



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

**INFLUENCIA DE SECUENCIAS DE ADN EN PROCESOS
ACTIVOS QUE DETERMINAN EL POSICIONAMIENTO
NUCLEOSOMAL**

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

POR: ROBERTO ANTONIO AMIGO BASTÍAS
Profesor Guía: José Leonardo Gutiérrez Contreras
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Marzo 2023
Concepción – Chile

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

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

Profesor tutor:

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

Comisión Evaluadora:

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

Dra. Violeta Morín M.
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dra. María Estela Andrés
Facultad de Ciencias Biológicas
Pontificia Universidad Católica de Chile

Director de Programa:

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

AGRADECIMIENTOS

A la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID), por Beca Nacional para estudios de Doctorado, Año Académico 2017, Folio 21170786.

Al proyecto ANID, FONDECYT/Regular 1180911 a cargo del Dr. José Leonardo Gutiérrez Contreras, que permitió el desarrollo de este trabajo de tesis.

A los docentes y administrativos de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, por su buen trato y disposición.

A todos los miembros y ex miembros del Laboratorio de Regulación Transcripcional, a cargo del Dr. José Leonardo Gutiérrez Contreras, por su ayuda y buena compañía durante la realización de este trabajo de tesis.

A mi familia y amigos, por apoyarme y acompañarme durante este largo proceso.

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	iii
TABLA DE CONTENIDOS.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	xi
GLOSARIO.....	xvi
RESUMEN.....	xxi
ABSTRACT	xxiii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Estructura de la cromatina	1
1.2 Remodelación de cromatina dependiente de ATP.....	5
1.3 Posicionamiento nucleosomal y arquitectura de promotores.....	11
1.4 Propiedades intrínsecas en el ADN que definen el posicionamiento nucleosomal.....	17
1.5 Factores extrínsecos que determinan el posicionamiento nucleosomal <i>in vivo</i>	20
1.6 Participación activa de secuencias de ADN en el posicionamiento nucleosomas.....	25

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	30
2.1 Hipótesis:	30
2.2 Objetivo general:	30
2.3 Objetivos específicos:.....	30
3. MATERIALES Y MÉTODOS	32
3.1 Transformación de bacterias competentes.....	32
3.2 Expresión y purificación de proteínas recombinantes (Gal4-DBD y Gal4-VP16).....	32
3.3 Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)	34
3.3.1 Tinción con azul de Coomassie y análisis densitométricos	35
3.3.2 Western blot	35
3.3.3 Tinción con plata	36
3.4 Purificación de complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP	37
3.4.1 Obtención del cultivo	37
3.4.2 Purificación por afinidad en tándem (TAP)	39
3.4.3 Concentración de complejos purificados	42
3.5 Obtención de plásmidos	42
3.6 Precipitación de ADN	44

3.7 Obtención de sondas marcadas con [γ-^{32}P]	44
3.7.1 Obtención de vectores a usar en PCR de marcaje	44
3.7.2 Marcaje con ^{32}P de partidores a usar en PCR radioactiva	51
3.7.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) radioactiva	52
3.7.4 Purificación de fragmentos de PCR por gel de poliacrilamida no denaturante	53
3.7.5 Determinación de la concentración de los productos de PCR marcados con ^{32}P	54
3.7.6 Reconstitución nucleosomal.....	55
3.8 Electroforesis en geles de poliacrilamida no denaturante	58
3.9 Ensayos con sondas radioactivas	59
3.9.1 Ensayos de unión de factores	59
3.9.2 Ensayos de unión de complejos remodeladores	60
3.9.3 Ensayo de remodelación	61
3.9.4 Ensayos de remodelación en presencia de factores de transcripción	63
3.10 Análisis bioinformático a nivel de genoma completo	65
4. RESULTADOS	67

4.1 Determinar el efecto <i>in vitro</i> de los trectos poli (dA:dT) sobre la actividad remodeladora de nucleosomas de complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP	67
4.1.1 Purificación de complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP: ISW1a, RSC y ySWI/SNF.....	67
4.1.2 Generación de sondas mononucleosomales.....	73
4.1.3 Efecto de trectos poli (dA:dT) sobre la actividad remodeladora de ISW1a.....	73
4.1.4 Efecto de trectos poli (dA:dT) sobre la actividad remodeladora de RSC....	76
4.1.5 Efecto de trectos poli (dA:dT) sobre la actividad remodeladora de ySWI/SNF.....	79
4.1.6 Efecto del tamaño de los trectos poli (dA:dT) sobre la actividad remodeladora de ISW1a y RSC	82
4.1.7 Análisis recíproco de la orientación de los trectos poli (dA:dT) respecto al nucleosoma, para el efecto observado sobre ISW1a y RSC	89
4.1.8 Efecto de la distancia entre los trectos poli (dA:dT) y el nucleosoma, sobre la actividad remodeladora de ISW1a y RSC	95
4.1.9 Efecto de los trectos poli (dA:dT) al estar presentes en la dirección contraria al movimiento del nucleosoma llevado a cabo por ISW1a	100

4.1.10 Determinación de la influencia de los tractos poli (dA:dT) sobre la actividad de RSC en un modelo de mononucleosomas centrales.....	103
4.1.11 Efecto de los tractos poli (dA:dT) sobre la unión de los complejos ISW1a y RSC	124
4.1.12 Efecto de los tractos poli (dA:dT) sobre la actividad de <i>eviction</i> de RSC.....	129
4.1.13 Influencia de los tractos poli (dA:dT) en una posición interna del ADN nucleosomal, sobre la actividad de ISW1a y RSC	130
4.1.14 Determinación de la influencia de los tractos poli (dA:dT) sobre ySWI/SNF en un modelo de mononucleosomas centrales.....	135
4.1.15 Influencia de una secuencia posicionadora en la actividad remodeladora de ISW1a y RSC	137
4.2 Determinar el efecto conjunto de los tractos poli (dA:dT) y un factor de transcripción sobre la actividad de complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP	140
4.2.1 Purificación de factores a usar en estos análisis: Gal4-DBD y Gal4-Vp16.....	140
4.2.2 Efecto de Gal4-DBD y tractos poli (dA:dT) sobre la actividad remodeladora de ISW1a.....	143

4.2.3 Efecto conjunto de Gal4-VP16 y tractos poli (dA:dT) sobre la actividad remodeladora de RSC.....	145
4.2.4 Efecto conjunto de Gal4-VP16 y tractos poli (dA:dT) sobre la actividad remodeladora de ySWI/SNF.....	148
4.3 Determinar el efecto a nivel de genoma completo de los tractos poli (dA:dT) sobre ISW1a	150
5. DISCUSIÓN	153
5.1 ISW1a.....	154
5.2 RSC	169
5.3 ySWI/SNF.....	183
6. CONCLUSIONES	186
7. REFERENCIAS	189

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Cepas de levadura utilizadas	38
Tabla 2: Plásmidos, partidores y sondas	45

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1: Niveles de compactación de la cromatina.....	2
Figura 2: Organización del nucleosoma.....	4
Figura 3: Organización y mecanismo de translocación de complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP.....	7
Figura 4: Diferentes resultados de la acción de remodelación.....	10
Figura 5: Paisaje nucleosomal.....	13
Figura 6: Arquitectura de promotores.....	15
Figura 7: Ilustración de secuencias que influyen en el posicionamiento nucleosomal.....	18
Figura 8: Modelo propuesto de la formación del “paisaje nucleosomal” in vivo en la región cercana al promotor.....	23
Figura 9: Modelo del rol antagónico entre ISW1a y RSC.....	25
Figura 10: Ejemplo de la estrategia para generación de sondas.....	45
Figura 11: Esquema de los pasos de para la reconstitución nucleosomal.....	57
Figura 12: Purificación de ISW1a.....	69
Figura 13: Purificación de RSC.....	71
Figura 14: Purificación de γSWI/SNF.....	72
Figura 15: Los tractos poli (dA:dT) frenan la actividad de sliding de ISW1a.....	75

Figura 16: Los tractos poli (dA:dT) estimulan la actividad de sliding de RSC.	78
Figura 17: Los tractos poli (dA:dT) estimulan la actividad de sliding de ySWI/SNF.	81
Figura 18: El efecto observado sobre ISW1a depende del tamaño de los tractos poli (dA:dT).	84
Figura 19: El efecto observado sobre RSC depende del tamaño de los tractos poli (dA:dT).	86
Figura 20: Análisis del efecto de tractos poli (dA:dT) de 7 pb sobre la actividad de ISW1a y RSC.	89
Figura 21: El máximo efecto de freno sobre ISW1a depende de cómo el tracto se oriente respecto al nucleosoma.	91
Figura 22: El máximo efecto de estimulación sobre RSC depende de cómo el tracto se oriente respecto al nucleosoma.	94
Figura 23: El efecto observado sobre ISW1a depende de la distancia entre los tractos poli (dA:dT) y el nucleosoma.	97
Figura 24: El efecto observado sobre RSC se mantiene al aumentar la distancia entre los tractos poli (dA:dT) y el nucleosoma.	99
Figura 25: Los tractos poli (dA:dT) no bloquean, e incluso estimulan, la actividad de sliding de ISW1a cuando se encuentran en el sentido contrario al movimiento del nucleosoma.	102

Figura 26: Los tractos poli (dA:dT) estimulan la actividad de sliding de RSC en un modelo de mononucleosoma central.....	105
Figura 27: Los tractos poli (dA:dT) direccionan la remodelación de RSC.	110
Figura 28: Mapeo del movimiento del nucleosoma en sondas Nuc-70 mediado por RSC.....	112
Figura 29: Los tractos poli (dA:dT) estimulan la actividad de sliding de RSC incluso al estar en dirección al movimiento del octamero de histonas.	115
Figura 30: Una mayor presencia de tractos poli (dA:dT) se traduce en una mayor estimulación en la actividad de RSC.....	118
Figura 31: La remodelación de sliding de RSC puede ser bloqueada por una de las dos posibles orientaciones de los tractos poli (dA:dT) dentro del ADN nucleosomal.	121
Figura 32: Efecto de tractos poli (dA:dT) sobre la unión de RSC y ISW1a al nucleosoma.....	126
Figura 33: Los tractos poli (dA:dT) incrementan la unión de RSC al ADN.	128
Figura 34: Los tractos poli (dA:dT), en una orientación, estimulan la actividad de eviction de RSC.....	130
Figura 35: Los tractos poli (dA:dT) en posición SHL5 afectan la actividad remodeladora de ISW1a y RSC.....	134

Figura 36: Los tractos poli (dA:dT) estimulan la actividad de sliding de ySWI/SNF en un modelo de mononucleosoma central.	136
Figura 37: La secuencia posicionadora 59(TA) no tiene efecto en la actividad remodeladora de ISW1a y RSC.	139
Figura 38: Purificación de Gal4-DBD y Gal4-VP16.....	141
Figura 39: Unión de Gal4-DBD y Gal4-VP16 a sondas mononucleosomales con tractos poli (dA:dT).....	142
Figura 40: La presencia de Gal4-DBD bloquea la actividad remodeladora de ISW1a en mayor grado que los tractos poli (dA:dT).....	145
Figura 41: La presencia de Gal4-VP16 estimula la actividad de sliding de RSC al igual que los tractos poli (dA:dT).....	147
Figura 42: La presencia de los tractos poli (dA:dT) no afecta la actividad de evicción de ySWI/SNF gatillada por Gal4-VP16.	149
Figura 43: A nivel de genoma completo los tractos poli (dA:dT) están menos presentes en aquellos promotores donde ISW1a actúa cubriendo los NDRs.....	152
Figura 44: Regulación y acción de ISW1a.	159
Figura 45: Análisis de genoma completo para observar el efecto de una secuencia poli T sobre diferentes complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP.	160
Figura 46: Modelo propuesto para la acción de ISW1a in vivo.....	168
Figura 47: Estructura de RSC unido al nucleosoma.....	172

Figura 48: Modelo hasta ahora concebido para el posicionamiento de RSC en el NDR para alejar los nucleosomas +1 y -1.....	173
Figura 49: Modelo propuesto para la acción de RSC in vivo.....	182

GLOSARIO

[γ -32P]-ATP: ATP marcado con fósforo 32, en el grupo fosfato gamma

μ Ci: Microcurie

μ g: Microgramo

μ L: Microlitro

μ M: Micromolar

6xHis: 6 veces histidina

Abf1: *ARS-Binding Factor 1*

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ATP: Adenosín trifosfato

ATPgammaS: Adenosine 5'-O-(3-thiotriphosphate)

BSA: Albúmina de Suero Bovino

CaCl₂: Cloruro de calcio

Cbf1: *Centromere Binding Factor 1*

Chd1: *Chromodomain Helicase DNA-binding 1*

DBD: DNA-Binding Domain

DIM: *DNA-Interaction Module*

dNTP: Desoxirribonucleótidos trifosfato

DTT: Ditioneitol

E. coli: *Escherichia coli*

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EGTA: Ácido egtázico

EN: Extracto nuclear

fmol: Femtomol

FT: Factor de transcripción

Gal4: *GALactose metabolism 4*

gr: Gramos

GRF: *General Regulatory Factor*

HCl: Ácido clorhídrico

HeLa: Células derivadas de carcinoma cervical humano

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

HRP: Peroxidasa de Rábano Picante

HSS: *HAND-SANT-SLIDE*

IgG: Inmunoglobulina G

loc3: Iswi One Complex 3

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

ISW1a: Imitation SWitch protein 1a

ISWI: *Imitation SWitch*

KCl: Cloruro de potasio

KDa: Kilo Daltons

KH₂PO₄: Fosfato de potasio monobásico

L: Litros

LB: Medio Luria Bertani

LON: Oligonucleosomas largos

M: Molar

mg: Miligramos

MgCl₂: Cloruro de magnesio

min: Minutos

mL: Mililitro

mm: Milímetros

mM: Milimolar

mmol: Milimol

MW: Peso molecular

N: Normal

Na₂HPO₄: Fosfato disódico

NaCl: Cloruro de sodio

NaH₂PO₄: Bifosfato de sodio

NaOH: Hidróxido de sodio

Nap1: *Nucleosome Assembly Protein 1*

ng: Nanogramo

nm: Nanometro

NP-40: Nonidet P-40

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

°C: Grado Celsius

pb: Par de bases

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en Cadena de Polimerasa

pmol: Picomol

PMSF: Fenilmetilsulfonilfluoruro

PSA: Persulfato de Amonio

PVDF: Fluoruro de polivinilideno

Rap1: *Repressor/Activator site binding Protein 1*

Reb1: *RNA polymerase I Enhancer Binding protein 1*

rpm: Revoluciones por minuto

RSC: *Remodels the Structure of Chromatin*

SDS: Dodecilsulfato sódico

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

SON: Oligonucleosomas cortos

ssDNA: ADN de esperma de salmón

SWI/SNF: *Switching Defective/Sucrose Nonfermenting*

TBE: Tampón Tris, borato, EDTA

TE: Tris-Cl 10mM, EDTA 1mM

TEMED: Tetrametiletilendiamina

TPCK: N-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona

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

U: Unidades

V: Volts

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

xg: *Times gravity*

YPD: *Yeast extract Peptone Dextrose*

RESUMEN

La posición de los nucleosomas tiene un gran impacto en procesos celulares que involucran interacción proteína-ADN, como es el caso de la replicación, reparación y transcripción. En *Saccharomyces cerevisiae* los promotores de genes se encuentran enriquecidos en secuencias homopoliméricas de ADN denominados trectos poli (dA:dT), las cuales se relacionan con la presencia de regiones libres de nucleosomas (NDRs). En otros organismos, como ratón y humano, la presencia de trectos poli (dA:dT) es menor y su distribución es más amplia; sin embargo, mantienen su capacidad de excluir nucleosomas, lo que podría significar que existen mecanismos comunes que se han conservado durante la evolución.

¿Cómo se forman y mantienen los NDRs? Estudios a nivel de genoma completo han determinado que los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP juegan un papel clave en este fenómeno, donde existen complejos denominados “despejadores”, que abren y forman los NDRs, y complejos denominados “cubridores”, que cierran los NDRs. Además, otros estudios han encontrado una relación entre la acción de los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP y la presencia de los trectos poli (dA:dT), donde la acción de factores de transcripción también estaría implicada. Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos moleculares de la

comunicación que existe entre los diferentes elementos que se encuentran en los NDRs.

Por este motivo, en el presente trabajo buscamos determinar la influencia de los tractos poli (dA:dT) sobre la actividad remodeladora de nucleosomas de los complejos ISW1a, RSC y γ SWI/SNF, los cuales cumplen diferentes roles en la mantención de los NDRs. Además, estudiamos cómo factores de transcripción pueden influir en la dinámica entre estas secuencias y los complejos estudiados. Para llevar a cabo nuestro estudio, usamos sondas mononucleosomales reconstituidas *in vitro* que poseían diferentes configuraciones de los tractos poli (dA:dT), con las que se ejecutaron ensayos de remodelación analizando la acción de los complejos purificados.

En nuestros resultados hallamos que estas secuencias pueden afectar de manera directa varios aspectos de la acción de estos complejos, como: la unión al nucleosoma, la intensidad de la actividad de remodelación y la dirección en que ejecutan ésta. Además, observamos que la orientación de los tractos poli (dA:dT) afecta diferencialmente a los complejos remodeladores de cromatina estudiados. Por otro lado, encontramos que los factores de transcripción podrían ejercer efectos diferenciales sobre ISW1a y RSC. Estos resultados realzan la importancia y el impacto que tienen los tractos poli (dA:dT) en el posicionamiento nucleosomal y ayudan a dilucidar los mecanismos mediante los cuales estas secuencias ejercen sus efectos.

ABSTRACT

Nucleosome positioning is crucial for cellular processes involving protein-DNA interactions, as in the case of replication, repair, and transcription. Gene promoters in *Saccharomyces cerevisiae* are highly enriched in homopolymeric DNA sequences called poly (dA:dT) tracts. These sequences are correlated with the presence of nucleosome-depleted regions (NDRs). In organisms like human and mouse, poly (dA:dT) tracts are less abundant and their distribution is wider. However, their ability to exclude nucleosomes is still present, which could mean that common molecular mechanisms have been conserved during evolution.

How are NDRs around poly (dA:dT) tracts formed and maintained? Genome wide analyses have found that ATP-dependent chromatin-remodeling complexes are key in these processes. There are complexes called “pushers” which can open and maintain NDRs, and “pullers” which can close NDRs. In addition, these studies have shown a correlation between the action of remodeling complexes and the presence of poly (dA:dT) tracts, where the action of transcription factors can be also involved. Nevertheless, the molecular mechanisms of by which these different elements act are still unknown.

In this context, our goal was to determine the influence of poly (dA:dT) tracts on the remodeling activity of ISW1a, RSC and γ SWI/SNF complexes. We chose these complexes because they play different roles at NDRs. In addition, transcription factors were analyzed to understand their contribution in NDR

dynamics. To answer our questions, we used *in vitro* reconstituted mononucleosomal probes, which harbor poly (dA:dT) tracts in different configurations, analyzing the action of the purified complexes.

We found that poly (dA:dT) tracts can influence the action of these complexes in several aspects, such as: binding to nucleosome, strength of remodeling and the direction in which the histone octamer is moved. In addition, we observed differential effects due to orientation of poly (dA:dT) tracts. Furthermore, we found that transcription factors can exert differential effects on RSC and ISW1a activities. In summary, our results highlight the role of poly (dA:dT) tracts on nucleosome positioning and help in the elucidation of the molecular mechanisms by which these sequences exert their effects.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Estructura de la cromatina

Los genomas eucariontes se encuentran altamente compactados dentro de los núcleos celulares. Esto se logra mediante la asociación del ADN a diferentes proteínas nucleares, formando un complejo núcleo-proteico conocido como cromatina. La unidad básica de ésta es el nucleosoma que está formado por aproximadamente 200 pb de ADN y un octámero de proteínas llamadas histonas (H2A, H2B, H3 y H4, dos copias de cada una). Alrededor de 147 pb de este ADN rodean el octámero, lo que conforma el centro nucleosomal, más conocido como *core nucleosomal*. A este ADN comúnmente se le denomina ADN nucleosomal (por lo que en esta tesis se usarán los términos “ADN de *core nucleosomal*” y “ADN nucleosomal” como equivalentes). El ADN sobrante (ADN *linker*) es el puente que mantiene unidos los nucleosomas. En ocasiones puede existir la presencia de una quinta histona (H1), la cual se ensambla por fuera del *core nucleosomal* y puede llevar a la cromatina a mayores grados de compactación (Figura 1) (Luger y col., 1997; Richmond y Davey, 2003).

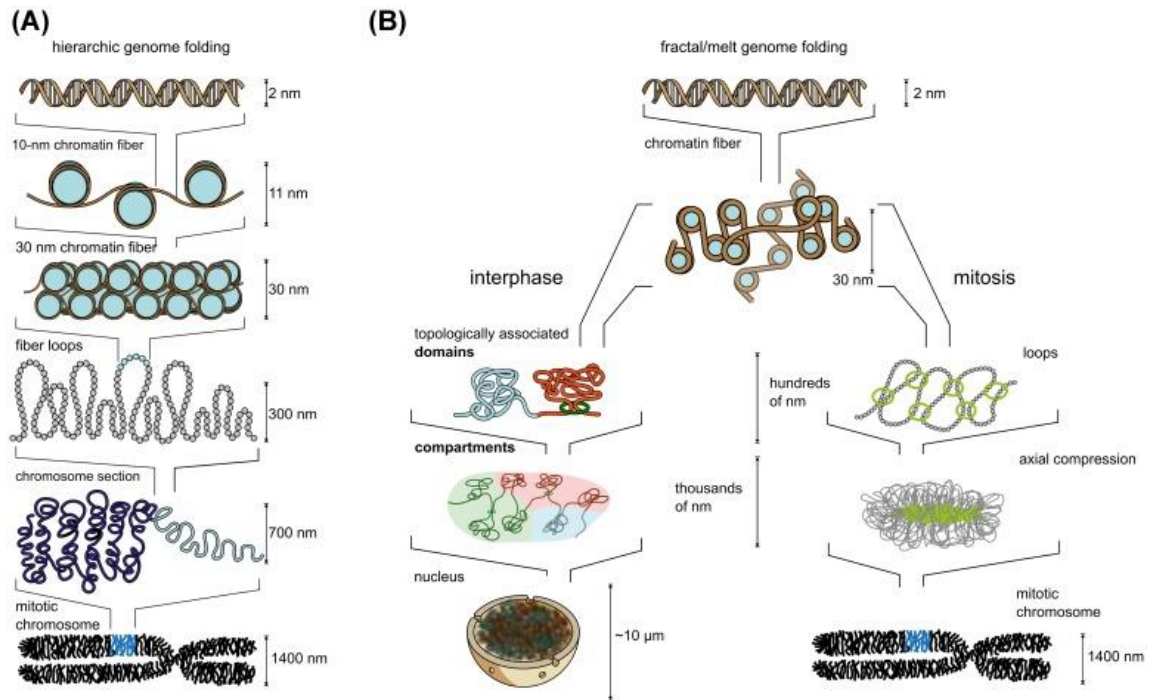


Figura 1: Niveles de compactación de la cromatina. A) Modelo clásico de la compactación de la cromatina. **B)** Modelo actual de cómo se organiza y compacta la cromatina. Fuente: A) Modificado de Felsenfeld y Groudine, (2003) (Felsenfeld y Groudine, 2003). B) Tomado de Moraru y Schalch, (2019) (Moraru y Schalch, 2019)

Si nos detenemos en la estructura del *core nucleosomal*, podemos observar que las histonas presentan un motivo estructural denominado *histone-fold*, el cual media las interacciones del dímero H2A-H2B y H3-H4. Posteriormente, se produce la formación del tetrámero H3-H4, al cual se le une dos dímeros H2A-H2B, para formar el octámero de histonas (Luger y col., 1997; Zheng y Hayes, 2003). Los dímeros que componen el octámero forman un motivo denominado *handshake*, el cual permite la interacción con el ADN. En

éste existen residuos aminoacídicos positivos que interaccionan con la cadena de ADN, la cual presenta carga negativa. En cada *handshake* existen tres puntos de interacción con el ADN (Figura 2A), que coinciden cuando el surco menor de este último mira hacia el octámero (Davie, 1998; Koyama y Kurumizaka, 2018; Luger y col., 1997). Considerando que 147 pb de ADN rodean el octámero de histonas (1.65 vueltas) y la cadena de ADN rota sobre su eje cada 10.4 pb, significa que hay alrededor de 14 vueltas de la doble hélice sobre el octámero de histonas, lo que se traduce en 14 puntos de interacción entre el surco menor del ADN nucleosomal y el octámero de histonas (Koyama y Kurumizaka, 2018; Trifonov, 2011). Para poder localizar estos puntos de interacción y otras propiedades del ADN enrollado alrededor del octámero de histonas, se creó una nomenclatura que da la locación del ADN dentro del nucleosoma, la cual se denominó SHL (*superhelical locations*). Estas se enumeran del -7 al +7 y se refiere a las posiciones donde el surco mayor del ADN mira hacia el octámero de histonas. También podemos encontrar posiciones intermedias que indican cuando el surco menor se enfrenta al octámero de histonas. Considerando el doble eje de simetría del nucleosoma, a la locación central se le denomina *dyad* (dado por 1 pb) y corresponde a la posición SHL 0 (Figura 2B) (Cutter y Hayes, 2015; Koyama y Kurumizaka, 2018; Luger y col., 1997; Richmond y Davey, 2003).

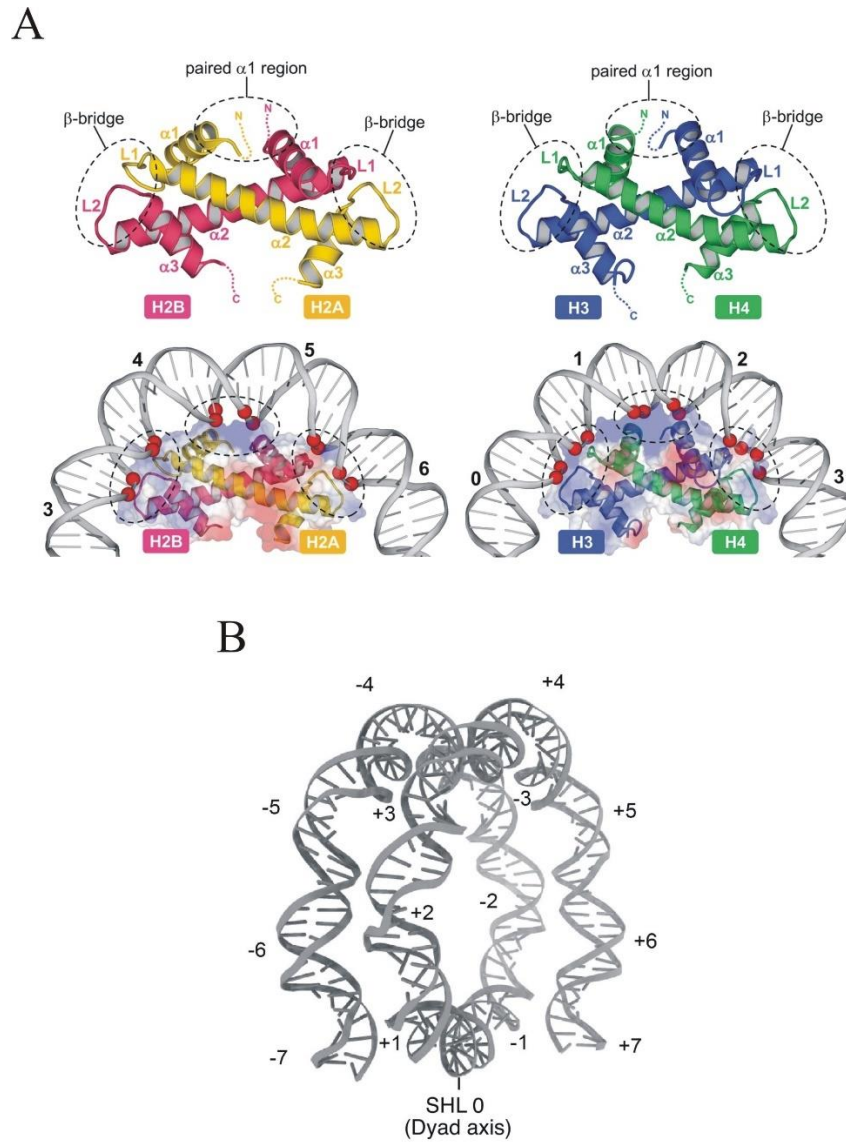


Figura 2: Organización del nucleosoma. A) Heterodímeros H2A-H2B (izquierda) y H3-H4 (derecha) en la estructura del nucleosoma. Se muestra el motivo *handshake* y los puntos de interacción con el ADN. Las esferas rojas indican los contactos entre el surco menor del ADN y los residuos positivos de las histonas. **B)** Se indican las locaciones (*superhelical locations*) del nucleosoma. El *dyad* (centro) del nucleosoma tiene la posición SHL 0. Cada locación SHL esta numerada del -1 al -7 y del +1 al +7, con una periodicidad de aproximadamente 10 pb. Fuente:

A) Modificado de Koyama y Kurumizaka, (2018) (Koyama y Kurumizaka, 2018) B) Modificado de Kobayashi y Kurumizaka, (2019) (Kobayashi y Kurumizaka, 2019).

Debido al enrollamiento del ADN alrededor del octámero de histonas, usualmente se considera que el nucleosoma es un elemento inhibitorio en procesos en donde es necesaria la unión de proteínas al ADN, como son los procesos de replicación, reparación y transcripción (Campos y Reinberg, 2009; Richmond y Davey, 2003). Así, la cromatina se muestra como un elemento altamente dinámico al poseer zonas donde el ADN se encuentra como ADN *linker* o formando parte del *core nucleosomal*. Además, la presencia de la histona H1 permite que la cromatina pueda transitar por mayores (menos accesible) y menores (accesible) grados de compactación, regulando la unión de proteínas en diferentes regiones del ADN (Woodcock y Ghosh, 2010).

1.2 Remodelación de cromatina dependiente de ATP

Como se mencionó anteriormente, la presencia de los nucleosomas es relevante en diferentes procesos celulares. En el caso de la transcripción, se ha descrito que durante la etapa de iniciación es necesario que ocurran cambios en la estructura de la cromatina en las regiones regulatorias de los genes a transcribir, lo que permitirá la unión de diferentes proteínas como los factores de transcripción (Li y Reinberg, 2011). A estos cambios en la estructura de la

cromatina se les llama remodelación de cromatina. Las proteínas o complejos de proteínas que pueden modificar la estructura de la cromatina se clasifican en dos grandes grupos: Los que modifican covalentemente residuos de las histonas y los que remodelan la cromatina con dependencia de hidrólisis de ATP (Clapier y Cairns, 2009; Clapier y col., 2017; Kouzarides, 2007).

Los miembros del segundo grupo comparten las siguientes características: 1) Mayor afinidad por el nucleosoma que por el ADN desnudo. 2) Poseen una sola subunidad catalítica, que contiene un dominio ATPasa que se divide en dos lóbulos *RecA-like*, la cual funciona como motor para realizar la translocación del ADN y romper los contactos ADN-histonas, mecanismo denominado translocación del ADN dependiente de ATP (Figura 3). 3) Dominios y/o proteínas que regulan y/o complementan la acción del dominio ATPasa. 4) Dominios y/o proteínas que interaccionan con otras proteínas, como es el caso de chaperonas, factores de transcripción y proteínas de la cromatina. Las primeras dos características permiten que el remodelador actúe sobre el nucleosoma, mientras que las últimas dos definen sobre qué región y nucleosomas actuará, como también el resultado final luego de la acción de remodelación (Clapier y col., 2017).

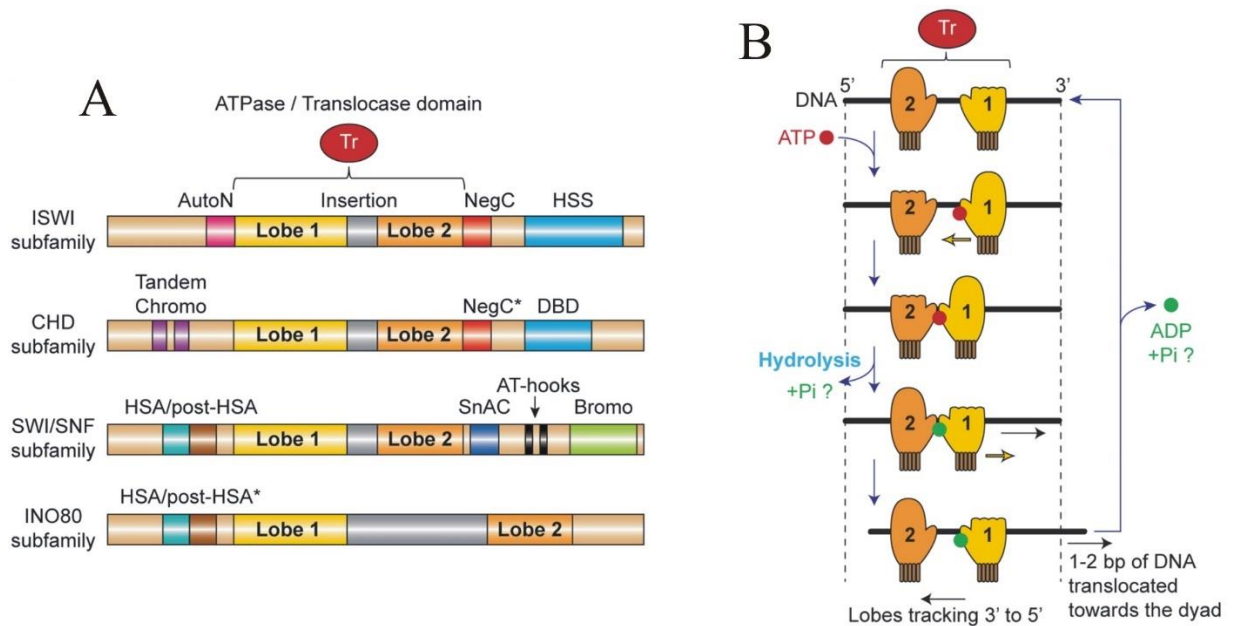


Figura 3: Organización y mecanismo de translocación de complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP. **A)** Organización de los dominios presentes en la subunidad catalítica de las diferentes subfamilias. El dominio ATPasa-translocasa (Tr) de todos los complejos remodeladores, es suficiente para llevar a cabo la translocación del ADN. *Lobe 1* y *Lobe 2* corresponden a los lóbulos *RecA-like*. Existen cuatro subfamilias: ISWI, CHD, SWI/SNF e INO80. **B)** Mecanismo de translocación. Los lóbulos *RecA-like* se representan como “guantes”, estos se unen y se liberan del ADN de manera secuencial. Con un ciclo de hidrólisis de ADN se transloca entre 1 a 2 pb. Fuente: Modificado de Clapier y col., (2017) (Clapier y col., 2017).

El mecanismo de translocación es compartido por todos los miembros de este grupo y se lleva a cabo por una hebra del ADN, de manera unidireccional y en dirección 3'-5' (Figura 3B). Para que se lleve a cabo, los lóbulos *RecA-like* se unen al nucleosoma en la locación SHL2, con excepción de INO80 que se une

en SHL-6/-7. Los lóbulos se unen uno por delante del otro, permaneciendo un complejo unido al octámero de histonas durante la translocación. Debido a que el dominio ATPasa no se encuentra unido al centro del nucleosoma (*dyad*), a un lado de éste existirá una porción de ADN nucleosomal más corto o “proximal” a un borde del *core nucleosomal*, mientras que por el lado contrario la porción de ADN nucleosomal será más extenso o “distal” al otro borde. De esta manera, durante el proceso de translocación el ADN es tirado del lado proximal y empujado en el sentido contrario (Auger y col., 2008; Clapier, 2021; Clapier y col., 2017; Nguyen y col., 2013), generando tensión a ambos lados del dominio ATPasa, lo que finaliza con la formación de una onda y ruptura de los contactos ADN-histonas en esa zona. Posteriormente, la onda se propaga por la superficie del octámero de histonas, rompiendo los contactos en la zona de avance y formándose nuevamente en la zona posterior (Clapier y col., 2017). Las ondas que se propagan pueden ser de 1 pb (Harada y col., 2016; Sirinakis y col., 2011) o pueden implicar más de 1 pb (Deindl y col., 2013). Por cada ciclo de hidrólisis de ATP se transloca 1 o 2 pb, y por aproximadamente 10 pb que son translocados, ocurre una rotación helicoidal del ADN (Clapier y col., 2017).

Debido a que todos los miembros poseen un mecanismo de translocación común, estos se diferencian por las funciones que cumplen, los cambios en la cromatina luego de que ocurra el mecanismo de remodelación, lo que está vinculado a dominios particulares presentes en su subunidad catalítica y propiedades de otras subunidades de cada complejo (Clapier y Cairns, 2009).

En base a características de la subunidad catalítica, los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP se dividen en cuatro subfamilias: SWI/SNF (*switching-defective/sucrose non-fermenting*), ISWI (*imitation switch*), Ino80 (*Inositol-requiring 80*) y CHD (*chromodomain helicase DNA-binding*) (Figura 3A) (Clapier, 2021; Clapier y Cairns, 2009; Clapier y col., 2017). Además, la mayoría de los miembros se especializan en llevar a cabo una de las siguientes tres funciones: ensamble y organización de nucleosomas, acceso a la cromatina y edición de nucleosomas (Clapier y col., 2017).

El primer complejo remodelador identificado fue SWI/SNF en *Saccharomyces cerevisiae*, el cual está conformado por doce subunidades y le da nombre a esta subfamilia (Cairns y col., 1994). Los organismos usualmente tienen dos miembros de esta subfamilia, los cuales poseen subunidades catalíticas similares; en levadura Sth1 y Snf2/Swi2 para el complejo RSC (*remodels the structure of chromatin*) y ySWI/SNF, respectivamente (Clapier, 2021; Clapier y Cairns, 2009; Clapier y col., 2017). Cabe destacar que el complejo RSC es aproximadamente diez veces más abundante que el complejo ySWI/SNF (Cairns y col., 1996). Entre las consecuencias observadas de la actividad catalítica de los complejos de la subfamilia SWI/SNF se encuentran: la exposición transitoria del ADN nucleosomal, el reposicionamiento del octámero de histonas en *cis* a lo largo del ADN (*sliding*) y la transferencia del octámero de histona en *trans* (*eviction*) (Figura 4). Muchas de estas respuestas son comunes en miembros de otras subfamilias, aunque en el caso de *eviction* es

característica de los complejos de la subfamilia SWI/SNF (Clapier y Cairns, 2009). Típicamente los miembros de esta subfamilia se caracterizan por facilitar el acceso a la cromatina, moviendo o eyectando nucleosomas, lo que se puede reflejar en activación y represión génica (Clapier y col., 2017).

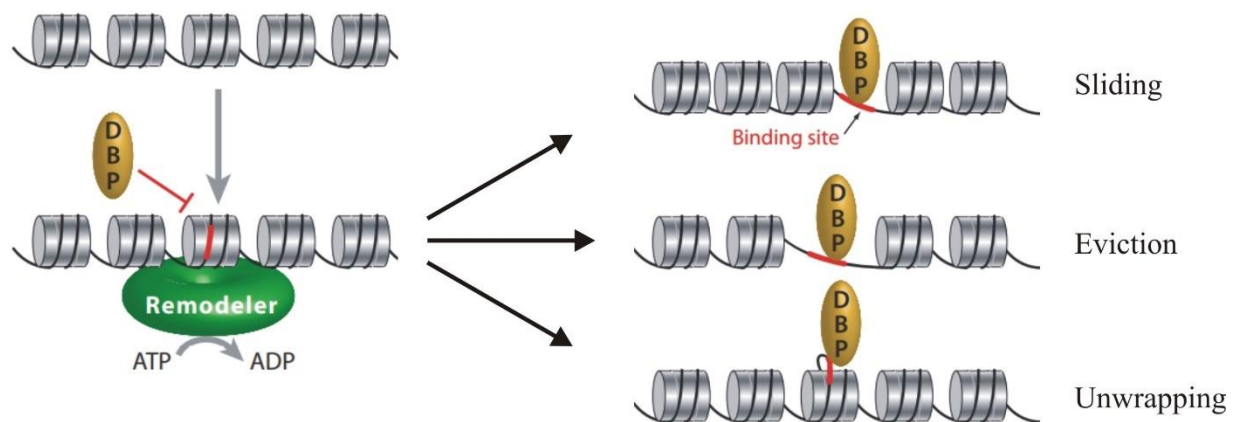


Figura 4: Diferentes resultados de la acción de remodelación. En rojo se muestra un sitio de unión para una proteína de unión al ADN (DBP), el cual se encuentra inaccesible al estar como ADN nucleosomal. Luego de la acción del remodelador, se pueden observar diferentes resultados que dejarán accesible el sitio de unión. El nucleosoma se puede mover en cis a lo largo del ADN (*Sliding*), se puede eyectar en trans (*Eviction*) o se puede realizar una exposición transiente del ADN nucleosomal (*Unwrapping*). Fuente: Modificado de Clapier y Cairns, (2009) (Clapier y Cairns, 2009).

Los complejos de la subfamilia ISWI se caracterizan por poseer un bajo número de subunidades, usualmente entre dos a cuatro. La mayoría de los organismos poseen una o dos subunidades catalíticas similares, con lo cual se

forman todos los miembros. En levadura, los complejos ISW1a y ISW1b poseen la subunidad catalítica Isw1, mientras que el complejo ISWI2, posee la subunidad catalítica Isw2. Los miembros de esta subfamilia realizan *sliding*, lo cual típicamente se traduce en ensamblar y regular el espaciamiento de nucleosomas, como también en limitar la expresión génica. Para dejar los nucleosomas con el mismo espaciamiento entre ellos, la subunidad catalítica de estos complejos posee un dominio *HAND-SANT-SLIDE* (HSS) que se une a la cola sin modificaciones de la histona H3 y al ADN *linker*, permitiendo funcionar como una “regla molecular” (Clapier, 2021; Clapier y Cairns, 2009; Clapier y col., 2017).

1.3 Posicionamiento nucleosomal y arquitectura de promotores

Como se mencionó anteriormente, los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP generan cambios en la estructura de la cromatina, lo que afectará diferentes procesos celulares, como por ejemplo la transcripción. Bajo este contexto, se ha observado que para que se lleve a cabo el proceso deben ocurrir diferentes cambios en la posición de los nucleosomas adyacentes al sitio de inicio de la transcripción (TSS) (Cairns, 2009; Clapier y Cairns, 2009; Hota y Bartholomew, 2011). Por este motivo, es relevante conocer la posición de los nucleosomas en esta región, así como las posibles

posiciones alternativas vinculadas a distintos estados transcripcionales, para el conjunto de genes de un genoma.

A lo largo de los años, muchas técnicas se han desarrollado con el objetivo de determinar la posición de los nucleosomas a lo largo del genoma, lo que se potenció con la llegada de técnicas de alto rendimiento (microarreglos y secuenciación de nueva generación). De esta manera, muchos estudios comenzaron a obtener mapas de posicionamiento nucleosomal con cada vez mayor precisión, desvelando nuevos aspectos relacionados al “paisaje nucleosomal” en el promotor proximal y su rol en la regulación de genes (Cairns, 2009; Chereji y col., 2018; Lee y col., 2007; Lieleg y col., 2015; Mahony y Pugh, 2015; Tirosh y Barkai, 2008; Voong y col., 2017). Cabe destacar, que el concepto de “paisaje nucleosomal” se refiere al posicionamiento nucleosomal (posición del nucleosoma) y ocupancia nucleosomal (densidad de nucleosomas) en una región determinada del genoma (Figura 5) (Pugh, 2010).

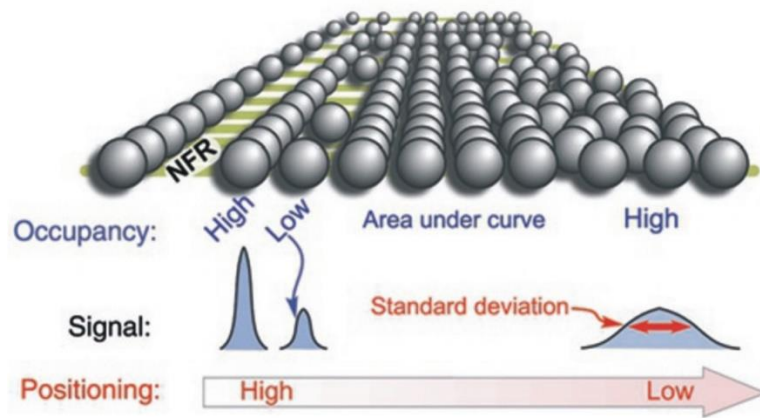


Figura 5: Paisaje nucleosomal. Ilustración que aborda la diferencia entre posicionamiento y ocupancia nucleosomal. El posicionamiento se refleja en la desviación estándar de la curva y muestra qué tan exacta es la posición de un determinado nucleosoma en una población celular. La ocupancia se refleja en el área bajo la curva y muestra la densidad nucleosomal en una determinada región, tomado de una población celular. Fuente: Modificado de Pugh, (2010) (Pugh, 2010).

En base a la información obtenida de los mapas de nucleosomas, se formaron dos categorías completamente diferentes en términos de arquitectura en el promotor proximal, denominados promotores abiertos y cubiertos (Figura 6). Los promotores abiertos se caracterizan por poseer una región inusualmente larga de ADN *linker* (aproximadamente 150 pb) denominada región libre de nucleosomas (NFR; *nucleosome free region*) o región reducida en nucleosomas (NDR; *nucleosome depleted region*). Esta región se encuentra río arriba del TSS y se encuentra flanqueada por dos nucleosomas fuertemente posicionados, denominados nucleosoma +1 (río abajo del NDR y puede

contener al TSS) y nucleosoma -1 (río arriba del NDR). Este tipo de promotores suelen corresponder a genes de expresión constitutiva (*housekeeping*) con baja plasticidad transcripcional. Además, al observar la secuencia de ADN encontramos que regularmente no poseen caja TATA y existe una baja presencia de sitios de unión para factores de transcripción, pero existen sitios para factores denominados “factores regulatorios generales” (GRFs; *general regulatory factors*) (Cairns, 2009; Clapier, 2021; Lieleg y col., 2015; Tirosh y Barkai, 2008). También podemos encontrar motivos ricos en G/C, los cuales pueden ser reconocidos por el complejo RSC (Badis y col., 2008), y secuencias de nucleótidos repetidos denominados tractos poli (dA:dT) en la región correspondiente al NDR (Cairns, 2009; Clapier, 2021; Lieleg y col., 2015; Tirosh y Barkai, 2008), las cuales en promedio poseen un tamaño de entre 6 a 10 pb (Segal y Widom, 2009; Wu y Li, 2010). Cabe destacar que también existen promotores con NDRs de mayor longitud (> 150 pb) que pueden presentar “partículas nucleosomales” altamente dinámicas, a las cuales se les denomina “nucleosomas frágiles”. Este grupo de promotores comparte todas las características anteriormente comentadas, pero difiere en término de su regulación (Clapier, 2021; Knight y col., 2014; Kubik y col., 2015; Xi y col., 2011).

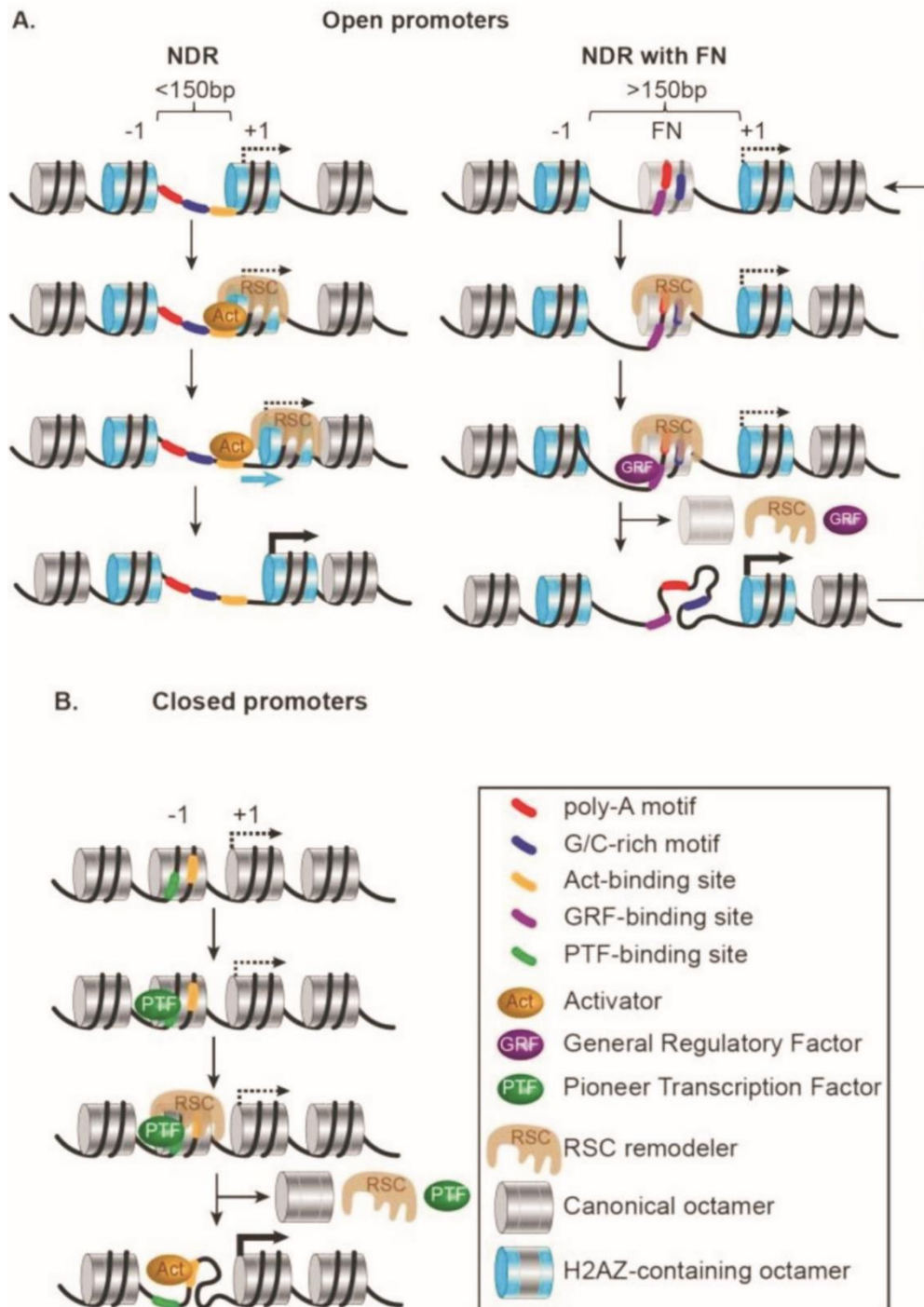


Figura 6: Arquitectura de promotores. A) En los promotores abiertos podemos encontrar NDRs sin y con nucleosomas frágiles. En estos se puede observar que los sitios de unión presentes en el NDR se encuentran accesibles para la unión de activadores, factores

regulatorios generales y complejos remodeladores de cromatina, en este caso representado por RSC. **B)** Los promotores cubiertos no poseen NDR y, por lo tanto, es necesarios que factores de transcripción pioneros lleguen y recluten complejos remodeladores de cromatina, para poder despejar la región de nucleosomas. Fuente: Modificado de Clapier, (2021) (Clapier, 2021).

Por el contrario, los promotores cubiertos se caracterizan por no poseer NDR y tener nucleosomas con bajo posicionamiento. Estos usualmente pertenecen a genes inducibles con alta plasticidad transcripcional, poseen caja TATA y varios sitios de unión para factores de transcripción. Debido a que estos no poseen NDR, los sitios de unión para factores se encuentran cubiertos por los nucleosomas y es necesario que factores de transcripción pioneros lleguen y recluten complejos remodeladores de cromatina, los cuales despejarán la región de nucleosomas y dejarán accesible los sitios de unión a proteínas (Cairns, 2009; Clapier, 2021; Lieleg y col., 2015; Tirosh y Barkai, 2008).

Cabe destacar que no todos los genes se encuentran en estos dos grupos, existen promotores que poseen características compartidas y se encuentran más cercanos a uno u otro grupo (Lieleg y col., 2015). Por otro lado, no todos los genes que poseen promotores abiertos son genes transcripcionalmente activos (Jiang y Pugh, 2009).

