



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

Dirección de Postgrado

Facultad de Ciencias Biológicas - Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas

Área Biología Celular y Molecular

**“Caracterización de la función de las proteínas HMGB
sobre la actividad de los complejos remodeladores de
cromatina dependientes de ATP”**

TESIS DOCTORAL PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

POR

MATÍAS IGNACIO HEPP CASTRO
CONCEPCIÓN - CHILE

-2013-

Profesor Guía: Dr. **José Leonardo Gutiérrez Contreras**

Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular

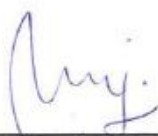
Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

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

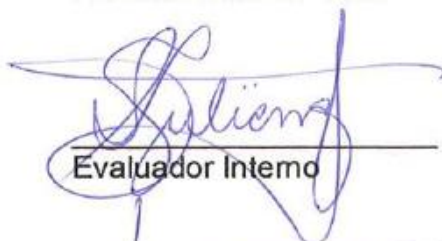
COMISIÓN EXAMINADORA:

Prof. José Gutiérrez C.
Facultad de Ciencias Biológicas



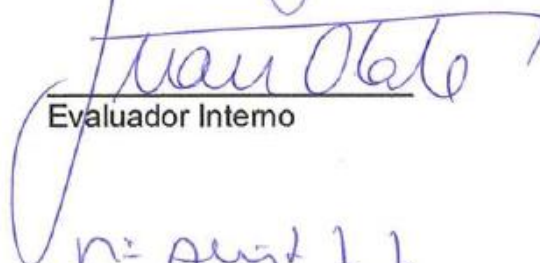
Profesor Guía de Tesis

Prof. Soraya Gutiérrez G.
Facultad de Ciencias Biológicas



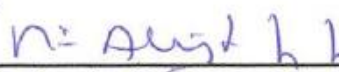
Evaluador Interno

Prof. Juan Olate A.
Facultad de Ciencias Biológicas



Evaluador Interno

Prof. Alejandra Loyola P.
Fundación Ciencia para la Vida



Evaluador Externo

Prof. José Guzmán G.
Facultad de Ciencias Biológicas



Director de Programa

Esta tesis doctoral fue realizada con el apoyo de CONICYT mediante las siguientes becas.

- Beca Doctorado marzo 2008-agosto 2012 (incluye extensión), folio 21080369
- Beca de apoyo a la realización de tesis de doctorado 2010-2011, folio 24100076
- Beca de pasantía en el extranjero 2011, folio 75110059

Esta tesis doctoral se realizó también con el financiamiento de FONDECYT.

-Proyecto FONDECYT 1130818 del Dr. José Leonardo Gutiérrez Contreras.

INDICE

	<u>Página</u>
ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABLAS	8
ABREVIACIONES	9
RESUMEN	10
ABSTRACT	12
1.- INTRODUCCIÓN	14
1.1.- Compactación del ADN	14
1.2.- Complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP	19
1.3.- Proteínas HMGB	24
1.4.- Proteínas HMGB y remodelación de cromatina dependiente de ATP	27
1.5.- Hipótesis	30
1.6.- Objetivo General	31
1.6.1.- Objetivos Específicos	31
2.- MATERIALES Y MÉTODOS	33
2.1.- Análisis <i>in silico</i> de las regiones codificantes.	33
2.2.- Medios y cepas de levadura.	33
2.3.- Aislamiento de fragmentos de ADN desde geles de agarosa.	34
2.4.- Aislamiento de ADN genómico desde levaduras.	34
2.5.- Preparación de extractos totales de levaduras.	35
2.6.- Obtención de ADN plasmidial.	35
2.7.- Transformación de bacterias competentes.	36
2.8.- Clonamiento y subclonamiento.	36
2.9.- Generación de la secuencia para arreglos nucleosomales.	38
2.10.- Purificación de proteínas recombinantes con el epítipo His.	39
2.11.- SDS-PAGE y Western blot.	40
2.12.- Tinción con plata.	41
2.13.- Extracción orgánica y precipitación de ADN.	42

2.14.- Marcaje de oligonucleótidos y arreglo nucleosomal con [γ -32P]-ATP.	43
2.15.- Sondas 601 para reconstitución nucleosomal.	44
2.16.- Aislamiento y purificación de oligonucleosomas cortos (SON) y largos (LON).	45
2.17.- Reconstitución nucleosomal.	47
2.18.- Purificación de complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP.	48
2.18.1.- Purificación en tándem.	48
2.18.2.- Purificación con el epítoto Flag.	50
2.19.- Ensayos de unión para Gal4-VP16 y las HMGB a ADN y nucleosomas.	51
2.20.- Ensayos de remodelación nucleosomal.	52
2.20.1.- Ensayo de <i>sliding</i> en ausencia de factor de transcripción.	52
2.20.2.- Ensayo de transferencia de histonas.	52
2.20.3.- Ensayo de desalojo del octámero de histonas.	53
2.20.4.- Ensayo de accesibilidad a enzimas de restricción	54
2.20.5.- Ensayo de remodelación de un arreglo nucleosomal	54
2.21.- Ensayo de hidrólisis de ATP.	55
2.22.- Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP Assay).	55
2.23.- Inmunoprecipitación de cromatina acoplada a microarreglo (ChIP-chip).	59
2.24.- Análisis <i>in silico</i> de la región promotora de genes específicos.	62
2.25.- Posicionamiento nucleosomal por digestión con Nucleasa Micrococcal	63
2.26.- PCR en tiempo real o cuantitativo (qPCR).	65
3.- RESULTADOS	67
3.1.- Analizar la estimulación de la actividad remodeladora de complejos dependientes de ATP del tipo ISWI y SWI/SNF de levadura dada por proteínas HMGB.	67
3.1.1.- Generación, purificación y cuantificación de las proteínas recombinantes HMGB silvestres unidas al epítoto His.	67
3.1.2.- Reconstitución de mononucleosomas y arreglos nucleosomales a partir de secuencias de ADN posicionadoras de nucleosomas marcadas radioactivamente.	73
3.1.3.- Unión de las proteínas recombinantes HMGB silvestres y el factor de transcripción quimérico Gal4-VP16 a ADN y mononucleosomas reconstituidos <i>in vitro</i> .	81

3.1.4.- Efecto de las proteínas HMGB sobre los diferentes tipos de remodelación nucleosomal generados por los complejos remodeladores dependientes de ATP.	85
3.1.5.- Efectos de las proteínas HMGB sobre la remodelación en el contexto de un arreglo nucleosomal.	99
3.2.- Estudiar los mecanismos involucrados en la estimulación de remodelación nucleosomal dada por proteínas HMGB de levadura.	102
3.2.1.- Generación, purificación y cuantificación de las proteínas recombinantes HMGB mutante y quiméricas unidas al epítipo His.	102
3.2.2.- Unión de las proteínas recombinantes HMGB deleción y quiméricas al ADN y a los mononucleosomas reconstituidos.	106
3.2.3.- Análisis comparativo del efecto de las proteínas HMGB silvestres y quimeras sobre la acción remodeladora del complejo SWI/SNF.	109
3.2.4.- Efecto de las diferentes proteínas HMGB silvestres, mutantes o quiméricas sobre la unión de los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP al ADN o mononucleosomas.	111
3.2.5.- Influencia de las proteínas HMGB sobre la hidrólisis de ATP de los complejos remodeladores.	115
3.3.- Analizar la influencia de las proteínas HMGB sobre la remodelación de cromatina in vivo.	117
3.3.1.- Influencia de las proteínas Nhp6 y Hmo1 sobre la presencia del complejo SWI/SNF en regiones promotoras del genoma completo de levadura.	117
3.3.2.- Efecto de las proteínas HMGB sobre el posicionamiento de nucleosomas en promotores de genes específicos.	133
4.- DISCUSIÓN	144
4.1.- Estudio de la influencia de proteínas HMGB sobre la actividad remodeladora <i>in vitro</i> .	144
4.1.1.- Establecimiento del sistema de estudio <i>in vitro</i> .	145
4.1.2.- Proteínas HMGB y su acción sobre la actividad remodeladora.	146
4.1.3.- Caracterización del mecanismo de estimulación <i>in vitro</i> de las proteínas HMGB.	150

4.2.- Influencia de las proteínas HMGB de levadura sobre la acción de SWI/SNF <i>in vivo</i> .	152
4.2.1.- Análisis del posicionamiento de SWI/SNF y las HMGB en genoma de levadura.	152
4.2.2.- Análisis de los genes regulados por SWI/SNF y con presencia física de Snf5.	153
4.2.3.- Análisis del posicionamiento nucleosomal afectado por SWI/SNF y las proteínas HMGB.	154
 5.- CONCLUSIONES	 157
 6.-MODELOS	 159
 7.- ANEXOS	 162
1.- Cepas de levadura utilizadas.	162
2.- Cepas de bacterias utilizadas.	162
3.- Vectores utilizados.	162
4.- Vectores generados.	162
5.- Programas utilizados.	163
6.- Oligonucleótidos clonamiento HMGBs recombinantes.	163
7.- Oligonucleótidos confección arreglo nucleosomal.	164
8.- Oligonucleótidos utilizados en análisis de mononucleosomas.	165
9.- Oligonucleótidos control cepas levadura ChIP o ensayo MNasa.	165
10.- Oligonucleótidos ChIP.	166
11.- Oligonucleótidos posicionamiento nucleosomal.	166
 REFERENCIAS	 168

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1: Esquema representativo de los niveles de compactación de la cromatina en eucariontes.	16
Fig. 2: Representación esquemática del primer nivel de compactación de la cromatina.	18
Fig.3: Esquema ilustrativo de los cuatro mecanismos generales de remodelación de los complejos remodeladores de cromatina dependientes de hidrólisis de ATP.	21
Fig. 4: Representación esquemática de algunas proteínas HMGB.	29
Fig. 5: Comparación de las proteínas HMGB utilizadas en este trabajo.	68
Fig. 6: Generación de vectores de expresión procarionte para las proteínas HMGB.	70
Fig. 7: Purificación de las proteínas HMGB.	72
Fig. 8: Obtención de los fragmentos de ADN para reconstituir mononucleosomas.	74
Fig. 9: Obtención de arreglos nucleosomales 601x6.	76
Fig. 10: Obtención y purificación de oligonucleosomas de células HeLa.	78
Fig. 11: Obtención de la reconstitución de los diferentes probadores de ADN.	80
Fig. 12: Análisis de la unión de las proteínas HMGB a ADN y mononucleosoma.	83
Fig. 13: Unión de la proteína Gal4-VP16 a mononucleosomas.	84
Fig. 14: Purificación del complejo SWI/SNF por cromatografía de afinidad en tándem.	87
Fig. 15: Purificación del complejo SWI/SNF por cromatografía de afinidad al epítipo Flag.	88
Fig. 16: Análisis de la actividad remodeladora de cromatina dependiente de ATP por las proteínas HMGB.	90
Fig. 17: Efecto de las proteínas HMGB sobre la actividad de transferencia del octámero de histonas.	92
Fig. 18: Efecto de las proteínas HMGB sobre la actividad de desensamble nucleosomal y el sliding de SWI/SNF.	95
Fig. 19: Análisis de la unión y la actividad de SWI/SNF.	96
Fig. 20: Efecto de las proteínas HMGB sobre la accesibilidad del ADN nucleosomal en la actividad de remodelación.	98
Fig. 21: Análisis de la digestión de un arreglo nucleosomal (601x6_Gal4cent).	101
Fig. 22: Análisis de los vectores de expresión procarionte para las proteínas HMGB quimeras y mutante de delección.	104

Fig. 23: Purificación de las proteínas HMGB quimeras y mutante de delección.	105
Fig. 24: Análisis de la unión de las proteínas HMGB quimeras y mutante de delección a ADN y mononucleosomas.	108
Fig. 25: Análisis de la actividad remodeladora de cromatina dependiente de ATP por las proteínas HMGB quimeras y delección.	110
Fig. 26: Efecto de las proteínas HMGB sobre la unión directa o el reclutamiento del complejo SWI/SNF a mononucleosoma.	113
Fig. 27: Efecto de las proteínas HMGB silvestres y mutantes sobre la unión del complejo SWI/SNF a mononucleosomas.	114
Fig. 28: Efecto de las proteínas HMGB sobre la hidrólisis de ATP generada por SWI/SNF.	116
Fig. 29: Análisis genético y de expresión de las cepas de levadura para su uso en estudios de ChIP y posicionamiento nucleosomal.	119
Fig. 30: Análisis de la presencia física de proteínas HMGB en promotores de genes selectos por ChIP-qPCR.	121
Fig. 31: Análisis de la presencia física de Snf5 en promotores de genes selectos por ChIP-qPCR, en función de la presencia o ausencia de proteínas HMGB.	122
Fig. 32: Normalización de los datos del análisis de ChIP-chip para proteínas TAP y Snf5.	125
Fig. 33: Perfil de enriquecimiento de SWI/SNF (Snf5) en los genes de levadura (<i>S. cerevisiae</i>).	127
Fig. 34: Perfil de enriquecimiento de las proteínas TAP-HMGB de levadura y Snf5.	128
Fig. 35: Perfil de ocupancia de Snf5 en genes con reducción de enriquecimiento entre silvestre y delección.	131
Fig. 36: Perfil de enriquecimiento de SWI/SNF (Snf5) y proteínas HMGB-TAP de levadura en los genes con reducción significativa de SWI/SNF en las cepas mutantes.	132
Fig. 37: Análisis de agrupaciones de genes por Diagramas de Venn.	136
Fig. 38: Estandarización de digestión de cromatina con MNasa para el análisis de posicionamiento nucleosomal.	138
Fig. 39: Análisis por PCR de los genes seleccionados para el análisis de posicionamiento nucleosomal.	140
Fig. 40: Análisis del perfil de posicionamiento nucleosomal y localización de Snf5 en los genes SAG1, RPS22a y MRP21.	143

- Fig. 41:** Modelo del efecto de las proteínas HMGB sobre la remodelación nucleosomal in vitro. 160
- Fig. 42:** Modelo del efecto de las proteínas HMGB sobre la remodelación de cromatina in vivo. 161

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Subunidades que conforman los complejos del tipo SWI/SNF e ISWI de levadura.	23
--	----

ABREVIACIONES

AA	Acrilamida/bis-acrilamida (poliacrilamida)
ADN o DNA	Ácido Desoxiribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
EMSA	Ensayos de retardo electroforético
ca	Cola Ácida/Básica
ChIP	Chromatin Immunoprecipitation
ChIP-chip	Chromatin immunoprecipitation acoplado a un microarreglo
dNTP	Deoxirribonucleótidos trifosfato
Hmo1	High MObility 1
HMG	High Mobility Group
HMGB1	High Mobility Group B1
IP	Inmunoprecipitación
ISW1	Imitation Switch 1
kDa	kilo Dalton
Log2	Logaritmo en base 2
LON	Oligonucleosomas Largos
MNasa	Nucleasa Micrococcal
Nhp6	Non Histone Protein 6
p.b.	Pares de Base
PM	Peso Molecular
qPCR	PCR en tiempo real
RSC	Remodels the Structure of Chromatin
SON	Oligonucleosomas Cortos
SSDNA	ADN de esperma de salmón
SWI/SNF	SWItching defective/Sucrose Non Fermenting
WT	Wild Type (Silvestre)

RESUMEN

La compactación del ADN en la cromatina es fundamental en la organización y utilización del genoma. Los nucleosomas son la unidad básica de la cromatina, su formación y desensamble es un proceso dinámico, el que ocurre esencialmente por acción de los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP. Uno de estos es SWI/SNF (SWItching defective/Sucrose Non Fermenting), que posee la capacidad de desplazar en *cis* el octámero de histonas (*sliding*) y de transferir octámeros entre distintos segmentos de ADN. Asociado a esta última actividad se describe un fenómeno denominado *eviction*, consistente en el desensamble de un nucleosoma.

Se ha descrito la existencia de factores que incrementan la actividad remodeladora de los complejos dependientes de ATP. En este sentido, estudios realizados con una proteína nuclear no histona, denominada HMGB1 (High Mobility Group B1), apuntan a que esta proteína interacciona con el ADN próximo a los nucleosomas y facilita la actividad de ciertos complejos remodeladores de cromatina. Sin embargo, se desconocen los efectos de proteínas de este tipo sobre las distintas actividades catalíticas de estos complejos.

Con el objeto de profundizar el conocimiento sobre los factores responsables de modular la actividad de complejos remodeladores dependientes de ATP, la presente tesis abordó el estudio del efecto de proteínas del tipo HMGB sobre la actividad de SWI/SNF. Con este propósito se generaron proteínas HMGB silvestres recombinantes de humano y levadura, más mutantes de estas últimas. Las proteínas con las que se trabajó fueron Nhp6A, Nhp6B, Hmo1 (levadura) y HMGB1 (humana). Como sustrato de la actividad remodeladora se reconstituyó mononucleosomas sobre segmentos de ADN marcados radioactivamente. Se estudió la

influencia de las proteínas HMGB sobre la actividad remodeladora de SWI/SNF de levadura y sobre la acción conjunta del factor de transcripción Gal4-VP16 y SWI/SNF. Además se evaluó los efectos de estas proteínas sobre la unión de SWI/SNF al ADN y sobre el grado de hidrólisis de ATP que realiza este complejo durante su acción. Finalmente se realizaron estudios de ChIP-chip con el fin de analizar el reclutamiento de SWI/SNF a promotores específicos en función de la presencia o ausencia de las proteínas HMGB estudiadas. También se analizó el enriquecimiento de estas proteínas en el genoma completo de levadura. Posterior a esto, se analizó si en función de la presencia o ausencia de estas proteínas HMGB se altera el posicionamiento de nucleosomas en regiones promotoras de determinados genes.

Nuestros estudios *in vitro* demuestran que las proteínas HMGB de levadura estimulan la actividad de complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP. Además nos permitieron entender parcialmente el mecanismo por el cual estarían actuando las HMGB sobre estos complejos. Los análisis *in vivo* permitieron observar que las proteínas HMGB afectan la permanencia del complejo SWI/SNF en regiones reguladoras de diversos genes, con un impacto en la estructura cromatínica de estas regiones.

ABSTRACT

DNA compaction into chromatin is a central element of genome organization and utilization. The nucleosome is the basic unit of chromatin, its formation and disassembly is a dynamic process, which occurs essentially by the action of ATP-dependent chromatin remodeling complexes. One of these complexes is SWI/SNF (SWItching defective/Sucrose Non Fermenting), which has the ability to move the histone octamer by sliding and by histone octamer transfer between two different DNA fragments. A phenomenon called eviction has been associated to the latter type of activity and involves nucleosome disassembling.

Recent studies have described a number of factors which enhance the activity of ATP-dependent chromatin remodeling complexes. To this respect, studies performed with a nuclear non-histone protein, called HMGB1 (High Mobility Group B1), pointed that this protein would be able to interact with DNA in the proximities of the nucleosome, facilitating the sliding activity of some chromatin remodeling complexes. However, the effects of this kind of proteins on the different actions of these complexes remain unknown.

In order to deepen the understanding factors influencing the activity of ATP-dependent chromatin remodeling complexes, this thesis work was dedicated to study the influence of yeast HMGB proteins on SWI/SNF activity. With this purpose we generated recombinant HMGB wild type proteins of human and yeast origin, plus mutant versions of the yeast proteins. The proteins used in our study were Nhp6A, Nhp6B, Hmo1 (yeast) and HMGB1 (human). As a substrate of remodeling activity we reconstituted mononucleosomes on radioactively labeled DNA segments. We studied how yeast HMGB proteins influence the remodeling activity of ySWI/SNF and the combined action of the chimeric transcription factor Gal4-VP16 and

SWI/SNF. Further, we evaluated the effects of these proteins on SWI/SNF binding to DNA and on the extent of ATP hydrolysis of this complex during its action. Finally, we performed ChIP-chip assays to study the physical association of SWI/SNF to gene regulatory regions in dependence of the presence or absence of the yeast HMGB proteins studied. We also studied the genome-wide relative enrichment of these HMGB proteins. Afterwards, we analyzed whether nucleosome positioning in certain gene promoters is dependent on the presence of these HMGB.

Our *in vitro* studies demonstrate that yeast HMGB proteins enhance the activity of ATP-dependent chromatin remodeling complexes. Additionally, allowed us to partially elucidate the mechanism by which these HMGB proteins would be acting on the activity of remodeling complexes. Our *In vivo* analyzes revealed that HMGB proteins affect the physical presence of SWI/SNF on several gene regulatory regions, with a consequent impact on chromatin structure of these regions.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Compactación del ADN.

El material genético en los eucariontes es longitudinalmente muy extenso para caber en el núcleo de una célula. En los humanos el ADN nuclear suma una longitud aproximada de 2 m y debe compactarse para estar dentro del núcleo que mide 10 μ m aprox., (Längst and Becker, 2004). Es por esto que debe compactarse sobre 10.000 veces para entrar en el volumen límite del núcleo (Nemeth and Längst, 2004), lo que además implica que el material genético deba ser una maquinaria muy dinámica, en la cual los procesos de condensación y descondensación del ADN son de vital importancia. Esta compactación se hace posible al encontrarse el ADN en la forma de un complejo nucleoproteico denominado cromatina.

La cromatina posee diferentes estados de compactación. El primer nivel corresponde a su estructuración en nucleosomas, que son la unidad básica de la cromatina, los cuales están conformados por ocho proteínas centrales que forman un octámero, 180-200 pb de ADN y una proteína conectora (Ramakrishnan, 1997). El core del nucleosoma está conformado por 147 pares de bases de ADN enrollado hacia la izquierda alrededor de un octámero de proteínas básicas denominadas histonas (H2A, H2B, H3 y H4) (Kornberg and Lorch, 1999), el cual se conforma en su parte central por un tetrámero H3-H4 y por la parte periférica por dos dímeros H2A-H2B. Del ADN nucleosomal, 121 pb internos se asocian al tetrámero H3/H4 y el resto del ADN nucleosomal se une a los dos dímeros H2A/H2B, produciéndose interacciones entre las histonas y la curvatura menor del ADN cada 10,2 pb aproximadamente. Lo anterior genera alrededor de 14 *clusters* o grupos de interacciones del tipo electroestáticas, puentes de

hidrógeno y no polares con el ADN, que lleva a formar uno de los complejos proteína-ADN más estables (Luger et al., 1997; Morales et al., 2001; Richmond and Davey, 2003; Li et al., 2007; Cairns, 2007). En el core nucleosomal el ADN envuelve al octámero de histonas 1,65 veces, generándose una compactación del ADN de unas 7 veces (Richmond and Davey, 2003). Cabe mencionar que cerca del 80% del ADN genómico se encuentra como ADN nucleosomal (Nemeth and Längst, 2004). El siguiente nivel de compactación corresponde a la denominada fibra de 30 nm, para la cual es esencial la presencia de la proteína conectora, en el nucleosoma. Sin embargo, su estructuración no está completamente dilucidada, existiendo hasta hoy dos teorías al respecto: un modelo explica que los nucleosomas se van ordenando uno al lado del otro (solenioide) y la otra dice que estos se ordenan en zig-zag para generar este grado de compactación (Daban, 2000; Woodcock and Dimitrov, 2001; Khorasanizadeh, 2004). Luego se encuentran varios niveles de compactación superior que corresponden primero al cromonema (fibra de 60 a 130 nm de diámetro) (Belmont and Bruce, 1994); estructura que se pliega sobre sí misma y se une a proteínas *scaffold* formando las cromátidas (fibra de 300 a 700 nm). Finalmente, el mayor nivel de compactación que puede alcanzar la cromatina corresponde al cromosoma metafásico (estructura de 1400 nm de grosor) (Wolffe, 1998) (Figura 1).

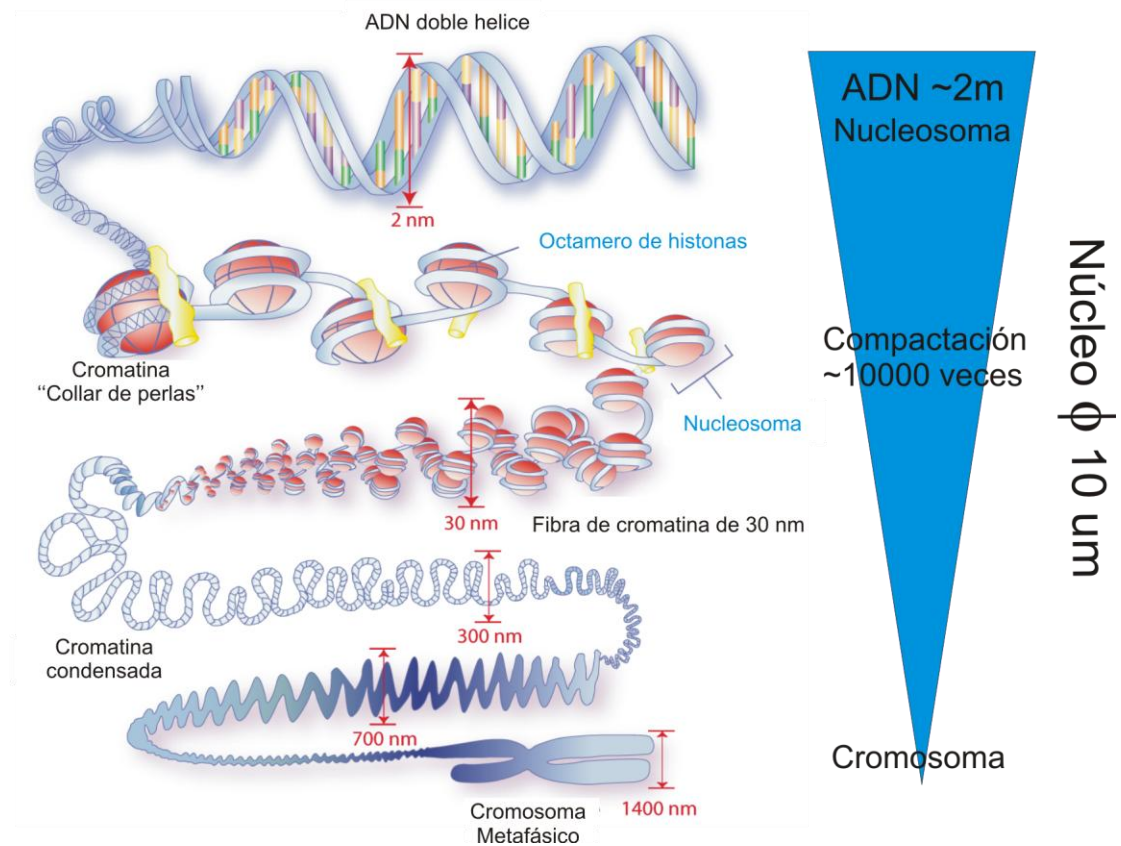


Figura 1: Esquema representativo de los niveles de compactación de la cromatina en eucariontes. Adaptado de The Cheung Lab, The Cancer-Chromatin Connection.

En la cromatina, existe ADN libre entre los diferentes nucleosomas que la forman. Este ADN es el que conecta un core nucleosomal con otro y se denomina ADN conector o linker. Este ADN tiene una longitud muy variable, que va entre 10 y más de 140 pares de bases en eucariontes superiores (Kornberg and Lorch, 1999; Horn and Peterson, 2002; Nemeth and Längst, 2004). Estos segmentos corresponden a zonas más accesibles del ADN. Además, es gracias a este ADN que los nucleosomas pueden plegarse para formar una fibra más compacta con un diámetro de ~30 nm (Daban, 2000). Para formar la fibra de 30 nm, el nucleosoma es estabilizado por la interacción de la proteína conectora, la cual es la quinta histona, denominada H1 (Horn and Peterson, 2002). Esta histona “conectora” interacciona con el ADN entrante y saliente del core nucleosomal, proceso que es muy dinámico en términos de asociación y disociación de esta histona y el nucleosoma (Zhou et al, 1998; Misteli et al., 2000). Además, se ha descrito una estructura denominada cromatosoma, la cual consiste en 167 pb de ADN, el octámero de histonas y la histona conectora (Simpson, 1978; Felsenfeld and Groudine, 2003; Ramakrishnan, 1997) (Figura 2).

La activación de la transcripción es un fenómeno que regularmente incluye una etapa de remodelación de la cromatina en las regiones promotoras de los genes. Esta remodelación permite la asociación de factores de transcripción específicos y generales que permitan dar inicio a la transcripción. En esta remodelación participan complejos proteicos denominados de forma genérica modificadores de cromatina, dentro de los que encontramos a los complejos remodeladores dependientes de ATP.

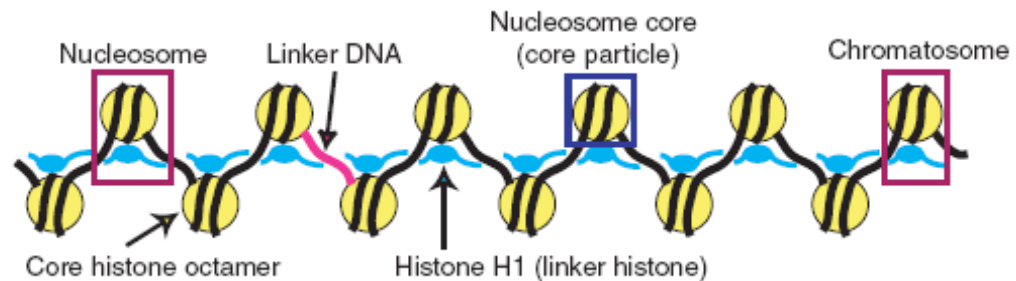


Figura 2: Representación esquemática del primer nivel de compactación de la cromatina. En negro la hebra de ADN, rosado un ejemplo de ADN conector, amarillo el octámero de histonas y en celeste la histona H1. Se señala la unidad fundamental de la cromatina, el nucleosoma, el cual consta de entre 180 y 200 pb de ADN, un octámero de histonas y la histona H1. Se destaca también el core nucleosomal, formado por el octámero de histonas y 147 pb de ADN, y el cromatosoma que comprende 167 pb de ADN, el octámero de histonas y la histona H1 (Tomado de Lusser and Kadonaga, 2004).

1.2.- Complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP.

Los complejos modificadores de cromatina se dividen en dos grupos: los complejos de modificación covalente de histonas y los complejos remodeladores dependientes de ATP. Ambos pueden alterar la estabilidad de la estructura existente entre ADN e histonas, utilizando los últimos la energía de la hidrólisis de ATP para ejercer esta acción (Becker and Horz, 2002). Son estos complejos dependientes de ATP en los que está centrado nuestro estudio.

Los complejos remodeladores dependientes de ATP pueden mediar diferentes procesos para alterar la estructura cromatínica y permitir la exposición de zonas del ADN, que en algunos casos producen activación transcripcional (Felsenfeld and Groudine, 2003). Entre estos procesos están: 1) *Sliding* o desplazamiento de nucleosomas, en el cual la posición de un nucleosoma cambia dentro de la misma hebra de ADN. 2) *Looping* o desenrollamiento del ADN sobre el octámero de histonas, permitiendo que el ADN nucleosomal sea más accesible a los factores regulatorios. 3) *Eviction* o desensamble del nucleosoma, consistente en la transferencia del octámero a una hebra de ADN diferente o a chaperonas de histonas. 4) *Exchange* o intercambio de dímeros de histonas H2A-H2B, entre el mismo tipo de histonas o por variantes de éstas (Wang et al., 2007; Gangaraju and Bartholomew, 2007; Clapier and Cairns, 2009) (Figura 3).

Se han descrito 4 diferentes subfamilias de complejos remodeladores, los que son agrupados y definidos por las características estructurales de la subunidad con actividad ATPasa dentro de cada complejo. Estas subunidades catalíticas poseen un dominio común, que está formado por dos motivos: el que genera la hidrólisis del ATP (DExx) y el dominio helicasa (HELICc), separados por una región de inserción. Estas subfamilias son: del tipo SWI/SNF (SWItching defective/Sucrose Non Fermenting), del tipo ISWI (Imitation Switch), del tipo CHD

(chromodomain, helicase, DNA binding) y del tipo INO 80 (inositol requiring 80) (Saha et al., 2006; Wang et al., 2007; Clapier and Cairns, 2009). Este trabajo de tesis está enfocado en el estudio de los complejos del tipo ISWI y SWI/SNF de levadura.

SWI/SNF (Cote et al., 1994; Imbalzano et al., 1994) es un complejo multiproteico de aproximadamente 1-2 MDa, el cual consiste de cerca de 11 subunidades, aislado originalmente de levaduras. Diversos estudios mostraron que la delección de algunos de los genes de las subunidades del complejo llevaban a una alteración en la estructura cromatínica, estableciendo el nexo entre este tipo de complejos y la regulación estructural de la cromatina. En levaduras se ha descrito un segundo tipo de complejos de la subfamilia SWI/SNF, denominado RSC (Remodels the Structure of Chromatin), el cual posee aproximadamente 15 subunidades. A diferencia de los complejos SWI/SNF, la presencia de RSC es necesaria para la viabilidad celular (Cairns et al., 1996). Entre SWI/SNF y RSC existe alta similitud estructural o de secuencia en las subunidades ATPasa, las cuales son Swi2/Snf2 y Sth1, respectivamente. Además Rsc8, Rsc6 y Sfh1 en RSC corresponden a las subunidades Swi3, Swp73 y Snf5 en SWI/SNF (proteínas homólogas) (Mohrmann et al., 2005) (Tabla 1). La subunidad catalítica de los complejos de esta subfamilia posee, además del dominio ATPasa, un dominio HSA (helicasa-SANT), un post-HSA y un bromodominio C-terminal (Cairns et al., 1998).

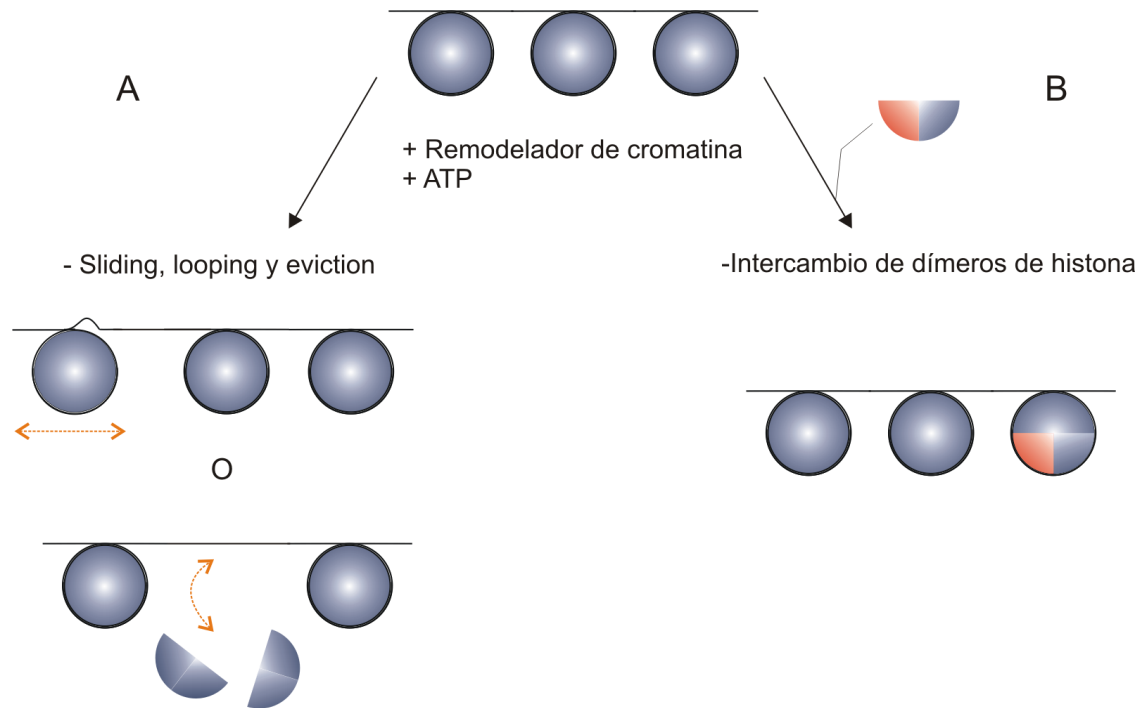


Figura 3: Esquema ilustrativo de los cuatro mecanismos generales de remodelación de los complejos remodeladores de cromatina dependientes de hidrólisis de ATP. a) El primero involucra la utilización de la energía de la hidrólisis del ATP para generar cambios, como *sliding* (desplazamiento en *cis* de nucleosomas), *looping* (desenrollamiento del ADN sobre el octámero de histonas) o *eviction* (desensamble del nucleosoma). b) El segundo se refiere a la utilización de esta energía para provocar un intercambio de dímeros de histonas, como H2A-H2B o variantes de éstas (Adaptado de Wang et al., 2007).

El complejo SWI/SNF posee la capacidad de mover octámeros de histonas a lo largo de la doble hebra de ADN (sliding) (Whitehouse et al., 1999) y también de transferir octámeros de histonas entre distintos segmentos de ADN (actividad de transferencia de histonas) (Lorch et al., 1999). Asociado a la transferencia de octámeros se encuentra el fenómeno de *eviction* o desalojo del octámero de histonas del nucleosoma. El destino de estas histonas puede ser la asociación con chaperonas de histonas y después con otro segmento de ADN (Reinke and Horz, 2003).

Por otra parte la subfamilia de complejos remodeladores de cromatina de tipo ISWI está representada por complejos proteicos de aproximadamente 0,4 MDa, de entre 2 y 3 subunidades, cuyos primeros miembros fueron descritos en *Drosophila*. Los complejos ISWI de esta especie fueron denominados dNURF (nucleosome remodeling factor, Tsukiyama and Wu, 1995), dCHRAC (chromatin accessibility complex, Varga-Weisz et al., 1997) y dACF (ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor, Ito et al. 1997). Se encontró que la subunidad catalítica de estos complejos poseía una similitud con la subunidad ATPasa de SWI/SNF (Elfring et al., 1994), por lo que se le denominó Imitation Switch (ISWI). En levadura se han descrito 2 proteínas ATPasas para esta subfamilia, siendo estas Isw1 e Isw2 (Tsukiyama et al., 1999), las que a su vez forman diferentes complejos, los que varían en el número de proteínas que los conforma. Para ISW1 existen dos isocomplejos, 1a y 1b, los cuales comparten la subunidad ATPasa (Isw1), pero difieren en las otras subunidades que las forman; ISW1a está formada además por Ioc3 e ISW1b por Ioc2 e Ioc4. Por otro lado ISW2 está conformada por la subunidad ATPasa (Isw2) e Itc1 (Vary et al., 2003) (Tabla 1). La subunidad ATPasa de esta subfamilia posee el dominio ATPasa característico de los complejos remodeladores dependientes de ATP, además de un dominio SANT y un dominio SLIDE, ambos hacia el C-terminal (Corona and Tamkun, 2004; Boyer et al., 2004).

Al igual que con SWI/SNF, a los complejos ISWI se les ha asociado la actividad de desplazamiento de histonas en *cis* (sliding) (Zofall et al., 2006), pero no se le ha relacionado con la actividad de transferencia de histonas ni con el intercambio de histonas.

Se ha demostrado que la actividad remodeladora producida por complejos de la subfamilia SWI/SNF puede ser modulada por algunos factores de transcripción, como es el caso del factor quimérico Gal4-VP16, que posee el dominio de unión al ADN de Gal4 y el dominio de transactivación de VP16. Se ha observado que Gal4-VP16, aparte de poder reclutar al complejo SWI/SNF hacia un nucleosoma particular, potencia en el complejo su actividad de eviction por sobre su actividad de sliding (Gutiérrez et al., 2007). Por otra parte, estudios realizados con una proteína nuclear no histona humana, denominada HMGB1 (High Mobility Group B1, Stros et al., 2007), mostraron que ésta interacciona con ADN conector entre los nucleosomas y en este contexto es capaz de facilitar el desplazamiento que sobre ellos catalizan complejos remodeladores de cromatina del tipo ISWI (Bonaldi et al., 2002).

Tabla 1: Subunidades que conforman los complejos del tipo SWI/SNF e ISWI de levadura.

Especie, familia y composición	Levadura				
	SWI/SNF		ISWI		
Complejo	SWI/SNF	RSC	ISW1a	ISW1b	ISW2
ATPasa	Swi2/Snf2	Sth1	Isw1		Isw2
Subunidades no catalíticas	Swi1/Adr6				
	Swi3	Rsc8/Swh3			
	Swp73	Rsc6			
	Snf5	Sfh1			
	Arp7, Arp9				
Subunidades no catalíticas únicas	Swp82, Taf14, Snf6, Snf11	Rsc1 or Rsc2, Rsc3-5, 7, 9, 10, 30, Htl1, Ldb7, Rtt102	Ioc3	Ioc2, Ioc4	Itc2

1.3.- Proteínas HMG.

Descubiertas hace unos 40 años por Goodwin y colaboradores, primero fueron caracterizadas como un nuevo grupo de proteínas asociadas a cromatina, aisladas en presencia de 350 mM de NaCl, con un alto contenido de aminoácidos ácidos y básicos (~55 %). Debido a su migración electroforética éstas fueron denominadas como High Mobility Group (HMG), ya que migraban más rápido que las proteínas aisladas a dicha concentración salina en un gel de triton-urea en condiciones ácidas (pH ~2,4) (Goodwin and Johns, 1973; Goodwin et al., 1973).

Son proteínas que tienen una masa molecular máxima de 30 KDa. Después de las histonas, las proteínas HMG son las más abundantes de las proteínas nucleares y estarían cumpliendo un rol importante en la remodelación, ensamblaje de la cromatina y la regulación transcripcional de los genes. Sus efectos se relacionan a sus acciones de distorsión, flexión y modificación de la estructura del ADN (Bustin and Reeves, 1996; Bianchi and Beltrame, 2000; Agresti and Bianchi, 2003).

De estas proteínas se han descrito tres familias diferentes según su dominio de unión al ADN. La primera es la familia HMGA cuyos miembros poseen tres dominios denominados ganchos AT (AT Hook), por medio de los cuales se pueden unir a la curvatura menor del ADN rico en nucleótidos AT (Reeves et al., 1990). La segunda es la familia HMGN que presenta un dominio de unión a ADN nucleosomal, que confiere la capacidad de unirse a ADN del core nucleosomal (Birger et al., 2001). La tercera es la familia HMGB integrada por proteínas que tienen en su secuencia una o dos cajas HMG (HMG box A y B), la cual confiere unión a la curvatura menor del ADN sin una especificidad de secuencia y genera una flexión en la hebra de ADN (Weir et al., 1993). Además, algunos miembros de las tres familias HMG poseen una

región rica en aminoácidos básicos y ácidos, la cual podría interaccionar con las histonas y el ADN del nucleosoma neutralizando las cargas, los aminoácidos con carga negativa a las histonas y los con carga positiva a la hebra de ADN (Bustin, 2001; Travers, 2003; Zhang and Wang, 2008). En el contexto de esta tesis profundizaremos en la familia HMGB ya que, como se mencionó previamente, en estudios anteriores proteínas de esta familia han sido relacionadas con la acción de complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP.

Las proteínas de la familia HMGB son apenas 10 veces menos abundantes que las histonas, existiendo entre 10^5 y 10^6 moléculas por célula en eucariontes superiores. Esto equivale aproximadamente a 1 molécula cada 10 nucleosomas; además están presentes en todos los eucariontes (Müller et al., 2001; Travers, 2003). Estas proteínas cumplen diferentes roles dentro de la célula. Es así como podrían ser importantes en la mantención de la heterocromatina, ya que en un ensayo de doble híbrido se encontró que HMGB2, integrante de la familia HMGB humana, interacciona con SP100 y ésta a su vez lo hace con HP1 (heterochromatin protein 1) (Lehming et al., 1998). También se ha observado que en el proceso de apoptosis, HMGB1 humana puede unirse al ADN de forma irreversible, disminuyendo su movilidad. Esto se puede deber a que en apoptosis la cromatina se condensa y las histonas sufren una pérdida general de acetilación, modificación en general asociada a cromatina menos compacta (Scaffidi et al., 2002). Otra función importante es la que vincula a HMGB1 humana con la reparación de ADN directamente, visto en células expuestas a radiación UV, las cuales al no expresar (knock-out) esta proteína mostraban una disminución en su viabilidad y una mayor tasa de mutación (Lange et al., 2008). Además, cabe destacar que algunas de las proteínas HMGB son capaces de interaccionar con algunos factores de transcripción y aumentar su afinidad de unión a ADN (Bianchi and Beltrame, 2000). En este contexto, entre las funciones encontradas para proteínas

HMGB, destaca su participación en expresión génica. Al respecto, se observó que al generarse ratones knock-out para HMGB1, estos morían luego del nacimiento por una hipoglicemia, producto del defecto en el realce transcripcional del receptor de glucocorticoides (Calogero et al., 1999). También se ha observado que en levaduras que son knock-out para unas proteínas HMGB denominadas Nhp6 (Non Histone Protein codificadas en dos genes redundantes NHP6A y NHP6B, Kolodrubetz et al., 1988), se genera la disminución de la expresión del gen HO (Yu et al., 2000), así como del gen CHA1 en condiciones específicas (Moreira & Holmberg, 2000) y además se produce una sensibilidad térmica para crecer (Costigan et al., 1994). En levaduras, además de las proteínas Nhp6, existe una proteína ortóloga de HMGB1 humana denominada Hmo1 (High MObility), a la cual también se le ha atribuido participación en la mantención de la integridad de la cromatina, ya que estaría involucrada en el crecimiento y mantención de plásmidos exógenos en levaduras, así como en la protección de la cromatina a digestiones con nucleasa, todo observado en levaduras knock-out para esta proteína (Lu et al., 1996).

1.4.- Proteínas HMGB y remodelación de cromatina dependiente de ATP.

Existen estudios en los que se describe un vínculo entre algunas proteínas HMGB y los complejos remodeladores, las cuales estarían afectando la actividad de estos complejos. En este mismo contexto, y como se mencionó anteriormente, HMGB1 ha sido vinculada con la capacidad de modular el desplazamiento nucleosomal generado por algunos integrantes de la familia de complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP del tipo ISWI, como son ACF, CHRAC y ISWI humano (Bonaldi et al., 2002). Esto se podría generar producto de que los complejos remodeladores inicialmente generan un loop de ADN que se propaga sobre el nucleosoma (looping) para producir la remodelación. Por otra parte, las proteínas HMGB al unirse al ADN generan una torsión de éste, la cual podría facilitar la formación del loop y así modular la actividad de los complejos remodeladores (Bonaldi et al., 2002). Otros investigadores encontraron que un triple knock-out en levaduras de estas dos proteínas Nhp6 y Swi2 (subunidad de SWI/SNF) es letal (Biswas et al., 2004).

A pesar de que es sabido que las proteínas HMGB participan en la regulación de la expresión de determinados genes, se desconoce el efecto que estas proteínas puedan tener sobre la participación en regulación transcripcional que posee el complejo SWI/SNF. Además, los estudios *in vitro* realizados hasta ahora demuestran cómo HMGB1 humana afecta la unión y actividad de *sliding* de SWI/SNF de levadura, sin profundizar en los distintos efectos en la actividad remodeladora que posee SWI/SNF (Ugrinova et al., 2009). Particularmente, no existe información respecto a qué efectos puedan tener estas proteínas sobre la acción remodeladora conjunta que poseen factores de transcripción y los complejos remodeladores a los que reclutan. El presente proyecto tuvo por objeto abordar estas interrogantes.

En levadura, el modelo de estudio utilizado en esta tesis, existen 7 proteínas del tipo HMGB, de las cuales 3 son netamente nucleares (Kasahara et al, 2007). En este proyecto nos centraremos y trabajaremos con 4 proteínas HMGB: HMGB1 humana (Wen et al., 1989) a modo de control y tres HMGB de levadura de localización nuclear, Hmo1 (ortólogo de HMGB1) (Lu et al., 1996) y las dos proteínas Nhp6 (A y B) que poseen una sola caja HMG y no tienen cola básica ácida (Kolodrubetz et al., 1988) (Figura 4).

