




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



**Interacción diferencial de las isoformas de hC/EBP $\beta$  con  
proteínas HMG**

Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica y Bioinformática

ROBERTO ANTONIO AMIGO BASTÍAS  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2017

Profesor Guía: José Gutiérrez Contreras  
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

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

Profesor tutor:

---

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

Comisión Evaluadora:



---

Dr. Sylvain Guy Marcellini Liotaud  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

---

Dra. Alejandra Loyola  
Fundación Ciencia y Vida

Director de Programa:

---

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

## **AGRADECIMIENTOS.**

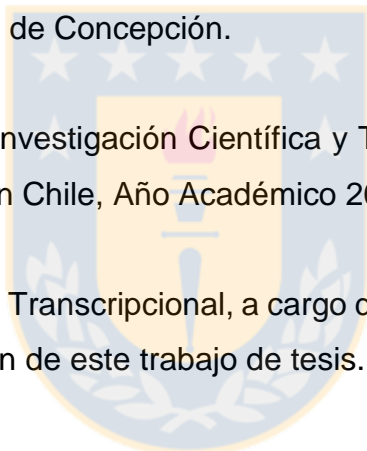
A Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, por Beca de Articulación que permitió realizar el primero año del programa de Magíster en Bioquímica y Bioinformática.

A Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (Fondecyt) dependiente de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (Conicyt), quienes han financiado el proyecto Fondecyt 1130818, que acogió este trabajo de tesis.

A proyecto Enlace 216.037.020-1.0, financiado por la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Concepción.

A la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (Conicyt), por beca para estudios de Magíster en Chile, Año Académico 2015.

A Laboratorio de Regulación Transcripcional, a cargo del Dr. José Leonardo Gutiérrez, por acoger la total realización de este trabajo de tesis.



**ÍNDICE GENERAL.**

**ÍNDICE DE FIGURAS. ....viii**  
**ÍNDICE DE TABLAS. ....x**  
**ABREVIATURAS. ....xi**  
**RESUMEN. ....xv**  
**ABSTRACT. ....xvii**

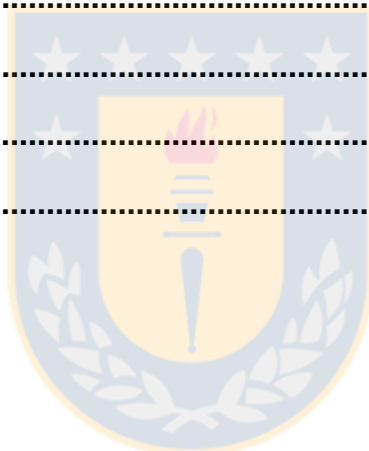


## TABLA DE CONTENIDOS.

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Estructura de la cromatina y regulación transcripcional .....	1
1.2 Proteínas que regulan el estado de la cromatina: HMG .....	4
1.3 Factores de transcripción: C/EBP $\beta$ .....	9
1.4 Interconexión entre C/EBP $\beta$ y HMGs.....	11
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
2.1 Hipótesis: .....	14
2.2 Objetivo general: .....	14
2.3 Objetivos específicos: .....	14
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
3.1 Transformación de bacterias competentes .....	15
3.2 Expresión y purificación de las isoformas de hC/EBP $\beta$ en fusión a GST.....	15
3.3 Expresión y purificación de hHMGA1 y hHMGB1 .....	16
3.4 Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE).....	18
3.5 Western blot .....	18
3.6 Obtención de extracto nuclear .....	19
3.7 GST pull-down .....	20
3.8 Selección de genes blancos .....	21
3.9 Cultivo celular.....	22
3.9.1 Transfección celular .....	22
3.10 Purificación y cuantificación de ARN.....	23
3.11 Análisis de proteínas nucleares .....	24
3.12 Determinación de niveles de ARN mensajero.....	25

3.12.1 Síntesis de ADNc.....	25
3.12.2 PCR tiempo real.....	25
3.13 Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) .....	27
3.13.1 Obtención de extractos nucleares.....	27
3.13.2 Inmunoprecipitación.....	28
3.13.3 Análisis de muestras.....	29
3.14 Expresión y purificación de las isoformas de hC/EBP $\beta$ para EMSA .....	30
3.15 Obtención de vectores con sitio de unión para HMGA y sitio de unión para C/EBP $\beta$ .....	32
3.16 Obtención de plásmidos.....	34
3.17 Marcaje de oligonucleótidos con [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP.....	34
3.17.1 Para PCR radioactiva .....	34
3.17.2 Para hibridación de oligos.....	34
3.18 Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) radioactiva.....	35
3.19 Precipitación de ADN .....	36
3.20 Purificación fragmentos de PCR por gel de poliacrilamida no denaturante ...	37
3.21 Determinación de la concentración de los productos de PCR marcados con $^{32}$ P .....	37
3.22 Reconstitución nucleosomal.....	38
3.23 Electroforesis en geles de poliacrilamida no denaturante .....	39
3.24 Ensayos de retardo electroforético.....	40
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
4.1 Purificación de las isoformas de hC/EBP $\beta$ en fusión a GST .....	41
4.2 Purificación de hHMGA1 y hHMGB1 recombinantes .....	43