1.4 Propiedades intrínsecas en el ADN que definen el posicionamiento nucleosomal

¿Qué elementos favorecen o desfavorecen el posicionamiento de un nucleosoma en una determinada región? Estudios anteriores han mostrado que, a pesar de que la interacción entre el ADN y las histonas es principalmente de naturaleza electrostática (Davie, 1998; Koyama y Kurumizaka, 2018; Luger y col., 1997), hay secuencias que tienen mayor preferencia a enrollarse alrededor del octámero de histonas. De hecho, mediante reconstituciones de nucleosomas de tipo competitiva, se ha demostrado que la afinidad del octámero de histonas por una secuencia de ADN puede variar hasta alrededor de tres órdenes de magnitud (Thastrom y col., 1999) y que existen patrones que permiten que una secuencia tenga mayor afinidad por enrollarse alrededor del octámero de histonas (Shrader y Crothers, 1989, 1990). Estas diferencias están determinadas por la flexibilidad que una secuencia de ADN puede otorgarle a la doble hélice de ADN. De esta manera, se ha determinado que las secuencias de ADN que poseen una alta facilidad para enrollarse alrededor del octámero de histonas poseen un patrón en el que dinucleótidos más flexibles en términos de acercamiento de los planos de las bases nitrogenadas contiguas en la misma hebra (WW: AA, AT, TA o TT), se encuentran en las regiones en que el surco menor del ADN está en más íntimo contacto con la superficie del octámero de histonas, con una periodicidad de alrededor 10 pb, lo que coincide

con una vuelta entera de la doble hélice. Además, los dinucleótidos menos flexibles (SS: CC, GG, CG o GC) están presentes cuando el surco mayor apunta a las histonas (Figura 7) (Jiang y Pugh, 2009; Lowary y Widom, 1998; Salih y col., 2015; Segal y col., 2006; Struhl y Segal, 2013).

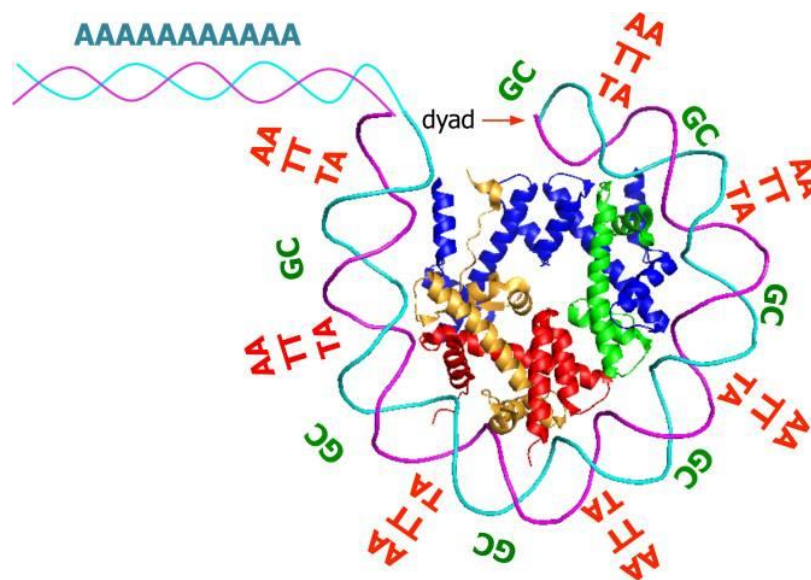


Figura 7: Ilustración de secuencias que influyen en el posicionamiento nucleosomal. Dentro de los 147 pb que rodean el octámero de histonas, existe una preferencia por la cual dinucleótidos WW posean una periodicidad de ~10 pb entre ellos, y exista un desfase de ~ 5 pb con dinucleótidos SS. Esta disposición favorece el enrollamiento alrededor del octámero de histonas. Por el contrario, secuencias homopoliméricas, como trectos poli (dA:dT), tienen resistencia a encontrarse como ADN nucleosomal. Fuente: Tomado de Struhl y Segal, (2013) (Struhl y Segal, 2013).

De la misma manera como existen secuencias que dada la flexibilidad de su doble hebra de ADN favorecen el posicionamiento de nucleosomas, existen

secuencias que, por su rigidez, desfavorecen el enrollamiento alrededor del octámero de histonas. A estas se les denomina como “secuencias excluyentes de nucleosomas” y se ha considerado que secuencias homopoliméricas como tractos poli (dA:dT) y poli (dG:dC) pertenecen a este grupo (McCall y col., 1985; Nelson y col., 1987; Segal y Widom, 2009; Struhl y Segal, 2013; Suter y col., 2000). Para el caso de los tractos poli (dA:dT), son diferentes las propiedades intrínsecas que conducen a que estas sean consideradas rígidas (Segal y Widom, 2009) y su propiedad de excluir nucleosomas se ha demostrado *in vitro* (Kaplan y col., 2009; Krietenstein y col., 2016; Shrader y Crothers, 1990) e *in vivo* (Iyer y Struhl, 1995; Kaplan y col., 2009; Segal y Widom, 2009; Struhl y Segal, 2013; Wu y Li, 2010), propiedad que se ha observado en diferentes especies (Field y col., 2008; Segal y Widom, 2009; Tsankov y col., 2010).

Como se mencionó anteriormente, los tractos poli (dA:dT) se encuentran enriquecidos en NDRs de promotores abiertos, alrededor del centro de estos y a aproximadamente -75 pb del TSS. Sin embargo, estos tractos poseen una extensión de unos 7 a 15 pb aproximadamente, mientras que el tamaño promedio de los NDRs es de aproximadamente 150 pb (Cairns, 2009; Segal y Widom, 2009; Struhl y Segal, 2013; Wu y Li, 2010), ¿Cómo es posible que secuencias tan cortas puedan excluir la presencia de nucleosomas en una región tan extensa? Bajo este contexto, muchos estudios empezaron a realizar comparaciones a nivel de genoma completo entre el “paisaje nucleosomal” *in vitro* e *in vivo*, y observaron que este “paisaje nucleosomal” *in vitro* difiere

enormemente del *in vivo*, pudiéndose observar en el primero la pérdida del posicionamiento de los nucleosomas +1 y -1, pérdida del *array nucleosomal* río abajo del TSS y un acortamiento de los NDRs, respecto de lo observado *in vivo* (Kaplan y col., 2009; Krietenstein y col., 2016; Wu y Li, 2010; Zhang y col., 2009). De esta manera, se planteó que deben existir elementos externos a la secuencia de ADN que logren mantener el “paisaje nucleosomal” observado *in vivo*.

1.5 Factores extrínsecos que determinan el posicionamiento nucleosomal *in vivo*

A pesar de la identificación de propiedades intrínsecas del ADN capaces de influir en el posicionamiento nucleosomal, el hecho es que el posicionamiento de los nucleosomas *in vivo* difiere significativamente de los obtenidos en reconstituciones *in vitro* (Kaplan y col., 2009; Wu y Li, 2010). Estas diferencias provocaron que surgiera la búsqueda de factores externos al ADN que logran posicionar los nucleosomas en los patrones observado *in vivo*. De esta manera, mediante reconstituciones *in vitro* del genoma de levadura y con la adición de extractos nucleares, se obtuvo un acercamiento de los patrones de posicionamiento *in vitro* hacia los patrones observados *in vivo*, determinándose además que este efecto es completamente dependiente de la presencia de ATP, lo que sugirió la participación de complejos remodeladores de cromatina

dependientes de ATP (Zhang y col., 2011). Además, se ha demostrado, mediante mutantes condicionales, que al eliminar el complejo RSC y/o diferentes GRFs, como Reb1, Abf1 o Rap1, los NDRs de muchos promotores comienzan a ser poblados por nucleosomas (Badis y col., 2008; Challal y col., 2018; Ganguli y col., 2014; Hartley y Madhani, 2009; Klein-Brill y col., 2019; Kubik y col., 2019; Kubik y col., 2018; Parnell y col., 2008; Rawal y col., 2018; van Bakel y col., 2013). De la misma manera, alteraciones en el “paisaje nucleosomal” de esta región se han observado por la ausencia de ySWI/SNF (Kubik y col., 2019; Rawal y col., 2018; Tolkunov y col., 2011), ISWI (Klein-Brill y col., 2019; Kubik y col., 2019), CHD (Klein-Brill y col., 2019; Kubik y col., 2019) e Ino80 (Klein-Brill y col., 2019; Kubik y col., 2019). De estos estudios y muchos otros, se concibió que los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP junto con proteínas de unión al ADN son los encargados de mantener activamente el “paisaje nucleosomal” *in vivo*.

Junto con confirmar la importancia de los complejos remodeladores de cromatina en la mantención del paisaje nucleosomal, también se comenzó a definir el rol de cada uno de estos en aspectos específicos como, por ejemplo, el posicionamiento del nucleosoma +1 y -1, la generación del NDR y la formación del *array nucleosomal* río abajo del NDR. De esta manera se ha determinado que: 1) El complejo RSC es uno de los mayores determinantes en la generación de los NDRs (Badis y col., 2008; Challal y col., 2018; Ganguli y col., 2014; Hartley y Madhani, 2009; Klein-Brill y col., 2019; Krietenstein y col.,

2016; Kubik y col., 2019; Kubik y col., 2018; Parnell y col., 2008; Rawal y col., 2018; van Bakel y col., 2013; Wippo y col., 2011). 2) El posicionamiento del nucleosoma +1 puede ser llevado a cabo por Ino80, ISW2 y en menor medida por ISW1a. Estos complejos tienen dominios que funcionan como “regla molecular”, por lo cual pueden usar GRFs o centros nucleosomales vecinos como “barreras” para posicionar al nucleosoma +1 (Klein-Brill y col., 2019; Krietenstein y col., 2016; Kubik y col., 2019; Li y col., 2015; McKnight y col., 2016; Oberbeckmann y col., 2021a; Oberbeckmann y col., 2021b; Parnell y col., 2015; Whitehouse y col., 2007; Yamada y col., 2011; Yen y col., 2012). 3) El espaciamiento y correcta distancia del *array nucleosomal* río abajo del NDR es llevado a cabo principalmente por ISW1a y CHD1. Sin embargo, Ino80 e ISW2 también poseen actividad espaciadora de nucleosomas, aunque el espaciamiento es mayor (Figura 8) (Gkikopoulos y col., 2011; Krietenstein y col., 2016; Kubik y col., 2019; Oberbeckmann y col., 2021b; Ocampo y col., 2016; Prajapati y col., 2020; Whitehouse y col., 2007). En *Saccharomyces cerevisiae* el promedio del ADN *linker* entre nucleosomas es de 18 pb (Thomas y Furber, 1976), pero los tamaños más frecuentes son 5, 15 y 25 o 4, 14 y 24 pb (Chereji y col., 2018).

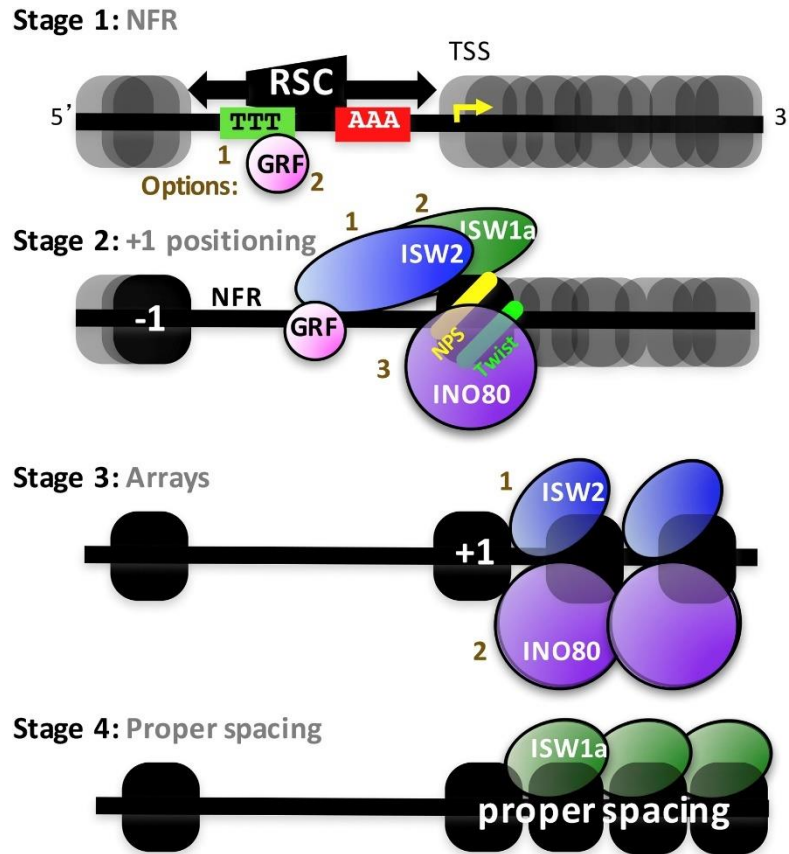


Figura 8: Modelo propuesto de la formación del “paisaje nucleosomal” *in vivo* en la región cercana al promotor. Se proponen cuatro etapas para la disposición de los nucleosomas *in vivo*: **1)** Formación del NDR (NFR). **2)** Posicionamiento del nucleosoma +1. **3)** Formación del *array nucleosomal*. **4)** Espaciamiento correcto del *array nucleosomal*. Se muestran los diferentes complejos remodeladores que participarían en cada etapa, además de otros elementos relevantes como GRFs y tractos poli (dA:dT). Los números marrones denotan diferentes opciones que se podrían llevar a cabo en esa etapa. Fuente: Tomado de Krietenstein y col., (2016) (Krietenstein y col., 2016).

Debido a que muchos complejos comparten funciones, existe un efecto sinérgico entre mucho de estos, pero también pueden existir funciones

antagónicas. Un estudio clasificó estas relaciones respecto a la función que cumplen los complejos (Kubik y col., 2019). 1) Existen complejos que son “despejadores”, los cuales pueden aumentar el tamaño del NDR empujando los nucleosomas +1 y -1 (*sliding*) o eyectando nucleosomas de esta región (*eviction*). En esta categoría se encuentra ySWI/SNF y RSC, los cuales pueden actuar sinérgicamente en muchos NDRs (Kubik y col., 2019; Rawal y col., 2018). 2) Existen complejos “cubridores”, los cuales intentan acortar el tamaño del NDR. En esta categoría se encuentran Ino80 e ISW2 principalmente (Kubik y col., 2019), así como también ISW1a (Parnell y col., 2015). 3) Los “espaciadores”, son los encargados de formar el *array nucleosomal* y dejar los nucleosomas con el mismo tamaño de ADN *linker* entre ellos. En esta categoría se encuentran ISW1a/b y CHD1, donde ISW1a/b tienen un rol más protagónico (Kubik y col., 2019; Ocampo y col., 2016). De esta manera los “despejadores” y los “cubridores” están compitiendo constantemente sobre el tamaño del NDR (Kubik y col., 2019), esto se ha observado para RSC e ISW1a, los cuales poseen roles antagónicos (Figura 9) (Parnell y col., 2015).

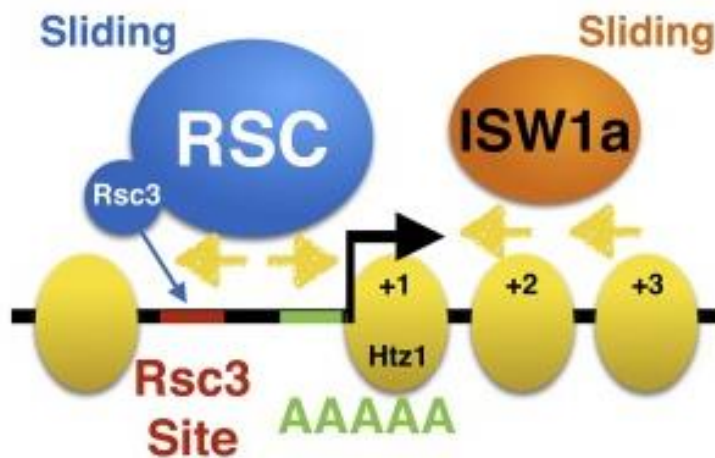


Figura 9: Modelo del rol antagónico entre ISW1a y RSC. RSC es un complejo “despejador”, que intenta abrir los NDRs; por el contrario, ISW1a puede actuar como un complejo “cubridor”, que intenta poblar con nucleosomas los NDRs. Las flechas amarillas indican hacia donde se están moviendo los nucleosomas por acción de cada complejo; en este caso se propone *sliding* como resultado de la remodelación. Además, se muestran elementos de ADN que podrían influir en RSC. Fuente: Modificado de Parnell y col., (2015) (Parnell y col., 2015).

1.6 Participación activa de secuencias de ADN en el posicionamiento nucleosomas

Según lo expuesto anteriormente, el posicionamiento nucleosomal depende tanto de la acción de TFs como de complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP, los que juegan un rol activo en este proceso. Por otro lado, las secuencias de ADN participarían pasivamente en el posicionamiento nucleosomal, a través de los motivos de unión para TFs y las secuencias que favorecen y desfavorecen el posicionamiento nucleosomal

(Hughes y Rando, 2014; Korber, 2012). El rol pasivo de los motivos de unión para TFs estaría dado al no afectar directamente el proceso de remodelación, mientras que el de las secuencias que favorecen y desfavorecen el posicionamiento nucleosomal estaría dado por la mayor o menor tendencia natural de secuencias de ADN a formar parte de *core* nucleosomales, en un vínculo exclusivo ADN-histonas que no incorpora otros elementos y que no posee la capacidad de recapitular el posicionamiento nucleosomal *in vivo*. Sin embargo, actualmente ha comenzado a aparecer evidencia que muestra que los tractos poli (dA:dT) pueden participar en los procesos activos que determinan el posicionamiento nucleosomal al afectar la actividad de los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP (Barnes y Korber, 2021). Mediante experimentos *in vitro* se ha determinado que los tractos poli (dA:dT) aumentan la actividad de *eviction* del complejo RSC (Lorch y col., 2014) y pueden afectar la actividad de *sliding* de Chd1 cuando estas se encuentran cercanas a la locación SHL2 (Winger y Bowman, 2017). Estos resultados muestran que los tractos poli (dA:dT) afectan la actividad remodeladora de los complejos y por lo tanto podrían participar activamente en el posicionamiento nucleosomal *in vivo*.

Como se mencionó anteriormente, los tractos poli (dA:dT) se encuentran en el interior de muchos NDRs (Cairns, 2009; Clapier, 2021; Lieleg y col., 2015; Tirosh y Barkai, 2008) y el tamaño de estas se relaciona de manera directa con el tamaño del NDR (Segal y Widom, 2009). Además, cabe destacar que la

disposición de los tractos poli (dA:dT) no es azarosa dentro de los NDRs. Por el contrario, el análisis del conjunto de NDRs de promotores de genes de *S. cerevisiae*, muestra que estas presentan una distribución simétrica dentro de estas regiones, en donde los tractos poli T se encuentran río arriba del centro del NDR (más alejado del TSS) y los tractos poli A se encuentran río abajo del centro del NDR (más cercano al TSS) (Wu y Li, 2010). Se cree que esta distribución cumple un objetivo funcional en la formación del NDR (Barnes y Korber, 2021); de hecho, en estudios *in vivo* se ha observado que la formación del NDR depende de la disposición y orientación de los tractos, fenómeno que se puede dar en diferentes organismos (de Boer y Hughes, 2014). En *S. cerevisiae* se ha observado que el complejo RSC podría reconocer estas orientaciones y así estas mediar su actividad de manera dirigida (Krietenstein y col., 2016). Sin embargo, aún quedan muchas preguntas sin resolver dentro de este ámbito.

En el presente trabajo de tesis se buscó responder diferentes aspectos que aún permanecen sin resolver y que ahondan en conocer cómo los tractos poli (dA:dT) afectan la actividad de complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP. Actualmente existen muchos trabajos que muestran de manera global cómo estas secuencias podrían afectar la dinámica de los complejos, esencialmente a través de correlaciones; sin embargo, pocos estudios han realizado trabajos para observar el efecto directo de estas secuencias (Lorch y col., 2014; Winger y Bowman, 2017). Para ello la pregunta

que nos planteamos fue la siguiente: ¿Cómo estas secuencias de ADN rígidas pueden influir de manera directa en la actividad de estos complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP? Una posibilidad es que estas secuencias estimulen la acción de los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP, mientras, que otra posibilidad es que estas funcionen como barrera, como se ha observado para diferentes TFs (Krietenstein y col., 2016; Li y col., 2015; Oberbeckmann y col., 2021a; Oberbeckmann y col., 2021b). Para llevar a cabo el análisis de estas posibilidades debemos conocer la dirección de remodelación y cómo se orientan estos complejos al enfrentarse a los tractos poli (dA:dT), además de dilucidar si estas secuencias afectan el mecanismo de translocación del ADN o la unión de los complejos.

Mediante experimentos *in vitro* buscamos observar el efecto de los tractos poli (dA:dT) sobre los complejos ySWI/SNF, RSC e ISW1a, esto debido a que se ha observado un rol similar para los complejos ySWI/SNF y RSC (Kubik y col., 2019; Rawal y col., 2018), y antagónico entre RSC e ISW1a (Parnell y col., 2015). Además, ySWI/SNF y RSC son complejos “despejadores”, mientras que ISW1a es “espaciador” y “cubridor” (Kubik y col., 2019; Parnell y col., 2015). Para ello evaluamos aspectos como la orientación, la extensión y la distancia respecto al nucleosoma de los tractos poli (dA:dT). Más aún, mediante diferentes enfoques evaluamos la dirección de la remodelación catalizada por estos complejos al enfrentarse a estas secuencias.

Por último, observamos la acción conjunta de una proteína unida y los tractos poli (dA:dT), ya que se ha observado que muchas veces estos complejos tienen que ser reclutados por un TF a esta región, donde se puede gatillar *eviction* del nucleosoma, para el caso de la subfamilia SWI/SNF (Clapier y Cairns, 2009; Gutierrez y col., 2007), y pueden funcionar como “barrera” para ISW1a (Li y col., 2015). Cabe destacar, que la mayoría de los aspectos abordados en este trabajo, aún no han sido evaluados directamente y comprenderlos es relevante para determinar a cabalidad la arquitectura y regulación que existe en las regiones promotoras de genes, lo que se puede extender a diferentes organismos, teniendo un impacto en diferentes procesos celulares como la transcripción y por ende la expresión génica.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis:

Los tractos poli (dA:dT) influyen en procesos activos que determinan el posicionamiento nucleosomal, estimulando la actividad de los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP.

2.2 Objetivo general:

Determinar la influencia que pueden tener los tractos poli (dA:dT) sobre la actividad de los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP.

2.3 Objetivos específicos:

1. Determinar el efecto *in vitro* de los tractos poli (dA:dT) sobre la actividad remodeladora de nucleosomas de complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP.
2. Determinar el efecto conjunto de los tractos poli (dA:dT) y un factor de transcripción sobre la actividad de complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP.

3. Determinar el efecto a nivel de genoma completo de los trectos poli (dA:dT) sobre ISW1a.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Transformación de bacterias competentes

Se utilizaron bacterias de cepa *E. coli* DH5 α para obtención de plásmidos y BL-21 *codon plus* para la expresión de proteínas recombinantes. Se tomaron por separado 100 μ L de bacterias CaCl₂ competentes y se agregaron entre 10 a 15 ng del ADN de interés. Luego se mezclaron suavemente y se incubaron por 30 minutos en hielo. A continuación, la mezcla fue incubada por 90 segundos a 42°C para dejarlo posteriormente en hielo. Se le adicionó 400 μ L de medio de cultivo (caldo LB) frío y estéril, y se incubó a 37°C por 45 minutos con agitación constante. Posteriormente, se centrifugó por 1 minuto a 10.000xg, se retiró el sobrenadante dejando aproximadamente unos 100 μ L, en los que se resuspendió el pellet de células. Éste se sembró en placas con medio de cultivo sólido (Agar-LB-Ampicilina 50 ng/ μ L) y se dejó en incubación por aproximadamente 16 horas en estufa a 37°C.

3.2 Expresión y purificación de proteínas recombinantes (Gal4-DBD y Gal4-VP16)

Una colonia positiva de bacterias transformadas con los plásmidos correspondientes para la expresión de Gal4-DBD y Gal4-VP16 con el epítipo

de 6xHis (ver sección 3.1), se cultivó en 5 mL de medio LB-Ampicilina (50 ng/ μ L), incubando alrededor de 16 horas a 37°C, con agitación constante. Luego 3 mL del cultivo se traspasaron a 300 mL de medio LB-Ampicilina (50 ng/ μ L) y se incubó a 28°C con agitación constante, hasta alcanzar una O.D.₆₀₀ entre 0.6 a 0.8, para luego inducir con IPTG a una concentración final de 200 μ M por 2 horas a 28°C con agitación constante. Luego el cultivo fue centrifugado a 7.700xg por 10 minutos a 4°C y el pellet fue resuspendido en 15 mL de Buffer de lisis (NaCl 300 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, Imidazol 20 mM) + DTT 5 mM + inhibidores de proteasas), sonicándose posteriormente con 4 pulsos de 15 segundos a 30 watts de potencia, seguido de 20 segundos de descanso en hielo entre cada pulso. Posteriormente se centrifugó el cultivo sonicado a 12.000xg por 20 minutos a 4°C, paso que se realizó dos veces. El sobrenadante del centrifugado fue incubado con 200 μ L de resina Ni-NTA (Qiagen) (previamente equilibrada con Buffer de lisis + inhibidores de proteasas) por 2 horas en rotación a 4°C, para luego ser traspasada a una columna BioRad, donde se dejó escurrir a temperatura ambiente. Posteriormente la resina fue lavada en la columna con 4 volúmenes (volumen de resina) de Buffer de lavado frío (NaCl 300 mM, NaH₂PO₄ 50 mM) + DTT 1 mM + inhibidores de proteasas, conteniendo concentraciones de entre 20 mM a 50 mM de imidazol. Luego se procedió a eluir la proteína con Buffer de elución frío (NaCl 300 mM, NaH₂PO₄ 50 mM) + DTT 1 mM + inhibidores de proteasas, conteniendo concentraciones de entre 60 mM a 150 mM de imidazol.

Las distintas eluciones fueron recolectadas y se les adicionó glicerol para dejar al 15% concentración final. El análisis de las purificaciones y las cuantificaciones fueron realizados a través de electroforesis en gel de poliacrilamida denaturante SDS-PAGE al 12% (ver sección 3.3) y su posterior tinción con azul de Coomassie (ver sección 3.3.1). En el caso de las cuantificaciones se incluyó en las electroforesis una curva de calibración con cantidades conocidas de Albúmina de Suero Bovino (BSA) (#5000206, Bio-Rad) y luego las concentraciones de las proteínas recombinantes se determinaron de la forma indicada en la sección 3.3.1.

3.3 Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)

Las muestras de proteínas se desnaturalizaron con adición en frío de 0.2 volúmenes de Buffer de carga 6x (Tris-HCl pH 6.5 300 mM, DTT 600 mM, SDS 12%, Azul de bromofenol 0.3% y Glicerol 30%) y calentamiento a 95°C por 5 minutos. Luego de centrifugar a 13.000xg durante 1 minuto, las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida denaturante (SDS-PAGE) al porcentaje correspondiente al ensayo. La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 100 V, aproximadamente por 30 minutos y luego a 150 V hasta finalizar la corrida, utilizando un Buffer de corrida (Tris-HCl 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1%).

3.3.1 Tinción con azul de Coomassie y análisis densitométricos

Luego de ser sometido a SDS-PAGE (ver sección 3.3), el gel se fijó y tiñó durante toda la noche en solución colorante azul de Coomassie (Metanol 50%, Ácido acético 10%, Azul de Coomassie 0.05%). Luego se trató por 45 minutos con solución fijadora (Metanol 50%, Ácido acético 10%) y acto seguido se decoloró por al menos 1 hora con solución decolorante (Metanol 5%, Ácido acético 7%). Finalmente se realizaron varios lavados con agua desionizada (*nanopure*). La imagen del gel se digitalizó con escáner UMAX PowerLook 2100XL-USB y las bandas fueron cuantificadas por densitometría utilizando el *software* UN-SCAN-IT gel™, versión 6.1.

3.3.2 Western blot

Luego de ser sometidas a SDS-PAGE (ver sección 3.3), las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (previamente tratada con metanol 100%) (Immobilon-P, MILLIPORE) usando Buffer de transferencia (Tris-HCl 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.04%, Metanol 20%) a un amperaje constante de 250 mA durante 2 horas. Posteriormente se bloqueó la membrana usando leche descremada diluida en PBS 1X + Tween 20 0.05% y se incubó durante 1 hora en agitación. Luego se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBS 1X + Tween 20 0.05%, para posteriormente dejar incubando con

anticuerpos específicos, adicionados en una solución de PBS 1X + Tween 20 0.05% a 4°C durante toda la noche. Luego se hicieron lavados sucesivos de 10 minutos con una solución PBS 1X + Tween 20 0.05%. La membrana se incubó luego con un segundo anticuerpo (dirigido al anticuerpo primario usado), que tiene acoplada la enzima Peroxidasa de Rábano Picante (HRP), en una solución de PBS 1x + Tween 20 0.05% durante 1 hora a temperatura ambiente. Seguidamente la membrana se lavó con una solución de PBS 1X + Tween 20 0.05%, 3 veces durante 10 minutos cada vez y la detección se llevó a cabo con reactivos para quimioluminiscencia (Thermo Scientific, Pierce ECL Western Blotting Substrate), según las instrucciones del fabricante. La membrana posteriormente se expuso a un film fotográfico (CL-Xposure Film, Thermo) a temperatura ambiente.

3.3.3 Tinción con plata

Luego de realizarse SDS-PAGE (ver sección 3.3), se procedió con este protocolo de tinción de gel, como alternativa a tinción con azul de Coomassie (sección 3.3.1). Todas las etapas se realizaron a temperatura ambiente. El gel se sumergió en una solución fijadora (Metanol 50%, Ácido acético 10%) por 45 minutos en rotación horizontal constante. Posteriormente se removió la solución fijadora y se agregó una solución de metanol al 50%, dejando en incubación por 1 hora. Luego se realizaron cuatro lavados de 10 minutos con agua desionizada

(*nanopure*), para posteriormente tratar el gel con solución de plata (NaOH 0.08%, NH₄OH 0.21 N, AgNO₃ 47.1 mM) por 15 minutos. A continuación, se removió la solución de plata y se lavó el gel seis veces con agua desionizada, siendo cada lavado de 5 minutos. Por último, se sumergió el gel en solución de revelado (Ácido cítrico 0.005%, Formaldehído 0.019%) y se mantuvo en agitación hasta que aparecieran las bandas correspondientes a las proteínas. La reacción de revelado se detuvo descartando la solución de revelado y lavando el gel con agua desionizada. La imagen del gel se digitalizó con escáner UMAX PowerLook 2100XL-USB.

3.4 Purificación de complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP

3.4.1 Obtención del cultivo

Las diferentes cepas de levaduras usadas para obtener los complejos RSC, ISW1a y ySWI/SNF, se muestran en la Tabla 1. Estas fueron modificadas genéticamente para expresar una subunidad del complejo en fusión con proteína A y la proteína de unión a calmodulina (CBP), las cuales son usadas para realizar purificaciones por afinidad en tándem (TAP) (Rigaut y col., 1999).

Las cepas fueron cultivadas en placas sólidas de agar-YPD-ampicilina (Extracto de levadura 10 g/L, Peptona 20 g/L, Glucosa 2%, Agar 20 g/L y

Ampicilina 50 ng/ μ L) durante 48 horas a 30°C. Una vez obtenidas colonias aisladas, una de estas se inoculó en 5 mL de medio líquido YPD-Ampicilina (Extracto de levadura 10 g/L, Peptona 20 g/L, Glucosa 2% y Ampicilina 50 ng/ μ L) y se dejó en agitación (200 rpm) a 30°C durante aproximadamente 16 horas. Se determinó la concentración de células mediante absorbancia a 600 nm (OD_{600}) y, usando la siguiente fórmula: $V_i = \frac{V_f \times A_f}{A_i \times 2^{\frac{T}{1.5}}}$ (V_i : el volumen a tomar del cultivo inicial, V_f : volumen del cultivo final, A_f : absorbancia final deseada, A_i : Absorbancia inicial del cultivo, T : tiempo que se desea crecer el cultivo), se determinó volumen de inóculo para escalar a 25 mL de medio YPD-Ampicilina para obtener una OD_{600} final de 1.8 en un tiempo definido (típicamente, 14 a 17 hrs.). Posteriormente se usó la misma fórmula recién mencionada para cultivar 6 L de cultivo en medio YPD-ampicilina a 30°C, hasta llegar a una OD_{600} entre 2.0 a 2.5.

Tabla 1: Cepas de levadura utilizadas

Cepa	Complejo	Genotipo	Origen
YPP187	SWI/SNF	SWI2-HA/SNF6-TAP (BY4741)	Workman Lab (Chandy y col., 2006)
YLR357w	RSC	RSC2-TAP (BY4741)	Open Biosystems
YFR013w	ISW1a	IOC3-TAP (BY4741)	Open Biosystems

3.4.2 Purificación por afinidad en tándem (TAP)

Los 6 L de medio de cultivo se centrifugaron a 5000xg por 10 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con 1 volumen de buffer de extracción (HEPES-KOH pH 7.5 40 mM, NaCl 350 mM, Tween-20 0.1%, Glicerol 10%, Pepstatin A 1 µg/mL, Leupeptin 2 µg/mL, PMSF 1 mM, DTT 0.2 mM). Luego se volvió a centrifugar a la misma velocidad anterior y se descartó el sobrenadante. Posteriormente se resuspendió el pellet en 10 mL de buffer de extracción y se mezcló con 30 mL de perlas de vidrio (0.5 mm diámetro, BioSpec Products) previamente lavadas con buffer de extracción. La mezcla se trasvasió a la cámara del sistema bead beater (BioSpec Products) y se agregó más buffer de extracción con tal de que no quedara aire en la cámara. Las levaduras se lisaron mediante 30 pulsos de 30 segundos con 60 segundos de descanso, todo llevado a cabo en hielo y en cámara a 4°C. El lisado fue succionado con una pipeta, evitando succionar perlas, y llevado a tubos de policarbonato para ser centrifugado a 14.000xg durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente el sobrenadante se llevó a tubos de ultracentrífuga y, utilizando un rotor de ángulo fijo, se centrifugó a 160.000xg durante 100 minutos a 4°C. En esta etapa deberían observarse 3 capas en el tubo, de superior a inferior serían: capa de lípidos, extracto de levadura y pellet. Se rescató el extracto de levadura con cuidado de no perturbar las otras capas y se cuantificó la cantidad de proteína total por el método de Bradford (Protein Assay, Bio-Rad). Luego se

preaclaró el extracto de levadura, mezclando éste con resina CL-6B Sepharose (Sigma Aldrich), en relación 250 μ L de resina por cada 100 mg de extracto. La resina fue previamente equilibrada con buffer de extracción. El preaclarado se realizó durante 2 horas en rotación a 4°C en microtubo. Luego el tubo se centrifugó a 2000xg por 5 minutos a 4°C para rescatar el extracto preaclarado, el cual fue incubado con 2 mL de resina IgG Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare) durante toda la noche (entre 12 a 16 horas) en rotación a 4°C. La resina IgG sefarosa fue previamente equilibrada en buffer de extracción.

Al día siguiente la mezcla se transfirió a 2 columnas Bio-Rad de 10 mL y se dejó escurrir a 4°C. La resina presente en la columna se lavó dos veces con 10 volúmenes de buffer de extracción y una tercera vez con 10 volúmenes de buffer TEV (Tris-Cl pH 8.0 10 mM, NaCl 150 mM, NP-40 0.1%, EDTA 0.5 mM, Glicerol 10%, Pepstatin A 1 μ g/mL, Leupeptin 2 μ g/mL, PMSF 1 mM, DTT 0.2 mM), en todos los casos se dejó escurrir por gravedad a 4°C. Posteriormente se agregó 2 volúmenes de buffer TEV a las columnas y se transfirió la mezcla con la resina a un tubo de 15 mL, agregándose enseguida 100 unidades de TEV proteasa (10 U/ μ L, New England BioLabs) por cada 1 mL de resina y se dejó digiriendo durante 8 horas en rotación a 4°C. Una vez transcurrido el tiempo, la suspensión se traspasó a una columna y se dejó escurrir, para obtener la elución. Luego a la columna se le agregó 1 volumen de buffer de unión a calmodulina 150 (Tris-Cl pH 8.0 10 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 2 mM, Imidazol 1 mM, MgAc 1 mM, NP-40 0.1%, Glicerol 10%, Pepstatin A 1 μ g/mL,

Leupeptin 2 µg/mL, PMSF 1 mM, DTT 0.5 mM), se dejó escurrir y se juntó con la elución. Inmediatamente se agregó CaCl₂ a la elución para dejar a una concentración final de 2 mM y se juntó con 500 µL de resina Calmodulin Sepharose (GE Healthcare), para dejar incubando durante toda la noche con agitación a 4°C.

Al día siguiente, la muestra se centrifugó a 2000xg por 2 minutos a 4°C y se retiró el sobrenadante. Luego la resina se lavó durante 5 minutos en rotación a temperatura ambiente con 10 volúmenes de buffer de unión a calmodulina 150 y se centrifugó a 2000xg por 2 minutos a 4°C para retirar el sobrenadante. El mismo procedimiento se realizó para hacer dos lavados con buffer de unión a calmodulina 300 (Tris-Cl pH 8.0 10 mM, NaCl 300 mM, CaCl₂ 2 mM, Imidazol 1 mM, MgAc 1 mM, NP-40 0.1%, Glicerol 10%, Pepstatin A 1 µg/mL, Leupeptin 2 µg/mL, PMSF 1 mM, DTT 0.5 mM) y posteriormente dos lavados con buffer de unión a calmodulina 150. Posteriormente, la resina se transfirió a un tubo de 2 mL y el complejo se eluyó agregando buffer de elución 150 (Tris-Cl pH 8.0 10 mM, NaCl 150 mM, Imidazol 1 mM, MgAc 1 mM, NP-40 0,1%, Glicerol 10%, EGTA 2 mM, 1 µg/mL Pepstatin A, Leupeptin 2 µg/mL, PMSF 1 mM, DTT 0.5 mM) y dejando en rotación durante 5 minutos a temperatura ambiente, para posteriormente centrifugar a 2000xg por 2 minutos a 4°C, procedimiento que se repitió diez veces. Finalmente se realizaron 10 eluciones más siguiendo el mismo procedimiento anterior, pero usando buffer de elución 300 (Tris-Cl pH 8.0 10 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 1 mM, MgAc 1 mM, NP-40 0.1%, Glicerol

10%, EGTA 2 mM, Pepstatin A 1 µg/mL, Leupeptin 2 µg/mL, PMSF 1 mM, DTT 0.5 mM).

Las eluciones se analizaron por Western blot (ver sección 3.3.2), mediante tinción con plata (ver sección 3.3.3) y mediante ensayos de remodelación (ver sección 3.9.3). Luego estas se alicuotaron y se guardaron a -80°C.

3.4.3 Concentración de complejos purificados

En caso de que los complejos no estuvieran lo suficientemente concentrados para trabajar con ellos, se procedió a concentrar las diferentes eluciones. El protocolo se realizó usando el sistema Amicon Ultra-4 Centrifugal Filters, de límite de exclusión 100 KDa (Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez concentrado, cada complejo se analizó mediante tinción con plata (ver sección 3.3.3) y mediante ensayos de remodelación (ver sección 3.9.3). Luego estas se alicuotaron y se guardaron a -80°C.

3.5 Obtención de plásmidos

Estas se realizaron a partir de 5 mL de medio de cultivo bacteriano (caldo LB-Ampicilina 50 ng/µL), obtenidas de colonias aisladas provenientes de la

transformación bacteriana (ver sección 3.1), las cuales fueron cultivadas entre 12 y 16 horas a 37°C con agitación.

Para búsqueda de colonias positivas, se realizaron minipreparaciones. Para ello se usó 1 mL del cultivo bacteriano, el cual se centrifugó a 10.000 rpm por 1 minuto. Se descartaron 900 µL del sobrenadante y al pellet se le agregó 300 µL de buffer TENS (Tris-Cl pH 8.0 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, SDS 0.5%). La mezcla se homogenizó por vortex y luego se incubó durante 10 minutos en hielo. Posteriormente, se agregó 150 µL de acetato de sodio 3M pH 5.2 y se homogenizó por vortex. A continuación, se centrifugó durante 6 minutos a 10.000 rpm, temperatura ambiente. Se rescató el sobrenadante y se le agregó 900 µL de etanol 100% frío. El tubo se incubó en hielo durante 15 minutos y luego se centrifugó a máxima velocidad por 2 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se lavó dos veces con etanol 70%, repitiendo los parámetros de la centrifugación anterior. Finalmente, el pellet se resuspendió en 20 µL de TE (Tris-HCl pH 8.0 10 mM, EDTA pH 8.0 1 mM), se le agregó 0.3 µL de RNAsa (10 µg/µL) y se incubó durante 30 minutos a 37°C. De esta manera la muestra quedó lista para ser analizada posteriormente.

Para clones positivos y para plásmidos conocidos, la purificación se realizó utilizando el kit E.Z.N.A. *Plasmid Miniprep* (OMEGA Bio-Tek), siguiendo lo descrito en el manual del kit.

3.6 Precipitación de ADN

La precipitación de ADN se realizó agregando 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío. La mezcla se mantuvo por 2 horas a -20°C o 30 minutos a -80°C y luego se centrifugó a 16.400g durante 15 minutos a 4°C. El precipitado se lavó dos veces con etanol 70% frío, centrifugando a 16.400g durante 15 minutos a 4°C en cada oportunidad. El precipitado se resuspendió en buffer Tris-HCl pH 8.0 10 mM, para el caso de muestras que serían utilizadas en reacciones enzimáticas posteriores, y TE pH 8.0 10 mM para los demás casos.

3.7 Obtención de sondas marcadas con [γ -³²P]

3.7.1 Obtención de vectores a usar en PCR de marcaje

Se diseñaron oligonucleótidos, sentido y antisentido, que al ser hibridados generaron casetes doble hebra, los cuales posteriormente fueron insertados en vectores específicos que poseen la secuencia posicionadora 601 (Lowary y Widom, 1998) (Figura 10A). Estos oligonucleótidos se diseñaron para que contengan secuencias de trectos poli (dA:dT) en diferentes orientaciones y con tamaños que han sido usados en experimentos anteriores (Lorch y col., 2014; Winger y Bowman, 2017). Además, los vectores usados para realizar el

subclonamiento poseen el sitio de unión para el factor de transcripción Gal4 (Gutierrez y col., 2007). Los diferentes vectores generados, así como la región que varía entre estos, se muestran en la Tabla 2.

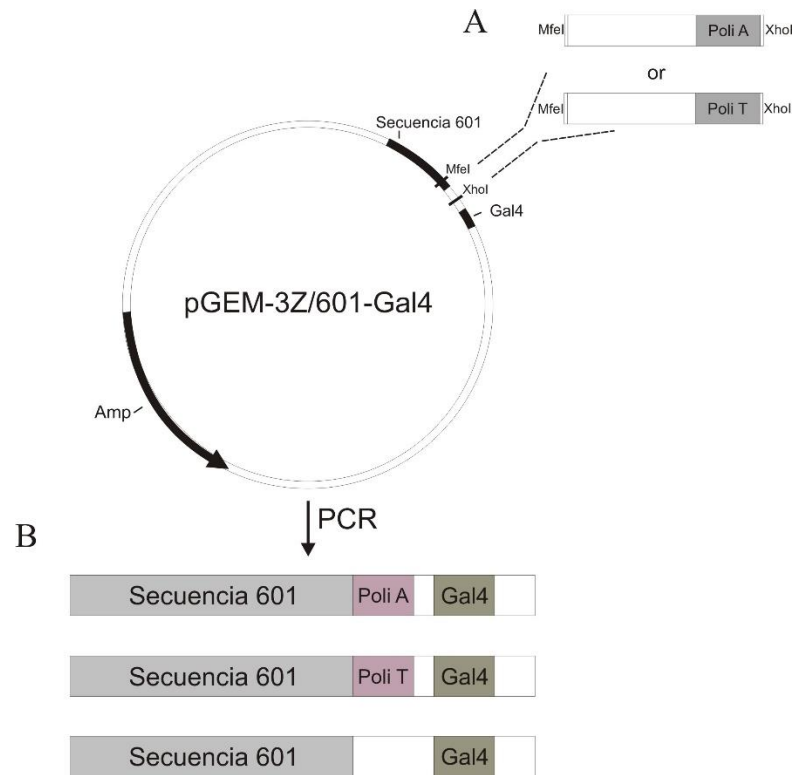


Figura 10: Ejemplo de la estrategia para generación de sondas. A) Los casetes doble hebra poseen sitios de restricción usados para insertarse en un vector que posee la secuencia 601. **B)** Los vectores generados fueron utilizados para las reacciones de PCR radioactiva. Dependiendo de los partidores utilizados, la secuencia 601 queda en posiciones laterales o centrales.

Tabla 2: Plásmidos, partidores y sondas

Nombre de la sonda	Nombre del plásmido y secuencia de la región amplificada	Partidores
--------------------	--	------------

Nuc-70	pGEM-3Z/601-Gal4 5'ggtcgcgtgttcaatacatgcacaggatgtatatactgacacgtgcctggagacta gggagtaatcccctggcgggtaaaacgcgggggacagcgcgtacgtgcgttaa gCGgtgctagagctgtctacgaccaattgagcggcctcggcaccgggattctccag ggcggccgcgtatctcgagcatcggaggacagtctccgcggacctgcaggcat gcaagcttgagtattctataggtcacctaaatagc	Forward: 5'ACAGGATGTAT ATATCTGACACGT GCCTGG Reverse: 5'GAATACTCAAG CTTGCATGCCTG
Nuc-(A15)70	pGEM-3Z/601-Gal4-A15-2in 5'ggtcgcgtgttcaatacatgcacaggatgtatatactgacacgtgcctggagacta gggagtaatcccctggcgggtaaaacgcgggggacagcgcgtacgtgcgttaa gCGgtgctagagctgtctacgaccaattgagcggcctcggcaccgggattctccaa aaaaaaaaaaaaaactcgagcatcggaggacagtctccgcggacctgcaggc atgcaagcttgagtattctataggtcacctaaatagc	Forward: 5'ACAGGATGTAT ATATCTGACACGT GCCTGG Reverse: 5'GAATACTCAAG CTTGCATGCCTG
Nuc-(A10)70	pGEM-3Z/601-Gal4-A10-2in 5'ggtcgcgtgttcaatacatgcacaggatgtatatactgacacgtgcctggagacta gggagtaatcccctggcgggtaaaacgcgggggacagcgcgtacgtgcgttaa gCGgtgctagagctgtctacgaccaattgagcggcctcggcaccgggattctccaa aaaaaaaaacgtatctcgagcatcggaggacagtctccgcggacctgcaggcat gcaagcttgagtattctataggtcacctaaatagc	Forward: 5'ACAGGATGTAT ATATCTGACACGT GCCTGG Reverse: 5'GAATACTCAAG CTTGCATGCCTG
Nuc-(A5)70	pGEM-3Z/601-Gal4-A5-2in 5'ggtcgcgtgttcaatacatgcacaggatgtatatactgacacgtgcctggagacta gggagtaatcccctggcgggtaaaacgcgggggacagcgcgtacgtgcgttaa gCGgtgctagagctgtctacgaccaattgagcggcctcggcaccgggattctccaa aaaggccgcgtatctcgagcatcggaggacagtctccgcggacctgcaggcat gcaagcttgagtattctataggtcacctaaatagc	Forward: 5'ACAGGATGTAT ATATCTGACACGT GCCTGG Reverse: 5'GAATACTCAAG CTTGCATGCCTG
Nuc-(T15)70	pGEM-3Z/601-Gal4-T15-2in 5'ggtcgcgtgttcaatacatgcacaggatgtatatactgacacgtgcctggagacta gggagtaatcccctggcgggtaaaacgcgggggacagcgcgtacgtgcgttaa gCGgtgctagagctgtctacgaccaattgagcggcctcggcaccgggattctccttt ttttttttctcgagcatcggaggacagtctccgcggacctgcaggcatgcaagctt gagtattctataggtcacctaaatagc	Forward: 5'ACAGGATGTAT ATATCTGACACGT GCCTGG Reverse: 5'GAATACTCAAG CTTGCATGCCTG
Nuc-(T10)70	pGEM-3Z/601-Gal4-T10-2in 5'ggtcgcgtgttcaatacatgcacaggatgtatatactgacacgtgcctggagacta gggagtaatcccctggcgggtaaaacgcgggggacagcgcgtacgtgcgttaa gCGgtgctagagctgtctacgaccaattgagcggcctcggcaccgggattctccttt tttttcgtatctcgagcatcggaggacagtctccgcggacctgcaggcatgcaag cttgagtattctataggtcacctaaatagc	Forward: 5'ACAGGATGTAT ATATCTGACACGT GCCTGG Reverse: 5'GAATACTCAAG CTTGCATGCCTG
Nuc-(T7)70	pGEM-3Z/601-Gal4-T7-2in 5'ggtcgcgtgttcaatacatgcacaggatgtatatactgacacgtgcctggagacta gggagtaatcccctggcgggtaaaacgcgggggacagcgcgtacgtgcgttaa gCGgtgctagagctgtctacgaccaattgagcggcctcggcaccgggattctccttt ttccgcgtatctcgagcatcggaggacagtctccgcggacctgcaggcatgcaa gcttgagtattctataggtcacctaaatagc	Forward: 5'ACAGGATGTAT ATATCTGACACGT GCCTGG Reverse: 5'GAATACTCAAG CTTGCATGCCTG

Nuc-(T5)70	pGEM-3Z/601-Gal4-T5-2in 5' ggtcgcgtgttcaatacatgcacaggatgtatatactgacacgtgcctgg agacta gggagtaatcccctggcgggtaaaacgcgggggacagcgcgtacgtgctggttaa gcggtgctagagctgtctacgaccaattgagcggcctcggcaccgggattctccttt tggccgcgtatctcgagcatcggaggacagtcctccgcggacctgcaggcatgca agcttgagtattctataggtcacctaaatagc	Forward: 5'ACAGGATGTAT ATATCTGACACGT GCCTGG Reverse: 5'GAATACTCAAG CTTGCATGCCTG
Nuc-19(T15)70	pGEM-3Z/601-T15-19 5' ggtcgcgtgttcaatacatgcacaggatgtatatactgacacgtgcctgg agacta gggagtaatcccctggcgggtaaaacgcgggggacagcgcgtacgtgctggttaa gcggtgctagagctgtctacgaccaattgagcggcctcggcaccgggattctccag ggcggccgcgtatctcgaggttttttttttttctccgcggacctgcaggcatgcaagctt gagtattctataggtcacctaaatagc	Forward: 5'ACAGGATGTAT ATATCTGACACGT GCCTGG Reverse: 5'GAATACTCAAG CTTGCATGCCTG
Nuc-40(T15)70	pGEM-3Z/601-Gal4-T15-40 5' ggtcgcgtgttcaatacatgcacaggatgtatatactgacacgtgcctgg agacta gggagtaatcccctggcgggtaaaacgcgggggacagcgcgtacgtgctggttaa gcggtgctagagctgtctacgaccaattgagcggcctcggcaccgggattctccag ggcggccgcgtatctcgagcatcggaggacagtcctccgcgttttttttttttcaagctt gagtattctataggtcacctaaatagc	Forward: 5'ACAGGATGTAT ATATCTGACACGT GCCTGG Reverse: 5'GAATACTCAAG CTTGAAA
Nuc-80	pGEM-3Z/601-Gal4: 5' ggtcgcgtgttcaatacatgcacaggatgtatatactgacacgtgcctgg agacta gggagtaatcccctggcgggtaaaacgcgggggacagcgcgtacgtgctggttaa gcggtgctagagctgtctacgaccaattgagcggcctcggcaccgggattctccag ggcggccgcgtatctcgagcatcggaggacagtcctccgcggacctgcaggcat gcaagcttgagtattctataggtcacctaaatagctggcgtaat	Forward: 5'ACAGGATGTAT ATATCTGACACGT GCCTGG Reverse: 5'TGACACTATAG AATACTCAAGC
Nuc-SHL5(A15)80	pGEM-3Z/A15-SHL5 5' ggtcgcgtgttcaatacatgcacaggatgtatatactgacacgtgcctgg agacta gggagtaatcccctggcgggtaaaacgcgggggacagcgcgtacgtgctggttaa gcggtgctagagctgtctacgaccaattgaaaaaaaaaaaaaaaaagggattctcca ggcggccgcgtatctcgagcatcggaggacagtcctccgcggacctgcaggca tgcaagcttgagtattctataggtcacctaaatagctggcgtaat	Forward: 5'ACAGGATGTAT ATATCTGACACGT GCCTGG Reverse: 5'TGACACTATAG AATACTCAAGC
Nuc-SHL5(T15)80	pGEM-3Z/T15-SHL5 5' ggtcgcgtgttcaatacatgcacaggatgtatatactgacacgtgcctgg agacta gggagtaatcccctggcgggtaaaacgcgggggacagcgcgtacgtgctggttaa gcggtgctagagctgtctacgaccaattgttttttttttttgggattctccagggcggc cggtatctcgagcatcggaggacagtcctccgcggacctgcaggcatgcaagctt tgagtattctataggtcacctaaatagctggcgtaat	Forward: 5'ACAGGATGTAT ATATCTGACACGT GCCTGG Reverse: 5'TGACACTATAG AATACTCAAGC
70-Nuc	pGEM-3Z/BNB-601 5' tgaatacgcactactatagggcgaattcgagctcggg acccggggatcctatcc gactggcagcgtagcggtcggcgttaatagatctaccggatgtatatactgacac gtgcctggagactagggagtaatcccctggcgggtaaaacgcgggggacagcgc cgtacgtgctggttaagcgggtgctagagctgtctacgaccaattgagcggcctcggca ccgggattctccag ggcggccgcgtatctcgagcatcggaggacagtcctccgcg gacctgcaggcatgcaag	Forward: 5'GGCGAATTCGA GCTCGGT Reverse: 5'CTGGAGAATCC CGGTGCCGAG