Considerando los antecedentes expuestos y debido a la importancia que tiene una correcta remodelación de cromatina en procesos como la transcripción del ADN, es que este trabajo de tesis propuso estudiar la influencia o el efecto que pueden tener las proteínas del tipo HMGB (High Mobility Group) en la remodelación de nucleosomas producida por complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP.

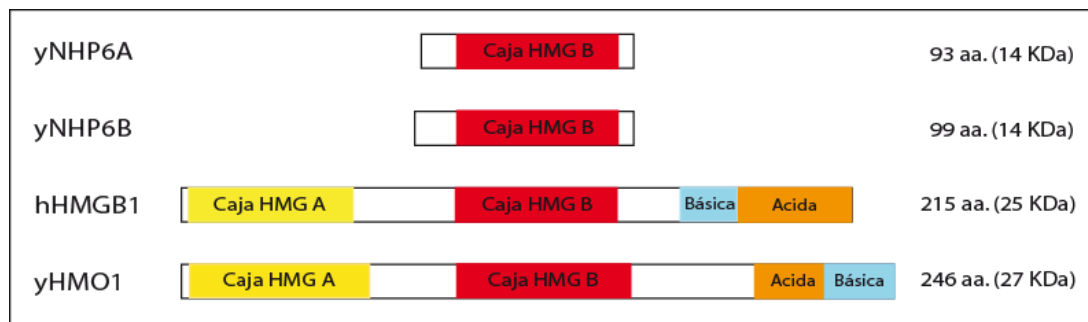


Figura 4: Representación esquemática de algunas proteínas HMGB. Se muestran las proteínas en orden según su número de residuos (aminoácidos), yNhp6A (14 KDa), yNhp6B (14 kDa), hHMGB1 (25 KDa) y yHmo1 (27 KDa). Se detalla en amarillo la caja HMG A, rojo la caja HMG B, celeste la región básica y en naranja la cola ácida (Adaptado de Lu et al., 1996).

1.5.- HIPÓTESIS

Basado en lo expuesto anteriormente se plantea la siguiente hipótesis de trabajo:

“Proteínas del tipo HMGB de levadura pueden estimular y modular la actividad de remodelación nucleosomal catalizada por el complejo remodelador de cromatina SWI/SNF de levadura”.

1.6.- OBJETIVO GENERAL

Determinar si proteínas HMGB de levadura pueden estimular y modular la actividad remodeladora de nucleosomas dependiente de ATP.

1.6.1.- Objetivos Específicos

1- **Analizar la estimulación de la actividad remodeladora de complejos dependientes de ATP del tipo ISWI y SWI/SNF de levadura dada por proteínas HMGB.** La consecución de este objetivo involucra primeramente obtener las secuencias codificantes para las proteínas HMGB de levadura en estudio, para así clonaras junto a un epítotope y poder realizar la purificación. También incluye reconstituciones de mononucleosomas utilizando secuencias de ADN posicionadoras de nucleosomas marcadas radioactivamente, con el afán de utilizar estos probadores para analizar la unión de las HMGB al ADN y el efecto de éstas sobre la actividad de los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP.

2- **Estudiar los mecanismos involucrados en la estimulación de remodelación nucleosomal dada por proteínas HMGB de levadura.** La realización de este objetivo contempla la obtención de quimeras y mutante de las proteínas HMGB de levadura en estudio y su purificación, para posteriormente analizar la unión de las quimeras y mutante de las HMGB al ADN y nucleosomas, además de estudiar su efecto sobre la actividad de los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP. Incluye además la comparación de la

variación que pueda existir entre las proteínas HMGB silvestres, quimeras y mutante sobre la unión de los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP al ADN o mononucleosomas, en adición al estudio de cómo podría ser afectada la hidrólisis de ATP por parte de los complejos remodeladores en presencia de las diferentes proteínas HMGB.

3- **Analizar la influencia de las proteínas HMGB sobre la remodelación de cromatina *in vivo*.** Este objetivo contempla el análisis de la presencia física de SWI/SNF y las proteínas HMGB en toda la extensión del genoma, a través de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) acoplado a la detección en microarreglos de genoma completo de levadura, centrando posteriormente el estudio en regiones promotoras de genes específicos, en los cuales su regulación es dependiente de SWI/SNF y donde la ocupancia esté relacionada con las proteínas HMGB. Involucra también la determinación del efecto que poseen las proteínas HMGB de levadura sobre el posicionamiento de nucleosomas en promotores de genes específicos por digestión con nucleasa micrococcal.

2.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.- Análisis *in silico* de las regiones codificantes.

Para llevar a cabo estos análisis se utilizaron bases de datos disponibles en internet y de acceso libre, uno para analizar los genomas de las especies estudiadas, “Ensembl Genome Browser”, disponible en <http://www.ensembl.org/index.html>. El otro fue utilizado específicamente para analizar el genoma de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), “Saccharomyces Genome Database”, disponible en <http://www.yeastgenome.org/>. Además se utilizó la base de datos del “GenBank”, con el fin de encontrar la secuencia consenso de la caja HMG. Los alineamientos de proteínas se realizaron con el servidor “ClustalW”.

2.2.- Medios y cepas de levadura.

Se cultivaron las diferentes cepas de levaduras (Anexo 1) en placa con medio sólido (agar) apropiado, se dejaron entre 2 y 3 días a 30°C hasta obtener una colonia de tamaño apropiado, luego una colonia aislada se inoculó inicialmente en 5 ml de medio líquido apropiado para cada cepa de levadura utilizada, se crecieron por 12-16 horas a 30 °C. El paso posterior de los cultivos varía dependiendo de los procedimientos o ensayos que se describen más adelante.

Luego, dependiendo del ensayo se inocularon 250 ml para ChIP (Costigan et al., 1994 y Dolinski & Heitman, 1999), 25 ml para el ensayo de MNasa y 20 ml transferido después a 6 L para purificación de proteínas (librería Stowers Institute, Dr Workman) de medio apropiado para cada cepa en una dilución 1/200 ó 1/100 del stock original, esto se cultivó a 30°C hasta

obtener un OD_{600 nm} entre 1,0 y 1,5. Cada cepa utilizada para el ensayo de ChIP o el ensayo de MNasa fue analizada por PCR con oligonucleótidos específicos (Anexo 9).

2.3.- Aislamiento de fragmentos de ADN desde geles de agarosa

El ADN se fraccionó en geles de agarosa (LONZA) de 0.8 a 2 % p/v en buffer TAE 1X o TBE 0.5X, conteniendo bromuro de etidio 0,5 ug/ml y realizándose la electroforesis a 1-5 V/cm. Los fragmentos se visualizaron bajo luz ultravioleta de baja intensidad y el trozo de agarosa que contenía el fragmento de ADN de interés se cortó con bisturí estéril. El ADN se extrajo desde la agarosa mediante resina de afinidad de acuerdo a las instrucciones del fabricante (QIAEX II, Qiagen).

2.4.- Aislamiento de ADN genómico desde levaduras.

Se crecieron las levaduras en placas con medio YPD sólido o medio YPD líquido. Luego se procedió ya sea desde medio sólido a resuspender una colonia de aproximadamente 20 ul o desde medio líquido el pellet de levaduras de 1 ml de cultivo líquido (OD₆₀₀ ~ 1), en 50 ul de Buffer de digestión (Sorbitol 0.9 M, EDTA 0.1 M, β-mercaptoetanol 14 mM & Zymolasa 0.4 mg/ml), incubando por 30 min. a 30°C y posteriormente se centrifugó y el sobrenadante fue desechado. Se agregaron 300 ul de esferas de vidrio de 0.45 - 0.6 um (Sigma G8772), 150 ul de TE pH8 0.1X y 150 ul de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), agitando con vortex por 1 min. a alta velocidad. Se separó el lisado de las esferas por centrifugación a 14000 rpm por 5 min. en microfuga, tomando el sobrenadante y finalmente éste se extrajo una vez más con un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se guardó el sobrenadante a -20°C. Se utilizó 1 ul de esta preparación en cada reacción de PCR realizada con este stock.

2.5.- Preparación de extractos totales de levaduras.

Los extractos se obtuvieron a partir de un cultivo de levadura de entre 5 y 10 ml con absorbancia de 1.0. Inicialmente se procedió a centrifugar las levaduras y dejar el pellet en hielo. Luego se resuspendió el pellet en 1 ml de buffer de lavado (Tris pH7.4 20 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100mM e inhibidores de proteasa (Sigma, P8215)) frío (4°C) y se centrifugó por 1 min. a 12000 rpm, se congeló el pellet en nitrógeno líquido o en -80°C, se dejó en hielo y se agregaron 100 ul (aproximadamente entre 1 y 2 vol del pellet) de buffer WCE (Tris pH8.0 50 mM, EDTA 5 mM, NaCl 500 mM, glicerol 5%, triton X-100 0.1%, DTT 2 mM, PMSF 1 mM e inhibidores de proteasa). Se agitó en vortex y se agregaron perlas de vidrio (Glass beads, Sigma G8772), dejando luego en hielo. Las muestras se agitaron en “bead beater” (Disruptor Genie, Scientific Industries) a 4°C, para romper las levaduras (8 veces con intervalos de 20 seg. encendido y 2 min. de descanso en hielo). Se centrifugó el lisado a 4°C por 10 min. a 14000 rpm en microfuga, recuperando el sobrenadante y centrifugándolo de nuevo a 4°C por 20 min. a 14000 rpm en microfuga, obteniendo finalmente entre 40 y 70 ul de extracto total. Los extractos fueron cuantificados mediante el ensayo “*Protein Assay*” (Bio-Rad), según indicación del fabricante comparando con una curva estándar de sero-albúmina de bovino (New England Biolabs).

2.6.- Obtención de ADN plasmidial.

El método utilizado fue el de extracción plasmidial por lisis alcalina con SDS combinado con purificación en columna, para así obtener ADN plasmidial de alta pureza. Esta se realizó a partir de 5 - 15 ml de medio de cultivo bacteriano (caldo LB-ampicilina) de *E. coli* DH5α con

los plásmidos correspondientes, crecido entre 12 y 16 horas a 37°C con agitación. Luego de esto se realizó la purificación con el kit E.Z.N.A. Plasmid Miniprep (OMEGA Bio-Tek) siguiendo lo descrito en el manual del kit.

2.7.- Transformación de bacterias competentes.

Se utilizaron bacterias de cepa *E. coli* DH5 α CaCl₂ competentes, para obtención de ADN plasmidial y la cepa BL-21 DE3, Codon plus, para la expresión de proteínas recombinantes. Se tomaron por separado 100 μ l de bacterias y se agregaron entre 10 y 100 ng de ADN plasmidial de interés, se mezcló suavemente y se incubó por 30 minutos en hielo. A continuación la mezcla se incubó por 90 segundos a 42°C para dejarlo posteriormente 2 minutos en hielo. Se adicionó 200 μ l de medio de cultivo (caldo LB) y se incubó a 37°C por 45 minutos con agitación constante. Posteriormente se sembró 100 μ l de la mezcla en placas con medio de cultivo sólido (agar LB-ampicilina 100 μ g/ml o LB-ampicilina 100 μ g/ml / cloranfenicol 27 μ g/ml) y se dejó entre 12 y 16 horas incubando en estufa a 37°C.

2.8.- Clonamiento y subclonamiento.

Las enzimas utilizadas fueron adquiridas a New England BioLabs y las condiciones de incubación fueron las recomendadas por el fabricante.

El plásmido destino (pQE-81L) fue linealizado por digestión con distintas combinaciones de enzimas de restricción. Los plásmidos linealizados de las diferentes digestiones se obtuvieron por electroforesis en gel de agarosa en buffer TAE 0.5X (cortando las bandas correspondientes al plásmido lineal). Los diferentes productos de PCR o insertos se

generaron desde ADN genómico de *Saccharomyces cerevisiae* para las regiones codificantes de las proteínas de levadura o parte de estas regiones en el caso de las construcciones quiméricas. En el caso de la obtención de la región codificante de la proteína HMGB1 humana (hHMGB1), la reacción de PCR se realizó a partir de un plásmido comercial (Invitrogen). Todas las reacciones de PCR se realizaron mediante la utilización de una ADN polimerasa de alta fidelidad (TaKaRa Ex Taq DNA polymerase, Clontech). Luego el ADN se extrajo utilizando el kit Qiaex II gel extraction (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los oligonucleótidos utilizados son específicos para cada gen (Anexo 6).

Para realizar la construcción de pQE-81_NHP6A, pQE-81_NHP6B y pQE-81_HMGB1, el producto de PCR (NHP6A, NHP6B y HMGB1) y el vector pQE-81L (Qiagen) fueron digeridos con las enzimas Sph I y Kpn I. Para la construcción de pQE-81_HMO1, se utilizaron las enzimas Sph I y Pst I. Las otras construcciones realizadas son una delección de HMO1, en cuyo caso se delecionó la región codificante para los residuos 212 a 247 de esta proteína, que corresponde a su cola ácida-básica (HMO1 Δ 212-247). Además se realizaron dos quimeras, que consistieron en la fusión de la región codificante de la cola ácida-básica de HMO1 con la secuencia codificante de NHP6A y NHP6B, por su extremo 3', resultando las construcciones codificantes para NHP6A_HMO1₍₂₁₂₋₂₄₇₎ y NHP6B_HMO1₍₂₁₂₋₂₄₇₎, respectivamente.

Para todas las ligaciones se utilizó la T4 DNA ligasa (New England BioLabs) y la razón molar a utilizar entre el vector y el inserto fue 1:2.

El producto de ligación se utilizó para transformar bacterias *E. coli* DH5 α competentes y luego se verificó la presencia de colonias recombinantes mediante lisis alcalina con SDS y posterior análisis de plásmidos con enzimas de restricción (ER). En estos casos, se utilizaron diferentes ER para analizar las construcciones: pQE-81_NHP6A (StyI), pQE-81_NHP6B

(NspI), pQE-81_HMO1 (HincII), pQE-81_HMGB1 (NdeI), pQE-81_NHP6A-HMO1₍₂₁₂₋₂₄₇₎ (SphI/AgeI y SphI/PstI), pQE-81_NHP6B-HMO1₍₂₁₂₋₂₄₇₎ (SphI/AgeI y SphI/PstI) y pQE-81_HMO1 Δ 212-247 (SphI/AgeI y SphI/PstI). Para el análisis de los fragmentos liberados por las diferentes enzimas se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1% TBE 0,5X teñido con BrEt. El mismo procedimiento se utilizó para corroborar las ligaciones internas de las quimeras y confirmar la ausencia del extremo C-terminal en la mutante.

2.9.- Generación de la secuencia para arreglos nucleosomales.

Se utilizó la secuencia posicionadora 601 (Lowary and Widom, 1998) proveniente del plásmido pGEM-3Z/601-Gal4 (Dr. Workman, Stowers Institute). Esta secuencia posicionadora fue obtenida mediante una doble digestión con NspI y NotI (148 pb). Para completar cada parte del arreglo se ligaron segmentos de 30 pb como ADN conector (con secuencias de corte únicas) en ambos extremos de las secuencias posicionadoras; cada repetición de la secuencia posicionadora más el ADN conector resultó con una extensión de 208 pb aproximadamente y fueron subclonados secuencialmente en el plásmido pGEM-3Z, utilizando las enzimas EcoRI y SacI para el 1°, SacI y XmaI para el 2°, XmaI y BamHI para el 3°, BamHI y PstI para el 4°, PstI y HindIII para el 5°, para finalmente obtener un arreglo nucleosomal con 5 repeticiones (pGEM-3Z/601x5). Mediante la inserción de variantes de una repetición adicional entre la secuencia posicionadora 3 y 4 (con las enzimas NheI y BglII) se generaron tres arreglos nucleosomales con 6 repeticiones de la secuencia posicionadora 601 (pGEM-3Z/601x6). Los oligonucleótidos utilizados son únicos y específicos para cada repetición (Anexo 7). Finalmente de estos plásmidos se obtuvieron los fragmentos de ADN con las 5 ó 6 repeticiones de la secuencia 601

por digestión con las enzimas de restricción EcoRI/HindIII. Los distintos fragmentos fueron marcados y reconstituidos como se explica más adelante en esta misma sección.

2.10.- Purificación de proteínas recombinantes con el epítoto His.

Resumidamente, una colonia de cepa BL-21 competente fue transformada con los diferentes constructos plasmidiales generados por separado. Las colonias positivas fueron crecidas en 5 ml de medio de cultivo LB-ampicilina (100 mg/ml), con incubación de 12 a 16 horas a 37°C, en agitación constante a 250 rpm. Luego 1 ml del cultivo se traspasó a un matraz con 100 ml de medio LB-ampicilina (100 ug/ml) y se incubó por entre 3 - 4 horas a una temperatura que varió entre 16°C y 30°C, dependiendo de la proteína a purificar. Esta incubación se extendió hasta alcanzar una OD₆₀₀ entre 0.5 - 0.6 y luego se indujo con isopropil β-D1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 200 uM por 3 horas con igual temperatura de crecimiento y agitación. Posteriormente el cultivo se centrifugó a 4000 g por 12 minutos a 4°C, y el pellet fue resuspendido en 20 ml de un buffer de lisis/lavado frío (Imidazol 20 mM, NaCl 300mM, NaH₂PO₄ 50mM, DTT 5mM e inhibidores de proteasas), para luego lisar por sonicación (Misonix, Sonicator 3000) con 6 pulsos de 15 seg. a 27 watts de potencia, seguido de 20 seg. de descanso entre cada pulso y sobre hielo. El producto de la lisis fue centrifugado a 6000 g por 15 minutos a 4°C. Posteriormente el sobrenadante se incubó con la resina de afinidad Ni-NTA (Qiagen) (1 ml de resina por 1 L de cultivo inicial) a 4°C por 30 minutos y se aplicó la mezcla a una columna, dejando fluir el pasado de largo por gravedad. Previamente la columna fue equilibrada secuencialmente con 10 ml de agua y con 10 ml de buffer de lisis/lavado. Terminado de fluir el pasado de largo se lavó la resina con 10 ml de buffer de lisis/lavado. Para eluir la proteína 6xHis se utilizaron 2 ml de buffer de elución

(Imidazol 80 – 200 mM, NaCl 300mM, NaH₂PO₄ 50mM, DTT 1mM e inhibidores de proteasas), recolectándose diferentes fracciones con la proteína recombinante. Las proteínas fueron almacenadas a -80°C ajustando la concentración de glicerol a 15% en cada fracción.

Luego se procedió a realizar la cuantificación de proteínas de cada eluato por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie, utilizando una curva de BSA como patrón. Además, se realizó un análisis por Western blot de cada proteína recombinante producida y purificada.

2.11.- SDS-PAGE y Western blot.

Las proteínas recombinantes o extractos totales se denaturaron con un volumen de buffer de carga (Tris-Cl pH8 60 mM, β-mercaptoetanol 1%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,01%, glicerol 10%) y se calentaron a 95°C durante 5 minutos. Luego las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida denaturante al 10, 12 ó 15% (29:1, PAA/Bis). La electroforesis se llevó a cabo a voltaje constante de 150 V en buffer de corrida Tris-base 25 mM, glicina 250 mM, SDS 0,1% p/v.

Una vez finalizada la electroforesis, los geles fueron teñidos con azul de Coomassie para verificar las purificaciones y cuantificar o fueron transferidos a una membrana PVDF (GE Health Care) a un amperaje constante de 200 o 250 mA por 2 horas. Posterior a la transferencia, la membrana se bloqueó con una solución PBS-T (PBS 1X, Tween 20 0,05% v/v) más leche descremada al 3% p/v. Luego la membrana se incubó con anticuerpos específicos para el epítipo His (Clontech), para el péptido Flag (Sigma), para la proteína Snf5 (Upstate) o para el epítipo TAP tag (este último conjugado a peroxidasa, Sigma) en solución PBS-T/leche descremada al 1 ó 2% p/v y lavados con PBS-T. Luego de lavados, la membrana se incubó con

un segundo anticuerpo dirigido contra el primer anticuerpo y que tiene acoplado la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) y lavados con PBS-T. Finalmente, se realizó la detección con reactivos para quimioluminiscencia (Pierce ECL Western Blotting Substrate) según indicaciones del fabricante y la membrana se expuso a un film radiográfico (BIOMAX XAR, KODAK) a temperatura ambiente. Alternativamente se expuso a placa quimioluminiscente (Bio-Rad), escaneada luego en Phosphoimager Bio-Rad, utilizando el Software Quantity One (Bio-Rad) o analizado y cuantificado en el equipo de Imagen BioMolecular Typhoon, utilizando el Software iImageQuant (GE, Typhoon™ FLA 9000).

2.12.- Tinción con plata.

Para esto se realizaron dos métodos diferentes, modificados de los originales.

El primer método utilizado fue tomado y modificado a partir de dos trabajos (Blum et al., 1987 y Shevchenko et al., 1996). El gel del SDS-PAGE se fijó por 30 min. o toda la noche en metanol 50%, ácido acético 10% en agua ultra pura (nano pure). Se descartó la solución de fijación y se incubó con metanol 30% por 30 min. Luego se procedió a lavar el gel 3 veces por 5 min. con agua ultra pura. Se sensibilizó el gel con solución acuosa de tiosulfato de sodio 0.2 g/L (preparada fresca), por 90 seg., después se lavó el gel 3 veces por 30 seg. con agua ultra pura. Se incubó con solución de nitrato de plata a 2 g/L por 25 min. y se lavó 2 veces con abundante (2 L) agua ultra pura por 30 seg. Después se procedió a revelar el gel mediante la incubación de éste en una solución de revelado (carbonato de sodio 60 g/L, la solución de tiosulfato de sodio 20 ml/L y formaldehído 0.02%) hasta lograr el revelado que se quiere. Se detuvo el revelado descartando la solución de revelado y se agregó solución 6% ácido acético

por 10 min. Enseguida se lavó el gel con agua ultra pura en rotación por 15 min. con 4 cambios de agua y se guardó el gel.

El segundo método utilizado fue modificado de Wiese/Wilson Lab. El gel de poliacrilamida del SDS-PAGE se fijó por 1 hora en solución de metanol 50%, ácido acético 10% (todas las soluciones son preparadas en agua ultra pura). Se descartó la solución de fijación y se trató con metanol 50% por 1 hora, procediendo luego a lavar el gel 4 veces por 10 min. con agua ultra pura. Posteriormente se trató el gel con solución de plata (NaOH 0.08% p/v, NH₄OH 0.2 N y AgNO₃ 8 g/L) por 15 min., y después se lavó el gel a lo menos 5 veces por 5 min. con agua ultra pura. Después se procedió a revelar el gel mediante la incubación de éste en una solución de revelado (Ácido cítrico 0.005% p/v y formaldehído 0.02%) hasta lograr el revelado que se quiere. Se descartó la solución de revelado e inmediatamente se agregó agua ultra pura, tratando luego el gel con metanol 50% por 1 hora. Enseguida se guardó el gel en ácido acético 1%.

2.13.- Extracción orgánica y precipitación de ADN.

Para la extracción orgánica se utilizó inicialmente 1 volumen de fenol y 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), agitando con vortex y luego centrifugando a 10000g por 10 min. Luego se obtuvo la fase acuosa y se vuelve a extraer con 1 vol. de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), con agitación y centrifugación igual que el paso anterior, obteniendo nuevamente la fase acuosa. Posteriormente se continuó con la precipitación del ADN agregando 1/10 volumen de Acetato de Sodio 3 M pH 5,2 y 2,5 a 3 volúmenes de Etanol absoluto frío. La precipitación de oligonucleótidos se hizo agregando 1/10 volumen de acetato de sodio 3 M pH 7,0 y 3 volúmenes de Etanol absoluto a -20°C. La mezcla se mantuvo por 2 horas a -20 °C o 30

minutos a -80°C y luego se centrifugó a 16000g durante 15 minutos a 4°C , eliminando el sobrenadante. El precipitado se lavó 2 veces con etanol 70% frío con centrifugaciones de 16000g durante 15 minutos a 4°C , desechando el sobrenadante cada vez. Finalmente, se centrifugó a 16000g durante 30 segundos a temperatura ambiente para eliminar trazas de etanol y el precipitado se secó dejando el tubo destapado sobre el mesón por 5 – 10 min. y se resuspendió en un volumen adecuado de buffer TE (pH 8,0) o agua.

2.14.- Marcaje de oligonucleótidos y arreglo nucleosomal con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$.

Los oligonucleótidos utilizados en la generación de los diferentes probadores de ADN para ser reconstituidos como nucleosomas se detallan en el anexo 8, previamente se marcaron 20 ó 25 pmoles del oligonucleótido sentido en su extremo 5', con el uso de T4 polinucleótido quinasa (New England Biolabs), más el buffer de la enzima, en presencia de 20 ó 25 pmoles de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (Stock 3,3 μM (3.000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, NEN LIFE SCIENCE)), en un volumen final de 50 μl , lo cual se incubó por 30 min a 37°C . Luego de terminada la reacción se adicionó EDTA pH 8.0 a una concentración final 20 mM, para detenerla. Los nucleótidos radiactivos no incorporados se eliminaron por cromatografía de exclusión en columnas Spin Sephadex G-25 (BOEHRINGER MANNHEIM). Para la obtención y marcaje del fragmento utilizado en la reconstitución del arreglo nucleosomal, el vector generado como se indica en la sección 2.10 se digirió con EcoRI, procediendo inmediatamente a desfosforilar el extremo 5' con fosfatasa antártica (New England Biolabs), luego se marcaron 7 pmoles del vector linearizado en el extremo 5' libre del ADN, con el uso de T4 polinucleótido quinasa (New England Biolabs), más el buffer de la enzima, en presencia de 7 pmoles de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (Stock 3,3 μM (3.000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, NEN LIFE SCIENCE)), en un volumen final de 50 μl , lo

cual se incubó por 30 min a 37°C. Luego de terminada la reacción se adicionó EDTA pH 8.0 a una concentración final 20 mM, para detenerla. Luego se precipitó el ADN con etanol absoluto y acetato de sodio 3M pH 5.2 toda la noche a -20°C. El precipitado se resuspendió en un volumen apropiado para posteriormente digerir con la enzima HindIII, lo que libera el fragmento a utilizar para reconstitución del arreglo nucleosomal. Después se purificó este fragmento de ADN por electroforesis en gel de agarosa y purificación con kit de extracción QIAEx II, según las instrucciones del fabricante. Tanto los oligonucleótidos marcados así como los fragmentos para generar arreglos nucleosomales se precipitaron con etanol absoluto y acetato de sodio 3M pH 5.2 toda la noche a -20°C, para resuspender el oligonucleótido y arreglo nucleosomal en 20 ul de H₂O desionizada o Tris-Cl 10 mM pH8.0, respectivamente.

2.15.- Sondas 601 para la reconstitución nucleosomal.

Fragmentos de 147 y 216 pb se generaron por PCR, utilizando oligonucleótidos específicos para amplificar la secuencia posicionadora de nucleosoma 601 o bien esta secuencia además de una porción adicional de ADN, respectivamente (Anexo 8), a partir del plásmido pGEM-3Z/601-Gal4 (Gutierrez et al, 2007). Los oligonucleótidos fueron diseñados para generar en un caso la secuencia posicionadora completa de 147 pb y en otro la secuencia posicionadora localizada hacia el 5' de un fragmento de ADN de 216 pb. En ambos casos se marcaron los oligonucleótidos 5' con [γ -32P]-ATP, como se detalla en la sección 2.14. Estos fragmentos se utilizaron posteriormente para realizar la reconstitución nucleosomal.

2.16.- Aislamiento y purificación de oligonucleosomas cortos (SON) y largos (LON).

Se purificaron a partir de núcleos de células HeLa-S3 (National Cell Culture Center, Stowers Institute) utilizando un protocolo modificado del descrito por Owen-Hughes (Owen-Hughes et al, 1999). Se crecieron inicialmente 24 litros de estas células en suspensión, luego se centrifugaron a 2500 g por 10 min. a 4°C y se guardaron los pellets (12 ml cada uno, aproximadamente) a -80°C. Posteriormente se descongelaron en hielo (~4 horas) y se agregó ½ volumen (respecto del pellet) de Low Salt buffer (LSB) (HEPES pH7.9 20mM, glicerol 25%, MgCl₂ 1.5mM, KCl 0.02M, EDTA 0.2mM, PMSF 0.2mM & DTT 0.5mM), mezclando suavemente. Después se agregó el mismo volumen de buffer pero ahora con High Salt buffer (HSB) (HEPES pH 7.9 20mM, glicerol 25%, MgCl₂ 1.5mM, KCl 1.2M, EDTA 0.2mM, PMSF 0.2mM & DTT 0.5mM) y se mezcló suavemente por 30 min. a 4°C. Luego se centrifugó el lisado a 20000g por 30 min. a 4°C, obteniendo en el sobrenadante extracto nuclear y en el pellet la cromatina. Se continuó trabajando sólo con la cromatina, la cual se resuspendió en 60 ml de Medium Salt buffer (MSB) (HEPES pH 7.5 20mM, NaCl 0.4M, EDTA 1mM, glicerol 5% (v/v), β-mercaptoethanol 1mM, pepstatin A 1uM y leupeptin 1uM) con la ayuda de una varilla de vidrio. Se homogenizó la cromatina con un douncer (Wheaton) utilizando el vástago de menor diámetro (vástago suave) y realizando unos pocos golpes en hielo. Se centrifugó luego el homogenizado a 20000 g por 20 min. a 4°C, repitiendo la homogenización por lo menos 6 veces. Luego el pellet fue resuspendido en 30 ml de MSB más 0.2% NP-40, para lavarlo; esta etapa se repitió 4 veces, de las cuales las 2 últimas procedieron sin NP-40, con centrifugaciones de 20000 g por 5 min. a 4°C. Se procedió luego a resuspender el pellet en 3 ó 4 volúmenes de HSB, homogenizando con aproximadamente 50 golpes con dounce usando el vástago suave, centrifugando posteriormente la cromatina a 12000 g por 20 min a 4°C. Se obtuvo dos fases con

cromatina, una densa (pellet ~20ml) y otra más laxa (sobrenadante ~36ml). La fase laxa se sonicó en hielo usando microtip con pulsos de 15 seg. encendido y 20 seg. apagado (50% potencia) por 1 min. 45 seg. total usando el ajuste 6 (Branson sonifier model 450) para mejorar la solubilidad de ésta. En este punto se analizó la presencia de oligonucleosomas largos (LON) por digestión con proteinasa K, extracción orgánica y electroforesis en gel de agarosa para confirmar el tamaño del ADN (~4 Kb). Se realizó exactamente lo mismo con el pellet o cromatina densa. Posteriormente se procedió a dializar la cromatina sonicada contra 4 L de LSB toda la noche, usando membrana tubular de 12-14000 MWCO cerrándola sin dejarla muy tensa y quedando luego de la diálisis un volumen aproximado de 35 ml de consistencia mucosa blanca difícil de pipetear. Previo a la siguiente etapa se procedió a equilibrar la columna CL-6B sefarosa (Sigma). Inicialmente se pasó por la columna 3 volúmenes de H₂O desionizada (columna 70 cm x 1.6 cm). Después por la columna se pasó 400 ml de 0.6M HB buffer (NaCl 0.6 M, HEPES pH 7.5 20mM, EDTA 1mM, glicerol 10%, 2-βMercaptoetanol 1mM, PMSF 0.5mM, aprotinin 5 ug/ml, leupeptin 2 ug/ml y pepstatin A 2ug/ml) a 0.2 ml/min, toda la noche. A continuación se estandarizó la digestión con nucleasa micrococcal (MNasa) (Worthington MNase) a pequeña escala (10 µl) para tener la razón tiempo/unidades de nucleasa a utilizar para digerir toda la muestra dializada. Se utilizaron las siguientes unidades de enzima: 0, 125, 250, 500, 1000, 2000 y 4000 mU; todas las digestiones se realizaron a T° ambiente por 10 min. Posteriormente se realizó digestión con proteinasa K, una extracción orgánica y electroforesis en gel de agarosa al 1.2% para confirmar el tamaño del ADN (tamaño medio optimo ~400 pb). Al total de la muestra se le adicionaron 0.03 volúmenes de CaCl₂ 0.1M (~1.05 ml), calentando la muestra a 37°C por 5 min. para solubilizarla mejor. Una vez solubilizada se trató con MNasa, con las unidades de enzima y el tiempo adecuados. Se detuvo la reacción agregando 0.1

volúmenes de EGTA 0.5M (~3.65 ml) y dejando en hielo. Después se agregó NaCl 2M para obtener una concentración final de de NaCl 0.6M (~12.5 ml), centrifugando a 20000 g por 15 min. a 4°C para limpiar el sobrenadante (~50 ml) y cargarlo en la columna ya equilibrada. Usando una bomba, se cargó toda la cromatina digerida en un Super loop, inyectando 5.05 ml de la muestra en la columna acoplada a un equipo FPLC AKTA (GE lifescience), a un flujo de 0.2 ml/min. y una presión de 0.19 MPa. Se colectaron 30 fracciones de 2 ml luego de pasados ~12 ml. El ADN de las fracciones se analizó por electroforesis en gel de agarosa, para confirmar el tamaño de los fragmentos de ADN (SON o LON) y por gel de acrilamida denaturante (SDS-PAGE), para confirmar la composición de histonas de la cromatina. Todas las fracciones fueron guardadas a -80°C, algunas de las fracciones óptimas fueron altamente concentradas (Amicon Ultra-4 100K MWCO, Millipore) y luego el ADN se cuantificó por absorbancia a 260 nm, dejándolas guardadas a -80°C.

2.17.- Reconstitución nucleosomal.

Las reconstituciones fueron realizadas por el método de transferencia de octámeros de histonas (Utley et al, 1996). En las reconstituciones estándar, se mezcló 1 pmol de ADN marcado radioactivamente, ya sea de 216 y 147 pb, con 3 ug de oligonucleosomas cortos (SON), en un volumen de 25 ul y a una concentración de NaCl 1 M. Se hicieron diluciones seriadas para lograr concentraciones de NaCl 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 M usando buffer de dilución (Tris-Cl pH7.4 10 mM, EDTA 1 mM, PMSF 0.5 mM, DTT 5 mM). La dilución final de NaCl 0.1 M se hizo con buffer de dilución final (Tris-Cl pH7.4 10 mM, EDTA 1 mM, PMSF 0.5 mM, DTT 5 mM, NP-40 0.1%, Glicerol 20%, BSA 200 ug/ml), llegando a un volumen final de 250 ul.

Para la reconstitución de arreglo nucleosomal, 0.1 pmol del producto de digestión de 1246 pb marcado radioactivamente se mezcló con 1.8 ug de oligonucleosomas cortos (SON) en un volumen inicial de 12.5 ul y llegándose en este caso a un volumen final de 125 ul.

2.18.- Purificación de complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP.

Los diferentes complejos remodeladores que se utilizaron en esta tesis son de levadura y para obtenerlos se realizaron purificaciones por afinidad en tándem (TAP) (Rigaut et al., 1999), o por purificación con el epítoto Flag [las diferentes cepas fueron donadas por el Dr. Workman (librería Stowers Institute)]. El cultivo previo de las cepas se realizó según lo indicado en la sección 2.2.

2.18.1.- Purificación en tándem.

A grandes rasgos para la purificación por afinidad en tándem, se cultivaron inicialmente 20 ml de cultivo de la cepa a utilizar para purificar, la que después se transfirió a 6 L de medio apropiado para la cepa de levadura que expresa la subunidad Snf6 del complejo remodelador de cromatina dependiente de ATP SWI/SNF con el tag TAP [Dominio de unión a IgG de Prot A y péptido de unión a calmodulina (CBP)]. Luego el cultivo se centrifugó a 8000g a 4°C por 15 min., se lavó el pellet y se resuspendió con buffer de extracción (Hepes-KOH, pH7.5 40 mM, glicerol 10%, NaCl 350 mM, Tween-20 0.1%, pepstatin A 1 µg/ml, leupeptin 2 µg/ml, PMSF 1 mM). Se agregó perlas de vidrio de 450-600 um (Sigma) y se rompieron las levaduras en un bead beater con una cámara de policarbonato (Biospec, bead beater) a 4°C. Para esto se realizaron 17 golpes con intervalos de 30 seg. encendido y 90 seg. de descanso en cámara fría. Después se agregó DNasa I 100 U y heparina 10 ug/ml y se incubó a T° ambiente por 10 min.

Luego se centrifugó a 10000g a 4°C por 15 min. y se recuperó el sobrenadante, para luego realizar ultracentrifugación por 2 horas a 100000 g a 4°C. Se preaclará el extracto de levadura, mezclando éste con resina CL-6B sefarosa (500 ul/100 mg de extracto), incubando por 2 horas a 4°C con agitación en rotor vertical. El extracto preaclarádo se mezcló con resina IgG Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare), incubando toda la noche a 4°C con agitación. Después se transfirió la suspensión a una columna y se dejó fluir por gravedad. Luego se lavó la resina con buffer TEV [Tris pH8 10 mM, NaCl 150 mM, NP-40 0.1%, EDTA 0.5 mM, glicerol 10%, PMSF 1mM, leupeptin 2 µg/ml, pepstatin A 1 µg/ml, (DTT 1mM no para los lavados)], se resuspendió la resina en 1 vol. de buffer TEV y se volvió a colocar en un tubo para incubarla y generar el clivaje con la proteasa TEV 40 U (Promega) por toda la noche a 4°C con agitación. Posteriormente se traspasó esta suspensión a columnas para dejar fluir el eluato por gravedad. La resina en la columna se lavó con buffer de unión de calmodulina (Tris pH8 10 mM, MgAc 1mM, imidazol 1mM, CaCl₂ 2mM, NP-40 0.1%, glicerol 10%, PMSF 1mM, leupeptin 2 µg/ml, pepstatin A 1 µg/ml, DTT 0.5 mM), combinando este lavado con el eluato ya obtenido. Al eluato total se agregó CaCl₂ 1 M. Luego se mezcló el eluato con la resina Calmodulin Sepharose (GE Healthcare) y se incubó toda la noche a 4°C con agitación, para posteriormente proceder con los lavados con buffer de unión calmodulina (tres veces con buffer conteniendo NaCl 0.3M y dos veces con buffer conteniendo NaCl 0.15M). Luego se transfirió la resina a un tubo de 1,5 ml y se eluyó 5 veces con 1 vol. de buffer de elución de calmodulina (Tris pH8 10 mM, NaCl 0.15 M, MgAc 1mM, imidazol 1mM, EGTA 2mM, NP-40 0.1%, glicerol 10%, PMSF 1mM, leupeptin 2 µg/ml, pepstatin A 1 µg/ml, DTT 0.5 mM) por 5 min. cada vez y con agitación. Después se realizaron otras 5 eluciones con buffer de elución calmodulina (NaCl 0,3M). Todas las centrifugaciones con la resina Calmodulina se realizaron a 3000g por 1 min. y cada fracción

obtenida fue guardada a -80°C . Finalmente las eluciones fueron analizadas por un gel de poliacrilamida denaturante teñido con plata.

2.18.2.- Purificación con el epítoto Flag.

Para la purificación por afinidad al epítoto Flag, se cultivaron inicialmente 20 ml de cultivo de la cepa a utilizar para purificar, la que después se transfirió a 6 L de medio con una cepa de levadura que expresa la proteína Snf2, subunidad del complejo remodelador de cromatina dependiente de ATP SWI/SNF, fusionada al epítoto Flag. Luego se centrifugó a 8000g a 4°C por 15 min. y el pellet se lavó con PBS 1X más PMSF 1 mM y benzonasa 25 U. Se resuspendió el pellet en buffer H350 (Hepes-KOH pH7.6 25 mM, glicerol 10%, KCl 350 mM, EDTA 1 mM, MgCl_2 2 mM, NP-40 0.02%, DTT 1 mM, pepstatin A 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, leupeptin 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y PMSF 1 mM) y se agregaron perlas de vidrio de 450-600 μm (Sigma), rompiendo las levaduras en un bead beater con una cámara de policarbonato (Biospec, bead beater) a 4°C . Para esto se realizaron 12 golpes con intervalos de 30 seg. encendido y 90 seg. de descanso en cámara fría. Después se agregó benzonasa 75 U y heparina a una concentración final de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, incubando a T° ambiente por 15 min. Luego se centrifugó a 20000g a 4°C por 15 min. y se recuperó el sobrenadante, el que se centrifugó luego por 2 horas a 100000 g a 4°C . Se ajustó la concentración de proteína total con buffer H350 a 10 mg/ml. El extracto de levadura se mezcló con resina de afinidad agarosa anti-Flag M2 (Sigma A-2220) y se incubó por 2-4 horas a 4°C con agitación. Después se centrifugó a 1000 g por 5 min. y se descartó el sobrenadante dejando solo la resina. Se resuspendió la resina y se traspasó la suspensión a un tubo de 15 ml, procediendo a realizar 10 lavados con buffer H350 de 5 min cada uno y un lavado final con buffer H100 (Hepes-KOH pH7.6 25 mM, glicerol 10%, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, MgCl_2 2

mM, NP-40 0.02%, DTT 1 mM, pepstatin A 1 µg/ml, leupeptin 2 µg/ml y PMSF 1 mM), tras el que se dejó un pequeño volumen para transferir la resina a un tubo de 1.5 ml para realizar la eluciones con 1 vol. de triple péptido Flag (Sigma F-4799) 250 ug/ml en buffer H100. Se procedió a incubar por 45 min. en rotor vertical a 4°C, centrifugando luego a 1000 g por 5 min a 4°C. El proceso se repitió cinco veces, incubando las últimas tres sólo 30 min. y cada fracción obtenida fue guardada a -80°C. Finalmente las fracciones eluidas fueron analizadas por un gel de poliacrilamida denaturante teñido con plata.

Algunas fracciones de los complejos obtenidos por ambas técnicas fueron concentradas utilizando Amicon Ultra-4 (100K MWCO, Millipore), y luego cuantificadas por SDS-PAGE teñido con plata y confirmado por western blot.

2.19.- Ensayos de unión para Gal4-VP16 y las HMGB a ADN y nucleosomas.

Se realizaron mezclando 7.9 µl de buffer de remodelación (HEPES pH7.9 10 mM, KCl 70 mM, PMSF 0.5 mM, DTT 2 mM, NP-40 0.05%, Glicerol 10 %, BSA 100 ug/mL, MgCl₂ 9.5 mM), 0.5 µl de His-HMGB (de concentración variables) o buffer HMG (HEPES pH7.9 10 mM, KCl 100 mM, Glicerol 15 %), 3 µl de buffer SWI/SNF (Tris-Cl 10 mM pH 8.0, EGTA 2 mM, PMSF 0.5 mM, DTT 1 mM, Imidazol 1 mM, NP-40 0.1 %, Mg(CHCOO)₂ 1 mM, Glicerol 10 %, NaCl 150 mM), 0.5 µl de Gal4-VP16 15 nM o buffer Gal4 (HEPES pH7.5 10 mM, KCl 100 mM, PMSF 0.2 mM, DTT 0.5 mM, Glicerol 20 %, BSA 100 ug/mL, ZnCl₂ 10 uM), 0.6 µl de H₂O desionizada y 10 fmol (2.5 µl) de sonda de ADN libre o nucleosoma reconstituido (todos marcados radioactivamente como se indica en la sección 2.14 y 2.15). La mezcla se incubó a 30°C por 30 minutos. Posteriormente se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida

no denaturante al 5% (AA:bis 40:1, TBE 0.3X). El gel se secó y expuso a films radiográficos (X-BIOMAX XAR, KODAK) o a placa autorradiográfica, la que fue analizada en Phosphoimager Bio-Rad (Molecular Imager Bio-Rad), utilizando el Software Quantity One (Bio-Rad).

2.20.- Ensayos de remodelación nucleosomal.

2.20.1.- Ensayo de *sliding* en ausencia de factor de transcripción.

Para este ensayo se utilizaron 10 fmol (2.5 μ l) de mononucleosomas (216 pb) previamente reconstituidos y marcados radioactivamente, los cuales se mezclaron con 7.9 μ l de buffer de remodelación, 0.6 μ l de ATP 50 mM (ATP sal de litio, Roche (1140965)), 0.5 μ l de buffer Gal4, 0.5 μ l de proteína HMG recombinante a analizar o buffer HMG y 3 μ l de complejo remodelador de cromatina dependiente de ATP o buffer SWI/SNF. Se incubó a 30°C por 30 min.. Luego se agregó ADN de espermatozoos de salmón (SSDNA) (750 ng en 0.2 μ l) y oligonucleosoma largo (LON) (500 ng en 0.5 μ l) como competidor de la unión del complejo remodelador al mononucleosoma; se incubó a 30°C por 20 min. y se procedió a sembrar en un gel de poliacrilamida no denaturante al 5% (AA:bis 40:1, TBE 0.3X). El gel se secó y la señal radioactiva se detectó como se indica en la sección 2.19.

2.20.2.- Ensayo de transferencia de histonas.

Para este ensayo se utilizaron 10 fmol (2.5 μ l) de ADN (147 pb) previamente marcado radioactivamente, que se mezclaron con 7.4 μ l de buffer de remodelación, 0.6 μ l de ATP 50 mM (Roche), 0.5 μ l de buffer Gal4, 0.5 μ l de proteína HMG recombinante a analizar o buffer

HMG, 0.5 μ l de oligonucleosomas cortos (SON) (5 ng o 30 ng) y 3 μ l de complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP o buffer SWI/SNF. Se incubó a 30°C por 1 hora y luego se agregó a la mezcla ADN de esperma de salmón (SSDNA) y oligonucleosomas largos (LON), como competidor de la unión del complejo remodelador al nucleosoma, incubando por 20 min. a 30°C. Luego se sembró las muestras en un gel de poliacrilamida no denaturante al 5% (AA:bis 40:1, TBE 0.3X). El gel se secó y la señal radioactiva se detectó como se indica en la sección 2.19.

2.20.3.- Ensayo de desalojo del octámero de histonas.

Para este ensayo se utilizaron 10 fmol (2.5 μ l) de mononucleosomas (216 pb) previamente reconstituidos y marcados radioactivamente, los cuales se mezclaron con 7.4 μ l de buffer de remodelación, 0.6 μ l de ATP 50 mM (Roche), 0.5 μ l de Gal4-VP16 o buffer Gal4 (15 nM), 0.5 μ l de proteína HMG recombinante a analizar o buffer HMG y 0.5 μ l (200 ng) de oligonucleosoma cortos. Se incubó a 30°C por 20 min., luego se agregaron 3 μ l de complejo SWI/SNF o buffer SWI/SNF, incubando a 30°C por 30 min.. Luego se agregó a la mezcla ADN de esperma de salmón (SSDNA) (750 ng en 0.2 μ l), oligonucleosomas largos (LON) (500 ng en 0.5 μ l) y oligonucleótido doble hebra con el sitio de unión consenso de Gal4 (50 pmoles en 0.5 μ l) (Anexo 8), como competidor de la unión del complejo remodelador al nucleosoma y de la unión de Gal4-VP16 a su sitio de unión. Inmediatamente se incubó a 30°C por 20 min. y se procedió a sembrar en un gel de poliacrilamida no denaturante al 5% (AA:bis 40:1, TBE 0.3X). El gel se seco y la señal radioactiva se detectó como se indica en la sección 2.19.

2.20.4.- Ensayo de accesibilidad a enzimas de restricción.