4.3 Estudio de la interacción diferencial de las isoformas de hC/EBP $\beta$ con las proteínas HMG e histona H1 .....	46
4.4 Selección de genes blancos .....	49
4.5 Análisis de la expresión génica de los genes blancos seleccionados.....	51
4.6 Análisis de unión de C/EBP $\beta$ y proteínas HMGs a los promotores de genes seleccionados .....	55
4.7 Analisis del efecto de proteínas HMG sobre la unión de las isoformas de C/EBP $\beta$ a su secuencia consenso.....	60
<b>5. DISCUSIÓN. ....</b>	<b>78</b>
<b>6. CONCLUSIONES. ....</b>	<b>89</b>
<b>7. PROYECCIONES. ....</b>	<b>90</b>
<b>8. REFERENCIAS.....</b>	<b>92</b>
<b>ANEXOS. ....</b>	<b>104</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS.

<b>Figura 1:</b> Niveles de compactación de la cromatina.....	3
<b>Figura 2:</b> Representación esquemática del proceso de transcripción en el contexto de la cromatina.....	4
<b>Figura 3:</b> Mecanismos propuestos para las proteínas HMGB1.....	6
<b>Figura 4:</b> Esquema de las proteínas HMGs.....	7
<b>Figura 5:</b> Representación esquemática de las isoformas de hC/EBP $\beta$ .....	10
<b>Figura 6:</b> Purificación de GST y las isoformas de hC/EBP $\beta$ en fusión a GST.....	42
<b>Figura 7:</b> Cuantificación de GST y las isoformas de hC/EBP $\beta$ en fusión a GST.....	43
<b>Figura 8:</b> Purificación de HMGA1a, HMGA1b y HMGB1.....	45
<b>Figura 9:</b> Cuantificación de HMGA1a, HMGA1b y HMGB1.....	46
<b>Figura 10:</b> Análisis de la interacción de las isoformas de hC/EBP $\beta$ con proteínas HMGs e histona H1.....	48
<b>Figura 11:</b> Representación esquemática de los genes blancos seleccionados.....	50
<b>Figura 12:</b> Verificación de transfecciones en células HepG2.....	53
<b>Figura 13:</b> Análisis del efecto de las isoformas de hC/EBP $\beta$ sobre los niveles de ARN mensajero de los genes seleccionados.....	54
<b>Figura 14:</b> Análisis de la ocupancia de C/EBP $\beta$ en los promotores de genes seleccionados.....	58
<b>Figura 15:</b> Análisis de la ocupancia de HMGA1 y HMGB1 en los promotores de genes seleccionados.....	59
<b>Figura 16:</b> Purificación y cuantificación de C/EBP $\beta$ 1, C/EBP $\beta$ 2 y C/EBP $\beta$ 3 fusionados a epítotope 6xHis.....	62
<b>Figura 17:</b> Subclonamientos y generación de las sondas con secuencia rica en AT y sitio de unión para C/EBP $\beta$ .....	64
<b>Figura 18:</b> Generación del ADN marcado.....	66
<b>Figura 19:</b> Reconstitución nucleosomal.....	67
<b>Figura 20:</b> Titulación de unión de proteínas al mononucleosoma.....	69