35(T15)- Nuc-(A15)35	pGEM-3Z/BNB-T15-601-A15 5' gctcggtagccgggatcct atcc gactggcacgctagcgg tcgcctttttttttttt tcggatgtatatactgacacgtgctggagactaggagtaatcccctggcggta aaacgcgggggacagcgcgtacgtgcgttaagcgggtgctagagctgtctacgac caattgagcggcctcggcaccgggattctccaa aaaaaaaaaaaaaactcgagc atcggaggacagtcctccgcggacctgcaggcatgcaagc	Forward: 5'GACTGGCACGC TAGCGG Reverse: 5'GGACTGTCCTC CGATGC
Nuc-140	pGEM-3Z/601-Gal4: 5' ggtcgtgttaatacatgcacaggatgtatatactgacacgtgcctgg agacta gggagtaatcccctggcggtaaaacgcgggggacagcgcgtacgtgcgttaa gcggtgctagagctgtctacgaccaattgagcggcctcggcaccgggattctccag ggcggccgcgtatctcgagcatcggaggacgtcctccgcggacctgcaggcat gcaagcttgagtattctataggtcacctaaatagctggcgtaacatggtcatagct gtttcct gtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacaacatac	Forward: 5'ACAGGATGTAT ATATCTGACACGT GCCTGG Reverse: 5'AGCGGATAACA ATTTACAC
70(A15)- Nuc-(T15)70	pGEM-3Z/BNB-A15-601-T15 5' tgaatacactactatagggcgaattcgagctcgg taccggggatcctatcc gactggcacgctagcggtcgccaaaaaaaaaaaa aacggatgtatatactga cacgtgctggagactaggagtaatcccctggcgggttaaacgcgggggaca gcgctacgtgcgttaagcgggtgctagagctgtctacgaccaattgagcggcctcg gcaccgggattctcct ttttttttttctcgagcatcggaggacagtcctccgcggac ctg caggcatgcaagcttgagtattctataggtcacctaaatagc	Forward: 5'GGCGAATTCGA GCTCGGT Reverse: 5'GAATACTCAAG CTTGCATGCCTG
70(T15)- Nuc-(A15)70	pGEM-3Z/BNB-T15-601-A15 5' tgaatacactactatagggcgaattcgagctcgg taccggggatcctatcc gactggcacgctagcggtcgccttttttttttt tcggatgtatatactgacacgtgcct ggagactaggagtaatcccctggcggtaaaacgcgggggacagcgcgtacg tgcggttaagcgggtgctagagctgtctacgaccaattgagcggcctcggcaccggg attctccaa aaaaaaaaaaaaaactcgagcatcggaggacagtcctccgcggacc tg caggcatgcaagcttgagtattctataggtcacctaaatagc	Forward: 5'GGCGAATTCGA GCTCGGT Reverse: 5'GAATACTCAAG CTTGCATGCCTG
30-Nuc-70	pGEM-3Z/BNB-601 5' gctcggtagccgggatcct atccgactg gcacgctagcgg tcgaccttaata gatct accggatgtatatactgacacgtgctggagactaggagtaatcccctg gcgggttaaacgcgggggacagcgcgtacgtgcgttaagcgggtgctagagctg ctacgaccaattgagcggcctcggcaccgggattctccag ggcggccgcgtatctc gagcatcggaggacagtcctccgcggacctg caggcatgcaagcttgagtattc taggtcacctaaatagc	Forward: 5'GCACGCTAGCG GTCG Reverse: 5'GAATACTCAAG CTTGCATGCCTG
30(A15)- Nuc-70	pGEM-3Z/BNB-A15-601 5' gctcggtagccgggatcct atccgactg gcacgctagcgg tcgccccaaaaa aaaaaa aacggatgtatatactgacacgtgctggagactaggagtaatcccct tgccgggttaaacgcgggggacagcgcgtacgtgcgttaagcgggtgctagagct gtctacgaccaattgagcggcctcggcaccgggattctccag ggcggccgcgtat ctcgagcatcggaggacagtcctccgcggacctg caggcatgcaagcttgagtatt ctataggtcacctaaatagc	Forward: 5'GCACGCTAGCG GTCG Reverse: 5'GAATACTCAAG CTTGCATGCCTG
70-Nuc-30	pGEM-3Z/BNB-601 5' tgaatacactactatagggcgaattcgagctcgg taccggggatcctatcc gactggcacgctagcggtcgctgtaatagatct accggatgtatatactgacac gtgctggagactaggagtaatcccctggcgggttaaacgcgggggacagcg cgtacgtgcgttaagcgggtgctagagctgtctacgaccaattgagcggcctcggca ccgggattctccag ggcggccgcgtatct cgagcatcggaggac agtcctccgcg gacctgcaggcatgcaagc	Forward: 5'GGCGAATTCGA GCTCGGT Reverse: 5' GTCCTCCGATGC TCG
70-Nuc- (A15)30	pGEM-3Z/BNB-601-A15 5' tgaatacactactatagggcgaattcgagctcgg taccggggatcctatcc gactggcacgctagcggtcgctgtaatagatct accggatgtatatactgacac gtgctggagactaggagtaatcccctggcgggttaaacgcgggggacagcg gtgctggagactaggagtaatcccctggcgggttaaacgcgggggacagcg	Forward: 5'GGCGAATTCGA GCTCGGT Reverse:

	<p>cgtagctgctgtaagcgggtgtagagctgtctacgaccaattgagcggcctcgga ccgggattctcaaaaaaaaaaaaaaaactcgagcatcggaggacagtctccgc ggacctgcaggcatgcaagc</p>	<p>5' GTCCTCCGATGC TCG</p>
70-Nuc- (T15)30	<p>pGEM-3Z/BNB-601-T15 5'tgtaatacgaactactatagggcgaattcgagctcgggaccggggatcctatcc gactggcagcgtagcggtcgccgttcaatagatctaccggatgtatatactgacac gtgcctggagactagggagtaatcccctggcgggtaaacgcgggggacagcg cgtagctgctgtaagcgggtgtagagctgtctacgaccaattgagcggcctcgga ccgggattctcctttttttttttctcgagcatcggaggacagtctccgcggacctgc aggcatgcaagc</p>	<p>Forward: 5'GGCGAATTCGA GCTCGGT Reverse: 5' GTCCTCCGATGC TCG</p>
Nuc-59TA	<p>pGEM-3Z/601-Gal4-59TA 5'ggtcgctgttcaatacagcagggatgtatatactgacacgctgctggagacta gggagtaatcccctggcgggtaaacgcgggggacagcgcgtacgtgctgtaaa gctgctgtagagctgtctacgaccaattgagcggcctcgaccgggattctccag ctaggcagcctatctcgagcatcggaggacagtcctccgaggacctgcaggcatg caagcttgagtattctatagtgacacctaataagc</p>	<p>Forward: 5'ACAGGATGTAT ATATCTGACACGT GCCTGG Reverse: 5'GAATACTCAAG CTTGCAATGCCTG</p>

En amarillo se muestran las regiones donde se unen los partidores. En celeste se muestran 20 nucleótidos correspondientes al vector pGEM-3Z/601 original. Las letras en rojo corresponden a la secuencia posicionadora 601. Las letras subrayadas corresponden a las modificaciones realizadas pertinentes al experimento.

Para realizar la hibridación de los oligonucleótidos correspondientes, se mezclaron 100 pmoles de cada oligonucleótido y se diluyó a 200 µL en Tris-HCl pH 8.0 60 mM, concentración final. Se incubó a 95°C por 5 minutos, dejándose luego enfriar lentamente hasta temperatura ambiente y finalizando con 1 minuto a 4°C. El alineamiento genera un casete que ya tiene los extremos cohesivos para ser insertado en el plásmido correspondiente que previamente se digirió con las enzimas de restricción adecuadas. El vector digerido se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% en TBE 0.5X a 60 V por 1:30 horas y luego se extrajo y purificó usando un kit de extracción (QIAEX II Gel Extraction Kit, Qiagen). El fragmento de ADN purificado se sometió a una electroforesis en

gel de agarosa, para observar la integridad, y se cuantificó usando el equipo Qubit 4 fluorometer (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) junto con el kit Qubit dsDNA BR Assay (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific).

La ligación del vector con cada casete por separado fue en razón molar 1:2 de vector:inserto, en una reacción llevada a cabo por la ligasa T4 (New England Biolabs) en un volumen de 20 μ L. Se incubó a 16°C por 16 horas, terminando a 65°C por 10 minutos. Por último, se realizaron transformaciones con las reacciones de ligación (ver sección 3.1) y posteriormente se obtuvieron plásmidos de colonias transformantes realizando minipreparaciones (ver sección 3.5) para encontrar clones recombinantes positivos. Estos se confirmaron realizando digestiones con diferentes enzimas de restricción. Posteriormente se obtuvo plasmidio de un clon positivo de cada subclonamiento, con uso de kit (ver sección 3.5), y luego se confirmó el detalle de su identidad por secuenciación automática Sanger (servicio PUC).

3.7.2 Marcaje con ^{32}P de partidores a usar en PCR radioactiva

Se marcaron 25 pmoles del respectivo partidior *forward* en su extremo 5', los cuales posteriormente fueron usados para la realización de las PCR radioactivas, los diferentes partidores usados se muestran en la Tabla 2. Para el marcaje se usó la enzima T4 polinucleótido quinasa (New England Biolabs), en presencia de 150 μ Ci de [γ - ^{32}P]-ATP (Perkin Elmer, 6.000 Ci/mmol, 150

mCi/mL) en un volumen final de 25 μ L. Esta reacción procedió a 37°C durante 30 minutos. Luego, pasado el tiempo de la reacción, se adicionó 1 μ L de EDTA pH 8.0 0.5 M para detener la reacción. Los nucleótidos radioactivos no incorporados se eliminaron por cromatografía de exclusión en columnas Spin Sephadex G-25 (G-25 Sephadex Columns, Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez terminado el paso por la columna, se procedió a precipitar las muestras (ver sección 3.6) y luego se resuspendió el partidor en 10 μ L de agua desionizada estéril.

3.7.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) radioactiva

Se prepararon stocks de 1 ng/ μ L de los respectivos vectores a usar (ver sección 3.7.1) y en cada reacción se usó 1 ng de vector, junto con 1.5 unidades de la enzima TaKaRa Ex Taq (TaKaRa), 0.5 μ M del partidor *forward* marcado (ver sección 3.7.2), 0.5 μ M del partidor *reverse*, 0.2 mM de cada dNTP y 1X de Buffer de TaKaRa Ex Taq (TaKaRa) (Figura 10B). Cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ L. En cada caso, una vez terminada la PCR se cargó la mezcla de reacción en columna Spin Sephadex G-50 (G-50 Sephadex Columns, Roche), para eliminar por cromatografía de exclusión los partidores radioactivos no incorporados. Una vez terminado el paso por la columna, se procedió a precipitar las muestras (ver sección 3.6) y se resuspendieron en 10 μ L de TE pH 8.0. Los partidores utilizados se muestran en la Tabla 2.

3.7.4 Purificación de fragmentos de PCR por gel de poliacrilamida no denaturante

La purificación se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida no denaturante al 5% (ver sección 3.8). A las muestras procedentes de la PCR radioactiva (ver sección 3.7.3) se les agregó glicerol para dejar al 10% y luego se cargaron en el gel. Antes de cargar las muestras el gel fue sometido a 100 V durante 50 minutos en cámara fría (4°C). La electroforesis procedió a 200 V durante 1 hora a 4°C. Una vez terminada la corrida, se retiró el vidrio superior y el gel junto al vidrio inferior se envolvieron en film plástico (alusa plast) y se expuso a film autorradiográfico por un tiempo dado por el nivel de emisión de la muestra, marcándose previamente en el film la posición del gel. Luego de revelar el film se procedió a cortar con un bisturí las bandas de interés en el gel, correspondientes a los productos de PCR (guiándose con el film revelado). Los trozos de gel se introdujeron en tubo de 0.6 mL con un pequeño agujero en la parte inferior y el tubo se introdujo a su vez en un tubo de 1.5 mL. Se realizó un breve centrifugado (*spin down*), para que el gel pasara a través de la apertura al tubo de 1.5 mL (sin sobrepasar 5.000 rpm en microcentrífuga). Luego se agregó 300 µL de TE pH 8.0 y se resuspendió, dejándose seguidamente en agitación fuerte durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se centrifugaron los tubos a máxima velocidad por 2 minutos a 4°C y se rescató el

sobrenadante. A continuación, se procedió a precipitar las muestras (ver sección 3.6) y luego se resuspendieron en 10 μ L de TE pH 8.0.

3.7.5 Determinación de la concentración de los productos de PCR marcados con ^{32}P

Las concentraciones de las sondas radioactivas obtenidas (ver sección 3.7.4) se cuantificaron usando el equipo Qubit 4 fluorometer (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) junto con el kit Qubit dsDNA BR Assay (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Usualmente se cuantificó una sonda del grupo de sondas que se obtenía en un proceso de marca dado, sonda que se considera como referencia; el resto de las sondas del grupo se cuantificó mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida no denaturante al 5% (ver sección 3.8), al comparar la señal de cada sonda con la sonda de referencia. Para ello se tomó una alícuota de cada una de las sondas y se diluyó 1:200 en buffer de condiciones finales de reconstitución (NaCl 100 mM, Tris-HCl pH 7.4 10 mM, EDTA 1 mM, PMSF 0.5 mM, DTT 5 mM, NP-40 0.05%, BSA 100 ng/ μ L, Glicerol 10%), para finalmente cargar 12 μ L en el gel. Una vez terminada la electroforesis se retiró el gel por separación de los vidrios y se secó en un papel whatman grado 3 a 80°C por 2 horas en secador *Gel Dryer 583* (Bio-Rad) acoplado a una bomba de vacío *HydroTechTM Vacuum Pump* (Bio-Rad). El gel fue revelado por exposición a placa *phosphorscreen* y analizado en *Molecular Imager Bio-Rad*

(Phosphorimager). Se utilizó el *Software Quantity One* (Bio-Rad) para el procesamiento de las imágenes y cuantificación de las señales obtenidas, comparando las señales de cada sonda con la sonda de referencia.

Al obtener las sondas marcadas y ya cuantificadas, estas se reconstituyeron a la forma de mononucleosomas (ver sección 3.7.6) o se diluyeron a 4 fmol/ μ L siguiendo el mismo procedimiento que en la reconstitución nucleosomal, pero sin agregar los oligonucleosomas cortos (SON) o agregándoselos al final de la reconstitución, dependiendo del tipo de ensayo a realizar.

3.7.6 Reconstitución nucleosomal

La reconstitución nucleosomal de cada sonda cuantificada (ver sección 3.7.5) se llevó a cabo mediante el método de transferencia de octámero de histonas (Owen-Hughes y col., 1999). Para esto se mezclaron 0.5 pmoles del ADN marcado, 1.5 μ g de oligonucleosomas cortos (SON), previamente obtenidos desde núcleos de células HeLa (Owen-Hughes y col., 1999), y NaCl a una concentración final 1 M, llevándose a 12.5 μ L con buffer de dilución (Tris-Cl pH 7.4 10 mM, EDTA 1 mM, PMSF 0.5 mM, DTT 5 mM). La mezcla se incubó por 20 minutos a 37°C. Transcurrido ese tiempo se realizaron diluciones seriadas adicionando 3.13 μ L, 5.20 μ L, 10.42 μ L y 31.25 μ L de buffer de dilución, cada una seguida por incubación de 20 minutos a 30°C. Por último, se

agregó 62.5 μL de buffer de dilución final (Tris-Cl pH 7.4 10 mM, EDTA 1 mM, PMSF 0.5 mM, DTT 5 mM, NP-40 0.1%, BSA 200 ng/ μL , Glicerol 20%) incubando por 20 minutos a 30°C. Las muestras quedaron en un volumen final de 125 μL y fueron guardadas a 4°C (Figura 11). La composición de la solución en la que queda el mononucleosoma reconstituido es la misma del buffer de condiciones finales de reconstitución (NaCl 100 mM, Tris-Cl pH 7.4 10 mM, EDTA 1 mM, PMSF 0.5 mM, DTT 5 mM, NP-40 0.05%, BSA 100 ng/ μL , Glicerol 10%), quedando el mononucleosoma reconstituido a una concentración de 4 fmol/ μL . La reconstitución se verificó al someter 10 fmoles de cada muestra a electroforesis en gel de poliacrilamida no denaturante al 5% (ver sección 3.8).

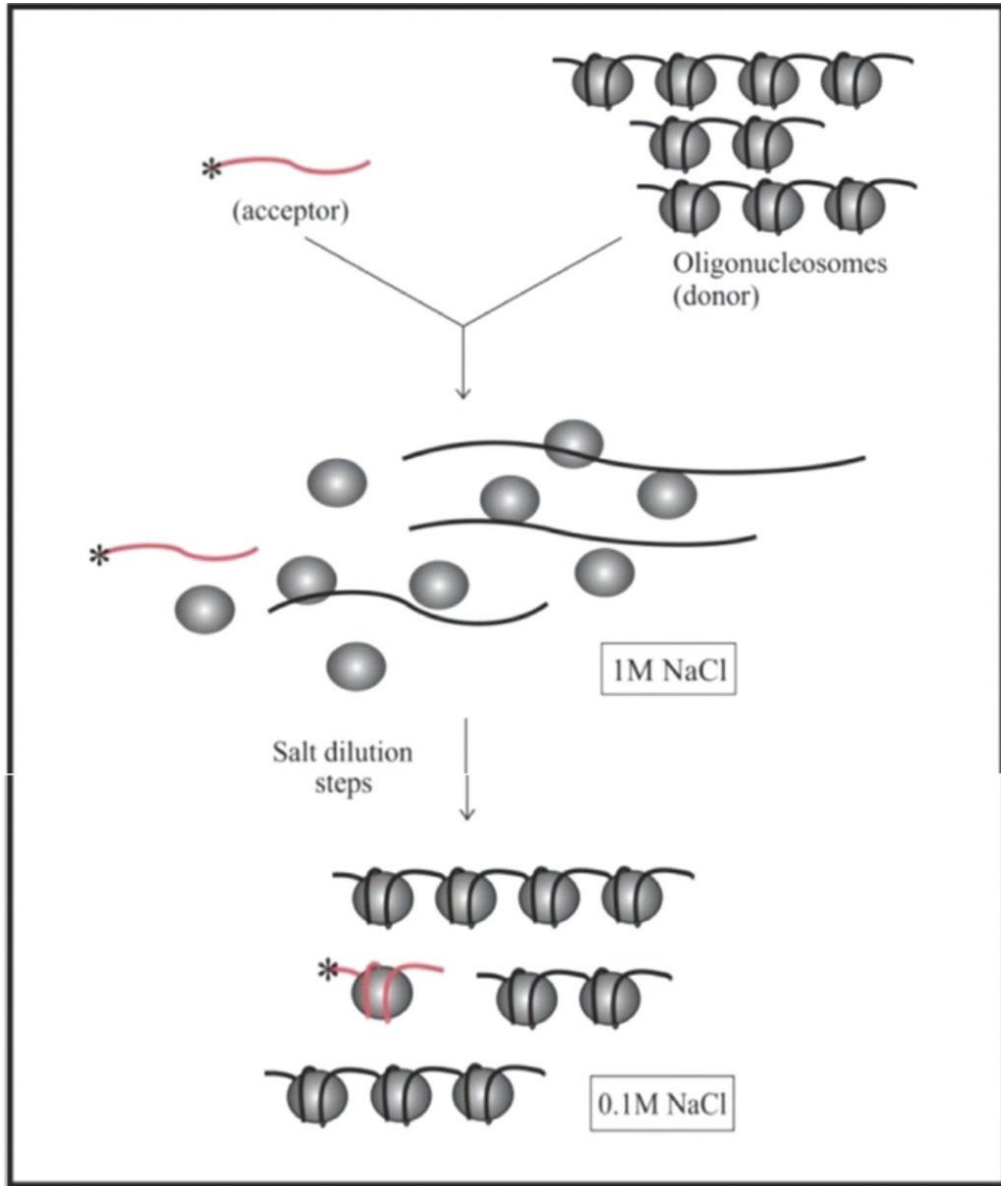


Figura 11: Esquema de los pasos de para la reconstitución nucleosomal. La metodología se llevó a cabo mediante el método de transferencia de octámero de histonas (Owen-Hughes y col., 1999). Fuente: Tomado desde Tesis doctoral de Gutiérrez, J.L.

3.8 Electroforesis en geles de poliacrilamida no denaturante

Para los ensayos de unión de factores (ver sección 3.9.1), ensayos de remodelación (ver sección 3.9.3), ensayos de remodelación con factores (ver sección 3.9.4) y obtención de sondas marcadas (ver sección 3.7) se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida no denaturante al 5% (40:1; Acrilamida:BisAcrilamida), mientras que para ensayos de unión de complejos remodeladores (ver sección 3.9.2) se usó geles al 3.5% (60:1; Acrilamida:BisAcrilamida). La dilución de la acrilamida se realiza en Buffer TBE 0.3x (Tris-Borato 27 mM, EDTA 6.7 mM), a los que se adiciona PSA 0.1% y TEMED 0.1%, los cuales en conjunto catalizan la polimerización del gel. Se deja polimerizar al menos 1 hora y se monta en el sistema de electroforesis, limpiando los carriles con buffer de corrida (TBE 0.3x) y eliminando burbujas eventualmente atrapadas en la parte inferior del gel al montarlo. Los geles se pre-corren a 100 V por 50 minutos a en cámara fría (4°C). Típicamente se cargan 13.5 µL de muestra (carriles de 8 mm de ancho) y la electroforesis procede a 200 V por 3 a 3:30 horas en cámara fría (4°C).

Una vez terminada la electroforesis, se retira el gel por separación de los vidrios y se seca en un papel whatman grado 3 a 80°C por 2 horas en secador *Gel Dryer 583* (Bio-Rad) acoplado a una bomba de vacío *HydroTech™ Vacuum Pump* (Bio-Rad). Los geles secos se expusieron a una placa de rayos X (CL-Xposure Film, Thermo) en presencia de intensificador HyperScreen (GE

Healthcare) a -80°C o fueron revelados por exposición a placa *phosphorscreen* y analizada en *Molecular Imager Bio-Rad (Phosphorimager)*. Se utilizó el *Software Quantity One* (Bio-Rad) para el procesamiento de las imágenes y cuantificación de las señales obtenidas.

3.9 Ensayos con sondas radioactivas

3.9.1 Ensayos de unión de factores

Para los ensayos de unión de los factores Gal4-DBD y Gal4-VP16, se mezclaron 2.5 μL (10 fmoles) de mononucleosoma marcado (Tris-Cl pH 7.4 10 mM, EDTA 1 mM, PMSF 0.5 mM, DTT 5 mM, NP-40 0.05%, Glicerol 10%, BSA 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, NaCl 100 mM) con 1.5 μL de factor o buffer de factor de transcripción (HEPES-KOH pH 7.4 10 mM, KCl 100 mM, NaCl 30 mM, Glicerol 20%, ZnCl_2 10 μM , Imidazol 10 mM, BSA 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, NaH_2PO_4 5 mM, DTT 1 mM, PMSF 0.2 mM), 0.5 μL de buffer CADS (HEPES-KOH pH 7.5 6.96 mM, Tris-Cl pH 7.4 6.52 mM, NaCl 208.7 mM, PMSF 0.5 mM, DTT 3.61 mM, EDTA pH 8.0 1 mM, NP-40 0.03%, Glicerol 10%), 0.6 μL de agua desionizada (*nanopure*), 3 μL de buffer de complejo remodelador (Tris-Cl pH 8.0 10 mM, NaCl 300 mM, $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 1 mM, Imidazol 1 mM, EGTA 2 mM, NP-40 0.1%, PMSF 0.5 mM, DTT 0.5 mM, Glicerol 10%) y 6.9 μL de buffer de remodelación (HEPES-KOH pH 7.9 20 mM, KCl 57.3 mM, PMSF 0.5 mM, DTT 2 mM, NP-40

0.05%, Glicerol 8.7%, $MgCl_2$ 11 mM, BSA 100 $\mu g/mL$). La mezcla se incubó 30 minutos a 30°C, seguido de 5 minutos en hielo. Por último, se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida no denaturante al 5% (Ver sección 3.8).

3.9.2 Ensayos de unión de complejos remodeladores

Para los ensayos de unión de los complejos ISW1a y RSC, se mezclaron 2.5 μL (10 fmoles) de mononucleosoma marcado o ADN marcado (Tris-Cl pH 7.4 10 mM, EDTA 1 mM, PMSF 0.5 mM, DTT 5 mM, NP-40 0.05%, Glicerol 10%, BSA 100 $\mu g/mL$, NaCl 100 mM) con 1.5 μL de buffer de factor de transcripción (HEPES-KOH pH 7.4 10 mM, KCl 100 mM, Glicerol 20%, $ZnCl_2$ 10 μM , Imidazol 10 mM, BSA 100 $\mu g/mL$, DTT 1 mM, PMSF 0.2 mM), 0.5 μL de buffer CADS (HEPES-KOH pH 7.5 6.96 mM, Tris-Cl pH 7.4 6.52 mM, NaCl 208.7 mM, PMSF 0.5 mM, DTT 3.61 mM, EDTA pH 8.0 1 mM, NP-40 0.03%, Glicerol 10%), 0.6 μL de 50 mM ATP (Roche) o 50 mM Adenosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) (Roche), 3 μL de complejo remodelador o buffer de complejo remodelador (Tris-Cl pH 8.0 10 mM, NaCl 300 mM, $Mg(CH_3COO)_2$ 1 mM, Imidazol 1 mM, EGTA 2 mM, NP-40 0.1%, PMSF 0.5 mM, DTT 0.5 mM, Glicerol 10%) y 6.9 μL de buffer de remodelación (HEPES-KOH pH 7.9 20 mM, KCl 57.3 mM, PMSF 0.5 mM, DTT 2 mM, NP-40 0.05%, Glicerol 8.7%, $MgCl_2$ 11 mM, BSA 100 $\mu g/mL$). La mezcla se incubó 45 minutos a 30°C, seguido de 5 minutos

en hielo. Por último, se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida no denaturante al 3.5% (Ver sección 3.8).

3.9.3 Ensayo de remodelación

Para los ensayos de *sliding* de los complejos ISW1a, RSC y γ SWI/SNF, se mezclaron 2.5 μ L (10 fmoles) de mononucleosoma marcado (Tris-Cl pH 7.4 10 mM, EDTA 1 mM, PMSF 0.5 mM, DTT 5 mM, NP-40 0.05%, Glicerol 10%, BSA 100 μ g/mL, NaCl 100 mM) con 1.5 μ L de buffer de factor de transcripción (HEPES-KOH pH 7.4 10 mM, KCl 100 mM, Glicerol 20%, ZnCl₂ 10 μ M, Imidazol 10 mM, BSA 100 μ g/mL, DTT 1 mM, PMSF 0.2 mM), 0.5 μ L de buffer CADS (HEPES-KOH pH 7.5 6.96 mM, Tris-Cl pH 7.4 6.52 mM, NaCl 208.7 mM, PMSF 0.5 mM, DTT 3.61 mM, EDTA pH 8.0 1 mM, NP-40 0.03%, Glicerol 10%), 0.6 μ L de 50 mM ATP (Roche), 3 μ L de complejo remodelador o buffer de complejo remodelador (Tris-Cl pH 8.0 10 mM, NaCl 300 mM, Mg(CH₃COO)₂ 1 mM, Imidazol 1 mM, EGTA 2 mM, NP-40 0.1%, PMSF 0.5 mM, DTT 0.5 mM, Glicerol 10%) y 6.9 μ L de buffer de remodelación (HEPES-KOH pH 7.9 20 mM, KCl 57.3 mM, PMSF 0.5 mM, DTT 2 mM, NP-40 0.05%, Glicerol 8.7%, MgCl₂ 11 mM, BSA 100 μ g/mL). La mezcla se incubó 45 minutos a 30°C y luego se agregó 0.2 μ L de 3.75 μ g/ μ L ssDNA (*Salmon Sperm DNA*) más 0.5 μ L de 1 μ g/ μ L LON (*Long Oligonucleosomes*) y se incubó durante 20 minutos a 30°C. La mezcla se

dejó 5 minutos en hielo y se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida no denaturante al 5% (Ver sección 3.8).

En el caso de los ensayos de *Time Course*, las reacciones se incubaron a diferentes tiempos a 30°C, deteniendo la reacción con ssDNA y LON a las mismas concentraciones indicadas anteriormente. Luego se procedió de la misma manera indicada en el párrafo anterior.

Para el caso de los análisis usando enzimas de restricción (análisis de direccionalidad de *sliding*), una vez finalizada la incubación de remoción con ssDNA y LON, se procedió a agregar 10 U de la respectiva enzima de restricción y se incubó durante 30 minutos a 30°C. La mezcla se dejó 5 minutos en hielo y se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida no denaturante al 5% (Ver sección 3.8).

La actividad de *sliding* se cuantificó como la razón entre la señal de la sonda remodelada y la señal total de mononucleosoma en el carril. La actividad de *sliding* de cada condición fue normalizada respecto del promedio de *sliding* de todas las condiciones incluidas en un ensayo individual. De esta manera, el análisis toma en cuenta las variaciones globales de actividad que típicamente sufren los complejos remodeladores de cromatina purificados con el paso del tiempo.

La actividad de *eviction* se cuantificó como la razón entre la diferencia de señal de ADN libre (ADN libre de condición en presencia de complejo *menos* ADN libre de condición en ausencia de complejo) y la señal correspondiente a

ADN nucleosomal de la condición en ausencia de complejo. La actividad de *eviction* de cada condición fue normalizada respecto del promedio de *eviction* de todas las condiciones incluidas en un ensayo individual. De esta manera, el análisis toma en cuenta las variaciones globales de actividad que típicamente sufren los complejos remodeladores de cromatina purificados con el paso del tiempo.

3.9.4 Ensayos de remodelación en presencia de factores de transcripción

Para los ensayos de remodelación en presencia de factores de transcripción, el complejo ISW1a se incubó con Gal4-DBD, mientras que los complejos RSC y ySWI/SNF se incubaron con Gal4-VP16. Para la reacción se mezclaron 2.5 μ L (10 fmoles) de mononucleosoma marcado (Tris-Cl pH 7.4 10 mM, EDTA 1 mM, PMSF 0.5 mM, DTT 5 mM, NP-40 0.05%, Glicerol 10%, BSA 100 μ g/mL, NaCl 100 mM) con 1.5 μ L de factor o buffer de factor de transcripción (HEPES-KOH pH 7.4 10 mM, KCl 100 mM, NaCl 30 mM, Glicerol 20%, ZnCl₂ 10 μ M, Imidazol 10 mM, BSA 100 μ g/mL, NaH₂PO₄ 5 mM, DTT 1 mM, PMSF 0.2 mM), 0.5 μ L de buffer CADS (HEPES-KOH pH 7.5 6.96 mM, Tris-Cl pH 7.4 6.52 mM, NaCl 208.7 mM, PMSF 0.5 mM, DTT 3.61 mM, EDTA pH 8.0 1 mM, NP-40 0.03%, Glicerol 10%), 0.6 μ L de 50 mM ATP (Roche) y 6.9 μ L de buffer de remodelación (HEPES-KOH pH 7.9 20 mM, KCl 57.3 mM, PMSF 0.5 mM, DTT 2 mM, NP-40 0.05%, Glicerol 8.7%, MgCl₂ 11 mM, BSA 100 μ g/mL). La mezcla se incubó 20 minutos a 30°C y luego se agregó 3 μ L de

complejo remodelador o buffer de complejo remodelador (Tris-Cl pH 8.0 10 mM, NaCl 300 mM, Mg(CH₃COO)₂ 1 mM, Imidazol 1 mM, EGTA 2 mM, NP-40 0.1%, PMSF 0.5 mM, DTT 0.5 mM, Glicerol 10%) y se incubó durante 45 minutos a 30°C. Finalmente se agregó 0.2 µL de 3.75 µg/µL ssDNA (Salmon Sperm DNA), 0.5 µL de 1 µg/µL LON (Long Oligonucleosomes) y 0.3 µL de 100 µM de un fragmento de ADN con sitio de unión a Gal4, incubándose seguidamente durante 30 minutos a 30°C. Luego la mezcla se dejó 5 minutos en hielo y se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida no denaturante al 5% (Ver sección 3.8).

La actividad de *sliding* se cuantificó como la razón entre la señal de la sonda remodelada y la señal total de mononucleosoma en el carril. La actividad de *sliding* de cada condición fue normalizada respecto del promedio de *sliding* de todas las condiciones incluidas en un ensayo individual. De esta manera, el análisis toma en cuenta las variaciones globales de actividad que típicamente sufren los complejos remodeladores de cromatina purificados con el paso del tiempo.

La actividad de *eviction* se cuantificó como la razón entre la diferencia de señal de ADN libre (ADN libre de condición en presencia de complejo *menos* ADN libre de condición en ausencia de complejo) y la señal correspondiente a ADN nucleosomal de la condición en ausencia de complejo. La actividad de *eviction* de cada condición fue normalizada respecto del promedio de *eviction* de todas las condiciones incluidas en un ensayo individual. De esta manera, el

análisis toma en cuenta las variaciones globales de actividad que típicamente sufren los complejos remodeladores de cromatina purificados con el paso del tiempo.

3.10 Análisis bioinformático a nivel de genoma completo

El análisis bioinformático se realizó sobre parte de la data publicada por Krietenstein y col., 2016 (GSE72106) (Krietenstein y col., 2016). El mapeo lo realizamos usando el genoma de *Saccharomyces cerevisiae* S288C (sacCer3) y usamos la herramienta DANPOS para obtener las posiciones de los nucleosomas en la data en presencia de ADN e histonas (SGD) y en presencia de ADN, histonas e ISW1a (ISW1a). La data usada fue: SGD réplica 1 (SRR2164369), SGD réplica 2 (SRR2164396), ISW1a réplica 1 (SRR2164386) y ISW1a réplica 2 (SRR2164392).

Para la obtención del *dyad* del nucleosoma +1, buscamos el nucleosoma más cercano al TSS en una ventana de -80 a 140 pb. Posteriormente buscamos el *dyad* del nucleosoma -1 como el *peak* río arriba del *dyad* del nucleosoma +1 más cercano; todos los genes que no presentaron nucleosoma -1 en una distancia de 1000 pb se eliminaron. Esto se realizó para ambas condiciones. Posteriormente, se calculó la diferencia en la posición de los nucleosomas +1 en ausencia (SGD) y presencia de ISW1a, para obtener el grado de movimiento de los nucleosomas, y con esta información se generaron dos grupos de

promotores: los que mostraron movimiento del nucleosoma +1 20 o más pb río arriba y los que mostraron movimiento 20 o más pb río abajo. El mismo procedimiento se realizó para el caso del nucleosoma -1.

Luego, se descargó la secuencia FASTA de cada gen, en una ventana de -250 a 250 pb alrededor del *dyad* del nucleosoma +1, usando bedtools getfasta y descargando inmediatamente el reverso complementario de los genes de hebra negativa. La misma descarga se realizó en el caso del nucleosoma -1. Posteriormente se hizo la búsqueda de tractos poli A o poli T, para lo cual se consideró en la hebra sentido 6 o más nucleótidos seguidos (AAAAAA o TTTTTT) y se buscó en la secuencia fasta, usando la herramienta meme suit. Esta búsqueda se realizó para cada uno de los 6 grupos de genes creados (SGD nucleosoma -1; SGD nucleosoma +1; ISW1a-desplazamiento río arriba nucleosoma -1; ISW1a-desplazamiento río abajo nucleosoma -1; ISW1a-desplazamiento río arriba nucleosoma +1; ISW1a-desplazamiento río abajo nucleosoma +1). Estos tractos poliA y, separadamente, poliT encontrados se asignaron a ventanas de 25 nucleótidos que abordaron los 500 nucleótidos alrededor de los *dyad*, estableciéndose la frecuencia de presencia de tractos como el número de genes que presenta tracto en esa ventana dividido por el número total de genes del grupo en análisis. Finalmente, los gráficos se realizaron en Rstudio usando la librería ggplot2.

4. RESULTADOS

4.1 Determinar el efecto *in vitro* de los tractos poli (dA:dT) sobre la actividad remodeladora de nucleosomas de complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP

4.1.1 Purificación de complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP: ISW1a, RSC y ySWI/SNF

La purificación de los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP, se llevó a cabo usando la aproximación de purificación por afinidad en tándem (TAP) (Rigaut y col., 1999), como se explica en la sección 3.4. Las subunidades de los complejos usadas para la purificación son loc3, Rsc2 y Snf6 para ISW1a, RSC y ySWI/SNF, respectivamente, como se muestra en la Tabla 1. Para corroborar que cada cepa de levadura expresaba la respectiva subunidad con el epítipo correspondiente, se realizó un ensayo de western blot usando lisado total de cada cepa y un anticuerpo dirigido contra CBP (TAP Tag Polyclonal Antibody, CAB1001, Invitrogen). De esta manera, por el tamaño aparente se corroboró que las subunidades poseían el epítipo (Figura 12A). Una vez finalizada la purificación de los complejos, se analizó las etapas de la purificación para cada uno de los complejos: ISW1a (Figura 12B), RSC (Figura 13A) y ySWI/SNF (Figura 14A). En cada caso se puede observar

que, luego del corte con la enzima TEV proteasa y la pérdida de proteína A, aumenta la migración de la subunidad marcada. Una mezcla de todas las eluciones a 150 mM y 300 mM de NaCl se usó para verificar la concentración salina a la que eluyó principalmente el complejo. De igual manera se analizaron las eluciones individuales de cada concentración salina para ISW1a (Figura 12C), RSC (Figura 13B) y ySWI/SNF (Figura 14B), donde se puede observar la presencia de una banda minoritaria correspondiente a la subunidad sin la pérdida de proteína A, con excepción de la purificación de ySWI/SNF, donde se observa en una mayor proporción.

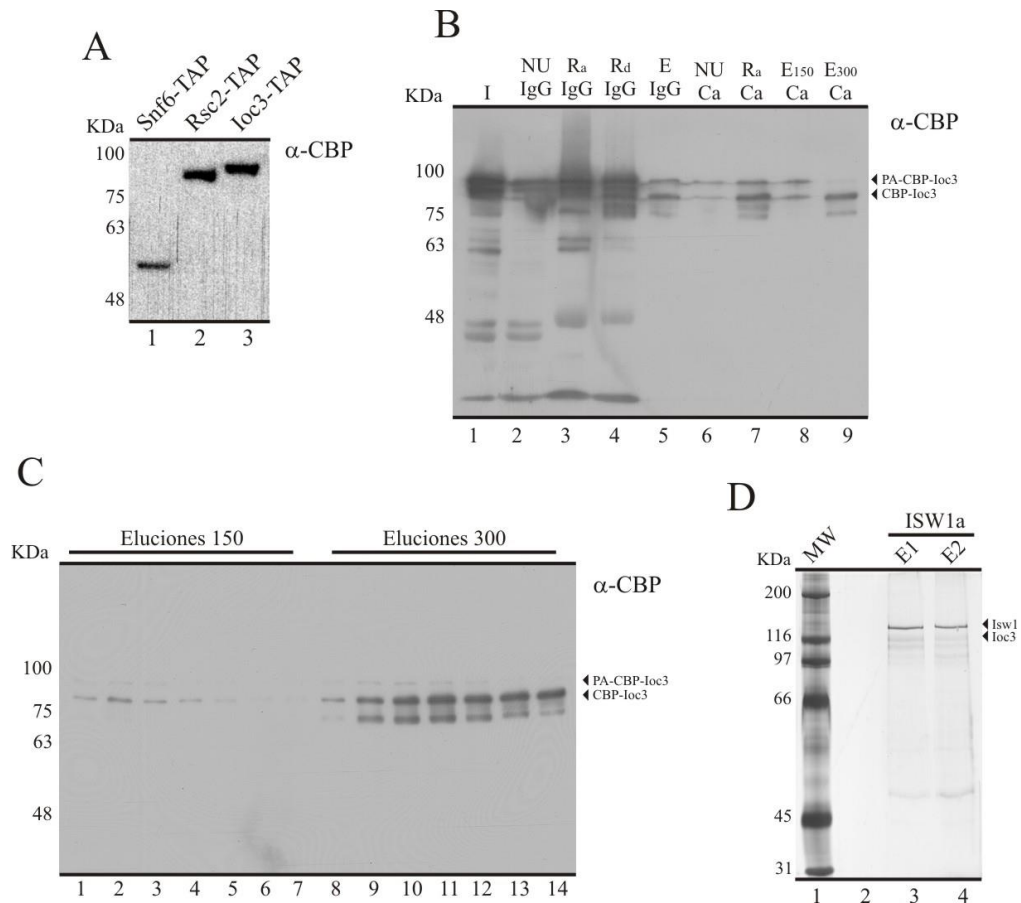


Figura 12: Purificación de ISW1a. **A)** Western blot de extractos celulares totales obtenidos de diferentes cepas de levaduras que expresan una subunidad de un complejo remodelador de cromatina dependiente de ATP con el epítipo Proteína A-CBP. **B)** Western blot de las etapas de purificación para ISW1a. A la derecha se indica la subunidad con el epítipo antes y después del corte con TEV proteasa. PA: Proteína A; CBP: Proteína de unión a calmodulina; I: Input; NU: No unido; Ra: Resina antes de eluir; Rd: Resina después de eluir; E: Elución; IgG: Resina IgG; Ca: Resina de calmodulina. **C)** Western blot de las eluciones obtenidas con el buffer que contiene 150 mM de NaCl y 300 mM de NaCl. **D)** Tinción con plata de las eluciones que se usaron para realizar los ensayos posteriores. A la derecha se indican las subunidades del complejo.

Tanto para ISW1a como para RSC, las eluciones más eficientes se obtuvieron con 300 mM de NaCl. De estas se analizó una alícuota de las dos mejores eluciones por tinción con plata (Figura 12D y Figura13C, respectivamente), para observar la integridad y la presencia de las subunidades de los complejos. Para el caso de γ SWI/SNF, las eluciones obtenidas fueron muy bajas en concentración proteica, lo que se tradujo en muy baja actividad de *sliding*. Por lo tanto, las eluciones que dieron presencia de complejo para 300 mM de NaCl se juntaron y concentraron (ver sección 3.4.3). Posteriormente se realizó tinción con plata (Figura 14C) para observar las subunidades del complejo. Para todos los complejos purificados, se realizaron ensayos de *sliding* para corroborar su funcionalidad.

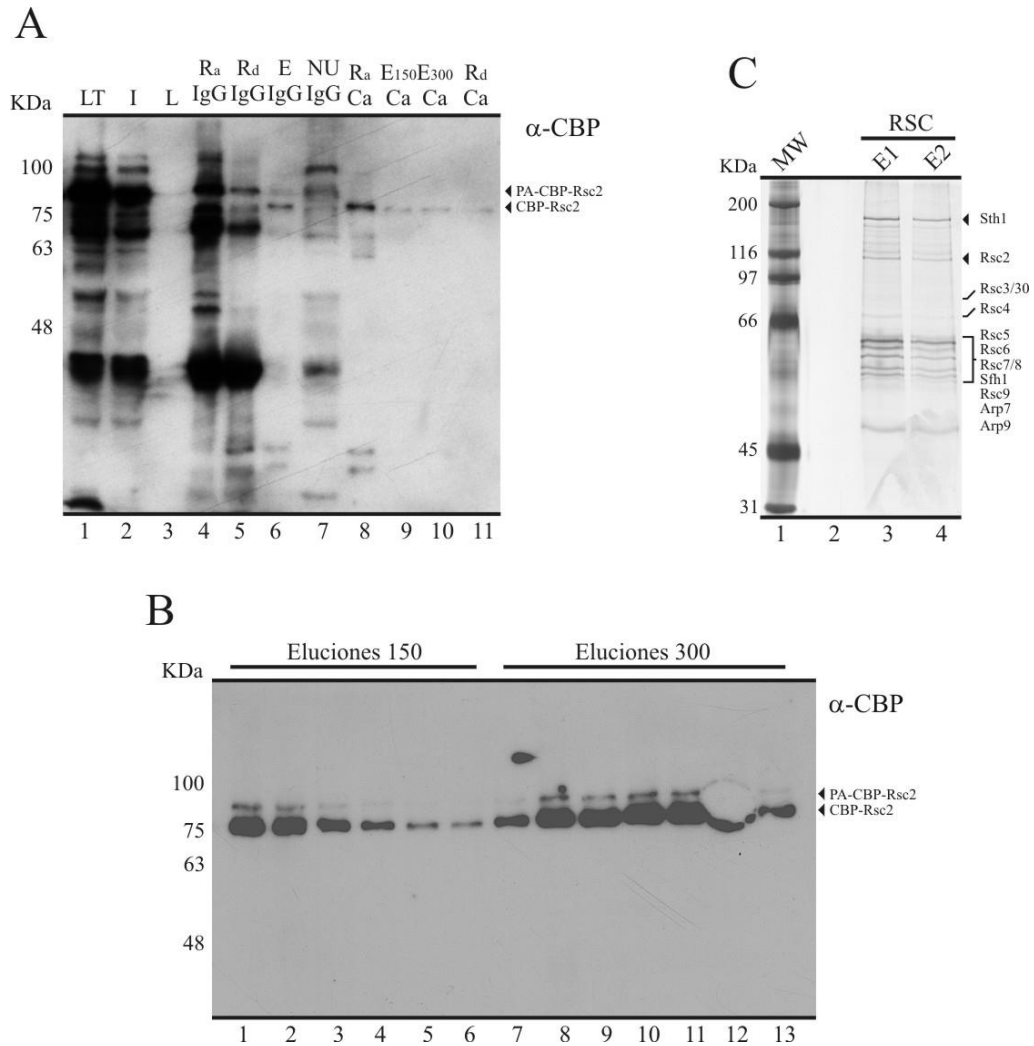


Figura 13: Purificación de RSC. **A)** Western blot de las etapas de purificación para RSC. A la derecha se indica la subunidad con el epítipo antes y después del corte con TEV proteasa. PA: Proteína A; CBP: Proteína de unión a calmodulina; LT: Lisado total; I: Input; L: Lavado; NU: No unido; Ra: Resina antes de eluir; Rd: Resina después de eluir; E: Elución; IgG: Resina IgG; Ca: Resina de calmodulina. **B)** Western blot de las eluciones obtenidas con el buffer que contiene 150 mM de NaCl y 300 mM de NaCl. **C)** Tinción con plata de las eluciones que se usaron para realizar los ensayos posteriores. A la derecha se indican las subunidades del complejo.

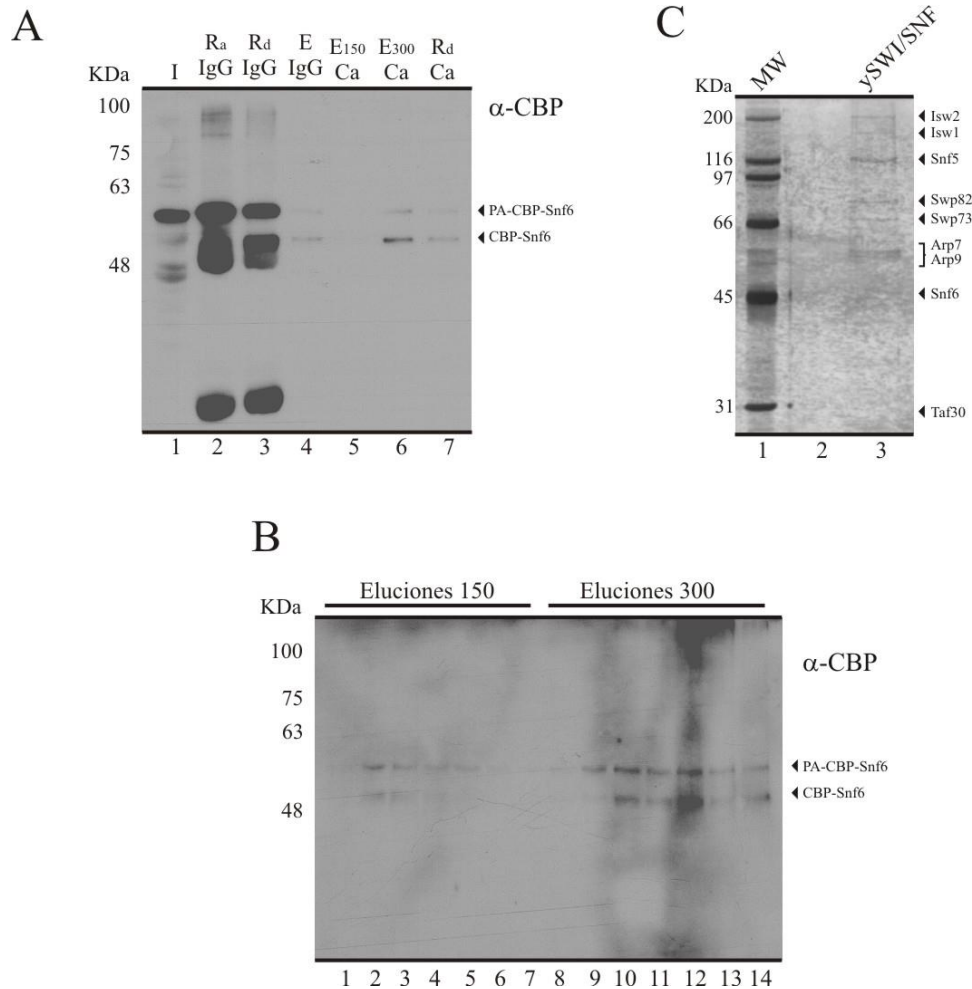


Figura 14: Purificación de ySWI/SNF. **A)** Western blot de las etapas de purificación para ySWI/SNF. A la derecha se indica la subunidad con el epítipo antes y después del corte con TEV proteasa. PA: Proteína A; CBP: Proteína de unión a calmodulina; I: Input; Ra: Resina antes de eluir; Rd: Resina después de eluir; E: Elución; IgG: Resina IgG; Ca: Resina de calmodulina. **B)** Western blot de las eluciones obtenidas con el buffer que contiene 150 mM de NaCl y 300 mM de NaCl. **C)** Tinción con plata de las eluciones de 300 mM de NaCl, luego de ser concentradas. Esta muestra se usó para realizar los ensayos posteriores. A la derecha se indican las subunidades del complejo.

4.1.2 Generación de sondas mononucleosomales

Para poder generar las sondas mononucleosomales, todos los subclonamientos se realizaron en un vector de origen que poseía la secuencia posicionadora 601 que fue descrita por el grupo del Dr. Widom (Lowary y Widom, 1998). Esta secuencia permite obtener un alto porcentaje de reconstitución nucleosomal y poder controlar la posición translacional del nucleosoma dentro de nuestra sonda de ADN.

Para realizar los experimentos se usaron diferentes sondas mononucleosomales dependiendo del enfoque analizado. Todas las sondas generadas se muestran en la Tabla 2 y un esquema de estas se mostrará en la respectiva figura donde fueron usadas. Una característica de estas es que pueden poseer un sitio de unión a Gal4 (17 pb) (Gutierrez y col., 2007) a 22 pb del *core nucleosomal*. En todos los casos hay que considerar el extremo 5' de la hebra superior (que, a su vez, es la marcada con ^{32}P) como la hebra dominante y la que se tomará en cuenta para nombrar las sondas. Los mononucleosomas reconstituidos se obtuvieron siguiendo el procedimiento descrito en la sección 3.7. En todos los casos se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida no denaturante (ver sección 3.8).

4.1.3 Efecto de tractos poli (dA:dT) sobre la actividad remodeladora de ISW1a

Al momento de realizar estos experimentos hay que tener en cuenta cómo ISW1a ejerce su actividad remodeladora. Este complejo es considerado del tipo “espaciador”, por lo que posee subunidades que funcionan como “regla molecular”, permitiendo dejar los nucleosomas con el mismo tamaño de ADN *linker* entre ellos (Clapier y Cairns, 2009; Clapier y col., 2017; Kubik y col., 2019; Ocampo y col., 2016). En una sonda mononucleosomal, este comportamiento se traduce en cambiar la posición translacional del octámero de histonas desde una posición lateral a posición central (con misma extensión de *linker* a ambos lados del *core nucleosomal*; Figura 15A).