Estos ensayos procedieron en su primera etapa como los descritos en las secciones 2.20.1 y 2.20.3. Luego del tratamiento con la mezcla de remoción de unión se procedió a agregar 0.5 μ l de la enzima de restricción BsrBI (10U/ μ l) o buffer de dilución A (Tris-Cl 10mM pH 7.4, DTT 1mM, EDTA 0.1mM, Glycerol 50%, BSA 200 μ g/ml, KCl 50mM). Se incubó a 30°C por 30 min., posteriormente se adicionó Buffer Stop (Tris-Cl 20 mM pH 7.4, EDTA 40 mM pH 8, SDS 1%, tRNA 250 ng/ μ l, proteinase K 200 ug/ml) e incubó 40 min. a 42°C. Luego se precipitó el ADN con etanol a -20°C, resuspendió las muestras en 10ul buffer TE y agregó 2ul de LB (glicerol 30% v/v, azul de bromofenol 0.25% p/v, xilencianol 0.25% p/v), esto se sembró en un gel de poliacrilamida no denaturante al 5% (AA:bis 40:1, TBE 0.3X). El gel se secó y la señal radioactiva se detectó como se indica en la sección 2.19.

2.20.5.- Ensayo de remodelación de un arreglo nucleosomal.

Este ensayo procedió como el descrito en la sección 2.20.3. Con algunas variaciones en la cantidad de probador a utilizar (2 fmol), el buffer de remodelación contiene 7,6 mM de $MgCl_2$, el stock de ATP es 25 mM y la incubación de remodelación fue de 1 hr. Luego del tratamiento con la mezcla de remoción de unión se procedió a agregar 2 μ l de MNasa (91-136.5 mU/ μ l) o 0.3 μ l de la enzima de restricción BglII (10U/ μ l) o SphI (10U/ μ l). Se incubó a 30°C por 120 seg. (MNasa) o 30 min. (Enz. Rest.), posteriormente se adicionó Buffer Stop e incubó 1 hr. a 42°C. Luego se precipitó el ADN con etanol a -20°C, se resuspendió las muestras en 10ul buffer TE y se agregó 2ul de LB, esto se sembró en un gel de agarosa al 1,5% (TAE 0.5X) o en

un gel de poliacrilamida no denaturante al 5% (AA:bis 40:1, TBE 0.3X). El gel se secó y la señal radioactiva se detectó como se indica en la sección 2.19.

2.21.- Ensayo de hidrólisis de ATP.

Para este ensayo se utilizaron 3 μ l de los diferentes complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP o de buffer SWI/SNF, 2.5 μ l (30ng) de SON en reemplazo de los mononucleosomas (216 pb), 0.3 μ l (1 pmol) de ATP radioactivo [γ - 32 P]-ATP (3.000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, NEN LIFE SCIENCE), 0.3 μ l de ATP (stock 100 μ M) (Roche), 8.4 μ l Buffer de Remodelación y 0.5 μ l de Buffer HMG o la HMG a analizar. La mezcla se incubó a 30°C por 30 ó 90 min.. Luego se sembró 1 μ l de muestra en una placa de cromatografía para separar el ATP y el fosfato por cromatografía en capa fina (TLC) (Macherey Nagel, Alemania) en LiCl 0.5 M y ácido fórmico 1 M por 30 min.. Posteriormente se expuso en placa autorradiográfica, se analizó y cuantificó en Phosphoimager Bio-Rad, utilizando el Software Quantity One (Bio-Rad).

2.22.- Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP Assay).

Esta técnica se utilizó para determinar la presencia física de proteínas en estudio a regiones particulares del genoma de levadura. En líneas generales, levaduras en cultivo son tratadas con un agente entrecruzador que permite estabilizar las interacciones proteína-proteína y proteína-ADN. Luego al fragmentar estos complejos entrecruzados, se obtendrán proteínas unidas a fragmentos de cromatina de un tamaño particular, para realizar la inmunoprecipitación de una proteína de interés y así obtener los fragmentos de ADN con los cuales esta proteína se

asocia en el momento del entrecruzamiento. Finalmente, mediante la técnica de PCR se analiza la presencia de una secuencia particular de ADN. El procedimiento detallado a continuación fue modificado a partir de protocolos descritos por Tansey, 2002 y Li et al, 2007B. Levaduras de cada cepa en análisis se inocularon en 5 ml y se crecieron por 2 días a 30°C, para luego realizar nuevos cultivos de 200 ml, los cuales fueron crecidos por 16 horas hasta una OD600 de 1,0. Luego se agregó al cultivo formaldehído 1% (diluido en PBS 1X a partir de una solución 37.5%) y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. El entrecruzamiento se detuvo con la adición de 0.25 vol. de glicina 2.5 M, continuando la incubación por 10 minutos a temperatura ambiente. El cultivo se traspasó a un tubo y se centrifugó a 5000 g por 10 minutos a 4°C. Se realizaron dos lavados del pellet con PBS 1X frío suplementado con 1 mM PMSF, 2 ug/ml leupeptin y 1 ug/ml pepstatin A. Luego del lavado final se resuspendieron las levaduras en 2 ml de PBS 1X y se traspasó a 4 tubos de 1.5 ml; se centrifugó a 4000 rpm por 5 minutos en microfuga y se procedió a congelar rápidamente los pellet de levaduras en nitrógeno líquido, los que después se resuspendieron en 1 vol. de buffer SDS-lisis FA [HEPES pH7.5 40 mM, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, deoxicolato de sodio 0,1%, SDS 0,2% e inhibidores de proteasa (Sigma P-8215)] y se agregó el mismo volumen de perlas de vidrio de 450-600 um (Glass beads, Sigma G8772), dejando en hielo. Las muestras se agitaron en bead beater (Disruptor Genie, Scientific Industries) por 2 horas a 4°C. Se recuperó el lisado y se ajustó el volumen a 2 ml en un tubo de 15 ml (para recuperar el lisado se hizo un hoyo en el fondo de cada tubo y se centrifugó cada uno sobre un tubo de 15 ml a 10000g por 5 min.). Después se sonicaron las muestras en un sonicador Branson 450, para obtener el tamaño adecuado de fragmentación del ADN. La sonicación se realizó en dos rondas. La primera consistió en 10 tandas de 6 pulsos de 0.9 segundos e

intervalos de descanso de 0.1 segundos. Luego se centrifugó a 12000 rpm por 30 seg. en microfuga y se traspasó a un nuevo tubo ajustando el volumen en 2 ml. La segunda consistió en 10 tandas de 10 pulsos de 0.9 segundos e intervalos de descanso de 0.1 segundos, ambos empleando microtip en un 40% de potencia. Luego se centrifugó a 16000 rpm por 20 minutos a 4°C en microfuga y la fracción sobrenadante se alicuotó y congeló en nitrógeno líquido para guardarlo a – 80 °C hasta su utilización. Una alícuota se utilizó para cuantificar el ADN a 260 nm y evaluar el grado de fragmentación del ADN genómico (ADNg) mediante un gel de agarosa al 1%.

Posteriormente se procedió a la etapa de inmunoprecipitación, en la que se utilizó una alícuota de extracto de cromatina (~200 µl) de cada una de las cepas utilizadas en la tesis para inmunoprecipitar y además se analizó un control de unión de background de éstas. Todas las muestras fueron diluidas hasta 400 µl con buffer lisis-FA [HEPES pH7.5 40 mM, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, deoxicolato de sodio 0,1% e inhibidores de proteasa (Sigma P-8215)] y se adicionó sarkosyl 1%, se centrifugó a 14000 rpm por 20 minutos a 4°C en microfuga. Luego se procedió con la inmunoprecipitación, para lo cual se utilizaron diferentes resinas dependiendo de la proteína en análisis: la resina IgG sefarosa 6FF (GE Lifescience) se utilizó para precipitar las proteínas HMGB de levadura (Nhp6A, Nhp6B y Hmo1), ya que en estos casos se utilizó cepas que expresan una de estas proteínas fusionadas al tag TAP hacia el C-terminal de la proteína. También se utilizó la cepa silvestre (BY4741) para descartar todas las uniones inespecíficas que pueda presentar la resina. Como control negativo de unión y precipitación para estas proteínas se utilizó la resina CL-4B sefarosa (Sigma). El complejo remodelador de cromatina dependiente de ATP SWI/SNF de levadura se inmunodetectó e inmunoprecipitó utilizando un anticuerpo anti-Snf5 (Upstate), inmunoprecipitaciones con este

anticuerpo se realizaron para todas las cepas en estudio. Para la inmunoprecipitación de éste se utilizó la resina Proteína G sefarosa 4FF (GE Lifescience). El control negativo en este caso fue resina sin anticuerpo. Se preaclaron las diferentes resinas incubándolas con BSA 20 ug/ml en PBS 1X toda la noche a 4°C en rotador continuo. Luego del preaclaramiento, las resinas fueron centrifugadas a 4000 rpm por 2 minutos a 4°C en microfuga y el extracto de cromatina de las diferentes cepas se traspasó a los tubos con resina. Se incubaron por 4 horas a 4°C en rotador continuo. Luego se centrifugó a 4000 rpm por 5 minutos a 4°C en microfuga. El sobrenadante se eliminó y las diferentes resinas con el inmunoprecipitado fueron lavadas sucesivamente con 1 mL de buffer lisis-FA (dos veces), la resina se transfirió a un nuevo tubo de 1.5 ml, luego se lavó con buffer lisis-FA (NaCl 500 mM), con buffer TEL (Tris pH8.0 10 mM, EDTA 1 mM, LiCl 250 mM, NP-40 1%, deoxicolato de sodio 1%, más inhibidores de proteasas) y con buffer TE (Tris pH8.0 10 mM, EDTA 0.25 mM). Entre cada lavado se dejó en rotador orbital por 5 minutos y luego se centrifugó a 4000 rpm por 5 minutos a 4°C en microfuga. En el último lavado se eluyó el inmunoprecipitado con 200 uL de buffer de elución (Tris pH8.0 10 mM, EDTA 10 mM, SDS 1 % y NaCl 250 mM), agitando en vortex e incubando a 65°C por 30 minutos. Se centrifugó a 10000 rpm por 5 min en microfuga, el sobrenadante se traspasó a un tubo nuevo y se repitió la elución de igual forma. Luego se reunieron los dos eluatos. Desde este momento se incluyeron en el procesamiento los INPUT de cada cepa (extracto de cromatina sin tratamiento de inmunoprecipitación). Se incubó la muestra eluida con RNasa A a una concentración final 20 ug/ml a 65°C por 1 hora. Luego se agregó Proteinasa K a 100 ug/ml concentración final, incubando a 55°C por al menos 1 hora y se continuó con la reversión del entrecruzamiento incubando a 65°C por 4 horas o toda la noche. Finalmente el ADN se extrajo por el método de fenol/cloroformo y por último se precipitó con etanol absoluto, previa adición de 0.1 vol. de

NaAc pH 5.2 3M y 1 ul de acrilamida lineal (Ambion, AM9520). Luego el ADN se resuspendió en 10 uL de 0.1X TE pH 8.0 y se utilizaron alícuotas de estas muestras, ya sea para cada reacción de PCR en tiempo real con oligonucleótidos específicos (Anexo 10) o para realizar el acoplamiento de esta técnica a un microarray (ChIP-chip), guardando el resto a -20°C.

Los fragmentos amplificados por qPCR también fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TBE 0.5X, en presencia de Bromuro de etidio (90 V por 45 min.), observando luego los amplicones por exposición a luz UV.

2.23.- Inmunoprecipitación de cromatina acoplada a microarreglo (ChIP-chip).

Los ensayos de ChIP-chip fueron realizados usando un arreglo de ADN genómico de levadura 8 X 60k (Agilent, cat. no. 031697) que posee un probador para el genoma nuclear de levadura *S. cerevisiae* cada aproximadamente 200 pb. Estos microarreglos se utilizaron para estudiar la distribución de todas las proteínas analizadas por ChIP (Nhp6A, Nhp6B, Hmo1 y Snf5). El protocolo utilizado se desarrolló en base a los trabajos de van Bakel, Smolle y Ventatesh (van Bakel et al, 2008; Venkatesh et al, 2012; Smolle et al, 2012). Se usaron los Input e inmunoprecipitado de las diferentes muestras para una doble amplificación lineal y marcaje por T7 (Epicentre Biotechnologies). En resumen, inicialmente 50 ng de Input o inmunoprecipitado se trataron con 2.5U de fosfatasa alcalina (CIP, NEB) a 37°C por 1 hora, seguido de una extracción orgánica y precipitación de ADN con etanol. Las muestras tratadas con CIP fueron incubadas con 20U de transferasa terminal (TdT, NEB) y dTTP a 37°C por 20 min. para adicionar colas T a los extremos. El producto fue aislado utilizando MiniElute Reaction Cleanup Kit (Qiagen). Después se adicionó un oligonucleótido promotor T7 anclado (dA)₁₈ alineándose en la cola T y luego se rellenó con 5U de Exo-Klenow (NEB) a 37°C por 4

horas, seguido de una extracción orgánica y precipitación de ADN con etanol. Luego se realizó una etapa de amplificación por transcripción *in vitro*, la que fue realizada a 37°C por toda la noche con Ampliscribe T7 transcription Kit (Epicentre Biotechnologies). El ARN fue purificado con RNeasy Mini Kit (Qiagen) y cuantificado en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Para una segunda ronda de amplificación, 150 ng de ARN fueron transcritos con transcriptasa reversa Superscript III (Invitrogen) utilizando random primers y el producto purificado con MiniElute Reaction Cleanup Kit (Qiagen). El oligonucleótido con el promotor T7 fue adicionado al producto como se describió antes en este protocolo, seguido por una segunda tanda de transcripción *in vitro* en presencia de amino allyl-UTP (Ambion) además de los nucleótidos regulares. Finalmente, la muestra fue purificada con RNeasy Mini Kit (Qiagen) y cuantificada con Nanodrop 2000.

Para la reacción de marcaje, 8 ug de ARN con amino-allyl incorporado fue mezclado con buffer carbonato pH 8.7 0.1 M y 0.01 nmol de Cy3 o Cy5 (GE Healthcare) en dimetilsulfóxido (Sigma) e incubado a T° ambiente por 2 horas. Los Input fueron marcados con Cy3 y los inmunoprecipitados con Cy5. La reacción fue inactivada con 2M hidroxilamina a T° ambiente por 15 min. y se purificó las muestras con RNeasy Mini Kit (Qiagen). La incorporación de la tinción de marcaje fue cuantificada con Nanodrop 2000.

Para la hibridización de las muestras con el microarreglo se utilizaron 4 ug de Input e inmunoprecipitado, los cuales se combinaron y fragmentaron con Fragmentation Reagent Kit (Ambion) según las especificaciones del fabricante. La mezcla de hibridización se hizo usando Oligo CGH/ChIP-chip hybridization Kit (Agilent), según las especificaciones del fabricante, con la adición de 20 ug de oligo T7 para bloqueo e hibridizando toda la noche a 65°C. El microarreglo fue lavado con buffer de lavado Oligo CGH/ChIP-chip (Agilent), según las

especificaciones del fabricante. El arreglo fue escaneado con Agilent DNA Microarray Scanner (model no.G2505B; Agilent) y la información extraída con Feature Extraction software (Agilent). La data fue normalizada con GeneSpringGX software (Agilent). Luego la data fue analizada con el software R y así se determinó el coeficiente de correlación entre las repeticiones biológicas, obteniendo la data normalizada.

La información del ChIP-chip normalizado se analizó utilizando un análisis de promedio de genes modificado (Li et al, 2007; Pattenden et al, 2010; Smolle et al, 2012; Venkatesh et al, 2012), que consiste básicamente en una normalización de la razón de intensidades (IP/Input o Cy5/Cy3) de tal forma que el promedio de estas razones adquiere el valor 1. A los valores resultantes se aplica logaritmo en base 2 ($\log_2$). Así, la señal promedio tiene un valor de cero ($\log_2 1=0$). La región del ORF (Open Reading Frame) fue subdividida en 14 secciones (bins) de igual tamaño, incluido un TSS (Transcription Start Site) y un TES (Transcription End Site). Las regiones intergénicas (480 pb corriente arriba y abajo del sitio de inicio y término de la transcripción para cada gen) fueron divididos en 3 bins de 160 pb cada uno. La razón de enriquecimiento del microarreglo [$\log_2(\text{IP}/\text{Input})$] para cada probador fue asignada al bin más cercano. Para obtener y graficar el promedio de las señales en estas distintas secciones a nivel del genoma completo (Whole-Genome), los probadores con un bin asignado fueron promediados como la media $\pm$ s.e.m. Además genes no regulados por RNAPolII, incluyendo los genes de ARNt y ARNsn, así como los de algunos ORF dudosos (~450 genes), fueron removidos para la determinación del promedio de este análisis.

Todos los análisis para agrupar información se realizaron con el programa Access (Microsoft Office, 2007) y R (Team, R.D.C.R., 2008), este último además fue utilizado para analizar y graficar toda la data obtenida del microarreglo.

Para analizar la señal dada por los distintos probadores, definimos su división en grupos correspondientes a la región promotora (región intergénica 5' y TSS), región 3' (TES y región intergénica 3') y el ORF (12 bins centrales). Nuestra data fue analizada focalizándonos en la región promotora y en virtud de distintos aspectos: Para el estudio del enriquecimiento de las HMGB utilizando las cepas que contienen las HMGB-TAP, se realizó un solapamiento y posterior substracción de los valores de enriquecimiento de cada posición genómica entre la cepa TAP y la cepa silvestre (BY4741), utilizada a modo de background de la inmunoprecipitación. Para el caso de Snf5, se analizó el perfil de enriquecimiento de esta proteína en las distintas cepas en estudio. Con los datos obtenidos con la cepa silvestre se obtuvo un set de genes con alto enriquecimiento de Snf5, que tiene la condición de poseer al menos un bin en la región promotora con un valor de enriquecimiento mayor o igual a 1 ($\log_2 \geq 1$). De igual forma se definió otro set de genes, pero poniendo como límite un valor de enriquecimiento mayor o igual a 0.5. Estos datos también fueron analizados en vínculo al enriquecimiento de Snf5 en las cepas mutantes nulas de cada HMGB. En cada caso a la señal de enriquecimiento de la cepa silvestre se substrajo la señal correspondiente de la cepa que contiene la delección de la HMGB analizada, obteniendo sets de genes que disminuyen más de 1 vez su valor de enriquecimiento ($wt - del \geq 1$).

2.24.- Análisis *in silico* de la región promotora de genes específicos.

Este análisis se realizó para poder determinar, tanto el enriquecimiento de las proteínas Nhp6A, Nhp6B y Hmo1, como el posicionamiento de los nucleosomas en las regiones promotoras de los genes seleccionados, a partir de la diferencia del enriquecimiento de Snf5, entre la cepa silvestre y las delecciones de las diferentes HMGB de levadura ($wt - del \geq 1$)

obtenidos en los ensayos de ChIP-chip. Con este fin, primero utilizando el servidor UCSC Genome Bioinformatics, disponible en <http://genome.ucsc.edu/>, creamos un Genome Browser del posicionamiento de las proteínas HMGB y de la subunidad de SWI/SNF, Snf5, a partir de este análisis se obtuvieron los perfiles de enriquecimiento de estas proteínas. Luego, con los genes que se obtuvo un enriquecimiento determinado de las proteínas HMGB en la región promotora, se utilizó la base de datos de posicionamiento nucleosomal en levadura, creada por el grupo de Erin Segal (Segal Lab of Computational Biology), disponible en http://genie.weizmann.ac.il/cgi-bin/gbrowse/nucleo_yeast/. Para así analizar los diferentes genes seleccionados detenidamente y poder utilizar algunos de estos para realizar el mapeo de posicionamiento nucleosomal por digestión con nucleasa micrococcal.

2.25.- Posicionamiento nucleosomal por digestión con Nucleasa Micrococcal.

Este estudio se realizó para analizar el posicionamiento de los nucleosomas en regiones promotoras de genes específicos, seleccionados de acuerdo a los resultados de enriquecimiento de Snf5 de los estudios de ChIP-chip y a la utilización de herramientas bioinformáticas. Se procedió de acuerdo al protocolo descrito por Lam y colaboradores (Lam et al, 2008).

Inicialmente se crecieron las diferentes cepas a estudiar en 25 ml de medio YPD hasta OD600 de 0.5 – 1, se centrifugó a 4000 g por 5 min. a T° ambiente. El pellet se resuspendió en buffer β -Mercaptoetanol (EDTA 20 mM, β -Mercaptoetanol 0.7 M) y se incubó a 30°C por 30 minutos con agitación suave cada 10 min. para prevenir la decantación de las células. Se transfirió a un tubo limpio y se centrifugó a 2000 g por 5 min. a T° ambiente. Las levaduras se lavaron con 1 M sorbitol y centrifugaron a 2000 g por 5 min a T° ambiente. Se resuspendieron luego en buffer lyticasa (sorbitol 1 M, Tris-Cl pH7.8 50 mM, β - Mercaptoetanol 5 mM) y se

agregó lyticasa (Zymolyase, Worthington) a una concentración final de 1000 U/ml, incubando a 30°C por 30 minutos en rotador orbital. Luego se centrifugaron los esferoplastos resultantes a 2000 g por 5 min. a T° ambiente, desechando el sobrenadante con cuidado y lavando los esferoplastos suavemente con 1 M sorbitol, con centrifugación a 2000 g por 5 min. a T° ambiente. Se resuspendieron los esferoplastos en buffer A (sorbitol 1 M, Tris-Cl pH7.5 10 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, CaCl₂ 1 mM, β- Mercaptoetanol 1 mM), siempre en hielo, procediendo después a realizar una titulación con nucleasa micrococcal (MNasa, Worthington). Se probaron 4 concentraciones de ésta (0, 2, 4 y 8 U/ml) para lo cual se realizaron las diluciones de la enzima con esferoplastos o ADN desnudo (ND, ADN genómico purificado en paralelo desde la misma cepa) y se agregó igual volumen de buffer B (Buffer A más NP-40 0.15%), incubando a 37°C por 20 minutos. Se detuvo la reacción de digestión agregando buffer MNase Stop (SDS 5%, EDTA 250 mM) precalentado a 37°C, agitando vigorosamente. Luego se agregó proteinasa K (Merck) a cada muestra y se incubó a 37°C entre 1 – 5 horas. Posteriormente se recuperó el ADN agregando 150 mM NaCl de concentración final y realizando una extracción orgánica. El sobrenadante se trató con RNasa A a una concentración final 0.1 mg/ml (USbiological) y se incubó a 37°C por 1 – 2 horas, repitiendo la extracción orgánica luego de la incubación. Finalmente se transfirió la misma cantidad de cada muestra y se procedió con la precipitación de ADN. Se resuspendió cada pellet en buffer 0.1X TE (1X = Tris-Cl pH7.5 10 mM, EDTA 1 mM). Se analizó la calidad de la digestión tanto de la cromatina como del ADN desnudo en un gel de agarosa al 1.5%, buscando visualizar los fragmentos de cromatina en múltiplos de ~150 pb en el caso de cromatina digerida (~5 bandas). Una vez confirmada la calidad de la digestión, las muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y se procedió a cortar las bandas de ~150 pb y purificar el ADN utilizando QIAquick Gel

Extraction Kit, según instrucciones del fabricante. Sobre las muestras purificadas se realizó posteriormente PCR en tiempo real con oligonucleótidos específicos (Anexo 11).

2.26.- PCR en tiempo real o cuantitativo (qPCR)

Esta técnica permite cuantificar los productos de amplificación por PCR de muestras a analizar, mediante la acumulación de ADN de doble hebra, el cual es detectado a través del reactivo SYBR Green I. Este reactivo es un intercalante de ácido nucleico, específico para ADN doble hebra. Durante cada fase de síntesis SYBR Green I se une a los productos de PCR detectándose este ADN por fluorescencia.

El ADN proveniente de los ensayos de ChIP y digestión con MNase fueron amplificados con partidores específicos para cada ensayo (Anexos). El PCR en Tiempo Real de los ensayos de ChIP se realizó en un equipo ABI 7900HT (Applied Biosystems), utilizando PerfeCta® SYBR® Green FastMix® (Quanta Biosciences), según instrucciones del fabricante. En tanto el PCR en Tiempo Real de los ensayos con MNase se realizó en un equipo Mx3000P (Stratagene), utilizando Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies), según las instrucciones el fabricante.

Para todas las reacciones se utilizó 0.4 uM de cada oligonucleótido, 2.5 mM MgCl₂, 0.8 mM dNTPs, 30 nM de reactivo de referencia ROX (1:500), 1X reactivo SYBR Green I y AccuFast Taq DNA polymerase (Quanta Biosciences) o Taq DNA polymerase modificada (Applied Biosystems), en un volumen final de 10 ul.

La cuantificación de cada muestra fue determinada por comparación con la amplificación de una curva estándar realizada con el mismo set de oligonucleótidos. En el caso de los ensayos de ChIP esta curva fue efectuada con diluciones seriadas del Input de la misma

muestra, pudiendo así además cuantificar el inmunoprecipitado como porcentaje del INPUT. Para el ensayo de MNasa, la curva estándar se realizó con diluciones seriadas de una muestra de ADN genómico (ADNg) correspondiente a la misma cepa específica. La cuantificación en este análisis se determinó por la cantidad de amplicón para cada set de oligonucleótidos con respecto a la curva de ADNg. Cabe destacar que cada experimento representa los promedios de repeticiones biológicas con por lo menos 2 réplicas técnicas cada una.

3.- RESULTADOS

3.1.- Analizar la estimulación de la actividad remodeladora de complejos dependientes de ATP del tipo ISWI y SWI/SNF de levadura dada por proteínas HMGB (objetivo específico 1, sección 1.6.1).

3.1.1.- Generación, purificación y cuantificación de las proteínas recombinantes HMGB silvestres unidas al epítipo His.

Existen siete proteínas que pertenecen a la familia HMGB en levadura; luego de analizar su secuencia y verificar los estudios realizados con estas proteínas, se optó por trabajar con tres de ellas: Hmo1, Nhp6A y Nhp6B. Además se utilizó hHMGB1.

Hmo1 es ortólogo de HMGB1 humana, ambas poseen dos cajas HMG (HMG box A y B) hacia el N-terminal y una región C-terminal rica en aminoácidos ácidos y básicos. El orden de estas regiones ácidas y básicas está invertido en Hmo1 respecto a lo observado en hHMGB1. Por su parte, Nhp6A y Nhp6B son dos proteínas pequeñas y redundantes entre sí, contienen sólo una caja HMG y no poseen la región rica en aminoácidos ácidos y básicos presentes en Hmo1 y hHMGB1. Las secuencias aminoácidicas de Nhp6A, Nhp6B, Hmo1 y HMGB1 fueron comparadas utilizando la herramienta informática ClustalW (Figura 5).

Nhp6A	-----	
Nhp6B	-----	
Hmo1	MTTDP SVKLKSAKDSLVS SLFELSKAANQTASSIVDFYNAIGDDEEEKIEAFTTLTESLQ	60
Hmgb1	---MGKGD PPKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTM SAK EK	54
	<u>PKKPh-Aahha--E-R--h--E-P---h---Eh-K-hGE-W--h---K</u>	
	Box A	
Nhp6A	-----MVT-----PREPKK-----RTTRKKK--DPNAPKRALSAYMFFANEN	35
Nhp6B	-----MAATKEAKQPKEPKK-----RTTRKKK--DPNAPKRRLSAYMFFANEN	41
Hmo1	TLTSGVNLH LGISSELVNPIDDDKDAI IAA PVKAVRRKIERDPNAPKKPLTVFFAYSAYV	120
Hmgb1	GKFEDMA----KADKARYEREMKTY-I PP KGETKKKFK--DPNAPKRPPSAFFLFCSEY	109
	<u>--a-----K--a-----a</u>	
	<u>PKRPh-Aahha--E-</u>	
Nhp6A	RDIVRSEN-----PDITFGQVGKKLG EKWKALTPEEKQPYEAKAQADKKRYESEKELYNA	90
Nhp6B	RDIVRSEN-----PDVTFGQVGRILGERWKALTAEKQPYESKAQADKKRYESEKELYNA	96
Hmo1	RQELREDRQKAGLPPLSSTEITQEI SKKWKELSDNEKEKWKQAYNVELENYQREKSKYLE	180
Hmgb1	RPKIKGEH-----PGLSIGDVAKKLGEMWNNTAADKQPYEKKA AKLKEKYEKDIAAYRA	164
	<u>R--h--E- P-h---Eh-K-hGE-W--h---K--a-----K--a-----a</u>	
	Box B	
Nhp6A	TIA-----	93
Nhp6B	TRA-----	99
Hmo1	AKKNGTLP PASLENGPTHAPVPIPFSLQHAAEPPVEKRP HDDDGSSEKKKKKKKKDKKKD	240
Hmgb1	KGKPDAAKKG VVK-----AEKSKKKKEEEDEDEDEDEEEDEDEDEDEDEED	211
Nhp6A	-----	
Nhp6B	-----	
Hmo1	<i>KSNS SI</i>	246
Hmgb1	DDDE --	215

Figura 5: Comparación de las proteínas HMGB utilizadas en este trabajo. Alineamiento obtenido desde el servidor ClustalW. Letras subrayadas, cajas HMG (A y B) y la secuencia consenso de las cajas HMG (Weir et al, 1993); Abreviaciones: *h*, hidrofóbico; *a*, aromático. La secuencia fue tomada del GenBank. Letras en cursiva, cola básica. Letras en negrita, cola ácida.

Con el objetivo de obtener las proteínas Hmo1, Nhp6A, Nhp6B y hHMGB1 en bacterias, se realizó la clonación de éstas tal como se describe en Materiales y Métodos, lo cual permitió su posterior purificación mediante una columna de afinidad.

Las regiones codificantes de las proteínas de levadura se obtuvieron a partir de ADN genómico de una cepa silvestre S208 (BY4741). La región codificante de la proteína HMGB1 humana se obtuvo a partir del plásmido comercial [pBlueScript-hHMGB1 (Invitrogen)], el cual posee el ADNc de HMGB1 humana. Una vez obtenidos los distintos productos de PCR, estos fueron digeridos con las enzimas de restricción determinadas para cada uno e insertados en el vector pQE-81L digerido con las mismas enzimas, la estrategia de clonamiento se muestra en la Figura 6A. Una vez obtenidos los clones (Figura 6B - 6E), estos fueron corroborados por análisis con enzimas de restricción específicas, donde se utilizaron StyI para Nhp6A, NspI para Nhp6B, HincII para Hmo1 y NdeI para HMGB1 (Figura 6F), confirmándose la obtención de todos los vectores por la aparición de los fragmentos de digestión esperados para cada uno de estos (para Nhp6A, Hmo1 y HMGB1 se obtuvieron las dos bandas esperadas y para Nhp6B las tres bandas). Los clones positivos luego se verificaron por secuenciación con un oligonucleótido sentido (PR pQE-80III) o antisentido (PR pQE-80rev) específicos para los vectores pQE-8XL (data no mostrada).

Una vez obtenidos los diferentes vectores pQE81L, estos fueron transformados en bacterias *E. coli* BL21-DE3 y se procedió a la purificación de las proteínas recombinantes como se indica en Materiales y Métodos.

Las proteínas purificadas fueron analizadas mediante SDS-PAGE y posterior tinción con Azul de Coomassie, así como por Western blot utilizando un anticuerpo dirigido contra el epítipo His, el cual está contenido en todas las proteínas generadas. En la

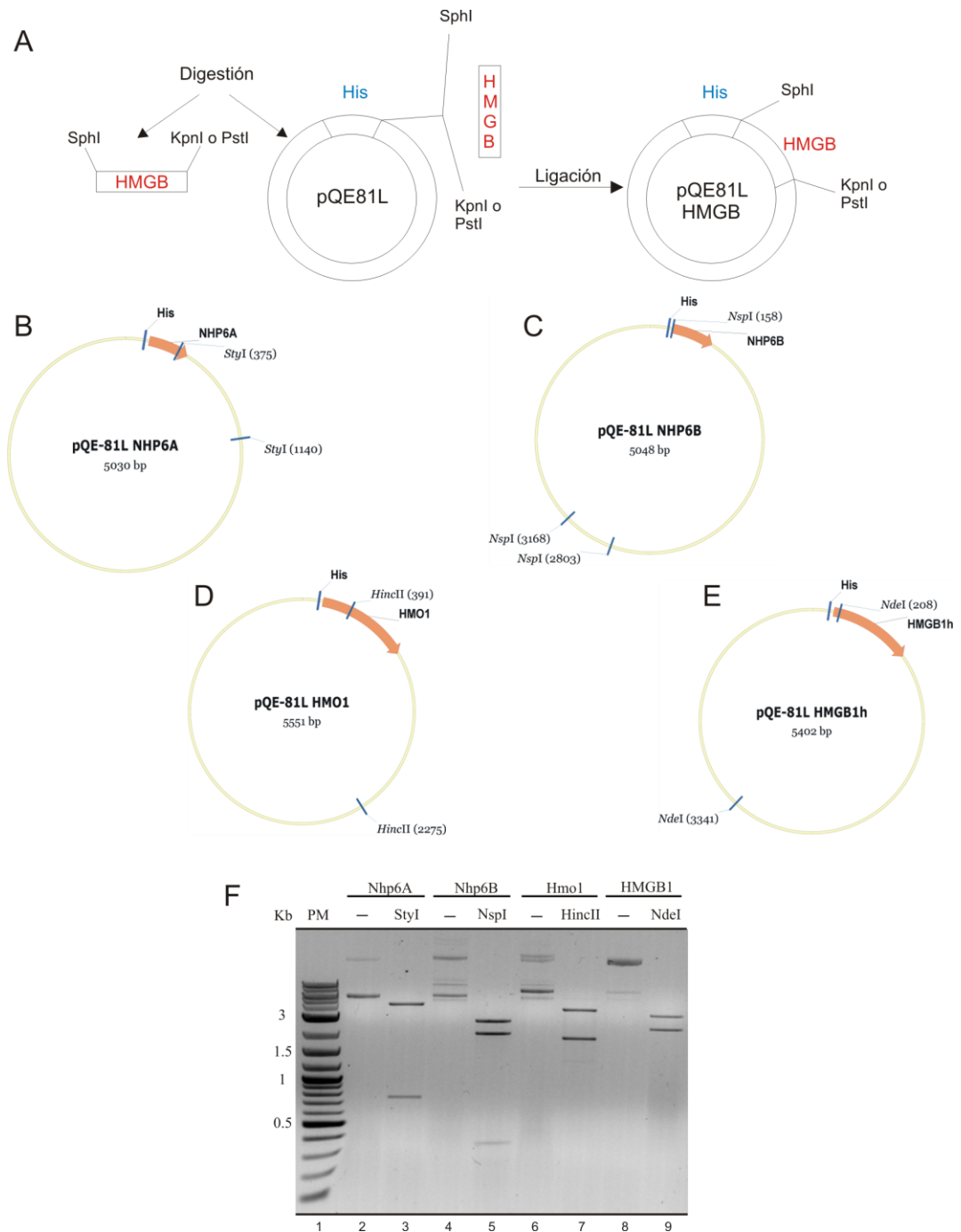


Figura 6: Generación de vectores de expresión procarionte para las proteínas HMGB. A) Esquema representativo del método de clonación de las proteínas HMGB en el vector pQE-81L. B, C, D & E) Representación esquemática de los vectores creados para cada proteína HMGB con las posiciones de las enzimas de restricción utilizadas en el análisis de confirmación de los clones. F) Gel de agarosa utilizado para analizar la confirmación de los diferentes clones por enzimas de restricción para cada constructo generado. Carril 1 marcador de peso molecular (PM), 2 & 3 Nhp6A, 4 & 5 Nhp6B, 6 & 7 Hmo1, 8 & 9 HMGB1. (-) sin digerir. La digestión se indica con la enzima particular.

Figura 7B se observa, luego de la tinción con Azul de Coomassie, una banda única o una banda principal con la movilidad electroforética esperada para cada una de las proteínas generadas, que corresponden a las proteínas HMG en fusión a histidinas. Lo anterior se corroboró por lo observado en la Figura 7C, mediante el ensayo de Western blot donde se visualiza una banda única y con una migración similar a las proteínas analizadas por SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie. Las distintas proteínas purificadas fueron cuantificadas por SDS-PAGE y tinción con Azul de Coomassie, comparando con cantidades conocidas de BSA (Sigma), entre 100 y 400 ng.

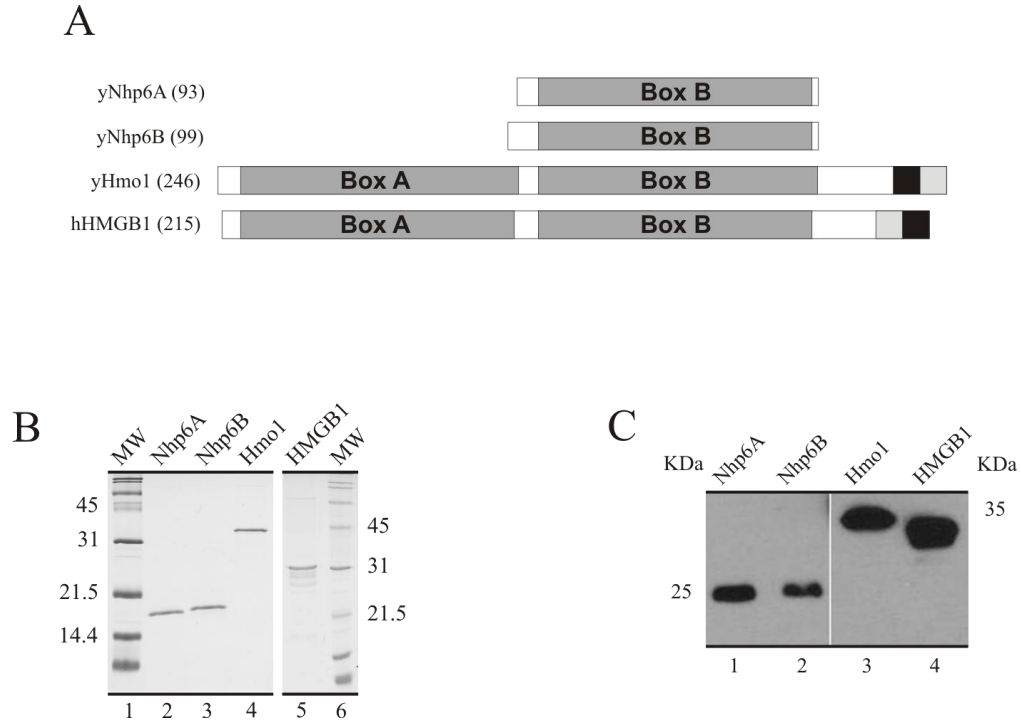


Figura 7: Purificación de las proteínas HMGB. A) Representación esquemática de las HMGBs utilizadas. Estas son 3 de levadura y 1 humana, yNhp6A, yNhp6B, yHmo1 y hHMGB1, respectivamente. En gris, las cajas HMG, A y B. En gris claro, cola básica. En gris oscuro, cola ácida. B) Análisis de la purificación de proteínas HMGB recombinantes de levadura y humano, mediante SDS-PAGE al 15 y 12% respectivamente, teñido con Azul de Coomassie. Las proteínas recombinantes poseen el epítipo His en el N-terminal, expresadas en BL-21 Codon plus. Marcador de peso molecular (1 y 6), His-Nhp6A (2), His-Nhp6B (3), His-Hmo1 (4), His-HMGB1 (5). C) Western blot de confirmación de la identidad de la proteína recombinante producida, con anticuerpo específico para el epítipo His. His-Nhp6A (1), His-Nhp6B (2), His-Hmo1 (3), His-HMGB1 (4).

3.1.2.- Reconstitución de mononucleosomas y arreglos nucleosomales a partir de secuencias de ADN posicionadoras de nucleosomas marcadas radioactivamente.

Para las reconstituciones de mononucleosoma se utilizó como ADN aceptor del core nucleosomal la secuencia posicionadora 601 que fue descrita por el grupo del Dr. Widom (Lowary and Widom, 1998). Esta secuencia permite obtener una reconstitución de mononucleosomas sobre el 90%.

Distintos fragmentos de ADN conteniendo la secuencia 601 fueron obtenidos a partir del plásmido pGEM-3Z/601-Gal4 (Gutiérrez et al, 2007) mediante PCR con partidores específicos; en cada caso uno de los partidores fue marcado radioactivamente en su extremo 5'. Los fragmentos obtenidos fueron: un fragmento de 147 pb que corresponde a la secuencia posicionadora 601 (core nucleosomal), un fragmento de 216 pb que contiene la secuencia 601 y 68 pb con un sitio de unión para el factor de transcripción Gal4 y un fragmento de 236 pb que posee la secuencia 601 en la región central más 44 pb de ADN hacia ambos extremos con un sitio de unión para el factor de transcripción Gal4 hacia el extremo 3' (Figura 8A – 8C). Tanto los tamaños óptimos como el marcaje radioactivo de los fragmentos fueron confirmados por electroforesis en un gel de agarosa (Figura 8D) y en un gel de AA no denaturante expuesto a un film radiográfico (Figura 8E).

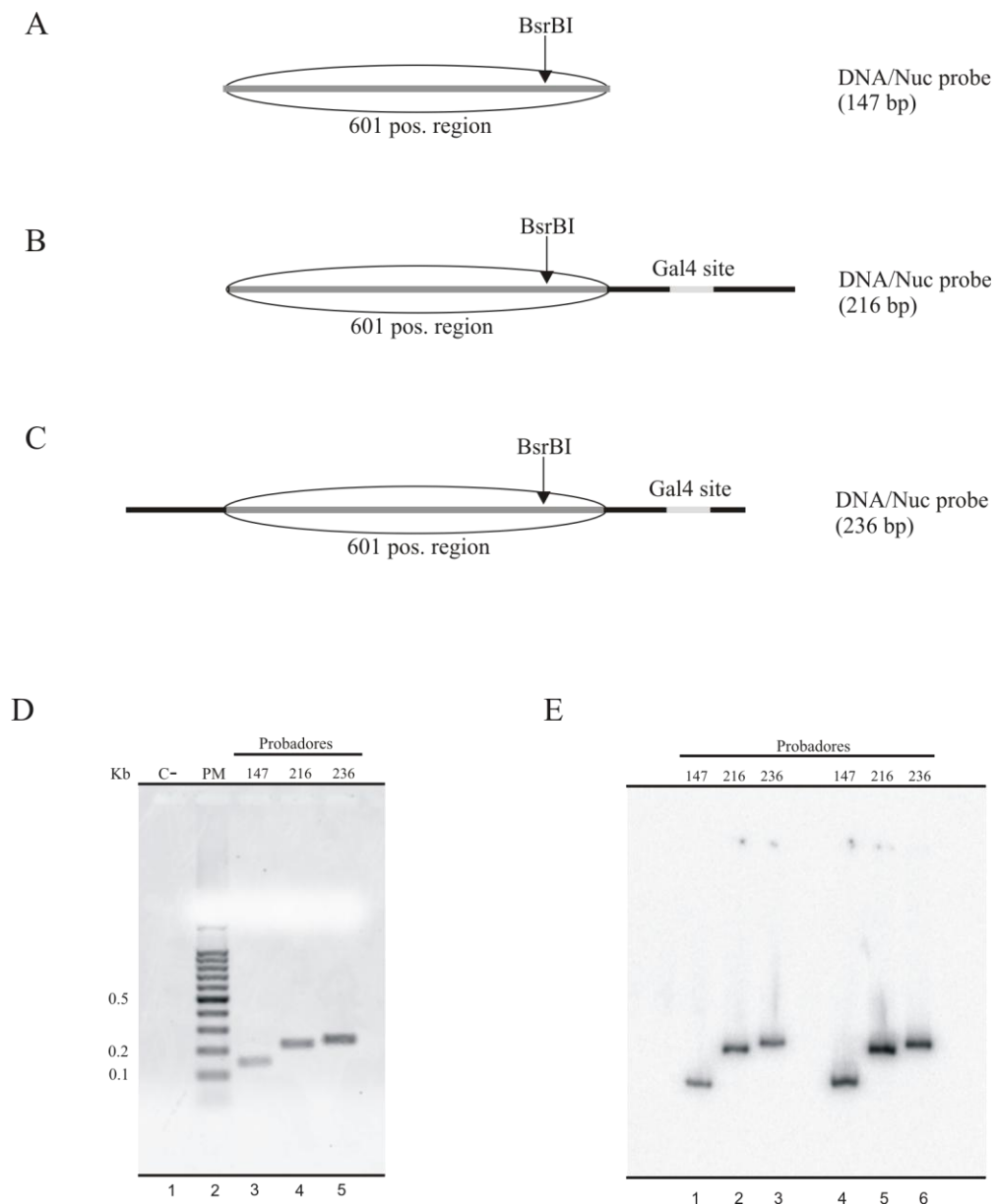


Figura 8: Obtención de los fragmentos de ADN para reconstituir mononucleosomas. A, B y C) Representación esquemática de los probadores de ADN a utilizar para reconstituir los mononucleosomas de 147, 216 y 236 pb, respectivamente. Se detalla la presencia de la secuencia posicionadora de nucleosoma 601 y del sitio de unión para el factor de transcripción Gal4. D) Gel de agarosa para confirmar los productos de PCR. Control negativo de PCR (1), marcador de tamaños moleculares (2), 147 (3), 216 (4) y 236 (5). E) Gel de poliácridamida no denaturante para verificar las purificaciones de ADN, 10 fmoles (1, 2 y 3), 20 fmoles (4, 5 y 6).

Para obtener el arreglo nucleosomal con la secuencia posicionadora 601, primeramente se obtuvo esta secuencia por doble digestión del plásmido pGEM-3Z/601-Gal4 y se ligó de manera consecutiva hasta obtener los diferentes arreglos de esta secuencia, como se indica en Materiales y Métodos. Los arreglos generados constan de 6 secuencias 601 distanciadas entre ellas por 60 pb; los extremos 5' y 3' del arreglo tienen 30 pb extra. Los distintos arreglos se ensamblaron en el plásmido pGEM-3Z (Promega), obteniendo finalmente los plásmidos pGEM-3Z/601x6_Gal4_central, pGEM-3Z/601x6 y pGEM-3Z/601x6_Gal4_Izquierda (Figura 9A – 9C), los cuales se detallan de Materiales y Métodos. Para predecir el ensamble de nucleosomas sobre la secuencia de nuestro arreglo, realizamos un análisis de predicción de posicionamiento nucleosomal sobre éste mediante un programa online (http://genie.weizmann.ac.il/software/nucleo_prediction.html) (Kaplan et al, 2009), observándose una alta probabilidad de posicionamiento en las regiones 601 (Figura 9D). El clonamiento de cada arreglo nucleosomal se confirmó por digestiones con enzimas de restricción específicas para cada arreglo que generan la liberación de un fragmento de tamaño esperado (Figura 9E) o liberando un fragmento de 1246 pb correspondiente al arreglo nucleosomal completo (Figura 9F). El arreglo nucleosomal que posee el sitio Gal4 central se marcó radioactivamente, se purificó y se confirmó el tamaño de este fragmento liberado por la digestión con las enzimas de restricción EcoRI y HindIII (Figura 9G).