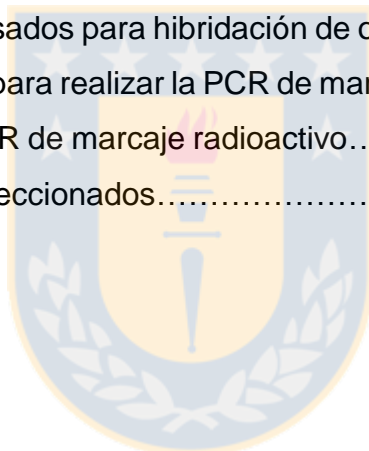


<b>Figura 21:</b> Análisis de influencia de HMGA1 sobre la unión de C/EBP $\beta$ a un probador reconstituido como mononucleosoma.....	71
<b>Figura 22:</b> Análisis de la unión conjunta de HMGB1 y C/EBP $\beta$ a un probador reconstituido como mononucleosoma.....	72
<b>Figura 23:</b> Influencia de HMGA1a sobre la unión de C/EBP $\beta$ 1 al ADN.....	74
<b>Figura 24:</b> Influencia de HMGA1a sobre la unión de C/EBP $\beta$ 2 al ADN.....	75
<b>Figura 25:</b> Influencia de HMGA1 sobre la unión de C/EBP $\beta$ 2 a la sonda A4-02-CEBP.....	77
<b>Anexo 1:</b> Análisis de los vectores pGEM-3Z/601 con secuencia rica en AT y sitio de unión para C/EBP $\beta$ .....	104
<b>Anexo 2:</b> PCR en frío de las sondas.....	105
<b>Anexo 3:</b> Purificación de C/EBP $\beta$ 2-His.....	106



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Detección de proteínas que interaccionan con C/EBP $\beta$ mediante análisis de espectrometría de masas, MudPIT (Multidimensional Protein Identification Technology).....	13
<b>Tabla 2:</b> Sets de partidores usados para medir niveles de ARNm.....	26
<b>Tabla 3:</b> Programa usado en la PCR en tiempo real.....	27
<b>Tabla 4:</b> Sets de partidores usados para amplificar los sitios de unión de las proteínas de interés.....	30
<b>Tabla 5:</b> Oligonucleótidos usados para generación de vectores a ser utilizados para generación de sondas de EMSA.....	33
<b>Tabla 6:</b> Oligonucleótidos usados para hibridación de oligos radioactivo.....	35
<b>Tabla 7:</b> Partidores usados para realizar la PCR de marcaje radioactivo.....	36
<b>Tabla 8:</b> Programa de la PCR de marcaje radioactivo.....	36
<b>Tabla 9:</b> Genes blancos seleccionados.....	50