Los experimentos con ISW1a se realizaron como se indica en la sección 3.9.3. Las sondas usadas en este caso se caracterizan por poseer 70 pb de ADN *linker* solamente por un extremo del nucleosoma; junto con poseer trectos poli (dA:dT) en diferentes orientaciones (Figura 15B). Al realizar los experimentos se puede observar que el desplazamiento del octámero de histonas de una posición lateral a central se refleja en una migración menor en la electroforesis (Figura 15C).

Al centrarnos en el efecto de los trectos poli (dA:dT) sobre la actividad de ISW1a, podemos observar que al estar presentes estas secuencias, disminuye la aparición de nucleosoma central, lo que refleja un freno a la actividad remodeladora de *sliding* del complejo (comparar carriles 2, 4 y 6, Figura 15C). Los grados de remodelación fueron cuantificados, confirmando el efecto observado (Figura 15D). Es de relevancia destacar que la sonda Nuc-(T15)70

frena la actividad remodeladora de ISW1a en mayor grado que la sonda Nuc-(A15)70 (Figuras 15C y D).

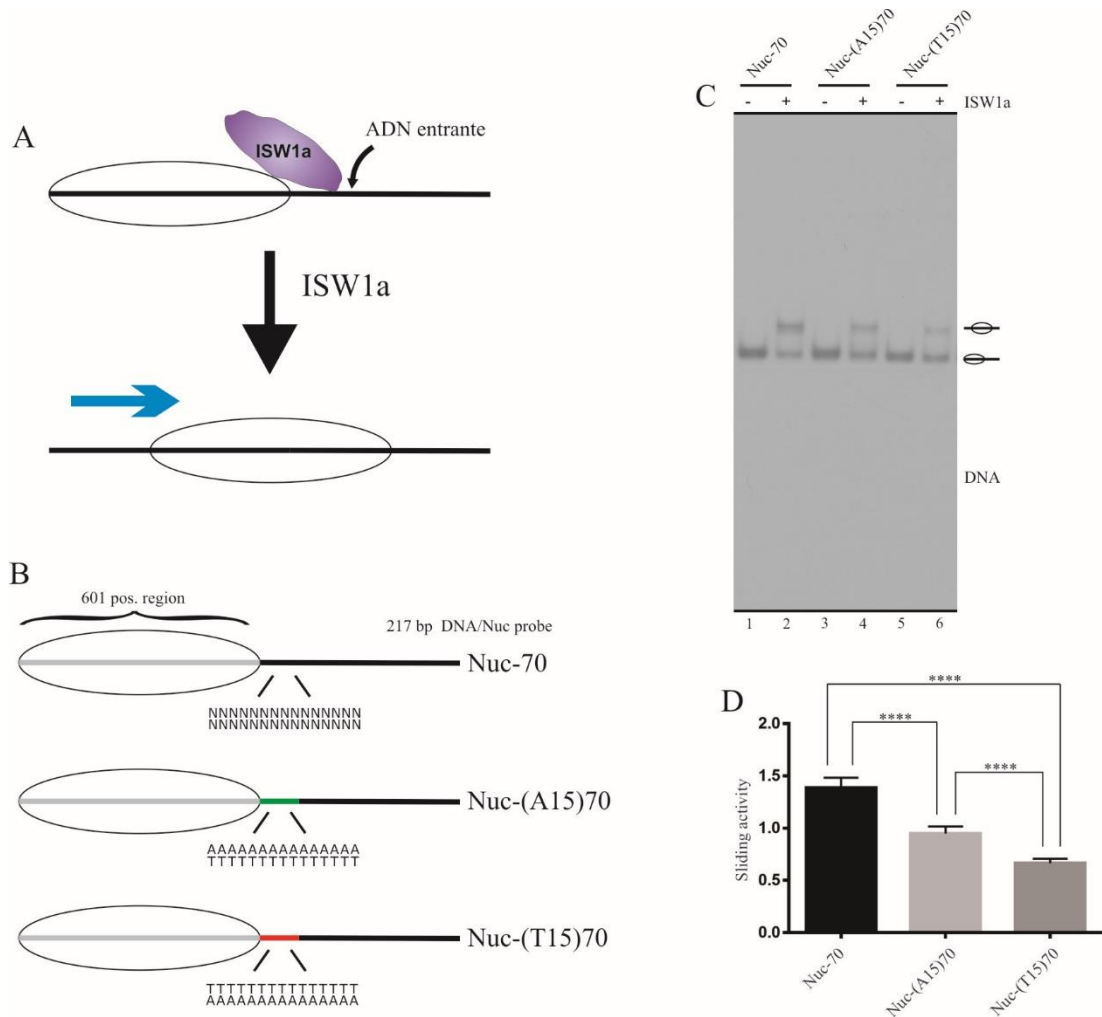


Figura 15: Los trectos poli (dA:dT) frenan la actividad de *sliding* de ISW1a. **A)** Representación esquemática del resultado de la remodelación de ISW1a sobre una sonda mononucleosomal lateral. El octámero de histonas es representado como un óvalo transparente y la flecha azul indica el movimiento del octámero de histonas luego de la remodelación. **B)** Representación esquemática de las sondas usadas en este análisis. El octámero de histonas es representado como un óvalo transparente, la línea gris representa el ADN nucleosomal y la

línea negra representa el ADN *linker* (70 pb). Los tractos poli (dA:dT) se representan por líneas verdes (poli A) o rojas (poli T) y poseen un tamaño de 15 pb. 601 pos. region: Secuencia posicionadora de nucleosomas 601 (147 pb). **C)** Ensayo de remodelación nucleosomal para observar la influencia de los tractos poli (dA:dT) sobre la actividad remodeladora de ISW1a. Las sondas usadas se indican en la parte superior de la figura. La imagen es representativa del ensayo realizado al menos tres veces. La migración de los diferentes estados del mononucleosoma se muestra a la derecha de la figura. **D)** El gráfico corresponde a la cuantificación de la actividad de *sliding* bajo cada condición. Las barras de error representan una desviación estándar. Los asteriscos denotan diferencias significativas (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$; $n = 3$) calculados mediante test ANOVA y comparación múltiple Tukey's.

4.1.4 Efecto de tractos poli (dA:dT) sobre la actividad remodeladora de RSC

El complejo RSC es considerado del tipo “despejador” (Kubik y col., 2019; Rawal y col., 2018) y al realizar su actividad sobre una sonda mononucleosomal, éste desplazará el octámero de histonas más allá de alguno de los extremos del ADN, lo cual considerando estudios de la estructura de RSC unido al nucleosoma (Chen y col., 2023; Wagner y col., 2020; Ye y col., 2019), debiera ser hacia el extremo 5' de la hebra superior (hebra marcada) (Figura 16A). Esto se evidenciará por una mayor migración de la sonda mononucleosomal respecto al mononucleosoma sin remodelar, a la cual denominamos como “Rem” (carril 2, Figura 16B). Se ha descrito que la

aparición de esta banda se debe a que el complejo mueve el octámero de histonas más allá del extremo del ADN, aproximadamente 51 pb del extremo (Flaus y Owen-Hughes, 2003; Kassabov y col., 2003).

Los experimentos con RSC se realizaron como se indica en la sección 3.9.3. Las sondas usadas para estos análisis se muestran en la Figura 15B. En primer lugar, se observa la aparición de una banda de mayor migración en los carriles en que está presente el complejo (carriles 2, 4, 6 y 8, Figura 16B), lo que corresponde a la sonda remodelada. En segundo lugar, las sondas que poseen un tracto poli (dA:dT) presentan una mayor presencia de la banda remodelada, lo que se traduce como un incremento en la actividad remodeladora de *sliding* (comparar carril 4 con 6 y 8, Figura 16B), lo que se verificó mediante densitometría de las bandas (Figura 16C). Cabe destacar que el aumento en la actividad de *sliding* es más pronunciado en la sonda Nuc-(T15)70 que en la sonda Nuc-(A15)70 (Figuras 16B y C); por otro lado, se observa una pérdida de señal en las sondas Nuc-(A15)70 y Nuc-(T15)70 (carril 6 y 8, Figura 16B), sin embargo, este fenómeno no se observó en otros modelos mononucleosomales usados (ver sección 4.1.10). Por último, y debido a que se demostró que los tractos poli (dA:dT) estimulan la actividad de *eviction* del complejo RSC (Lorch y col., 2014), dispusimos cuantificar esta actividad considerando la aparición de ADN desnudo al agregar RSC. Sin embargo, como se observa en la Figura 16B, en ningún caso se aprecia aparición de ADN

desnudo, lo cual se confirmó al cuantificar y no encontrar diferencias significativas (Figura 16D).

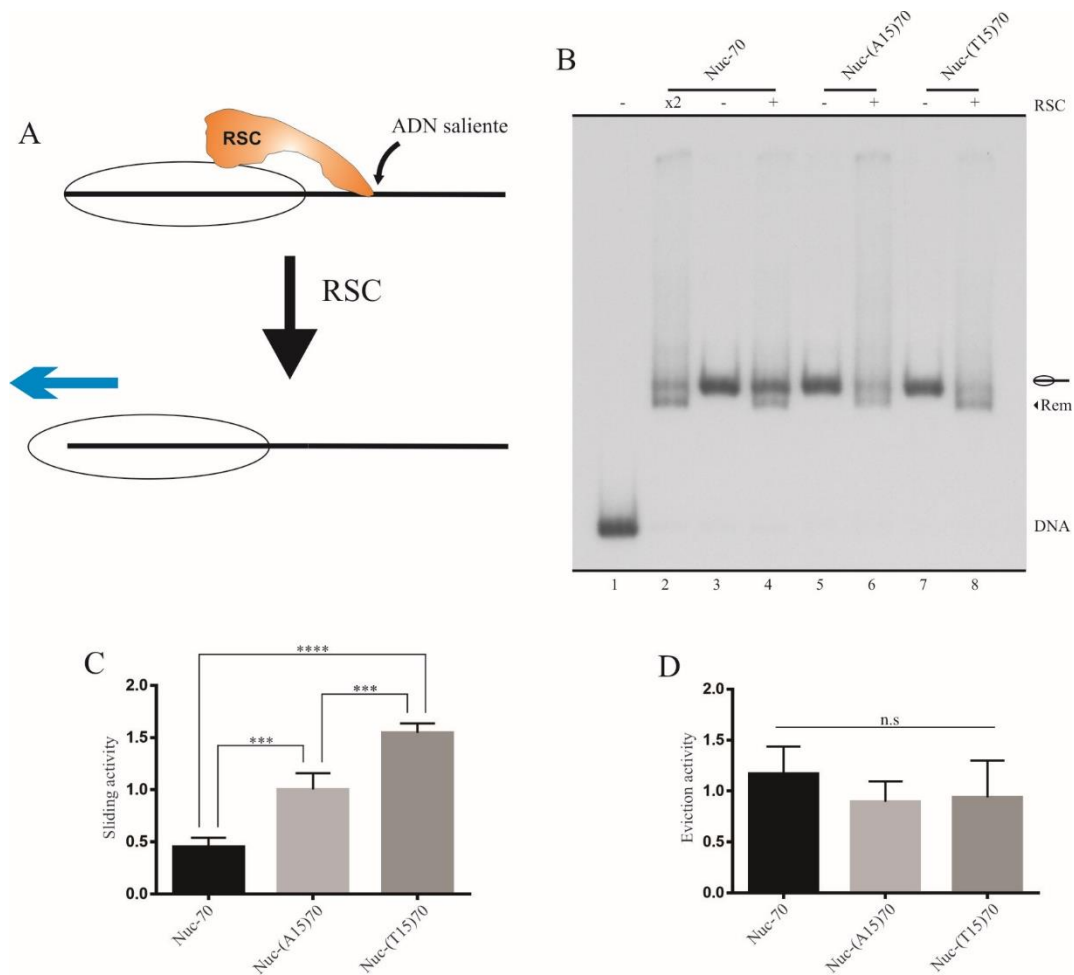


Figura 16: Los tracts poli (dA:dT) estimulan la actividad de *sliding* de RSC. A) Representación esquemática del resultado de la remodelación de RSC sobre una sonda mononucleosomal lateral, considerando las estructuras unidas al nucleosoma obtenidas por cryo-EM (Wagner y col., 2020; Ye y col., 2019). El octámero de histonas es representado como un óvalo transparente y la flecha azul indica el movimiento del octámero de histonas luego de la remodelación. **B)** Ensayo de remodelación nucleosomal para observar la influencia de los tracts poli (dA:dT) sobre la actividad de RSC. Las sondas usadas se indican en la parte superior de la figura y corresponden a las mostradas en la Figura 15B. La imagen es

representativa del ensayo realizado al menos tres veces. La migración de los diferentes estados del mononucleosoma se muestra a la derecha de la figura. **C)** El gráfico corresponde a la cuantificación de la actividad de *sliding* bajo cada condición. Las barras de error representan una desviación estándar. Los asteriscos denotan diferencias significativas (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$; $n = 3$) calculados mediante test ANOVA y comparación múltiple Tukey's. **D)** El gráfico corresponde a la cuantificación de la actividad de *eviction* bajo cada condición. Las barras de error representan una desviación estándar. No se encontraron diferencias significativas (n.s: no significativo) calculados mediante test ANOVA y comparación múltiple Tukey's.

4.1.5 Efecto de tractos poli (dA:dT) sobre la actividad remodeladora de γ SWI/SNF

El complejo γ SWI/SNF es considerado un complejo del tipo “despejador” (Kubik y col., 2019; Rawal y col., 2018) y su estructura unida al nucleosoma ha sido resuelta (Dechassa y col., 2008; Han y col., 2020; He y col., 2021). De la misma manera que para RSC, el movimiento del octámero de histonas debiera ser hacia el extremo 5' de la hebra superior (hebra marcada) (Chen y col., 2023; He y col., 2021) (Figura 17A).

Los ensayos con γ SWI/SNF se realizaron como se indica en la sección 3.9.3. Las sondas usadas para estos análisis se muestran en la Figura 15B. Al realizar los experimentos se puede notar que el complejo γ SWI/SNF purificado posee una baja actividad en la sonda control (Nuc-70) (carril 3, Figura 17B),

pero de igual manera se logra observar una pequeña estimulación de su actividad de *sliding* al estar presente los tractos poli (dA:dT) (comparar carril 3 con 5 y 7, Figura 17B). La actividad de *sliding* se cuantificó, confirmando la estimulación observada al estar presentes los tractos poli (dA:dT) (Figura 17C). Sin embargo, no se aprecian diferencias entre las sondas Nuc-(A15)70 y Nuc-(T15)70 (Figuras 17B y C).

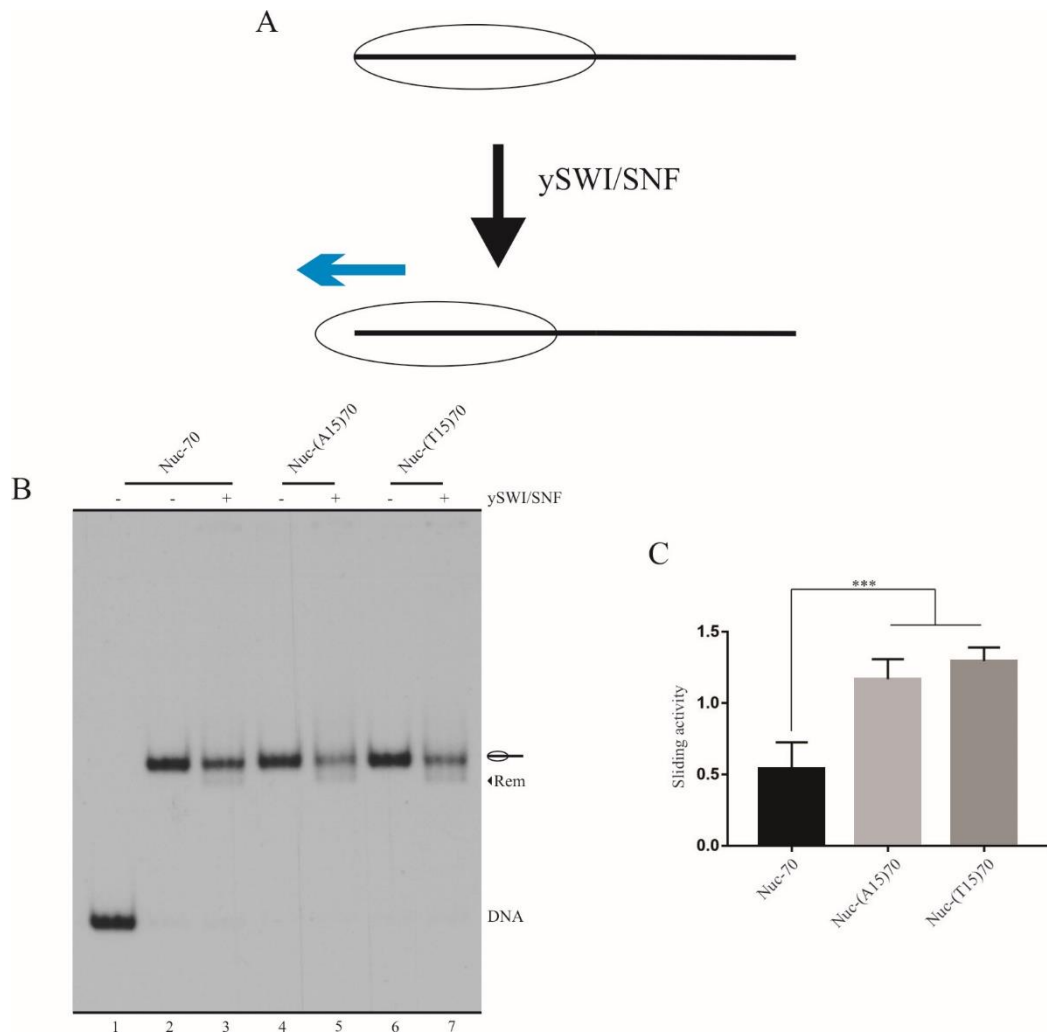


Figura 17: Los tractos poli (dA:dT) estimulan la actividad de *sliding* de ySWI/SNF. A) Representación esquemática del resultado de la remodelación de ySWI/SNF sobre una sonda mononucleosomal lateral. El octámero de histonas es representado como un óvalo transparente y la flecha azul indica el movimiento del octámero de histonas luego de la remodelación. **B)** Ensayo de remodelación nucleosomal para observar la influencia de los tractos poli (dA:dT) sobre la actividad remodeladora de ySWI/SNF. Las sondas usadas se indican en la parte superior de la figura y corresponden a las mostradas en la Figura 15B. La imagen es representativa del ensayo realizado al menos tres veces. La migración de los diferentes estados del mononucleosoma se muestra a la derecha de la figura. **C)** El gráfico corresponde a la

cuantificación de la actividad de *sliding* bajo cada condición. Las barras de error representan una desviación estándar. Los asteriscos denotan diferencias significativas (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$; $n = 3$) calculados mediante test ANOVA y comparación múltiple Tukey's.

4.1.6 Efecto del tamaño de los trectos poli (dA:dT) sobre la actividad remodeladora de ISW1a y RSC

Debido a que los resultados anteriores mostraron que los trectos poli (dA:dT) tienen un efecto sobre la actividad de los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP abordados en este estudio, se procedió a acortar el tamaño de éstos para determinar la extensión mínima con la que se mantiene el efecto observado. Para estos ensayos solo se usaron los complejos ISW1a y RSC, ya que γ SWI/SNF presentó una baja actividad remodeladora.

En primer lugar se diseñaron sondas mononucleosomales de 217 pb que comparten las mismas características que las sondas usadas en los ensayos anteriores (ver sección 4.1.2), con la única diferencia en el tamaño de los trectos poli (dA:dT) usados: 5, 10 y 15 pb (Figura 18A). Estas sondas se generaron como se explica en la sección 3.7.

En el caso de ISW1a, podemos observar que el grado de remodelación obtenido tanto con la sonda Nuc-(A5)70 como la sonda Nuc-(T5)70, no se diferencia del obtenido con la sonda control Nuc-70 (comparar carril 2 con 4 y

10, Figura 18B; Figura 18C). Sin embargo, con las sondas que poseen los tractos de 10 pb ya se puede observar el mismo efecto de frenado observado para las sondas que poseen los tractos de 15 pb (comparar carril 2 con 6 y 12, Figura 18B y Figura 18C). Cabe destacar que no se encontraron diferencias entre las sondas de 10 y 15 pb, tanto para las sondas poli A (comparar carril 6 y 8, Figura 18B; Figura 18C) como para las sondas poli T (comparar carril 12 y 14, Figura 18B; Figura 18C). También se puede observar que se mantiene el efecto otorgado por la orientación, en donde poli T frena en mayor medida que poli A (Figura 18C).

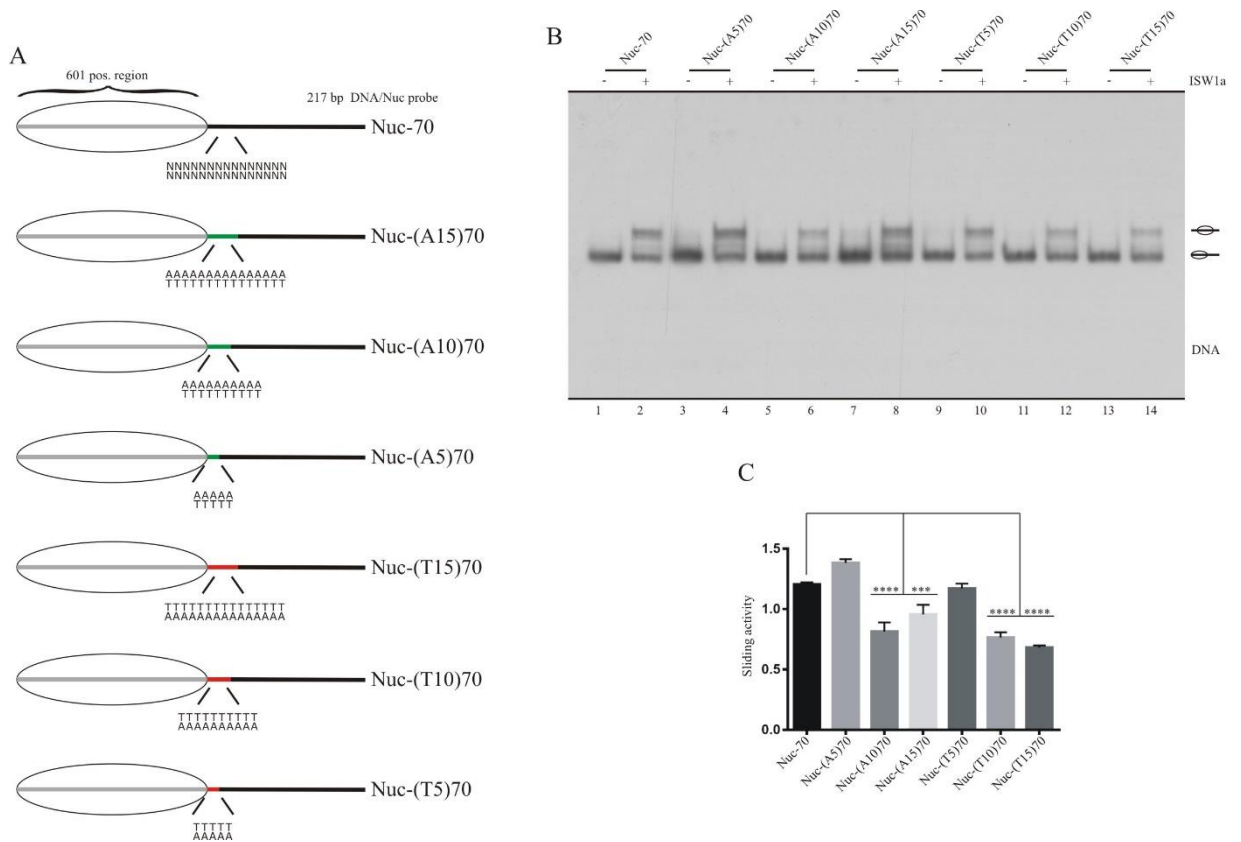


Figura 18: El efecto observado sobre ISW1a depende del tamaño de los tracts poli (dA:dT). **A)** Representación esquemática de las sondas usadas en este análisis. El octámero de histonas es representado como un óvalo transparente, la línea gris representa el ADN nucleosomal y la línea negra representa el ADN *linker* (70 pb). Los tracts poli (dA:dT) se representan por líneas verdes (poli A) o rojas (poli T) y poseen un tamaño de 5, 10 y 15 pb, respectivamente. 601 pos. region: Secuencia posicionadora de nucleosomas 601 (147 pb). **B)** Ensayo de remodelación nucleosomal para observar el efecto del tamaño de los tracts poli (dA:dT) sobre la actividad remodeladora de ISW1a. Las sondas usadas se indican en la parte superior de la figura. La imagen es representativa del ensayo realizado al menos tres veces. La migración de los diferentes estados del mononucleosoma se muestra a la derecha de la figura. **C)** El gráfico corresponde a la cuantificación de la actividad de *sliding* bajo cada condición. Las barras de error representan una desviación estándar. Los asteriscos denotan

diferencias significativas (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$; $n = 3$) calculados mediante test ANOVA y comparación múltiple Tukey's.

Para el caso de RSC, solo probamos las sondas poli T, ya que los resultados para ISW1a nos mostraron que disminuir el tamaño del tracto no afecta las diferencias dadas por la orientación. De la misma manera que con ISW1a, observamos que no existen diferencias entre los grados de remodelación obtenido para las sondas Nuc-70 y Nuc-(T5)70 (comparar carril 2 y 4, Figura 19A; Figura 19B), pero sí pudimos observar un efecto de estimulación de *sliding* en la sonda Nuc-(T10)70, al igual que para la sonda Nuc-(T15)70 (comparar carril 2 con 6 y 8, Figura 19A; Figura 19B). Además, similar a ISW1a, no existen diferencias entre la sonda Nuc-(T10)70 y Nuc-(T15)70 (Figura 19B).

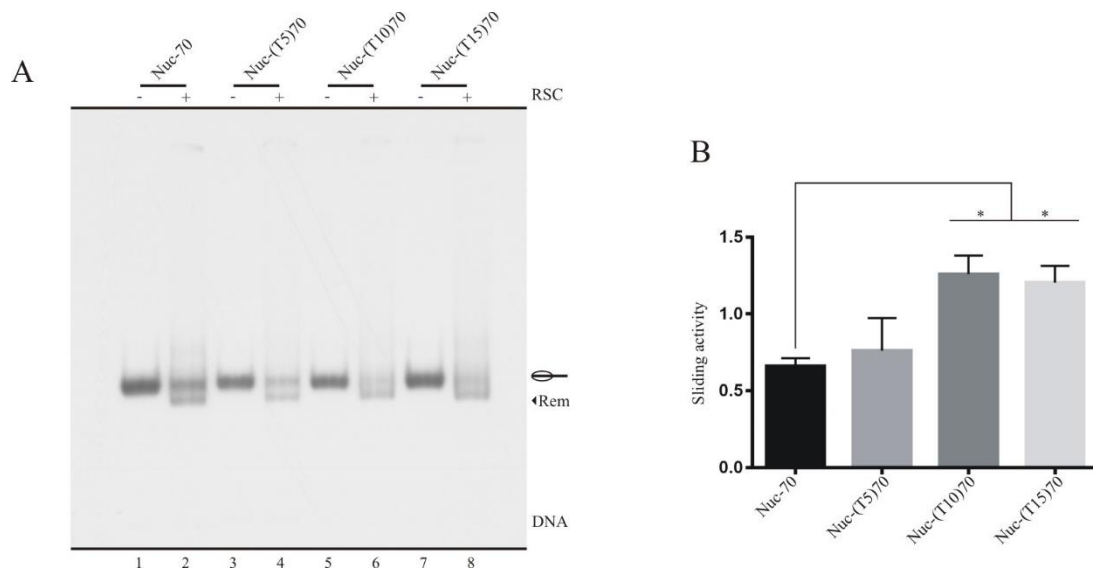


Figura 19: El efecto observado sobre RSC depende del tamaño de los trectos poli (dA:dT). **A)** Ensayo de remodelación nucleosomal para observar el efecto del tamaño de los trectos poli (dA:dT) sobre la actividad remodeladora de RSC. Las sondas usadas se indican en la parte superior de la figura y corresponden a las mostradas en la Figura 18A. La imagen es representativa del ensayo realizado al menos tres veces. La migración de los diferentes estados del mononucleosoma se muestra a la derecha de la figura. **B)** El gráfico corresponde a la cuantificación de la actividad de *sliding* bajo cada condición. Las barras de error representan una desviación estándar. Los asteriscos denotan diferencias significativas (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$; $n = 3$) calculados mediante test ANOVA y comparación múltiple Tukey's.

Dado los resultados obtenidos con los trectos poli (dA:dT) de tamaño 5 y 10 pb, nos propusimos usar un tamaño intermedio entre ambos, ya que con el tamaño de 5 pb no observamos efecto y con el tamaño de 10 pb observamos un efecto igual al tamaño de 15 pb. De esta manera, realizamos el mismo

experimento usando un tamaño de 7 pb solo con la orientación poli T (Figura 20A). En el caso de ISW1a existe un freno de la actividad de *sliding* al estar presente el tracto de 7 pb, pero en menor grado al efecto observado con el tamaño de 15 pb (comparar carril 5 con 3 y 7, Figura 20B; Figura 20C). Para el caso de RSC, se puede observar un grado bajo de estimulación de *sliding* con el tracto de 7pb (comparar carril 3 y 5, Figura 20D); sin embargo, esta pequeña estimulación resultó no ser estadísticamente significativa (Figura 20E).

Figura 20: Análisis del efecto de tractos poli (dA:dT) de 7 pb sobre la actividad de ISW1a y RSC. A) Representación esquemática de las sondas usadas en este análisis. El octámero de histonas es representado como un óvalo transparente, la línea gris representa el ADN nucleosomal y la línea negra representa el ADN *linker* (70 pb). Los tractos poli T se representan por líneas rojas y poseen un tamaño de 7 y 15 pb, respectivamente. 601 pos. region: Secuencia posicionadora de nucleosomas 601 (147 pb). **B y D)** Ensayos de remodelación nucleosomal para observar el efecto del tamaño de los tractos poli (dA:dT) sobre la actividad remodeladora de ISW1a (B) y RSC (D). Las sondas usadas se indican en la parte superior de las figuras. Las imágenes son representativas de cada ensayo realizado al menos tres veces. La migración de los diferentes estados del mononucleosoma se muestra a la derecha de la figura. **C y E)** Los gráficos corresponden a la cuantificación de la actividad de *sliding* bajo cada condición. Las barras de error representan una desviación estándar. Los asteriscos denotan diferencias significativas (** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$; $n = 3$) calculados mediante test ANOVA y comparación múltiple Tukey's.

4.1.7 Análisis recíproco de la orientación de los tractos poli (dA:dT) respecto al nucleosoma, para el efecto observado sobre ISW1a y RSC

Durante los experimentos realizados anteriormente, las sondas mononucleosomales contaban con el ADN *linker* por el extremo 3' del *core nucleosomal* (siempre considerando la hebra superior como la de referencia), en donde observamos que la orientación poli T (Nuc-T15-70) presentaba un mayor efecto que la orientación poli A (Nuc-A15-70) en frenar la actividad de ISW1a y estimular la de RSC (Figuras 15 y 16, respectivamente). Por lo tanto, si

el fenómeno es real y las diferencias observadas entre poli T y poli A dependen de la orientación de estas secuencias respecto al nucleosoma, al cambiar el ADN *linker* al lado 5' del nucleosoma, deberíamos observar que poli A tiene un mayor efecto sobre los complejos. Para ello tenemos que tomar en cuenta el eje de simetría doble que posee el nucleosoma (Figura 21A) (Davie, 1998; Koyama y Kurumizaka, 2018; Luger y col., 1997; Richmond y Davey, 2003; Trifonov, 2011; Zheng y Hayes, 2003). Para corroborar esta hipótesis diseñamos una nueva serie de sondas mononucleosomales con el ADN *linker* por el extremo 5' del nucleosoma (Figura 21B). Considerando el eje de simetría doble del nucleosoma, la sonda Nuc-(A15)70 sería equivalente a la sonda 70(T15)-Nuc y la sonda Nuc-(T15)70 sería equivalente a la sonda 70(A15)-Nuc.

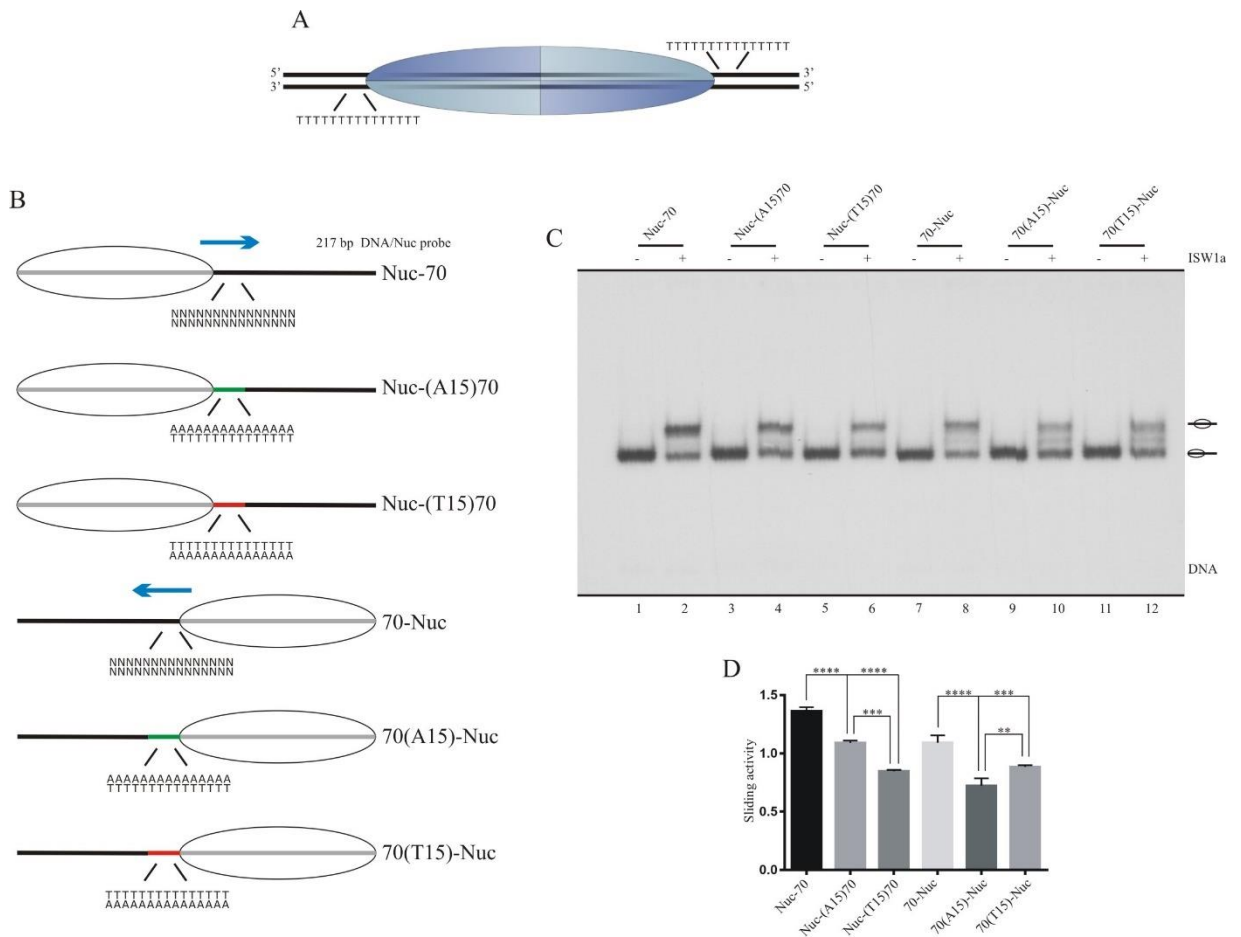


Figura 21: El máximo efecto de freno sobre ISW1a depende de cómo el tracto se oriente respecto al nucleosoma. A) Representación esquemática del eje de simetría doble del nucleosoma. El octámero de histonas está coloreado para representar la simetría existente. Se muestra cómo un tracto poli T al extremo 3' del nucleosoma en la hebra "sentido", es equivalente a un tracto poli A por el extremo 5' del nucleosoma en la hebra "antisentido" (considerando la nomenclatura explicada en la sección 4.1.2). **B)** Representación esquemática de las sondas usadas en este análisis. El octámero de histonas es representado como un óvalo transparente, la línea gris representa el ADN nucleosomal, la línea negra representa el ADN *linker* (70 pb) y las flechas azules muestran la dirección de movimiento del octámero de histonas en presencia de ISW1a. Los tracts poli A se representan por líneas verdes, mientras que los tracts poli T se representan con líneas rojas. Todas las sondas poseen un tamaño de

217 pb y poseen tractos de 15 pb. **C)** Ensayo de remodelación nucleosomal para observar cómo la orientación de los tractos poli (dA:dT) respecto del nucleosoma influye sobre la actividad remodeladora de ISW1a. Las sondas usadas se indican en la parte superior de la figura. La imagen es representativa del ensayo realizado al menos tres veces. La migración de los diferentes estados del mononucleosoma se muestra a la derecha de la figura. **D)** El gráfico corresponde a la cuantificación de la actividad de *sliding* bajo cada condición. Las barras de error representan una desviación estándar. Los asteriscos denotan diferencias significativas (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$; $n = 3$) calculados mediante test ANOVA y comparación múltiple Tukey's.

En primer lugar, podemos observar que la sonda que tiene el ADN *linker* por el extremo 5' presenta un grado de remodelación menor que el de la sonda con el ADN *linker* por el extremo 3' (comparar carril 2 con 8, Figura 21C). Este fenómeno es normal al usar la secuencia 601, ya que se ha descrito que la remodelación está más favorecida hacia un extremo de ésta (Winger y Bowman, 2017). Es además otro motivo para realizar el análisis recíproco, para descartar que los efectos de los tracts encontrados al estar corriente abajo del *core nucleosomal* no estaban influenciados por la secuencia 601 en sí. Al realizar los experimentos con ISW1a, se demuestra que el efecto de freno provocado por los tractos poli (dA:dT) se mantiene al estar el *linker* por el extremo 5' del nucleosoma (comparar carril 8 con 10 y 12, Figura 21C). Además, la sonda que presenta un mayor efecto de freno por el extremo 5' es 70(A15)-Nuc (comparar carril 10 y 12, Figura 21C), la cual según lo observado

en la Figura 21A, es equivalente a la sonda Nuc-(T15)70, que presenta un mayor freno por el extremo 3' del nucleosoma. En la Figura 21D se puede observar las cuantificaciones de las sondas utilizadas.

En el caso de RSC, podemos observar el mismo patrón encontrado para ISW1a, solo que en este caso es estimulación de la actividad de *sliding* al estar presente los tractos poli (dA:dT). Por lo tanto, el mayor efecto de estimulación sobre RSC se da con las sondas Nuc-(T15)70 (ADN *linker* por el lado 3' del *core*) y 70(A15)-Nuc (ADN *linker* por el lado 5' del *core*) (Figuras 22B y C).

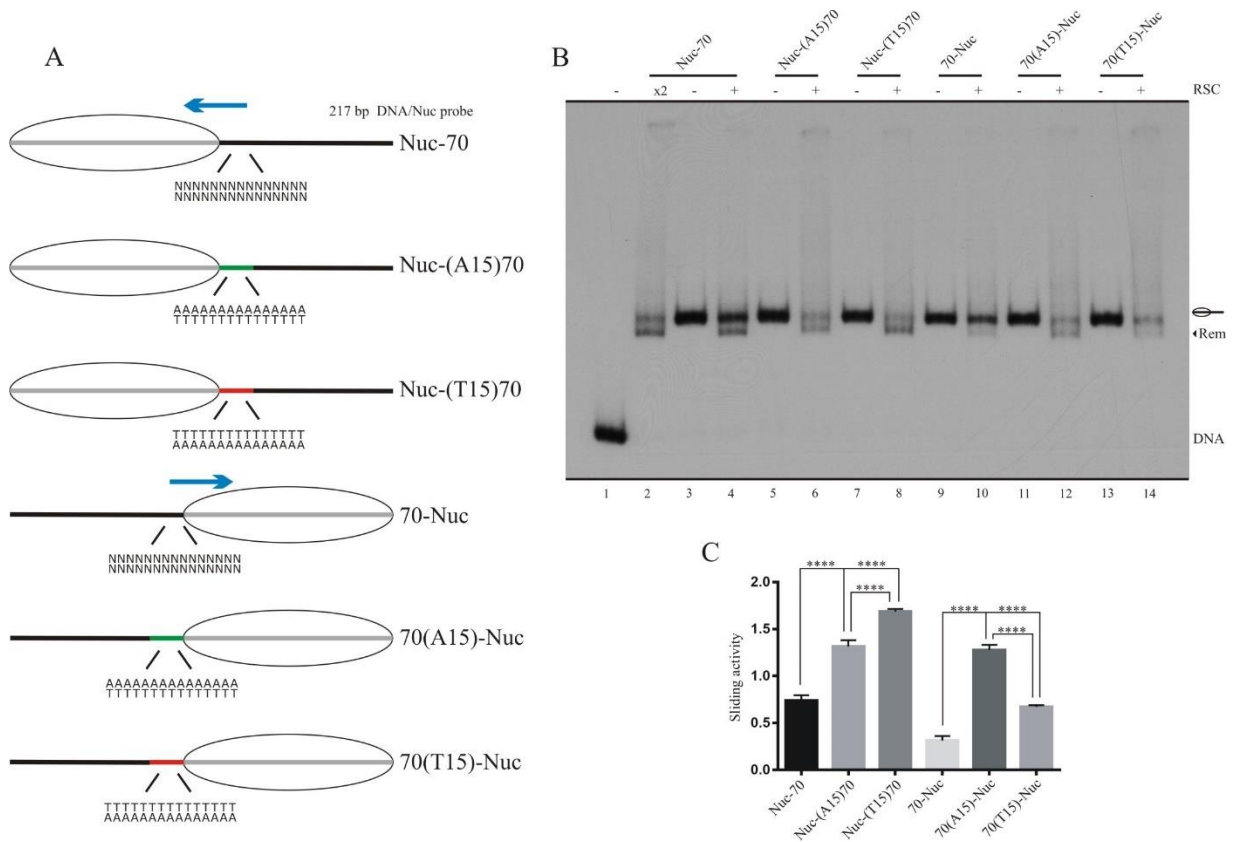


Figura 22: El máximo efecto de estimulación sobre RSC depende de cómo el tracto se oriente respecto al nucleosoma. A) Representación esquemática de las sondas usadas en este análisis. El octámero de histonas es representado como un óvalo transparente, la línea gris representa el ADN nucleosomal, la línea negra representa el ADN *linker* (70 pb) y las flechas azules muestran la dirección de movimiento del octámero de histonas descrito en este tipo de sondas para RSC. Los trectos poli A se representan por líneas verdes, mientras que los trectos poli T se representan con líneas rojas. Todas las sondas poseen un tamaño de 217 pb y poseen trectos de 15 pb. **B)** Ensayo de remodelación nucleosomal para observar cómo la orientación de los trectos poli (dA:dT) respecto el nucleosoma influye sobre la actividad remodeladora de RSC. La imagen es representativa del ensayo realizado al menos tres veces. La migración de los diferentes estados del mononucleosoma se muestra a la derecha de la figura. **C)** El gráfico corresponde a la cuantificación de la actividad de *sliding* bajo cada condición. Las barras de

error representan una desviación estándar. Los asteriscos denotan diferencias significativas (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$; $n = 3$) calculados mediante test ANOVA y comparación múltiple Tukey's.

4.1.8 Efecto de la distancia entre los tractos poli (dA:dT) y el nucleosoma, sobre la actividad remodeladora de ISW1a y RSC

En todos los experimentos anteriores los tractos poli (dA:dT) estaban adyacentes al *core nucleosomal*, lo cual no necesariamente representa todos los casos encontrados en un contexto *in vivo*. Por esta razón quisimos observar si el efecto de los tractos poli (dA:dT) de frenar la actividad de ISW1a y estimular la de RSC, se ve afectada al aumentar la distancia (en términos de extensión de ADN) entre estas secuencias y la región del *core nucleosomal*. Hay que considerar que, debido a la naturaleza de los complejos, la interacción de estos con el ADN *linker* se dan a diferentes distancias del borde del *core nucleosomal* y conducen a movimientos en direcciones contrarias (Figuras 15A y 16A). En el caso de ISW1a, la interacción ocurre más fuertemente con el ADN *linker* entrante a una distancia de entre 5 a 20 pb del borde del *core nucleosomal* (Gangaraju y Bartholomew, 2007), por lo que, la dirección del movimiento será hacia el tracto poli (dA:dT) (Figura 15A). En el caso de RSC, la interacción es con el ADN *linker* saliente a una distancia de entre 20 a 40 pb del borde del *core nucleosomal* (Wagner y col., 2020), por lo que en nuestro caso al

tener ADN *linker* por solo un lado del nucleosoma, el movimiento será en dirección contraria al tracto poli (dA:dT) (Figura 16A). Por lo tanto, la información obtenida de estos resultados será relevante para entender el mecanismo de acción de estas secuencias.

En este experimento diseñamos sondas alterando la distancia entre los tractos poli (dA:dT) y el *core nucleosomal*, las distancias usadas fueron 0, 19 y 40 pb. Para todos los casos usamos la orientación poli T en hebra superior para presencia de *linker* corriente abajo del *core*, ya que es la orientación que mostró un mayor efecto sobre ambos complejos. El tamaño de los tractos es de 15 pb y las sondas poseen un tamaño de 217 pb (Figura 23A). Se puede observar para el caso de ISW1a, que el efecto de freno que los tractos poli (dA:dT) tienen sobre la actividad de *sliding* se pierde al alejar estas secuencias del *core nucleosomal* (comparar carril 3 con 7 y 9, Figura 23B; Figura 23C). Cabe consignar para ISW1a, que el octámero de histonas se tiene que movilizar alrededor de 35 pb para que el mononucleosoma quede en una posición central. Por lo tanto, en la sonda Nuc-40(T15)70 el tracto nunca va a ser parte del ADN nucleosomal y en la sonda Nuc-19(T15)70 el tracto apenas va a entrar a ser parte del ADN nucleosomal, llegando aproximadamente hasta la posición SHL6 (ver Figura 2B para revisión de las posiciones dentro del nucleosoma). Para el caso de la sonda Nuc-(T15)70, el tracto poli (dA:dT) podría llegar aproximadamente hasta SHL4. Además, y contrario a lo observado en resultados anteriores, en la sonda Nuc-40(T15)70 existe una pequeña

estimulación de la actividad de *sliding* (Figura 23C) y en la sonda Nuc-19(T15)70 se observa más marcada la aparición de una población de transición entre la población lateral y central (ver carril 7, Figura 23B).

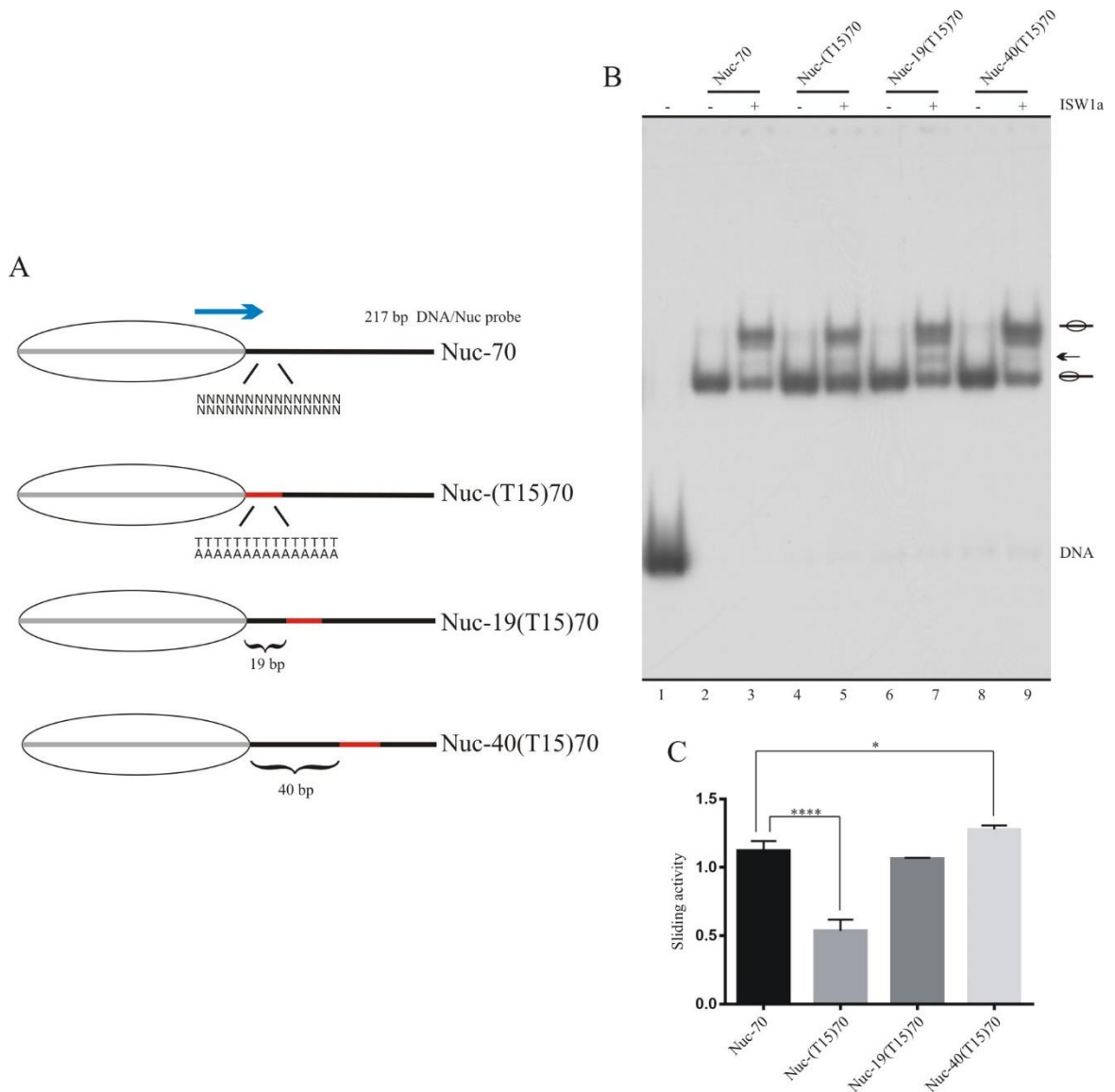


Figura 23: El efecto observado sobre ISW1a depende de la distancia entre los tracts poli (dA:dT) y el nucleosoma. A) Representación esquemática de las sondas usadas en este análisis. El octámero de histonas es representado como un óvalo transparente, la línea gris representa el ADN nucleosomal y la línea negra representa el ADN *linker* (70 pb). Los tracts

poli T se representan por líneas rojas. La flecha azul representa el movimiento del octámero de histonas mediada por la acción de ISW1a. Todas las sondas poseen un tamaño de 217 pb y poseen tractos de 15 pb. Las distancias usadas fueron 0, 19 y 40 pb. **B)** Ensayo de remodelación nucleosomal para observar el efecto de la distancia entre los tractos poli (dA:dT) y el *core nucleosomal* sobre la actividad remodeladora de ISW1a. Las sondas usadas se indican en la parte superior de la figura. La flecha indica la aparición de una población semi-central. La imagen es representativa del ensayo realizado al menos tres veces. La migración de los diferentes estados del mononucleosoma se muestra a la derecha de la figura. **C)** El gráfico corresponde a la cuantificación de la actividad de *sliding* bajo cada condición. Las barras de error representan una desviación estándar. Los asteriscos denotan diferencias significativas (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$; $n = 3$) calculados mediante test ANOVA y comparación múltiple Tukey's.

En el caso de RSC se observó un resultado interesante, ya que la estimulación de la actividad de *sliding* se mantuvo incluso con el tracto poli T a 40 pb de distancia del *core nucleosomal* (comparar carril 3 con 5, 7 y 9, Figura 24B; Figura 24C), aunque a esta distancia ya se comienza a observar una disminución en la estimulación, en comparación a distancias más cercanas (comparar carril 9 con 5 y 7, Figura 24B; Figura 24C). Hay que considerar que en estos casos, por acción de RSC, el octámero de histonas se estaría alejando de los tractos poli (dA:dT), ya que estos se encuentran en el lado del único *linker* que poseen estas sondas (Figura 24A). Entre las distancias de 0 pb y 19 pb no existen diferencias (comparar carril 5 y 7, Figura 24B; Figura 24C).