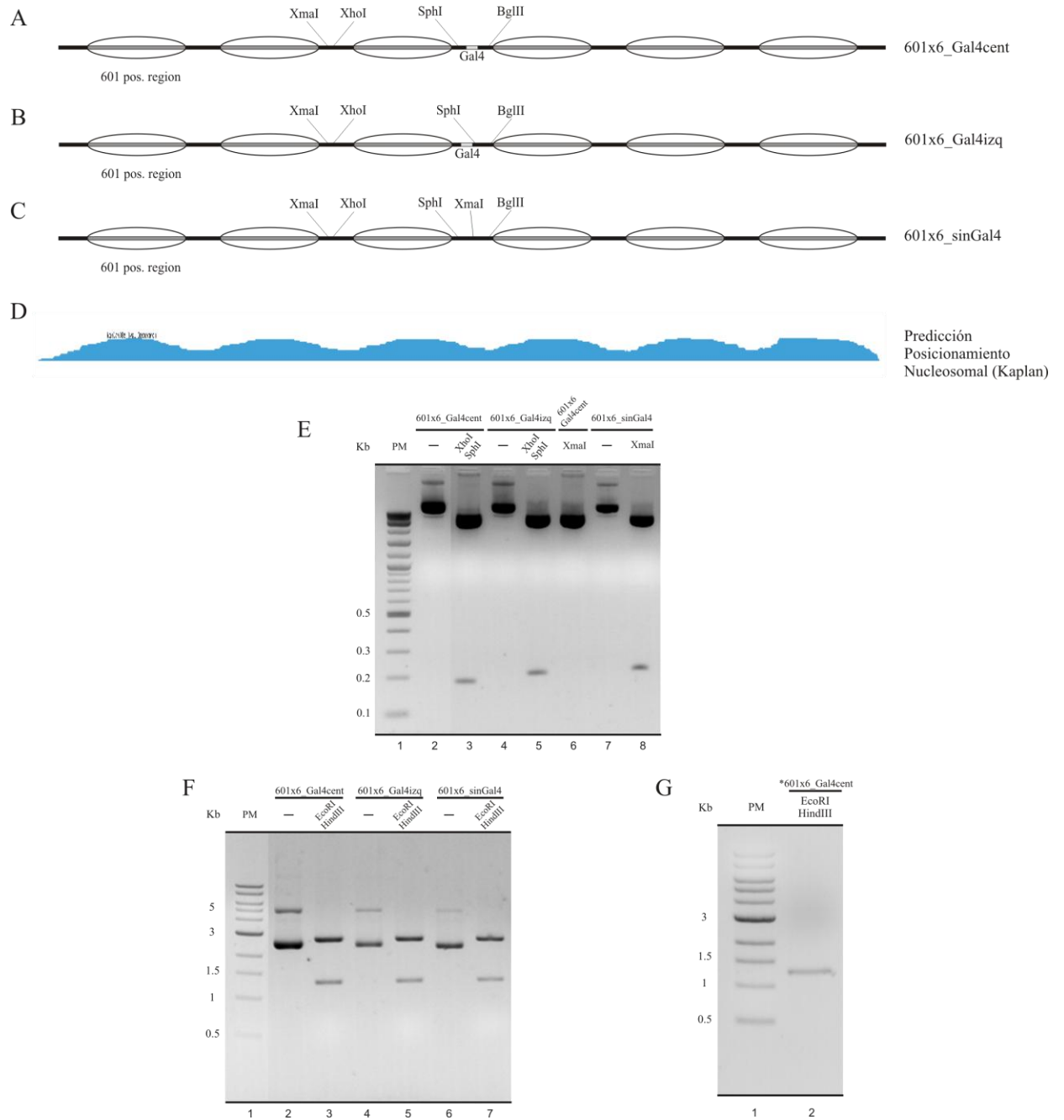


Figura 9: Obtención de arreglos nucleosomales 601x6. A, B y C) Representación esquemática de los arreglos nucleosomales y sus secuencias posicionadoras, 601. 601x6_Gal4cent, 601x6_Gal4izq y 601x6_sinGal4, respectivamente. D) Análisis de predicción de posicionamiento nucleosomal de la secuencia del arreglo 601x6_Gal4cent por servidor del laboratorio de Erin Segal (Kaplan et al, 2008), que muestra una probabilidad alta de posicionamiento en regiones 601. E) Gel de agarosa para confirmar digestión diferencial entre los diferentes arreglos 601x6. Diferencia entre Gal4cent y Gal4izq (3 y 5) y entre Gal4cent y sinGal4 (6 y 8). F) Gel de agarosa para liberar el fragmento completo del arreglo de 1246 pb (EcoRI/HindIII). G) Gel de agarosa con el fragmento de ADN del 601x6_Gal4cent marcado radioactivamente, liberado con EcoRI/HindIII.

El dador del octámero de histonas para reconstituir los nucleosomas se obtuvo a partir de cromatina de células HeLa, obtenida como se señala en Materiales y Métodos. Una vez obtenida la cromatina fue necesario determinar las concentraciones necesarias de MNasa a utilizar para la obtención de oligonucleosomas cortos. En la Figura 10A podemos observar que a una concentración de MNasa de 0.125 U/ul (carril 3) es posible obtener fragmentos de ADN entre 100 y 2000 pb, con una banda marcada entre 500 y 600 pb, que son los tamaños de ADN deseados. Lo anterior se obtuvo tanto en la fracción densa (pellet) como en la laxa (sobrenadante); las diferentes fracciones se detallan en Materiales y Métodos. Considerando lo anterior se procedió a digerir toda la cromatina de la fracción laxa (sobrenadante) y los productos de digestión fueron separados por tamaño mediante FPLC. Una vez obtenidas las distintas fracciones se corroboró el tamaño del ADN y la composición proteica (octámero de histonas) mediante electroforesis en gel de agarosa y SDS-PAGE respectivamente (Figura 10B y 10C). Se observa en las Figuras 10B y 10C que las fracciones 12 a la 16 corresponden a oligonucleosomas cortos (SON), aproximadamente de 2 a 5 nucleosomas (300 – 800 pb), los que se utilizan para realizar el intercambio de octámeros de histonas en las reconstituciones. La capacidad de donar los octámeros de histonas al ADN marcado radioactivamente fue analizada mediante el ensayo de reconstitución nucleosomal, detallado en Materiales y Métodos. Se observa en la Figura 10D, que todas las fracciones analizadas fueron capaces de generar la transferencia del octámero de histonas al ADN marcado de manera óptima y sin generar productos inespecíficos de reconstitución.

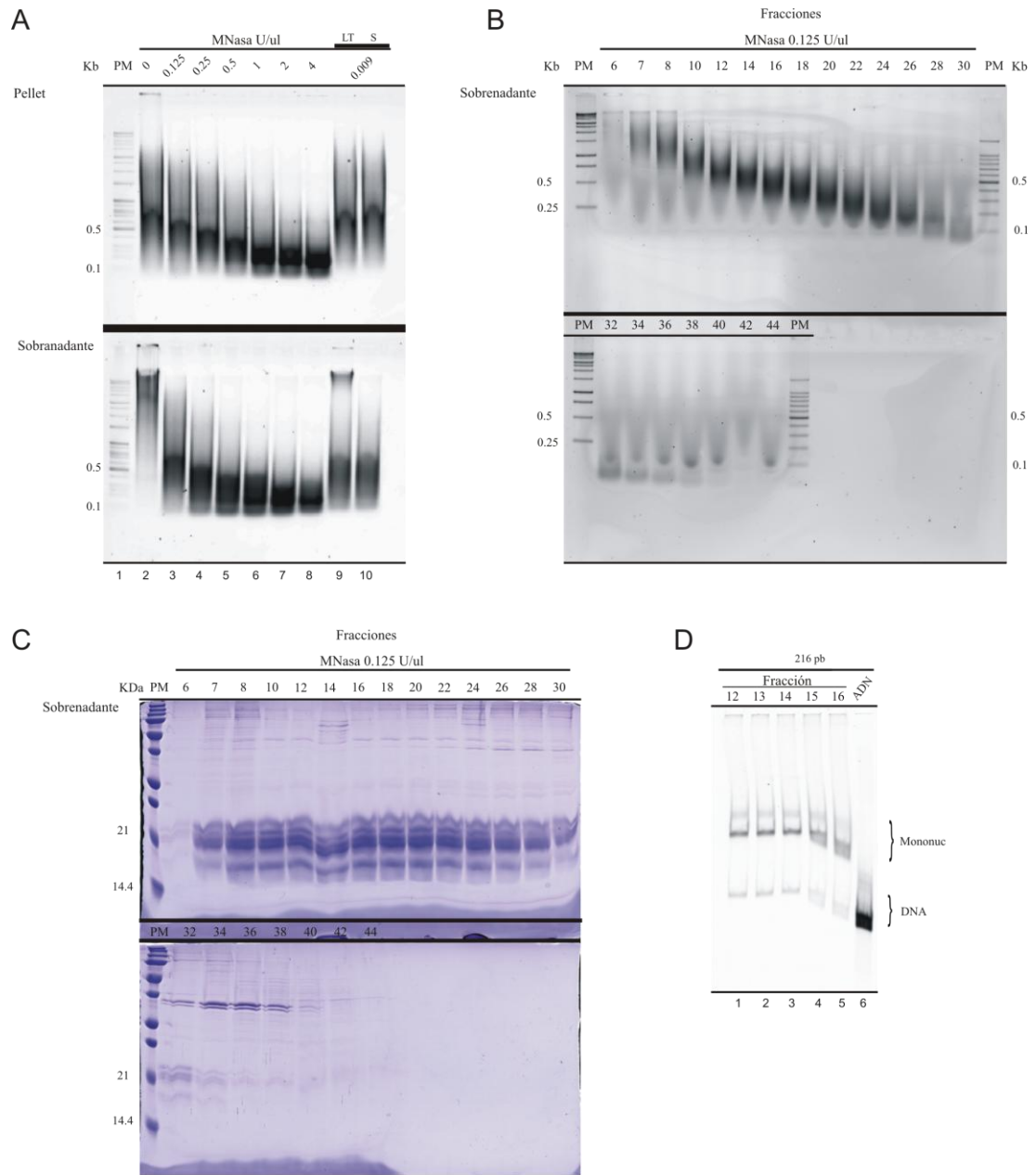


Figura 10: Obtención y purificación de oligonucleosomas desde células HeLa. A) Gel de agarosa para analizar la fragmentación del ADN luego de la digestión de estandarización con MNasa sobre la cromatina. Concentraciones crecientes de MNasa (0-4 U/ul) carriles (2 – 8); parte superior, la digestión del pellet, parte inferior, la del sobrenadante de la purificación. B & C) Análisis de la obtención de los oligonucleosomas luego de la digestión con MNasa (fracción laxa) y cromatografía en columna Sefarosa CL-6B. B) Gel de agarosa para analizar el promedio de los fragmentos de ADN obtenidos en las distintas fracciones. C) Gel de AA denaturante para analizar la composición de las histonas de estos oligonucleosomas en las diferentes fracciones obtenidas. Fracciones seleccionadas por tamaño de ADN e histonas presentes (12 – 16). D) Gel AA no denaturante para analizar las reconstituciones obtenidas con las fracciones seleccionadas sobre el fragmento de ADN de 216 pb, donde se aprecia la migración del ADN libre y el de mononucleosomas sin productos inespecíficos.

La reconstitución de los fragmentos de 147, 216 y 236 pb marcados radioactivamente se realizó utilizando los oligonucleosomas cortos (SON) purificados. La formación de los mononucleosomas se observa en la Figura 11A por su retardo característico con respecto al ADN libre en geles de AA nativo.

La reconstitución del arreglo nucleosomal también se realizó mediante el método de reconstitución por diluciones sucesivas. Cada fragmento, conteniendo el arreglo 601x6_Gal4_central (equivalente a 6 mononucleosomas reconstituidos), fue analizado por gel de agarosa (Figura 11B), donde se observó una migración mayor para el arreglo reconstituido comparado con el ADN desnudo. Esto también fue analizado por un gel de AA no denaturante (Figura 11C), obteniéndose un retardo mayor para el arreglo reconstituido comparado con el ADN libre de éste.

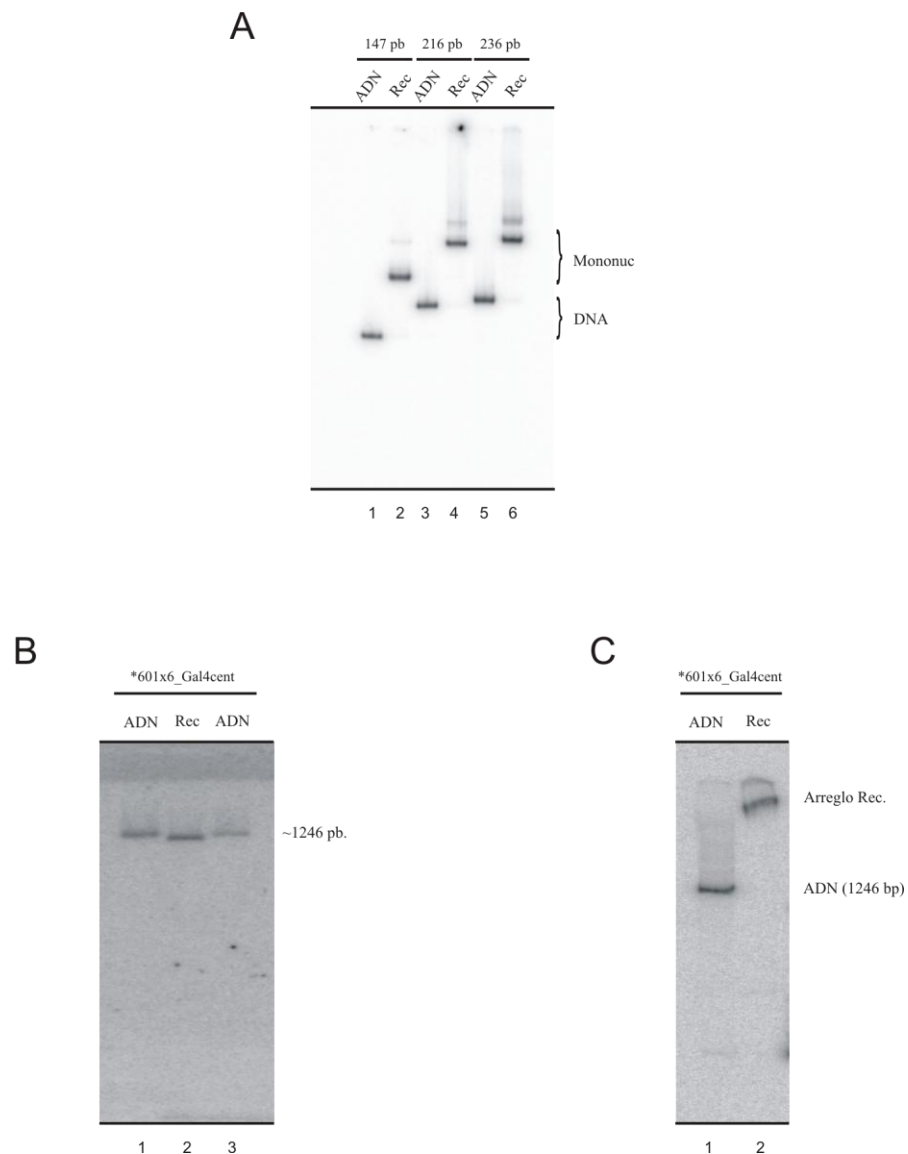


Figura 11: Obtención de la reconstitución de los diferentes probadores de ADN. A) Gel de AA no denaturante para analizar las reconstituciones de los mononucleosomas de 147, 216 y 236 pb marcados radioactivamente. ADN libre (1, 3 y 5) y mononucleosoma reconstituído (2, 4 y 6). B) Gel de agarosa para confirmar la reconstitución del arreglo 601x6_Gal4cent. Arreglo libre (1 y 3), arreglo reconstituído (2). C) Gel de AA no denaturante al 3.5% (60:1) para confirmar la reconstitución del arreglo nucleosomal (2), comparando el retardo de éste con el del probador de ADN libre (1) de 1246 pb.

3.1.3.- Unión de las proteínas recombinantes HMGB silvestres y el factor de transcripción quimérico Gal4-VP16 a ADN y a mononucleosomas reconstituidos *in vitro*.

Estos análisis se realizaron como está descrito en Materiales y Métodos. En resumen, en los ensayos de unión de las proteínas HMGB a ADN y a mononucleosomas reconstituidos de 147 y 216 pb, se utilizó una cantidad determinada de cada probador y además se analizaron diferentes cantidades de las proteínas HMGB recombinantes. Lo anterior se realizó a dos condiciones diferentes de estringencia. Para nuestros estudios, estringencia se refiere a la cantidad de ADN (o nucleosomas) sin marcar (frío), que compite por la unión de las proteínas con el probador marcado. Esto nos permite generar condiciones más cercanas a lo que realmente ocurre *in vivo*. Un nivel corresponde a la estringencia estándar (baja estringencia) que contiene una mínima cantidad de ADN frío (a la forma de oligonucleosomas cortos), la cual se obtiene luego de realizar las reconstituciones; corresponde a una concentración de 2 ng/ul (~15 nM en unidades de nucleosoma). La otra condición (alta estringencia) corresponde a una concentración de 15 ng/ul (~120 nM). La razón molar existente entre el ADN frío (a la forma de unidades de nucleosomas) y el probador marcado a baja estringencia es de ~20:1 y a alta estringencia es de ~180:1, considerando que la concentración de probador marcado es de ~0.7 nM. Los diferentes resultados de unión se observan por la aparición de bandas de mayor retardo a la del probador utilizado.

Con el objetivo de determinar la capacidad de unión al ADN de las proteínas HMGB recombinantes purificadas, primeramente se utilizó probadores que sólo consideran la secuencia de ADN que envuelve al octámero de histonas en el nucleosoma (147 pb). Cuando se obtuvo el resultado utilizando este probador, realizado a baja estringencia, logramos confirmar que las

cuatro proteínas HMGB analizadas presentan unión sólo al ADN desnudo, ya que no se observó unión de éstas al mononucleosoma de 147pb (Figura 12A).

Luego se estudió la unión de las proteínas HMGB (a diferentes concentraciones) al ADN de 216 pb a baja estringencia, donde se visualizó que éstas ya se unen a una concentración de 5 nM (Figura 12B). En cambio a alta estringencia, su grado de asociación al probador es menor (Figura 12D). Cuando evaluamos la unión a mononucleosomas reconstituidos sobre este mismo fragmento de ADN de 216 pb, a baja estringencia, observamos que las proteínas Nhp6A y Nhp6B ya se unen a una concentración de 5 nM, la proteína Hmo1 muestra asociación desde 25 nM y HMGB1 desde 10 nM, todas las cuales se unen más débil que al ADN libre (Figura 12C). En cambio, al analizar la unión a alta estringencia observamos que todas las proteínas disminuyen notoriamente su unión al probador (Figura 12E). Es así como las proteínas Nhp6A, Nhp6B y HMGB1 se unen desde una concentración de 25 nM y la proteína Hmo1 se une desde 50 nM.

Por otro lado se analizó si el factor de transcripción quimérico Gal4-VP16 se une al sitio de unión que está presente en el ADN conector de los mononucleosomas de 216 pb (Figura 8B). Para lo anterior se estudió la unión de diferentes fracciones de una purificación de esta proteína (Figura 13A), observándose que las 5 fracciones analizadas poseen un alto grado de unión a 15 nM de Gal4-VP16, cercano al 80%. Un análisis adicional para la fracción E1 a tres concentraciones (5, 15 y 20 nM), mostró que a 15 nM la unión de este factor de transcripción quimérico a su sitio de unión, en las condiciones de nuestros ensayos, era muy cercana al máximo de unión, siendo esta fracción óptima para utilizarla a una concentración de 15 nM en los ensayos posteriores (Figura 13B).

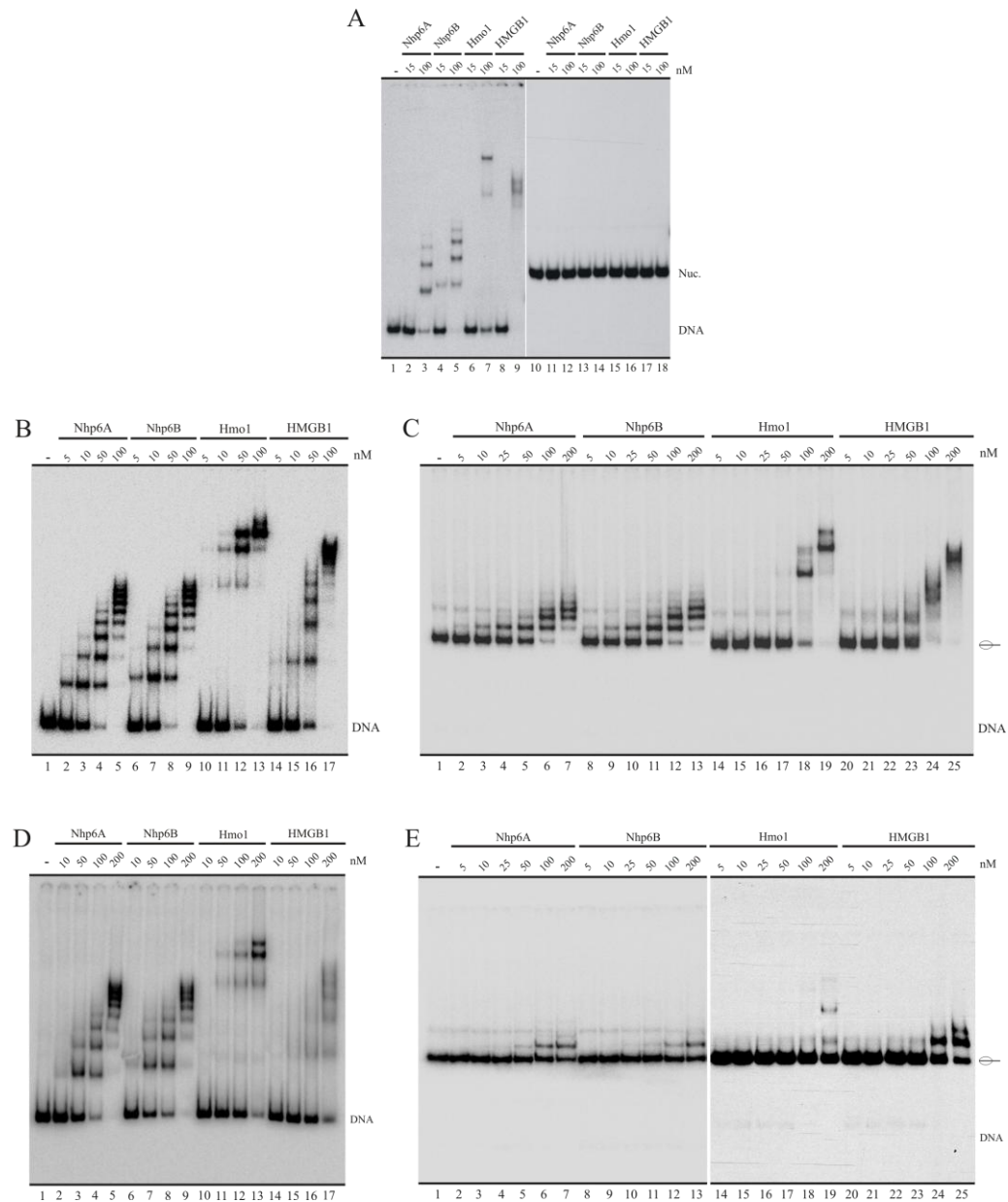


Figura 12: Análisis de la unión de las proteínas HMGB a ADN y mononucleosoma. A) Ensayo de retardo en gel (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA) para análisis de unión de las proteínas HMGB sobre el ADN y mononucleosoma de 147 pb, representando al nucleosoma sin ADN conector (linker), en condiciones de baja estringencia [2 ng/uL de oligonucleosomas cortos (SON)]. B) EMSA analizando la unión de todas las HMGBs en estudio a un probador de ADN, bajo condiciones de baja estringencia. C) EMSA para análisis de unión al probador reconstituido como mononucleosoma, bajo condiciones de baja estringencia. D) EMSA de análisis de unión al probador de ADN, bajo condiciones de alta estringencia (15 ng/uLSON). E) EMSA analizando la unión al probador reconstituido como mononucleosoma, bajo condiciones de alta estringencia. Para los ensayos de unión (B, C, D & E) se utilizo un probador de 216 pb (a la forma de ADN desnudo o mononucleosoma) que posee en un extremo la secuencia posicionadora de nucleosomas 601, lo que posiciona el octámero de histonas en una ubicación lateral.

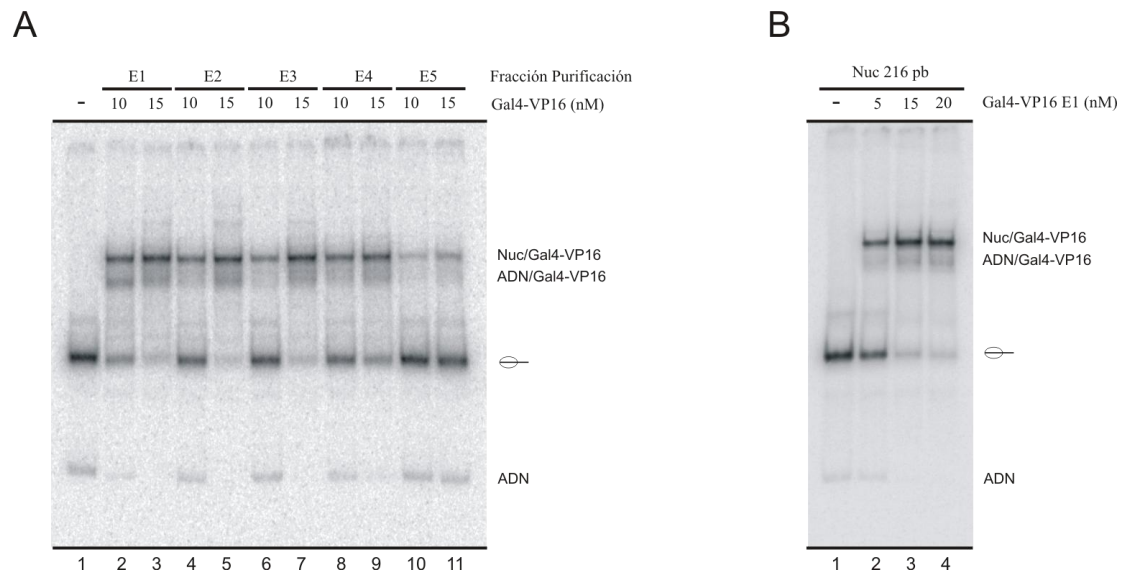


Figura 13: Unión de la proteína Gal4-VP16 a mononucleosomas. A) Análisis de unión de diferentes fracciones de Gal4-VP16 (10 y 15 nM). Donde E1, 2 & 3 poseen similar unión. B) Titulación para la asociación de la fracción E1 de Gal4-VP16, concentraciones de 5, 15 y 20 nM. En ambos casos se utilizó en el probador de 216 pb, en el cual el sitio de unión de Gal4-VP16 se ubica en la región de ADN linker luego de la reconstitución.

3.1.4.- Efecto de las proteínas HMGB sobre los diferentes tipos de remodelación nucleosomal generados por los complejos remodeladores dependientes de ATP.

Con el objetivo de responder a esta interrogante se analizaron tres tipos de actividad de los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP, que son:

- El desplazamiento nucleosomal en *cis* (sliding), en el cual se observa cómo el octámero de histonas se mueve sobre la misma hebra de ADN.
- La transferencia de histonas, ensayo en el que se aprecia cómo se transfiere el octámero de histonas de una hebra de ADN nucleosomal dadora a otra receptora.
- El desalojo de histonas o desensamble nucleosomal (eviction), en el cual, producto del reclutamiento del complejo remodelador de cromatina dependiente de ATP por parte de un factor de transcripción, se genera la pérdida o desensamble del octámero de histonas del nucleosoma probador.

Los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP, se obtuvieron por dos métodos de purificación, detallados en Materiales y Métodos. Los complejos remodeladores RSC e ISW1, que se utilizaron en este trabajo, fueron purificados previamente por afinidad en tándem (TAP). Mediante esta misma técnica se logró obtener el complejo SWI/SNF purificado (Figura 14), corroborado por western blot con un anticuerpo específico para el péptido de unión a calmodulina presente en el epítipo TAP que posee la subunidad Snf6 (Snf6-TAP) del complejo SWI/SNF (Figura 14A). Se confirmó que las fracciones 3-6 y 11-16 tenían presente esta subunidad. Por SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie o solución de plata (Figura 14B y C, respectivamente), se cuantificó y corroboró la presencia de las diferentes subunidades del

complejo en las diferentes fracciones, obteniendo una baja concentración del complejo SWI/SNF, inapropiada para realizar los ensayos de remodelación. Además la baja concentración de complejo no nos permitió visualizar la falta de alguna subunidad de este complejo, cuando se comparó con el estándar de concentración de éste.

El segundo método que se utilizó fue el de afinidad al epítipo Flag (Figura 15). La purificación se confirmó en las 4 eluciones obtenidas por un gel SDS-PAGE teñido con solución de plata (Figura 15A). Las diferentes fracciones fueron combinadas y concentradas; por el mismo método se cuantificó y comparó dos cantidades diferentes del complejo purificado (Figura 15B), observándose la presencia de todas las subunidades de este complejo y una concentración adecuada para los ensayos.

Para analizar la variación de la actividad remodeladora por desplazamiento nucleosomal en *cis* de los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP en presencia de las proteínas HMGB, los ensayos fueron realizados a baja estringencia. Además se utilizaron controles de migración de mononucleosomas, así como de la actividad que generan estos complejos por sí solos.

Al analizar el complejo SWI/SNF se debe considerar que la actividad de remodelación que estos generan por desplazamiento en *cis* sobre el nucleosoma lateral, es desplazar el octámero de histonas más allá del extremo 5' ó 3' del probador, lo que se evidencia por la mayor migración del mononucleosoma con respecto al mononucleosoma sin remodelar. Para estudiar la estimulación de esta actividad se utilizaron tres concentraciones de las proteínas recombinantes HMGB, específicamente 10, 50 y 100 nM, mediante las cuales se observó para las variantes de levadura una leve estimulación de la actividad de *sliding* a 50 nM y una remodelación casi total a 100 nM. En cambio para la proteína HMGB1 humana se observó

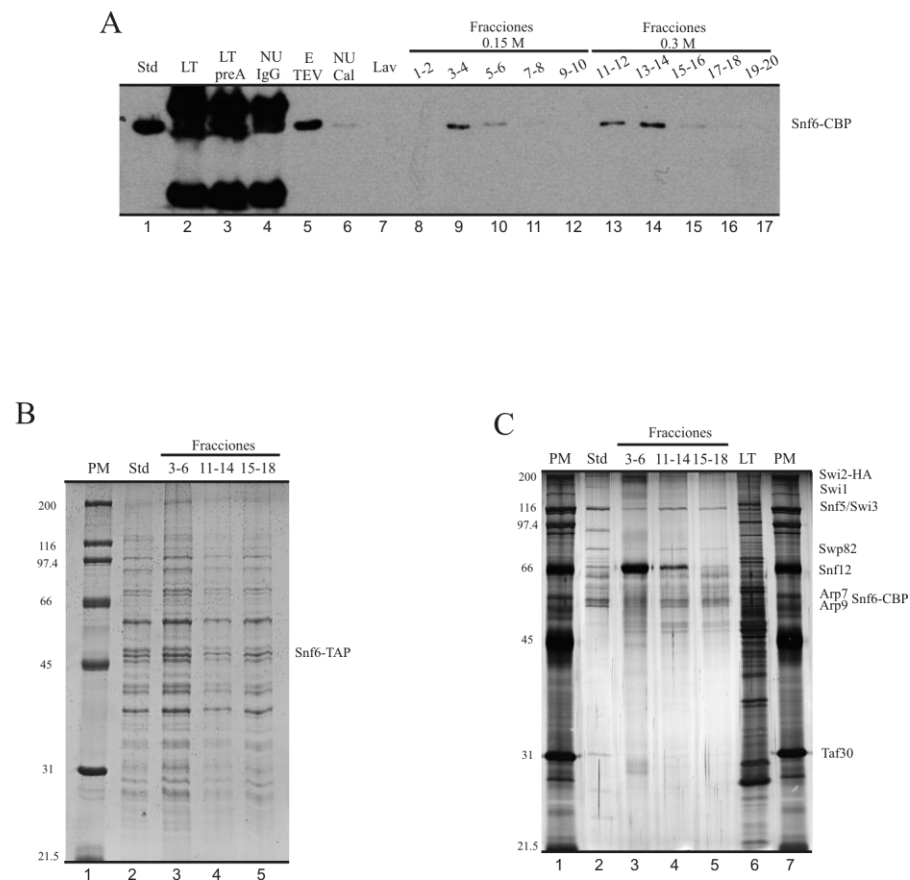


Figura 14: Purificación del complejo SWI/SNF por cromatografía de afinidad en tándem. Método de purificación en tándem desde levaduras que expresan la proteína TAP-Snf6. A) Western blot para detectar la presencia de la proteína Snf6, con anticuerpo específico para el epítipo TAP. B y C) Análisis electroforéticos en geles de AA denaturante al 10% (30:1). B) Gel teñido con Azul de Coomassie. C) Gel teñido con plata. En ambos geles se observa PM (1), Std (2) y las diferentes fracciones. Significado de Std (estándar), LT (lisado total), UN (fracción no unida) y E (elución).

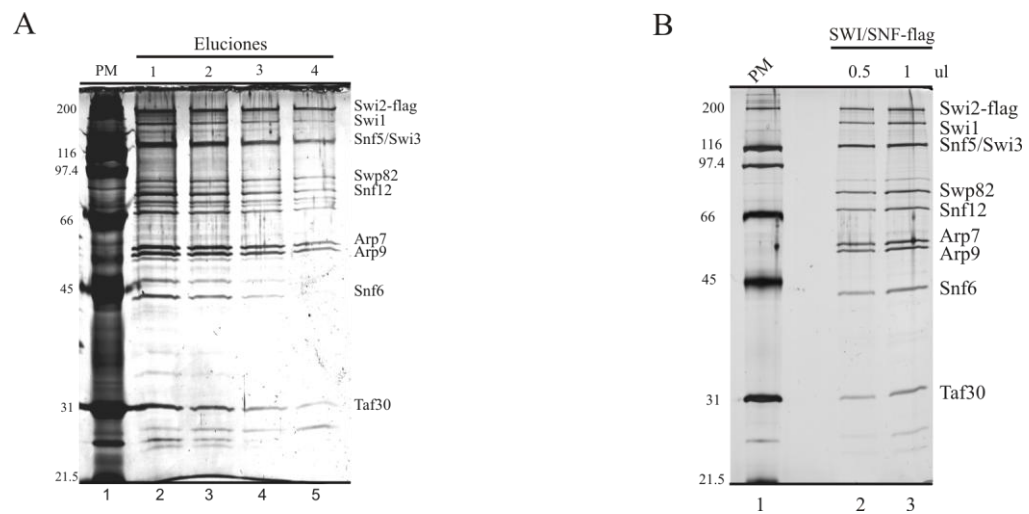


Figura 15: Purificación del complejo SWI/SNF por cromatografía de afinidad al epítipo Flag. Método de purificación Flag-tag desde levaduras que expresan la proteína Snf2-Flag. A y B) Análisis electroforéticos en geles de AA denaturante al 10% (30:1), teñidos posteriormente con plata. A) Análisis de las 4 eluciones obtenidas de este complejo por esta purificación. B) Análisis de las eluciones combinadas y concentradas, para realizar la cuantificación con respecto al marcador de peso molecular. PM (1), 0.5 ul de SWI/SNF (2) y 1 ul de SWI/SNF purificado (3).

estimulación a partir de 10 nM. Todo esto comparado con el control de actividad del complejo SWI/SNF por sí solo (carril 3, Figura 16A). Además se demuestra que las proteínas HMGB por sí solas no presentan ningún tipo de modificación del patrón de retardo del mononucleosoma (Figura 16A).

El complejo RSC, el cual pertenece a la misma familia del complejo SWI/SNF, presenta un tipo de remodelación por desplazamiento en *cis* similar a éste. Se analizó la estimulación comparando la actividad de remodelación de RSC por sí sólo (carril 3, Figura 16B) con la presencia de dos concentraciones de las proteínas HMGB (15 y 100 nM), con lo cual se obtuvo un patrón de estimulación similar en todas las proteínas a 100 nM. La proteína HMGB1 mostró estimulación desde 15 nM (Figura 16B).

En el caso del complejo ISW1, la actividad de remodelación por desplazamiento en *cis* que genera este complejo es la de trasladar el octámero desde una posición lateral a una posición central, lo que se evidencia por una menor migración con respecto al mononucleosoma lateral. La actividad de remodelación se analizó en presencia de las proteínas HMGB a 15 y 100 nM. (Figura 16C). En este caso se observó que las proteínas Nhp6A y Nhp6B no estimulan la actividad de remodelación. En cambio las proteínas Hmo1 y HMGB1 generan estimulación notoria de dicha actividad a 100 nM (Figura 16C), siempre comparando con respecto a la actividad remodeladora del complejo por sí sólo (carril 3, Figura 16C).

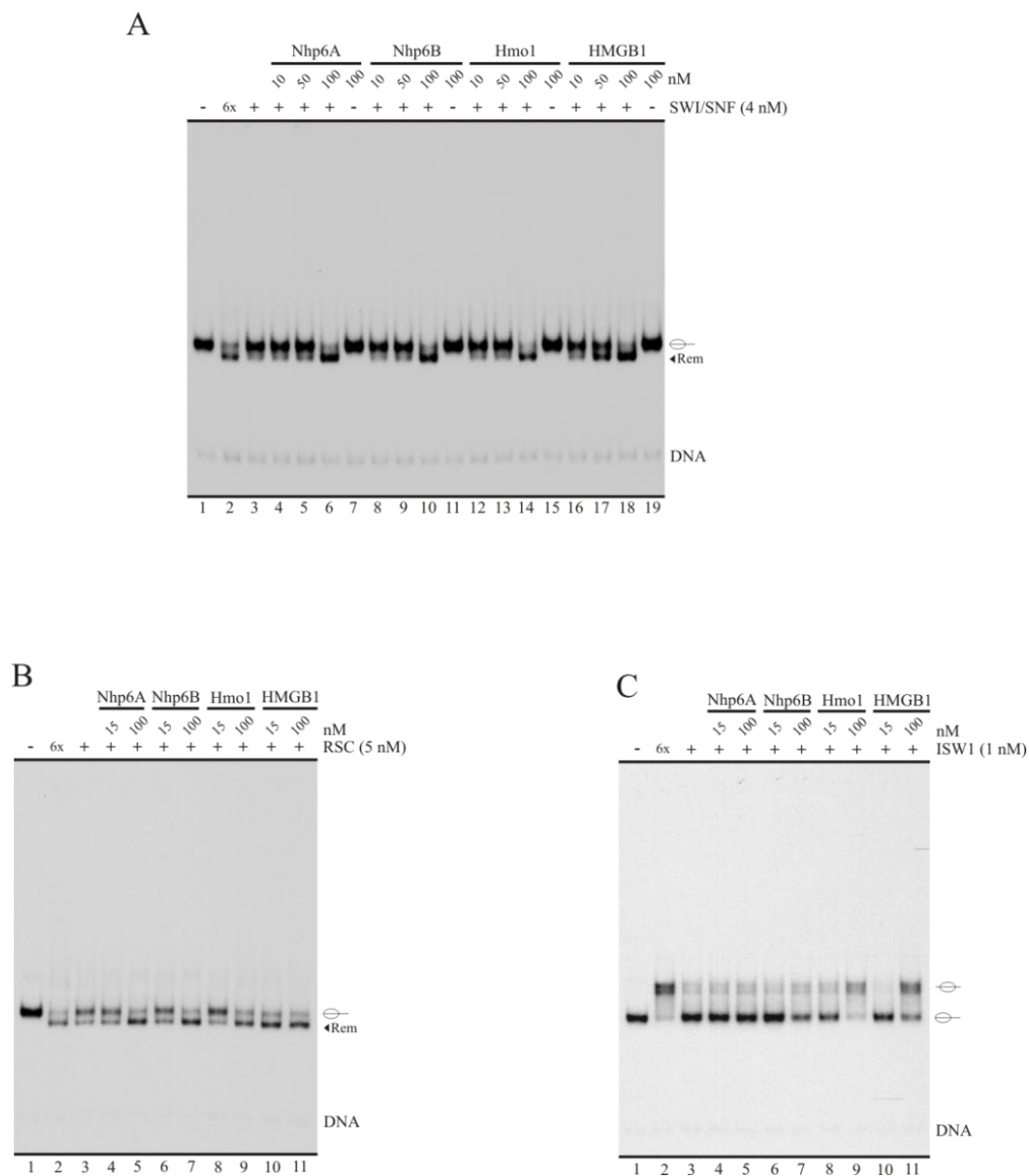


Figura 16: Análisis de la actividad remodeladora de cromatina dependiente de ATP por las proteínas HMGB. A, B y C) Ensayos de Sliding. A) complejo SWI/SNF. B) complejo yRSC. C) complejo yISW1. Las condiciones de cada reacción se detallan en la parte superior de cada figura. A la derecha de cada una se representa la migración de las poblaciones de mononucleosomas. Rem, nucleosomas remodelados (slid). 6x, concentración de complejo utilizado de 6 veces superior a lo utilizado en el resto del ensayo. Todos los carriles contienen ATP. En todas estas reacciones se adicionó una mezcla de ADN de esperma de salmón (SSDNA) más oligonucleosomas largos (LON), después de la incubación de remodelación. Este procedimiento es común a todos los análisis de este tipo en los que se pretende ver el patrón de remodelación del nucleosoma en lugar del patrón de asociación de los complejos proteicos al nucleosoma (ver Materiales y Métodos para más detalles).

En el caso de los ensayos de transferencia de histonas, los complejos remodeladores generan un desplazamiento en *trans* del octámero de histonas desde oligonucleosomas cortos (SON) fríos (dador) hacia el fragmento de ADN de 147 pb marcado radioactivamente (aceptor), observándose la aparición de una banda de menor movilidad electroforética formada por el mononucleosoma de 147 pb, en comparación con la migración del ADN de 147 pb (Figura 17). En los ensayos se utilizó controles de migración, tanto de ADN como de mononucleosomas de 147 pb y de la actividad que generan los complejos por sí solos. En estos ensayos se prefiere utilizar un segmento de ADN de 147 pb ya que entrega un patrón más definido del nucleosoma que lo que entregan segmentos de ADN más largos.

Para el complejo SWI/SNF (Figura 17A) se observó que las proteínas Nhp6A, Nhp6B y HMGB1 no presentan estimulación de esta actividad y que por el contrario, a 100 nM estas proteínas presentan un bloqueo de dicha actividad. En cambio la proteína Hmo1 a una concentración de 100 nM mostró estimulación de la actividad de transferencia de histonas (Figura 17A). Todo esto cuando se compara cada condición con el control de actividad del complejo SWI/SNF por sí sólo, donde se observa la formación del mononucleosoma de 147 pb (carril 3, Figura 17A).

En el caso del complejo RSC, se observó que la actividad de remodelación de este complejo se ve modificada de manera similar a lo que sucede con el complejo SWI/SNF, donde se ve un bloqueo de la actividad a los 150 nM en presencia de las proteínas Nhp6A, Nhp6B y HMGB1 (Figura 17B). Además con la proteína Hmo1 se observó estimulación de la actividad de remodelación a concentración de 150 nM de esta HMGB (Figura 17B). Esto comparado con el control de actividad del complejo RSC por sí sólo, donde se observa la formación del mononucleosoma de 147 pb (carril 3, Figura 17B).

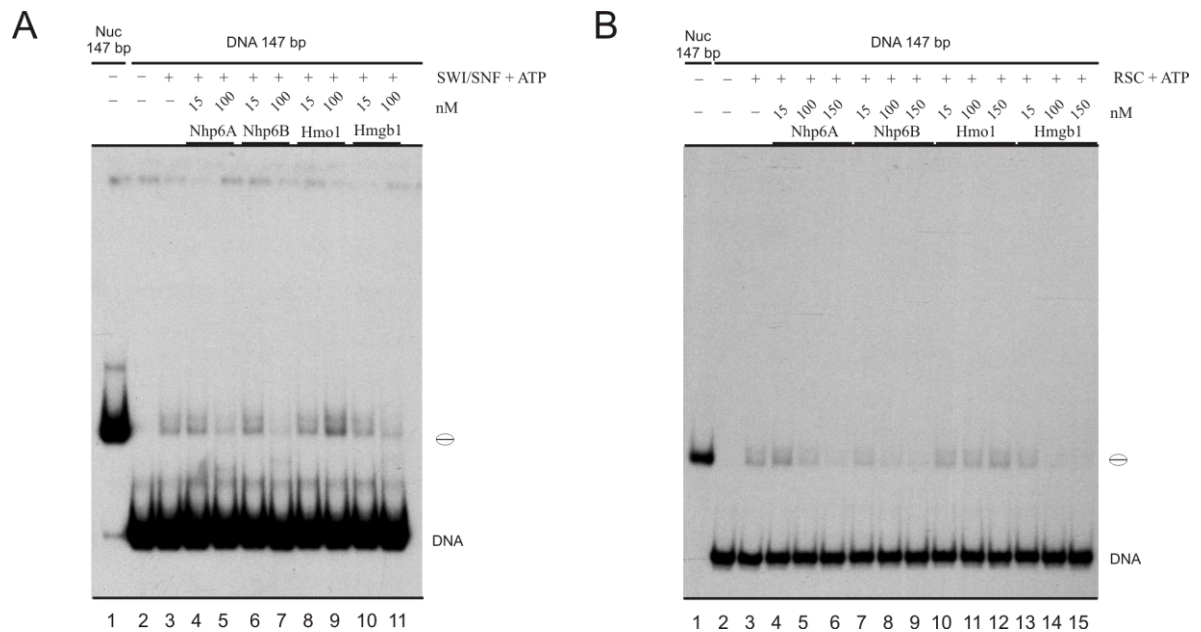


Figura 17: Efecto de las proteínas HMGB sobre la actividad de transferencia del octámero de histonas. Ensayos de transferencia de histonas utilizando segmento de ADN marcado de 147 pb como aceptor de histonas y oligonucleosomas cortos como dadores. A) Análisis para el complejo SWI/SNF. B) Análisis para el complejo RSC. Las condiciones de cada reacción se detallan en la parte superior de cada Figura. A la derecha de cada una se representa la migración de las poblaciones de mononucleosomas. En ambas Figuras, la línea 1 corresponde a mononucleosoma de 147 pb previamente reconstituido, como control de migración. DNA, migración del ADN desnudo. En todas las reacciones se agregó una mezcla de remoción de unión luego de la incubación de remodelación (ver leyenda de Figura 16 para más detalle).

Posteriormente se analizó la actividad de desensamble nucleosomal del complejo SWI/SNF, en presencia de las proteínas HMGB, en condiciones de alta estringencia. Esta actividad de remodelación es generada por el reclutamiento del complejo SWI/SNF, por parte de un factor de transcripción (Gal4-VP16), lo cual produce el desensamble del octámero de histonas del mononucleosoma de 216 pb, dejando el ADN de 216 pb marcado radioactivamente libre (Figura 18). Para analizar este tipo de actividad se utilizaron múltiples controles, como la migración de mononucleosomas, el efecto generado por Gal4-VP16 por sí sólo, la presencia de las proteínas HMGB por sí solas y la actividad de remodelación que en conjunto generan este complejo en presencia de Gal4-VP16.

En este ensayo se observó que ninguna de las proteínas HMGB estimulan la actividad de desalojo de histonas; por el contrario, a alta concentración de estas proteínas (200 nM) se ve un bloqueo o disminución de dicha actividad (Figura 18A y B). Todo esto comparado con el control de la actividad conjunta del complejo SWI/SNF y el factor Gal4-VP16 (carril 4, Figura 18A y B), donde se observa tanto la formación del mononucleosoma remodelado por *sliding* así como la aparición de ADN libre de 216 pb (Figura 18A y B).

Con el objeto de verificar que las condiciones del análisis de desensamble nucleosomal eran las apropiadas, se realizaron ensayos para comprobar el grado de unión de Gal4-VP16 y el reclutamiento de SWI/SNF al nucleosoma probador por parte de este factor quimérico. Uno de estos ensayos se muestra en la Figura 19A. La diferencia de este ensayo respecto de los mostrados en la Figura 18, es que aquí no se adiciona una mezcla de remoción después de la incubación con el complejo y los demás elementos, de manera que aquí sí se puede apreciar la asociación tanto de Gal4-VP16 como de SWI/SNF al probador. Se verificó el alto grado de asociación de Gal4-VP16 al probador reconstituido como nucleosoma (Figura 19A, carril 7) y la

asociación significativa de SWI/SNF al nucleosoma probador sólo en presencia del factor de transcripción (carriles 9 y 10).