## ABREVIATURAS.

**[ $\gamma$ -32P]-ATP:** ATP marcado con fosforo 32, en el grupo fosfato gamma

**$\mu$ Ci:** Microcurie

**$\mu$ l:** Microlitro

**3T3-L1:** Células derivadas de fibroblasto de ratón

**6xHis:** 6 veces histidina

**A/T:** Adenina/Timina

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ATP:** Adenosín trifosfato

**BSA:** Albúmina de Suero Bovino

**bZIP:** *Basic Leucine Zipper Domain*

**C/EBPs:** *CCAAT-enhancer-binding proteins*

**C/EBP $\beta$ :** *CCAAT-enhancer-binding protein  $\beta$*

**C/EBP $\beta$ 1:** *CCAAT-enhancer-binding protein  $\beta$  isoform 1*

**C/EBP $\beta$ 2:** *CCAAT-enhancer-binding protein  $\beta$  isoform 2*

**C/EBP $\beta$ 3:** *CCAAT-enhancer-binding protein  $\beta$  isoform 3*

**CaCl<sub>2</sub>:** Cloruro de calcio

**ChIP:** Inmunoprecipitación de Cromatina

**DMEM:** Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco

**dNTP:** Desoxirribonucleótidos trifosfato

**DTT:** Ditioneitol

**E. coli:** *Escherichia coli*

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético

**EMSA:** Ensayo de retardo electroforético

**EN:** Extracto nuclear

**fmol:** Fentomol

**gr:** Gramos

**GST:** *Glutathione S-Transferase*

**HCl:** Ácido clorhídrico

**HeLa:** Células derivadas de carcinoma cervical humano

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

**HepG2:** Línea celular humana derivada de hepatoma

**HMG:** *High Mobility Group*

**HMGA:** *High Mobility Group AT-hook*

**HMGA1:** *High Mobility Group AT-hook 1*

**HMGA1a:** *High Mobility Group AT-hook 1 isoform a*

**HMGA1b:** *High Mobility Group AT-hook 1 isoform b*

**HMGA2:** *High Mobility Group AT-hook 2*

**HMGB:** *High Mobility Group Box*

**HMGB1:** *High Mobility Group Box 1*

**HMGN:** *High Mobility Group Nucleosome-binding*

**HRP:** Peroxidasa de Rábano Picante

**Id1:** Inhibitor of DNA Binding 1

**IgG:** Inmunoglobulina G

**IPTG:** Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido

**KCl:** Cloruro de potasio

**KDa:** Kilo Daltons

**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:** Fosfato de potasio monobásico

**L:** Litros

**LAP\*:** *Liver-Enriched Activating Protein\**

**LAP:** *Liver-Enriched Activating Protein*

**LB:** Medio Luria Bertani

**LIP:** *Liver-Enriched Inhibitory Protein*

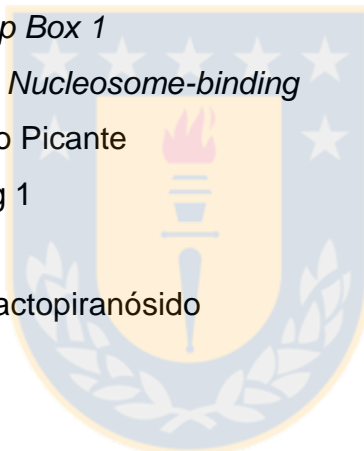
**M:** Molar

**MCF-7:** Células derivadas de adenocarcinoma de mama humano

**mg:** Miligramos

**MgCl<sub>2</sub>:** Cloruro de magnesio

**min:** Minutos



**ml:** Mililitro

**mm:** Milímetros

**mM:** Milimolar

**mmol:** Milimol

**MudPIT:** *Multidimensional Protein Identification Technology*

**MW:** Peso molecular

**MWCO:** *Molecular weight cut-off*

**N:** Normal

**Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>:** Fosfato disódico

**NaCl:** Cloruro de sodio

**NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:** Bifosfato de sodio

**NaOH:** Hidróxido de sodio

**ng:** Nanogramo

**nm:** Nanometro

**NP-40:** Nonidet P-40

**O.D.<sub>600</sub>:** 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

**RB:** Retinoblastoma

**rpm:** Revoluciones por minuto

**RT-PCR:** Reacción de polimerización en cadena con transcripción reversa

**SDS:** Dodecilsulfato sódico

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

**SON:** Oligonucleosomas cortos



**Sp1:** *Specificity Protein 1*

**SWI/SNF:** *Switching Defective/Sucrose Nonfermenting*

**TBE:** Tampón Tris, borato, EDTA

**TE:** Tris-Cl 10mM, EDTA 1mM

**TEMED:** Tetrametiletilendiamina

**TGF- $\beta$ :** *Transforming growth factor  $\beta$*

**TPCK:** N-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona

**Tris-HCl:** Tris-(hidroximetil)-aminometano-Cloruro de hidrógeno

**U:** Unidades

**V:** Volts

**xg:** *Times gravity*

**$\mu$ g:** Microgramo

**$\mu$ M:** Micromolar



## RESUMEN.

La transcripción es un proceso altamente regulado, en el cual existe la participación de una gran cantidad de proteínas como los factores de transcripción, complejos remodeladores de cromatina y otras proteínas nucleares. Entre estas últimas se encuentran las proteínas HMG, las cuales tienen una función directa en la regulación del estado de la cromatina al tener la capacidad de doblar el ADN, competir con la histona H1 por sitios de unión a la cromatina y, en algunos casos, de estimular actividad remodeladora de cromatina dependiente de ATP. Así, estas proteínas pueden facilitar la acción de complejos remodeladores de cromatina y factores de transcripción, lo que se traduce usualmente en una activación de la transcripción. Entre los factores de transcripción con los cuales se ha descrito participación junto a proteínas HMG se encuentra C/EBP $\beta$ , un factor que participa en procesos de diferenciación y proliferación, entre otros. Esta proteína se presenta como tres isoformas: C/EBP $\beta$ 1, C/EBP $\beta$ 2 y C/EBP $\beta$ 3, en donde generalmente C/EBP $\beta$ 1 y C/EBP $\beta$ 2 actúan como activadores transcripcionales, mientras que C/EBP $\beta$ 3 actúa como un represor transcripcional. Se ha descrito que hC/EBP $\beta$  y HMGA1 interactúan físicamente y esta última estimula la unión de C/EBP $\beta$  al promotor del gen del receptor de insulina (*INSR*) humano. Sin embargo, no se ha determinado si existe interacción diferencial entre las isoformas de C/EBP $\beta$  con HMGA1. Para HMGB1 solo se ha descrito una posible interacción física con C/EBP $\beta$ 1 en forma teórica. En este contexto, análisis de GST pull-down asociados a espectrometría de masas realizados en nuestro laboratorio sugirieron la existencia de interacción diferencial entre las isoformas de hC/EBP $\beta$  y HMGA1 (igualmente para HMGB1). Por otro lado, también se observó interacción entre hC/EBP $\beta$ 3 y la histona H1. En esta tesis se buscó verificar la existencia de estas interacciones, a través de ensayos de GST pull-down asociados a inmunodetección, analizando la influencia de C/EBP $\beta$  sobre la unión de HMGB1 y HMGA1 a regiones regulatorias de genes, mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). Para los ensayos de ChIP, se seleccionó genes blanco analizando por qRT-PCR variaciones en niveles de ARNm tras sobreexpresión de