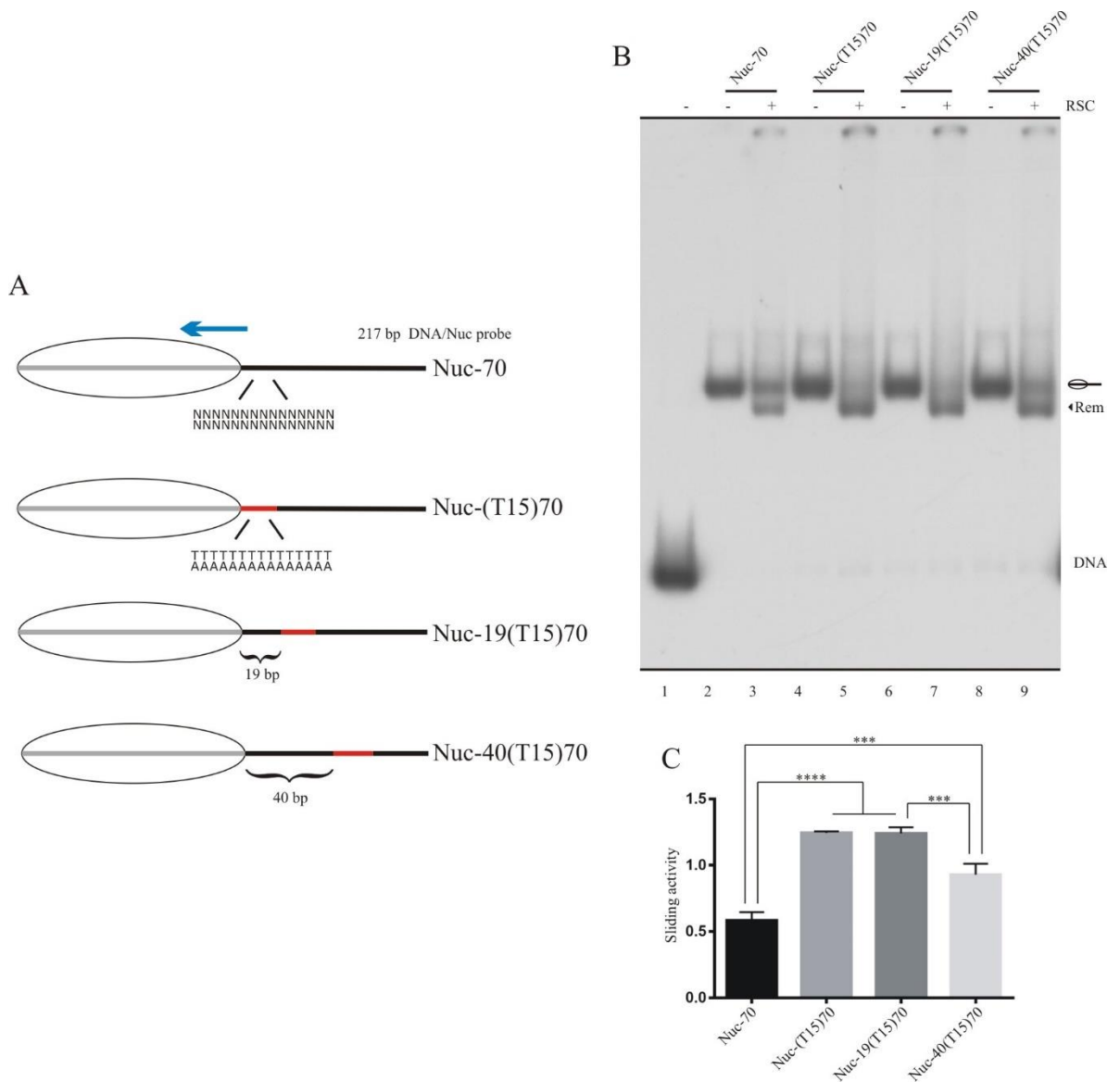


Figura 24: El efecto observado sobre RSC se mantiene al aumentar la distancia entre los trectos poli (dA:dT) y el nucleosoma. A) Representación esquemática de las sondas usadas en este análisis. El octámero de histonas es representado como un óvalo transparente, la línea gris representa el ADN nucleosomal y la línea negra representa el ADN *linker* (70 pb). Los trectos poli T se representan por líneas rojas. La flecha azul representa el movimiento del octámero de histonas mediada por la acción de RSC. Todas las sondas poseen un tamaño de 217 pb y poseen trectos de 15 pb. Las distancias usadas fueron 0, 19 y 40 pb. **B)** Ensayo de

remodelación nucleosomal para observar el efecto de la distancia entre los tractos poli (dA:dT) y el nucleosoma sobre la actividad remodeladora de RSC. La imagen es representativa del ensayo realizado al menos tres veces. La migración de los diferentes estados del mononucleosoma se muestra a la derecha de la figura. **C)** El gráfico corresponde a la cuantificación de la actividad de *sliding* bajo cada condición. Las barras de error representan una desviación estándar. Los asteriscos denotan diferencias significativas (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$; $n = 3$) calculados mediante test ANOVA y comparación múltiple Tukey's.

4.1.9 Efecto de los tractos poli (dA:dT) al estar presentes en la dirección contraria al movimiento del nucleosoma llevado a cabo por ISW1a

Para entender el mecanismo detrás del efecto que los tractos poli (dA:dT) tienen sobre la remodelación llevada a cabo por ISW1a, decidimos forzar nuestro modelo para que el complejo tenga que remodelar en la dirección contraria a los tractos poli (dA:dT). Para poder llevar a cabo este enfoque, tuvimos que diseñar nuevas sondas mononucleosomales, en la cual el octámero de histonas está posicionado en una locación semi-central (Figura 25A), recordando que ISW1a siempre mueve el nucleosoma a una posición central (Figura 15A), lo que está dado por su interacción muy dinámica con el nucleosoma, que involucra unión preferencial con el ADN *linker* de extensión mayor (Gangaraju y Bartholomew, 2007). Para ello, fue necesario aumentar el tamaño de las sondas de ADN para tener espacio suficiente para colocar el

tracto poli (dA:dT) en el ADN *linker* contrario al movimiento, es por ello que las sondas tienen un tamaño de 247 pb y poseen 30 pb de ADN *linker* por un extremo y 70 pb por el otro extremo (Figura 25A). Realizamos los experimentos considerando las dos posibilidades de extensión del ADN *linker*, colocando los 30 pb al extremo 5' o al 3' del nucleosoma.

Al llevar a cabo los experimentos con ISW1a, pudimos observar que en estas situaciones los tractos poli (dA:dT) no bloquean la actividad de *sliding* del complejo, incluso se da una leve estimulación, tanto para las sondas de distribución 30-Nuc-70 (comparar carril 2 y 4, Figura 25B; Figura 25C) como 70-Nuc-30 (comparar carril 2 con 4 y 6, Figura 25D; Figura 25E). Resultados contrarios a los obtenidos anteriormente, en donde los tractos poli (dA:dT) se encontraban en la zona de interacción del complejo con el ADN *linker* y, por ende, en dirección al movimiento del octámero (Figura 15). Además, en la distribución 70-Nuc-30 en donde probamos ambas orientaciones de tractos poli (dA:dT), se puede observar una muy leve diferencia entre ambas orientaciones, en donde la sonda 70-Nuc-(T15)30 estimularía la remodelación levemente en mayor grado (Figura 25E).

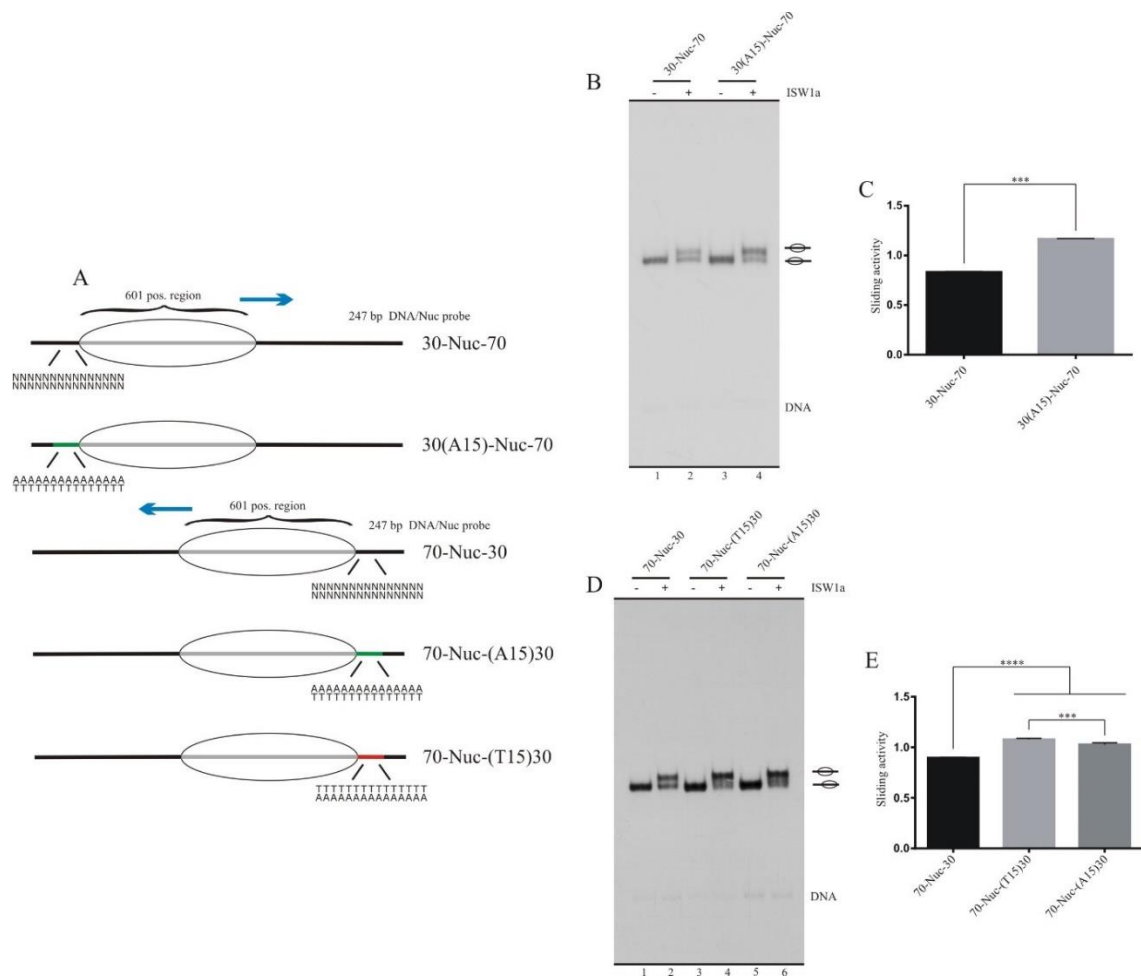


Figura 25: Los trectos poli (dA:dT) no bloquean, e incluso estimulan, la actividad de *sliding* de ISW1a cuando se encuentran en el sentido contrario al movimiento del nucleosoma. A) Representación esquemática de las sondas usadas en este análisis. El octámero de histonas es representado como un óvalo transparente, la línea gris representa el ADN nucleosomal y la línea negra representa el ADN *linker* (70 pb o 30 pb). Los trectos poli (dA:dT) se representan por líneas verdes (poli A) o rojas (poli T). Las flechas azules representan el movimiento del octámero de histonas mediada por la acción de ISW1a, ya sea en la distribución 30-Nuc-70 o 70-Nuc-30. Todas las sondas poseen un tamaño de 247 pb y poseen trectos de 15 pb. **B y D)** Ensayos de remodelación nucleosomal para observar el efecto que tienen los trectos poli (dA:dT) al estar en la ubicación contraria al movimiento llevado a cabo por

la acción de ISW1a. Las sondas usadas se indican en la parte superior de la figura. La imagen es representativa del ensayo realizado al menos tres veces. La migración de los diferentes estados del mononucleosoma se muestra a la derecha de la figura. **C y E)** Los gráficos corresponden a la cuantificación de la actividad de *sliding* bajo cada condición. Las barras de error representan una desviación estándar. Los asteriscos denotan diferencias significativas (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$; $n = 3$) calculados mediante test ANOVA y comparación múltiple Tukey's.

4.1.10 Determinación de la influencia de los tractos poli (dA:dT) sobre la actividad de RSC en un modelo de mononucleosomas centrales

De la misma manera que se realizó para ISW1a, para comprender el mecanismo detrás del efecto de los tractos (poli dA:dT) sobre la actividad del complejo RSC, decidimos cambiar el modelo mononucleosomal usado. Para ello diseñamos una sonda mononucleosomal central de 217 pb, ósea que posee la misma extensión de ADN *linker* por ambos (35 pb de ADN *linker* a cada extremo del *core nucleosoma*) (Figura 26A). Esto nos permite corroborar si el efecto de estimulación de la actividad de *sliding* de RSC observado en los experimentos anteriores (Figura 16), se sigue manteniendo en este nuevo modelo de mononucleosoma central.

En primer lugar, hay que tener en cuenta que para estos experimentos el resultado de la remodelación se observa en la aparición de las bandas de mayor migración, las cuales corresponden a mononucleosomas laterales y más

laterales (Rem), debido a que el mononucleosoma central tiene una menor migración (ver carril 7, Figura 26B). Como podemos observar al realizar el experimento bajo estas nuevas condiciones, los tractos poli (dA:dT) siguen estimulando la actividad de *sliding* de RSC (comparar carril 3 con 5 y 7, Figura 26B; Figura 26C). Además, podemos observar el mismo efecto encontrado anteriormente (Figura 16), en donde la orientación de los tractos influye sobre la actividad de este complejo, en este caso la sonda 35-Nuc-(T15)-35 genera una mayor estimulación que la sonda 35-Nuc-(A15)-35 (comparar carril 5 y 7, Figura 26B; Figura 26C).

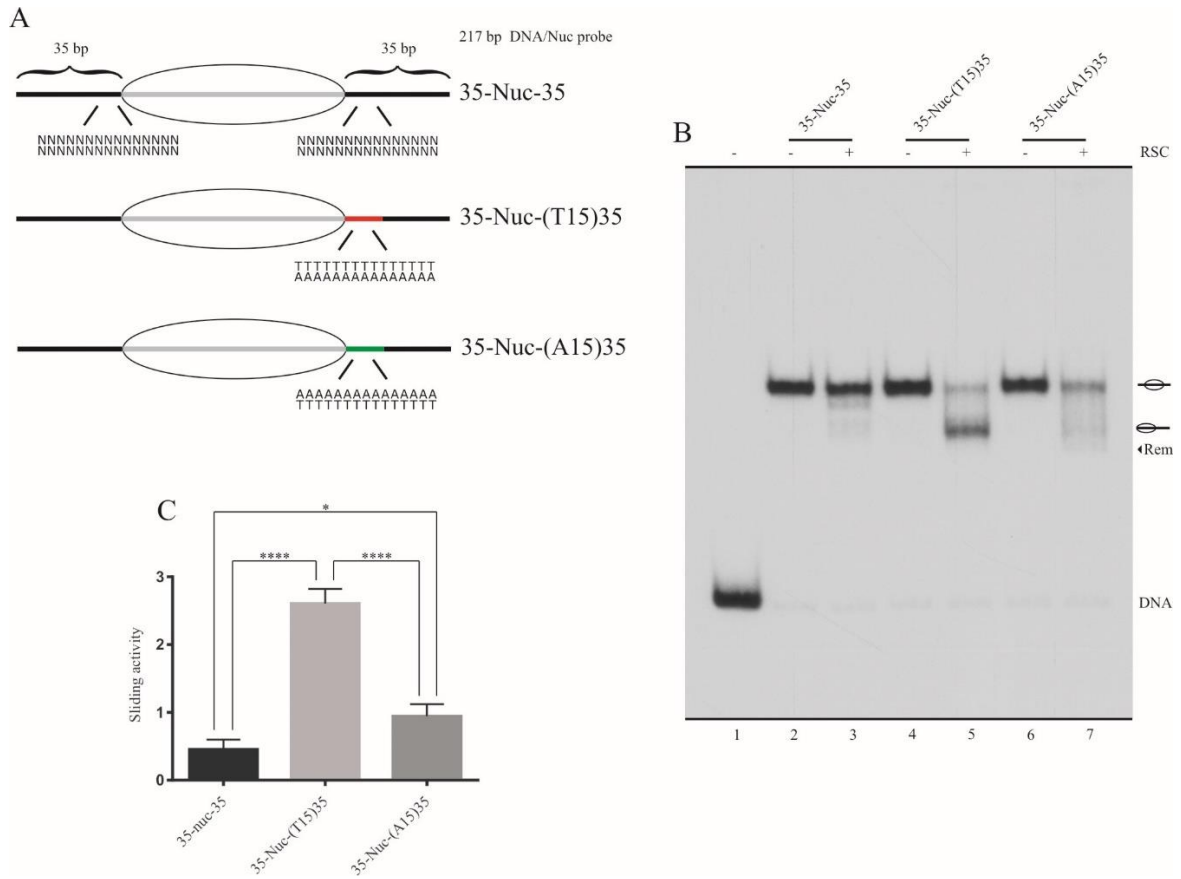


Figura 26: Los trectos poli (dA:dT) estimulan la actividad de *sliding* de RSC en un modelo de mononucleosoma central. A) Representación esquemática de las sondas usadas en este análisis. El octámero de histonas es representado como un óvalo transparente, la línea gris representa el ADN nucleosomal y las líneas negras representan el ADN *linker* (35 pb a cada extremo). Los trectos poli A se representan por líneas verdes, mientras que los trectos poli T se representan con líneas rojas. Todas las sondas poseen un tamaño de 217 pb y poseen trectos de 15 pb. **B)** Ensayo de remodelación nucleosomal para observar el efecto de los trectos poli (dA:dT) sobre la actividad remodeladora de RSC, en un modelo de mononucleosoma central. La imagen es representativa del ensayo realizado al menos tres veces. La migración de los diferentes estados del mononucleosoma se muestra a la derecha de la figura. **C)** El gráfico corresponde a la cuantificación de la actividad de *sliding* bajo cada condición. Las barras de error representan una desviación estándar. Los asteriscos denotan diferencias significativas

(**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$; $n = 3$) calculados mediante test ANOVA y comparación múltiple Tukey's.

Con estos resultados corroboramos el efecto de estimulación que los tractos poli (dA:dT) ejercen sobre la actividad de *sliding* de RSC; sin embargo, con el uso de estas sondas mononucleosomales centrales surge la incertidumbre de la dirección en que el complejo RSC mueve el octámero de histonas. Para el caso de las sondas mononucleosomales laterales usadas en los experimentos anteriores, teníamos certeza del movimiento del octámero de histonas (Figura 16A), debido a los análisis estructurales de RSC unido al nucleosoma que muestran que este interacciona con el ADN *linker* saliente (Wagner y col., 2020; Ye y col., 2019); por lo tanto, en esos experimentos el complejo se encontraba condicionado a interactuar con el único ADN *linker* existente en esas sondas. Por el contrario, en el caso de los experimentos con mononucleosomas centrales, el complejo puede seleccionar a que ADN *linker* unirse, imposibilitándonos conocer la dirección de movimiento del octámero de histonas. De esta manera, es necesario conocer si los tractos poli (dA:dT) influyen en la selección realizada por RSC, y por ende, en la dirección en que se mueve el octámero de histonas.

Para resolver este cuestionamiento nos propusimos a usar sondas mononucleosomales centrales con tractos poli (dA:dT) al extremo 3' o al extremo 5' del nucleosoma (Figura 27A) y usamos enzimas de restricción con

sitios de corte dentro del ADN nucleosomal para mapear la posición del octámero de histonas antes y después de la acción de RSC (Figura 27B). Si el movimiento es hacia el extremo 3' deberíamos observar corte con la enzima PmlI, mientras que si el movimiento es hacia el extremo 5' deberíamos observar corte con la enzima MfeI (Figura 27B). En primer lugar, al realizar el experimento en las sondas con trectos poli (dA:dT) por el extremo 3' del *core nucleosomal* (Figuras 27C y D), podemos notar que el patrón de corte es similar en ambas sondas. Además, ambas enzimas son capaces de cortar el ADN desnudo, lo que se aprecia con la aparición de las bandas de mayor migración (comparar carril 1 con 2 y 3, Figura 27C; comparar carril 1, con 2 y 3, Figura 27D). En segundo lugar, podemos notar que las enzimas no son capaces de cortar el ADN nucleosomal (comparar carril 4 con 5 y 6, Figura 27C; comparar carril 4, con 5 y 6, Figura 27D). Por último, el resultado de corte luego de la remodelación de RSC nos muestra que la dirección principal del movimiento del octámero de histonas en estas sondas es hacia el extremo 5', lo que se evidencia al existir corte con la enzima MfeI y no con PmlI (comparar carril 7 con 8 y 9, Figura 27C; comparar carril 7, con 8 y 9, Figura 27D). De esta manera, en estas sondas el complejo RSC aleja el octámero de histonas de los trectos poli (dA:dT) independiente de la orientación de estas.

Al usar las sondas con trectos poli (dA:dT) por el extremo 5' del nucleosoma, observamos un patrón de corte contrario a los ya obtenidos con estas secuencias por el extremo 3'. Con estas sondas podemos observar que el

corte principal ocurre con la enzima PmlI (comparar carril 7 con 8 y 9, Figura 27E; comparar carril 7, con 8 y 9, Figura 27F) lo que indica que el movimiento del octámero de histonas es en la dirección 3'. Por lo tanto, al igual que con las sondas anteriores, el complejo RSC aleja el octámero de histonas de los tractos poli (dA:dT) independientemente de la orientación de estas.

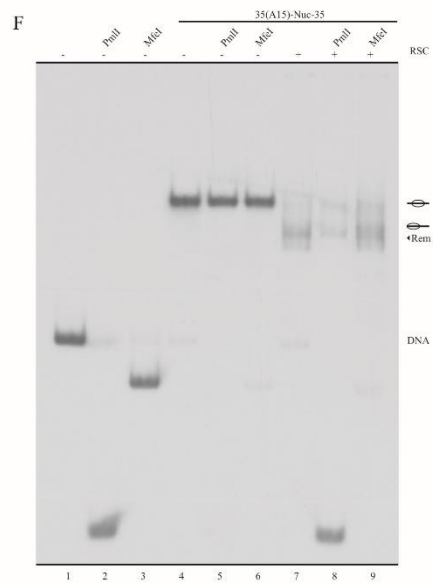
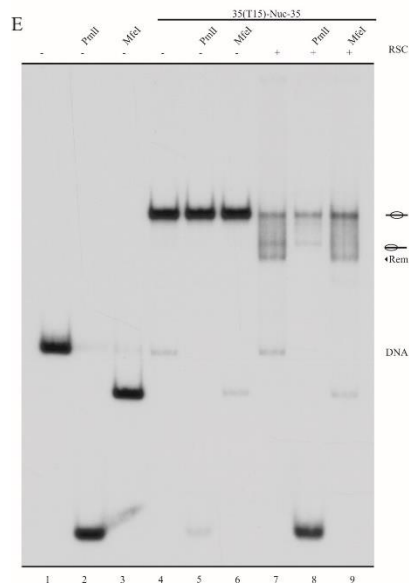
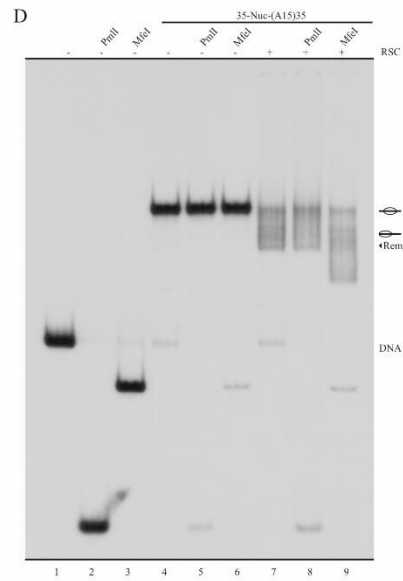
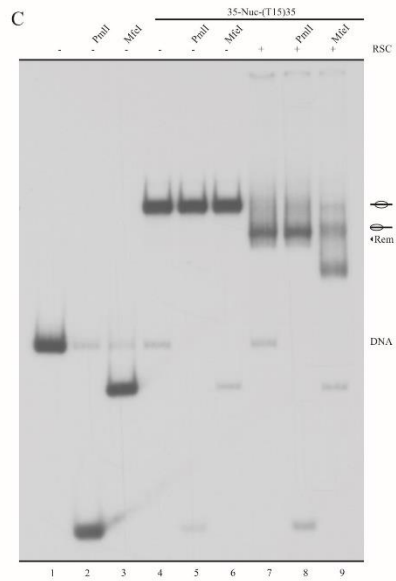
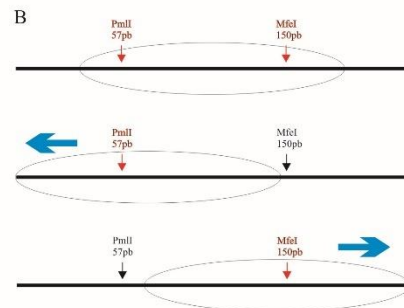
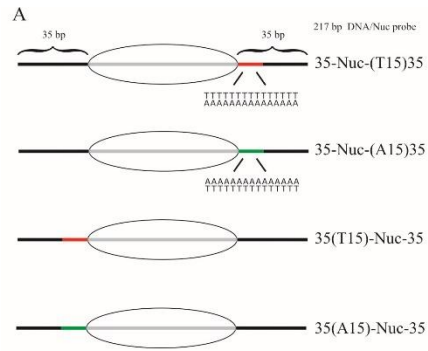


Figura 27: Los tractos poli (dA:dT) direccionan la remodelación de RSC. A) Representación esquemática de las sondas usadas en este análisis. El octámero de histonas es representado como un óvalo transparente, la línea gris representa el ADN nucleosomal y las líneas negras representan el ADN *linker* (35 pb a cada extremo). Los tractos poli A se representan por líneas verdes, mientras que los tractos poli T se representan con líneas rojas. Todas las sondas poseen un tamaño de 217 pb y poseen tractos de 15 pb. **B)** Representación esquemática de los sitios de cortes presentes en el ADN nucleosomal que fueron usados en este análisis. Los sitios de corte para PmlI y MfeI se muestran en rojo cuando se encuentran inaccesibles y en negro cuando se encuentran accesibles. Las flechas azules indican los posibles movimientos del octámero de histonas luego de la remodelación mediada por RSC. **C-F)** Ensayos de mapeo nucleosomal con enzimas de restricción para observar cómo influyen los tractos poli (dA:dT) sobre la dirección de remodelación llevada a cabo por RSC. Los carriles 1, 2 y 3 de cada experimento, corresponden a la sonda en forma de ADN desnudo. Las sondas usadas se indican en la parte superior de la figura. La imagen es representativa del ensayo realizado al menos tres veces. La migración de los diferentes estados del mononucleosoma se muestra a la derecha de cada figura.

Al observar los resultados del movimiento del octámero de histonas ejercido por RSC en presencia de los tractos poli (dA:dT), nos propusimos a corroborar que en las sondas mononucleosomales laterales el octámero de histonas se mueve en la dirección que determinamos en base los resultados estructurales (Wagner y col., 2020; Ye y col., 2019), y no fueron alterados por la presencia de los tractos poli (dA:dT). Para ello realizamos el mismo tipo de análisis usando enzimas de restricción. El mapa con las enzimas usadas se

muestra en la Figura 28B y las flechas azules indican los posibles movimientos del octámero de histonas. En primer lugar, corroboramos que bajo nuestras condiciones las enzimas son capaces de cortar las sondas a la forma de ADN, al ver la desaparición o el cambio de migración de las bandas (comparar carril 1 con 2 y 3, Figura 28C; comparar carril 1 con 2 y 3, Figura 28D). Luego según lo esperado, el nucleosoma sin remodelar es cortado por la enzima XhoI, pero no por PmlI (comparar carril 4 con 5 y 6, Figura 28C; comparar carril 4 con 5 y 6, Figura 28D). Por último, al observar los cortes en el nucleosoma remodelado, podemos notar que la única enzima que realiza el corte es XhoI, confirmado que la dirección de movimiento es la que esperábamos al tener ADN *linker* por un solo extremo del *core nucleosomal* (comparar carril 7 con 8 y 9, Figura 28C; comparar carril 7 con 8 y 9, Figura 28D).

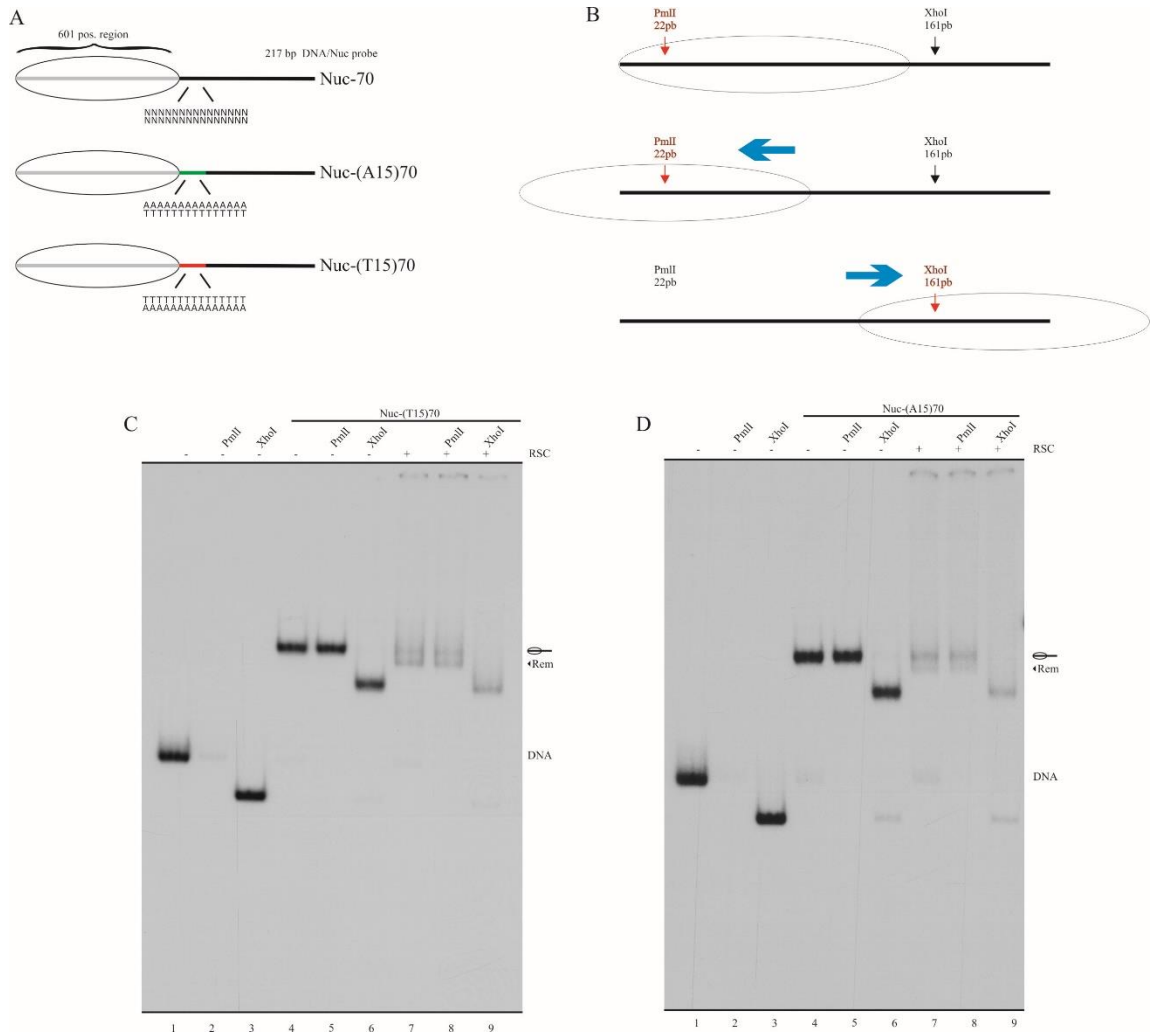


Figura 28: Mapeo del movimiento del nucleosoma en sondas Nuc-70 mediado por RSC.

A) Representación esquemática de las sondas usadas en este análisis. El octámero de histonas es representado como un óvalo transparente, la línea gris representa el ADN nucleosomal y la línea negra representa el ADN *linker* (70 pb). Los trectos poli A se representan por líneas verdes, mientras que los trectos poli T se representan con líneas rojas. Todas las sondas poseen un tamaño de 217 pb y poseen trectos de 15 pb. **B)** Representación esquemática de los sitios de cortes presentes en el ADN nucleosomal que fueron usados en este análisis. Los sitios de corte para PmlI y XhoI se muestran en rojo cuando se encuentran inaccesibles y en negro cuando se encuentran accesibles. Las flechas azules indican los posibles movimientos del

octámero de histonas luego de la remodelación mediada por RSC. **C y D)** Ensayos de mapeo nucleosomal con enzimas de restricción para observar cómo influyen los tractos poli (dA:dT) sobre la dirección de remodelación llevada a cabo por RSC. Los carriles 1, 2 y 3 de cada experimento, corresponden a la sonda en forma de ADN desnudo. Las sondas usadas se indican en la parte superior de la figura. La imagen es representativa del ensayo realizado al menos tres veces. La migración de los diferentes estados del mononucleosoma se muestra a la derecha de cada figura.

Debido a que nuestros resultados mostraron que RSC aleja el octámero de histonas de los tractos poli (dA:dT), nos propusimos a forzar el modelo para averiguar cómo afectan estas secuencias al ser ingresadas al ADN nucleosomal. Hay que recordar que en las sondas mononucleosomales anteriores el complejo RSC siempre alejaba el nucleosoma de los tractos poli (dA:dT) (Figuras 27 y 28). Para poder lograr que el complejo mueva el nucleosoma en dirección a los tractos poli (dA:dT), diseñamos mononucleosomas centrales con tractos poli (dA:dT) a ambos extremos del nucleosoma, por lo que independiente de la dirección en que el complejo RSC mueva el nucleosoma, se encontrará en el camino con un tracto poli (dA:dT). Para el diseño de las sondas nos guiamos por el máximo efecto observado en resultados anteriores (Figura 21), poli T por el extremo 3' y poli A por el extremo 5' del nucleosoma. Para la sonda con tractos por ambos lados usamos una combinación de las dos anteriores (Figura 29A).

Al llevar a cabo los experimentos, nos pudimos percatar que existe estimulación de la actividad de *sliding* de RSC en todas las sondas con tractos poli (dA:dT), incluso en la sonda que posee estas secuencias a ambos lados (comparar carril 3 con 5, 7 y 9, Figura 29B; Figura 29C). Esto nos demostró que la estimulación se puede llevar a cabo incluso si los tractos poli (dA:dT) se encuentran en la dirección del movimiento del nucleosoma. Sin embargo, un hecho curioso es que en la sonda 35(A15)-Nuc-(T15)35 no se observa la población "Rem", la cual corresponde a una población más lateral (ver carril 9, Figura 29B).

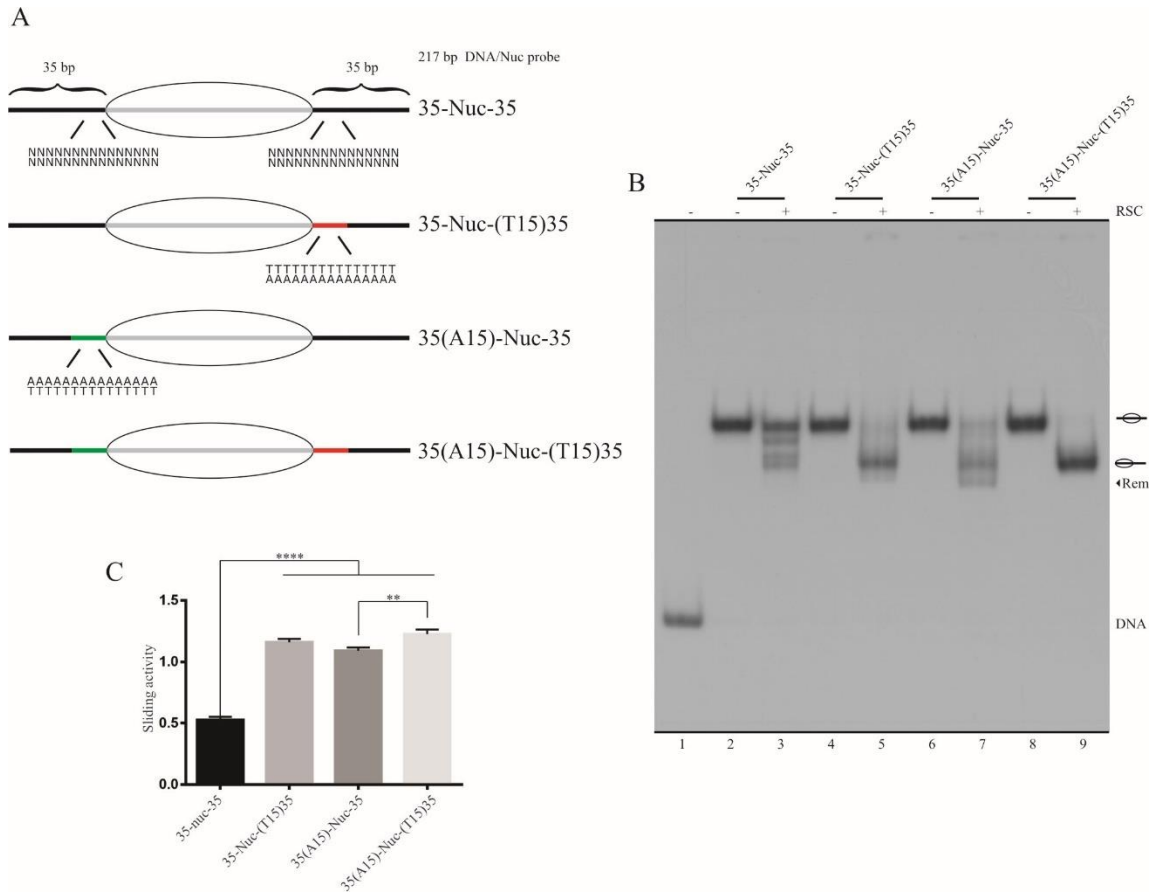


Figura 29: Los trectos poli (dA:dT) estimulan la actividad de *sliding* de RSC incluso al estar en dirección al movimiento del octámero de histonas. A) Representación esquemática de las sondas usadas en este análisis. El octámero de histonas es representado como un óvalo transparente, la línea gris representa el ADN nucleosomal y las líneas negras representan el ADN *linker* (35 pb a cada extremo). Los trectos poli A se representan por líneas verdes, mientras que los trectos poli T se representan con líneas rojas. Todas las sondas poseen un tamaño de 217 pb y poseen trectos de 15 pb. **B)** Ensayo de remodelación nucleosomal para observar el efecto de los trectos poli (dA:dT) sobre la actividad remodeladora de RSC, en un modelo de mononucleosoma central. La imagen es representativa del ensayo realizado al menos tres veces. La migración de los diferentes estados del mononucleosoma se muestra a la derecha de la figura. **C)** El gráfico corresponde a la cuantificación de la actividad de *sliding* bajo

cada condición. Las barras de error representan una desviación estándar. Los asteriscos denotan diferencias significativas (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$; $n = 3$) calculados mediante test ANOVA y comparación múltiple Tukey's.

Considerando los resultados obtenidos en la Figura 29, nos cuestionamos dos situaciones: 1) Si el hecho de que la sonda tenga dos tractos poli (dA:dT) permite que exista una estimulación mayor que al solo tener un tracto poli (dA:dT). 2) La ausencia de la población "Rem" en la sonda 35(A15)-Nuc-(T15)35 se debe a que aún le falta tiempo de remodelación para llegar a esa población, considerando que en la sonda control apenas se logra notar esta población (ver carril 3, Figura 29B). Para resolver ambos cuestionamientos nos propusimos a realizar ensayos de *time course* usando diferentes tiempos de remodelación: 15, 30 y 45 minutos (Figuras 30A y B), para observar las diferencias entre poseer uno o dos tractos poli (dA:dT); y tiempos de : 30, 60 y 90 minutos (Figura 30C), para observar si aparece la población "Rem" a tiempos mayores. En estos experimentos se confirma que la sonda que posee dos tractos poli (dA:dT) remodela más que las sondas que poseen solo un tracto (Figuras 30). Al comparar la sonda 35(A15)-Nuc-35 con la sonda 35(A15)-Nuc-(T15)35, podemos ver que en cada tiempo la sonda con dos tractos poli (dA:dT) posee mayor remodelación que la sonda con un solo tracto (comparar los tiempos de las Figuras 30A y B), lo mismo se puede observar en la Figura 30C al centrarnos en el tiempo de 30 minutos. Por otro lado, podemos

observar que en la sonda 35(A15)-Nuc-(T15)35 nunca se logra apreciar la banda "Rem", incluso a los 90 minutos de remodelación (ver carril 16, Figura 30C), lo que si ocurre con el resto de las sondas estudiadas.

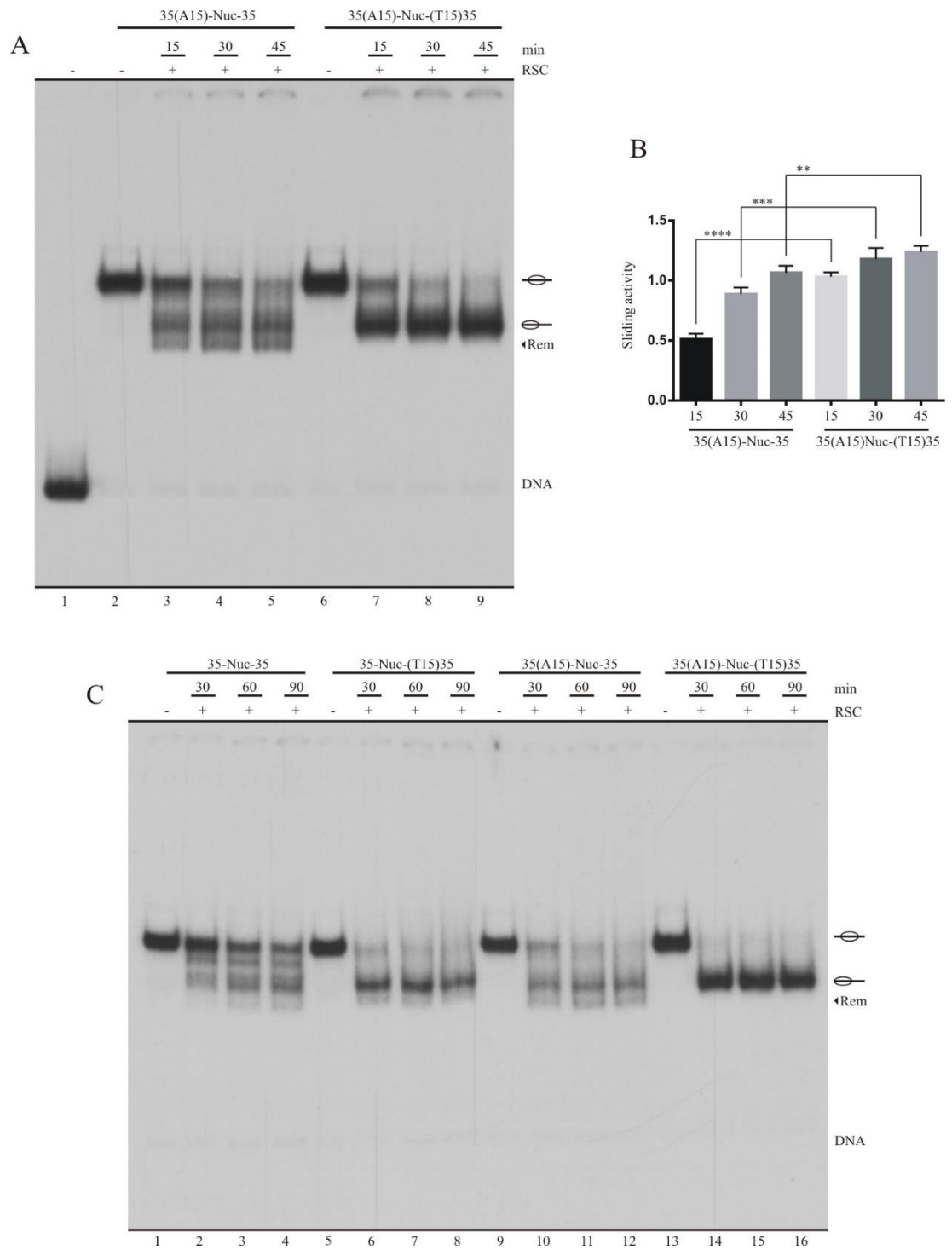


Figura 30: Una mayor presencia de trectos poli (dA:dT) se traduce en una mayor estimulación en la actividad de RSC. A) Ensayo de progresión de remodelación nucleosomal

en el tiempo (*time course*) para observar si la mayor presencia de tractos poli (dA:dT) tienen un efecto mayor sobre la actividad de RSC en un modelo de mononucleosoma central. Las sondas usadas se indican en la parte superior de la figura y se muestran en la Figura 29A. La imagen es representativa del ensayo realizado al menos tres veces. La migración de los diferentes estados del mononucleosoma se muestra a la derecha de la figura. **B)** El gráfico corresponde a la cuantificación de la actividad de *sliding* bajo cada condición. Las barras de error representan una desviación estándar. Los asteriscos denotan diferencias significativas (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$; $n = 3$) calculados mediante test ANOVA y comparación múltiple Tukey's. **C)** Ensayo de progresión de remodelación nucleosomal en el tiempo (*time course*) para observar si a tiempos largos de remodelación existe la aparición de la banda "Rem" en un modelo de mononucleosoma central. Las sondas usadas se indican en la parte superior de la figura y se muestran en la Figura 29A. La imagen es representativa del ensayo realizado al menos tres veces. La migración de los diferentes estados del mononucleosoma se muestra a la derecha de la figura.

A continuación, nos comenzamos a preguntar por qué la sonda 35(A15)-Nuc-(T15)35 no presentó la población "Rem" en ninguna condición. Una posibilidad es que el movimiento del nucleosoma se bloquee cuando el tracto poli (dA:dT) llegue a una cierta posición dentro del ADN nucleosomal, donde la orientación de estas secuencias podría influir. Cabe recordar que la translocación de los complejos remodeladores se lleva a cabo por una hebra del ADN, de manera unidireccional y en dirección 3'-5' (Auger y col., 2008; Clapier, 2021; Clapier y col., 2017; Nguyen y col., 2013), por lo tanto, la orientación de los tractos poli (dA:dT) podría influir durante el mecanismo de translocación del

complejo. Anteriormente, observamos que la orientación de los tractos influyen en la actividad de *sliding* de RSC (Figuras 16 y 26); sin embargo, en todos los casos anteriores los tractos poli (dA:dT) se alejaban del nucleosoma (Figuras 27 y 28). Para comprender el efecto de la orientación de los tractos poli (dA:dT) al ingresar a ser parte del ADN nucleosomal, decidimos realizar experimentos usando los mononucleosomas con tractos por ambos lados, pero cambiando la orientación de estas secuencias (Figura 31A).

Para estos experimentos usamos una sonda lateral Nuc-70 (Figura 31A) como control de migración (carril 2, Figura 31B). De los resultados obtenidos podemos observar que con ambas orientaciones se obtiene mayor remodelación que con la sonda control (comparar carril 4 con 6 y 8, Figura 31B; Figura 31C); sin embargo, se observa una mayor estimulación en la sonda 35(A15)-Nuc-(T15)35 que en la sonda 35(T15)-Nuc-(A15)35 (comparar carril 6 y 8, Figura 31B; Figura 31C). Además, si nos centramos en la banda "Rem", podemos notar que en la sonda 35(T15)-Nuc-(A15)35 aparece levemente una señal (carril 8, Figura 31B); por el contrario, en la sonda 35(A15)-Nuc-(T15)35 esta banda no aparece (carril 6, Figura 31B).

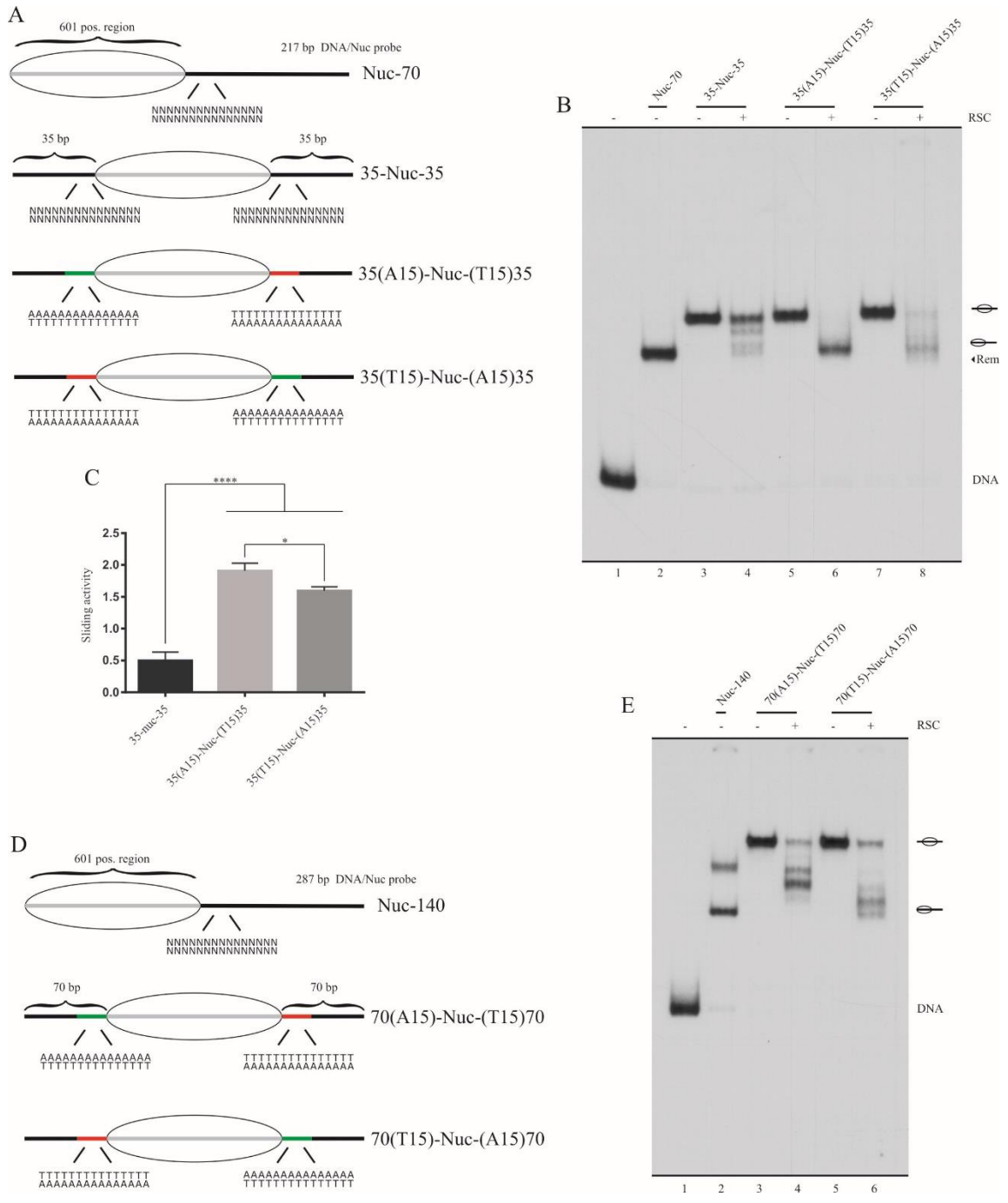


Figura 31: La remodelación de *sliding* de RSC puede ser bloqueada por una de las dos posibles orientaciones de los trectos poli (dA:dT) dentro del ADN nucleosomal. A y D) Representaciones esquemáticas de las sondas usadas en estos análisis. El octámero de histonas es representado como un óvalo transparente, la línea gris representa el ADN

nucleosomal y las líneas negras representan el ADN *linker*, 35 pb a cada extremo para el caso de (A) y 70 pb a cada extremo para el caso de (D). Los tractos poli A se representan por líneas verdes, mientras que los tractos poli T se representan con líneas rojas. Todas las sondas poseen un tamaño de 217 pb para el caso de (A) y 287 pb para el caso de (D). Los tractos poli (dA:dT) poseen un tamaño de 15 pb. **B y E**) Ensayos de remodelación nucleosomal para observar cómo influye la orientación de los tractos poli (dA:dT) sobre la actividad de RSC en un modelo de mononucleosoma central. Las sondas usadas se indican en la parte superior de cada figura. La imagen es representativa del ensayo realizado al menos tres veces. La migración de los diferentes estados del mononucleosoma se muestra a la derecha de la figura. **C**) El gráfico corresponde a la cuantificación de la actividad de *sliding* bajo cada condición llevado a cabo en (B). Las barras de error representan una desviación estándar. Los asteriscos denotan diferencias significativas (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$; $n = 3$) calculados mediante test ANOVA y comparación múltiple Tukey's.