Una de las razones por las cuales no observamos estimulación de desensamble por parte de las HMGB analizadas, podía radicar en lo descrito por Dechassa y colaboradores, quienes postulan que cuando el complejo SWI/SNF es reclutado a un mononucleosoma por parte de Gal4-VP16, el complejo ejerce su actividad sobre el ADN del nucleosoma desde el lado opuesto en que se encuentra el sitio de unión de Gal4 (Dechassa et al, 2008). Dado que el probador utilizado en el análisis de desensamble posee el octámero de histonas hacia uno de los costados del segmento de ADN, posibilidad de acción remodeladora de SWI/SNF, y eventualmente la estimulación por parte de HMGB, se vería limitada. En consideración a esta posibilidad de acción remodeladora, se utilizó un probador de 236 pb que contiene ADN linker por ambos lados del ADN nucleosomal (Figura 19B). Al utilizar el probador mencionado se repitió el mismo resultado obtenido anteriormente con los mononucleosomas laterales (Figura 19B), lo que indica que la ausencia de estimulación de desensamble no es debida a una eventual imposibilidad de ejercer acción remodeladora por el lado opuesto al que se asocia Gal4-VP16. Similar a lo observado en la Figura 18, aquí también se observa disminución del desensamble a alta concentración de HMGB, observándose más claramente con las proteínas Nhp6A (carril 8) y Nhp6B (carril 10), comparado con el control de actividad del complejo (carril 6) (Figura 19B).

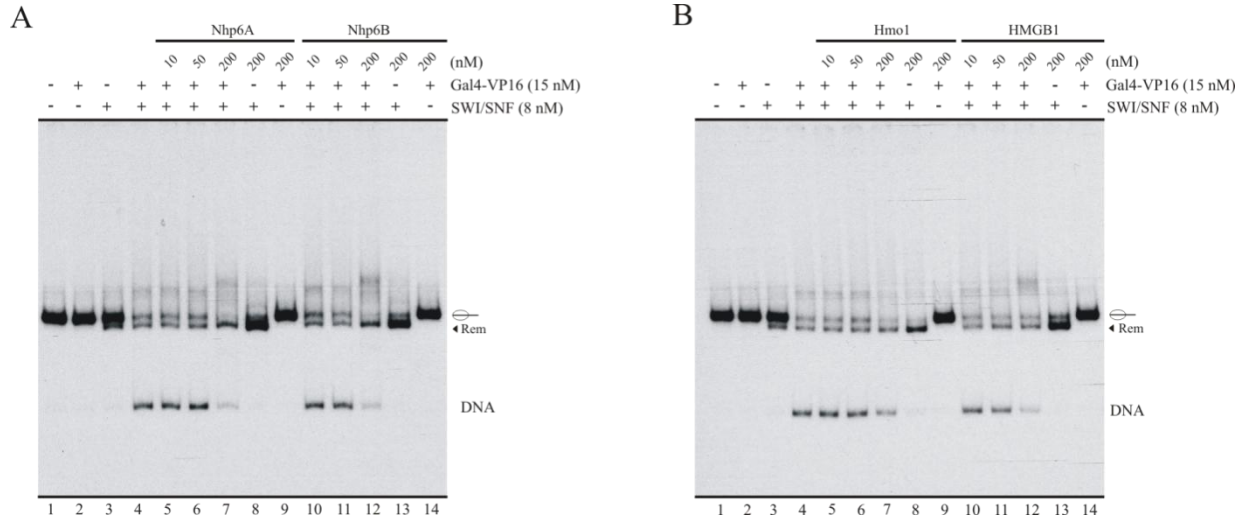


Figura 18: Efecto de las proteínas HMGB sobre la actividad de desensamble nucleosomal y el *sliding* de SWI/SNF. A y B) Determinación del desplazamiento *in cis* y desensamble nucleosomal generado por SWI/SNF, en presencia de Gal4-VP16 y cada una de las proteínas HMGB bajo condiciones de alta estringencia (SON), analizado por electroforesis en gel de poliacrilamida nodenaturante (5%, AA:bis 40:1). A) Proteínas Nhp6A y Nhp6B. B) Proteínas Hmo1 y HMGB1. Las condiciones de cada reacción son detalladas en la parte superior de cada Figura. A la derecha de cada una se representa la migración de las poblaciones de mononucleosomas, así como el ADN desnudo generado por la acción del complejo SWI/SNF. Rem, nucleosomas remodelados (*slid*). A todas las reacciones de estos ensayos se agregó una mezcla de remoción de unión a probadores, después de la incubación de remodelación, consistente en SSDNA, LON y oligonucleótido con el sitio de unión consenso para Gal4 (Ver leyenda en Figura 16 para la fundamentación).

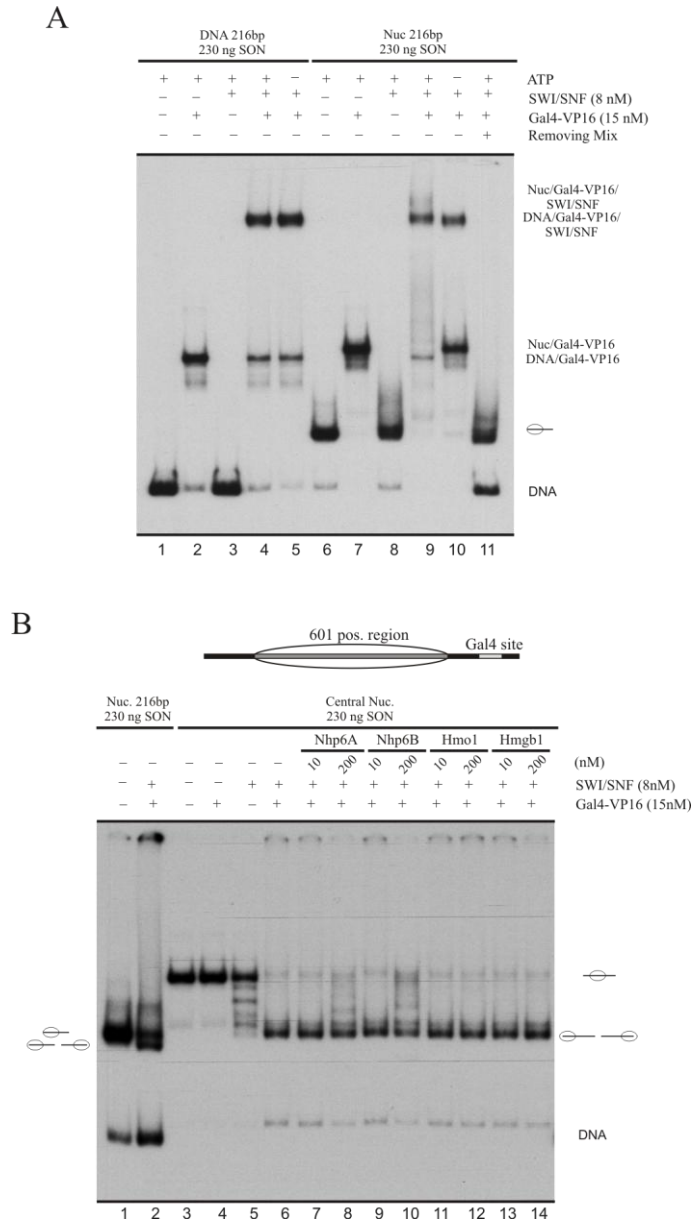


Figura 19: Análisis de la unión y la actividad de SWI/SNF. A) Ensayo de unión del complejo SWI/SNF al ADN y mononucleosomas, utilizando el probador de 216 pb. El análisis se realizó bajo las mismas condiciones de los ensayos de remodelación de la Figura 18. B) Influencia de las proteínas HMGB sobre la actividad de desensamble nucleosomal de SWI/SNF en un contexto nucleosomal diferente. Este ensayo de eviction utiliza el probador de 236 pb a modo de analizar la diferencia que puede existir con respecto a la posición del nucleosoma. Removing mix: mezcla de remoción de patrones de unión (ver detalles de composición en leyenda de Figura 18).

Por otro lado, también se analizó la variación de la accesibilidad del ADN nucleosomal en el proceso de remodelación mediante el uso de enzimas de restricción. Este análisis se realizó utilizando la endonucleasa BsrBI tal como se explica en Materiales y Métodos.

Al analizar la variación en la accesibilidad del ADN nucleosomal producto de la actividad remodeladora, se observó que bajo las mismas condiciones en que las proteínas HMGB estimulan actividad de *sliding* de SWI/SNF (Figura 16A) también se propicia un aumento de la accesibilidad del ADN nucleosomal a la enzima BsrBI, con respecto al control de actividad (carril 6, Figura 20A). Para facilitar este análisis se señalan los porcentajes de ADN digerido en la parte inferior de la Figura 20A, para un ensayo representativo. Además se muestra en una gráfica la cuantificación del grado de digestión del ADN nucleosomal de 3 ensayos independientes entre sí, observándose el aumento de accesibilidad a 100 nM para las cuatro proteínas analizadas. En el caso de la proteína HMGB1 el aumento de la digestión del ADN nucleosomal ya se observa a 50 nM (Figura 20A).

Luego al analizar la variación de accesibilidad para la actividad de desalojo del octámero, observamos que ninguna de estas proteínas HMGB genera un aumento en el porcentaje de accesibilidad de ADN nucleosomal con respecto al control de digestión (carril 7, Figura 20B). Esto se confirmó mediante la gráfica de las cuantificaciones del grado de digestión del ADN nucleosomal de a lo menos 3 ensayos independientes entre sí, en los cuales no se observan variaciones a ninguna concentración de HMGB (Figura 20B).

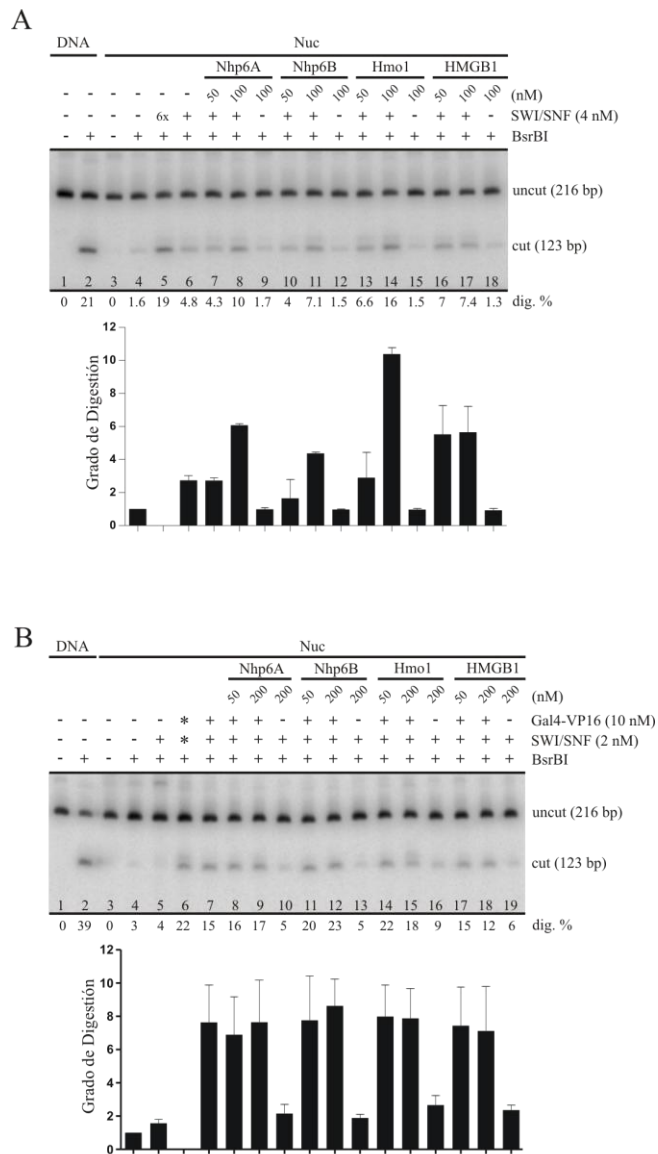


Figura 20: Efecto de las proteínas HMGB sobre la accesibilidad del ADN nucleosomal en la actividad de remodelación. A y B) Ensayo de accesibilidad para el desplazamiento y desensamble nucleosomal generado por SWI/SNF, en presencia de cada una de las proteínas HMGB, analizado por electroforesis en gel de poliacrilamida no denaturante (5%, AA:bis 40:1). A) Análisis de accesibilidad realizado en las mismas condiciones que los ensayos de actividad de sliding de SWI/SNF (realizado por ende a baja estringencia). B) Accesibilidad en el ensayo de actividad de desensamble nucleosomal y sliding de SWI/SNF (realizado a alta estringencia, como los demás ensayos que involucran reclutamiento). Las condiciones de cada reacción son detalladas en la parte superior de cada Figura. A la derecha de cada una se representa la migración de las poblaciones de ADN no digerido (uncut) y digerido (cut). En A, 6x, concentración de complejo utilizado de 6 veces superior a lo utilizado en el resto del ensayo. En B, * Corresponde a concentración 20 nM de Gal4-VP16 y 4 nM de SWI/SNF, superior a la utilizada en el resto del ensayo. Además cada imagen posee en la parte inferior de ellas un gráfico que muestra las veces de digestión generada en cada caso en relación a la digestión del mononucleosoma solo. Las gráficas representan valores promedio de tres ensayos independientes.

3.1.5.- Efectos de las proteínas HMGB sobre la remodelación en el contexto de un arreglo nucleosomal.

Estos estudios involucraban análisis de remodelación reclutada de SWI/SNF sobre un arreglo nucleosomal marcado en el extremo 5' en una sola hebra y luego digestión con nucleasa micrococcal (MNasa) para analizar los patrones de digestión.

Para conocer los patrones de migración electroforética del arreglo nucleosomal se analizó el arreglo 601x6_Gal4cent (Figura 21A), estudiando el ADN del arreglo, la reconstitución de éste, una digestión en la región central del fragmento de ADN reconstituido como arreglo nucleosomal con una enzima de restricción de corte único y ubicada cerca del sitio Gal4 (BglII) (Figura 21A) y como patrón de migración conocida utilizamos el probador de 216 pb. Mediante lo anterior se observó que todo migraba según los patrones esperados y la digestión en la región central del arreglo nucleosomal con BglII daba una banda única (Figura 21B).

Luego se procedió a analizar la digestión del arreglo reconstituido con MNasa, a diferentes concentraciones y bajo las condiciones en que se realizan los ensayos de remodelación. En este análisis observamos que la señal correspondiente a productos de digestión no aparecen en ninguna de las 3 concentraciones de MNasa estudiadas (10, 13 & 15 mU/ul) (Figura 21C). Sin embargo, se observó que la banda que corresponde a la migración del ADN de 1246 pb disminuye a medida que aumentamos la cantidad de MNasa, el resultado obtenido sugiere que se produce digestión del probador en su extremo 5'. Este arreglo está marcado radioactivamente y tiene una distancia entre el nucleosoma 1 y el extremo 5' de 32 pb, cantidad de nucleótidos sobre los cuales podría estar actuando la MNasa. El análisis de

digestión con MNasa de arreglo nucleosomal fue realizado por lo menos 3 veces de forma independiente uno de otro, observándose cada vez el mismo efecto. En este mismo ensayo se analizaron 2 digestiones en la región central del arreglo con enzimas de restricción de corte único como SphI y BglII (Figura 21A), ubicadas a ambos extremos del sitio Gal4, las cuales dan productos de digestión de 608 y 639 pb, respectivamente. Estos productos de digestión marcan la región que debería ser modificada en los ensayos de remodelación. También a modo de patrón de migración se observa un probador de 216 pb (Figura 21C).

Producto del imprevisto que se presentó con respecto a la digestión del extremo 5' del arreglo nucleosomal, no se continuó con estos ensayos, ya que debíamos modificar el marcaje de este con un protocolo distinto. Originalmente como está descrito en Materiales y Métodos, se digirió con EcoRI y se procedió a marcar radioactivamente en el extremo 5'. Ahora debemos digerir con otra enzima, la cual debemos analizar en profundidad.

Este efecto imprevisto de acción de la MNasa sobre el arreglo nucleosomal hizo inviable el continuar con los ensayos siguientes de remodelación con este probador. El tiempo prolongado que podía significar el modificar este arreglo de secuencias posicionadoras, sumado a que -en el momento en que se obtuvo este resultado- ya se estaba en condiciones de realizar estudios *in vivo* sobre promotores de genes, nos llevó a dejar de lado la continuación del trabajo con arreglos nucleosomales.

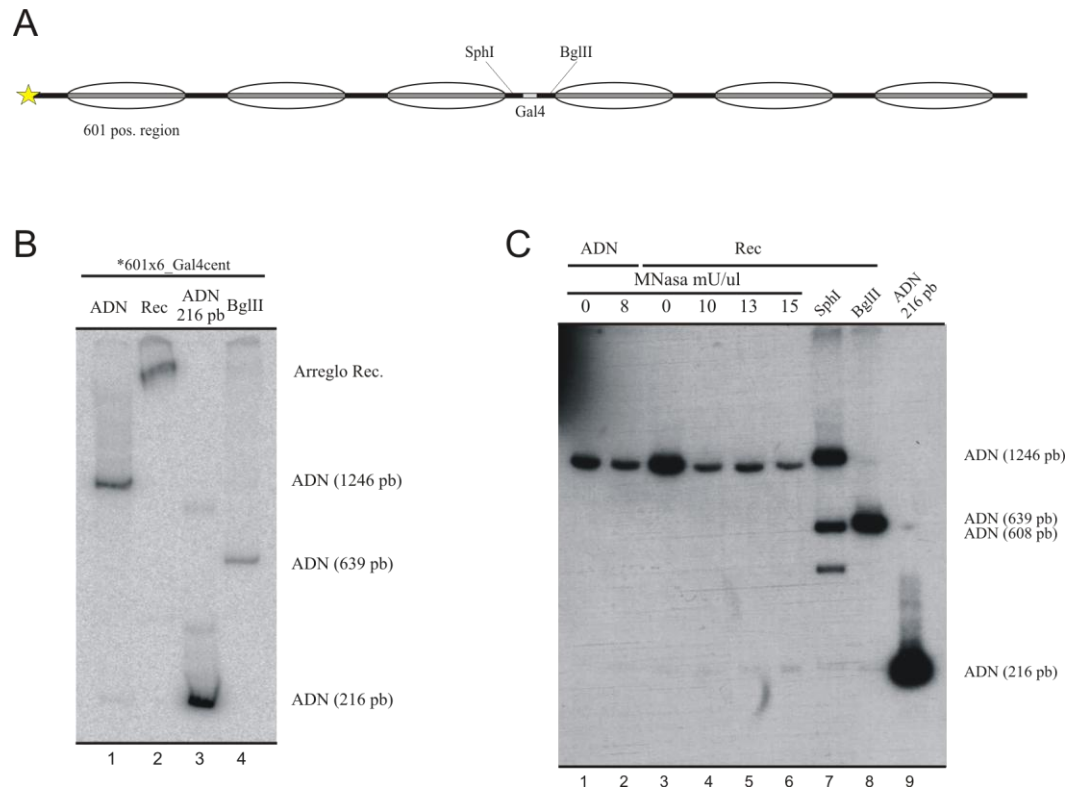


Figura 21: Análisis de la digestión de un arreglo nucleosomal (601x6_Gal4cent). A) Representación esquemática del arreglo nucleosomal 601x6_Gal4cent, utilizado en estos análisis. La estrella en el extremo 5' indica el punto de marcaje radioactivo. B) Control de migración de los diferentes fragmentos del análisis. Gel de AA no denaturante donde se observa el ADN de arreglo desnudo (1), arreglo reconstituido (2), fragmento de 216 pb (3) y ADN producto de la digestión control en el centro del arreglo nucleosomal reconstituido (BglII) (4). C) Gel de poliacrilamida no denaturante para verificar los grados de digestión de las diferentes concentraciones de MNasa (0, 10, 13 y 15 mU/ul) (3 – 6) realizadas sobre el arreglo nucleosomal reconstituido, en las condiciones de los ensayos de remodelación. Además se utilizaron dos digestiones con enzimas de restricción en la región central del arreglo nucleosomal reconstituido (SphI y BglII) (7 y 8) y el patrón de migración del fragmento de 216 pb (9). Las condiciones de cada reacción son detalladas en la parte superior de cada Figura. A la derecha de cada una se indica la migración de los diferentes fragmentos de ADN generados.

3.2.- Estudiar los mecanismos involucrados en la estimulación de remodelación nucleosomal dada por proteínas HMGB de levadura (objetivo específico 2, sección 1.6.1).

3.2.1.- Generación, purificación y cuantificación de las proteínas recombinantes HMGB mutante y quiméricas unidas al epítipo His.

Con el objetivo de obtener las proteínas Hmo1 mutante, Nhp6A y Nhp6B quiméricas en bacterias, sus secuencias codificantes fueron amplificadas con partidores específicos y se utilizaron partidores para amplificar un fragmento que incluye toda la región codificante para la cola básica/ácida de la proteína Hmo1 (caHmo1). Esta región fue subclonada a continuación del C-terminal de las proteínas Nhp6A y Nhp6B, las que no poseen esta cola básica/ácida (Nhp6A_caHmo1, Nhp6B_caHmo1). En paralelo se obtuvo la proteína Hmo1 sin cola básica/ácida (Hmo1 Δ ca).

Una vez obtenidos los distintos productos de PCR, estos fueron digeridos con las enzimas de restricción determinadas para cada uno e insertados en el vector pQE-81L digerido con las mismas enzimas; la estrategia de clonamiento se muestra en la Figura 22A. Los vectores generados se esquematizan en la Figura 22B, 22C y 22D. Las proteínas codificadas también contienen epítipo 6xHis, lo cual permitió su posterior purificación mediante una columna de afinidad. Estos clones fueron corroborados por análisis con enzimas de restricción específicas, que utilizaron SphI/AgeI para corroborar las ligaciones internas de las quimeras y para confirmar la desaparición de la cola ácida en la delección y SphI/PstI para confirmar la clonación, ligación y tamaño de los insertos (Figura 22E). Se confirmó la obtención de todos los

vectores por la aparición de los fragmentos de digestión esperados para cada uno de los vectores analizados. Los clones positivos luego se verificaron por secuenciación con un oligonucleótido sentido (PR pQE-80III) o antisentido (PR pQE-80rev) específicos para los vectores pQE-8XL (data no mostrada).

Una vez obtenidos los diferentes vectores pQE81L, estos fueron transformados en bacterias *E. coli* BL21-DE3 y se procedió a la purificación de las proteínas recombinantes como se indica en Materiales y Métodos.

En la Figura 23A se esquematizan las proteínas de levadura silvestres para compararlas con las proteínas mutantes purificadas. Estas proteínas mutantes fueron analizadas mediante SDS-PAGE y posterior tinción con Azul de Coomassie, así como por Western blot utilizando un anticuerpo dirigido contra el epítipo His, el cual está contenido en todas las proteínas generadas. En la Figura 23B se observa, luego de la tinción con Azul de Coomassie, una banda única con la movilidad electroforética esperada para cada una de las proteínas generadas. Estas bandas corresponden a las proteínas HMGB mutante y quimeras en fusión a histidinas (His-Nhp6A_caHmo1, His-Nhp6B_caHmo1 y His-Hmo1_Δca), lo que se confirmó en el ensayo de Western blot ya que se observa una banda única y con una migración similar a las proteínas analizadas por SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie (Figura 23C). Las distintas proteínas purificadas fueron cuantificadas por SDS-PAGE y tinción con Azul de Coomassie, comparando con cantidades conocidas de BSA (Sigma).

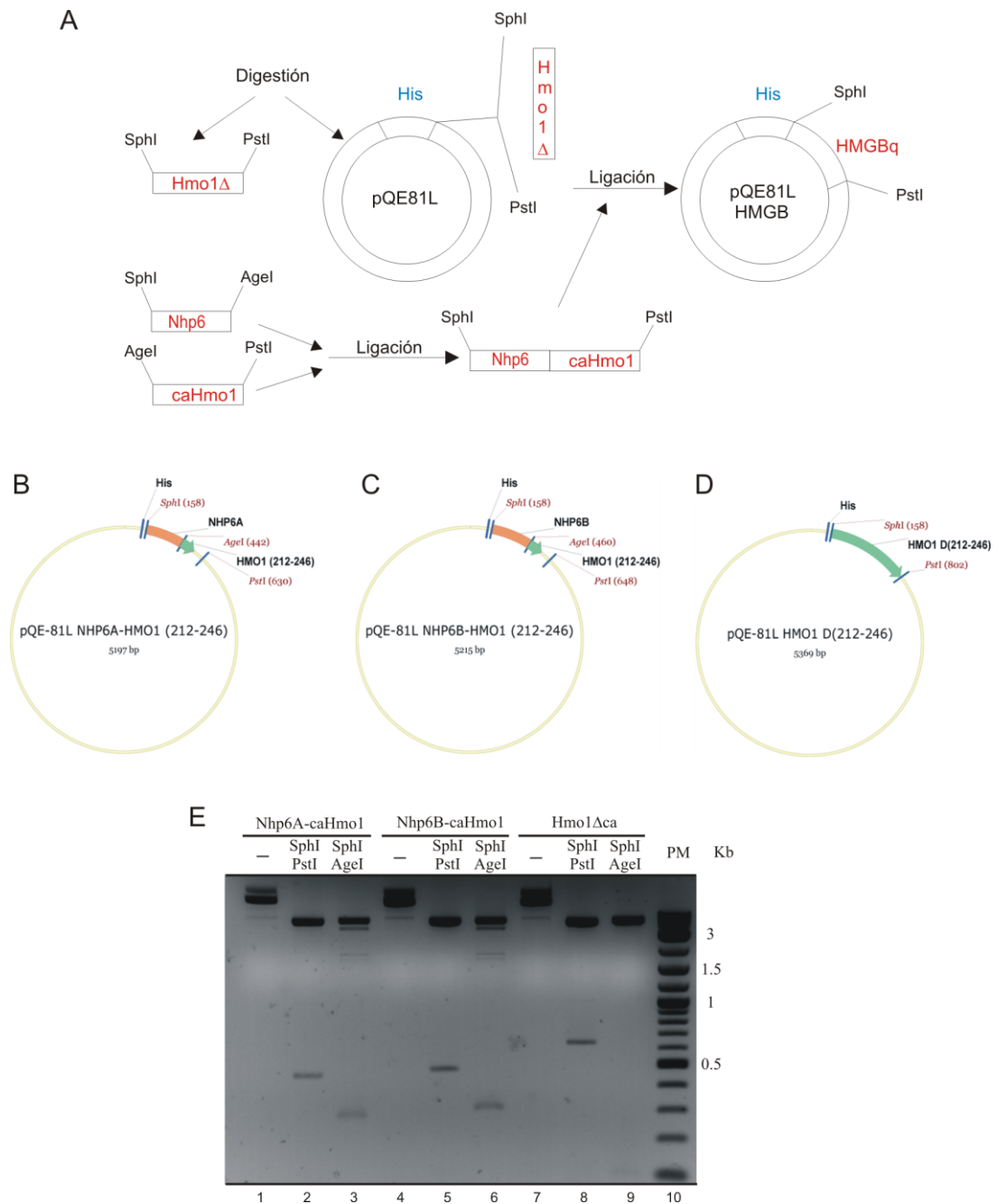


Figura 22: Análisis de los vectores de expresión procarionte para las proteínas HMGB quimeras y mutante de delección. A) Esquema representativo del método de clonación de las proteínas HMGB quimeras y delección en el vector pQE-81L. B, C & D) Representación esquemática de los vectores creados para cada proteína HMGB quimérica y mutante de delección con las posiciones de las enzimas de restricción utilizadas en el análisis (control). E) Electroforesis en gel de agarosa utilizado para analizar la confirmación de los diferentes clones por enzimas de restricción para cada constructo generado. Carril 10 marcador de peso molecular, 1, 2 & 3 Nhp6a_caHmo1, 4, 5 y 6 Nhp6b_caHmo1 y 7, 8 & 9 Hmo1_Δca. En la parte superior de la imagen se indican las combinaciones de enzimas utilizadas o la ausencia de digestión.

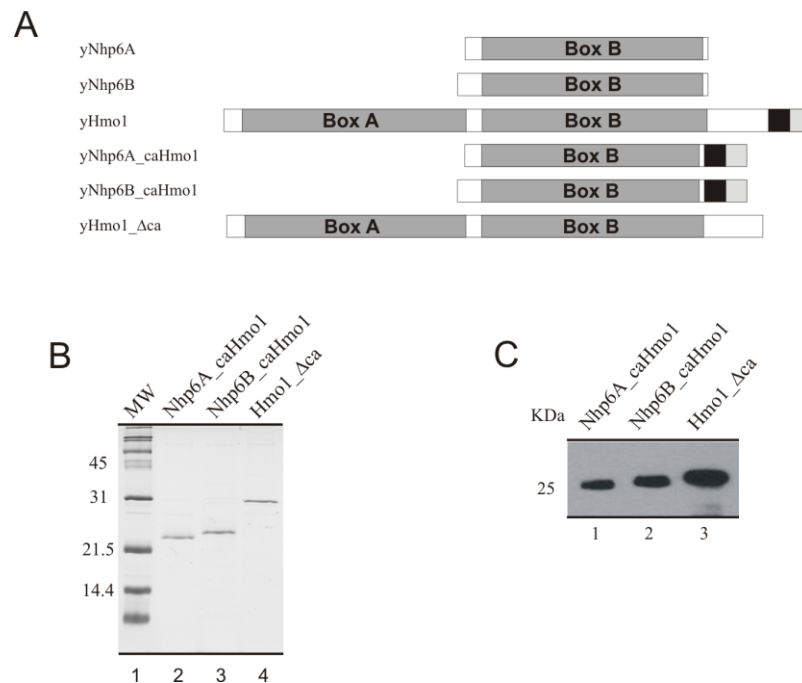


Figura 23: Purificación de las proteínas HMGB quimeras y mutante de delección. A) Representación esquemática de las HMGBs utilizadas y la comparación con las proteínas silvestres. Estas son las 3 proteínas silvestres (ya descritas en la Figura 7), 2 quimeras (yNhp6A_caHmo1, yNhp6B_caHmo1) y 1 delección (yHmo1_Δca). En gris, las cajas HMG, A y B. En gris claro, cola básica. En negro, cola ácida. B y C) Análisis de la purificación de proteínas HMGB quimeras y delección recombinantes. B) Gel de AA denaturante para las proteínas obtenidas al 12%, teñido con Azul de Coomassie. Las proteínas recombinantes poseen el epítipo His en el N-terminal, expresadas en BL-21 Codon plus. Marcador de peso molecular (1), His-Nhp6A_caHmo1 (2), His-Nhp6B_caHmo1 (3) y His-Hmo1_Δca (4). C) Western blot de confirmación de la identidad de las proteínas recombinantes producidas, con anticuerpo específico para el epítipo His. His-Nhp6A_caHmo1 (1), His-Nhp6B_caHmo1 (2) y His-Hmo1_Δca (3).

3.2.2.- Unión de las proteínas recombinantes HMGB deleción y quiméricas al ADN y a los mononucleosomas reconstituidos.

Con el objetivo de determinar la capacidad de unión de las proteínas HMGB mutantes se analizó si las proteínas quiméricas y la deleción purificadas se unían al ADN y mononucleosomas (probador de 216 pb) con un perfil similar al de las proteínas silvestres (Figura 12). Al analizar la unión de éstas (a diferentes concentraciones) al ADN, se logró confirmar que las proteínas se unen al ADN, pero con un patrón diferente a las proteínas silvestres (Figura 24A). Cabe destacar que se observó una leve diferencia en el patrón de unión de la proteína Hmo1_Δca con respecto a la proteína silvestre, donde se obtuvo que la proteína delecionada se une con menor afinidad que la proteína silvestre (Figura 12B). Al analizar la unión de estas proteínas al mononucleosoma de 216 pb (Figura 24B), se observó que las proteínas quiméricas y la deleción se unen menos que las proteínas silvestres. En este caso las proteínas no forman los mismos complejos de unión que las proteínas silvestres, observado por la aparición de patrones de retardo diferentes; para Hmo1_Δca esta diferencia es mucho más notoria, uniéndose con menor afinidad que la proteína silvestre (Figura 12B).

Al considerar lo anterior, optamos por estudiar en detalle las uniones de Hmo1 silvestre y Hmo1_Δca, ya que eran las proteínas que presentaban una mayor diferencia al hacer los análisis de unión. Cuando evaluamos la unión tanto al ADN como a mononucleosomas de 216 pb, en paralelo, la proteína silvestre ya se une levemente a una concentración de 50 nM al ADN y 100 nM al mononucleosoma, en cambio la proteína Hmo1_Δca prácticamente no presenta

unión al ADN a 50 nM y a 100 nM se une muy débilmente al mononucleosoma (Figura 24C), confirmando lo que habíamos visto en los ensayos anteriores.

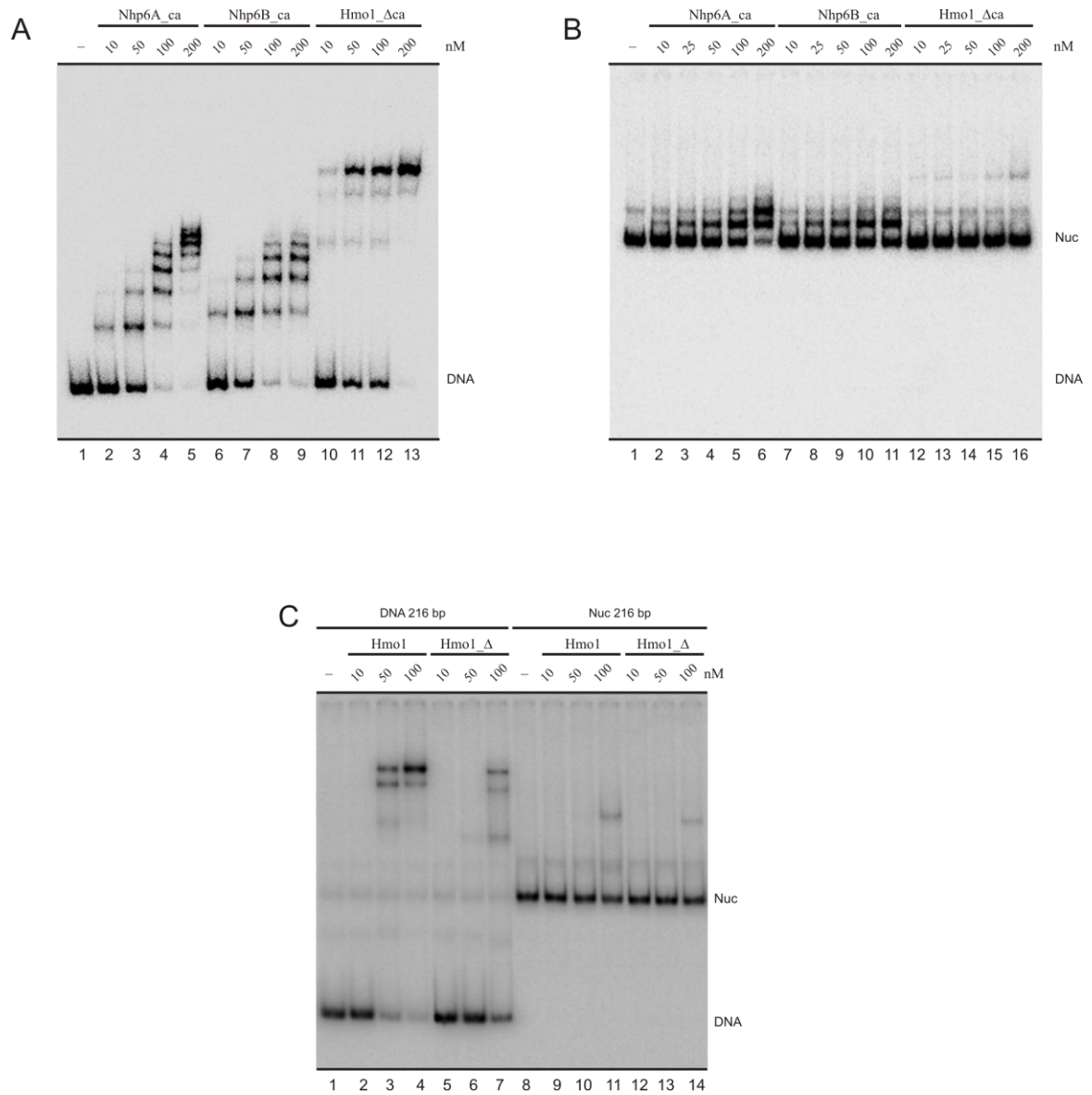


Figura 24: Análisis de la unión de las proteínas HMGB quimeras y mutante de delección a ADN y mononucleosomas. A y B) EMSA para análisis de unión de todas las HMGB quimeras y delección en estudio. A) Probador de ADN, bajo condiciones de baja estringencia. B) Probador reconstituido como mononucleosoma, bajo condiciones de baja estringencia. C) EMSA para análisis de unión al probador de ADN y mononucleosoma, bajo condiciones de baja estringencia, en paralelo entre la proteína Hmo1 silvestre y la delección Hmo1_Δca. Para los ensayos de unión (A, B y C) se utilizó un probador de 216 pb de ADN que posee en un extremo la secuencia posicionadora de nucleosomas 601, que permite ubicar el octámero de histonas en una posición lateral en el segmento de ADN, luego de la reconstitución.

3.2.3.- Análisis comparativo del efecto de las proteínas HMGB silvestres y quimeras sobre la acción remodeladora del complejo SWI/SNF.

Se analizó la variación de la actividad remodeladora por desplazamiento nucleosomal en *cis* de los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP en presencia de las proteínas quimeras Nhp6A_caHmo1 y Nhp6B_caHmo1, más la delección Hmo1_Δca, a baja estrictencia.

En este ensayo se observó que la remodelación por desplazamiento en *cis* del nucleosoma se ve afectada, comparando el efecto que producen las proteínas quimeras o la delección versus el efecto que generan sobre esta actividad las proteínas HMGB silvestres. La actividad de este complejo se ve estimulada por las proteínas silvestres a partir de 50 nM (Figura 16A). En cambio en la Figura 25A se observa estimulación por parte de las proteínas HMGB quiméricas (Nhp6A_caHmo1 y Nhp6B_caHmo1) desde concentración de 10 nM. Por otro lado, la proteína delecionada (Hmo1_Δca), mostró una menor capacidad de estimulación que la proteína Hmo1 silvestre (Figura 16A). Además, se demostró que las proteínas quiméricas y delecionada no presentan ningún tipo de actividad de remodelación por sí solas.

Debido a las diferencias observadas en el efecto de las proteínas silvestre y la mutante de Hmo1, se realizó un ensayo de remodelación con estas proteínas en paralelo. Mediante este ensayo se corroboró la disminución de la estimulación que genera la delección con respecto a lo que provoca la proteína Hmo1 silvestre sobre la actividad de remodelación en *cis* del complejo SWI/SNF (Figura 25B).

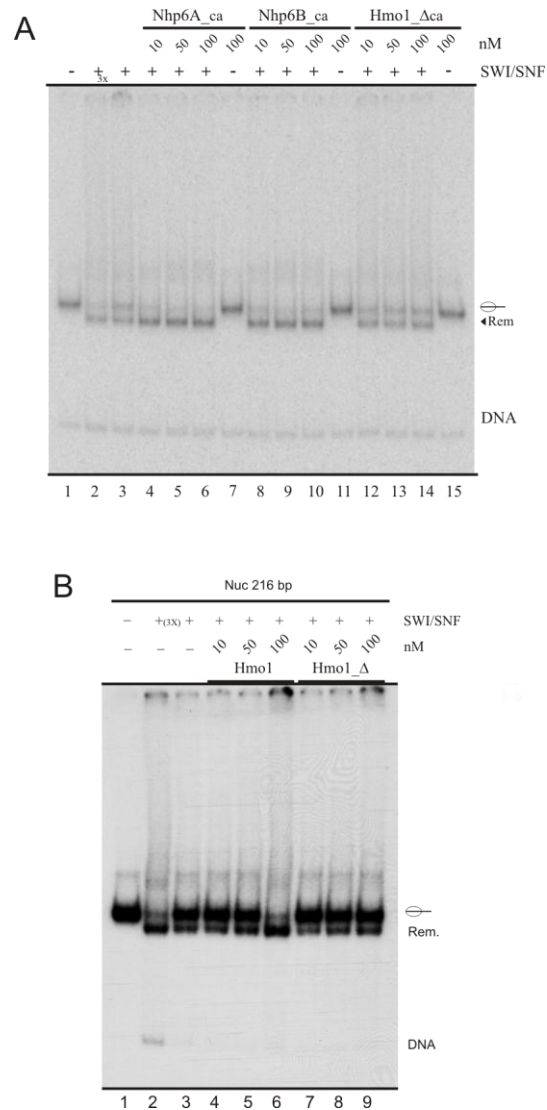


Figura 25: Análisis de la actividad remodeladora de cromatina dependiente de ATP por las proteínas HMGB quimeras y delección. A y B) Ensayo de Sliding para el complejo SWI/SNF A) En presencia de las proteínas mutantes. B) En presencia de las proteínas Hmo1 silvestre y delección (Hmo1_{Δca}) en paralelo. Las condiciones de cada reacción son detalladas en la parte superior de cada Figura. A la derecha de cada una se representa la migración de las poblaciones de mononucleosomas. 3x se refiere a una concentración de complejo utilizado de 3 veces superior a lo utilizado en el resto del ensayo. Todos los carriles contienen ATP.

3.2.4.- Efecto de las diferentes proteínas HMGB silvestres, mutantes o quiméricas sobre la unión de los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP al ADN o mononucleosomas.

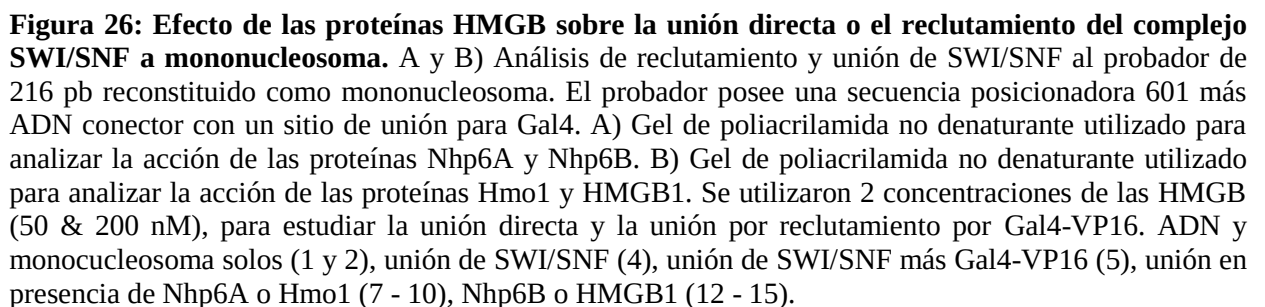
Con el objetivo de resolver esta interrogante primeramente se analizó tanto la unión directa del complejo remodelador SWI/SNF, así como la generada por reclutamiento en presencia del factor quimérico Gal4-VP16, a alta estringencia en presencia de las diferentes proteínas HMGB silvestres (Figuras 26A y B).

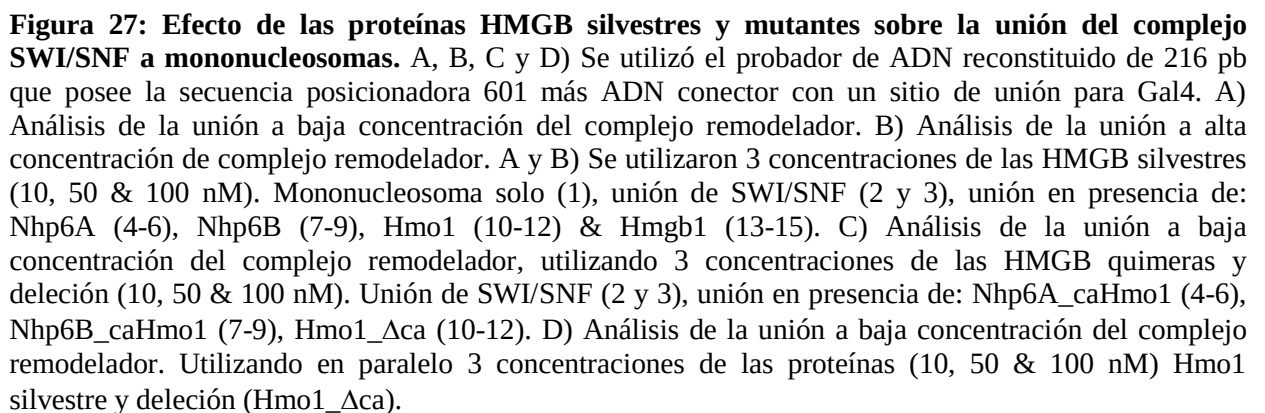
Al analizar la unión directa del complejo se observó que las proteínas HMGB silvestre Nhp6A, Nhp6B y HMGB1 no modifican el grado de unión directa del complejo a su probador (Figura 26A y B). En cambio la proteína Hmo1 silvestre es capaz de estimular la unión directa de SWI/SNF al probador, lo que se observa al comparar el control de unión del complejo por sí sólo (carril 4, Figura 26B) con 50 nM de Hmo1, donde vemos un leve aumento en la intensidad de la banda de unión. Este aumento es bastante más notorio a 200 nM (carril 8, Figura 26B). Por otro lado, en este mismo ensayo se analizó el reclutamiento de SWI/SNF generado por Gal4-VP16, observándose que ninguna de las proteínas HMGB silvestres afectan el reclutamiento de este complejo generado por el factor de transcripción quimérico Gal4-VP16.

Producto de lo obtenido con la unión directa del complejo SWI/SNF en el análisis recién descrito, se quiso ver específicamente lo que ocurría con este efecto de las proteínas HMGB a baja estringencia. Para ello se realizaron dos análisis, estudiando si estas proteínas podían aumentar o disminuir la unión directa de SWI/SNF (Figura 27A y B); se utilizó concentraciones de 8 y 24 nM del complejo, respectivamente. En estos ensayos se observó que las proteínas Nhp6 y HMGB1 no generan ningún tipo de variación (aumento o disminución) en la unión del

complejo con respecto al control de unión (carril 3, Figuras 27A y B). En cambio para la proteína Hmo1 se repite el efecto observado anteriormente, confirmando que esta proteína es capaz de aumentar la unión del complejo SWI/SNF de levadura al nucleosoma (Figura 27A y B).

Luego se analizó si las proteínas quiméricas y delección podían afectar la unión del complejo, ya que queríamos evaluar el efecto que posee la cola básica/ácida de Hmo1 sobre la unión del complejo (Figura 27C). El resultado se muestra en la Figura 27C, donde las quimeras Nhp6A_caHmo1 y Nhp6B_caHmo1 no estimulan la asociación de SWI/SNF, tal como ocurre en el caso de las proteínas Nhp6 silvestres. En cambio la delección Hmo1_Δca entregó un resultado diferente al de la proteína silvestre, ya que no se observó estimulación de la unión del complejo. Para confirmar esto último realizamos un ensayo con las proteínas Hmo1 silvestre y delección en paralelo. En este análisis se obtuvo una confirmación de dicho resultado a 100 nM con ambas proteínas Hmo1 (silvestre y delección), donde se visualiza en un mismo ensayo la diferencia entre la proteína silvestre y la mutante, con ausencia de estimulación de unión por parte de la delección (Figura 27D, comparar carriles 3, 6 y 9).