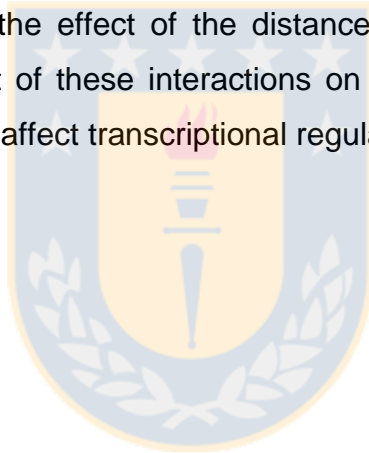
cada isoforma de C/EBP $\beta$ . Se realizaron además ensayos de EMSA para observar la influencia de estas interacciones sobre la unión de las isoformas de C/EBP $\beta$  y las proteínas HMG a sus secuencias en el ADN. Los resultados obtenidos, muestran la existencia de interacción diferencial entre las isoformas de C/EBP $\beta$  y las proteínas HMG, lo cual no se observó para la histona H1. Por otro lado, nuestros ensayos de qRT-PCR mostraron que los genes *ALB*, *SMAD6*, *BRCA2*, *INSR* y *CCND1* son regulados de manera diferencial por las isoformas de C/EBP $\beta$ . Adicionalmente, los análisis de CHIP mostraron que al sobreexpresar C/EBP $\beta$ 1 aumenta la unión de HMGB1 a los promotores de estos genes blanco, con similar resultado para HMGA1 en algunos de estos genes. Sin embargo, en los ensayos de EMSA no se observó el mismo efecto para HMGA1, situación que podría deberse a la distancia en los probadores utilizados entre el sitio de unión para HMGA1 y C/EBP $\beta$ , como lo sugieren análisis adicionales de este tipo realizados en nuestro estudio. Los resultados obtenidos en esta tesis conforman una base que estimula la realización de estudios futuros que aborden aspectos funcionales de la interacción diferencial de las isoformas de C/EBP $\beta$  con estas proteínas HMG, como es estudiar condiciones fisiológicas bajo las cuales estén ocurriendo estas interacciones, influencia de la distancia entre los sitios de unión para C/EBP $\beta$  y HMGA1 y el efecto de estas interacciones sobre la acción de otras proteínas o complejos de proteínas que puedan afectar la regulación transcripcional.



## ABSTRACT.

Transcription is a highly regulated process in which a large number of proteins are involved, such as transcription factors, chromatin remodeling complexes and other nuclear proteins. Within the last group are HMG proteins, which play a direct role in regulation of chromatin structure. These proteins have the ability to bend the DNA, compete with histone H1 for binding sites on chromatin and, in some cases, stimulate ATP-dependent chromatin remodeling activity. Thus, these proteins may facilitate the action of chromatin remodeling complexes and transcription factors, which usually results in transcriptional activation. Among transcription factors for which an association with HMG proteins has been described is C/EBP $\beta$ , which is involved in processes such as cell differentiation and proliferation. This factor exists as three isoforms: C/EBP $\beta$ 1, C/EBP $\beta$ 2 and C/EBP $\beta$ 3, where generally C/EBP $\beta$ 1 and C/EBP $\beta$ 2 act as transcriptional activators, whereas C/EBP $\beta$ 3 acts as a transcriptional repressor. Physical interaction between hC/EBP $\beta$  and HMGA1 has been described and this HMG protein stimulates C/EBP $\beta$  binding to the promoter of the human insulin receptor gene (*INSR*). However, whether C/EBP $\beta$  isoforms differentially interact with HMGA1 is currently unknown. In the case of HMGB1 only a theoretical interaction with C/EBP $\beta$ 1 has been described. In this context, previous studies carried out in our laboratory, consisting in GST pull-down assays coupled to Mass Spectrometry analysis, suggest a putative differential interaction between hC/EBP $\beta$  isoforms and HMGA1 (and also HMGB1). In addition, interaction between hC/EBP $\beta$ 3 and histone H1 was also observed. In this thesis we sought to confirm the existence of the differential interactions mentioned above, with the use of GST pull-down assays coupled to immunodetection and by analyzing the influence of hC/EBP $\beta$  on the binding of HMGB1 and HMGA1 to gene regulatory regions, using chromatin immunoprecipitation assays (ChIP). For ChIP assays, the target genes to be tested were selected by analyzing variations of their mRNA levels by qRT-PCR upon overexpression with each C/EBP $\beta$  isoform. In addition, EMSA assays were performed to observe the influence of these interactions on the binding of C/EBP $\beta$  isoforms and HMG proteins to their cognate sequences. Our results show the