Considerando el resultado obtenido en la Figura 31B, donde se observó que la orientación de los tractos poli (dA:dT) condicionó la aparición de la banda "Rem", nos propusimos realizar un experimento para confirmar el fenómeno de que una orientación del tracto poli (dA:dT) bloquea la remodelación de *sliding* de RSC en alguna posición del ADN nucleosomal. Hay que considerar en los ensayos anteriores, que al usar las sondas 35-Nuc-35 el complejo RSC tiene que mover el octámero de histona 35 pb para dejarlo en una posición lateral, por lo que el tracto poli (dA:dT) llegará hasta la posición SHL4 aproximadamente; luego el complejo seguirá moviendo el octámero de histonas para dejarlo en la posición "Rem", lo cual no ocurre con la sonda 35(A15)-Nuc-

(T15)35 (carril 9, Figura 29B; carril 9, Figura 30A; carril 16, Figura 30C; carril 6, Figura 31B). Para tener mayor claridad de que existe un bloqueo en la remodelación de *sliding* de RSC, diseñamos sondas mononucleosomales centrales con el ADN *linker* más largo (70 pb de ADN *linker* a cada extremo) (Figura 31D), con el objetivo de que el tracto poli (dA:dT) tenga que llegar hasta aproximadamente SHL0 en la conformación de mononucleosoma lateral. Si existe un bloqueo de la remodelación de RSC, no deberíamos observar la población de mononucleosoma lateral. Además, agregamos un control para saber la migración de una sonda mononucleosomal lateral de este tamaño (Nuc-140). En primer lugar, hay que notar que en la sonda Nuc-140 se observan dos bandas nucleosomales (carril 2, Figura 31E), la de mayor migración indica la posición lateral, mientras que la de menor migración indica una posición semi-central. En segundo lugar, al comparar las sondas con tractos poli (dA:dT) a ambos lados, pero en diferentes orientaciones, podemos notar que en la sonda 70(A15)-Nuc-(T15)70 el octámero de histonas no logra quedar en una población lateral (carril 4, Figura 31E); sin embargo, con la orientación 70(T15)-Nuc-(A15)70 si se logra observar la población lateral (carril 6, Figura 31E). De esta manera, confirmamos que existe un bloqueo de la actividad de *sliding* de RSC que depende de la orientación de como los tractos poli (dA:dT) ingresan a ser parte del ADN nucleosomal.

4.1.11 Efecto de los trectos poli (dA:dT) sobre la unión de los complejos ISW1a y RSC

Una vez demostrado que los trectos poli (dA:dT) ejercen un efecto sobre la actividad de los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP, quisimos ahondar en una parte del mecanismo que no habíamos abordado con los experimentos anteriores, que es si estas secuencias pueden afectar la unión de estos complejos. Para ello realizamos ensayos de unión al nucleosoma usando las sondas Nuc-70 de los primeros experimentos (Figura 15B). Cabe destacar que los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP no poseen sitios de unión consenso al ADN (Clapier y Cairns, 2009; Clapier y col., 2017), con excepción del complejo RSC, para el cual se ha descrito que la subunidad Rsc3/30 puede reconocer una secuencia específica de unión al ADN (Badis y col., 2008). Sin embargo, en ningún caso los trectos poli (dA:dT) se han descrito como secuencias de unión específicas para complejos remodeladores.

Los experimentos se llevaron a cabo como se indica en la sección 3.9.2, y las sondas usadas fueron las siguientes: Nuc-70, Nuc-(A15)70 y Nuc-(T15)70 (Figura 15B). Las uniones de los complejos se realizaron usando una mayor concentración de ambos complejos y en presencia de ATP o Adenosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) (ATP γ S, sustrato no hidrolizable), para observar si el efecto de los trectos poli (dA:dT) es únicamente sobre la unión inicial, previa a

la ocurrencia de ciclos de hidrólisis de ATP, o también sobre la interacción del del complejo con el nucleosoma durante la remodelación. Al realizar los experimentos con ISW1a (Figura 32A) podemos observar la ausencia de unión al usar ATP γ S como sustrato (carriles 2, 5 y 8, Figura 32A); por el contrario, al usar ATP como sustrato podemos observar las bandas que corresponde a la unión del complejo (carriles 3, 6 y 9, Figura 32A). En primera instancia se puede observar que los tractos poli (dA:dT) no afectan la unión de ISW1a, aunque se puede advertir una pequeña disminución en la sonda Nuc-(T15)70 (comparar carril 9 con 6 y 3, Figura 32A). Sin embargo, la naturaleza de estos experimentos impide realizar una cuantificación certera de las uniones, por lo que el resultado es meramente cualitativo.

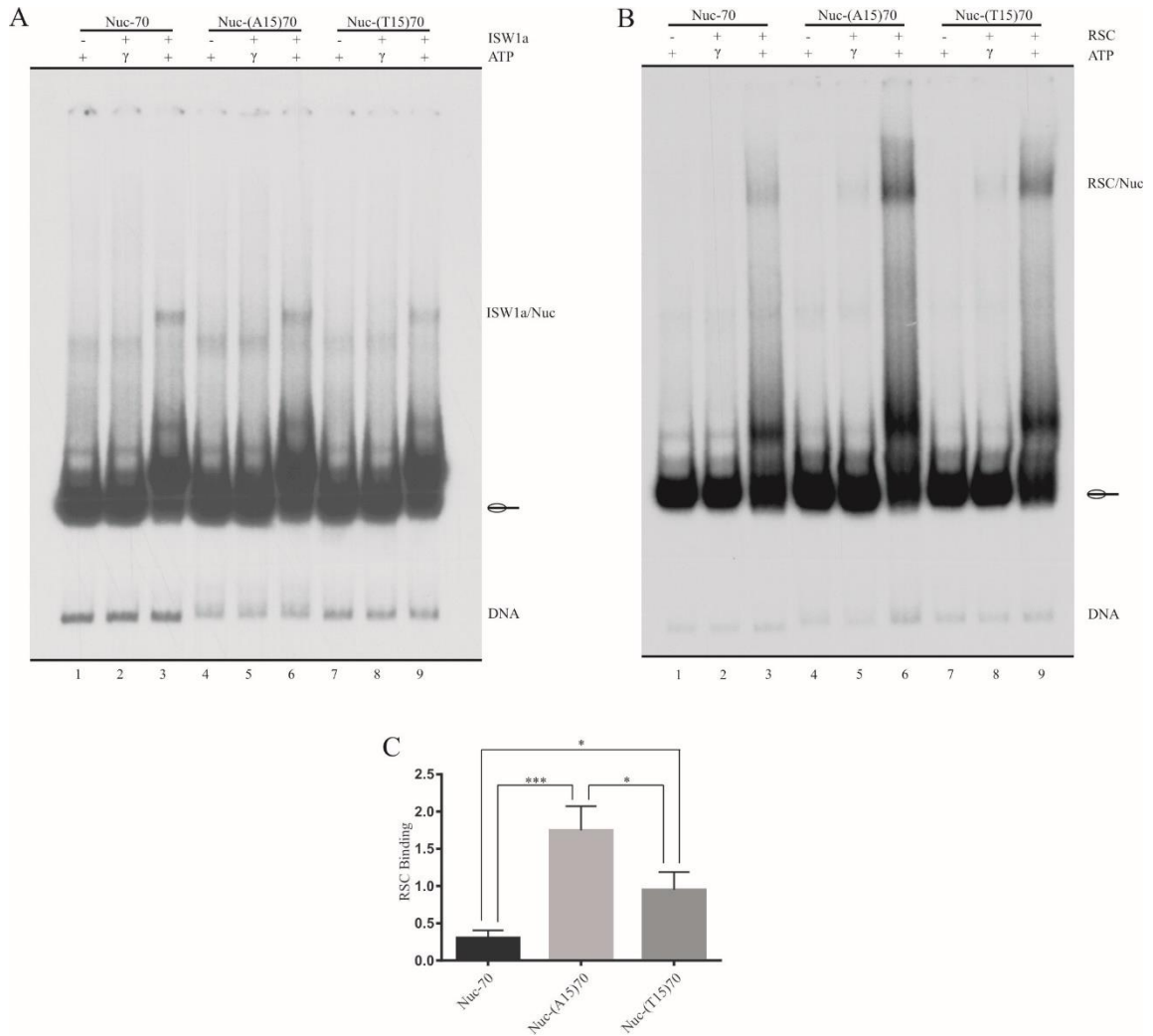


Figura 32: Efecto de trectos poli (dA:dT) sobre la unión de RSC y ISW1a al nucleosoma.

Las sondas usadas se indican en la parte superior de cada figura y corresponden a las esquematizadas en la Figura 15B. Los experimentos se realizaron en presencia de 2 mM de ATP o ATPgammaS. La migración de los diferentes estados se muestra a la derecha de cada figura. Las imágenes son representativas de cada ensayo realizado al menos tres veces. **A)** Imagen representativa de ensayo de retardamiento en gel para observar el efecto de trectos poli (dA:dT) en la unión de ISW1a. **B)** Imagen representativa de ensayo de retardamiento en gel para observar el efecto de trectos poli (dA:dT) en la unión de RSC. γ: ATPgammaS. **C)** El gráfico corresponde a la cuantificación de la unión de RSC en presencia de ATP. Las barras de

error representan una desviación estándar. Los asteriscos denotan diferencias significativas (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$; $n = 3$) calculados mediante test ANOVA y comparación múltiple Tukey's.

Para el caso de RSC se advierte una unión más fuerte del complejo y se puede observar que los tractos poli (dA:dT) aumentan la unión de este en presencia de ATPgammaS (comparar carril 2 con 5 y 8, Figura 32B). Por otro lado, podemos observar un incremento de la unión en todas las sondas al usar ATP como sustrato, lo que realza las diferencias en la unión de RSC al estar presentes los tractos poli (dA:dT) (comparar carril 3 con 6 y 9, Figura 32B). Estos resultados se confirmaron al realizar la cuantificación de los grados de unión de RSC en presencia de ATP (Figura 32C). Curiosamente, encontramos que existe una mayor unión de RSC a la sonda Nuc-(A15)70 en comparación a la sonda Nuc-(T15)70 (Figura 32C).

Interesantemente, en la unión de RSC a la sonda Nuc-(A15)70 en presencia de ATP se observa un incremento en la cantidad de ADN desnudo (comparar carril 6 con 4 y 5, Figura 32B). Por otro lado, debido a que los tractos poli (dA:dT) incrementaron la unión de RSC más fuertemente durante el proceso de remodelación (en presencia de ATP), surgió la pregunta de si este incremento se da solo en el contexto del nucleosoma. Para ello, realizamos el mismo experimento, solo que las sondas se usaron a la forma de ADN desnudo. Como se puede observar en la Figura 33, las sondas de ADN que

poseen trectos poli (dA:dT) poseen una mayor unión de RSC, confirmando de esta manera que los trectos poli (dA:dT) estimulan la unión de RSC. Si bien se puede observar una cierta tendencia a mayor unión en presencia de ATP, la diferencia entre ausencia y presencia de ATP es mucho mayor en las sondas nucleosomales. Adicionalmente, en las sondas de ADN desnudo no hay diferencia de grado de unión de RSC entre las dos orientaciones de tracto de poli (dA:dT).

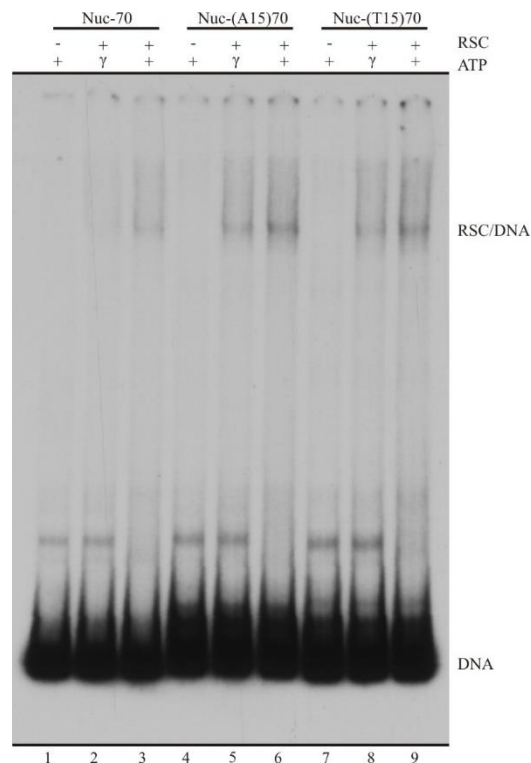


Figura 33: Los trectos poli (dA:dT) incrementan la unión de RSC al ADN. Ensayo de retardamiento en gel para observar el efecto de trectos poli (dA:dT) en la unión de RSC al ADN. Las sondas usadas se indican en la parte superior de la figura y corresponden a las sondas

mostradas en la Figura 15B, pero a la forma de ADN desnudo. Los experimentos se realizaron en presencia de 2 mM de ATP o ATPgammaS. La imagen es representativa del ensayo realizado al menos tres veces. La migración de los diferentes estados se muestra a la derecha de la figura. γ : ATPgammaS.

4.1.12 Efecto de los tractos poli (dA:dT) sobre la actividad de *eviction* de RSC

Debido a que en el ensayo de unión de RSC al nucleosoma observamos aparición de ADN desnudo en la sonda poli A (comparar carril 6 con 4 y 5, Figura 32B), decidimos realizar ensayos de remodelación (ver sección 3.9.3) usando concentraciones más altas de RSC. Al realizar estos nuevos experimentos podemos observar la aparición ADN desnudo con todas las sondas (Figura 34A), que es uno de los resultados de remodelación caracterizados para RSC y que refleja desensamble del nucleosoma. Destaca en los resultados de este análisis que, al realizar la cuantificación de la actividad de *eviction*, pudimos notar que con la sonda Nuc-(A15)70 (poli A) existe una mayor aparición de ADN desnudo en relación con las otras sondas, reflejando una estimulación de la actividad de *eviction* de RSC dada por el tracto en esta orientación (Figura 34B).

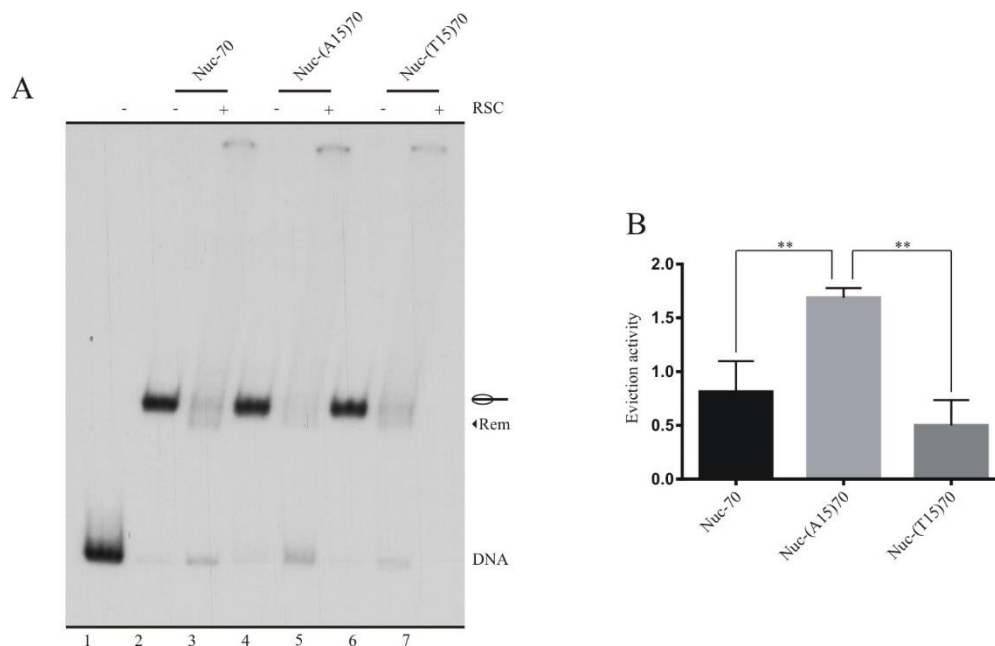


Figura 34: Los trectos poli (dA:dT), en una orientación, estimulan la actividad de *eviction* de RSC. A) Ensayo de remodelación nucleosomal para observar la influencia de los trectos poli (dA:dT) sobre la actividad de *eviction* de RSC. Las sondas usadas se indican en la parte superior de la figura y corresponden a las mostradas en la Figura 15B. La imagen es representativa del ensayo realizado al menos tres veces. La migración de los diferentes estados del mononucleosoma se muestra a la derecha de la figura. **B)** El gráfico corresponde a la cuantificación de la actividad de *eviction* bajo cada condición. Las barras de error representan una desviación estándar. Los asteriscos denotan diferencias significativas (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$; $n = 3$) calculados mediante test ANOVA y comparación múltiple Tukey's.

4.1.13 Influencia de los trectos poli (dA:dT) en una posición interna del ADN nucleosomal, sobre la actividad de ISW1a y RSC

Una vez obtenidos los resultados que muestran que los tractos poli (dA:dT) pueden influir en la unión de los complejos ISW1a y RSC (Figura 32), nos preguntamos si todos los efectos observados anteriormente se deben a que estas secuencias se encontraban presentes en el ADN *linker* de nuestras sondas. Cabe destacar que los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP pueden poseer tanto subunidades que interaccionan con el nucleosoma como con el ADN extranucleosomal (Clapier, 2021; Clapier y col., 2017; Reyes y col., 2021; Wagner y col., 2020; Yan y col., 2019; Ye y col., 2019); por lo tanto, saber si el efecto de estas secuencias se hace presente cuando se encuentran localizadas en el ADN *linker* o en el ADN nucleosomal, nos ayudará a inferir sobre cuáles subunidades de los complejos se están generando los efectos. Para abordar esta interrogante diseñamos sondas mononucleosomales laterales con los tractos poli (dA:dT) en la localización SHL5 y usamos 80 pb de ADN *linker* (Figura 35A). El objetivo de usar un *linker* más largo, fue dado para que durante la acción de ISW1a el tracto poli (dA:dT) se tope con la posición SHL2 antes de llegar a la posición central, ya que para el complejo Chd1 se ha observado que la cercanía a esta posición influye en la actividad del complejo (Winger y Bowman, 2017).

Al realizar los experimentos con ISW1a pudimos notar que no existe un freno evidente en la actividad de *sliding*, lo cual pudimos notar más claramente al realizar la cuantificación (comparar carril 2 con 4 y 6, Figura 35B; Figura 35C); sin embargo, la presencia de los tractos poli (dA:dT) induce la aparición

de una población que apenas se observa en el control y que indicamos con una flecha (carril 4 y 6, Figura 35B). La aparición de esta banda muestra que existe un freno en algún punto de la remodelación de ISW1a, la cual no se representa en la cuantificación al no considerar las diferentes poblaciones individualmente, sino que son consideradas todas juntas como movimiento por *sliding* del complejo. Una situación similar ocurrió al observar el efecto de los tractos poli (dA:dT) a una distancia de 19 pb (ver carril 7, Figura 23B; Figura 23C).

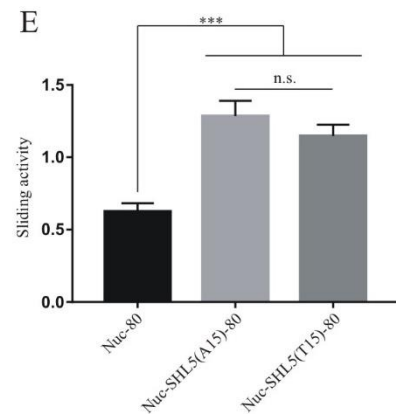
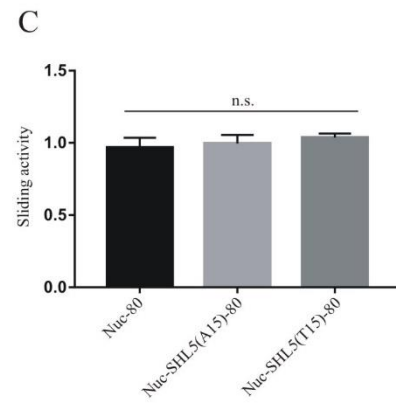
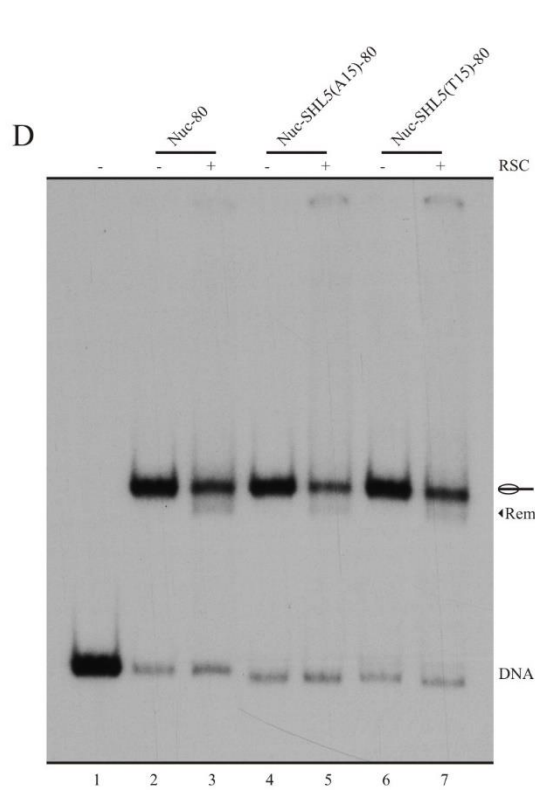
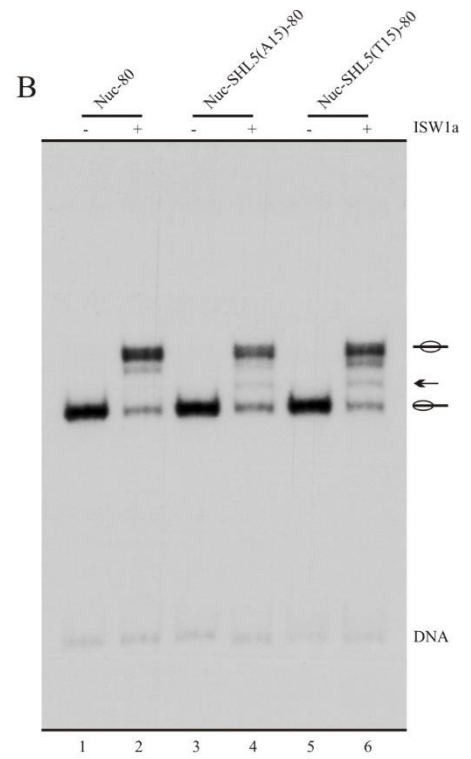
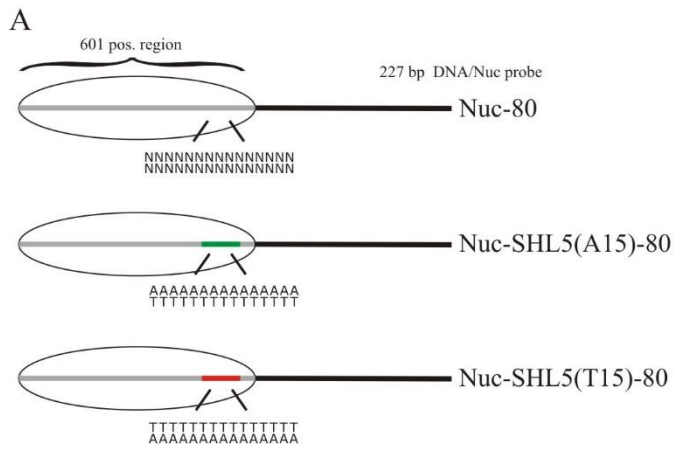


Figura 35: Los tractos poli (dA:dT) en posición SHL5 afectan la actividad remodeladora de ISW1a y RSC. **A)** Representación esquemática de las sondas usadas en este análisis. El octámero de histonas es representado como un óvalo transparente, la línea gris representa el ADN nucleosomal y las líneas negras representan el ADN *linker* (80 pb). Los tractos poli A se representan por líneas verdes, mientras que los tractos poli T se representan con líneas rojas. Todas las sondas poseen un tamaño de 227 pb y poseen tractos de 15 pb en la posición SHL5. **B y D)** Ensayos de remodelación nucleosomal para observar cómo influyen la orientación de los tractos poli (dA:dT) en una posición interna del nucleosoma sobre la actividad de RSC. Las sondas usadas se indican en la parte superior de cada figura. La imagen es representativa del ensayo realizado al menos tres veces. La migración de los diferentes estados del mononucleosoma se muestra a la derecha de cada figura. La flecha en B representa una población semi-central. **C y E)** Los gráficos corresponden a la cuantificación de la actividad de *sliding* bajo cada condición. Las barras de error representan una desviación estándar. Los asteriscos denotan diferencias significativas (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, n.s: no significativo; $n = 3$) calculados mediante test ANOVA y comparación múltiple Tukey's.

Al realizar los experimentos con RSC, se puede notar que a simple vista no existen diferencias entre las sondas usadas (Figura 35D); sin embargo, al cuantificar la actividad de *sliding* observamos que existe una estimulación al estar presente los tractos poli (dA:dT) (Figura 35E). La diferencia entre lo observado en el gel y en la cuantificación se debe a que existe una disminución en la señal total del mononucleosoma, que se aprecia al observar la cantidad de señal perdida en la zona de siembra y a lo largo del carril, en las sondas con tractos poli (dA:dT) (ver carril 5 y 7, Figura 35D); sin embargo, la relación entre

la banda remodelada por *sliding* y la banda de nucleosoma sin remodelar, acusa que existe una estimulación. Este resultado es consistente con lo descrito previamente sobre el efecto estimulador de trectos poli (dA:dT) sobre la actividad de RSC (Lorch y col., 2014). De todas formas, el efecto estimulador es menor al encontrado con sondas que poseen los trectos en ADN *linker* (ver, por ejemplo, Figuras 16 y 26). Además, no se observan diferencias entre las dos distintas orientaciones de estas secuencias (comparar carril 5 y 7, Figura 35D; Figura 35E).

4.1.14 Determinación de la influencia de los trectos poli (dA:dT) sobre γ SWI/SNF en un modelo de mononucleosomas centrales

Una vez obtenidos los resultados con ISW1a y RSC, decidimos confirmar el efecto observado sobre γ SWI/SNF (Figura 17). Para ello usamos los mononucleosomas centrales usados para los experimentos con RSC (Figura 29A), pero solo comparamos la sonda sin trectos poli (dA:dT) con la sonda con trectos por ambos lados del nucleosoma (Figura 36A), ya que habíamos observado para RSC que la sonda con dos trectos estimula más la remodelación de *sliding* que la sonda con un solo tracto (Figura 30). Esto nos permitía observar un efecto más claro sobre γ SWI/SNF y confirmar los resultados previos obtenidos con este complejo (Figura 17). Además, debido a que γ SWI/SNF es un complejo de la misma subfamilia que RSC (Clapier y

Cairns, 2009; Clapier y col., 2017), esperábamos resultados similares a los encontrados para RSC. Al realizar el experimento notamos que existe una estimulación de la actividad de *sliding* de γ SWI/SNF al estar presentes los trectos poli (dA:dT) a ambos lados del nucleosoma (comparar carril 3 con 5, Figura 36B; Figura 36C).

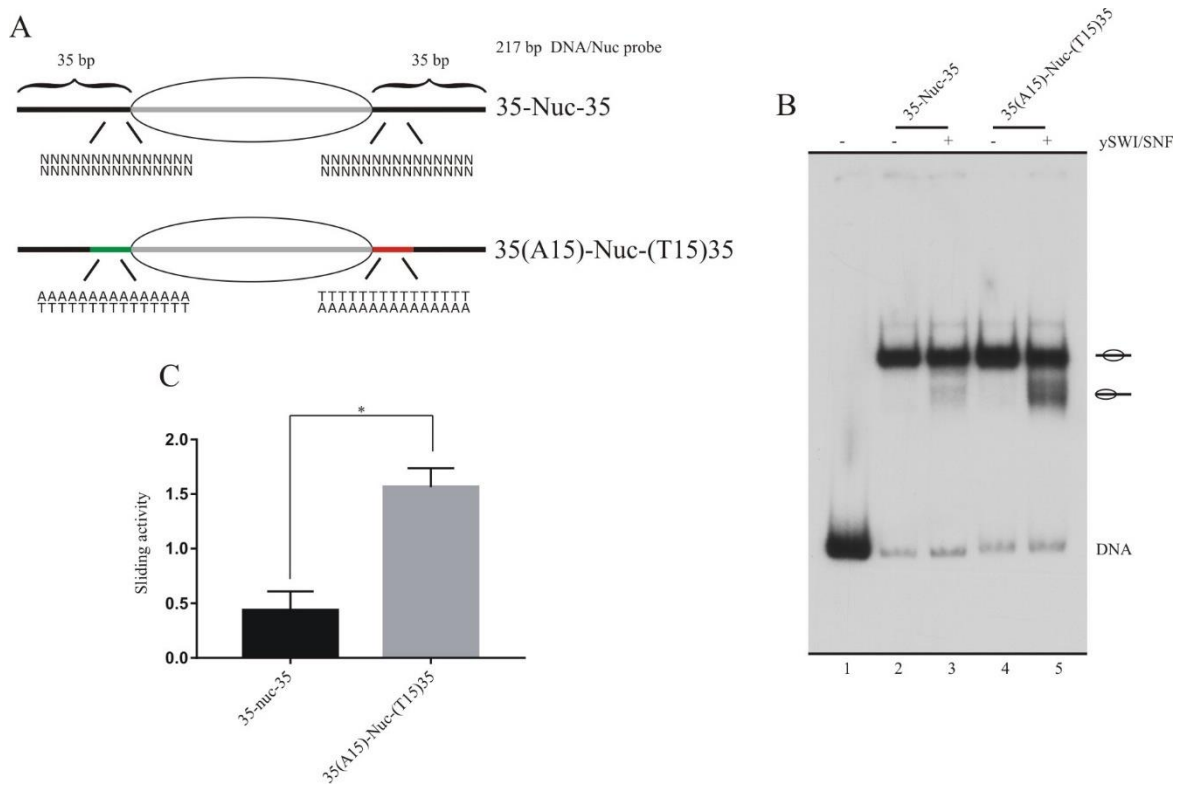


Figura 36: Los trectos poli (dA:dT) estimulan la actividad de *sliding* de γ SWI/SNF en un modelo de mononucleosoma central. A) Representación esquemática de las sondas usadas en este análisis. El octámero de histonas es representado como un óvalo transparente, la línea gris representa el ADN nucleosomal y las líneas negras representan el ADN *linker* (35 pb a cada extremo). Los trectos poli A se representan por líneas verdes, mientras que los trectos poli T se representan con líneas rojas. Todas las sondas poseen un tamaño de 217 pb y poseen trectos

de 15 pb. **B)** Ensayo de remodelación nucleosomal para observar el efecto de los tractos poli (dA:dT) sobre la actividad remodeladora de γ SWI/SNF en un modelo de mononucleosoma central. Las sondas usadas se indican en la parte superior de la figura. La imagen es representativa del ensayo realizado al menos tres veces. La migración de los diferentes estados del mononucleosoma se muestra a la derecha de la figura. **C)** El gráfico corresponde a la cuantificación de la actividad de *sliding* bajo cada condición. Las barras de error representan una desviación estándar. Los asteriscos denotan diferencias significativas (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$; $n = 3$) calculados mediante test ANOVA y comparación múltiple Tukey's.

4.1.15 Influencia de una secuencia posicionadora en la actividad remodeladora de ISW1a y RSC

Debido a que hemos observado que los tractos poli (dA:dT) tienen un efecto sobre la actividad de complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP, nos propusimos analizar si otra secuencia de ADN puede tener un efecto sobre los complejos ISW1a y RSC. Tenemos que considerar que los tractos poli (dA:dT) son considerados como secuencias rígidas y excluyentes de nucleosomas (Nelson y col., 1987; Segal y Widom, 2009; Struhl y Segal, 2013; Suter y col., 2000), por lo tanto, nos propusimos probar un caso opuesto, es decir, una secuencia que fuera considerada posicionadora de nucleosomas. El objetivo de este experimento fue dilucidar si el efecto observado de los tractos poli (dA:dT) sobre los complejos se debe a sus

propiedades como secuencia excluyente de nucleosomas o por algún tipo de reconocimiento que los complejos realizan sobre estas secuencias. Para el caso de una secuencia que sea posicionadora de nucleosomas, esperábamos un efecto contrario al de los trectos poli (dA:dT), de surtir estos trectos su efecto en base a su rigidez. De manera más general, este análisis también permitía revisar si cualquier cambio de secuencia cerca del *core nucleosomal* podía surtir un efecto sobre la actividad de los complejos.

Para este experimento usamos una secuencia artificial (CTAGGCAGCC) que ha sido probada como posicionadora de nucleosomas anteriormente (Takasuka y Stein, 2010). Esta secuencia fue insertada en el extremo 3' de la secuencia 601 (Figura 37A), siguiendo la teoría de que el ADN nucleosomal prefiere tener dinucleótidos más flexibles (ej: TA) en el surco menor y con una periodicidad de 10 pb (Jiang y Pugh, 2009; Lowary y Widom, 1998; Salih y col., 2015; Segal y col., 2006; Struhl y Segal, 2013; Takasuka y Stein, 2010). De esta manera, el dinucleótido TA presente en la secuencia insertada se encuentra a 59 pb de distancia del primer dinucleótido TA presente a la derecha del *dyad* en la secuencia 601.

Los ensayos de remodelación con esta sonda mostraron que esta secuencia no ejerce efectos sobre ISW1a (comparar carril 3 con 6 Figura 37B; Figura 37C) y tampoco sobre RSC (comparar carril 4 con 7 Figura 37B; Figura 37D), indicando que no cualquier cambio de secuencia lleva a una variación en los grados de actividad de estos complejos.

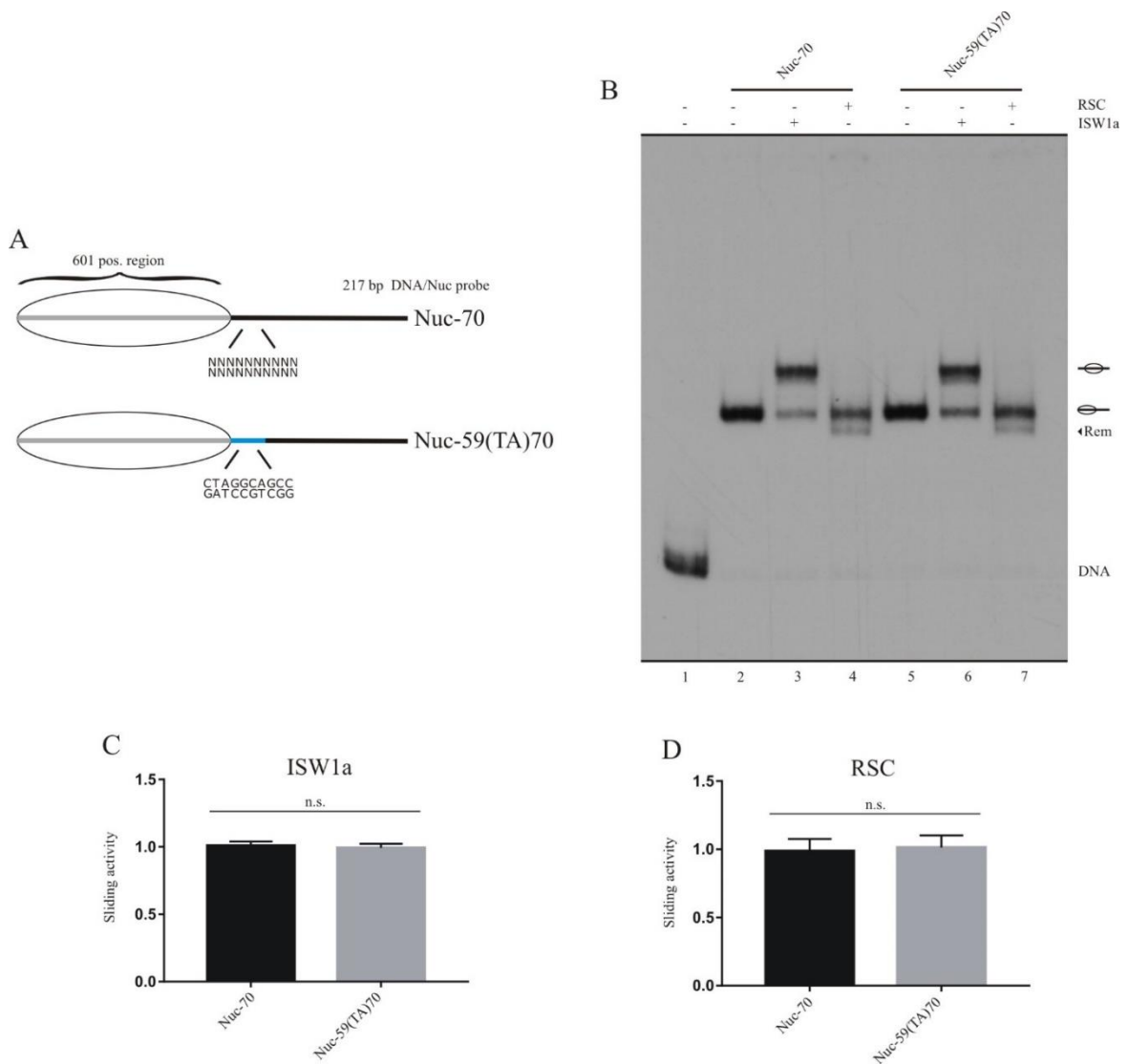


Figura 37: La secuencia posicionadora 59(TA) no tiene efecto en la actividad remodeladora de ISW1a y RSC. A) Representación esquemática de las sondas usadas en este análisis. El octámero de histonas es representado como un óvalo transparente, la línea gris representa el ADN nucleosomal y la línea negra representa el ADN *linker* (70 pb). La secuencia posicionadora se representa por una línea celeste y tiene un tamaño de 10 pb. 601 pos. region: Secuencia posicionadora de nucleosomas 601 (147 pb). **B)** Ensayo de remodelación nucleosomal para observar el efecto de una secuencia posicionadora sobre la actividad remodeladora de ISW1a y RSC. Las sondas usadas se indican en la parte superior de la figura.

La imagen es representativa del ensayo realizado al menos tres veces. La migración de los diferentes estados del mononucleosoma se muestra a la derecha de la figura. **C y D)** Los gráficos corresponden a la cuantificación de la actividad de *sliding* bajo cada condición para ISW1a (C) o RSC (D). Las barras de error representan una desviación estándar (n = 3). Las letras “n.s” significa que no hay diferencias significativas calculados mediante test t Student.

4.2 Determinar el efecto conjunto de los tractos poli (dA:dT) y un factor de transcripción sobre la actividad de complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP

4.2.1 Purificación de factores a usar en estos análisis: Gal4-DBD y Gal4-Vp16

Como se mencionó anteriormente, en el NDR existen sitios de unión para diferentes proteínas, las cuales pueden llegar a influir en el “paisaje nucleosomal” (Hota y Bartholomew, 2011; Mahony y Pugh, 2015; Pugh, 2010; Sirinakis y col., 2011). De este modo, nos propusimos analizar cómo la presencia física de una proteína unida a una sonda mononucleosomal que posee tractos poli (dA:dT), puede influir en la actividad de complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP. Para ello usamos el dominio de unión del factor de transcripción Gal4 (Gal4-DBD) y un factor de transcripción quimérico que posee el dominio de unión de Gal4 y el dominio de transactivación del factor VP16 (Gal4-VP16). Ambas proteínas han sido usadas

ampliamente en nuestro laboratorio (Gutierrez y col., 2007; Hepp y col., 2017). La purificación se llevó a cabo como se explica en la sección 3.2. La Figura 38 corresponde a una tinción con azul de Coomassie para observar el estado de las proteínas purificadas. Las concentraciones obtenidas para ambas fueron óptimas para realizar los experimentos siguientes.

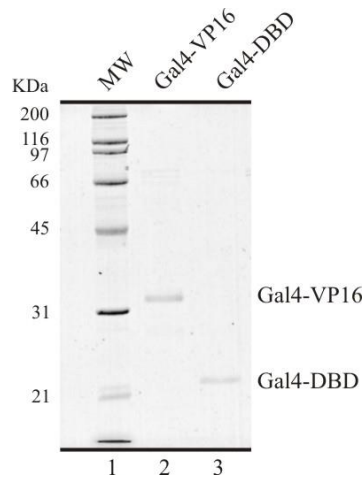


Figura 38: Purificación de Gal4-DBD y Gal4-VP16. Análisis SDS-PAGE, con gel al 12% teñido con azul de Coomassie en donde se muestra la purificación de Gal4-DBD y Gal4-VP16. MW: Marcador de tamaños moleculares (Molecular Weight).

Antes de realizar los experimentos de remodelación, para ambas proteínas se realizaron ensayos de unión a las sondas que se ocuparon posteriormente. Las sondas usadas para estos experimentos fueron: Nuc-70, Nuc-(A15)70 y Nuc-(T15)70 (Figura 39A). Cabe recordar que todas estas sondas poseen el sitio de unión a Gal4 a 22 pb de distancia del nucleosoma. En

estos experimentos se buscó un alto porcentaje de unión por parte de ambas proteínas (95-100%), lo que es necesario para los posteriores ensayos de remodelación. Esto se logró con las concentraciones que normalmente se manejaban en el laboratorio: 25 nM para Gal4-DBD y 15 nM para Gal4-VP16 (Figura 39B). Además, este ensayo permitía descartar que los trectos poli (dA:dT) tengan un efecto en la unión de ambas proteínas.

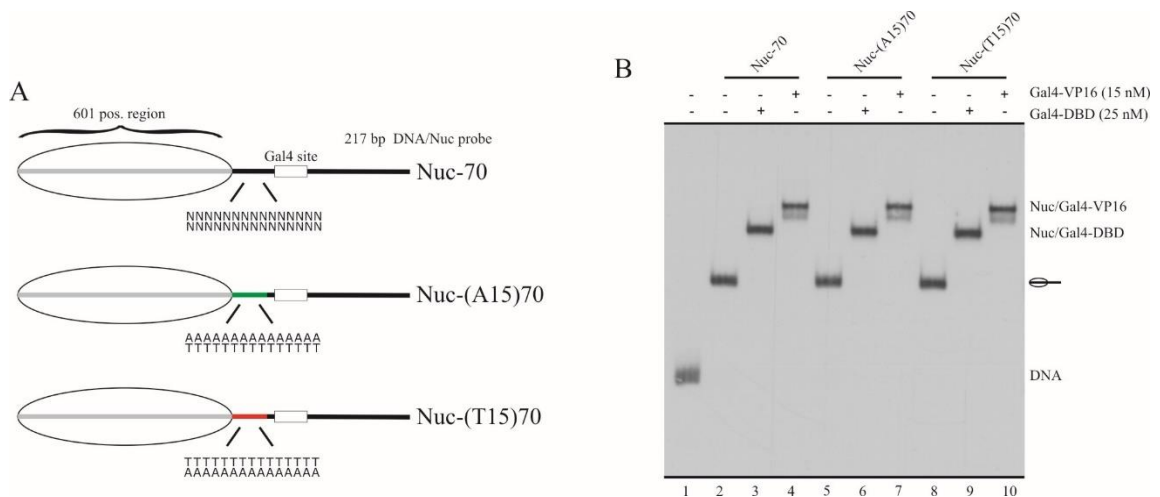


Figura 39: Unión de Gal4-DBD y Gal4-VP16 a sondas mononucleosomales con trectos poli (dA:dT). **A)** Representación esquemática de las sondas usadas en este análisis. El octámero de histonas es representado como un óvalo transparente, la línea gris representa el ADN nucleosomal y la línea negra representa el ADN *linker* (70 pb). Los trectos poli (dA:dT) se representan por líneas verdes (poli A) o rojas (poli T) y poseen un tamaño de 15 pb. La secuencia de unión a Gal4 se representa con un rectángulo blanco. 601 pos. region: Secuencia posicionadora de nucleosomas 601 (147 pb). **B)** Ensayo de retardo en gel para observar la unión de Gal4-DBD y Gal4-VP16 a sondas con trectos poli (dA:dT). Las concentraciones usadas fueron de 15 nM y 25 nM para Gal4-VP16 y Gal4-DBD, respectivamente. Las sondas usadas se indican en la parte superior de la figura. La imagen es representativa del ensayo

realizado al menos tres veces. La migración de los diferentes estados del mononucleosoma se muestra a la derecha de la figura.

4.2.2 Efecto de Gal4-DBD y trectos poli (dA:dT) sobre la actividad remodeladora de ISW1a

Para observar cómo la presencia física de una proteína unida al ADN en conjunto con la presencia de trectos poli(dA:dT) puede - en comparación con ambos elementos por separado - actuar sobre la actividad de *sliding* de ISW1a, decidimos usar las sondas mostradas en la Figura 39A y el dominio de unión al ADN del factor de transcripción Gal4 (Gal4-DBD). Decidimos usar este factor, debido a que anteriormente se observó que este es capaz de bloquear la actividad remodeladora de ISW1a, funcionando como una barrera (Li y col., 2015), efecto que es similar al que observamos por parte de los trectos poli (dA:dT) en nuestros resultados anteriores para estas sondas (ver sección 4.1.3). De esta manera procedimos a realizar los experimentos como se explica en la sección 3.9.4. Las sondas usadas se muestran en la Figura 39A y los resultados se pueden observar en la Figura 40. El carril 1 de la Figura 40A, es una reacción en donde no se agregó la mezcla remodeladora y es usada como control de unión de Gal4-DBD en el experimento. Este control solo se realizó con la sonda Nuc-70, ya que en la Figura 39B se muestra que la unión es similar en todas las sondas. Al observar el resto del experimento, nos damos

cuenta de que el resultado coincide con lo mostrado anteriormente (Li y col., 2015), en donde Gal4-DBD es capaz de bloquear la actividad de *sliding* de ISW1a (comparar carriles 3 y 4, Figura 40A; Figura 40B). Adicionalmente, este resultado nos muestra que el bloqueo que realiza Gal4-DBD es mayor al realizado por los tractos poli (dA:dT) (comparar carril 4 con 6 y 9, Figura 40A; Figura 40B). Además, al comparar la acción conjunta de Gal4-DBD con los tractos poli (dA:dT), podemos observar que el bloqueo de la actividad de *sliding* mediada por Gal4-DBD no se ve afectada por la presencia de estas secuencias (comparar carril 4 con 7 y 10, Figura 40A; Figura 40B).

Cabe consignar que en este experimento la remoción de la unión de Gal4-DBD no fue completamente eficiente, debido a que aún podemos observar una banda remanente que corresponde a la unión de este factor (observar carriles 4, 7 y 10, Figura 40A). Este hecho no afecta el resultado final, ya que la sonda que queda unida a Gal4-DBD después de la remoción corresponde a sonda donde ISW1a no pudo remodelar. Esto considerando que el sitio de unión para Gal4-DBD queda bloqueado por el octámero de histonas una vez que este se mueve a la posición central. Por lo tanto, no puede existir la condición de mononucleosoma central con Gal4-DBD unido.

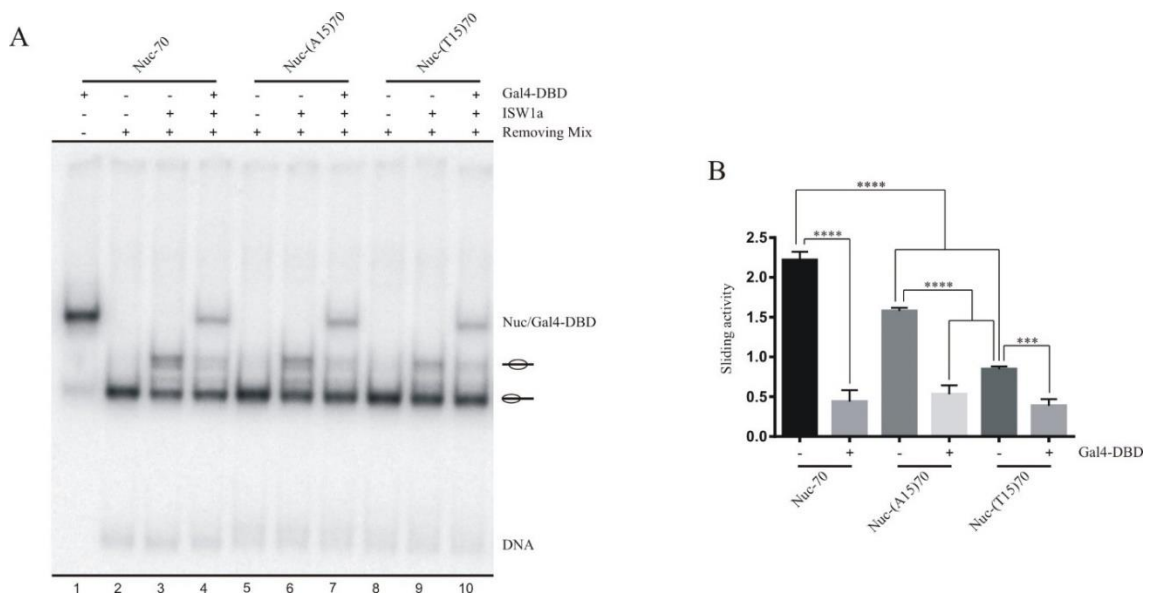


Figura 40: La presencia de Gal4-DBD bloquea la actividad remodeladora de ISW1a en mayor grado que los trectos poli (dA:dT). A) Ensayo de remodelación nucleosomal para observar cómo Gal4-DBD en conjunto con los trectos poli (dA:dT) pueden afectar la actividad remodeladora de ISW1a. Las sondas usadas se indican en la parte superior de la figura y se esquematizan en la Figura 39A. La concentración de Gal4-DBD usada fue de 25 nM. La imagen es representativa del ensayo realizado al menos tres veces. La migración de los diferentes estados del mononucleosoma se muestra a la derecha de la figura. **B)** El gráfico corresponde a la cuantificación de la actividad de *sliding* bajo cada condición. Las barras de error representan una desviación estándar. Los asteriscos denotan diferencias significativas (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$; $n = 3$) calculados mediante test ANOVA y comparación múltiple Tukey's.

4.2.3 Efecto conjunto de Gal4-VP16 y trectos poli (dA:dT) sobre la actividad remodeladora de RSC

Al igual como se realizó para ISW1a, se procedió a realizar el mismo experimento con RSC y usando las mismas sondas (Figura 39A); sin embargo, en este caso se usó Gal4-VP16 y no Gal4-DBD. Esto se debe a que para el caso de RSC era más crítico obtener una remoción completa de la unión del factor, lo que pudimos lograr con Gal4-VP16, pero no con Gal4-DBD. Esta necesidad viene al saber que RSC mueve el nucleosoma en dirección contraria al sitio de unión a Gal4 y los tractos poli (dA:dT) (Figura 16A y Figura 28). Por lo tanto, el factor puede permanecer unido a la sonda incluso después de la reacción de remodelación.

Al realizar el experimento se observó que en la sonda Nuc-70, Gal4-VP16 estimula la actividad de *sliding* de RSC (comparar carril 4 y 5, Figura 41A; Figura 41B). Interesantemente, esta estimulación no es mayor a la estimulación ejercida por los tractos poli (dA:dT) (comparar carril 5 con 7 y 10, Figura 41A y Figura 41B). Además, notamos que existe una acción conjunta entre Gal4-VP16 y los tractos poli (dA:dT), pero no en todos los casos. Si observamos la sonda Nuc-(T15)70, notamos que la presencia de Gal4-VP16 no afecta la estimulación ejercida por el tracto poli T (comparar carril 10 y 11, Figura 41A; Figura 41B). Sin embargo, para el caso de la sonda Nuc-(A15)70 se observa un pequeño aumento en la remodelación de RSC al estar presente Gal4-VP16 (comparar carril 7 y 8, Figura 41A; Figura 41B).