3.2.5.- Efecto de las proteínas HMGB sobre la hidrólisis de ATP de los complejos remodeladores.

El objetivo de este análisis fue estudiar si las proteínas HMGB de levadura generan un aumento de la hidrólisis de ATP que producen los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP, específicamente SWI/SNF.

Se analizó la capacidad del complejo remodelador SWI/SNF de levadura de producir hidrólisis de ATP, en presencia de las proteínas HMGB de levadura silvestre (Nhp6A, Nhp6B y Hmo1), quimeras (Nhp6A_caHmo1 y Nhp6B_caHmo1) y la mutante de delección (Hmo1_Δca) a dos concentraciones de cada una (50 y 100 nM). El grado de hidrólisis de ATP se midió luego de 30 ó 90 minutos de incubación de remodelación (Figura 28 A y B, respectivamente), observándose que no existe un aumento ni disminución del grado de hidrólisis de ATP con respecto al control de hidrólisis utilizado. En el carril 2 de ambas Figuras, a modo de control, se observa la hidrólisis de ATP generada por una mayor concentración de complejo SWI/SNF. No se analizó HMGB1, ya que está descrito que no altera la hidrólisis de ATP generada por los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP (Ugrinova et al, 2009).

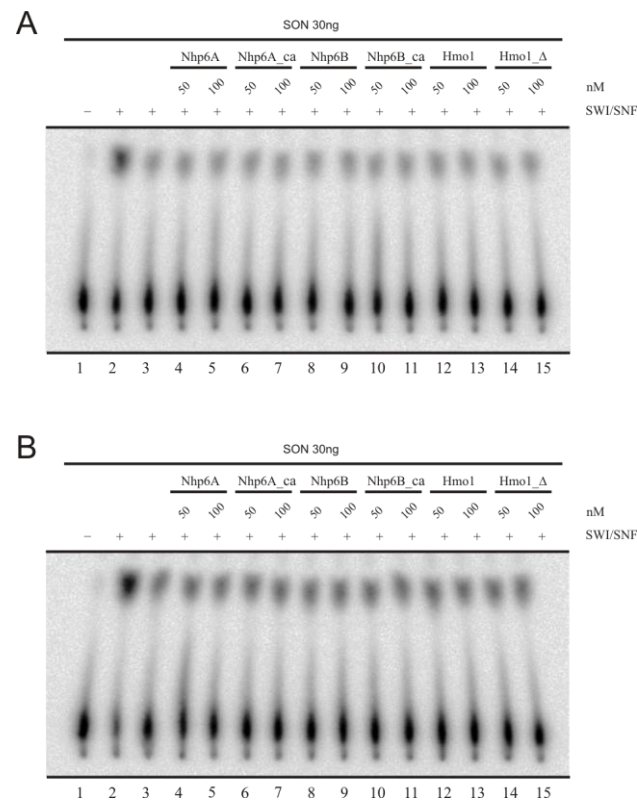


Figura 28: Efecto de las proteínas HMGB sobre la hidrólisis de ATP generada por SWI/SNF. A y B) Hidrólisis de ATP de SWI/SNF en presencia de 2 concentraciones (50 y 100 nM) de las proteínas HMGB de levadura y de 30 ng de oligonucleosomas cortos (SON). A) Hidrólisis de ATP correspondiente a 30 minutos de actividad del complejo. B) Hidrólisis de ATP correspondiente a 90 minutos de actividad del complejo SWI/SNF. Las combinaciones de cada reacción se detallan en la parte superior de las Figuras. El carril 2 de cada Figura corresponde al control positivo de hidrólisis de ATP, realizado a una concentración alta de SWI/SNF.

3.3.- Analizar la influencia de las proteínas HMGB sobre la remodelación de cromatina *in vivo* (objetivo específico 3, sección 1.6.1).

3.3.1.- Influencia de las proteínas Nhp6 y Hmo1 sobre la presencia del complejo SWI/SNF en regiones promotoras del genoma completo de levadura.

El objetivo de estos estudios fue analizar la presencia física de las diferentes proteínas HMGB (Nhp6A, Nhp6B y Hmo1) y del complejo SWI/SNF (Snf5) de levadura en genoma completo por la técnica de ChIP-chip, la cual se describe en Materiales y Métodos, teniendo como foco principal el determinar si las proteínas HMGB influyen en el reclutamiento del complejo remodelador SWI/SNF a regiones promotoras de genes.

Se verificaron las diferentes cepas de levadura a utilizar en este estudio por PCR para detección de secuencias de los genes de las proteínas HMGB analizadas en este trabajo. Se consideró para amplificar una región del promotor y otra del ORF de cada uno de estos genes, utilizando oligonucleótidos específicos para cada uno (Anexo 9). Se analizaron cepas silvestre, mutantes de delección y TAP-HMGB, para los cuales se obtuvieron los amplicones esperados sólo en la cepa silvestre (Figura 29A). Esto se debe a que las cepas mutantes corresponden a una delección del gen en cuestión; con esto se confirmó que las cepas tenían la delección de Nhp6A o Hmo1. En el caso de las cepas TAP, éstas poseen la secuencia del epítipo TAP entre el promotor y el inicio del ORF de las HMGB, por lo cual se debería obtener un producto de PCR de aproximadamente 3000 pb, inviable para las condiciones de PCR utilizadas. Luego evaluamos la cepa con la doble delección de Nhp6A y Nhp6B, donde se repitieron las reacciones de PCR para los genes NHP6A y NHP6B, observando que esta cepa correspondía a la doble

deleción de ambos genes (Figura 29B). También se evaluó la presencia de la proteína Snf5, una de las subunidades del complejo SWI/SNF, por western blot con un anticuerpo específico para esta proteína, en las cepas silvestre y mutantes. Se observó que las cepas analizadas presentan una cantidad similar de esta proteína (Snf5), indicando que las diferentes cepas poseen el complejo remodelador SWI/SNF (Figura 29C) y sin variación en sus niveles.

Dentro de la confirmación de las cepas TAP-HMGB por PCR, se confeccionó un nuevo oligonucleótido dirigido a la secuencia del epítoto TAP (Anexo 9) y se utilizó junto con el oligonucleótido específico orientado al ORF de cada uno de los genes, obteniéndose producto único de amplificación por PCR y demostrándose así que las tres cepas TAP eran correctas (Figura 29D). También corroboramos la presencia de las proteínas TAP-HMGB, utilizando un anticuerpo específico para este epítoto (Figura 29E). Al mismo tiempo realizamos la detección de la subunidad Snf5 en estas cepas (Figura 29F), visualizando además de Snf5, las proteínas TAP, ya que el epítoto TAP puede ser reconocido por cualquier IgG. Con lo anterior se demostró que estas cepas poseen las proteínas HMGB con el epítoto y además poseen el complejo SWI/SNF (Snf5) en cantidades similares a la cepa silvestre (Figura 29E y F).

Luego que las cepas a utilizar en los ensayos de ChIP-chip fueran confirmadas, se procedió con la estandarización de la inmunoprecipitación de cromatina. Para esto se seleccionaron 2 genes en base a un estudio donde se determinó por ChIP-chip el enriquecimiento de Nhp6A y Snf2 en la región promotora de genes, realizado por el laboratorio de Franklin Pugh (Venters BJ et al, 2011). Sin embargo, esta selección presentó un problema, ya que las cepas y las condiciones de crecimiento utilizadas por ellos diferían de las nuestras. Independiente de lo

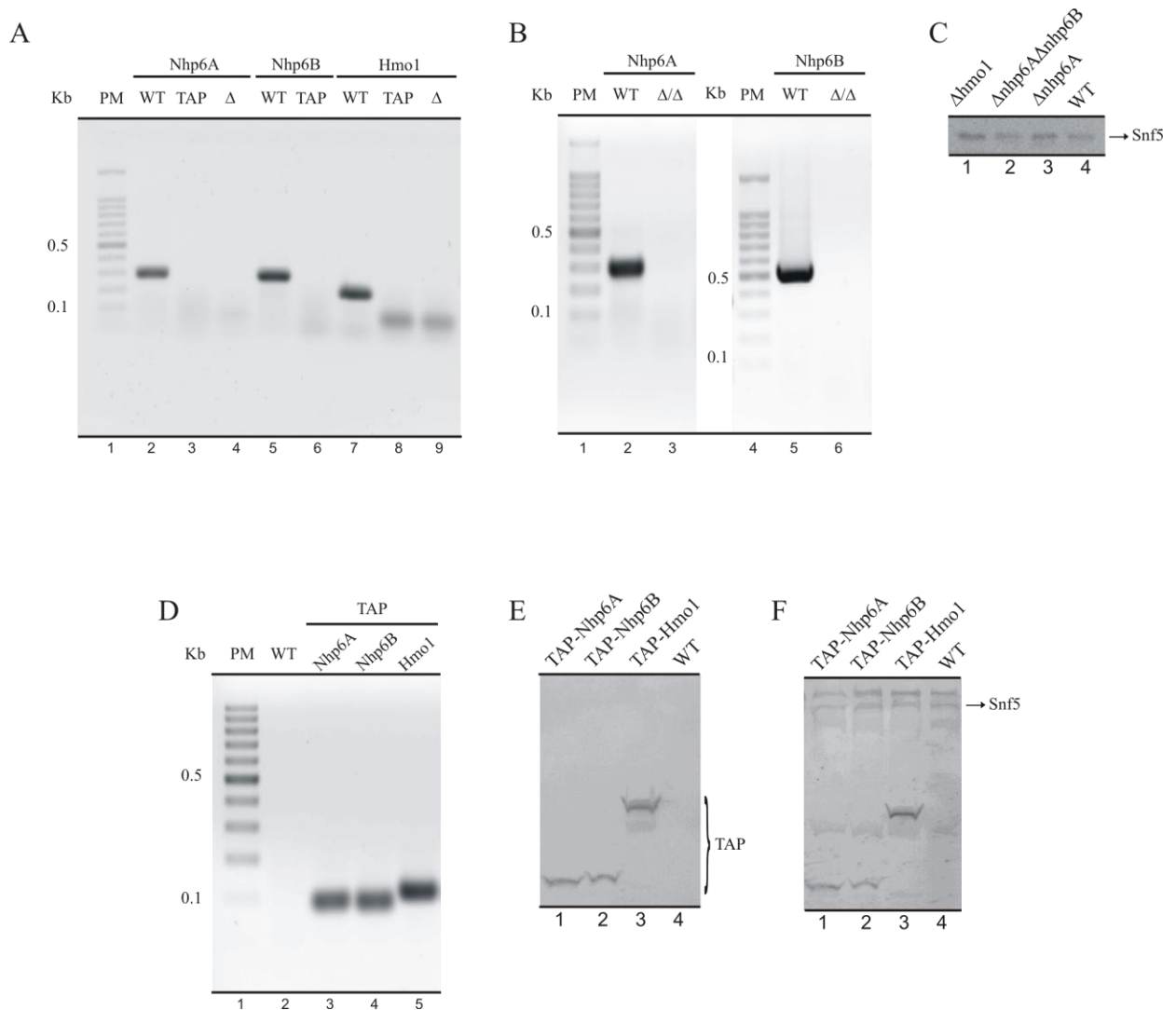


Figura 29: Análisis genético y de expresión de las cepas de levadura para su uso en estudios de ChIP y posicionamiento nucleosomal. A) Análisis por PCR utilizando oligonucleótidos específicos para los genes individuales de las proteínas HMGB de levadura a estudiar (cepas silvestre, TAP y delecionada para cada caso). B) PCR para confirmar la amplificación de los oligonucleótidos específicos de los genes NHP6A y NHP6B a estudiar, en cepas silvestre y la doble deleción. C) Western blot de análisis de los niveles del complejo remodelador de cromatina SWI/SNF (subunidad Snf5), en las cepas silvestre y deleciones (simples y doble) con anticuerpo específico para la proteína Snf5. D) PCR para confirmar la amplificación de los genes de las proteínas HMGB y el epítipo TAP, en cepas silvestre y las cepas TAP por oligonucleótidos específicos (Anexo 9). E) Western blot para confirmar la presencia de las proteínas HMGB-TAP, en las cepas silvestre y TAP (tres cepas) con anticuerpo específico para este epítipo. F) Western blot de confirmación para la presencia del complejo remodelador de cromatina SWI/SNF (subunidad Snf5), en las cepas silvestre y TAP (tres cepas) con anticuerpo específico para esta proteína. Todos los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa.

anterior, los 2 genes seleccionados: (YLR438W e YCL064C), tenían un alto grado de enriquecimiento de Nhp6A y Snf2 en la región promotora. Para cada gen se confeccionaron partidores específicos orientados a la región donde existía un enriquecimiento de estas proteínas (Anexo 10).

En el análisis de inmunoprecipitación de cromatina para las proteínas TAP, se utilizaron la cepa silvestre y las tres cepas con las proteínas TAP-HMGB (TAP-Nhp6A, TAP-Nhp6B y TAP-Hmo1). Se obtuvieron buenos grados de inmunoprecipitado, con resultados distintos entre los genes y entre las diferentes proteínas analizadas. Además, el control de unión inespecífica, que en este caso sólo fue la resina CL-4B, nos dio valores bajos de inmunoprecipitado, comparados con los valores de inmunoprecipitado obtenidos con la resina IgG, que se asocia a la porción proteína A del epítipo TAP (Figura 30).

En paralelo se analizó el grado de inmunoprecipitación de cromatina para la proteína Snf5, utilizando un anticuerpo específico para ella. Se estudió una cepa silvestre y las tres cepas mutantes con deleciones de las proteínas Nhp6A, Nhp6A/Nhp6B y Hmo1. Mediante este análisis observamos que es posible realizar el ensayo de ChIP con nuestra metodología, obteniendo buenos grados de inmunoprecipitado. Se obtuvo resultados disímiles entre los dos genes y entre las diferentes cepas utilizadas, observándose una tendencia a la baja en la presencia de Snf5 sobre el promotor del gen YLR438W en el caso de la mutante de doble deleción y la deleción de Hmo1 (Figura 31). Además, el control de asociación inespecífica (que en este caso utilizó resina con proteína G) nos dio valores bajos de inmunoprecipitado, comparados con los valores de inmunoprecipitado con el anticuerpo anti-Snf5.

No se profundiza en el análisis de los resultados específicos de cada gen, ya que el análisis definitivo realizado por ChIP-chip es mucho más completo.

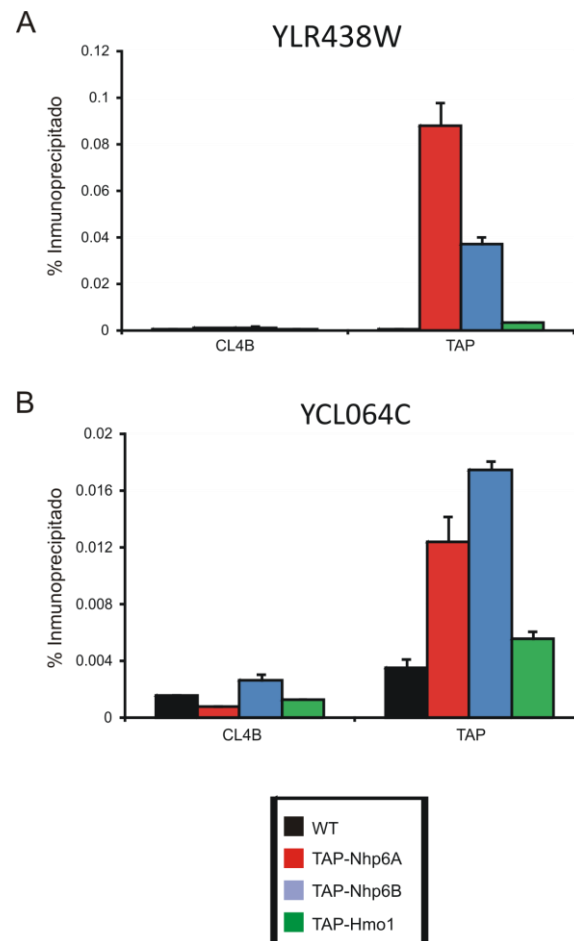


Figura 30: Análisis de la presencia física de proteínas HMGB en promotores de genes seleccionados por ChIP-qPCR. A y B) Los genes fueron seleccionados a partir de un estudio realizado por el laboratorio de F. Pugh, que incluyó el análisis de presencia física de Nhp6A y Snf2 a nivel de genoma completo, ambos genes seleccionados presentan niveles altos de ambas proteínas analizadas (Venters BJ et al, 2011). A) Perfil de enriquecimiento de proteínas con epítipo TAP en el promotor del gen YLR438w. B) Perfil de enriquecimiento de proteínas con epítipo TAP en el promotor del gen YCL064c. Se señala en cada gráfica la presencia de las diferentes proteínas TAP en estos genes al inmunoprecipitar con resina CL-4B (control de unión inespecífica) y la resina IgG sefarosa como unión específica para el epítipo TAP. La simbología correspondiente a las cepas silvestre y TAP en cada una de las gráficas se muestra en la parte inferior de la figura.

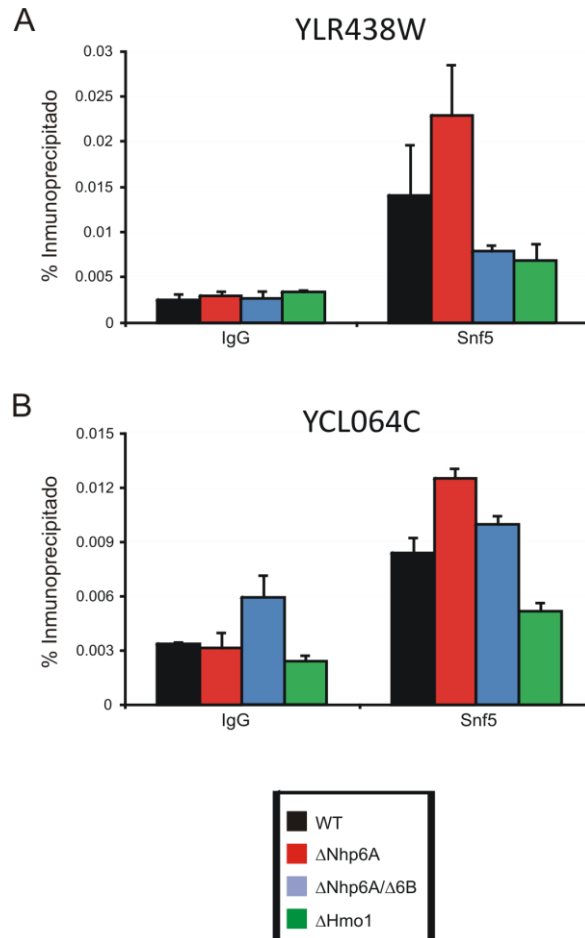


Figura 31: Análisis de la presencia física de Snf5 en promotores de genes selectos por ChIP-qPCR, en función de la presencia o ausencia de proteínas HMGB. A y B) Los genes fueron seleccionados a partir de un estudio realizado por el laboratorio de F. Pugh, que incluyó el análisis de la presencia física de Nhp6A y Snf2 a nivel de genoma completo, ambos genes seleccionados presentan niveles altos de ambas proteínas analizadas (Venters BJ et al, 2011). A) Perfil de enriquecimiento de Snf5 en el promotor del gen YLR438w. B) Perfil de enriquecimiento de Snf5 en el promotor del gen YCL064c. Se señala en cada una de las gráficas la presencia de Snf5 en estos genes al inmunoprecipitar con el anticuerpo específico para Snf5 y con el control de asociación inespecífica. La simbología correspondiente a las cepas utilizadas en cada una de las gráficas se muestra en la parte inferior de la figura.

Posteriormente se procedió a la estandarización de la técnica de ChIP-chip. Para esto se comenzó por el marcaje de los inmunoprecipitados (IP) y el material de partida de cada uno (Input) con los fluoróforos Cy5 y Cy3, respectivamente, tal como se detalla en Materiales y Métodos. Luego, cada análisis (IP/Input) de microarreglo se realizó por triplicado. De estas réplicas se procedió a descartar el microarreglo que presentase valores bajos en la intensidad de marca de al menos uno de los fluoróforos. Por lo cual se continuó con la normalización final, consistente en comparar los valores de IP/Input en general (genoma completo) entre las diferentes réplicas, para las inmunoprecipitaciones con TAP o Snf5 (Figura 32A y B). En el procedimiento se obtuvo una correcta correlación entre cada una de las réplicas seleccionadas para los diferentes análisis de TAP (Figura 32A) y de Snf5 (Figura 32B). Los valores de correlación van entre el 0 y 1, siendo 1 el valor más alto (amarillo) y 0 el valor más bajo (azul oscuro) (Figura 32C). Se tomó como correcto cualquier valor superior a 0.4, ya que este valor se considera como indicativo de una correlación adecuada para estos ensayos.

En relación al análisis de resultados de ChIP-chip, se debe considerar que cada chip posee 8 cassettes independientes donde se aplican el IP e Input de cada condición. Cada uno de estos cassettes posee 60000 secuencias de ADN diferentes, con aproximadamente 10 probadores por gen. Estos barren la extensión de cada gen. Para la asignación de las señales que otorgan los probadores cada gen es dividido en 20 bins diferentes, cuya identidad se define respecto al ORF de cada gen: 3 bins corresponden al promotor y poseen una extensión de 160 pb cada uno; 1 bin se localiza en el TSS; 12 bins son vinculados al ORF; 1 bin se localiza en el TES y 3 bins cubren la región 3' y también poseen una extensión de 160 pb cada uno (Figura 32D).

Como se indica con más detalles en la sección de Materiales y Métodos, previo a obtener y analizar los perfiles de presencia física (enriquecimiento) de cada proteína, se realiza una

normalización de todas las razones IP/Input, llevando a 1 el promedio de esta razón. Luego, a los valores resultantes se aplica logaritmo en base 2 ($\log_2$) para finalmente pasar al análisis de los resultados. De esta forma, la presencia física promedio de una proteína tiene un valor de cero ($\log_2 1 = 0$). Un enriquecimiento del doble del promedio del genoma completo tendrá un valor de 1 ($\log_2 2 = 1$), un enriquecimiento de la mitad del promedio tendrá un valor de -1 ($\log_2 0.5 = -1$) y así continua.

El análisis que consideró la inmunoprecipitación de Snf5 se realizó con 4 cepas diferentes: la silvestre (BY4741), la delección simple de Nhp6A, la doble delección de Nhp6A/Nhp6B y la delección de Hmo1. Se obtuvo la gráfica de los valores de $\log_2$ (IP/Input) V/S la posición en los genes (bins) en genoma completo (~6600 genes) (Figura 33A). El análisis arrojó como resultado que la distribución de Snf5 en la cepa silvestre en genoma completo es homogénea. En cambio, en la gráfica de genoma completo de las cepas mutantes (deleciones) observamos que el patrón de distribución de enriquecimiento de Snf5 baja levemente en la región promotora y en la región 3', manteniéndose sin variación en el ORF (Figura 33A). A la luz de este resultado, quisimos determinar el grado de reducción de Snf5 en promotores de genes sólo para aquellos genes que poseen niveles significativos de esta proteína en la cepa silvestre. Con este fin se realizó una agrupación de genes por valores de enriquecimiento de Snf5, enfocándonos en la región promotora y el TSS (región en la que el complejo remodelador SWI/SNF típicamente actúa). Para esto se seleccionó los genes que tuvieran un nivel de enriquecimiento de Snf5 mayor o igual a 0.5 del $\log_2$ (IP/Input), en cualquiera de los 4 bins correspondientes al promotor-TSS, en la cepa silvestre (Figura 33B). Los genes que cumplieron

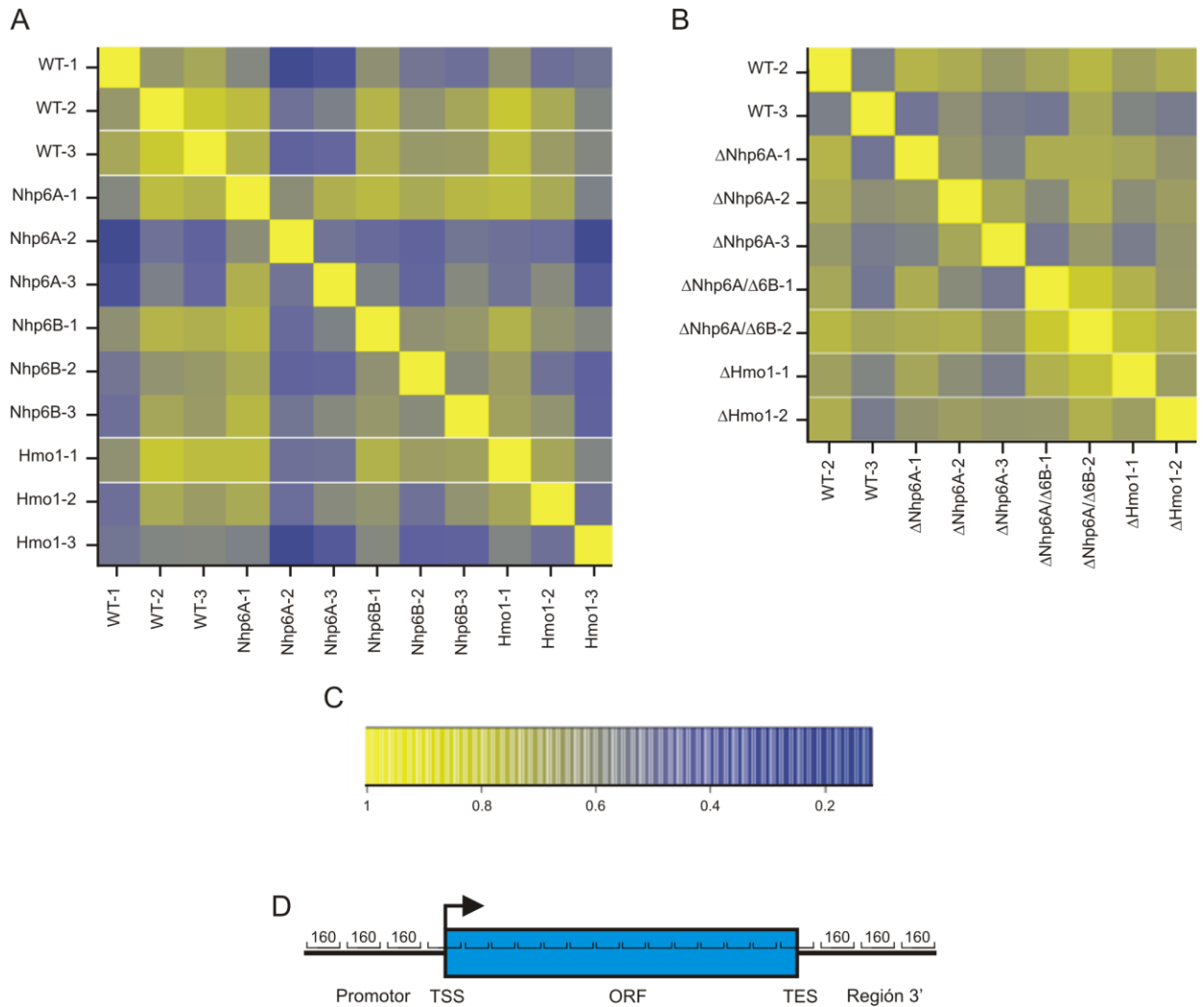


Figura 32: Normalización de los datos del análisis de ChIP-chip para proteínas TAP y Snf5. A y B) Gráfica de intensidades de la correlación del enriquecimiento de los inmunoprecipitados. A) anti-TAP, para las diferentes cepas. B) anti-Snf5, para las diferentes cepas utilizadas. En ambos se comparan los productos de señal del IP/Input entre las diferentes cepas, obtenidos de un análisis de ChIP-chip de un microarreglo con plataforma de alta resolución (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). C) Simbología de la correlación que existe entre las diferentes cepas inmunoprecipitadas y las correspondientes réplicas. Amarillo indica alta correlación (1) y azul oscuro indica baja correlación (0), entre los valores de las muestras. D) Representación esquemática de la distribución de los diferentes probadores del microarreglo, los cuales son divididos en 20 bins diferentes (regiones específicas de cada gen), y se subdividen en 3 bins correspondientes al promotor cada 160 pb, 1 en el TSS, 12 en el ORF, 1 en el TES y 3 en el 3' cada 160 pb

con este criterio son 2536. Al analizar el perfil de enriquecimiento de Snf5 para estos genes en las distintas cepas, se observó que la disminución de esta proteína en la región promotora, que en genoma completo era leve, se hizo más notoria (Figura 33B). El mismo ejercicio de selección de genes se hizo ahora agrupando los genes que tuvieran un nivel de enriquecimiento de Snf5 mayor o igual a 1 del $\log_2$ (IP/Input). Los genes que cumplieron con este criterio fueron 1017. Al analizar el perfil de enriquecimiento de Snf5 para este grupo, también se encontró una mayor reducción de Snf5 en las cepas mutantes que lo encontrado con todos los genes de *S. cerevisiae* (Figura 33C).

Paralelamente se comparó el perfil de enriquecimiento de Snf5 (en la cepa silvestre) con el perfil de enriquecimiento de las proteínas TAP-HMGB en sus cepas correspondientes (TAP-Nhp6a, TAP-Nhp6b y TAP-Hmo1). Esta comparación mostró que, a diferencia de Snf5, las proteínas TAP-HMGB en genoma completo tienen una localización mayoritaria sobre la región promotora y la región 3' (Figura 34A). Al analizar el perfil de presencia física de las proteínas TAP en los genes que poseen un enriquecimiento de Snf5 ≥ 0.5 (2536 genes), se observó que estas proteínas aumentan su enriquecimiento de la mano de Snf5, si lo comparamos con el análisis de genoma completo, destacándose una preponderancia en el enriquecimiento en la región promotora por sobre la región 3' de estos genes (Figura 34B). También se analizó el enriquecimiento de las proteínas TAP en los genes con presencia de Snf5 ≥ 1 (1017 genes) (Figura 34C). Para estos se obtuvo un mayor aumento en su enriquecimiento si lo comparamos con el grupo de genes de Snf5 ≥ 0.5 , manteniéndose la preferencia del enriquecimiento en la región promotora de los genes (Figura 34C).

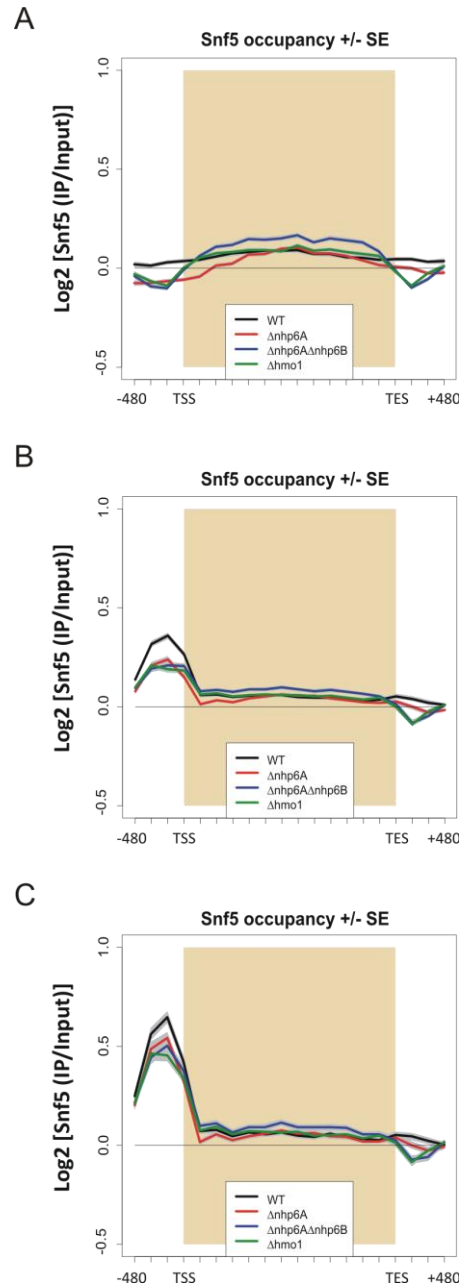


Figura 33: Perfil de enriquecimiento de SWI/SNF (Snf5) en los genes de levadura (*S. cerevisiae*). Análisis ChIP-chip utilizando microarreglo de alta resolución (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Todos los análisis son mediante ChIP-chip en promotor, ORF y 3' de los genes de levadura. A, B y C) Gráficas de enriquecimiento en cepas silvestre (WT, BY4741) (negro) y cepas que poseen la delección simple de Nhp6A (rojo), la doble delección de Nhp6A y Nhp6B (azul) o la delección simple de Hmo1 (verde). A) Enriquecimiento de Snf5 en genoma completo (6600 genes). B y C) Filtrado de valores de Snf5 en la región promotora completa (-480 a TSS) de la cepa WT y comparado con los valores de las cepas mutantes de delección. B) Snf5 mayor o igual a 0.5 ($\log_2 \geq 0.5$) en cepas WT (2536 genes). C) Snf5 mayor o igual a 1 ($\log_2 \geq 1$) en cepas WT (1017 genes). Los valores de enriquecimiento son calculados en base a log2 de la razón inmunoprecipitado versus input (IP/Input).

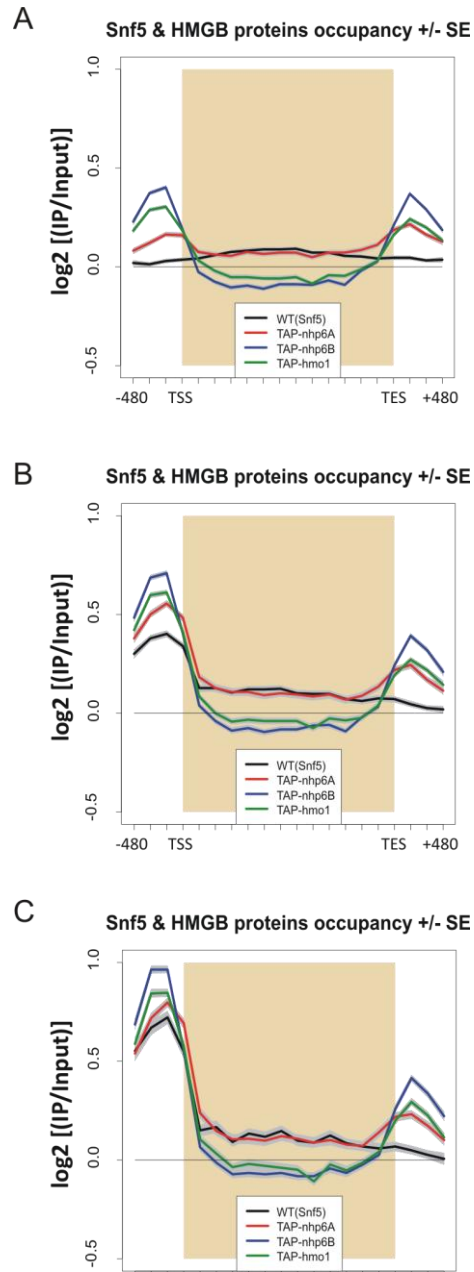


Figura 34: Perfil de enriquecimiento de las proteínas TAP-HMGB de levadura y Snf5. Análisis ChIP-chip utilizando microarreglo de alta resolución (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Los gráficos muestran la ocupancia de las proteínas en estudio en relación a promotor, ORF y 3' de los genes de levadura. A, B y C) Gráficas de enriquecimiento en cepa silvestre (WT, BY4741) (negro) y cepas que poseen la proteína TAP-Nhp6A (rojo), TAP-Nhp6B (azul) o TAP-Hmo1 (verde). A) Enriquecimiento de Snf5 y proteínas HMGB en genoma completo. B y C) Perfil de proteínas TAP y Snf5 en los genes seleccionados en ambos análisis de enriquecimiento de Snf5 en la región promotora completa (-480 a TSS). B) Genes con Snf5 mayor o igual a 0.5. C) Genes con Snf5 mayor o igual a 1. Los valores de enriquecimiento son calculados en base a log2 de la razón inmunoprecipitado versus input (IP/Input).

Tomando como base los genes con enriquecimiento de Snf5 mayor o igual a 0.5 (2536) o 1 (1017), se procedió a analizar en cuáles de estos genes se observaba una reducción de enriquecimiento mayor o igual a 1 entre el valor de $\log_2$ de Snf5 en la cepa silvestre (WT) y el de cada cepa mutante de delección (esto es, una reducción en los niveles de la proteína que consideramos como biológicamente significativo). Este análisis arrojó una disminución significativa del enriquecimiento de Snf5 para las mutantes de delección en las regiones promotoras de varios genes (Figura 35). Estos análisis se graficaron de forma independiente para cada cepa mutante, contrastando el perfil de presencia física de Snf5 de la cepa silvestre con el perfil de la delección correspondiente, sólo para los genes con reducción significativa de Snf5 (Figura 35A y E). Para la cepa mutante simple de Nhp6A se obtuvo que, de los 2536 genes que tenían un enriquecimiento de Snf5 mayor o igual a 0.5, 90 presentaron reducción significativa (Figura 35B). En cambio, cuando se analizó los 1017 genes que presentan enriquecimiento de Snf5 mayor o igual a 1, 29 genes presentaron reducción significativa (Figura 35F). Al realizar el análisis con la cepa doble mutante para Nhp6A/Nhp6B (doble delección) se obtuvo que, de los 2536 genes con enriquecimiento de Snf5 ≥ 0.5 , 167 genes presentaron esta reducción, más que en el caso de la mutante simple (Figura 35C). En el caso de los 1017 genes con enriquecimiento de Snf5 ≥ 1 el número de genes afectados fue de 75 (Figura 35G). Al analizar la cepa mutante de delección de Hmo1 obtuvimos que de los 2536 genes con Snf5 ≥ 0.5 , 215 genes presentaron esta reducción (Figura 35D), incluso más que los genes afectados por la doble delección de Nhp6. Para el grupo de 1017 genes con Snf5 > 1 se obtuvo que 128 genes presentan reducción significativa de Snf5 en su región promotora (Figura 35H).

Si bien el número de genes en que se vio afectada la presencia física de Snf5 puede parecer bajo en términos de porcentaje, se debe tener en consideración que los grupos de genes

que se tomaron como base en este análisis (2536 genes con $\text{Snf5} \geq 0.5$ y 1017 genes con $\text{Snf5} \geq 1$) fueron definidos solamente de acuerdo a presencia física significativa de Snf5. En muchos de estos genes no hay una presencia física significativa de alguna de las HMGB en estudio. En la sección siguiente se incorporara éste y otros criterios para la continuación del análisis de resultados.

Entre los genes con un enriquecimiento de $\text{Snf5} \geq 0.5$ y una reducción ≥ 1 en el enriquecimiento de Snf5 entre la cepa silvestre y las diferentes mutantes, analizamos cómo es el enriquecimiento de las proteínas TAP-HMGB, realizando gráficas independientes para cada una de éstas con respecto a la delección específica (Figura 36). Para los 90 genes seleccionados en la cepa mutante de Nhp6A, se observó que el enriquecimiento de Nhp6A y Nhp6B en las cepas TAP es alto en la región promotora, al igual que Snf5 (Figura 36A). De hecho, 41 de estos 90 genes poseen la presencia física de Nhp6A y/o Nhp6B ≥ 1 en a lo menos un bin de la región promotora y TSS. En los 167 genes determinados para la cepa doble mutante de Nhp6A/Nhp6B, observamos que el perfil de presencia física de Nhp6A y Nhp6B en las cepas TAP muestra un mayor enriquecimiento localizado en la región promotora y TSS, siendo más marcado este enriquecimiento en la cepa TAP-Nhp6B (Figura 36B). De hecho, 129 de estos 167 genes presentan un enriquecimiento de Nhp6A y/o Nhp6B ≥ 1 en a lo menos uno de los bins de promotor y TSS. Al analizar la cepa mutante de Hmo1, en los 215 genes que poseen esa característica se observó un perfil de localización de Hmo1 en la cepa TAP con marcado enriquecimiento en el promotor y TSS de estos genes (Figura 36C). De hecho, 160 de estos 215 genes poseen un enriquecimiento de Hmo1 ≥ 1 en a lo menos uno de los bins de la región promotora y TSS.

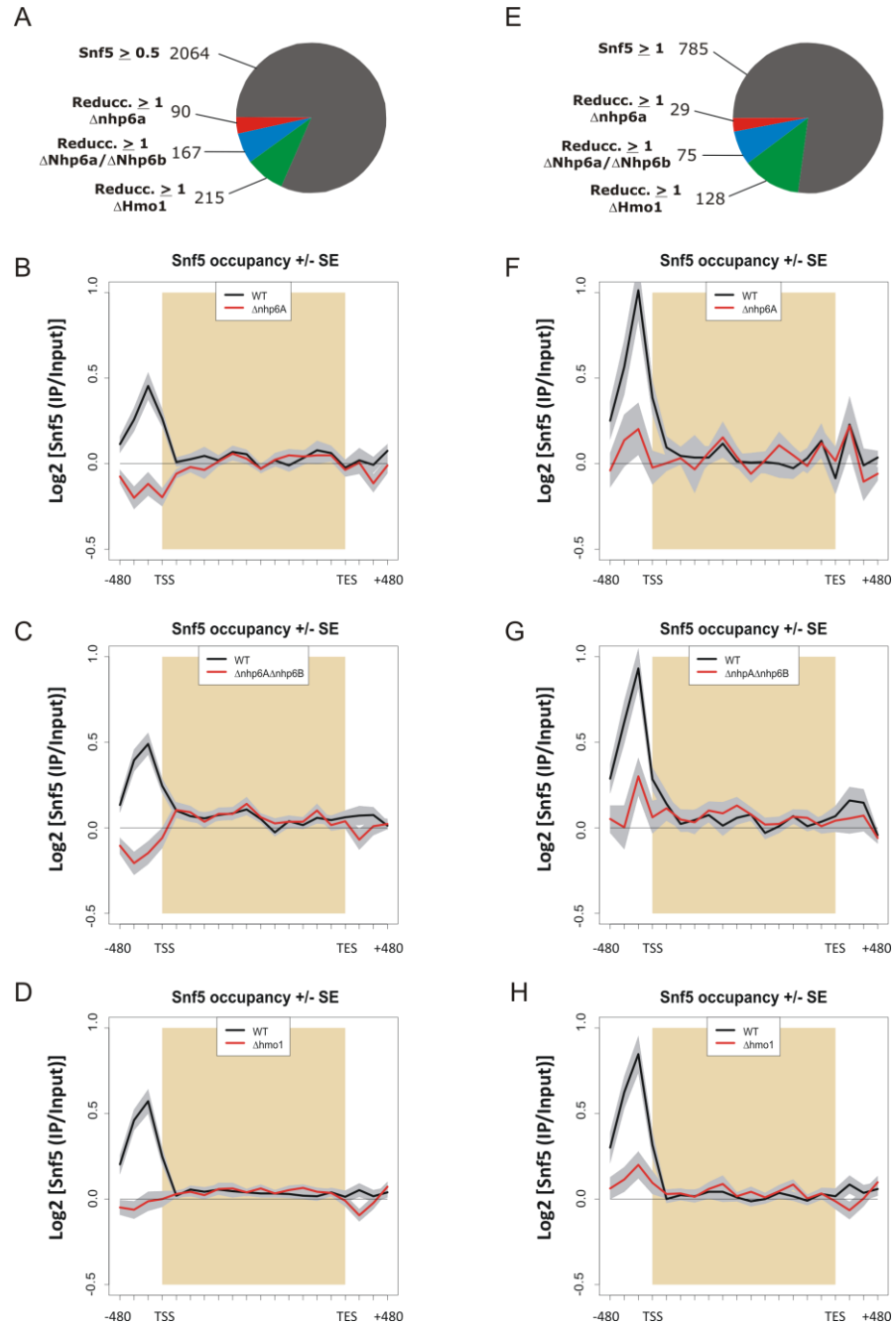


Figura 35: Perfil de ocupancia de Snf5 en genes con reducción de enriquecimiento entre silvestre y delección. Cálculos de reducción con los valores de presencia física de Snf5 en la región promotora y TSS. A y E) Graficas proporcionales de genes con presencia de Snf5 y reducción de éste en las diferentes delecciones. A) $Snf5 \geq 0.5$ y E) $Snf5 \geq 1$. Grafica de los perfiles de ocupancia de Snf5 para los genes que cumplen con una reducción seleccionada. B-D) Análisis realizado para el set de genes que poseen ocupancia de $Snf5 \geq 0.5$ (2536 genes). F-H) Análisis realizado para el set de genes que poseen ocupancia de $Snf5 \geq 1$ (1017 genes). B) Delección simple de Nhp6A (90 genes), C) doble delección Nhp6A/Nhp6B (167 genes), D) delección simple de Hmo1 (215 genes), F) Delección simple de Nhp6A (29 genes), G) doble delección Nhp6A/Nhp6B (75 genes) y H) delección simple de Hmo1 (128 genes).

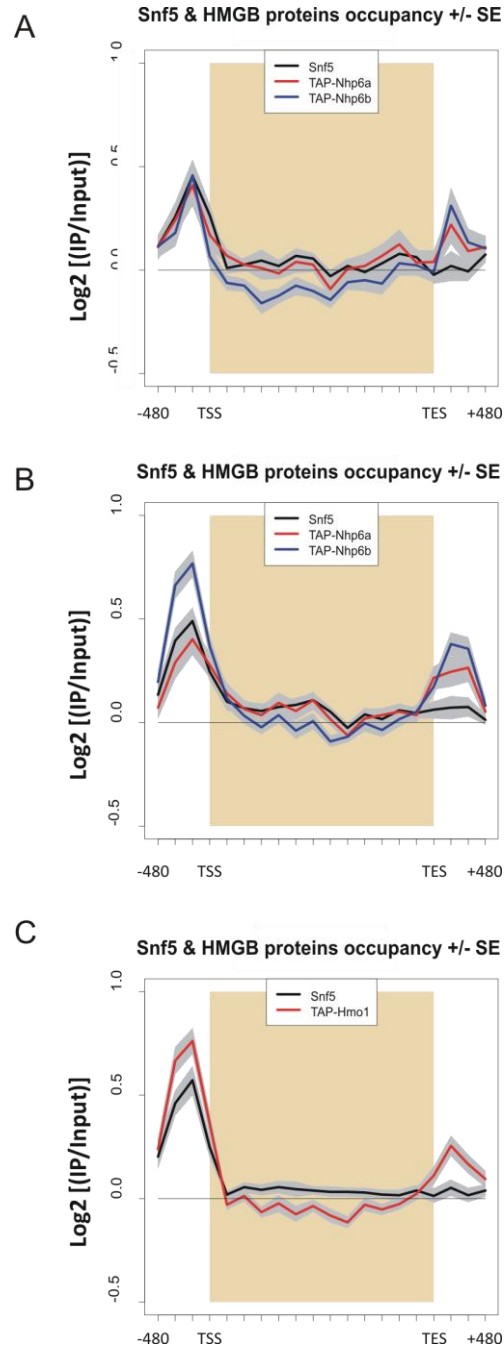


Figura 36: Perfil de enriquecimiento de SWI/SNF (Snf5) y proteínas HMGB-TAP de levadura en los genes con reducción significativa de SWI/SNF en las cepas mutantes. A - C) Perfiles de enriquecimiento de Snf5 y de las proteínas HMGB-TAP en la región promotora (-480 a TSS) de los genes que ven afectada la presencia física de Snf5 con la ausencia de las HMGB en estudio (análisis de Figuras 35 D, E y F). A) Perfil de distribución de las proteínas Nhp6A-TAP (rojo) y Nhp6B-TAP (azul) en los 90 genes de la delección simple de Nhp6A. B) Perfil de distribución de las proteínas Nhp6A-TAP (rojo) y Nhp6B-TAP (azul) en los 167 genes de la doble delección de Nhp6A/Nhp6B. C) Perfil de distribución de la proteína Hmo1-TAP (rojo) en los 215 genes de la delección simple de Hmo1.