existence of differential interaction between C/EBP $\beta$  isoforms and HMG proteins, which was not observed for histone H1. On the other hand, our qRT-PCR assays showed that *ALB*, *SMAD6*, *BRCA2*, *INSR* and *CCND1* genes are differentially regulated by C/EBP $\beta$  isoforms. In addition, our ChIP results showed that overexpressing C/EBP $\beta$ 1 increased the binding of HMGB1 to promoter regions of these target genes, obtaining similar results for HMGA1 in some of these genes. However, EMSA assays did not show cooperativity between C/EBP $\beta$  and HMGA1. This result might be due to the distance between the HMGA1 and C/EBP $\beta$  binding sites, as suggested by additional analysis performed in our study. Our results stimulate the development of future studies addressing functional aspects of this differential interaction between C/EBP $\beta$  isoforms and these HMG proteins, such as the study of physiological conditions where these interactions are occurring, the effect of the distance between C/EBP $\beta$  and HMGA binding sites and the effect of these interactions on the action of other proteins or protein complexes that may affect transcriptional regulation.



# 1. INTRODUCCIÓN.

## 1.1 Estructura de la cromatina y regulación transcripcional

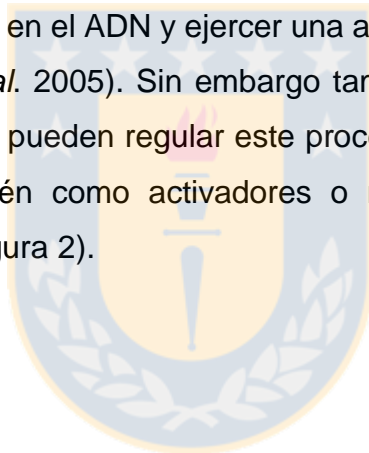
Los genomas eucariontes están altamente condensados dentro de los núcleos de las células. El nivel de compactación del material genético permite así que un largo total de aproximadamente 2m de ADN pueda caber en un núcleo celular de cerca de  $10^{-5}$ m de diámetro, en el caso de células humanas (Längst y Becker, 2004).

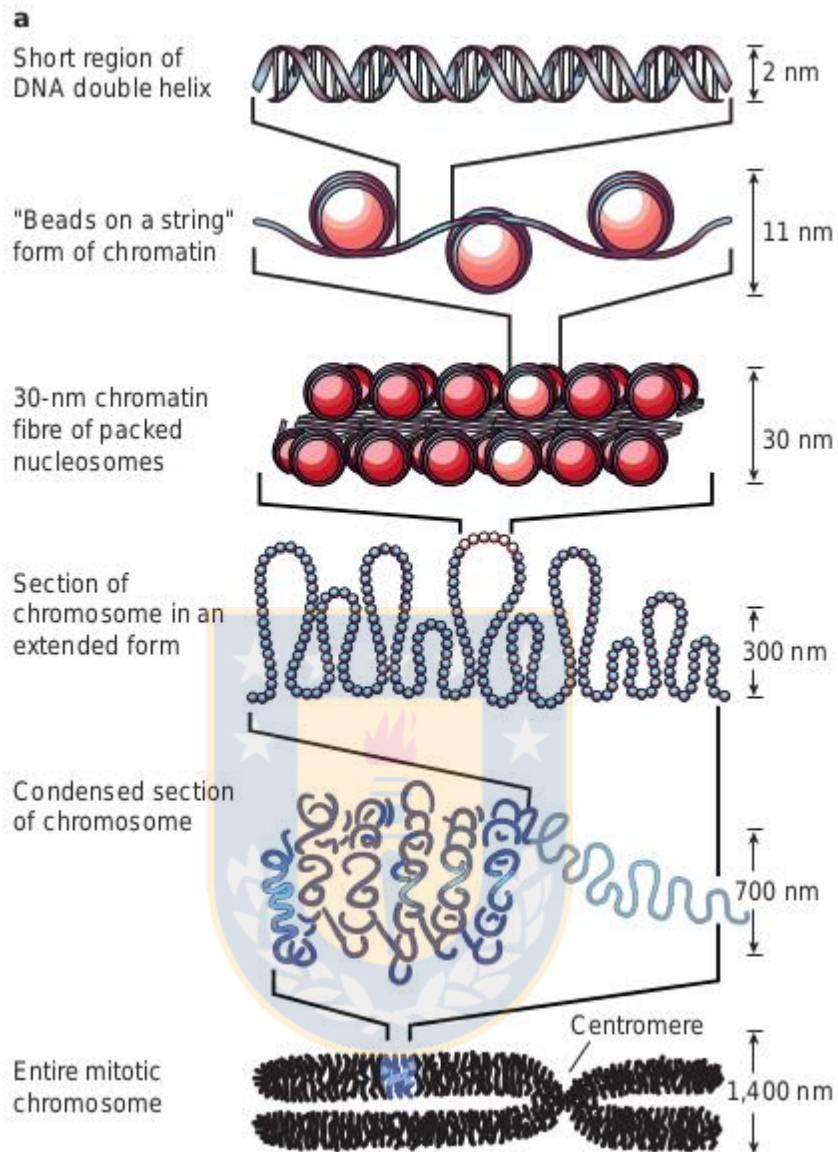
Para lograr alcanzar el nivel de compactación del ADN en células eucariontes, es necesario que éste se encuentre interaccionando con proteínas nucleares, conformando lo que se conoce como cromatina. La unidad básica repetitiva de la cromatina es el nucleosoma, que está formado por aproximadamente 200pb de ADN y un octámero de histonas (H2A, H2B, H3 y H4), que conforman un núcleo proteico, al cual aproximadamente 147pb de este ADN lo rodean, dando 1.7 vueltas. A la estructura conformada sólo por el octámero de histonas y los 147pb directamente asociados a él se le conoce como *core* nucleosomal. El ADN sobrante se denomina ADN *linker*, el cual sirve de conector entre los distintos *core* nucleosomales. El nucleosoma puede además tener la presencia de una quinta histona denominada H1, que se ensambla por fuera del *core* nucleosomal y le permite a la cromatina llegar a un mayor grado de compactación conocido como fibra de 30nm (Richmond y Davey, 2003). La presencia de la histona H1 puede permitir la interacción entre nucleosomas y así estabilizar los grados de compactación de orden superior de la cromatina (Wolffe *et al.* 1997; Thomas, 1999). El máximo grado de compactación de la cromatina se puede observar en los cromosomas en metafase (Richmond y Davey, 2003; Németh y Längst, 2004) (Figura 1).