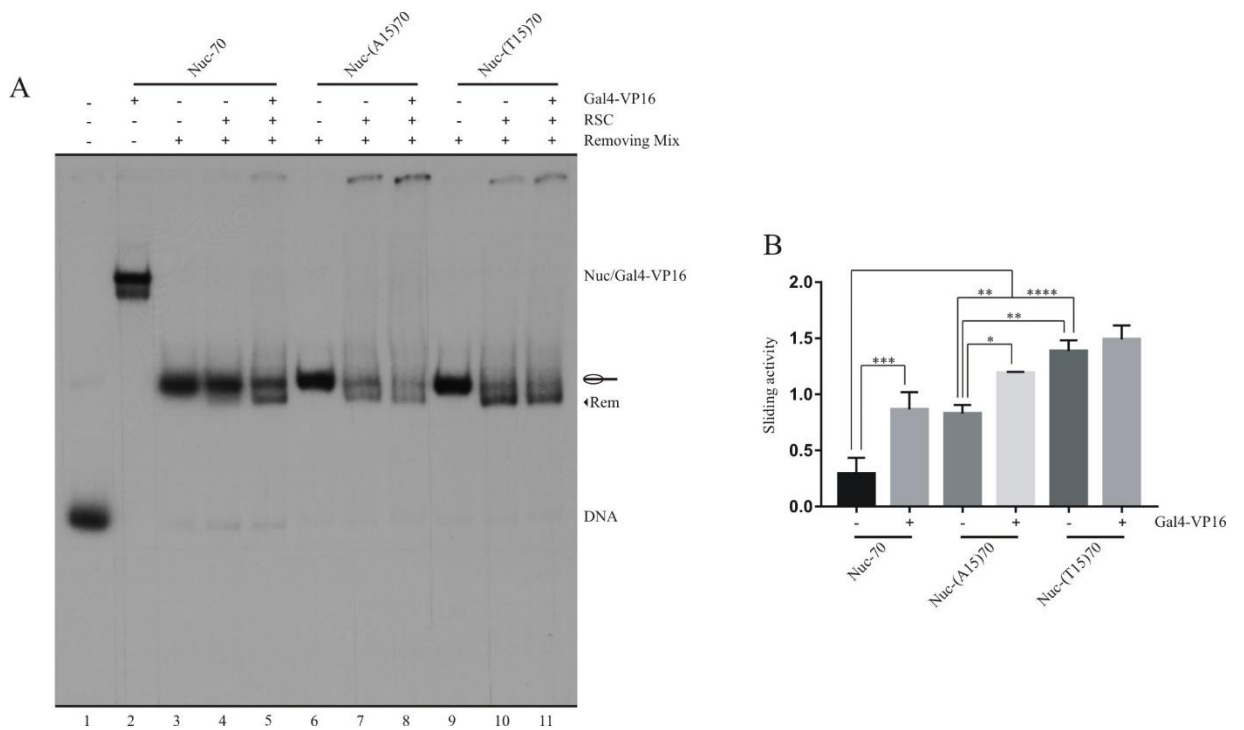


Figura 41: La presencia de Gal4-VP16 estimula la actividad de *sliding* de RSC al igual que los tractos poli (dA:dT). A) Ensayo de remodelación nucleosomal para observar cómo Gal4-VP16 y tractos poli (dA:dT), por separado o en conjunto, pueden afectar la actividad remodeladora de RSC. Las sondas usadas se indican en la parte superior de la figura y se muestran en la Figura 39A. La concentración de Gal4-VP16 usada fue de 15 nM. La imagen es representativa del ensayo realizado al menos tres veces. La migración de los diferentes estados del mononucleosoma se muestra a la derecha de la figura. **B)** El gráfico corresponde a la cuantificación de la actividad de *sliding* bajo cada condición. Las barras de error representan una desviación estándar. Los asteriscos denotan diferencias significativas (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$; $n = 3$) calculados mediante test ANOVA y comparación múltiple Tukey's.

4.2.4 Efecto conjunto de Gal4-VP16 y tractos poli (dA:dT) sobre la actividad remodeladora de γ SWI/SNF

Para el caso de γ SWI/SNF decidimos usar el factor Gal4-VP16 por las mismas razones dadas para RSC y por antecedentes obtenidos en trabajos previos, donde se demostró que Gal4-VP16 es capaz de estimular la actividad de *eviction* de γ SWI/SNF (Gutierrez y col., 2007). Por otro lado, se ha descrito que los tractos poli (dA:dT) son capaces de estimular la actividad de *eviction* de RSC (Lorch y col., 2014). Por estas razones, decidimos observar si los tractos poli (dA:dT) pueden afectar la actividad de *eviction* de γ SWI/SNF gatillada por Gal4-VP16.

Realizamos los experimentos usando las sondas mostradas en la Figura 39A. En primer lugar, confirmamos que Gal4-VP16 estimula la actividad de *eviction* del complejo γ SWI/SNF, al incrementar la aparición de ADN desnudo (comparar carril 3 y 4, Figura 42A). Además, podemos notar que este factor es capaz de estimular la actividad de *eviction* en las sondas que poseen tractos poli (dA:dT); sin embargo, no se lograron observar diferencias significativas entre las sondas estudiadas por efecto de los tractos poli (dA:dT) (comparar carril 4 con 6 y 8, Figura 42A; Figura 42B).

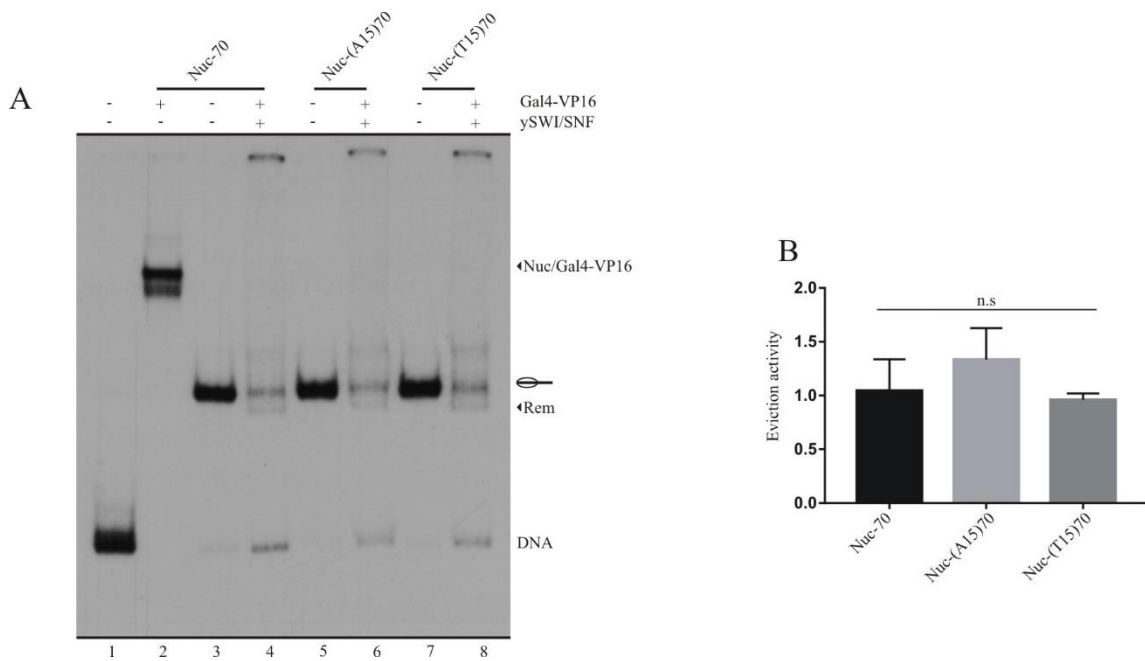


Figura 42: La presencia de los trectos poli (dA:dT) no afecta la actividad de *eviction* de ySWI/SNF gatillada por Gal4-VP16. **A)** Ensayo de remodelación nucleosomal para observar el efecto de los trectos poli (dA:dT) sobre la actividad de *eviction* que gatilla Gal4-VP16 sobre ySWI/SNF. Las sondas usadas se indican en la parte superior de la figura y se muestran en la Figura 39A. La concentración de Gal4-VP16 usada fue de 15 nM. La imagen es representativa del ensayo realizado al menos tres veces. La migración de los diferentes estados del mononucleosoma se muestra a la derecha de la figura. **B)** El gráfico corresponde a la cuantificación de la actividad de *eviction* bajo cada condición. Las barras de error representan una desviación estándar. Los asteriscos denotan diferencias significativas (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, n.s. no significativo; $n = 3$) calculados mediante test ANOVA y comparación múltiple Tukey's.

4.3 Determinar el efecto a nivel de genoma completo de los tractos poli (dA:dT) sobre ISW1a

Al observar los resultados obtenidos con ISW1a, nos propusimos realizar un análisis de genoma completo para corroborar el efecto de los tractos poli (dA:dT) sobre este complejo. Para el caso de RSC no fue necesario realizar el análisis, ya que se ha demostrado, a nivel de genoma completo, una correlación entre la dirección preferencial de remodelación llevada a cabo por este complejo y la orientación de los tractos poli (dA:dT) (Krietenstein y col., 2016).

Para realizar el análisis, se descargó la data publicada por Krietenstein y col., 2016, quienes realizaron una reconstitución nucleosomal del genoma de *S. cerevisiae* y luego analizaron la movilización de nucleosomas que generan distintos complejos purificados, incluido ISW1a. Posteriormente se realizó la metodología explicada en la sección 3.10 para obtener las posiciones de los nucleosomas -1 y +1 en presencia y ausencia del complejo. De esta manera se agruparon los genes que sufrieron un movimiento mayor a 20 pb río arriba o río abajo del *dyad* del nucleosoma -1, y se observó el enriquecimiento de tractos poli A o poli T de a lo menos 6 nucleótidos de extensión en la hebra “sentido” de cada grupo de genes, para la región que abarca la ubicación del nucleosoma -1 en la condición previa a la acción del complejo (SGD). Lo mismo se hizo para el caso del nucleosoma +1.

Como se muestra en la Figura 43, en el grupo de genes que sufre movilización del nucleosoma -1 río abajo en presencia de ISW1a (flecha y línea celeste) hay menor frecuencia de tractos poli A (Figura 43A) y poly T (Figura 43C) en relación a SGD (todos los genes), precisamente en la zona de ADN *linker* que, en la condición previa a la acción de ISW1a (SGD), está justo río abajo del nucleosoma -1. El movimiento río abajo del nucleosoma -1 quiere decir que el nucleosoma se mueve en dirección al NDR. Por el contrario, en el grupo de genes donde ISW1a aleja el nucleosoma -1 del NDR (movimiento de nucleosoma -1 río arriba, flecha y línea naranja) la frecuencia de tractos poli (dA:dT) en la misma región es mayor (Figura 43A y 43C). Con el nucleosoma +1 ocurre lo mismo, existe un movimiento hacia el NDR (flecha y línea naranja) correlacionado a una menor frecuencia de tractos poli (dA:dT) (Figura 43B y 43D) río arriba de este nucleosoma, mientras que hay mayor frecuencia de estas secuencias en el grupo de genes en los que ISW1a aleja el nucleosoma +1 del NDR (flecha y línea celeste) (Figura 43B y 43D).

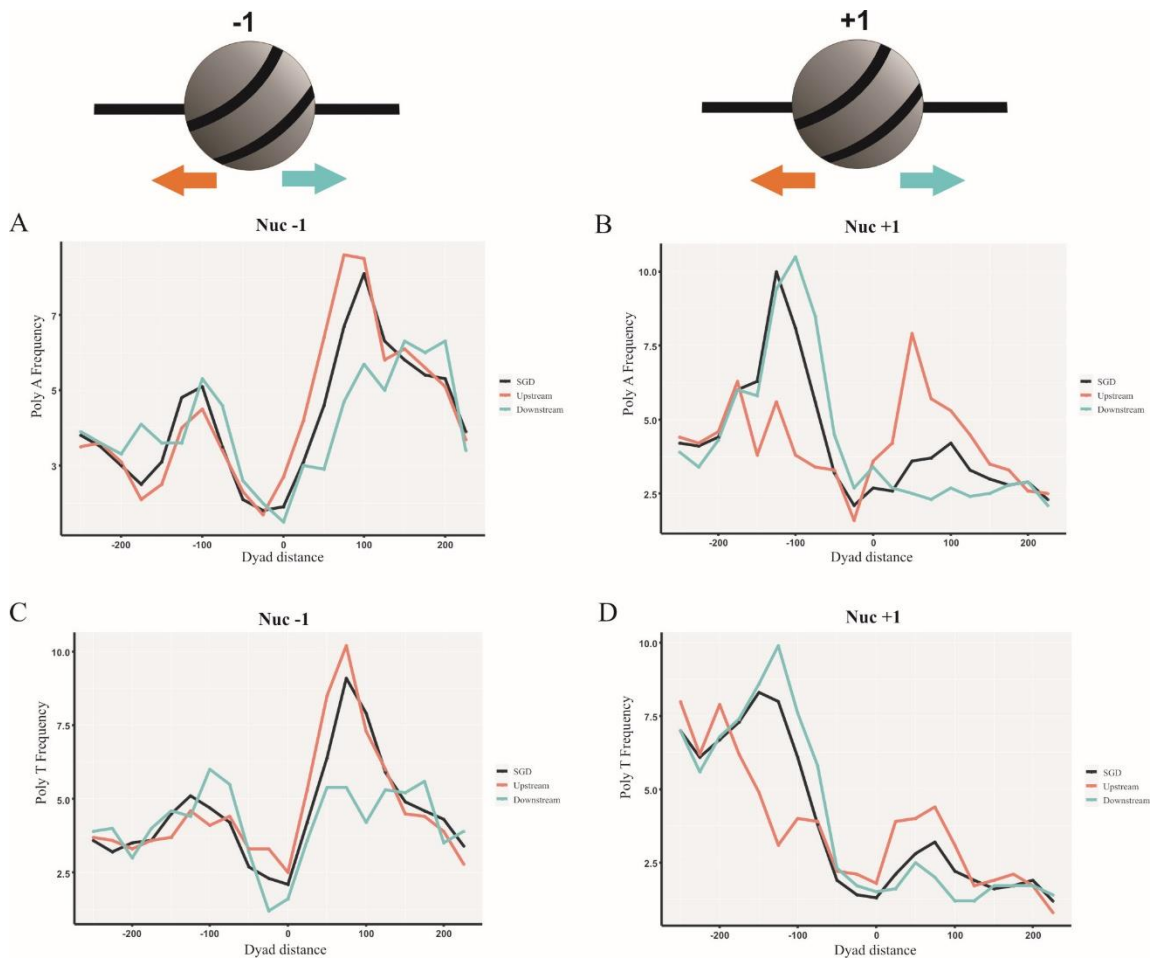


Figura 43: A nivel de genoma completo los trectos poli (dA:dT) están menos presentes en aquellos promotores donde ISW1a actúa cubriendo los NDRs. Gráficos de frecuencia de trectos poli (dA:dT) centrados en el *dyad* del nucleosoma -1 y +1, respectivamente. En negro se muestra el perfil de frecuencia de trectos de todos los genes (SGD), en celeste se muestra el perfil de los grupos de genes que sufrieron movilización de nucleosoma (-1 o +1) al menos 20 pb río abajo (*downstream*) por acción de ISW1a y en naranja se muestra el perfil de los grupos de genes que se sufrieron movilización río arriba (*upstream*). **A)** Frecuencia de poli A alrededor del *dyad* del nucleosoma -1. **B)** Frecuencia de poli A alrededor del *dyad* del nucleosoma +1. **C)** Frecuencia de poli T alrededor del *dyad* del nucleosoma -1. **D)** Frecuencia de poli T alrededor del *dyad* del nucleosoma +1.

5. DISCUSIÓN

Durante bastante tiempo los trectos poli (dA:dT) han sido estudiados para comprender sus propiedades y su impacto en la dinámica de la cromatina. De esta manera, han aparecido una gran variedad de estudios mostrando sus propiedades intrínsecas como su posible impacto en procesos activos de dinámica de cromatina. Esto ha permitido que el rol concebido para estas secuencias haya ido cambiando a lo largo de los años, donde últimamente han ido tomando una mayor relevancia (Barnes y Korber, 2021; Cairns, 2009; Clapier, 2021; Field y col., 2008; Hughes y Rando, 2014; Kaplan y col., 2009; Korber, 2012; Krietenstein y col., 2016; Lieleg y col., 2015; Nelson y col., 1987; Segal y Widom, 2009; Shrader y Crothers, 1990; Struhl y Segal, 2013; Suter y col., 2000; Tirosh y Barkai, 2008; Tsankov y col., 2010). Actualmente el estudio de estas secuencias se ha ligado fuertemente a la actividad de los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP, donde se ha observado que existe una relación entre ambos (Barnes y Korber, 2021; Krietenstein y col., 2016; Lorch y col., 2014; Winger y Bowman, 2017). Sin embargo, aún no existe la suficiente evidencia para determinar cómo los complejos remodeladores dependientes de ATP se ven afectados por estas secuencias. Debido a ello en este trabajo de tesis nos propusimos determinar cómo los trectos poli (dA:dT) pueden influir en diferentes propiedades de los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP.

5.1 ISW1a

Uno de los complejos remodeladores de cromatina que abordamos fue ISW1a, un complejo del tipo “espaciador” (Kubik y col., 2019) y que se ha encontrado que en varios genes puede actuar como “cubridor” al tratar de cerrar los NDRs compitiendo con el rol de RSC (Parnell y col., 2015). Al realizar los primeros experimentos usando las sondas Nuc-70 (Figura 15B), pudimos notar que los tractos poli (dA:dT) frenan la actividad de *sliding* del complejo (Figura 15). En esta situación hay que considerar que el complejo moverá el nucleosoma en dirección a los tractos poli (dA:dT) para llegar a la población central, dejando el tracto en la locación SHL4 aproximadamente. Un resultado similar se encontró para el complejo Chd1, el cual al igual que ISW1a, es considerado un complejo “espaciador” (Kubik y col., 2019). En este estudio se observó que los tractos poli (dA:dT) frenan la remodelación de *sliding* de Chd1 a medida que se encuentran más cerca de la locación SHL2 (Winger y Bowman, 2017), locación donde se une el motor de la mayoría de los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP (Auger y col., 2008; Clapier, 2021; Clapier y col., 2017; Nguyen y col., 2013). Interesantemente, cuando el tracto se encontraba demasiado cerca de SHL2, el complejo Chd1 mostró remodelación en la dirección contraria a la ubicación de los tractos poli (dA:dT) (Winger y Bowman, 2017). Estos resultados mostrarían que los tractos poli (dA:dT) afectan a estos complejos a medida que se acercan al motor de estos, donde ocurre la acción de translocación que realiza la subunidad catalítica.

Además, afectarían negativamente este proceso. Esta idea se apoya con otro de nuestros resultados obtenidos. En la Figura 23 mostramos qué ocurre con la remodelación catalizada por ISW1a en sondas con tracto poli (dA:dT) a mayor distancia del *core nucleosomal*, donde observamos que a 19 pb y 40 pb de distancia, se pierde el efecto de frenado que ejercen estas secuencias sobre el complejo. Esto se podría deber a la lejanía existente con la locación SHL2, ya que con la distancia de 19 pb el tracto llegaría a la locación SHL6 tras la acción de ISW1a, y con la distancia de 40 pb no llegaría a formar parte del ADN nucleosomal. Sin embargo, podemos notar que en la distancia de 19 pb aparece una banda de una población semi-central, indicando que existe un pequeño freno generado posiblemente por el ingreso de esta secuencia al ADN nucleosomal o acercamiento a este (Figura 23). Este resultado se ve apoyado por los experimentos con los tractos poli (dA:dT) en la locación SHL5 (Figura 35B y Figura 35C), donde observamos que la presencia del tracto no tiene efecto sobre la actividad de *sliding*, pero solo en presencia de estas secuencias aparece una población semi-central, indicando el frenado ejercido por los tractos poli (dA:dT) al acercarse a SHL2. Por lo que en su conjunto estos resultados indicarían que ISW1a podría comportarse, al menos en parte, similar a Chd1, al estar presentes los tractos poli (dA:dT) en locaciones internas del nucleosoma. Sin embargo, no podemos descartar que los efectos de bloqueo observados por parte de los tractos poli (dA:dT) sobre ISW1a, se deban a la propiedad de estas secuencias de desestabilizar al nucleosoma.

Un aspecto que no analizó el estudio de Chd1 fue el efecto que tienen los tractos poli (dA:dT) en el ADN *linker*, ellos solo usaron locaciones internas del nucleosoma (Winger y Bowman, 2017). Por el contrario, en nuestros análisis observamos el efecto de estas secuencias en el ADN nucleosomal y en el ADN *linker*, lo que nos permitió obtener una mayor cantidad de observaciones para entender el efecto que ejercen estas secuencias sobre los complejos. De hecho, este enfoque nos permitió obtener un resultado interesante respecto a lo que ocurre con la remodelación de ISW1a si el tracto poli (dA:dT) se encuentra en la dirección contraria al movimiento del nucleosoma. Aquí pudimos observar que la remodelación de *sliding* no se ve bloqueada por los tractos e incluso se ve estimulada por estas secuencias (Figura 25). Pero ¿cómo los tractos poli (dA:dT) afectan al complejo para que ocurra esta estimulación? En esta situación los tractos poli (dA:dT) nunca llegan a ser parte del ADN nucleosomal, por lo que la única alternativa es que la interacción sea con las regiones de ISW1a que se unen al ADN *linker*. En la Figura 3A hay un esquema con los elementos que componen la subunidad catalítica de ISWI, donde se muestran los lóbulos que generan la translocación del ADN, el dominio HSS y las regiones auto inhibitorias AutoN y NegC (Clapier y col., 2017). De estos elementos los que tienen implicancia directa con la interacción con el ADN *linker* son HSS y NegC, los cuales regulan la actividad del complejo (Clapier, 2021; Reyes y col., 2021). El dominio HSS es el que interacciona con el ADN *linker*, funcionando como una “regla molecular” y confiriéndole la capacidad de

espaciamiento que posee el complejo (Clapier, 2021; Reyes y col., 2021; Yamada y col., 2011). Cuando el complejo no se encuentra unido al nucleosoma, NegC inhibe un lóbulo *RecA-like* impidiendo que ocurra la translocación del ADN; la inhibición se ve interrumpida solo cuando el dominio HSS se une al ADN *linker*. Esta regulación entre NegC y HSS permite generar el espaciamiento entre nucleosomas, ya que la unión de HSS se ve interrumpida cuando se enfrenta al nucleosoma adyacente, por lo que al soltarse del ADN *linker* generará que NegC vuelva a inhibir al complejo (Clapier, 2021; Clapier y Cairns, 2012; Reyes y col., 2021; Yan y col., 2016). En la Figura 44A se muestra como AutoN y NegC regulan la acción de ISW1a. Por otro lado, se ha observado que la subunidad loc3 de ISW1a, puede unirse al ADN *linker* interaccionando con HSS, por lo que igual podría estar implicado en la habilidad de espaciamiento del complejo (Figura 44B) (Bhardwaj y col., 2020; Yamada y col., 2011). Esta información junto con los resultados de la Figura 25, nos permite interpretar que los tractos poli (dA:dT) pueden afectar la interacción de HSS y/o loc3 al ADN *linker*. Hipotetizamos que los eventos de unión y reacomodación de ISW1a al nucleosoma ocurren de manera más rápida y/o eficiente por uno de los segmentos de ADN *linker* del nucleosoma al tener una secuencia inhibitoria para su actividad en el otro *linker*. Complementariamente, los resultados de unión de ISW1a (Figura 32A) muestran que la unión del complejo disminuye levemente con la orientación poli T, lo que podría indicar que la interacción de HSS/loc3 al ADN podría disminuir con la presencia de

estas secuencias. Esto permitiría que *in vivo* el complejo prefiera unirse al ADN *linker* que no posee estas secuencias, remodelando en dirección contraria a estas. Cabe destacar, que HSS se une al ADN *linker* que va entrando al nucleosoma, lo que permite su función de “regla molecular” (Clapier, 2021; Yamada y col., 2011). Además, estos resultados se ven apoyados por el estudio realizado por Krietenstein y col., donde observaron el efecto de complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP purificados sobre el posicionamiento nucleosomal. Este grupo observó que ciertos complejos pueden despejar una región de nucleosomas al estar presente un tracto poli (dA:dT) (Krietenstein y col., 2016). Interesantemente, exceptuando a RSC e Ino80, los complejos ISW1a y Chd1 son los que más se ven influenciados por estas secuencias para despejar la región de nucleosomas (Figura 45). Usando estos mismos datos obtenidos por el grupo de Krietenstein y col., observamos que ISW1a no cierra los NDRs de genes que tienen tractos poli (dA:dT) (Figura 43). Dado esto, sería interesante averiguar el efecto que los tractos poli (dA:dT) en el ADN *linker* podrían tener sobre la actividad de Chd1. En conjunto, estos resultados mostrarían que los tractos poli (dA:dT) ejercen un efecto sobre ISW1a al estar presentes en el ADN *linker*.

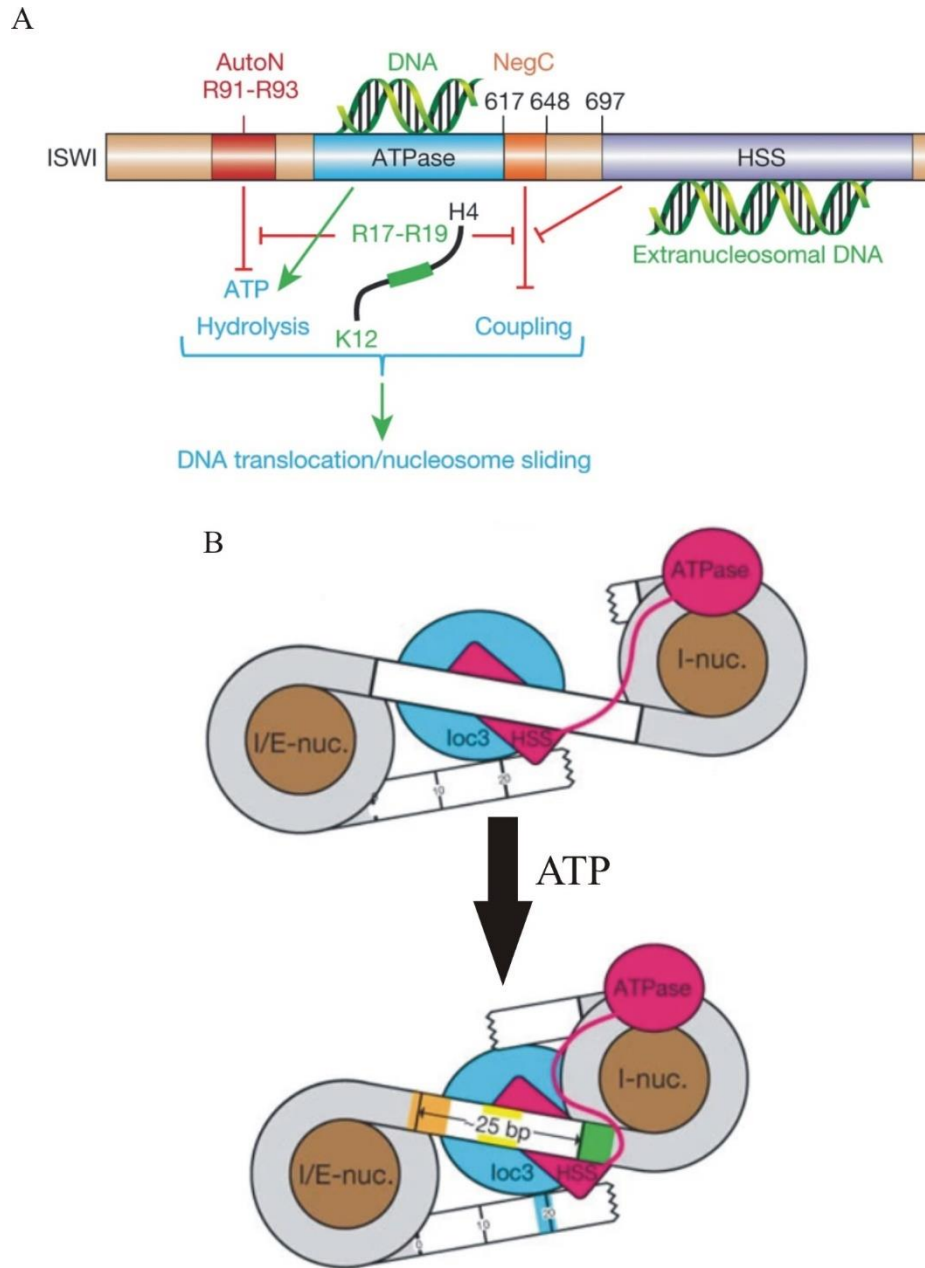


Figura 44: Regulación y acción de ISW1a. A) Esquema de la subunidad catalítica de complejos ISWI. Se muestra el dominio translocasa (ATPase), las regiones auto inhibitorias (AutoN y NegC) y el dominio HSS. Se indican las regiones de interacción con el ADN nucleosomal (ATPase) y con el ADN *linker* (HSS). AutoN tiene una región básica (R91-R93) que inhibe la translocación del ADN cuando el complejo no se encuentra unido al nucleosoma. Al

momento de unirse al nucleosoma la región básica (R17-R19) de la cola de la histona H4 libera la inhibición de AutoN. **B)** Modelo que representa como *loc3* junto con HSS interaccionan con el ADN *linker* para funcionar como “regla molecular” y dejar los nucleosomas espaciados entre ellos. Fuente: A) Modificado de Yamada y col., (2011) (Yamada y col., 2011) B) Modificado de Clapier y Cairns, (2012) (Clapier y Cairns, 2012).

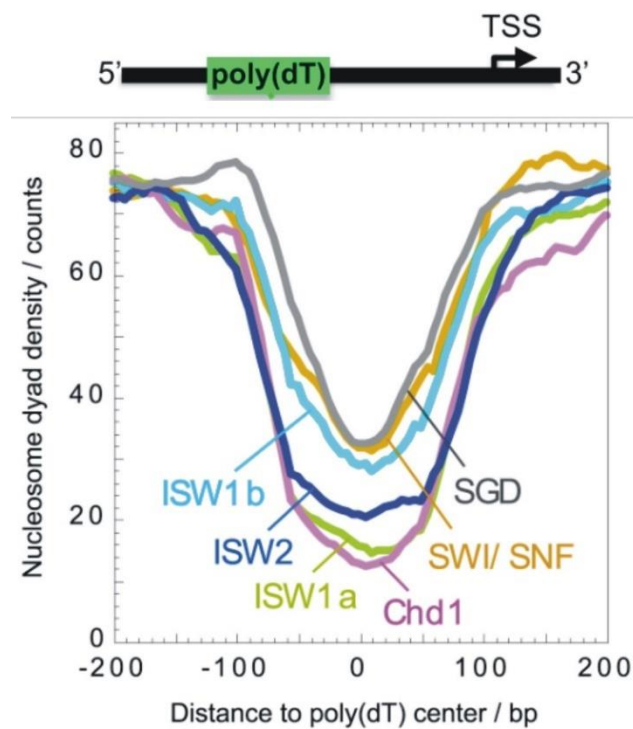


Figura 45: Análisis de genoma completo para observar el efecto de una secuencia poli T sobre diferentes complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP. Gráfico que muestra la ocupancia nucleosomal centrada en trectos poli T presentes en regiones libres de nucleosomas (NDRs). SGD (*Salt Gradient Dialysis*) corresponde a la reconstitución nucleosomal de genoma completo sin ningún complejo remodelador de cromatina presente. La acción individual de los diferentes complejos se observa por las diferentes líneas de colores. El ensanchamiento de la región libre de nucleosoma se observa al comparar las líneas de colores

con la línea gris. Los complejos que más ensanchan el NDR son ISW1a y Chd1. Fuente: A) Modificado de Krietenstein y col., (2016) (Krietenstein y col., 2016).

Otro aspecto importante analizado en este trabajo, fue el efecto de la orientación de los tractos poli (dA:dT) sobre la actividad de ISW1a. Como se mencionó anteriormente, en muchos promotores de *S. cerevisiae* los tractos poli (dA:dT) presentan una simetría, donde poli T se encuentran río arriba del centro del NDR y los tractos poli A se encuentran río abajo del centro del NDR, considerando la hebra sentido de los genes (Wu y Li, 2010). Aunque aún no se ha estudiado el efecto directo de esta distribución sobre los complejos remodeladores, hay estudios que hipotetizan que tienen un efecto en el posicionamiento de los nucleosomas mediados por complejos remodeladores de cromatina (de Boer y Hughes, 2014; Krietenstein y col., 2016). En nuestros resultados encontramos mediante varias aproximaciones que la orientación de los tractos poli (dA:dT) tiene un efecto diferencial sobre la actividad de ISW1a. De hecho, es el primer estudio donde se ha observado de manera directa este fenómeno, ya que estudios anteriores con RSC y Chd1 solo usaron una orientación de estas secuencias (Lorch y col., 2014; Winger y Bowman, 2017). En estos experimentos encontramos que la orientación de estas secuencias podría influir en la unión del complejo, donde la orientación poli T afectaría en mayor grado (Figura 32A). En base a esto, hipotetizamos que la orientación afecta a los módulos del complejo que interaccionan con el ADN *linker*,

HSS/loc3. De hecho, este fenómeno se apoya en los resultados de la Figura 21, donde se confirma que el efecto sobre ISW1a depende de la orientación respecto al nucleosoma. Al realizar estos experimentos sobre mononucleosomas laterales, el complejo está obligado a mover el octámero en solo una dirección, la del lado en donde se encuentra el *linker*, implicando que la disposición espacial del complejo no cambiará al enfrentarse a poli A o poli T, lo que este pequeño cambio en la orientación de la secuencia podría afectar al complejo. Hay que recordar que la dirección de translocación de los complejos es de 3' a 5' (Auger y col., 2008; Clapier, 2021; Clapier y col., 2017; Nguyen y col., 2013).

También observamos que el tamaño de estas secuencias importa para observar el efecto sobre el complejo, donde 5 pb de tamaño parecen ser insuficientes, pero mayor de 7 pb ya se comienza a observar el efecto de frenado (Figura 18 y Figura 20B). En estos análisis, los trectos de distintas extensiones fueron todos puestos adyacentes al *core nucleosomal*. Para secuencias cortas, como 7 pb, sería interesante analizar si hay un punto de mayor inhibición en el rango de 0 a 20 pb desde el *core*, ya que esta región es la caracterizada como la zona de interacción de ISW1a con ADN *linker* (Gangaraju y Bartholomew, 2007). *In vivo* se ha observado que, a medida que aumenta el tamaño de estas secuencias, hay un mayor grado de reducción de ocupancia de nucleosomas (Segal y Widom, 2009). Sin embargo, es difícil discriminar en este estudio si el efecto es mediado por la acción de complejos

remodeladores de cromatina dependientes de ATP o por las propiedades anti-nucleosomales de estas secuencias, aunque posiblemente sea una combinación de ambos efectos.

Los trectos poli (dA:dT) se encuentran usualmente en la regiones promotoras de genes (Cairns, 2009; Clapier, 2021; Lieleg y col., 2015; Tirosh y Barkai, 2008), por lo que, afectarán la actividad de ISW1a cuando éste se encuentre en las cercanías de esta región. Así mismo, se ha determinado que ISW1a también está presente en promotores de genes (Parnell y col., 2015; Yen y col., 2012). Se ha propuesto a este complejo como un “espaciador” que actúa principalmente en el cuerpo de los genes (Kubik y col., 2019; Ocampo y col., 2016); sin embargo, también se ha propuesto que puede actuar posicionando al nucleosoma +1 (Krietenstein y col., 2016; Kubik y col., 2019; Li y col., 2015; Oberbeckmann y col., 2021b; Parnell y col., 2015; Yen y col., 2012). En estos casos se propone que factores de transcripción unidos al NDR actuarían como barreras que ayudarían a posicionar el nucleosoma +1. De hecho, se ha observado que Reb1 y Abf1 ejercerían este efecto sobre los complejos “cubridores” (Krietenstein y col., 2016; Oberbeckmann y col., 2021a; Oberbeckmann y col., 2021b). Al parecer el mecanismo está asociado al dominio de “regla molecular” que tienen estos complejos, permitiéndoles determinar la distancia del factor y el nucleosoma remodelado (Oberbeckmann y col., 2021a). Por otro lado, los complejos que no funcionan de esta manera podrían retirar al factor durante su remodelación, como se ha observado para

ySWI/SNF (Li y col., 2015). En nuestros experimentos comparamos la acción de Gal4-DBD y los tractos poli (dA:dT) en su capacidad de frenar la acción de ISW1a (Figura 40) y confirmamos que un factor puede frenar la actividad de *sliding* de ISW1a, como se ha observado anteriormente (Li y col., 2015). Complementariamente, determinamos que el efecto de frenado mediado por los tractos poli (dA:dT) es menor al ejercido por Gal4-DBD y no son sumativos. Sin embargo, estos resultados indicarían que estas secuencias podrían funcionar como una barrera, por lo tanto, ayudarían a posicionar al nucleosoma +1. Esta hipótesis es apoyada por los resultados de la Figura 23, donde mostramos que al estar los tractos poli (dA:dT) a 19 pb de distancia aparece la formación de una población semi-central, indicando que el movimiento es frenado por los tractos en una posición intermedia. Además, en la distancia de 40 pb observamos que hay una mayor estimulación de la actividad de *sliding*. Cabe recordar que a esta distancia el tracto poli (dA:dT) nunca llegará a ser parte del ADN nucleosomal. El efecto de estas secuencias en aumentar la población de nucleosoma en la posición central al estar a mayor distancia del *core* podría estar dado por que los tractos poli (dA:dT), al funcionar como una barrera, ayudarían al complejo a dejar al nucleosoma más rápidamente en la posición central, al reducir la ocurrencia de eventos en que el complejo se excede en movilizar el octámero más allá de la ubicación central.

En conjunto, nuestros resultados muestran que estas secuencias tienen un efecto directo en la remodelación mediada por ISW1a. De hecho, al insertar

una secuencia posicionadora de nucleosomas en el mismo sitio donde insertamos los tractos poli (dA:dT), observamos que no hay diferencias en la remodelación de ISW1a (Figura 37), demostrando que el efecto de estas secuencias no pasan por su capacidad anti-nucleosomal. Por lo tanto, planteamos un modelo con tres situaciones de cómo estas secuencias influirían en la remodelación catalizada por ISW1a *in vivo* (Figura 46). **1)** En promotores que no poseen tractos poli (dA:dT) el complejo ISW1a llegaría a remodelar los nucleosomas +1/-1 pudiendo unirse a ambos extremos del nucleosoma. En este caso los nucleosomas adyacentes funcionan como impedimento en la remodelación, como se ha observado que funcionan los nucleosomas para los complejos “espaciadores” (Clapier, 2021; Clapier y Cairns, 2012; Oberbeckmann y col., 2021b; Yamada y col., 2011). Esto resultaría en que ISW1a mueva preferentemente los nucleosomas +1/-1 hacia el NDR, debido a la gran cantidad de ADN *linker* disponible. Esto provocaría un estrechamiento de los NDRs, lo cual se ha observado que ocurre *in vivo* por la acción de este complejo (Parnell y col., 2015). Esta idea se apoya por los análisis de genoma completo que realizamos, donde los promotores cuyos nucleosomas -1 y +1 se mueven en dirección al NDR tienen menor frecuencia de tractos poli (dA:dT) en esta región (Figura 43). **2)** En promotores con tractos poli (dA:dT) en el NDR, si estas secuencias están lo suficientemente cercas del nucleosoma +1/-1, ISW1a preferirá unirse al extremo del nucleosoma donde no se encuentra el tracto, lo que generará que se ensanche el NDR. Hipotetizamos que una vez llegado el

complejo, la reacomodación para comenzar a remodelar se ve favorecida en la dirección contraria a los tractos poli (dA:dT), ya que estas secuencias afectarían la unión eficiente de HSS/loc3 al ADN *linker*. Esta hipótesis se apoya por los experimentos que muestran inhibición de la actividad de *sliding* de ISW1a por la presencia de tractos poli(dA:dT) en el *linker* sobre el que el complejo debe unirse, mostrando, además, una disminución de la unión de ISW1a a la sonda poli T (Figura 32A), y por los experimentos con las sondas semi-centrales que muestran que la remodelación de *sliding* se ve estimulada cuando los tractos poli (dA:dT) se encuentran en la dirección contraria al movimiento del nucleosoma (Figura 25). Además, se apoya por estudios de genoma completo que muestran un ensanchamiento del NDR mediado por este complejo cuando hay poli T presente en esta región (Figura 45) (Krietenstein y col., 2016) y por nuestro análisis de genoma completo que muestra que ISW1a aleja los nucleosomas del NDR cuando hay mayor frecuencia de tractos poli (dA:dT) (Figura 43). Esta situación lleva principalmente a la mantención o leve aumento del tamaño del NDR y al posicionamiento del nucleosoma +1/-1. **3)** En promotores con tractos poli (dA:dT) en el NDR, si estas secuencias están a una distancia que no puede ser reconocida por ISW1a al comenzar a remodelar el nucleosoma +1/-1, el complejo se podrá unir a ambos extremos del nucleosoma por igual. En esta situación existirá una barrera a un extremo del nucleosoma remodelado, el cual podría estar dado por un factor de transcripción (por ejemplo Reb1 (Krietenstein y col., 2016; Oberbeckmann y col., 2021b)) o los

tractos poli (dA:dT). En ambos casos la “regla molecular” compuesta por HSS/loc3 se soltará del ADN *linker* al toparse con la barrera, permitiendo que NegC inhiba la actividad del complejo (Figura 44A). Para el caso de los factores de transcripción, este modelo se apoya en los resultados obtenidos por nosotros usando Gal4-DBD (Figura 40) y por los resultados obtenidos por otros investigadores usando Gal4-DBD (Li y col., 2015), Abf1 (Krietenstein y col., 2016) y Reb1 (Krietenstein y col., 2016; Oberbeckmann y col., 2021b). Para el caso de los tractos poli (dA:dT), este modelo se apoya por los experimentos que muestran que la unión de ISW1a disminuye en presencia de poli T (Figura 32A) y por los experimentos que muestran que, al estar estas secuencias a 40 pb de distancia del nucleosoma, este se estabiliza más rápidamente en su posición final (Figura 23). Esta situación lleva a la mantención del tamaño del NDR y al posicionamiento del nucleosoma +1/-1.

En los modelos anteriormente propuestos, nos apoyamos en que la unión de ISW1a al nucleosoma disminuye al estar presente un tracto poli (dA:dT). Sin embargo, no podemos descartar que el efecto de los tractos poli (dA:dT) no pase por la unión de ISW1a.

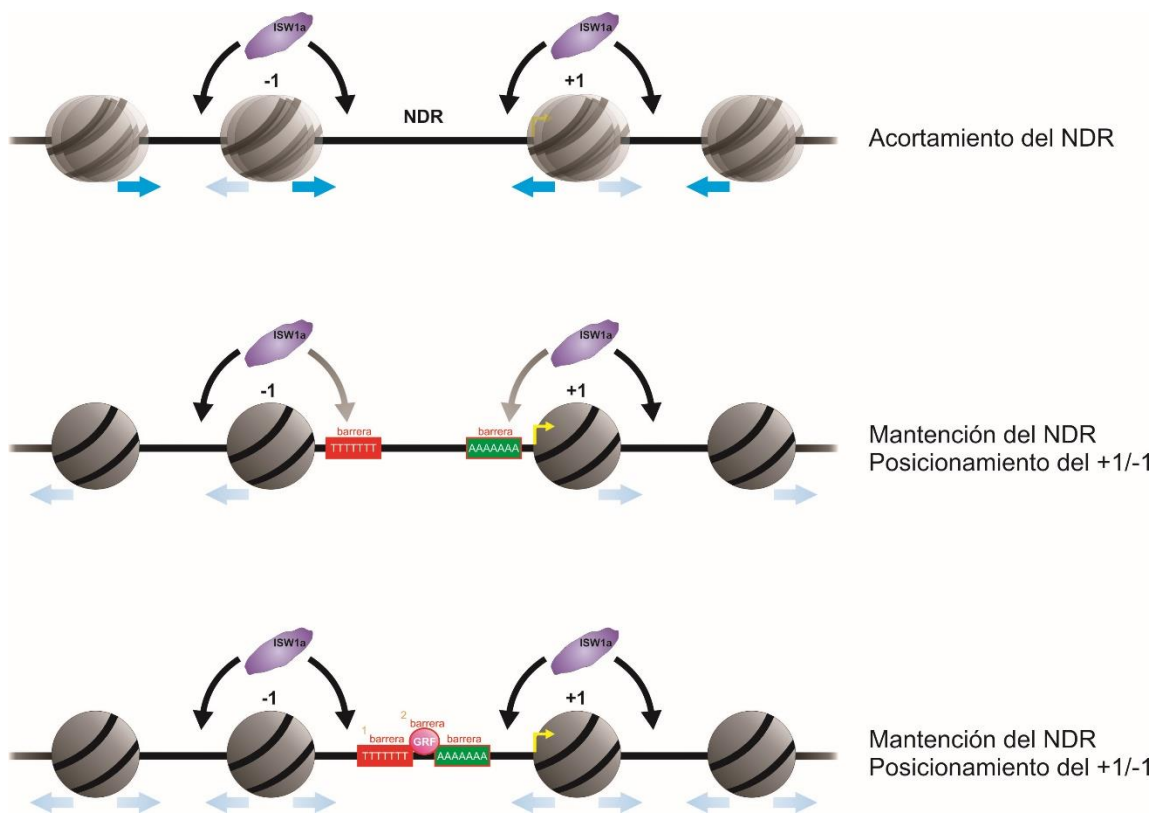


Figura 46: Modelo propuesto para la acción de ISW1a *in vivo*. Con la recopilación de los resultados obtenidos por nosotros y otros autores, proponemos las siguientes situaciones: **1)** En NDRs sin trectos poli (dA:dT), ISW1a actuaría cerrando el NDR. **2)** NDRs con trectos poli (dA:dT) cercanos a los nucleosomas +1/-1, ISW1a usaría estas secuencias como barreras para ensanchar levemente el tamaño del NDR y posicionando a los nucleosomas +1/-1. **3)** NDRs con trectos poli (dA:dT) lejanos a los nucleosomas +1/-1, ISW1a no reconocería estas secuencias en una primera instancia. Al acercarse al nucleosoma al tracto adyacente, estas secuencias actuarían como barrera, manteniendo el tamaño del NDR y posicionando a los nucleosomas +1/-1. Un GRF podría actuar de la misma manera que los trectos poli (dA:dT). El octámero de histonas se representa como un círculo gris, las líneas negras representan el ADN, el complejo ISW1a se representa en morado, el GRF se representa en color rosado, las flechas negras indican la unión del complejo, las flechas azules indican la dirección y fuerza del movimiento del

nucleosoma, la flecha amarilla representa el sitio de inicio de la transcripción, los tractos poli (dA:dT) se representan con recuadros rojos (poli T) y verdes (poli A).

5.2 RSC

Otro complejo remodelador de cromatina dependiente de ATP abordado fue RSC, este indiscutiblemente ha sido categorizado como un complejo “despejador” (Kubik y col., 2019), por lo que intenta abrir los NDRs (Badis y col., 2008; Challal y col., 2018; Ganguli y col., 2014; Hartley y Madhani, 2009; Klein-Brill y col., 2019; Krietenstein y col., 2016; Kubik y col., 2019; Kubik y col., 2018; Parnell y col., 2008; Rawal y col., 2018; van Bakel y col., 2013; Wippo y col., 2011). De hecho, este complejo ya ha sido asociado con los tractos poli (dA:dT) *in vivo* (Barnes y Korber, 2021; Brahma y Henikoff, 2019) e *in vitro* (Krietenstein y col., 2016; Lorch y col., 2014). Al realizar los primeros experimentos usando las sondas Nuc-70, observamos que los tractos poli (dA:dT) estimulan la actividad de *sliding* de RSC (Figura 16), un efecto que también pudimos observar en las sondas 35-Nuc-35 (Figuras 26, 29, 30 y 31). En estos estudios también pudimos observar que una orientación del tracto entrega mayor estimulación de la actividad de *sliding* de este complejo (Figuras 16, 21, 26, 30 y 31). Posteriormente, determinamos que el complejo RSC aleja los nucleosomas de los tractos poli (dA:dT) (Figuras 27 y 28). Estos resultados son consistentes con los resultados *in vivo*, que muestran que RSC es un complejo

que abre las regiones libres de nucleosomas (Badis y col., 2008; Challal y col., 2018; Ganguli y col., 2014; Hartley y Madhani, 2009; Klein-Brill y col., 2019; Krietenstein y col., 2016; Kubik y col., 2019; Kubik y col., 2018; Parnell y col., 2008; Rawal y col., 2018; van Bakel y col., 2013; Wippo y col., 2011). Para comprender el mecanismo detrás de nuestros resultados es necesario observar la estructura del complejo RSC unido al nucleosoma, la que fue determinada recientemente (Wagner y col., 2020; Ye y col., 2019). Estos estudios determinaron que el dominio de unión al ADN *linker* de RSC, al que se denominó DIM (*DNA-interaction module*), se une al ADN *linker* que pasará a ser el ADN saliente del nucleosoma en el proceso de remodelación (Figura 47). Este módulo está conformado principalmente por las subunidades Rsc3/30, las cuales poseen dominios de unión al ADN denominadas ZnD (Figura 47A). Por lo tanto, se determinó que para que RSC abra los NDRs, es necesario que el dominio DIM se una al ADN *linker* que pasará a conformar el NDR (Wagner y col., 2020; Ye y col., 2019) (Figura 48), lugar donde usualmente se encuentran presentes los tractos poli (dA:dT) (Cairns, 2009; Clapier, 2021; Lieleg y col., 2015; Tirosh y Barkai, 2008). Esto resulta en que los nucleosomas +1/-1 se alejen de los tractos poli (dA:dT). Los estudios existentes hasta ahora, sin embargo, no habían confirmado una unión preferencial del DIM de RSC al ADN *linker* que pasará a conformar el NDR gracias a la presencia de los tractos poli(dA:dT). Nuestros resultados confirman este fenómeno observado *in vivo*, al mostrar que la dirección de remodelación del complejo RSC es siempre en

dirección contraria a los tractos poli (dA:dT) (Figuras 27 y 28). Este fenómeno también es apoyado por nuestros ensayos de unión de RSC que muestran que la unión de este al nucleosoma aumenta al estar presentes los tractos poli (dA:dT) (Figuras 32B y C). En resumen nuestros resultados de estimulación de la actividad de *sliding* (Figuras 16 y 29), estimulación de la unión (Figuras 32B y C) y dirección de la remodelación (Figuras 27 y 28), muestran que la unión del dominio DIM de RSC al *linker* que pasará a ser ADN de salida se ve estimulada por la presencia de los tractos poli (dA:dT), indicando que *in vivo* el complejo prefiere unirse al ADN presente en el NDR gracias a la presencia de los tractos poli (dA:dT) y en consecuencia se alejen los nucleosoma +1/-1 de esta región.