3.3.2.- Efecto de las proteínas HMGB sobre el posicionamiento de nucleosomas en promotores de genes específicos.

El objetivo de este análisis fue determinar el posicionamiento nucleosomal en algunos genes en los cuales se determinó la presencia física de las diferentes HMGB y Snf5, así como la influencia en la expresión mediada por SWI/SNF. El ensayo se basó en el trabajo de Lam y colaboradores (Lam et al, 2008), el cual se detalla en Materiales y Métodos.

Mediante la utilización de diagramas de Venn obtenidos por el programa estadístico “R” se realizaron diferentes agrupaciones a modo de resumen de los diferentes datos obtenidos por los ensayos de ChIP-chip. En la Figura 37A se muestran los 6600 genes en genoma completo, subdividiéndolos en las agrupaciones de los genes que poseen $\text{Snf5} \geq 0.5$ en la región promotora y TSS (2536 genes) y de los genes que poseen $\text{Snf5} \geq 1$ también en la región promotora y TSS (1017 genes). Cabe destacar que estos 1017 genes están incluidos en los 2536 genes antes mencionados. En la Figura 37B se utiliza sólo los 1017 genes con $\text{Snf5} \geq 1$ y en la Figura 37C los 2536 genes que poseen $\text{Snf5} \geq 0.5$, analizando en ambas Figuras el acoplamiento con los genes que tienen una reducción ≥ 1 en el enriquecimiento de Snf5 entre la cepa silvestre y la doble delección de $\Delta\text{Nhp6A}/\Delta\text{Nhp6B}$ o la delección simple de ΔHmo1 . En ambos casos (Figura 37B y 37C) se observa que existen genes donde la presencia física de SWI/SNF se ve afectada por la ausencia de cualquiera de las HMGB estudiadas, Nhp6 (doble delección) o Hmo1.

Los otros análisis que se realizaron nos facilitaron la elección de los genes candidatos para los estudios de posicionamiento nucleosomal. Estos se basaron en la cruza de datos de nuestros análisis de ChIP-chip y de un análisis por microarreglo de expresión en base a cepas mutantes de SWI/SNF realizado por el grupo de Winston (Sudarsanam et al, 2000). En este

estudio se definieron los genes en que el complejo SWI/SNF afecta negativa o positivamente la transcripción. En la Figura 37D se muestran en un diagrama de Venn los genes de genoma completo (~6600), los genes que son regulados negativamente (319) y los regulados positivamente (233). Luego, en la Figura 37E se muestra una combinación de los genes que poseen presencia física de $\text{Snf5} \geq 0.5$ (2536) con los del microarreglo de expresión de genes regulados de forma negativa, obteniéndose 117 genes con presencia física de Snf5 y que son regulados negativamente por la presencia del complejo SWI/SNF. En el análisis que se observa en la Figura 37F, 85 genes poseen presencia física de Snf5 y son regulados positivamente por el complejo SWI/SNF.

Con los grupos de genes obtenidos (117 y 85 genes) se realizó un análisis de combinación con los grupos previamente definidos de reducción ≥ 1 en el enriquecimiento de Snf5 entre las cepas silvestre y $\Delta\text{Nhp6A}/\Delta\text{Nhp6B}$ o ΔHmo1 (167 y 215 genes, respectivamente) (Figura 37G y H). Con este análisis se pudo definir los genes con regulación directa por parte de SWI/SNF y que además ven reducida la presencia física de este complejo por ausencia de las HMGB en estudio. En la Figura 37G se muestra el análisis de los genes regulados negativamente por SWI/SNF, de los cuales 15 coinciden con la combinación de características analizadas para la mutante $\Delta\text{Nhp6A}/\Delta\text{Nhp6B}$, y 19 genes coinciden con la combinación de características analizadas para la mutante ΔHmo1 . Al mismo tiempo en la Figura 37H se realizó el análisis con los genes que son regulados positivamente por SWI/SNF, donde vimos que existen 15 genes para la mutante $\Delta\text{Nhp6a}/\Delta\text{Nhp6b}$ y 22 para la mutante ΔHmo1 . De manera interesante, un número mínimo de genes regulados directamente por SWI/SNF ven afectada la

presencia de este complejo por la ausencia de Nhp6 como por la ausencia de Hmo1 (grupo central en los diagramas de Figuras 37G y 37H).

A partir de los grupos de genes que son regulados directa y positivamente por SWI/SNF y que presentan una reducción notoria (≥ 1) del enriquecimiento de Snf5 en su región promotora en las cepas mutantes (15 en la doble mutante Nhp6 y 22 en la mutante Hmo1, Figura 37 H), se realizó la selección de los genes candidatos para los estudios de posicionamiento nucleosomal. Se seleccionó un gen para cada condición de análisis: un gen regulado positivamente por SWI/SNF y sin reducción del enriquecimiento de Snf5 en la región promotora en ninguna de las cepas mutantes; un gen regulado positivamente por SWI/SNF y con una reducción del enriquecimiento de Snf5 en la región promotora en la cepa Δ Nhp6A/ Δ Nhp6B; un gen regulado positivamente por SWI/SNF y con una reducción del enriquecimiento de Snf5 en la región promotora en la cepa Δ Hmo1.

La metodología de selección se detalla en Materiales y Métodos. En resumen, se analizó la presencia específica de Snf5 en los promotores de los genes y los valores de enriquecimiento de esta proteína en la cepa silvestre como en la cepa mutante en cuestión (Genome Browser y tablas del ensayo de ChIP-chip). Además se verificó que estuviera físicamente presente la proteína HMGB (TAP) en cuestión en las regiones promotoras de cada gen seleccionado (Genome Browser y tablas del ensayo de ChIP-chip). También, se analizó el posicionamiento normal de nucleosoma de cada uno de los genes seleccionados (Yeast Nucleosomes Database, Segal Lab.). Esto último se realizó porque no todos los genes poseen un posicionamiento nucleosomal en la región promotora fácil de analizar o dilucidar, sobre todo por la posición del nucleosoma -1 (primer nucleosoma del promotor). Es así como optamos finalmente por trabajar con el gen SAG1 (YJR004C), el cual forma parte de la vía de aglutinación de las levaduras (Doi

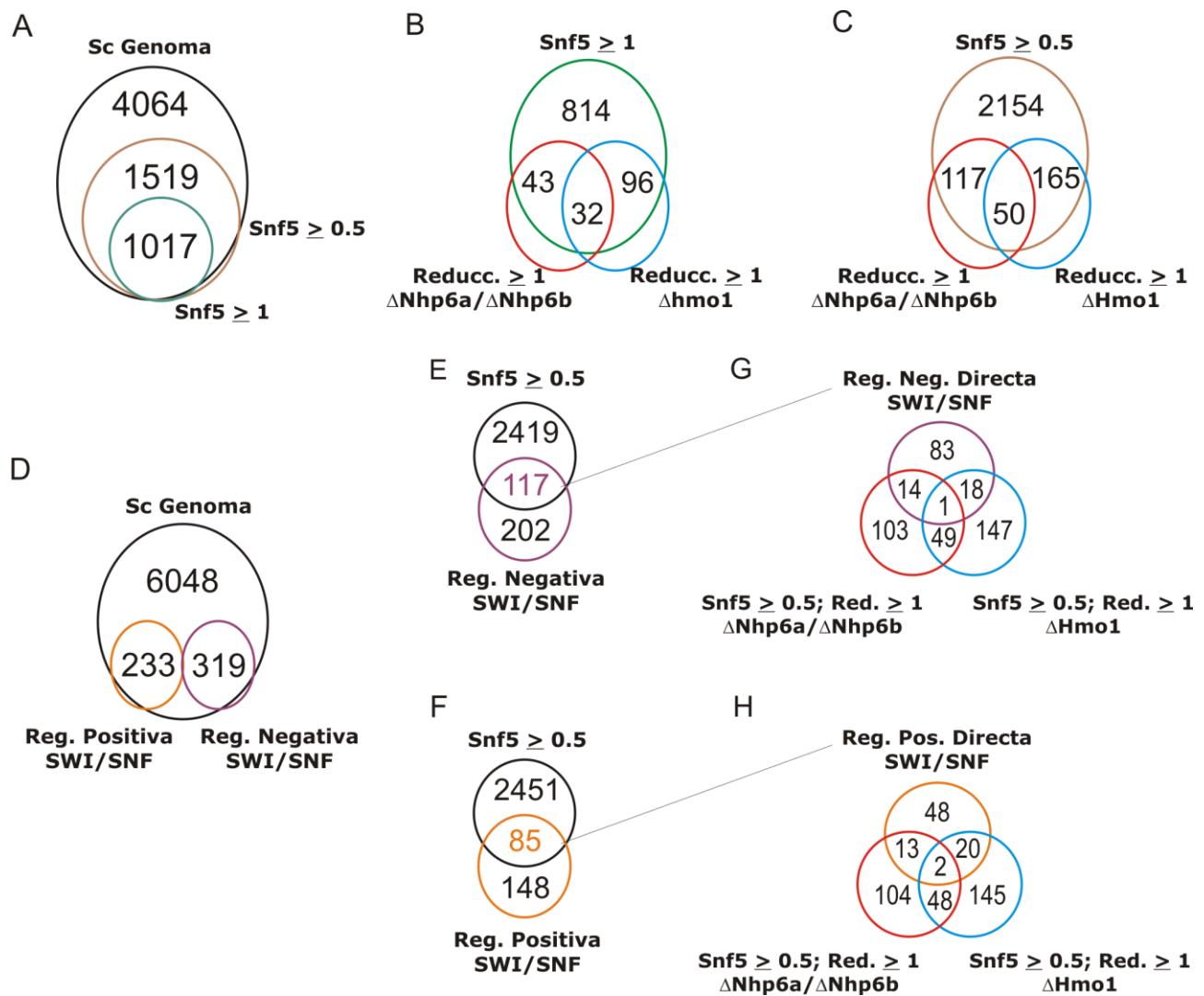


Figura 37: Análisis de agrupaciones de genes por Diagramas de Venn. A) Diagrama de Venn de genoma completo, comparado con los genes con enriquecimiento de Snf5 en la región promotora, mayor o igual a 0.5 (café, 2536 genes) y mayor o igual a 1 (verde, 1017 genes). B y C) Diagrama de Venn para enriquecimiento y variación de enriquecimiento de Snf5; (B) base con Snf5 mayor o igual a 1 (verde), (C) base con Snf5 mayor o igual a 0.5 (café). Ambos diagramas se conjugan con una reducción mayor o igual a 1 de Snf5 en la doble deleción (rojo) o en la deleción simple de Hmo1 (azul). D) Diagrama de Venn de genoma completo, comparado con los genes regulados negativamente por SWI/SNF (morado, 319) y los genes regulados positivamente por SWI/SNF (naranja, 233). E y F) Diagrama de Venn de los genes regulados por SWI/SNF con enriquecimiento de Snf5 mayor o igual a 0.5, (E) negativamente (morado), (F) positivamente (naranja). G y H) Diagrama de Venn de los genes regulados por SWI/SNF y con presencia física de Snf5 en estos (mayor o igual a 0.5), conjugando con los genes que tienen una disminución de Snf5 en las deleciones. (G) negativamente regulados (117 genes), (H) positivamente regulados (85 genes). Deleción Nhp6A/Nhp6B (rojo), deleción simple de Hmo1 (azul), con reducción de Snf5 mayor o igual a 1.

et al, 1989; Cappellaro et al, 1994), como representante de los genes regulados positivamente y donde la presencia física de Snf5 no es afectada por ninguna de las deleciones. Se seleccionó el gen RPS22a (YJL190c), proteína componente de la subunidad menor del ribosoma (40S) (Moritz et al, 1990; Lecompte et al, 2002), entre los genes regulados positivamente por SWI/SNF y donde el enriquecimiento de Snf5 es afectado sólo por la doble deleción Δ Nhp6A/ Δ Nhp6B. Finalmente se seleccionó el gen MRP21 (YBL090w), proteína componente de la subunidad mayor del ribosoma mitocondrial (Green-Willms et al, 1998), gen representante de los regulados positivamente por SWI/SNF y donde el enriquecimiento de Snf5 es afectado sólo por la deleción Δ Hmo1.

Una vez seleccionados los genes, procedimos a estandarizar y luego realizar la digestión de la cromatina con MNasa de las diferentes cepas de levadura a utilizar, como se indica en Materiales y Métodos. Las muestras de cromatina analizadas corresponden a la cepa silvestre (BY4741), la cepa mutante con la doble deleción Nhp6 (Δ Nhp6A/ Δ Nhp6B) y la cepa mutante con la deleción simple de Hmo1 (Δ Hmo1). Las digestiones de la cromatina que se obtuvieron se observan en la Figura 38, donde se realizó digestión a diferentes concentraciones de MNasa, corroborándose luego la presencia de fragmentos de ADN de ~150 pb y múltiplos de esta extensión (lo cual indica digestión óptima de la cromatina). Se observó este patrón con las 3 cepas utilizadas. El ADN de 150 pb fue purificado y utilizado en los análisis posteriores.

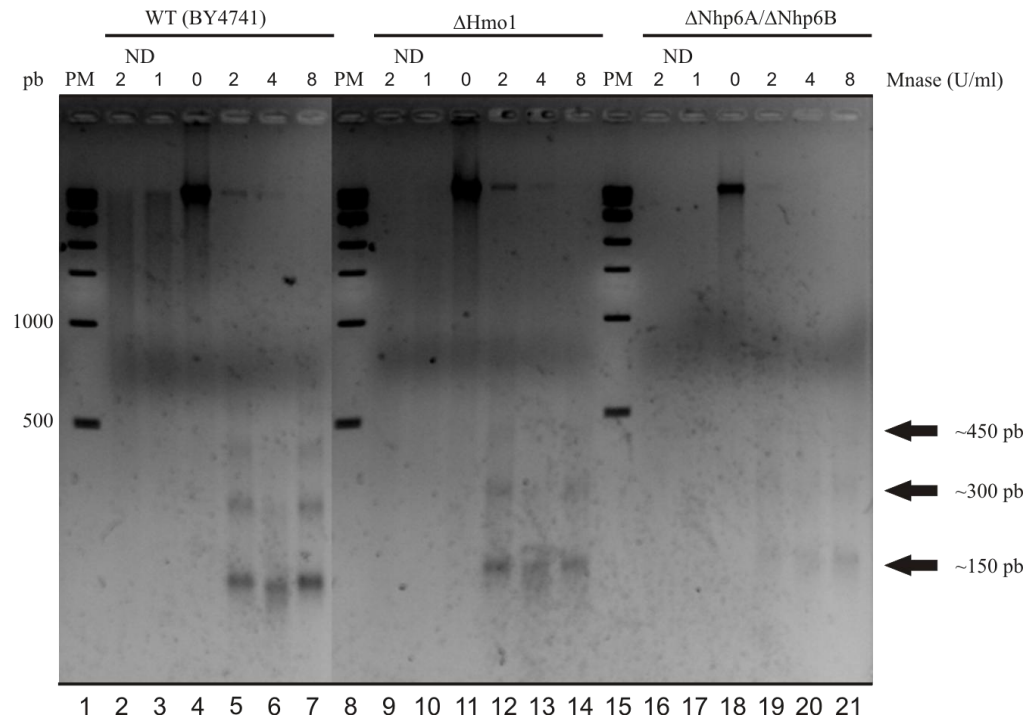


Figura 38: Estandarización de digestión de cromatina con MNasa para el análisis de posicionamiento nucleosomal. Electroforesis en gel de agarosa para determinar la correcta digestión de la cromatina de las tres cepas de levadura utilizadas (silvestre, delección simple Hmo1 y doble delección Nhp6A/Nhp6B). Las concentraciones de MNasa utilizadas en cada reacción se detallan en la parte superior de la Figura. A la derecha se señalan los tamaños de los fragmentos de ADN en múltiplos aproximados de 150 pb

Para el análisis de posicionamiento nucleosomal de cada gen se generaron diferentes sets de oligonucleótidos cuyos amplicones cubren entre 400 y 600 pb de la región promotora y el TSS de cada gen (Anexo 11). Se procedió a estandarizar las PCR de cada gen por PCR convencional, confirmándose que estas generaban un amplicón único del tamaño esperado (~100 pb). Para la estandarización se utilizó ADN genómico de la cepa silvestre y de las digestiones de la cepa silvestre, de la doble delección de Δ Nhp6A/ Δ Nhp6B y de la delección simple de Δ Hmo1 (Figura 39). Se generaron 9 sets de oligonucleótidos para el gen SAG1 (Figura 39A) y el gen RPS22a (Figura 39B), y 12 sets de oligonucleótidos para el gen MRP21 (Figura 39C), observándose que cada PCR tiene una eficiencia de amplificado diferente, pero al realizar el PCR en tiempo real (qPCR) esto no es un problema ya que cada PCR se cuantifica contra su propia curva estándar. Además, se obtuvo que todas las PCR realizadas generan un producto único de amplificación, lo cual es fundamental al momento de cuantificar por qPCR (Figura 39). Algunas PCR convencionales no mostraron amplificación en las cepas mutantes, lo que se pudo deber a que en esa posición, producto de la ausencia de un nucleosoma, se digirió la cromatina por la MNasa, a una menor eficiencia de PCR o a una combinación de ambos factores.

Finalmente se procedió a realizar el análisis del posicionamiento nucleosomal mediante qPCR, para las regiones promotoras de cada uno de los genes seleccionados (SAG1, RPS22a y MRP21) (Figura 40). Para SAG1 se analizó la cepa silvestre y ambas cepas mutantes (Figura 40A). Para RPS22a, las cepas silvestre y la doble mutante (Δ Nhp6A/ Δ Nhp6B) (Figura 40B). Para el gen MRP21, las cepas silvestre y la mutante (Δ Hmo1) (Figura 40C).

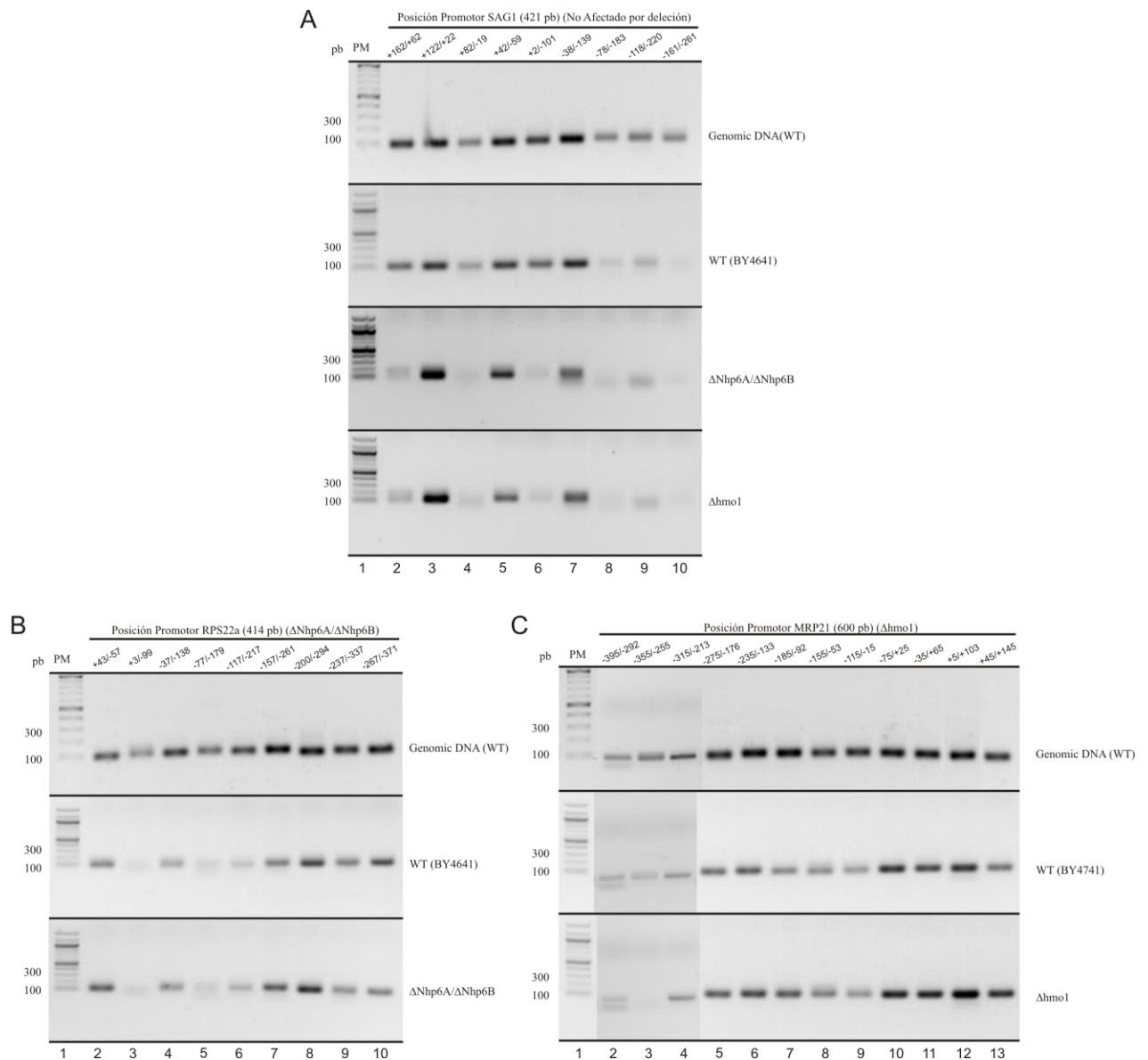


Figura 39: Análisis por PCR de los genes seleccionados para el análisis de posicionamiento nucleosomal. Estandarización de las condiciones de PCR convencional de los diferentes oligonucleótidos generados para el estudio de posicionamiento nucleosomal. A) Estandarización de las PCR del gen control SAG1, realizadas con ADN genómico cepa silvestre, ADN digerido cepa silvestre, ADN digerido cepa doble delección Nhp6A/Nhp6B y ADN digerido cepa delección simple Hmo1. B) Estandarización de las PCR del gen afectado por la doble delección RPS22a, realizadas con ADN genómico cepa silvestre, ADN digerido cepa silvestre y ADN digerido cepa doble delección Nhp6a/Nhp6b. C) Estandarización de las PCR del gen afectado por la delección de Hmo1 MRP21, realizadas con ADN genómico cepa silvestre, ADN digerido cepa silvestre y ADN digerido cepa delección simple Hmo1. En la parte superior de cada Figura se detalla la posición analizada por PCR en cada gen. Para todas las Figuras, el ADN derivado de la digestión con MNasa corresponde a ADN de 150 pb purificado luego de la digestión con esta enzima.

Cada producto de PCR se cuantificó y se graficó los valores de cada qPCR normalizándolos con respecto a uno de los puntos analizados (definido al azar) de cada gen (valor 1). Además, en cada gráfico se incorporó el perfil de enriquecimiento de Snf5 en todas las cepas involucradas. También se incorporó un esquema del posicionamiento de los nucleosomas descrito para cada gen por el grupo de Segal (http://genie.weizmann.ac.il/cgi-bin/gbrowse/nucleo_yeast/).

Para el gen SAG1, el cual no presenta influencia sobre la presencia física de Snf5 por las proteínas HMGB, observamos que no existe ninguna diferencia entre el patrón de posicionamiento de la cepa silvestre y el de las cepas mutantes (Δ Nhp6A/ Δ Nhp6B y Δ Hmo1). Se observó la presencia de 2 nucleosomas completos (+1 y -1) y el comienzo de uno (-2) (región distal del promotor) lo que coincide entre las 3 cepas, observando en este último nucleosoma un desplazamiento con respecto a lo previamente descrito para este gen.

Al analizar RPS22a, el cual ve afectada la presencia física de Snf5 en la cepa que posee la doble delección, vemos que existe una diferencia de posicionamiento nucleosomal entre la cepa silvestre y la doble delección. En el caso de este gen en la Figura 40B visualizamos la presencia de 2 nucleosomas completos (+1 y -1) y una parte de otro en el extremo más distal del promotor analizado (-2). Nuestros resultados indican que en el caso de la cepa silvestre los nucleosomas -1 y -2 no están presentes, lo que podría ser reflejo de encontrarse el gen activo. Sin embargo, en la cepa mutante estos nucleosomas (-1 y -2) están posicionados en la región descrita por Erin Segal (Kurdistani et al, 2002), indicando que en ese caso este gen estaría inactivo. Por otra parte se observa la significativa variación de enriquecimiento de Snf5 en este promotor entre la cepa silvestre y la mutante de delección.

En el caso del gen MRP21, el cual ve afectada la presencia física de Snf5 en la cepa que posee la delección simple de Hmo1, también se observa que existe una diferencia entre la cepa silvestre y la doble delección (Figura 40C). En el caso de este gen también vemos la presencia de 2 nucleosomas completos (+1 y -1) y un fragmento en la parte distal del promotor (-2). En el caso de la cepa silvestre se observa que estos nucleosomas están posicionados de una forma que se correlaciona con la situación del gen activo, ya que este gen posee una región de asociación para el represor transcripcional Rpd3 (línea roja) (Kurdistani et al, 2002), en la misma región donde está posicionando el segundo nucleosoma (-1). En cambio, en la cepa mutante este nucleosoma está desplazado dejando descubierta esta región para el acceso de Rpd3, sugiriendo que en este caso este gen podría estar inactivo. Además, se observa la significativa reducción de presencia física de Snf5 en este promotor en la región analizada, cuando comparamos la cepa silvestre con la mutante de delección.

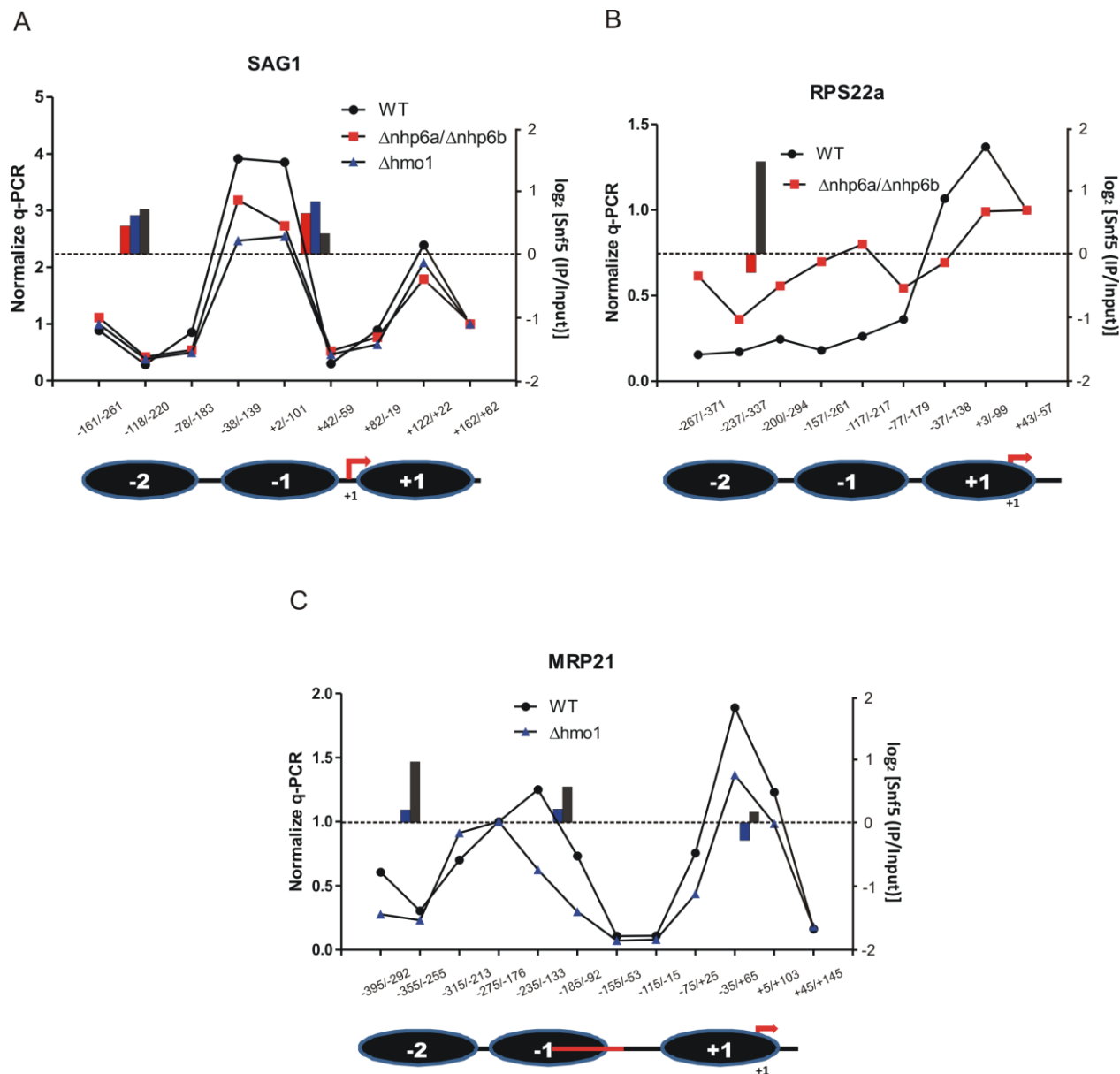


Figura 40: Análisis del perfil de posicionamiento nucleosomal y localización de Snf5 en los genes SAG1, RPS22a y MRP21. En cada gráfico se representan ambos análisis. Por un lado vemos en el eje (y) de la izquierda los valores normalizados respecto de uno de los puntos de las qPCR para determinar el posicionamiento nucleosomal; en el eje (y) de la derecha el enriquecimiento en $\log_2$ de Snf5 (IP/INPUT) para la determinación de la localización de Snf5, y en el eje (x) tenemos el posicionamiento de cada fragmento amplificado y el posicionamiento estándar (obtenidos de base de datos) de los nucleosomas de cada gen. A) Perfiles para el gen SAG1, en el que la presencia física de SWI/SNF no se afecta por las deleciones. B) Perfiles para el gen RPS22a, afectado por la doble deleción Nhp6A/Nhp6B. C) Perfiles para el gen MRP21 afectado por la deleción de Hmo1. En cada gráfico, la presencia física de Snf5 se señala por barras; las negras para la cepa WT, las rojas para la doble deleción de Nhp6A/Nhp6B y las azules para la deleción de Hmo1.

4.- DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis nos centramos en dilucidar la función que pueden tener algunas de las proteínas HMGB de levadura sobre la actividad de los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP, en especial del tipo SWI/SNF, analizando esta función tanto *in vitro* como *in vivo*. El desarrollo de los estudios *in vitro* implicó el clonar y purificar las proteínas HMGB a estudiar (a la forma de proteínas recombinantes), la purificación de complejos SWI/SNF de levadura, la obtención de probadores de ADN nucleosomal y el desarrollo de distintos análisis de remodelación nucleosomal que pudieran cubrir la variedad de efectos que los complejos remodeladores de cromatina generan sobre los nucleosomas. En el caso de los estudios *in vivo*, realizamos un análisis de presencia física del complejo SWI/SNF (subunidad Snf5) y de las tres proteínas HMGB de levadura, con cobertura de genoma completo de *S. cerevisiae* (ChIP-chip). Estos estudios incluyeron además el análisis de posicionamiento nucleosomal en regiones promotoras de 3 genes en función de la presencia o ausencia de las proteínas HMGB estudiadas.

4.1.- Estudio de la influencia de proteínas HMGB sobre la actividad remodeladora *in vitro*.

Para este análisis se debió establecer el sistema completo a utilizar en los ensayos *in vitro*. Luego se realizaron varios análisis de funcionalidad de estas proteínas HMGB y a continuación se generaron los diferentes estudios de estimulación de la actividad remodeladora del complejo SWI/SNF.

4.1.1.- Establecimiento del sistema de estudio *in vitro*.

Con respecto a la obtención de las proteínas recombinantes HMGB, ya sean del tipo silvestre o mutantes, todas éstas se lograron obtener con un alto grado de pureza (Figuras 7 & 23), presentando valores adecuados de concentración al cuantificarlas. Un caso particular lo presentó la variante humana HMGB1, la que se debió purificar incubando las bacterias a 16°C para evitar cualquier degradación. Cuando inicialmente se purificó esta proteína con la misma temperatura de incubación de las bacterias que en los otros casos (28°C), la proteína eluida presentaba bandas inespecíficas (posible degradación), lo que no ocurrió con las demás proteínas. Cabe mencionar además que cada proteína se eluyó óptimamente a 80 mM de Imidazol, y sólo se requirió concentrarlas levemente, para así lograr una concentración óptima para los ensayos posteriores.

Para el caso de la generación de probadores nucleosomales, se logró obtener todos los segmentos de ADN sin fragmentos contaminantes, de manera completamente reproducible. La presencia en estos segmentos de la secuencia posicionadora 601 aseguró altos porcentajes de reconstitución, siempre superior al 90%. En todos los casos, el ADN nucleosomal se reflejaba en una sola banda, indicativo de sólo una posición translacional del octámero de histonas y de la ausencia de asociación de otros componentes al nucleosoma reconstituido.

Una vez que se generaron los diferentes factores del sistema para este estudio, se analizó la funcionalidad de las proteínas recombinantes. Esto se realizó por medio de un ensayo de unión de las proteínas HMGB recombinantes, donde se observó que éstas se unían adecuadamente por la presencia de un patrón de retardo producto de la unión de estas proteínas tanto al ADN desnudo como al ADN conector de los mononucleosomas (ADN extranucleosomal). Esto se evidenció por un aumento en el retardo de la banda del probador

utilizado, ya que estas proteínas no poseen una secuencia nucleotídica específica de unión, por lo cual éstas se pueden unir a cualquier secuencia de ADN, generando la aparición de más bandas de retardo. Este aumento del número de bandas refleja la asociación sumativa de unidades monoméricas al ADN (Yen et al, 1998). Lo cual se explica porque estas proteínas se pueden unir a pequeñas extensiones del ADN, como lo que ocurre con la proteína Nhp6A para la cual se definió una extensión óptima de unión de 11 pb (Allain et al, 1999). Además se confirmó que este retardo no es generado por unión de estas proteínas al nucleosoma, porque al analizar la unión de estas proteínas a fragmentos de ADN reconstituidos que contenían sólo la secuencia posicionadora de nucleosomas 601 (147 pb) no se observó ningún tipo de unión de estas proteínas al ADN ensamblado como nucleosoma, en cambio al analizar estos mismos fragmentos sin reconstituir se observó unión significativa de las proteínas HMGB. Además se observó, que la unión de estas proteínas no discrimina el tipo de secuencia de ADN, ya que cuando utilizamos una estringencia mayor en nuestros ensayos, la unión de estas proteínas al probador de ADN marcado radioactivamente disminuye significativamente (Figura 12).

4.1.2.- Proteínas HMGB y su acción sobre la actividad remodeladora.

En relación a los ensayos de remodelación nucleosomal, se observó el patrón de remodelación esperado con los tres complejos remodeladores analizados (ISW1, RSC y SWI/SNF), consistente en desplazamiento en *cis* del octámero de histonas dentro de una hebra de ADN. En el caso de ISW1 se obtuvo una remodelación producto del cambio de posición del nucleosoma de la posición 5' lateral a una posición central. En el caso de RSC y SWI/SNF se obtuvo remodelación con desplazamiento en *cis* de posición 5' lateral a posiciones laterales más allá de los extremos del segmento de ADN, diversos estudios han mostrado que complejos

como SWI/SNF y RSC poseen la capacidad de desplazar el octámero más allá de los extremos del segmento de ADN en el que se encuentra (Workman and Kingston, 1998; Becker and Hörz, 2002; Gangaraju and Bartholomew, 2007) (Figura 16). Estos resultados confirmaron la integridad de los complejos purificados, al mostrar un buen grado de actividad por sí solos. En estos ensayos además se observó un aumento de la actividad de remodelación que presentan los complejos remodeladores del tipo SWI/SNF (RSC y SWI/SNF) producto de la presencia de las proteínas HMGB. Este aumento fue distinguible ya a una concentración de proteína HMGB de 10 ó 15 nM. Por otra parte se observó que la acción remodeladora de ISW1 fue sólo estimulada por las proteínas Hmo1 y HMGB1. Adicionalmente, esta estimulación fue detectable a concentraciones de HMGB más altas que las que ya mostraban un efecto en SWI/SNF y RSC. Estos resultados dan pie a estudios futuros que apunten a determinar qué características diferenciales hay entre las proteínas HMGB que estimulan ISW1 y las que no lo hacen.

En el caso de los ensayos de actividad de transferencia de histonas, en que se estudió el traspaso de octámeros de histonas desde oligonucleosomas cortos a un segmento de ADN de 147 pb, sólo Hmo1 mostró un cierto grado de estimulación de esta acción, tanto para SWI/SNF como para RSC. Las otras HMGB estudiadas incluso mostraron un bloqueo de la actividad de transferencia de histonas a altas concentraciones. Esta diferencia entre Hmo1 y las demás HMGB estudiadas podría radicar en un efecto diferencial que ejerce esta proteína sobre SWI/SNF y RSC. De hecho, como se discute más adelante, sólo Hmo1 estimula la unión de SWI/SNF al nucleosoma. También podría radicar en características propias del sistema de análisis *in vitro* utilizado: bajo la estringencia a la que se realizó el ensayo de actividad de transferencia de histonas (15 ng/μl SON, baja estringencia) todas las HMGB analizadas muestran un alto grado de unión al probador de ADN de 147 pb a alta concentración (100 nM),

salvo Hmo1. Este alto grado de unión al probador podría estar evitando que este segmento de ADN sea un aceptor eficiente de octámero de histonas en la reacción de transferencia. Por lo recién expuesto, no podemos descartar que las proteínas Nhp6A, Nhp6B y HMGB1 puedan efectivamente estimular la actividad de transferencia de histonas. Existe la posibilidad de que el efecto de Hmo1 se haya manifestado con estos ensayos al no estar completamente bloqueado el probador (ADN aceptor) por esta proteína y que en el caso de las otras HMGB el alto grado de unión al probador haya enmascarado la estimulación de este tipo de actividad remodeladora. Se requerirá de otros tipos de ensayos para poder aclarar el efecto de estas proteínas sobre esta actividad.

Al analizar el efecto de las proteínas HMGB sobre la actividad de desensamble del nucleosoma (eviction), observamos que ninguna de éstas estimula la actividad. Si se observó un bloqueo o una disminución de esta actividad en presencia de altas concentraciones de las proteínas HMGB. Junto a esto observamos un cambio de esta actividad, ya que a las concentraciones de proteína en que se aprecia un bloqueo del eviction se obtiene un aumento en el sliding del nucleosoma probador (Figura 18). Este bloqueo del eviction a alta concentración de las HMGB estudiadas (200 nM) podría estar relacionado a lo recién discutido en el caso del bloqueo de la actividad de transferencia de histonas. A alta estringencia y 200 nM de proteínas HMGB, hay un grado significativo de unión al probador, lo que podría estar impidiendo el acceso a ADN aceptor para la salida del octámero de histonas. Consistente con esta posibilidad, la proteína Hmo1 es la que presenta menor grado de unión al probador a 200 nM y alta estringencia, a la vez la de menor bloqueo de eviction. El no observar estimulación de eviction por parte de las HMGB estudiadas fue un resultado inesperado, ya que pensamos inicialmente que si estas proteínas eran capaces de afectar la actividad de desplazamiento en *cis* del octámero

de histonas, también podrían influir sobre aquella actividad. Mediante los ensayos en que analizamos el reclutamiento de SWI/SNF por parte de Gal4-VP16, bajo las mismas condiciones utilizadas en los ensayos de eviction, pudimos observar que a las concentraciones de HMGB que generan un bloqueo de eviction no hay reducción ni de la unión de Gal4-VP16 ni del reclutamiento de SWI/SNF (Figura 26). La presencia de ADN extranucleosomal por el lado opuesto al que contiene el sitio GAL4 tampoco evidenció una estimulación del eviction por parte de las HMGB estudiadas (Figura 19). Además al analizar si las proteínas HMGB afectaban la accesibilidad de ADN nucleosomal en las diferentes actividades estudiadas, para el desplazamiento en *cis* se observó que existía un aumento de la accesibilidad del ADN nucleosomal en presencia de las proteínas HMGB. En cambio para la actividad de remodelación reclutada de SWI/SNF por Gal4-VP16, por la metodología usada, no se pudo detectar una variación de accesibilidad en el ADN nucleosomal en presencia de las proteínas HMGB (Figura 20).

El efecto de estimulación de remodelación se puede deber a las características que poseen las proteínas HMGB, las cuales por medio de sus cajas HMG se pueden unir al ADN, generando una curvatura en el ADN que se encuentra cercano al que forma parte del nucleosoma, además en el extremo C-terminal posee una secuencia con una parte básica y otra ácida, la que puede interaccionar con el ADN y con el octámero de histonas, respectivamente, estabilizando cargas y cooperando con la actividad de los complejos remodeladores dependientes de ATP (Travers, 2003). Cabe destacar que la formación de la torsión del ADN por las cajas HMG, ya podría estar favoreciendo la acción de los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP.

4.1.3.- Caracterización del mecanismo de estimulación *in vitro* de las proteínas HMGB.

Para esto se realizaron ensayos con proteínas mutantes (quimeras y delección), las cuales se utilizaron para analizar las propiedades de unión de estas variantes, la influencia sobre la actividad de remodelación por desplazamiento *in cis* de SWI/SNF y la unión de este complejo al nucleosoma, con respecto al efecto ya encontrado con las proteínas HMGB silvestres. Al analizar la unión de las quimeras de Nhp6A y Nhp6B con la cola ácida/básica de Hmo1, vemos que la unión tanto al ADN como mononucleosoma de éstas con respecto a las proteínas silvestres, no se ve alterada (Figura 12 y 24). En cambio la proteína mutante Hmo1_Δca mostró una unión reducida al ADN y a los mononucleosomas comparado con Hmo1 silvestre (Figura 12 y 24). Mediante esto se destacó lo importante que es la cola ácida/básica para la proteína Hmo1, con respecto a la unión de ésta al ADN desnudo o conector (mononucleosomas). Siendo esta cola C-terminal necesaria para Hmo1 pero no suficiente para dotar a otras proteínas con esta característica, ya que no se ve un aumento de la unión al ADN en las quimeras, por lo cual suponemos que la influencia de esta cola C-terminal ocurre en un contexto estructural particular de Hmo1.

Al analizar la actividad de remodelación por desplazamiento *in cis* del octámero de histonas del complejo SWI/SNF, la mutante de Hmo1 que no posee el extremo C-terminal mostró un mínimo grado de estimulación de la actividad remodeladora de este complejo (Figura 25). Con lo cual se demostró que esta región en la proteína Hmo1 es importante para soportar la estimulación de esta actividad en los complejos remodeladores SWI/SNF.

Nuestros análisis muestran que, entre las proteínas HMGB estudiadas, sólo Hmo1 estimula la unión de SWI/SNF al nucleosoma. En este contexto, también se estudió si Hmo1 y las demás HMGB estimulan el reclutamiento al nucleosoma que media Gal4-VP16, sin

observarse efectos para ninguna de las HMGB. El no observar estimulación de reclutamiento puede deberse a la alta eficiencia que de por sí ya muestra Gal4-VP16 para reclutar al complejo SWI/SNF. De todas formas, Hmo1 mostró una característica diferencial respecto de las demás HMGB estudiadas en términos de la estimulación de asociación del complejo SWI/SNF al nucleosoma en ausencia de Gal4-VP16. Esta estimulación mostró ser dependiente de la presencia de la cola ácida/básica de Hmo1, lo que se correlaciona con la dependencia de esta región de Hmo1 para que esta proteína logre estimular la actividad remodeladora de SWI/SNF. Estos resultados confirman la importancia de la cola ácida/básica para la proteína Hmo1, la cual es esencial para su funcionamiento normal y que esta región por sí sola al ser insertada en otra proteína no es capaz de generar el mismo efecto, demostrando que necesita el contexto estructural de la proteína Hmo1 silvestre.

Para profundizar en los mecanismos por los cuales estas proteínas podrían influir sobre la remodelación, se realizaron ensayos de hidrólisis de ATP, con el objeto de determinar si estas proteínas, tanto silvestres como mutantes, afectan la actividad de remodelación alterando ésta propiedad que genera la subunidad catalítica del complejo SWI/SNF. En estos ensayos observamos que ninguna de las proteínas HMGB silvestres modificaron el grado de hidrólisis de ATP que produce normalmente el complejo (Figura 28), demostrando que el aumento de actividad no pasa por un aumento de ésta, sino que por un efecto que se estaría generando directamente sobre la conformación de los nucleosomas. Se evaluó además el efecto que podrían tener estas proteínas en un contexto cromatínico más cercano al de la conformación del ADN nuclear, lo cual se iba a realizar utilizando un arreglo nucleosomal con 6 repeticiones de secuencias posicionadoras. Sin embargo, se presentaron problemas con el proceso de digestión. Esto producto de que entre el extremo 5' marcado de este arreglo nucleosomal y la primera

secuencia posicionadora de nucleosoma existen 32 pb, en las que la MNasa puede digerir el ADN sin problema, provocando la pérdida de la marca radiactiva de nuestro probador (arreglo nucleosomal). En consideración a que nuestro trabajo incluía el desarrollo de análisis *in vivo* que ofrecen estudios en un contexto cromatínico celular, decidimos pasar a esta etapa, ya que engloban los resultados que los estudios con arreglos nucleosomales pueden entregar.

4.2.- Influencia de las proteínas HMGB de levadura sobre la acción de SWI/SNF *in vivo*.

En los estudios *in vivo* analizamos el comportamiento que tienen las proteínas HMGB de levadura (Nhp6A, Nhp6B y Hmo1) sobre el posicionamiento en genoma completo de levadura del complejo SWI/SNF, específicamente una de las subunidades (Snf5) de éste, lo que se realizó por ChIP acoplado a un microarreglo (ChIP-chip). También evaluamos cómo estas proteínas pueden influir sobre la ubicación de los nucleosomas en la región promotora por análisis de digestión con MNasa para algunos genes específicos que son modulados por SWI/SNF y las HMGB de levadura.

4.2.1.- Análisis del posicionamiento de SWI/SNF y las HMGB en genoma de levadura.

En un primer análisis a escala de genoma completo se obtuvo que los perfiles de enriquecimiento de Snf5 entre la cepa silvestre y las mutantes mostraron una leve disminución en la región promotora y 3'. Luego de todos los análisis realizados en el genoma completo de levadura nos enfocamos en la región promotora y el TSS. Dentro de esta región se observó que 2536 genes del genoma completo de la cepa silvestre poseen una presencia significativa de Snf5 (≥ 0.5). En paralelo, este mismo análisis hecho con una mayor restricción arrojó 1017 genes con $\text{Snf5} \geq 1$, reduciéndose a más de la mitad los genes enriquecidos. Entre los genes con $\text{Snf5} \geq 0.5$

ó 1 observamos que las diferentes proteínas HMGB están presentes en un alto porcentaje de estos, demostrando que podrían tener un vínculo funcional. En el contexto de estos genes, se seleccionaron aquellos que tuvieran una reducción ≥ 1 entre el enriquecimiento de la cepa silvestre y las diferentes cepas mutantes (deleciones) (WT – mut), observándose que el número de genes en que se ve afectado el enriquecimiento de Snf5 al deletar alguna de las HMGB está entre un 15 y 20 %. Al igual que el análisis de presencia física de Snf5, se confirmó que estos genes poseen un enriquecimiento elevado en la región promotora de las diferentes proteínas HMGB (TAP-HMGB).

4.2.2.- Análisis de los genes regulados por SWI/SNF y con presencia física de Snf5.