Debido a que el ADN se encuentra formando parte de la cromatina, éste se puede encontrar en dos estados, como ADN nucleosomal o como ADN *linker*. El ADN nucleosomal se considera regularmente inaccesible para la unión de proteínas que

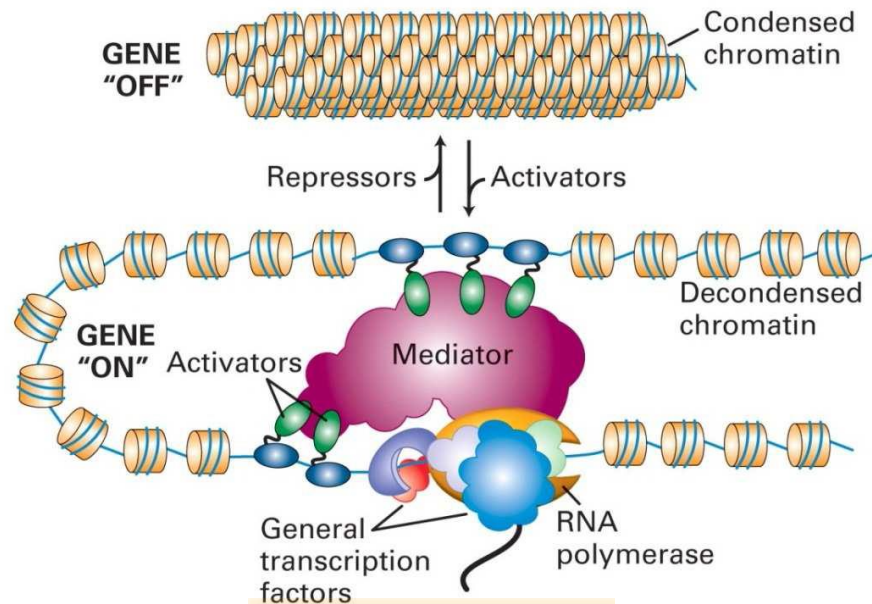
poseen secuencias de unión en éste, por lo tanto, la presencia de los nucleosomas es considerada como un componente inhibitorio de procesos como la transcripción, replicación y reparación del ADN (Richmond y Davey, 2003; Campos y Reinberg, 2009).

En el proceso de transcripción una hebra de ADN actúa como molde para la síntesis de una hebra de ARN, reacción catalizada por la ARN polimerasa. En este proceso también participan proteínas que son componentes de la maquinaria transcripcional basal, las cuales otorgan una serie de características que harán posible la síntesis del ARN. La regulación de la transcripción ocurre principalmente gracias a la participación de proteínas denominadas factores de transcripción, los cuales pueden interaccionar con secuencias reguladoras en el ADN y ejercer una acción activadora o represora de la transcripción (Lodish *et al.* 2005). Sin embargo también existen otras proteínas y complejos de proteínas que pueden regular este proceso al modificar el estado de la cromatina, actuando también como activadores o represores de la transcripción (Clapier y Cairns, 2009) (Figura 2).