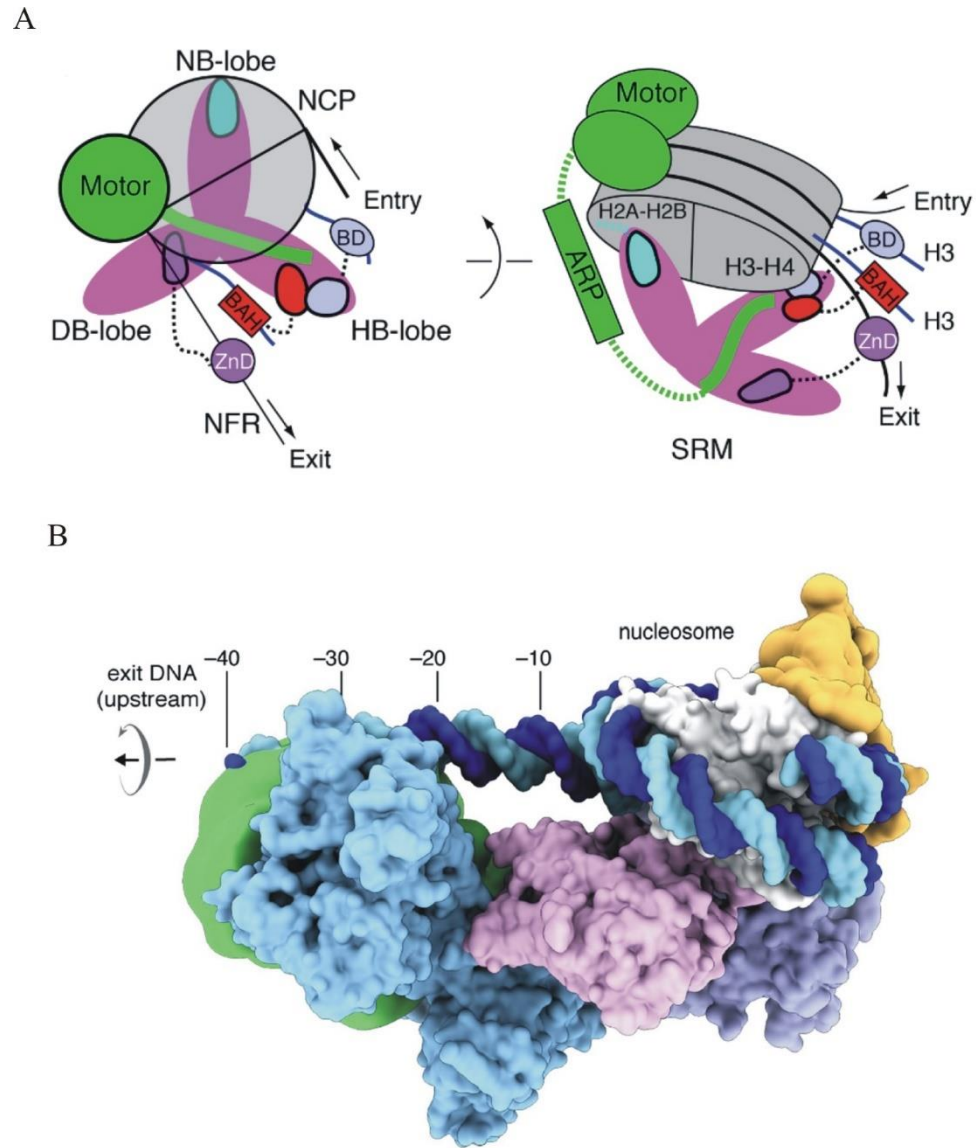


Figura 47: Estructura de RSC unido al nucleosoma. A) Representación esquemática de los mayores elementos estructurales de RSC unido al nucleosoma. El módulo de unión al ADN *linker* de RSC se muestra en morado con las siglas ZnD (*DNA-binding Zn-cluster domain*), el cual es parte de las subunidades Rsc3/30. Este módulo se une al ADN *linker* saliente del nucleosoma y al ocurrir la translocación del ADN por los lóbulos del motor, se traduce en el movimiento del nucleosoma hacia fuera del NDR. **B)** Densidades estructurales de RSC unido al nucleosoma. El módulo de unión al ADN *linker* (DIM) se representa en verde y el dominio

ATPasa se representa en naranja. Se muestra que el DIM se puede unir hasta aproximadamente 40 pb de distancia del nucleosoma por el ADN *linker* que pasa a conformar el ADN saliente una vez iniciada la remodelación. Fuente: A) Modificado de Ye y col., (2019) (Ye y col., 2019). B) Modificado de Wagner y col., (2020) (Wagner y col., 2020).

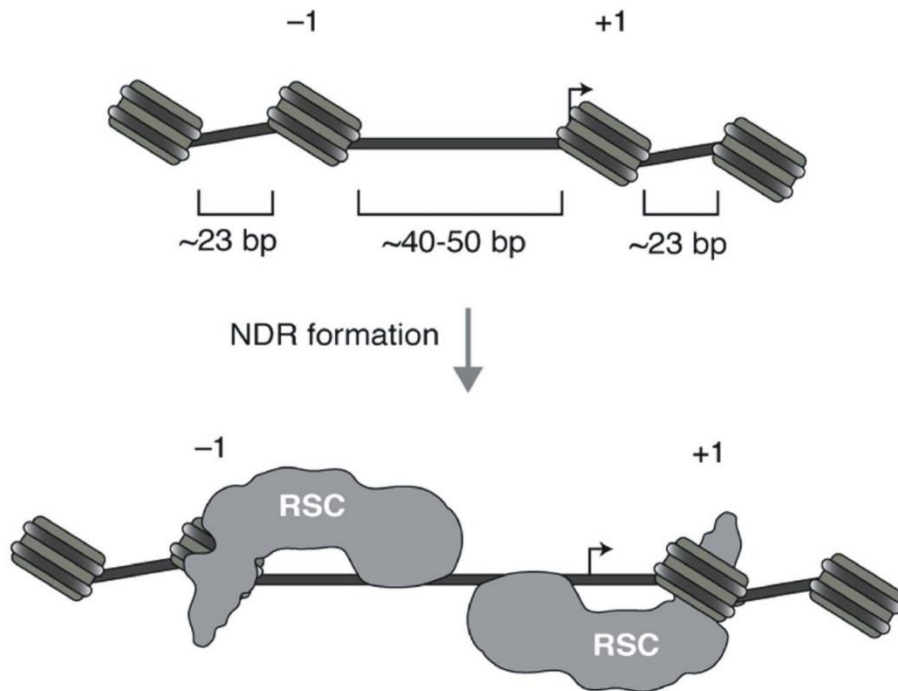


Figura 48: Modelo hasta ahora concebido para el posicionamiento de RSC en el NDR para alejar los nucleosomas +1 y -1. Representación esquemática de RSC unido al nucleosoma +1 y -1. El dominio de unión al ADN *linker* (DIM) se une al NDR, mientras que el motor y otras subunidades del complejo se unen al *core nucleosomal*. RSC es capaz de abrir esta región al unirse preferentemente al ADN *linker* presente en el NDR. Hasta ahora, no se había caracterizado elementos que favorezcan una unión preferencial del DIM de RSC al *linker* que pasa a conformar el NDR. Fuente: Modificado de Wagner y col., (2020) (Wagner y col., 2020).

Una información adicional que entregaron los datos de la estructura de RSC unido al nucleosoma, fue que el módulo de unión a ADN *linker* es capaz de unirse hasta aproximadamente 40 pb de distancia del *core nucleosomal* (Figura 47B). Esta característica permitiría explicar cómo el complejo puede agrandar en gran medida los NDRs *in vivo* (Wagner y col., 2020) (Figura 48), lo que se confirmaría con resultados que muestran que RSC es el complejo con mayor efectividad en abrir los NDRs (Krietenstein y col., 2016). En favor a este modelo, nuestros resultados muestran que la acción de RSC está influenciada por la presencia de los tractos poli (dA:dT), donde observamos una estimulación de su actividad de *sliding* incluso en sustratos nucleosomales que tenían los tractos poli (dA:dT) a 40 pb de distancia del *core nucleosomal* (Figura 24). Apoyando la idea de que la estimulación de la unión de RSC (Figuras 32B y C), y por tanto su actividad (Figura 24), pasa por que el dominio DIM puede reconocer estas secuencias incluso a 40 pb de distancia del nucleosoma. De hecho, al colocar los tractos poli (dA:dT) dentro del ADN nucleosomal, observamos una menor estimulación de RSC por parte de estas secuencias, en comparación a su presencia en ADN *linker* (Figuras 35D y E). La disminución en la estimulación se debería a que el dominio DIM no podría reconocer los tractos poli (dA:dT), por lo que no habría un aumento en la unión del complejo, y solo una vez remodelado el nucleosoma se podrían exponer estas secuencias al reconocimiento del dominio DIM.

En los párrafos anteriores proponemos continuamente que los tractos poli (dA:dT) ejercen su efecto al ser reconocidos por el dominio DIM de RSC, y por lo tanto tienen que encontrarse en el ADN *linker* para ser funcionales. Sin embargo, estas secuencias también tendrían un efecto al estar dentro del ADN nucleosomal. Esto lo observamos en nuestros experimentos realizados con los mononucleosomas centrales que presentan tractos poli (dA:dT) por ambos extremos del nucleosoma (Figuras 29, 30 y 31). En estos experimentos forzamos a que RSC tenga que mover el octámero de histonas en dirección a los tractos poli (dA:dT). Así nos percatamos que en un punto la remodelación efectuada por RSC se bloquea, esto al no observar la aparición de la población “Rem” en estas sondas (ver carril 9 Figura 29B; ver carril 7, 8 y 9 Figura 30A; ver carril 14, 15 y 16 Figura 30C). Para confirmar esta observación, realizamos este mismo experimento usando sondas con ADN *linker* más largo y observamos que el complejo no fue capaz de llevar el nucleosoma a una posición lateral (ver carril 4 Figura 31E). Curiosamente, en este mismo experimentos notamos que el bloqueo que realizan los tractos poli (dA:dT) dependen de la orientación de estas secuencias, ya que la orientación contraria sí es capaz de llevar al nucleosoma a una posición lateral (ver carril 6 Figura 31E). Al parecer cierta orientación de los tractos poli (dA:dT) es capaz de dificultar la translocación del ADN llevada a cabo en SHL2. Considerando que la translocación ocurre de manera unidireccional y en dirección 3'-5' (Auger y col., 2008; Clapier, 2021; Clapier y col., 2017; Nguyen y col., 2013), significa que al

complejo le estaría dificultado translocar por la hebra poli A (Figura 31), lo que explicaría el estancamiento en las sondas 70(A15)-Nuc-(T15)70 y 35(A15)-Nuc-(T15)35. De todas formas, cabe consignar que esta dificultad que tendría el motor de RSC para hacer translocación por poli A, lo que ocurre en una región interna del nucleosoma (SHL2), no implica un dificultamiento de la acción que lleva a cabo el complejo, que es de alejar el *core nucleosomal* del tracto poli(dA:dT), estando el tracto en cualquiera de sus dos orientaciones.

Un aspecto importante abordado en este trabajo fue cómo la orientación de los tractos poli (dA:dT) pueden influenciar al complejo RSC. Este aspecto no ha sido abordado directamente (Lorch y col., 2014) y solo se han mostrado indicios de que el fenómeno existe (Krietenstein y col., 2016). De hecho, hasta el momento el mecanismo propuesto es de que los tractos poli (dA:dT) favorecerían la translocación del complejo RSC cuando este transloca por poli T (Barnes y Korber, 2021; Krietenstein y col., 2016). Sin embargo, en nuestros resultados observamos que los tractos poli (dA:dT) pueden surtir un mayor efecto estimulador al estar presentes en el ADN *linker* que al estar en el ADN nucleosomal. En el caso del ADN nucleosomal, bajo ciertas condiciones (tract por ambos lados del *core*) el efecto incluso puede llegar a ser de bloquear la translocación del ADN llevado a cabo por RSC. Este efecto estaría mediado por la orientación de estas secuencias, ya que el efecto se da cuando el complejo tiene que translocar por poli A (Figura 31). En cambio, estando en ADN *linker* observamos que estas secuencias pueden aumentar la unión de RSC (Figuras

32B y C) y pueden estimular la actividad de *sliding* del complejo (Figura 16). En este contexto también observamos que la orientación de los tractos poli (dA:dT) es relevante, ya que la máxima estimulación de *sliding* se da con ciertas orientaciones respecto al nucleosoma (Figura 21). Interesantemente, al realizar los experimentos usando una concentración mayor de RSC, observamos que existe actividad de *eviction* del complejo (Figura 34), resultado que no habíamos observado a concentraciones más bajas del complejo (Figuras 16B y D). Lo destacable de este resultado, es que existe una estimulación de la actividad de *eviction* solo con la orientación de *core nucleosomal* estando por el 5' de poli A (Figura 34). Esto significa que existe una orientación de estas secuencias que favorecería la estimulación de la actividad de *sliding* (*core* por el 3' de poli A) y otra que favorecería su actividad de *eviction*. Anteriormente ya se había publicado que los tractos poli (dA:dT) pueden estimular la actividad de *eviction* del complejo RSC (Lorch y col., 2014), aunque en ese estudio se analizó solo una orientación de tracto, no se analizó presencia de tracto en ADN *linker* y se incluyó en los ensayos a la chaperona de histonas Nap1 para gatillar la actividad de *eviction* del complejo (Lorch y col., 2014). Se ha descrito que esta chaperona de histonas es capaz de realizar este efecto sobre RSC (Lorch y col., 2006). Para entender el mecanismo de cómo el cambio en la orientación de los tractos poli (dA:dT) puede cambiar el tipo de resultado de remodelación estimulada en RSC, hay que entender qué aspectos influyen que exista *eviction* o *sliding*. Un mecanismo propuesto es que la fuerza con la que los

complejos se unen al nucleosoma define el tipo de resultado de remodelación. Complejos de la familia SWI/SNF son capaces de unirse fuertemente al nucleosoma, lo que gatillaría la actividad de *eviction* (Clapier y col., 2017). En este aspecto, se ha observado que un factor de transcripción que recluta a ySWI/SNF fuertemente al nucleosoma, gatilla la actividad de *eviction* del complejo (Gutierrez y col., 2007), indicando que esta respuesta se debe a la fuerte unión que existe al nucleosoma. Nosotros hipotetizamos que existe una diferencia en la unión de RSC al unirse a poli A o poli T. En la Figuras 32B y C se observa una mayor unión a la sonda poli A, lo que explicaría el favorecimiento de la actividad de *eviction* gatillada por esta sonda. Además, se ha observado que el complejo RSC puede realizar *eviction* sobre los nucleosomas +1/-1 de los genes altamente transcritos (Rawal y col., 2018) y puede actuar en conjunto con el factor de transcripción Gcn4 para gatillar *eviction* de los nucleosomas asociados a este factor (Rawal y col., 2022). Sin embargo, habría que observar la orientación de los tractos poli (dA:dT) en estos genes altamente transcritos, para corroborar que se encuentran en la orientación para la cual nosotros observamos que se gatilla *eviction* de RSC. Por otro lado, las publicaciones que hablan sobre los “nucleosomas frágiles” muestran que es el complejo RSC el que podría eyectar estos nucleosomas de los NDRs (Brahma y Henikoff, 2019; Kubik y col., 2015). Sin embargo, estudios posteriores deberán ser realizados para validar esta hipótesis.

Por último, abordamos el efecto conjunto que podrían tener un factor de transcripción y los tractos poli (dA:dT). En este caso, usamos el factor de transcripción quimérico Gal4-VP16, el cual se ha observado que gatilla la actividad de *eviction* de γ SWI/SNF (Gutierrez y col., 2007). Para el caso de RSC no existen antecedentes del efecto de este factor sobre el complejo. Bajo esta premisa pudimos observar que este factor estimula actividad de *sliding* de RSC (Figura 41), lo que se podría deber al aumento en la unión o la estabilidad de este a la sonda. Por otro lado, no observamos un claro efecto conjunto con los tractos poli (dA:dT) (Figura 41). En este aspecto nos faltó realizar este experimento usando concentraciones mayores de RSC, para observar si existe un efecto conjunto en la actividad de *eviction* del complejo. Además, es necesario probar otros factores de transcripción como Reb1, Abf1, Rap1 y Cbf1, a los cuales se les ha asociado con RSC y su capacidad de abrir NDRs (Badis y col., 2008; Challal y col., 2018; Ganguli y col., 2014; Hartley y Madhani, 2009; Klein-Brill y col., 2019; Krietenstein y col., 2016; Kubik y col., 2019; Kubik y col., 2018; Parnell y col., 2008; Rawal y col., 2018; van Bakel y col., 2013). Sin embargo, nuestros resultados muestran que un factor podría estimular la actividad de *sliding* de RSC.

Según los resultados obtenidos planteamos un modelo que aborda cuatro escenarios (Figura 49): **1)** En promotores sin tractos poli (dA:dT) el complejo RSC podría unirse a ambos extremos de los nucleosomas +1/-1 por lo que el NDR no se encontraría bien definido. Tendría que existir algún GRF que

se asocie con el complejo RSC para que lleve a cabo su acción de abrir NDRs (Badis y col., 2008; Challal y col., 2018; Ganguli y col., 2014; Hartley y Madhani, 2009; Klein-Brill y col., 2019; Krietenstein y col., 2016; Kubik y col., 2019; Kubik y col., 2018; Parnell y col., 2008; Rawal y col., 2018; van Bakel y col., 2013) **2)** En promotores que presentan trectos poli (dA:dT) en la orientación más común encontrada *in vivo* (Barnes y Korber, 2021; de Boer y Hughes, 2014; Krietenstein y col., 2016; Wu y Li, 2010), el complejo RSC se unirá preferentemente a los trectos poli (dA:dT) lo que generará que se abran los NDRs, mediante una acción esencialmente de *sliding* sobre los nucleosomas -1 y +1. Este modelo se apoya por todos los estudios que muestran que RSC abre los NDRs (Badis y col., 2008; Challal y col., 2018; Ganguli y col., 2014; Hartley y Madhani, 2009; Klein-Brill y col., 2019; Krietenstein y col., 2016; Kubik y col., 2019; Kubik y col., 2018; Parnell y col., 2008; Rawal y col., 2018; van Bakel y col., 2013; Wippo y col., 2011), los modelos de la estructura de RSC unido al nucleosoma (Wagner y col., 2020; Ye y col., 2019), en nuestros resultados que muestran que la unión del complejo es más fuerte en presencia de estas secuencias (Figuras 32B y C), en el aumento de la actividad de *sliding* de RSC dado por una orientación de tract (Figuras 16, 26, 29 y 30) incluso cuando estas secuencias se encuentran a 40 pb de distancia del nucleosoma (Figura 24) y en nuestro experimentos que muestran que RSC aleja el nucleosoma de los trectos poli (dA:dT) (Figuras 27 y 28). **3)** Pueden existir NDRs con otras orientaciones de trectos poli (dA:dT) (de Boer y Hughes, 2014; Krietenstein y

col., 2016; Wu y Li, 2010). En estos casos el complejo RSC se unirá preferentemente a los trectos poli (dA:dT), pero gatillará la eyección de los nucleosomas +1/-1, permitiendo que los NDRs se abran en gran medida. Este modelo se apoya en el estudio que mostraron que estas secuencias gatillan la actividad de *eviction* de RSC (Lorch y col., 2014), en estudios que han mostrado que RSC puede realizar *eviction* del nucleosoma +1/-1 en un contexto asociado a la actividad transcripcional (Rawal y col., 2018; Rawal y col., 2022), en nuestros resultados que muestran que la unión de RSC se ve favorecida por estas secuencias (Figuras 32B y C) y los resultados que muestran que la orientación de *core* por el lado 5' de poli A es capaz de estimular la actividad de *eviction* del complejo (Figura 34). **4)** En caso de que un “nucleosoma frágil” se posicione en el NDR, el complejo RSC será capaz de unirse a este nucleosoma ayudado por la presencia del tracto poli (dA:dT) adyacente, permitiendo la eyección de este nucleosoma. Esto permitirá la mantención del NDR. Estos resultados se ven apoyados por estudios de genoma completo que muestran que RSC es capaz de unirse a estos “nucleosomas frágiles” eyectándolos (Brahma y Henikoff, 2019; Kubik y col., 2015), por nuestros experimentos que demuestran que la unión de RSC se ve favorecida por estas secuencias (Figuras 32B y C) y los resultados que muestran que la orientación poli A es capaz de gatillar *eviction* del complejo (Figura 34).

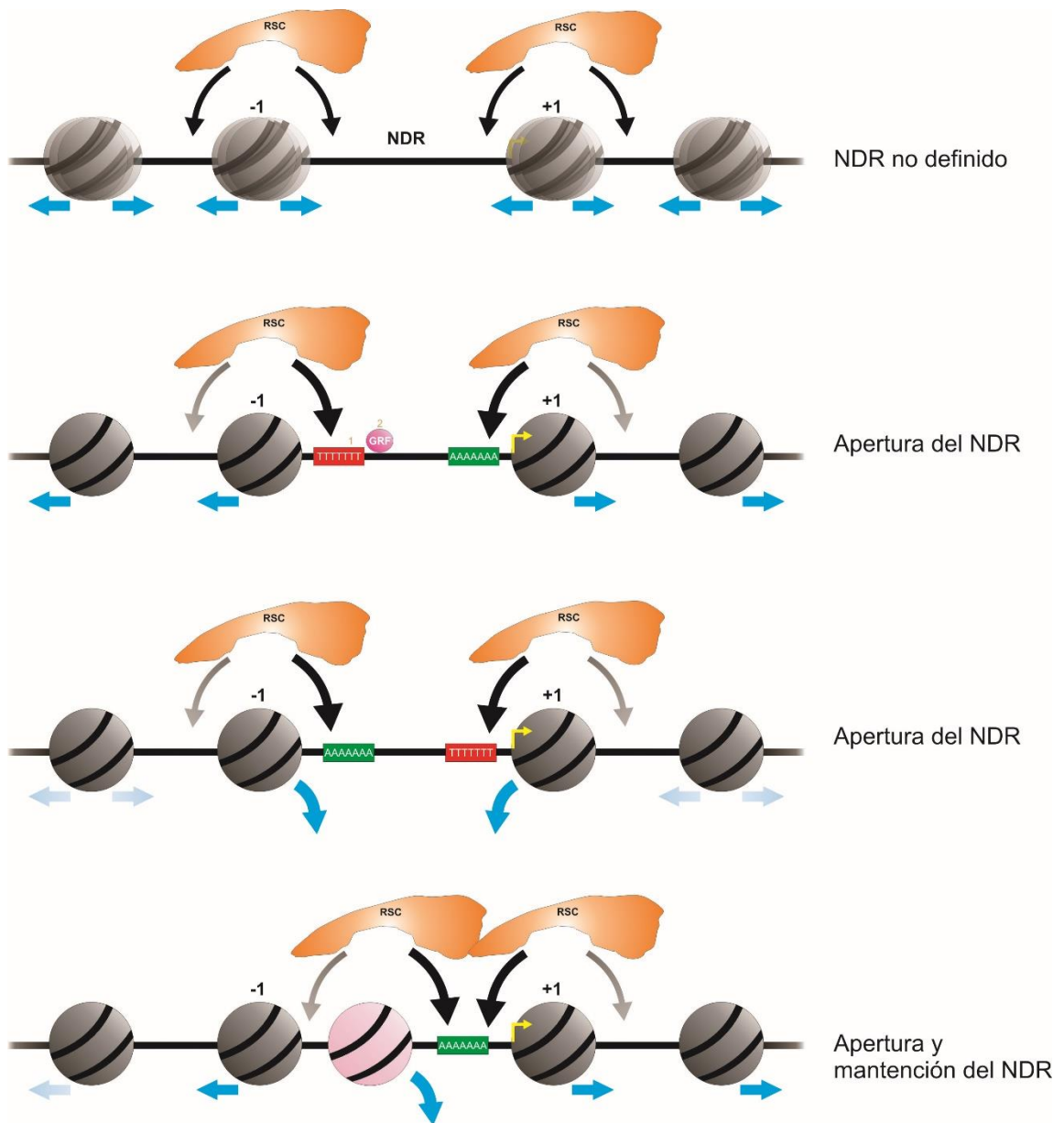


Figura 49: Modelo propuesto para la acción de RSC *in vivo*. Con la recopilación de los resultados obtenidos por nosotros y otros autores, proponemos las siguientes situaciones: **1)** En NDRs sin trectos poli (dA:dT), RSC se podría unir a ambos extremos de los nucleosomas +1/-1, pudiéndose obtener un NDR no definido. **2)** NDRs con trectos poli (dA:dT) en orientación más común encontrado en NDRs. El módulo DIM de RSC se uniría preferentemente a los trectos poli (dA:dT) provocando que se abra el NDR. En esta opción los factores regulatorios generales

podrían actuar de una manera similar a estas secuencias. **3)** NDRs con tractos poli (dA:dT) en orientación menos común, RSC se uniría preferentemente a los tractos poli (dA:dT), pero en esta ocasión se gatillaría la respuesta de *eviction* del complejo. La eyección de los nucleosomas +1/-1 provocaría que los NDR se agrandaran en gran medida. **4)** Si un “nucleosoma frágil” se posiciona en el NDR, RSC podría eyectarlo del NDR. En la orientación más común encontrada en NDRs, el complejo será capaz de unirse al tracto adyacente y sacar este nucleosoma por *eviction*. El octámero de histonas se representa como un círculo gris (con excepción del nucleosoma frágil que se representa en rosado pastel), las líneas negras representan el ADN, el complejo RSC se representa en naranja, el GRF se representa en color rosado, las flechas negras indican la unión del complejo, las flechas azules indican la dirección y fuerza del movimiento del nucleosoma, la flecha amarilla representa el sitio de inicio de la transcripción, los tractos poli (dA:dT) se representan con recuadros rojos (poli T) y verdes (poli A).

5.3 ySWI/SNF

El último complejo remodelador de cromatina abordado en este trabajo fue ySWI/SNF, el cual al igual que RSC es considerado un complejo “despejador” (Kubik y col., 2019). A diferencia de RSC, el cual ha sido implicado mayoritariamente en formar y mantener los NDRs, a ySWI/SNF se le asocia más con participar durante el proceso de transcripción (Kubik y col., 2019; Qiu y col., 2016; Rawal y col., 2018; Rawal y col., 2022; Shivaswamy y Iyer, 2008). Sin embargo, también se le ha asociado con la formación de NDRs, especialmente los que son más amplios (Kubik y col., 2019; Rawal y col., 2018; Rawal y col., 2022).

Debido a la baja actividad obtenida del complejo purificado, nos fue imposible realizar todo el set de experimentos planeados para determinar con más detalle los mecanismos tras los efectos de los tractos poli (dA:dT) sobre la actividad de este. Sin embargo, usando los nucleosomas laterales (Figura 17) y los nucleosomas centrales (Figura 36), pudimos obtener resultados que muestran que los tractos poli (dA:dT) estimulan la actividad de γ SWI/SNF. Cabe destacar que, a diferencia de los resultados obtenidos para ISW1a y RSC, la orientación de los tractos poli (dA:dT) no influyen en la actividad de γ SWI/SNF (Figura 17), al menos no en el set de ensayos realizados para este complejo.

Por otro lado, quisimos observar si los tractos poli (dA:dT) podrían influir en la actividad de *eviction* de γ SWI/SNF gatillada por un factor de transcripción. Para ello usamos el factor de transcripción quimérico Gal4-VP16, el cual se ha demostrado que gatilla la actividad de *eviction* del complejo (Gutierrez y col., 2007). Sin embargo, al realizar los experimentos observamos que no hay diferencias al estar presentes estas secuencias (Figura 42). En este aspecto, otros estudios han propuesto que estas secuencias tienen poca influencia sobre este complejo (Figura 45) (Krietenstein y col., 2016). Además, hay que considerar que γ SWI/SNF usualmente actúa sobre promotores de genes transcripcionalmente activos (Rawal y col., 2018; Rawal y col., 2022) y que presentan caja TATA (Kubik y col., 2019; Rawal y col., 2022), mientras que los tractos poli (dA:dT) usualmente se encuentran en NDRs sin caja TATA (Cairns, 2009; Clapier, 2021; Lieleg y col., 2015; Tirosh y Barkai, 2008). Bajo este

contexto, el complejo ySWI/SNF se vería más influenciado por los factores de transcripción que se unen al promotor, como por ejemplo el factor Gcn4 (Rawal y col., 2018; Rawal y col., 2022).

En conjunto, nuestros resultados con ySWI/SNF muestran que los trectos poli (dA:dT) podrían influir en la actividad del complejo. Sin embargo, aún nos falta realizar más experimentos para confirmar este fenómeno y determinar el mecanismo por el cual se llevarían a cabo los efectos encontrados.

6. CONCLUSIONES

- Los trectos poli (dA:dT) frenan la actividad de *sliding* de ISW1a cuando el movimiento del *core nucleosomal* es en dirección a estas secuencias, mientras que estimulan la actividad de *sliding* de ISW1a en la dirección opuesta. Además, la orientación de estas secuencias influye en el grado de efecto observado sobre este complejo.
- Los trectos poli (dA:dT) podrían disminuir la unión de ISW1a al nucleosoma, como también afectar la actividad de translocación del complejo.
- Tanto el tamaño como la distancia de los trectos poli (dA:dT) respecto al nucleosoma, son relevantes para observar el efecto sobre la actividad de *sliding* de ISW1a
- El factor Gal4-DBD realiza un mayor bloqueo de la actividad de *sliding* de ISW1a en comparación a los trectos poli (dA:dT) y no se encontró un efecto sinérgico entre ambos elementos.
- Las dos orientaciones posibles de los trectos poli (dA:dT) influyen de manera diferencial sobre la actividad de RSC, estimulando una orientación con mayor

potencia el *sliding* (*core* al 3' de poli A) y la otra con mayor potencia el *eviction* (*core* al 5' de poli A).

- Los trectos poli (dA:dT) estimulan la unión de RSC al nucleosoma, teniendo también las orientaciones un efecto diferencial sobre esta propiedad (mayor estimulación de la unión al estar el *core* por el 5' de poli A).
- La orientación de los trectos poli (dA:dT) puede dificultar la actividad de translocación de RSC.
- Tanto el tamaño como la distancia de los trectos poli (dA:dT) respecto al nucleosoma, son relevantes para observar el efecto sobre la actividad de *sliding* de RSC
- No se observó un efecto sinérgico entre los trectos poli (dA:dT) y el factor Gal4-VP16, en estimular la actividad de *sliding* de RSC.
- Gal4-VP16 estimula la actividad de *sliding* de RSC y no se observó un claro efecto sinérgico entre los trectos poli (dA:dT) y este factor.
- Los trectos poli (dA:dT) estimulan la actividad de *sliding* de γ SWI/SNF. Sin embargo, la orientación de estas no tuvo un efecto evidente.

- Los tractos poli (dA:dT) no afectan el *eviction* catalizado por ySWI/SNF y mediado por el factor Gal4-VP16.

7. REFERENCIAS

- Auger, A., Galarneau, L., Altaf, M., Nourani, A., Doyon, Y., Utle, R. T., Cronier, D., Allard, S., Cote, J. (2008). Eaf1 is the platform for NuA4 molecular assembly that evolutionarily links chromatin acetylation to ATP-dependent exchange of histone H2A variants. *Mol Cell Biol*, 28(7), 2257-2270.
- Badis, G., Chan, E. T., van Bakel, H., Pena-Castillo, L., Tillo, D., Tsui, K., Carlson, C. D., Gossett, A. J., Hasinoff, M. J., Warren, C. L., Gebbia, M., Talukder, S., Yang, A., Mnaimneh, S., Terterov, D., Coburn, D., Li Yeo, A., Yeo, Z. X., Clarke, N. D., Lieb, J. D., Ansari, A. Z., Nislow, C., Hughes, T. R. (2008). A library of yeast transcription factor motifs reveals a widespread function for Rsc3 in targeting nucleosome exclusion at promoters. *Mol Cell*, 32(6), 878-887.
- Barnes, T., Korber, P. (2021). The Active Mechanism of Nucleosome Depletion by Poly(dA:dT) Tracts In Vivo. *Int J Mol Sci*, 22(15).
- Bhardwaj, S. K., Hailu, S. G., Olufemi, L., Brahma, S., Kundu, S., Hota, S. K., Persinger, J., Bartholomew, B. (2020). Dinucleosome specificity and allosteric switch of the ISW1a ATP-dependent chromatin remodeler in transcription regulation. *Nat Commun*, 11(1), 5913.
- Brahma, S., Henikoff, S. (2019). RSC-Associated Subnucleosomes Define MNase-Sensitive Promoters in Yeast. *Mol Cell*, 73(2), 238-249 e233.
- Cairns, B. R. (2009). The logic of chromatin architecture and remodelling at promoters. *Nature*, 461(7261), 193-198.
- Cairns, B. R., Kim, Y. J., Sayre, M. H., Laurent, B. C., Kornberg, R. D. (1994). A multisubunit complex containing the SWI1/ADR6, SWI2/SNF2, SWI3, SNF5, and SNF6 gene products isolated from yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(5), 1950-1954.
- Cairns, B. R., Lorch, Y., Li, Y., Zhang, M., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Du, J., Laurent, B., Kornberg, R. D. (1996). RSC, an essential, abundant chromatin-remodeling complex. *Cell*, 87(7), 1249-1260.
- Campos, E. I., Reinberg, D. (2009). Histones: annotating chromatin. *Annu Rev Genet*, 43, 559-599.
- Challal, D., Barucco, M., Kubik, S., Feuerbach, F., Candelli, T., Geoffroy, H., Benaksas, C., Shore, D., Libri, D. (2018). General Regulatory Factors Control the Fidelity of Transcription by Restricting Non-coding and Ectopic Initiation. *Mol Cell*, 72(6), 955-969 e957.
- Chandy, M., Gutierrez, J. L., Prochasson, P., Workman, J. L. (2006). SWI/SNF displaces SAGA-acetylated nucleosomes. *Eukaryot Cell*, 5(10), 1738-1747.
- Chen, K., Yuan, J., Sia, Y., Chen, Z. (2023). Mechanism of action of the SWI/SNF family complexes. *Nucleus*, 14(1), 2165604.

- Chereji, R. V., Ramachandran, S., Bryson, T. D., Henikoff, S. (2018). Precise genome-wide mapping of single nucleosomes and linkers in vivo. *Genome Biol*, 19(1), 19.
- Clapier, C. R. (2021). Sophisticated Conversations between Chromatin and Chromatin Remodelers, and Dissonances in Cancer. *Int J Mol Sci*, 22(11).
- Clapier, C. R., Cairns, B. R. (2009). The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Biochem*, 78, 273-304.
- Clapier, C. R., Cairns, B. R. (2012). Regulation of ISWI involves inhibitory modules antagonized by nucleosomal epitopes. *Nature*, 492(7428), 280-284.
- Clapier, C. R., Iwasa, J., Cairns, B. R., Peterson, C. L. (2017). Mechanisms of action and regulation of ATP-dependent chromatin-remodelling complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18(7), 407-422.
- Cutter, A. R., Hayes, J. J. (2015). A brief review of nucleosome structure. *FEBS Lett*, 589(20 Pt A), 2914-2922.
- Davie, J. R. (1998). Covalent modifications of histones: expression from chromatin templates. *Curr Opin Genet Dev*, 8(2), 173-178.
- de Boer, C. G., Hughes, T. R. (2014). Poly-dA:dT tracts form an in vivo nucleosomal turnstile. *PLoS One*, 9(10), e110479.
- Dechassa, M. L., Zhang, B., Horowitz-Scherer, R., Persinger, J., Woodcock, C. L., Peterson, C. L., Bartholomew, B. (2008). Architecture of the SWI/SNF-nucleosome complex. *Mol Cell Biol*, 28(19), 6010-6021.
- Deindl, S., Hwang, W. L., Hota, S. K., Blosser, T. R., Prasad, P., Bartholomew, B., Zhuang, X. (2013). ISWI remodelers slide nucleosomes with coordinated multi-base-pair entry steps and single-base-pair exit steps. *Cell*, 152(3), 442-452.
- Felsenfeld, G., Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature*, 421(6921), 448-453.
- Field, Y., Kaplan, N., Fondufe-Mittendorf, Y., Moore, I. K., Sharon, E., Lubling, Y., Widom, J., Segal, E. (2008). Distinct modes of regulation by chromatin encoded through nucleosome positioning signals. *PLoS Comput Biol*, 4(11), e1000216.
- Flaus, A., Owen-Hughes, T. (2003). Dynamic properties of nucleosomes during thermal and ATP-driven mobilization. *Mol Cell Biol*, 23(21), 7767-7779.
- Gangaraju, V. K., Bartholomew, B. (2007). Dependency of ISW1a chromatin remodeling on extranucleosomal DNA. *Mol Cell Biol*, 27(8), 3217-3225.
- Ganguli, D., Chereji, R. V., Iben, J. R., Cole, H. A., Clark, D. J. (2014). RSC-dependent constructive and destructive interference between opposing arrays of phased nucleosomes in yeast. *Genome Res*, 24(10), 1637-1649.
- Gkikopoulos, T., Schofield, P., Singh, V., Pinskaya, M., Mellor, J., Smolle, M., Workman, J. L., Barton, G. J., Owen-Hughes, T. (2011). A role for Snf2-

- related nucleosome-spacing enzymes in genome-wide nucleosome organization. *Science*, 333(6050), 1758-1760.
- Gutierrez, J. L., Chandy, M., Carrozza, M. J., Workman, J. L. (2007). Activation domains drive nucleosome eviction by SWI/SNF. *EMBO J*, 26(3), 730-740.
- Han, Y., Reyes, A. A., Malik, S., He, Y. (2020). Cryo-EM structure of SWI/SNF complex bound to a nucleosome. *Nature*, 579(7799), 452-455.
- Harada, B. T., Hwang, W. L., Deindl, S., Chatterjee, N., Bartholomew, B., Zhuang, X. (2016). Stepwise nucleosome translocation by RSC remodeling complexes. *Elife*, 5.
- Hartley, P. D., Madhani, H. D. (2009). Mechanisms that specify promoter nucleosome location and identity. *Cell*, 137(3), 445-458.
- He, Z., Chen, K., Ye, Y., Chen, Z. (2021). Structure of the SWI/SNF complex bound to the nucleosome and insights into the functional modularity. *Cell Discov*, 7(1), 28.
- Hepp, M. I., Smolle, M., Gidi, C., Amigo, R., Valenzuela, N., Arriagada, A., Maureira, A., Gogol, M. M., Torrejon, M., Workman, J. L., Gutierrez, J. L. (2017). Role of Nhp6 and Hmo1 in SWI/SNF occupancy and nucleosome landscape at gene regulatory regions. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 1860(3), 316-326.
- Hota, S. K., Bartholomew, B. (2011). Diversity of operation in ATP-dependent chromatin remodelers. *Biochim Biophys Acta*, 1809(9), 476-487.
- Hughes, A. L., Rando, O. J. (2014). Mechanisms underlying nucleosome positioning in vivo. *Annu Rev Biophys*, 43, 41-63.
- Iyer, V., Struhl, K. (1995). Poly(dA:dT), a ubiquitous promoter element that stimulates transcription via its intrinsic DNA structure. *EMBO J*, 14(11), 2570-2579.
- Jiang, C., Pugh, B. F. (2009). Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics. *Nat Rev Genet*, 10(3), 161-172.
- Kaplan, N., Moore, I. K., Fondufe-Mittendorf, Y., Gossett, A. J., Tillo, D., Field, Y., LeProust, E. M., Hughes, T. R., Lieb, J. D., Widom, J., Segal, E. (2009). The DNA-encoded nucleosome organization of a eukaryotic genome. *Nature*, 458(7236), 362-366.
- Kassabov, S. R., Zhang, B., Persinger, J., Bartholomew, B. (2003). SWI/SNF unwraps, slides, and rewraps the nucleosome. *Mol Cell*, 11(2), 391-403.
- Klein-Brill, A., Joseph-Strauss, D., Appleboim, A., Friedman, N. (2019). Dynamics of Chromatin and Transcription during Transient Depletion of the RSC Chromatin Remodeling Complex. *Cell Rep*, 26(1), 279-292 e275.
- Knight, B., Kubik, S., Ghosh, B., Bruzzone, M. J., Geertz, M., Martin, V., Denervaud, N., Jacquet, P., Ozkan, B., Rougemont, J., Maerkl, S. J., Naef, F., Shore, D. (2014). Two distinct promoter architectures centered on dynamic nucleosomes control ribosomal protein gene transcription. *Genes Dev*, 28(15), 1695-1709.

- Kobayashi, W., Kurumizaka, H. (2019). Structural transition of the nucleosome during chromatin remodeling and transcription. *Curr Opin Struct Biol*, 59, 107-114.
- Korber, P. (2012). Active nucleosome positioning beyond intrinsic biophysics is revealed by in vitro reconstitution. *Biochem Soc Trans*, 40(2), 377-382.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4), 693-705.
- Koyama, M., Kurumizaka, H. (2018). Structural diversity of the nucleosome. *J Biochem*, 163(2), 85-95.
- Krietenstein, N., Wal, M., Watanabe, S., Park, B., Peterson, C. L., Pugh, B. F., Korber, P. (2016). Genomic Nucleosome Organization Reconstituted with Pure Proteins. *Cell*, 167(3), 709-721 e712.
- Kubik, S., Bruzzone, M. J., Challal, D., Dreos, R., Mattarocci, S., Bucher, P., Libri, D., Shore, D. (2019). Opposing chromatin remodelers control transcription initiation frequency and start site selection. *Nat Struct Mol Biol*, 26(8), 744-754.
- Kubik, S., Bruzzone, M. J., Jacquet, P., Falcone, J. L., Rougemont, J., Shore, D. (2015). Nucleosome Stability Distinguishes Two Different Promoter Types at All Protein-Coding Genes in Yeast. *Mol Cell*, 60(3), 422-434.
- Kubik, S., O'Duibhir, E., de Jonge, W. J., Mattarocci, S., Albert, B., Falcone, J. L., Bruzzone, M. J., Holstege, F. C. P., Shore, D. (2018). Sequence-Directed Action of RSC Remodeler and General Regulatory Factors Modulates +1 Nucleosome Position to Facilitate Transcription. *Mol Cell*, 71(1), 89-102 e105.
- Lee, W., Tillo, D., Bray, N., Morse, R. H., Davis, R. W., Hughes, T. R., Nislow, C. (2007). A high-resolution atlas of nucleosome occupancy in yeast. *Nat Genet*, 39(10), 1235-1244.
- Li, G., Reinberg, D. (2011). Chromatin higher-order structures and gene regulation. *Curr Opin Genet Dev*, 21(2), 175-186.
- Li, M., Hada, A., Sen, P., Olufemi, L., Hall, M. A., Smith, B. Y., Forth, S., McKnight, J. N., Patel, A., Bowman, G. D., Bartholomew, B., Wang, M. D. (2015). Dynamic regulation of transcription factors by nucleosome remodeling. *Elife*, 4.
- Lieleg, C., Krietenstein, N., Walker, M., Korber, P. (2015). Nucleosome positioning in yeasts: methods, maps, and mechanisms. *Chromosoma*, 124(2), 131-151.
- Lorch, Y., Maier-Davis, B., Kornberg, R. D. (2006). Chromatin remodeling by nucleosome disassembly in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(9), 3090-3093.
- Lorch, Y., Maier-Davis, B., Kornberg, R. D. (2014). Role of DNA sequence in chromatin remodeling and the formation of nucleosome-free regions. *Genes Dev*, 28(22), 2492-2497.

- Lowary, P. T., Widom, J. (1998). New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning. *J Mol Biol*, 276(1), 19-42.
- Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648), 251-260.
- Mahony, S., Pugh, B. F. (2015). Protein-DNA binding in high-resolution. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 50(4), 269-283.
- McCall, M., Brown, T., Kennard, O. (1985). The crystal structure of d(G-G-G-G-C-C-C-C). A model for poly(dG).poly(dC). *J Mol Biol*, 183(3), 385-396.
- McKnight, J. N., Tsukiyama, T., Bowman, G. D. (2016). Sequence-targeted nucleosome sliding in vivo by a hybrid Chd1 chromatin remodeler. *Genome Res*, 26(5), 693-704.
- Moraru, M., Schalch, T. (2019). Chromatin fiber structural motifs as regulatory hubs of genome function? *Essays Biochem*, 63(1), 123-132.
- Nelson, H. C., Finch, J. T., Luisi, B. F., Klug, A. (1987). The structure of an oligo(dA).oligo(dT) tract and its biological implications. *Nature*, 330(6145), 221-226.
- Nguyen, V. Q., Ranjan, A., Stengel, F., Wei, D., Aebersold, R., Wu, C., Leschziner, A. E. (2013). Molecular architecture of the ATP-dependent chromatin-remodeling complex SWR1. *Cell*, 154(6), 1220-1231.
- Oberbeckmann, E., Krietenstein, N., Niebauer, V., Wang, Y., Schall, K., Moldt, M., Straub, T., Rohs, R., Hopfner, K. P., Korber, P., Eustermann, S. (2021a). Genome information processing by the INO80 chromatin remodeler positions nucleosomes. *Nat Commun*, 12(1), 3231.
- Oberbeckmann, E., Niebauer, V., Watanabe, S., Farnung, L., Moldt, M., Schmid, A., Cramer, P., Peterson, C. L., Eustermann, S., Hopfner, K. P., Korber, P. (2021b). Ruler elements in chromatin remodelers set nucleosome array spacing and phasing. *Nat Commun*, 12(1), 3232.
- Ocampo, J., Chereji, R. V., Eriksson, P. R., Clark, D. J. (2016). The ISW1 and CHD1 ATP-dependent chromatin remodelers compete to set nucleosome spacing in vivo. *Nucleic Acids Res*, 44(10), 4625-4635.
- Owen-Hughes, T., Utlej, R. T., Steger, D. J., West, J. M., John, S., Cote, J., Havas, K. M., Workman, J. L. (1999). Analysis of nucleosome disruption by ATP-driven chromatin remodeling complexes. *Methods Mol Biol*, 119, 319-331.
- Parnell, T. J., Huff, J. T., Cairns, B. R. (2008). RSC regulates nucleosome positioning at Pol II genes and density at Pol III genes. *EMBO J*, 27(1), 100-110.
- Parnell, T. J., Schlichter, A., Wilson, B. G., Cairns, B. R. (2015). The chromatin remodelers RSC and ISW1 display functional and chromatin-based promoter antagonism. *Elife*, 4, e06073.

- Prajapati, H. K., Ocampo, J., Clark, D. J. (2020). Interplay among ATP-Dependent Chromatin Remodelers Determines Chromatin Organisation in Yeast. *Biology (Basel)*, 9(8).
- Pugh, B. F. (2010). A preoccupied position on nucleosomes. *Nat Struct Mol Biol*, 17(8), 923.
- Qiu, H., Chereji, R. V., Hu, C., Cole, H. A., Rawal, Y., Clark, D. J., Hinnebusch, A. G. (2016). Genome-wide cooperation by HAT Gcn5, remodeler SWI/SNF, and chaperone Ydj1 in promoter nucleosome eviction and transcriptional activation. *Genome Res*, 26(2), 211-225.
- Rawal, Y., Chereji, R. V., Qiu, H., Ananthakrishnan, S., Govind, C. K., Clark, D. J., Hinnebusch, A. G. (2018). SWI/SNF and RSC cooperate to reposition and evict promoter nucleosomes at highly expressed genes in yeast. *Genes Dev*, 32(9-10), 695-710.
- Rawal, Y., Qiu, H., Hinnebusch, A. G. (2022). Distinct functions of three chromatin remodelers in activator binding and preinitiation complex assembly. *PLoS Genet*, 18(7), e1010277.
- Reyes, A. A., Marcum, R. D., He, Y. (2021). Structure and Function of Chromatin Remodelers. *J Mol Biol*, 433(14), 166929.
- Richmond, T. J., Davey, C. A. (2003). The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature*, 423(6936), 145-150.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., Seraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol*, 17(10), 1030-1032.
- Salih, B., Tripathi, V., Trifonov, E. N. (2015). Visible periodicity of strong nucleosome DNA sequences. *J Biomol Struct Dyn*, 33(1), 1-9.
- Segal, E., Fondufe-Mittendorf, Y., Chen, L., Thastrom, A., Field, Y., Moore, I. K., Wang, J. P., Widom, J. (2006). A genomic code for nucleosome positioning. *Nature*, 442(7104), 772-778.
- Segal, E., Widom, J. (2009). Poly(dA:dT) tracts: major determinants of nucleosome organization. *Curr Opin Struct Biol*, 19(1), 65-71.
- Shivaswamy, S., Iyer, V. R. (2008). Stress-dependent dynamics of global chromatin remodeling in yeast: dual role for SWI/SNF in the heat shock stress response. *Mol Cell Biol*, 28(7), 2221-2234.
- Shrader, T. E., Crothers, D. M. (1989). Artificial nucleosome positioning sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(19), 7418-7422.
- Shrader, T. E., Crothers, D. M. (1990). Effects of DNA sequence and histone-histone interactions on nucleosome placement. *J Mol Biol*, 216(1), 69-84.
- Sirinakis, G., Clapier, C. R., Gao, Y., Viswanathan, R., Cairns, B. R., Zhang, Y. (2011). The RSC chromatin remodelling ATPase translocates DNA with high force and small step size. *EMBO J*, 30(12), 2364-2372.
- Struhl, K., Segal, E. (2013). Determinants of nucleosome positioning. *Nat Struct Mol Biol*, 20(3), 267-273.

- Suter, B., Schnappauf, G., Thoma, F. (2000). Poly(dA.dT) sequences exist as rigid DNA structures in nucleosome-free yeast promoters in vivo. *Nucleic Acids Res*, 28(21), 4083-4089.
- Takasuka, T. E., Stein, A. (2010). Direct measurements of the nucleosome-forming preferences of periodic DNA motifs challenge established models. *Nucleic Acids Res*, 38(17), 5672-5680.
- Thastrom, A., Lowary, P. T., Widlund, H. R., Cao, H., Kubista, M., Widom, J. (1999). Sequence motifs and free energies of selected natural and non-natural nucleosome positioning DNA sequences. *J Mol Biol*, 288(2), 213-229.
- Thomas, J. O., Furber, V. (1976). Yeast chromatin structure. *FEBS Lett*, 66(2), 274-280.
- Tirosh, I., Barkai, N. (2008). Two strategies for gene regulation by promoter nucleosomes. *Genome Res*, 18(7), 1084-1091.
- Tolkunov, D., Zawadzki, K. A., Singer, C., Elfving, N., Morozov, A. V., Broach, J. R. (2011). Chromatin remodelers clear nucleosomes from intrinsically unfavorable sites to establish nucleosome-depleted regions at promoters. *Mol Biol Cell*, 22(12), 2106-2118.
- Trifonov, E. N. (2011). Cracking the chromatin code: precise rule of nucleosome positioning. *Phys Life Rev*, 8(1), 39-50.
- Tsankov, A. M., Thompson, D. A., Socha, A., Regev, A., Rando, O. J. (2010). The role of nucleosome positioning in the evolution of gene regulation. *PLoS Biol*, 8(7), e1000414.
- van Bakel, H., Tsui, K., Gebbia, M., Mnaimneh, S., Hughes, T. R., Nislow, C. (2013). A compendium of nucleosome and transcript profiles reveals determinants of chromatin architecture and transcription. *PLoS Genet*, 9(5), e1003479.
- Voong, L. N., Xi, L., Wang, J. P., Wang, X. (2017). Genome-wide Mapping of the Nucleosome Landscape by Micrococcal Nuclease and Chemical Mapping. *Trends Genet*, 33(8), 495-507.
- Wagner, F. R., Dienemann, C., Wang, H., Stutzer, A., Tegunov, D., Urlaub, H., Cramer, P. (2020). Structure of SWI/SNF chromatin remodeler RSC bound to a nucleosome. *Nature*, 579(7799), 448-451.
- Whitehouse, I., Rando, O. J., Delrow, J., Tsukiyama, T. (2007). Chromatin remodelling at promoters suppresses antisense transcription. *Nature*, 450(7172), 1031-1035.
- Winger, J., Bowman, G. D. (2017). The Sequence of Nucleosomal DNA Modulates Sliding by the Chd1 Chromatin Remodeler. *J Mol Biol*, 429(6), 808-822.
- Wippo, C. J., Israel, L., Watanabe, S., Hochheimer, A., Peterson, C. L., Korber, P. (2011). The RSC chromatin remodelling enzyme has a unique role in directing the accurate positioning of nucleosomes. *EMBO J*, 30(7), 1277-1288.

- Woodcock, C. L., Ghosh, R. P. (2010). Chromatin higher-order structure and dynamics. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(5), a000596.
- Wu, R., Li, H. (2010). Positioned and G/C-capped poly(dA:dT) tracts associate with the centers of nucleosome-free regions in yeast promoters. *Genome Res*, 20(4), 473-484.
- Xi, Y., Yao, J., Chen, R., Li, W., He, X. (2011). Nucleosome fragility reveals novel functional states of chromatin and poises genes for activation. *Genome Res*, 21(5), 718-724.
- Yamada, K., Frouws, T. D., Angst, B., Fitzgerald, D. J., DeLuca, C., Schimmele, K., Sargent, D. F., Richmond, T. J. (2011). Structure and mechanism of the chromatin remodelling factor ISW1a. *Nature*, 472(7344), 448-453.
- Yan, L., Wang, L., Tian, Y., Xia, X., Chen, Z. (2016). Structure and regulation of the chromatin remodeller ISWI. *Nature*, 540(7633), 466-469.
- Yan, L., Wu, H., Li, X., Gao, N., Chen, Z. (2019). Structures of the ISWI-nucleosome complex reveal a conserved mechanism of chromatin remodeling. *Nat Struct Mol Biol*, 26(4), 258-266.
- Ye, Y., Wu, H., Chen, K., Clapier, C. R., Verma, N., Zhang, W., Deng, H., Cairns, B. R., Gao, N., Chen, Z. (2019). Structure of the RSC complex bound to the nucleosome. *Science*, 366(6467), 838-843.
- Yen, K., Vinayachandran, V., Batta, K., Koerber, R. T., Pugh, B. F. (2012). Genome-wide nucleosome specificity and directionality of chromatin remodelers. *Cell*, 149(7), 1461-1473.
- Zhang, Y., Moqtaderi, Z., Rattner, B. P., Euskirchen, G., Snyder, M., Kadonaga, J. T., Liu, X. S., Struhl, K. (2009). Intrinsic histone-DNA interactions are not the major determinant of nucleosome positions in vivo. *Nat Struct Mol Biol*, 16(8), 847-852.
- Zhang, Z., Wippo, C. J., Wal, M., Ward, E., Korber, P., Pugh, B. F. (2011). A packing mechanism for nucleosome organization reconstituted across a eukaryotic genome. *Science*, 332(6032), 977-980.
- Zheng, C., Hayes, J. J. (2003). Structures and interactions of the core histone tail domains. *Biopolymers*, 68(4), 539-546.