Tomando la información de lo realizado en el estudio de presencia física de SWI/SNF y de las proteínas HMGB, con esta agrupación de genes y considerando sólo los datos obtenidos con la doble deleción de Nhp6A/Nhp6B y la deleción simple de Hmo1, se realizó una cruza de nuestros datos con los datos de expresión de genes mediado por SWI/SNF publicados por el grupo de Winston (Sudarsanam et al, 2000), donde se describió los genes que son influenciados por el complejo SWI/SNF. Dentro de estos genes existen unos que son regulados negativamente y otros positivamente por este complejo, los que suman aproximadamente el 10 % de los genes totales de levadura. Con la combinación de todos estos datos seleccionamos sólo los genes en que se encuentra en su región promotora el complejo remodelador SWI/SNF y que esta presencia está afectada por las proteínas HMGB y además son genes en que su expresión es regulada por SWI/SNF. De esta forma se obtuvo que aproximadamente el 2% de los genes corresponden a los regulados negativamente y aproximadamente el 1.5% a los genes que son regulados positivamente por SWI/SNF, considerando el genoma completo de levadura.

Luego, con los genes seleccionados se analizó si las proteínas HMGB tenían presencia física en la región promotora de estos con un alto nivel de enriquecimiento. Con respecto a esto último, el número de genes que poseen esta característica son acotados, demostrando que, si bien las proteínas HMGB son abundantes en el núcleo y poseen múltiples funciones a nivel de la regulación transcripcional, la función que pueden poseer estas proteínas sobre los complejos remodeladores es mucho más específica. Es así como a partir de los genes que poseen altos niveles de SWI/SNF, que son afectados transcripcionalmente por el complejo y que ven reducida la presencia de Snf5 en las mutantes de delección, se seleccionaron los candidatos para estudiar el efecto de las diferentes mutantes sobre la remodelación de cromatina. Los genes elegidos están entre los que son regulados positivamente por SWI/SNF; uno en que el enriquecimiento de Snf5 no se ve afectado por ninguna de las dos cepas mutantes (SAG1), otro que es afectado sólo por la doble delección de Nhp6A/Nhp6B (RPS22a), y otro afectado sólo por la delección simple de Hmo1 (MRP21).

4.2.3.- Análisis del posicionamiento nucleosomal afectado por SWI/SNF y las proteínas HMGB.

Al analizar el posicionamiento nucleosomal de los genes seleccionados, observamos que para el gen SAG1 no existe variación en el posicionamiento de los nucleosomas en ausencia de las HMGB estudiadas. La ausencia del nucleosoma -2 en la posición definida por otros estudios puede ser reflejo de estar en presencia del gen activo bajo nuestras condiciones de cultivo. Además, cabe recordar que el enriquecimiento de Snf5 no varía en la región promotora de este gen entre las diferentes cepas analizadas (Figura 40A).

En el análisis de los otros dos genes obtuvimos diferentes tipos de variación en el posicionamiento nucleosomal de las regiones promotoras de estos. En el caso del gen RPS22a se observó en la cepa silvestre una apertura completa de la región promotora, lo que nos indica que es un gen transcripcionalmente activo. Esta exposición del ADN se podría generar por desensamble de los nucleosomas, ya que no se visualiza un desplazamiento en *cis* de estos. En cambio al analizar la cepa mutante de doble delección de las proteínas Nhp6A/Nhp6B, este promotor muestra un reposicionamiento de los nucleosomas -1 y -2 en la región promotora, lo que interpretamos como una posible inactivación del gen. También se confirmó la disminución del enriquecimiento de Snf5 en esta región del promotor de RPS22a (Figura 40B). Al realizar el análisis con el gen MRP21, se observó que se podría estar generando otro tipo de variación en el posicionamiento nucleosomal; en el caso de la cepa silvestre vemos que el nucleosoma -1 está cercano al nucleosoma +1, dejando inaccesible un sitio de unión para un represor transcripcional (Rpd3), un tipo de histona deacetilasa (Deckert and Struhl, 2002; Kurdistan et al, 2002). Cuando se analizó la cepa mutante con la delección de Hmo1, el nucleosoma -1 se detectó posicionado hacia el nucleosoma -2 dejando libre el sitio de unión para el represor transcripcional (Rpd3). Este resultado sugiere fuertemente que en presencia del complejo SWI/SNF se podría estar generando la actividad de desplazamiento en *cis* sobre el nucleosoma -1 en el promotor de este gen. Además se confirmó la disminución del enriquecimiento de Snf5 en la región promotora analizada de este gen (Figura 40C).

Los resultados de nuestros estudios *in vivo* demuestran que las proteínas HMGB estudiadas pueden afectar la presencia física del complejo SWI/SNF en un subgrupo de los genes regulados por este complejo y sugieren que este rol es importante para la remodelación de cromatina en los promotores de estos genes. No descartamos que entre los genes en los que no

se ve afectada la presencia física de SWI/SNF, por la ausencia de estas HMGB, existan genes que de todas formas se vean afectados en la remodelación de cromatina. Esta última afirmación la hacemos a la luz del significativo efecto que las proteínas HMGB estudiadas tienen sobre la actividad ATP dependiente de SWI/SNF, demostrado con diversos análisis *in vitro* llevados a cabo en esta tesis.

Para finalizar, cabe desatacar que en un trabajo que realizó el grupo de Gaudreau (Lemieux et al, 2008) se describió que los complejos remodeladores SWI/SNF no podían ser reclutados por las proteínas Nhp6A/B al promotor Gal1-10 en *S. cerevisiae*, en condiciones de crecimiento mediado por la inducción de la expresión de genes Gal (medio mínimo más Galactosa). En nuestro estudio, el cual se realizó en otras condiciones de crecimiento y expresión de proteínas para *S. cerevisiae* (medio completo), este promotor tiene completa ausencia de Nhp6A/B y de complejo SWI/SNF por lo que no existe la posibilidad efectiva de contrastar resultados en relación a Gal1-10. De todas formas, nuestro estudio está demostrando una función que aún no está descrita para estas proteínas y, aún más importante, demuestra que algo como lo descrito por Lemieux y colaboradores no necesariamente es algo que ocurre de forma generalizada.

5.- CONCLUSIONES

En su conjunto, los resultados de los análisis *in vitro* de este trabajo de tesis apuntan a las siguientes conclusiones:

- Las proteínas HMGB estudiadas en esta tesis, generan estimulación sobre la actividad de *sliding*.
- Sólo la proteína Hmo1 es capaz de estimular la actividad de transferencia de histonas.
- En los ensayos de desensamble nucleosomal en presencia de las proteínas HMGB, no se observó estimulación de la actividad de *eviction*, pero sí una estimulación del *sliding*.
- Hmo1 es capaz de aumentar la unión directa de SWI/SNF a su probador.
- Al deleccionar la cola C-terminal de Hmo1, ésta pierde la capacidad de estimulación del *sliding* y de generar el aumento de la unión directa del complejo SWI/SNF al probador.
- Las proteínas HMGB analizadas no alteran la hidrólisis del ATP generada por SWI/SNF, por lo que creemos que estas proteínas generarían una modificación estructural en el ADN nucleosomal.

En los estudios *in vivo* se definieron las siguientes conclusiones:

- Las proteínas HMGB de levadura pueden influir sobre la presencia o permanencia del complejo SWI/SNF (Snf5) en la región promotora de diversos genes.
- Estas proteínas de levadura en conjunto con SWI/SNF, pueden influir sobre el posicionamiento nucleosomal en la región promotora de algunos genes.
- Las proteínas HMGB de levadura analizadas generan un efecto de modificación de la actividad de remodelación en un contexto cromatínico mayor, ya sea por desplazamiento en *cis* (*sliding*) o por desensamble del nucleosoma (*eviction*).

En resumen el conjunto de nuestros resultados tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* entregan nuevas luces respecto del rol que las proteínas HMGB juegan en la regulación de la expresión génica.

6.- MODELOS

A partir de todos los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, proponemos dos posibles modelos para la función de las proteínas HMGB sobre la remodelación nucleosomal *in vitro* (Figura 41) e *in vivo* (Figura 42).

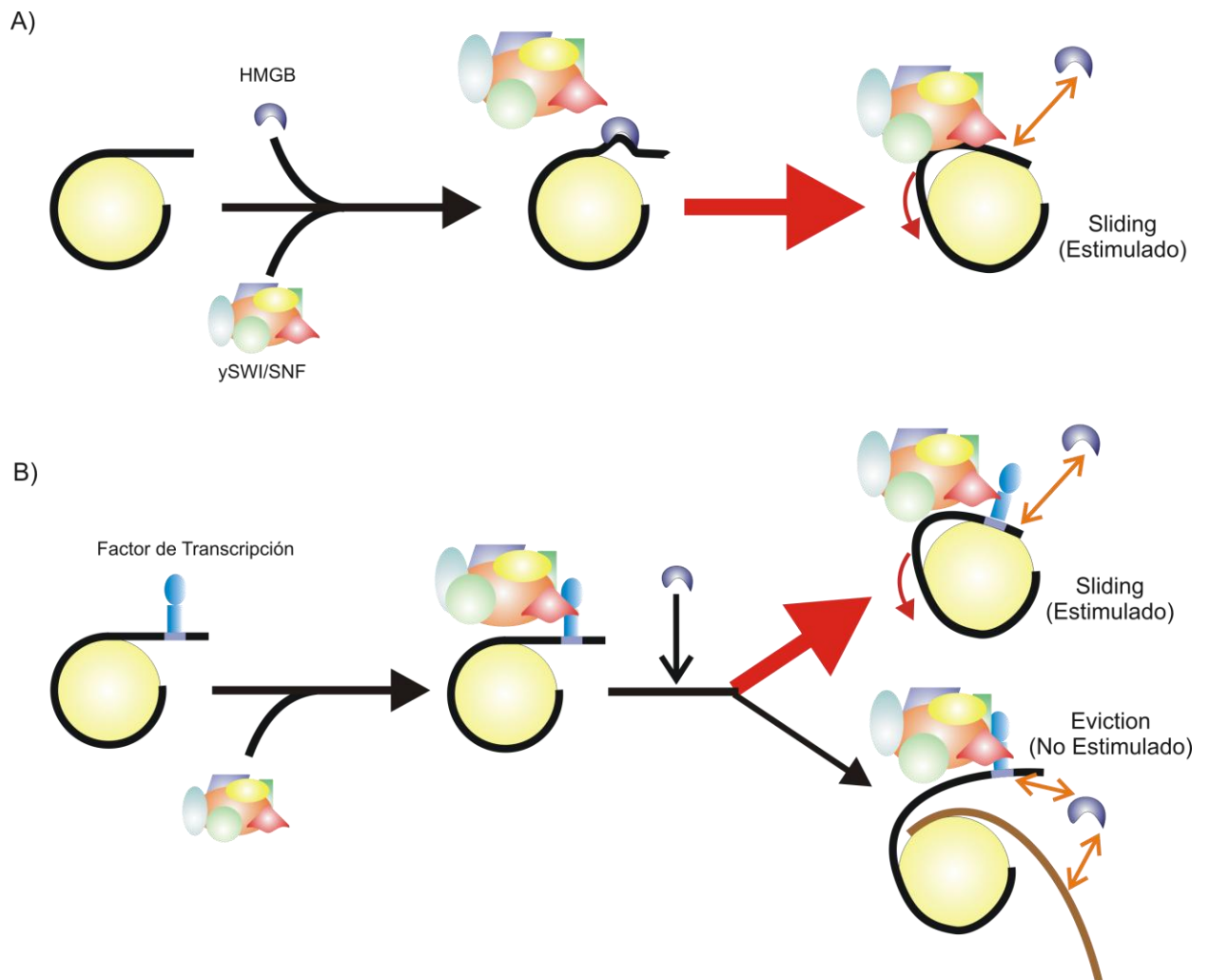


Figura 41: Modelo del efecto de las proteínas HMGB sobre la remodelación nucleosomal *in vitro*. A) Modelo propuesto de cómo las proteínas HMGB de levadura podrían generar la estimulación de la actividad remodeladora por desplazamiento nucleosomal en *cis* (*sliding*), de los complejos remodeladores de la familia SWI/SNF a baja estringencia. El efecto de las proteínas HMGB podría derivar de una acción exclusiva sobre el ADN (de torsión) o también de ejercer influencia directa sobre el complejo remodelador en el caso de la proteína Hmo1. B) Modelo que explicaría cómo las HMGB podrían modular la actividad de desensamble del octámero de histonas o desplazamiento nucleosomal en *trans* (*eviction*) a alta estringencia. Después del reclutamiento del complejo remodelador por el FT, se genera un efecto de remodelación conjunta, generando el *eviction*. En presencia de las HMGB se observa una modulación de esta actividad por una inhibición o bloqueo del *eviction* y una estimulación del *sliding* por las proteínas HMGB. En ambas Figuras, en amarillo se representa el octámero de histonas, la línea negra corresponde al ADN nucleosomal, la línea café al ADN aceptor en el *eviction*, la flecha roja grande significa estimulación, la flecha negra pequeña indica el posible bloqueo, la flecha roja pequeña indica el desplazamiento del loop generado por el complejo remodelador y las flechas naranjas indican los posibles destinos de unión de las proteínas HMGB.

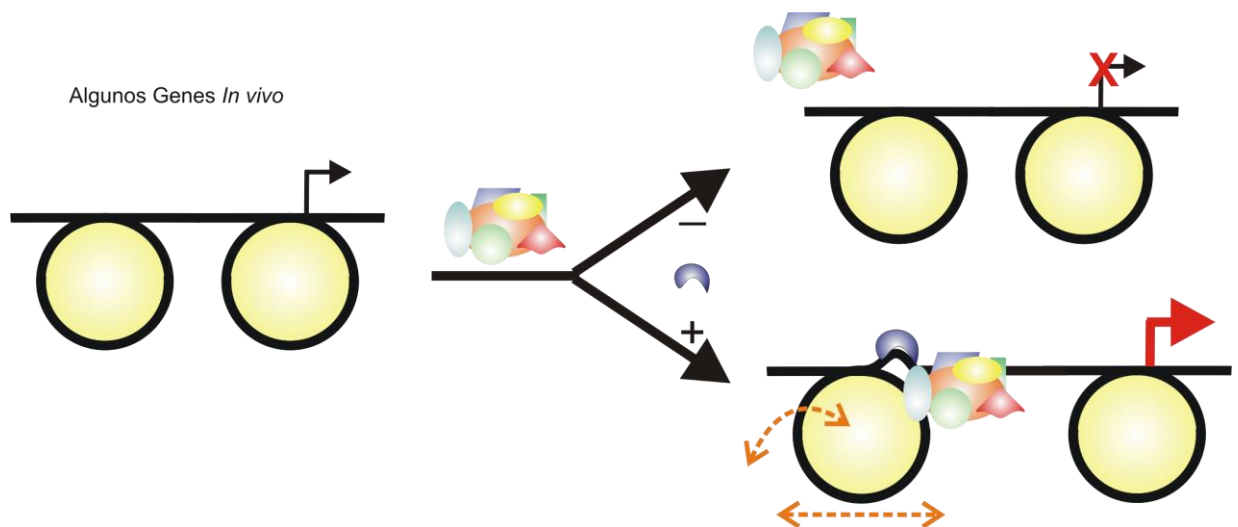


Figura 42: Modelo del efecto de las proteínas HMGB sobre la remodelación de cromatina *in vivo*. Modelo propuesto de cómo las proteínas HMGB de levadura podrían generar un efecto positivo sobre la permanencia o el enriquecimiento del complejo SWI/SNF en la región promotora de algunos genes. Sobre esto último se confirma que estas proteínas sí generan un efecto de modificación de la actividad de remodelación en un contexto cromatínico mayor, ya sea por desplazamiento *in cis* o por desensamble de octámero, lo que observamos en los genes MRP21 y RPS22a, respectivamente. En la Figura, en amarillo se representa el octámero de histonas, la línea negra corresponde al ADN cromatínico, el signo positivo significa presencia de las HMGB, el negativo ausencia de las HMGB, la flecha negra con una X indica reducción de la transcripción, la flecha roja indica actividad transcripcional y las flechas naranjas indican el movimiento de los nucleosomas, ya sea el *sliding* o el *eviction* del octámero, en los genes analizados.

7.- ANEXOS

1.- Cepas de levadura utilizadas.

Ensayo	Nombre Cepas	Tipo	Genotipo	Origen
ChIP/MNasa	BY4741*	S288c (Silvestre)	MATa his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 1	Open Biosystem
	YPR052c	Nhp6a Δ	MATa nhp6a Δ ::KANMX6	Open Biosystem
	YDR174w	Hmo1 Δ	MATa hmo1 Δ ::KANMX6	Open Biosystem
	DY6863	Nhp6a Δ / Nhp6b Δ	MATa nhp6a::URA3 nhp6b::HIS3	Stillman Lab
	YPR052c	Nhp6a	nhp6a-TAP	Open Biosystem
	YBR089c-a	Nhp6b	nhp6b-TAP	Open Biosystem
	YDR174w	Hmo1	hmo1-TAP	Open Biosystem
Purificación	YPP187	SWI/SNF	swi2HA/Snf6-TAP	Workman Lab
	YLR357w	RSC	rsc2-TAP	Open Biosystem
	YLR095c	ISW1b	ioc2-TAP	Open Biosystem
	YJH117	SWI/SNF	Snf2-Flag::LEU	Workman Lab

2.- Cepas de bacterias utilizadas.

Ensayo	Nombre Cepas
Clonamiento	DH5 α
Expresión de proteína	BL21-DE3 codon plus RIL

3.- Vectores utilizados.

Vector	Uso
pQE-81L	Clonamiento HMGB
pBluescript-HMGB1h	Obtención por PCR de cDNA HMGB1
pGEM-3Z	Clonamiento arreglo nucleosomal
pGEM-3Z/601	Obtención secuencia 601
pGEM-3Z/601-22-Gal4	Obtención por PCR de probadores de ADN

4.- Vectores generados.

Vector	Uso
pQE-81L NHP6A	Expresión y purificación proteína
pQE-81L NHP6B	Expresión y purificación proteína
pQE-81L HMO1	Expresión y purificación proteína

4.- Vectores generados (cont.).

pQE-81L NHP6A_o1	Expresión y purificación proteína
pQE-81L NHP6B_o1	Expresión y purificación proteína
pQE-81L HMO1_Δc-terminal	Expresión y purificación proteína
pQE-81L HMGB1	Expresión y purificación proteína
pGEM-3Z/601x6_Gal4_Cen	Obtención por ER del arreglo nucleosomal
pGEM-3Z/601x6_Gal4_Izq	Obtención por ER del arreglo nucleosomal
pGEM-3Z/601x6_S_Gal4	Obtención por ER del arreglo nucleosomal

5.- Programas utilizados.

Programa	Uso
ClustalW	Alineamiento de secuencias
Vector NTI	Mapas y secuencia de vectores
R	Análisis estadístico de datos de ChIP-chip
Tinn R	Ayuda del programa R
Access	Filtrado de valores y datos
Prisma	Generación gráficos
Quantity One	Escaneo y análisis Phosphor Imager
Un.Scan-IT	Cuantificación de muestras desde imágenes de geles
PhotoShop	Tratamiento de imágenes
Corel	Generación de figuras

6.- Oligonucleótidos clonamiento HMGBs recombinantes.

Nhp6a	5' - 3'
Sph I sense	CATAGTAAAGCACGCATGCAATGGTCACCC
Kpn I antisense	CGCGGGGAGGAAGGTACCCTAAGCCAAAGT
Quimera_6a	
Age I antisense	CGCGGGGAGGAAGACCGGTTTCAGCCAAAGT
Nhp6b	
Sph I sense	ACATATATAAAACGCATGCTATGGCCGCAA
Kpn I antisense	GAACATTGAGTTGGTACCTCAAGCACGTGT
Quimera_6b	
Age I antisense	GAACATTGAGTTGACCGGTTTCAGCACGTGT
Hmo1	
Sph I sense	CACAACAAGCCTGGCATGCCATGACTACAG
Pst I antisense	CAAAGCAAGCCCCTGCAGCTATATTTTATTC

6.- Oligonucleótidos clonamiento HMGBs recombinantes (cont.).

Hmo1_D	
Pst I antisense	GTCTCTTTTCCACCTGCAGTTAAGCGGCGTG
caHmo1	
Age I sense	GCACGCCGCTGAACCGGTCGTGGAAAAGAG
Pst I antisense	CAAAGCAAGCCCCTGCAGCTATATTTTATTC
HMGB1	
Sph I sense	GCTGAGGAAAAGCATGCAAACATGGGCA
Kpn I antisense	AAACTGCGCTGGTACCAACTTATTCATC

7.- Oligonucleótidos confección arreglonucleosomal.

I	5' - 3'
S_EcoRI/AgeI/NspI	AATTCGCAAGTTCGTCCACCGGTAATACATG
A_EcoRI/AgeI/NspI	TATTACCGGTGGACGAACCTTGCG
S_NotI/SacI	GGCCGCGTATAGGGTCCAGTTCAGGAGCT
A_NotI/SacI	CCTGAACTGGACCCTATACGC
II	
S_SacI/NspI	CGCAAGTTCGTTCGTGTTCAATACATG
A_SacI/NspI	TATTGAACAGCGACGAACCTTGCGAGCT
S_NotI/NheI/AvaI	GGCCGCGCTAGCGTTCAGTTCAGC
A_NotI/NheI/AvaI	CCGGGCTGAACTGGAACGCTAGCGC
III Array 601x6_Gal4	
S_NheI/XmaI/XhoI	CTAGCGTTCAGTTCAGCCCCGGGGCAAGTTCGTCCCTCGAGAATACATG
A_NheI/XmaI/XhoI	TATTCTCGAGGGACGAACCTTGCCCCGGGCTGAACTGGAACG
S_SphI/Gal4/BglII	GGCCGCGGCATGCGTCCAGCGGAGGACAGTCCCTCCGTCTGCCA
A_SphI/Gal4/BglII	GATCTGGACGACGGAGGACTGTCTCCGCTGGACGCATGCCGC
IV	
S_AvaI/BglII/NspI	CCGGGGCAAGTTCGTCCAGATCTAATACATG
A_AvaI/BglII/NspI	TATTAGATCTGGACGAACCTTGCC
S_NotI/KpnI/BamHI	GGCCGCGGTACCGTTCAGTTCAGG
A_NotI/KpnI/BamHI	GATCCCTGAACTGGAACGGTACCGC
V	
S_BamHI/NdeI/NspI	GATCCGCAAGTTCGTCCCATATGAATACATG
A_BamHI/NdeI/NspI	TATTCATATGGGACGAACCTTGCG
S_NotI/PstI	GGCCGCGTATAGGGTCCAGTTCAGCTGCA
A_NotI/PstI	GCTGAACTGGACCCTATACGC
VI	
S_PstI/NspI	GGCAAGTTCGTTCGTGTTCAATACATG

7.- Oligonucleótidos confección arreglonucleosomal (cont.).

A_PstI/NspI	TATTGAACAGCGACGAACCTGCCTGCA
S_NotI/XbaI/Hind	GGCCGCGTCTAGAGTCCAGTTCAGA
A_NotI/XbaI/Hind	AGCTTCTGAACTGGACTCTAGACGC
Array 601x6_Gal4_Izq	
S_XhoI/Gal4_Izq	GGCAAGGTCGCTCGAGAATACATGCA
A_XhoI/Gal4_Izq	CTATAGAATAAGATCTCTTGCATGCC
Array 601x6	
S_SphI/S-Gal4/BglII	CGTCCAGTTCAGCCCGGGCAAGTTCGTCCA
A_SphI/S-Gal4/BglII	GATCTGGACGAACCTGCCCGGGCTGAAGTGGACGCATG

8.- Oligonucleótidos utilizados en análisis de mononucleosomas.

5'-216; 147	5' - 3'
5p_601Lat_pGEM	CCAAGGCCCAGGCCGATAAG
216	
3p_601_Gal4	AGGCTCAAGCAGACAAGAAGAG
147	
3p_601_147	TCGCGTTTTGGTGCGTCGGATG
236	
5p_601cent_pGEM	GACTGGCACCAGCAAGGTCG
3p_601_Gal4_10	TGCAGGTCCGCGGAGGACTG
Sitio unión Gal4	
Sentido	CTCTAGACGGAGGACAGTCCTCCGGTTACC
Antisentido	GGTAACCGGAGGACTGTCCTCCGTCTAGAG

9.- Oligonucleótidos control cepas levadura ChIP o ensayo MNasa.

Nhp6a	5' - 3'
6a_for ORF	CCAAGGCCCAGGCCGATAAG
6a_rev 3UTR	TCCTAATGCATGGCCGGCTG
Nhp6b	
6b_for ORF	AGGCTCAAGCAGACAAGAAGAG
6b_rev 3UTR	TCGCGTTTTGGTGCGTCGGATG
Hmo1	
o1_for ORF	AGAGACCTCACGATGATGATGG
o1_rev 3UTR	ACACTATGGGCAAAGCAAGCCCA
TAP	
F2CHK rev	AACCCGGGGATCCGTCGACC

10.- Oligonucleótidos ChIP.

YLR438W	5' - 3'
for UAS	AATAAATACCCCACTGGCGG
rev UAS	TTGTCCGTGCGCACATTTGC
YCL064C	
for UAS	GGTCCCATTCTTTACTGCACTG
rev UAS	GAATCATGTCTCCGCGCAGAG

11.- Oligonucleótidos posicionamiento nucleosomal.

SAG1_gene	5' - 3'
SAG1_1f	TGCAATACTAAAATCAAAAGTGG
SAG1_1r	TATCAACGATATCACATTTTCCAA
SAG1_2f	GGTTGTTTATTTGCAGTCAGTGGAG
SAG1_2r	TTCTGTGGCTTTTTTTCCTTGGC
SAG1_3f	AAAATGTGATATCGTTGATATTTATAG
SAG1_3r	CAATTCGCCAGTTTTCAA
SAG1_4f	CAAGGAAAAAGCCACAGAATAATTTTG
SAG1_4r	TCAGTCGCCTCGCTTAATATAGTC
SAG1_5f	ATTTTGAAAAGTGGCGAATTGTTG
SAG1_5r	CTATTTATTCTAGTAATCGTCCATTCTC
SAG1_6f	TATATTAAGCGAGGCGACTGATATAAGG
SAG1_6r	GATTCCTTTTAGCATACTATAAATATGCG
SAG1_7f	TGGACGATTACTAGAATAAATAGAG
SAG1_7r	CGAAATGCAATCTTCTAAAAA
SAG1_8f	TATAGTATGCTAAAAGGAATCTTTTTTTG
SAG1_8r	CCCAAAAACGTTACAATGGAATTGTTTG
SAG1_9f	TTTTTTAGAAGATTGCATTTTCGTTACA
SAG1_9r	CTTTATGTCACTTCATTCTTCAGTAA
RPS22A_gene	5' - 3'
RPS22A_1f	TGTTAATGGCATTCAAAGCATC
RPS22A_1r	TGGCCTTTTCAGTTCTAGTATTTTT
RPS22A_2f	GGTCATCTTGGATATGTATGTTGGT
RPS22A_2r	TCTTAATCGACTATTCAATTCTTAAA
RPS22A_3f	ATACTAGAAGTAAAGGCCATTAAAAA
RPS22A_3r	GAATATGGGTTTGCAGTTAGTCAA
RPS22A_4f	AGAATTGAATAGTCGATTAAGATTATT
RPS22A_4r	CAGCGGCATGTTTACTCG
RPS22A_5f	ACTAACTGCAAACCCATATTCAAG

11.- Oligonucleótidos posicionamiento nucleosomal (cont.).

RPS22A_5r	CTATTTGAAAACTCAAATATTGAGGAC
RPS22A_6f	CCAGCGAGTAAACATGCCGCTG
RPS22A_6r	CACATACTTAAAAGTGTGTAATTCCTCTAT
RPS22A_7f	TTGAGTTTTTCAAATAGTGAGGTGTGG
RPS22A_7r	AAAAAGTTAAATTGGTACTGTGCGCCC
RPS22A_8f	GAATTACACACTTTTAAGTATGTGATGTATGG
RPS22A_8r	GCCCATAGTTTTTTGAAAATCAAGC
RPS22A_9f	GGGCGCACAGTACCAATTTAAC
RPS22A_9r	CGTGGTGGTGGTAGTTTGAGCCG
MRP21_gene	5' - 3'
MRP21_-2f	ACTTTCATCTGGAAACAGTA
MRP21_-2r	GACGAGTCAGACCCAGTAGA
MRP21_-1f	GCTTTTCTTCTTCTTCTTTTCTTG
MRP21_-1r	GAATGAAGGCGTTGAACAGC
MRP21_0f	CTTCTACTGGGTCTGACTCGTC
MRP21_0r	AGAAAATTCCCCTGCTTCTGAT
MRP21_1f	GCTGTTCAACGCCTTCATTC
MRP21_1r	AAGCTCTACCGTATTGAAAAATGAC
MRP21_2f	ATCAGAAGCAGGGGAATTTTCT
MRP21_2r	CAAGAAGCTAATAAGTGGGCTTTT
MRP21_3f	TTTCAATACGGTAGAGCTTCTACAG
MRP21_3r	CTTGGGAAAGAAGCGAACTTAAAAAAG
MRP21_4f	AAGCCCACTTATTAGCTTCTTGC
MRP21_4r	CCTTTAATGACCTGGTCTCACTTA
MRP21_5f	TTTAAGTTCGCTTCTTTCCCAAG
MRP21_5r	ATGGGTGATATTTGACAGATTTT
MRP21_6f	AGTGAGACCAGGTCATTAAAGGTC
MRP21_6r	AAAGCCTCAGCGTGCTCTT
MRP21_7f	ATCTGTCAAATATCACCCATAAGAGC
MRP21_7r	CAGTCGATCGTTGTGAAACC
MRP21_8f	GAAGAGCACGCTGAGGCTTTC
MRP21_8r	CAAAATTCGGATATCGATAAAATCATAC
MRP21_9f	GGTTTCACAACGATCGACTGTTTAC
MRP21_9r	CACGATCGCTGTTGCTTC

REFERENCIAS

- Agresti A, Bianchi ME (2003) HMGB proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 13(2): 170-178
- Allain FH, Yen YM, Masse JE, Schultze P, Dieckmann T, Johnson RC, Feigon J (1999) Solution structure of the HMG protein NHP6A and its interaction with DNA reveals the structural determinants for non-sequence-specific binding. *EMBO J* 18(9): 2563-79
- Becker PB, Horz W (2002) ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu Rev Biochem* 71: 247-273
- Belmont AS, Bruce K (1994) Visualization of G1 chromosomes: a folded, twisted, supercoiled chromonema model of interphase chromatid structure. *J Cell Biol* 127(2): 287-302
- Bianchi ME, Beltrame M (2000) Upwardly mobile proteins. Workshop: the role of HMG proteins in chromatin structure, gene expression and neoplasia. *EMBO Rep* 1(2): 109-114
- Birger Y, Ito Y, West KL, Landsman D, Bustin M (2001) HMGN4, a newly discovered nucleosome-binding protein encoded by an intronless gene. *DNA Cell Biol* 20(5): 257-264
- Biswas D, Imbalzano A, Eriksson P, Yu Y, Stillman D (2004) Role for Nhp6, Gcn5, and the Swi/Snf complex in stimulating formation of the TATA-binding protein-TFIIA-DNA complex. *Molecular and Cellular Biology* 24(18): 8312-8321
- Blum H, Beier H, Gross H (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8(2): 93-99
- Bonaldi T, Langst G, Strohner R, Becker PB, Bianchi ME (2002) The DNA chaperone HMGB1 facilitates ACF/CHRAC-dependent nucleosome sliding. *EMBO J* 21(24): 6865-6873
- Boyer LA, Latek RR, Peterson CL (2004) The SANT domain: a unique histone-tail-binding module? *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(2): 158-163
- Bustin M (2001) Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins. *Trends Biochem Sci* 26(3): 152-153
- Bustin M, Reeves R (1996) High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 54: 35-100
- Cairns BR (2007) Chromatin remodeling: insights and intrigue from single-molecule studies. *Nat Struct Mol Biol* 14(11): 989-996
- Cairns BR, Lorch Y, Li Y, Zhang M, Lacomis L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Du J, Laurent B, Kornberg RD (1996) RSC, an essential, abundant chromatin-remodeling complex. *Cell* 87(7): 1249-1260
- Cairns RB, Cairns BD, Xie H, Leung MC, Hearne S (1998) Paths across generations: academic competence and aggressive behaviors in young mothers and their children. *Dev Psychol* 34(6): 1162-1174

- Calogero S, Grassi F, Aguzzi A, Voigtlander T, Ferrier P, Ferrari S, Bianchi ME (1999) The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice. *Nat Genet* 22(3): 276-280
- Cappellaro C, Baldermann C, Rachel R, Tanner W (1994) Mating type-specific cell-cell recognition of *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall attachment and active sites of a- and alpha-agglutinin. *EMBO J* 13(20): 4737-44
- Clapier CR, Cairns BR (2009) The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Biochem* 78: 273-304
- Corona DF, Tamkun JW (2004) Multiple roles for ISWI in transcription, chromosome organization and DNA replication. *Biochim Biophys Acta* 1677(1-3): 113-119
- Costigan C, Kolodrubetz D, Snyder M (1994) NHP6A and NHP6B, which encode HMG1-like proteins, are candidates for downstream components of the yeast SLT2 mitogen-activated protein kinase pathway. *Molecular and Cellular Biology* 14(4): 2391-2403
- Cote J, Quinn J, Workman JL, Peterson CL (1994) Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science* 265(5168): 53-60
- Chasman D, Leatherwood J, Carey M, Ptashne M, Kornberg R (1989) Activation of yeast polymerase II transcription by herpesvirus VP16 and GAL4 derivatives in vitro. *Molecular and Cellular Biology* 9(11): 4746-4749
- Daban JR (2000) Physical constraints in the condensation of eukaryotic chromosomes. Local concentration of DNA versus linear packing ratio in higher order chromatin structures. *Biochemistry* 39(14): 3861-3866
- Dechassa ML, Zhang B, Horowitz-Scherer R, Persinger J, Woodcock CL, Peterson CL, Bartholomew B (2008) Architecture of the SWI/SNF-nucleosome complex. *Molecular and Cellular Biology* 28(19): 6010-6021
- Deckert J and Struhl K (2002) Targeted Recruitment of Rpd3 Histone Deacetylase Represses Transcription by Inhibiting Recruitment of Swi/Snf, SAGA, and TATA Binding Protein. *Molecular and Cellular Biology* 22 (18): 6458-70
- Doi S, Tanabe K, Watanabe M, Yamaguchi M, Yoshimura M (1989) An alpha-specific gene, SAG1 is required for sexual agglutination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 15(6): 393-8
- Elfring LK, Deuring R, McCallum CM, Peterson CL, Tamkun JW (1994) Identification and characterization of *Drosophila* relatives of the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Mol Cell Biol* 14(4): 2225-2234
- Ezhkova E, Tansey WP (2006) Chromatin immunoprecipitation to study protein-DNA interactions in budding yeast. *Methods Mol Biol* 313: 225-244
- Felsenfeld G, Groudine M (2003) Controlling the double helix. *Nature* 421(6921): 448-453

- Gangaraju VK, Bartholomew B (2007) Mechanisms of ATP dependent chromatin remodeling. *Mutat Res* 618(1-2): 3-17
- Goodwin GH, Johns EW (1973) Isolation and characterisation of two calf-thymus chromatin non-histone proteins with high contents of acidic and basic amino acids. *Eur J Biochem* 40(1): 215-219
- Goodwin GH, Sanders C, Johns EW (1973) A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. *Eur J Biochem* 38(1): 14-19
- Green-Willms NS, Fox TD, Costanzo MC (1998) Functional interactions between yeast mitochondrial ribosomes and mRNA 5' untranslated leaders. *Mol Cell Biol* 18(4): 1826-34
- Gutierrez JL, Chandy M, Carrozza MJ, Workman JL (2007) Activation domains drive nucleosome eviction by SWI/SNF. *EMBO J* 26(3): 730-740
- Horn PJ, Peterson CL (2002) Molecular biology. Chromatin higher order folding--wrapping up transcription. *Science* 297(5588): 1824-1827
- Imbalzano AN, Kwon H, Green MR, Kingston RE (1994) Facilitated binding of TATA-binding protein to nucleosomal DNA. *Nature* 370(6489): 481-485
- Ito T, Bulger M, Pazin MJ, Kobayashi R, Kadonaga JT (1997) ACF, an ISWI-containing and ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor. *Cell* 90(1): 145-155
- Kaplan N, Moore IK, Fondufe-Mittendorf Y, Gossett AJ, Tillo D, Field Y, LeProust EM, Hughes TR, Lieb JD, Widom J, Segal E (2009) The DNA-encoded nucleosome organization of a eukaryotic genome. *Nature* 458(7236): 362-6
- Kasahara K, Ohtsuki K, Ki S, Aoyama K, Takahashi H, Kobayashi T, Shirahige K, Kokubo T (2007) Assembly of regulatory factors on rRNA and ribosomal protein genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 27(19): 6686
- Khorasanizadeh S (2004) The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell* 116(2): 259-272
- Kolodrubetz D, Haggren W, Burgum A (1988) Amino-terminal sequence of a *Saccharomyces cerevisiae* nuclear protein, NHP6, shows significant identity to bovine HMG1. *FEBS Lett* 238(1): 175-179
- Kornberg RD, Lorch Y (1999) Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 98(3): 285-294
- Kurdistani SK, Robyr D, Tavazoie S, Grunstein M (2002) Genome-wide binding map of the histone deacetylase Rpd3 in yeast. *Nature Genetics* 31: 248-254
- Lam F, Steger D, O'Shea E (2008) Chromatin decouples promoter threshold from dynamic range. *Nature* 453(7192): 246-250

- Lange SS, Mitchell DL, Vasquez KM (2008) High mobility group protein B1 enhances DNA repair and chromatin modification after DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(30): 10320-10325
- Langst G, Becker PB (2004) Nucleosome remodeling: one mechanism, many phenomena? *Biochim Biophys Acta* 1677(1-3): 58-63
- Lecompte O, Ripp R, Thierry JC, Moras D, Poch O (2002) Comparative analysis of ribosomal proteins in complete genomes: an example of reductive evolution at the domain scale. *Nucleic Acids Res* 30(24): 5382-90
- Lehming N, Le Saux A, Schuller J, Ptashne M (1998) Chromatin components as part of a putative transcriptional repressing complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(13): 7322-7326
- Lemieux K, Larochelle M, Gaudreau L (2008) Variant histone H2A.Z, but not the HMG proteins Nhp6a/b, is essential for the recruitment of Swi/Snf, Mediator, and SAGA to the yeast GAL1 UASG. *Biochem Biophys Res Commun* 369(4): 1103-7
- Li B, Carey M, Workman JL (2007) The role of chromatin during transcription. *Cell* 128(4): 707-719
- Li B, Gogol M, Carey M, Pattenden SG, Seidel C, Workman JL (2007) Infrequently transcribed long genes depend on the Set2/Rpd3S pathway for accurate transcription. *Genes Dev* 21(11): 1422-30
- Lorch Y, Zhang M, Kornberg RD (1999) Histone octamer transfer by a chromatin-remodeling complex. *Cell* 96(3): 389-392
- Lowary P, Widom J (1998) New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning. *Journal of molecular biology* 276(1): 19-42
- Lu J, Kobayashi R, Brill S (1996) Characterization of a high mobility group 1/2 homolog in yeast. *Journal of Biological Chemistry* 271(52): 33678
- Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389(6648): 251-260
- Lusser A, Kadonaga JT (2004) Strategies for the reconstitution of chromatin. *Nat Methods* 1(1): 19-26
- Misteli T, Gunjan A, Hock R, Bustin M, Brown DT (2000) Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells. *Nature* 408(6814): 877-881
- Mohrmann L, Verrijzer CP (2005) Composition and functional specificity of SWI2/SNF2 class chromatin remodeling complexes. *Biochim Biophys Acta* 1681(2-3): 59-73
- Morales V, Giamarchi C, Chailleux C, Moro F, Marsaud V, Le Ricousse S, Richard-Foy H (2001) Chromatin structure and dynamics: functional implications. *Biochimie* 83(11-12): 1029-1039
- Moreira J, Holmberg S (2000) Chromatin-mediated transcriptional regulation by the yeast architectural factors NHP6A and NHP6B. *The EMBO Journal* 19(24): 6804

- Moritz M, Paulovich AG, Tsay YF, Woolford JL Jr (1990) Depletion of yeast ribosomal proteins L16 or rp59 disrupts ribosome assembly. *J Cell Biol* 111(6 Pt 1): 2261-74
- Muller S, Scaffidi P, Degryse B, Bonaldi T, Ronfani L, Agresti A, Beltrame M, Bianchi ME (2001) New EMBO members' review: the double life of HMGB1 chromatin protein: architectural factor and extracellular signal. *EMBO J* 20(16): 4337-4340
- Nemeth A, Langst G (2004) Chromatin higher order structure: opening up chromatin for transcription. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2(4): 334-343
- Owen-Hughes T, Utleý RT, Steger DJ, West JM, John S, Côté J, Havas KM, Workman JL (1999) Analysis of nucleosome disruption by ATP-driven chromatin remodeling complexes. *Methods Mol Biol* 119: 319-331.
- Pattenden SG, Gogol MM, Workman JL (2010) Features of cryptic promoters and their varied reliance on bromodomain-containing factors. *PLoS One* 5(9): e12927
- Ramakrishnan V (1997) Histone structure and the organization of the nucleosome. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 26: 83-112
- Reeves R, Nissen MS (1990) The A.T-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. A novel peptide motif for recognizing DNA structure. *J Biol Chem* 265(15): 8573-8582
- Reinke H, Hörz W (2003) Histones are first hyperacetylated and then lose contact with the activated PHO5 promoter. *Molecular Cell* 11(6): 1599-1607
- Richmond TJ, Davey CA (2003) The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature* 423(6936): 145-150
- Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, Séraphin B (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature biotechnology* 17(10): 1030-1032
- Saha A, Wittmeyer J, Cairns BR (2006) Mechanisms for nucleosome movement by ATP-dependent chromatin remodeling complexes. *Results Probl Cell Differ* 41: 127-148
- Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME (2002) Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418(6894): 191-195
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68(5): 850-858
- Simpson R (1978) Structure of the chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones. *Biochemistry* 17(25): 5524-5531
- Smolle M, Venkatesh S, Gogol MM, Li H, Zhang Y, Florens L, Washburn MP, Workman JL (2012) Chromatin remodelers Isw1 and Chd1 maintain chromatin structure during transcription by preventing histone exchange. *Nat Struct Mol Biol* 19(9): 884-92

- Steger D, Workman J (1997) Stable co-occupancy of transcription factors and histones at the HIV-1 enhancer. *The EMBO Journal* 16(9): 2463-2472
- Stros M, Launholt D, Grasser KD (2007) The HMG-box: a versatile protein domain occurring in a wide variety of DNA-binding proteins. *Cell Mol Life Sci* 64(19-20): 2590-2606
- Sudarsanam P, Iyer V, Brown P, Winston F (2000) Whole-genome expression analysis of Snf/swi mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(7): 3364
- Tansey WP (2002) Ultimate Yeast ChIP Assay. *Tansey Lab Protocols*: 9
- Travers AA (2003) Priming the nucleosome: a role for HMGB proteins? *EMBO Rep* 4(2): 131-136
- Tsukiyama T, Palmer J, Landel CC, Shiloach J, Wu C (1999) Characterization of the imitation switch subfamily of ATP-dependent chromatin-remodeling factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 13(6): 686-697
- Tsukiyama T, Wu C (1995) Purification and properties of an ATP-dependent nucleosome remodeling factor. *Cell* 83(6): 1011-1020
- Ugrinova I, Pashev I, Pasheva E (2009) Nucleosome Binding Properties and Co-Remodeling Activities of Native and in Vivo Acetylated HMGB-1 and HMGB-2 Proteins. *Biochemistry* 48: 6502–6507
- Utlely R, Ikeda K, Grant P, Côté J, Steger D, Eberharter A, John S, Workman J (1998) Transcriptional activators direct histone acetyltransferase complexes to nucleosomes. *Nature* 394(6692): 498-502
- Utlely RT, Owen-Hughes TA, Juan LJ, Cote J, Adams CC, Workman JL (1996) In vitro analysis of transcription factor binding to nucleosomes and nucleosome disruption/displacement. *Methods Enzymol* 274: 276-291
- van Bakel H, van Werven FJ, Radonjic M, Brok MO, van Leenen D, Holstege FC, Timmers HT (2008) Improved genome-wide localization by ChIP-chip using double-round T7 RNA polymerase-based amplification. *Nucleic Acids Res* 36: e21
- Varga-Weisz PD, Wilm M, Bonte E, Dumas K, Mann M, Becker PB (1997) Chromatin-remodelling factor CHRAC contains the ATPases ISWI and topoisomerase II. *Nature* 388(6642): 598-602
- Vary JC, Jr., Gangaraju VK, Qin J, Landel CC, Kooperberg C, Bartholomew B, Tsukiyama T (2003) Yeast Isw1p forms two separable complexes in vivo. *Mol Cell Biol* 23(1): 80-91
- Venkatesh S, Smolle M, Li H, Gogol MM, Saint M, Kumar S, Natarajan K, Workman JL (2012) Set2 methylation of histone H3 lysine36 suppresses histone exchange on transcribed genes. *Nature* 489(7416): 452-5
- Venters BJ, Wachi S, Mavrich TN, Andersen BE, Jena P, Sinnamon AJ, Jain P, Roller NS, Jiang C, Hemeryck-Walsh C, Pugh BF (2011) A comprehensive genomic binding map of gene and chromatin regulatory proteins in *Saccharomyces*. *Mol Cell* 41(4): 480-92

- Wang GG, Allis CD, Chi P (2007) Chromatin remodeling and cancer, Part II: ATP-dependent chromatin remodeling. *Trends Mol Med* 13(9): 373-380
- Weir HM, Kraulis PJ, Hill CS, Raine AR, Laue ED, Thomas JO (1993) Structure of the HMG box motif in the B-domain of HMG1. *EMBO J* 12(4): 1311-1319
- Wen L, Huang J, Johnson B, Gerald R (1989) A human placental cDNA clone that encodes nonhistone chromosomal protein HMG-1. *Nucleic acids research* 17(3): 1197
- Whitehouse I, Flaus A, Cairns BR, White MF, Workman JL, Owen-Hughes T (1999) Nucleosome mobilization catalysed by the yeast SWI/SNF complex. *Nature* 400(6746): 784-787
- Wolffe A (1998) *Chromatin: structure and function*: Academic Press London.
- Woodcock CL, Dimitrov S (2001) Higher-order structure of chromatin and chromosomes. *Curr Opin Genet Dev* 11(2): 130-135
- Yen YM, Wong B, Johnson RC (1998) Determinants of DNA binding and bending by the *Saccharomyces cerevisiae* high mobility group protein NHP6A that are important for its biological activities. Role of the unique N terminus and putative intercalating methionine. *J Biol Chem* 273(8): 4424-35.
- Yu Y, Eriksson P, Stillman D (2000) Architectural transcription factors and the SAGA complex function in parallel pathways to activate transcription. *Molecular and Cellular Biology* 20(7): 2350-2357
- Zhang Q, Wang Y (2008) High mobility group proteins and their post-translational modifications. *Biochim Biophys Acta* 1784(9): 1159-1166
- Zhou YB, Gerchman SE, Ramakrishnan V, Travers A, Muyldermans S (1998) Position and orientation of the globular domain of linker histone H5 on the nucleosome. *Nature* 395(6700): 402-405
- Zofall M, Persinger J, Kassabov SR, Bartholomew B (2006) Chromatin remodeling by ISW2 and SWI/SNF requires DNA translocation inside the nucleosome. *Nat Struct Mol Biol* 13(4): 339-346