**Figura 1: Niveles de compactación de la cromatina.** Fuente: Tomado de Felsenfeld y Groudine (2003).



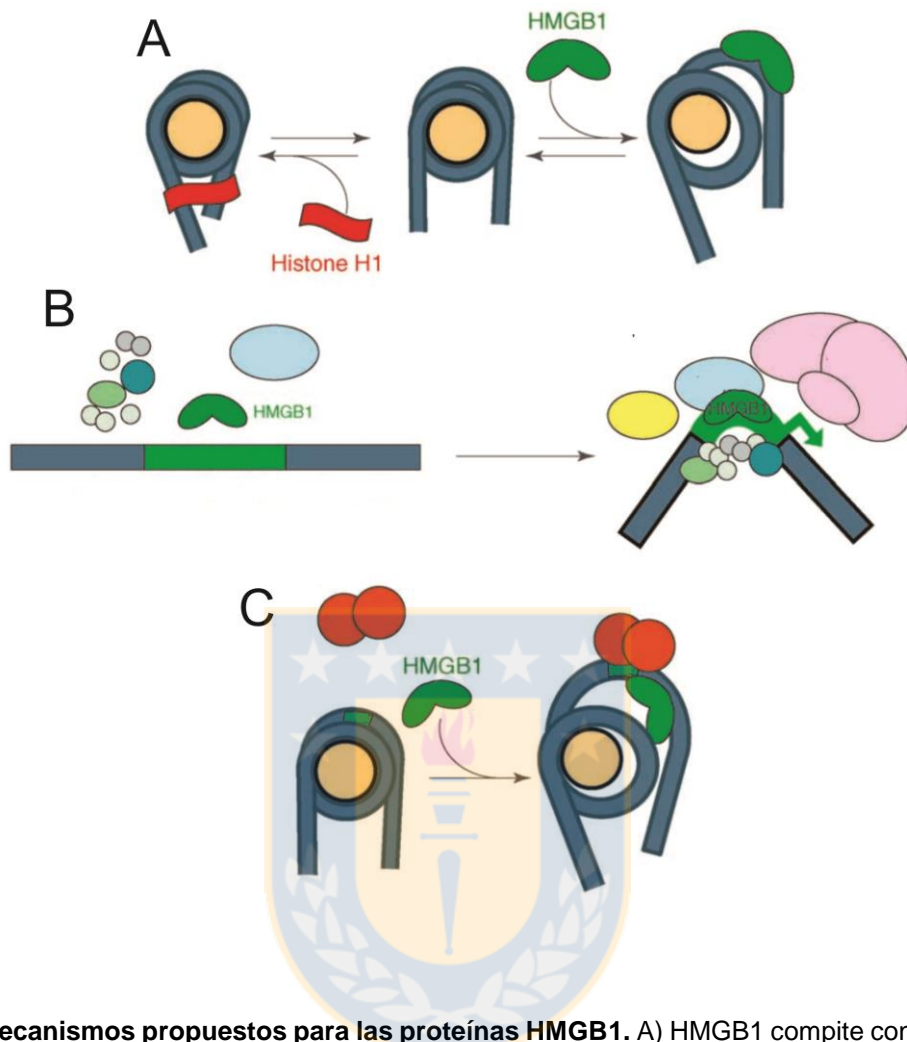
**Figura 2: Representación esquemática del proceso de transcripción en el contexto de la cromatina.** Para que ocurra la transcripción es necesario que proteínas o complejos multiproteicos activadores interactúen con elementos reguladores en la cromatina, llevando a la descondensación de ésta y generando zonas de accesibilidad para factores de transcripción y la maquinaria transcripcional. En el caso contrario proteínas y complejos multiproteicos represores pueden interactuar con sus propios elementos reguladores en la cromatina, llevándola a un estado de mayor condensación, lo que impide la accesibilidad de factores de transcripción y la maquinaria transcripcional a sus respectivos sitios en el ADN. Fuente: Lodish HF, Molecular Cell Biology, 5ª Edición, Capítulo 11, Fig. 11-1.

## 1.2 Proteínas que regulan el estado de la cromatina: HMG

Las proteínas HMG (*High Mobility Group*) pertenecen a un grupo de proteínas no histónicas, muy abundantes en el núcleo. Estas proteínas se caracterizan por poseer una larga cola cargada negativamente en el extremo C-terminal, la cual cumple una función reguladora al modular su interacción con distintas proteínas y el ADN. También se les denomina, “factores de transcripción arquitectónicos”, debido a su interacción con factores de transcripción y otras proteínas, permitiendo la formación de complejos multiproteicos en distintas regiones del genoma. Estas se encuentran de manera

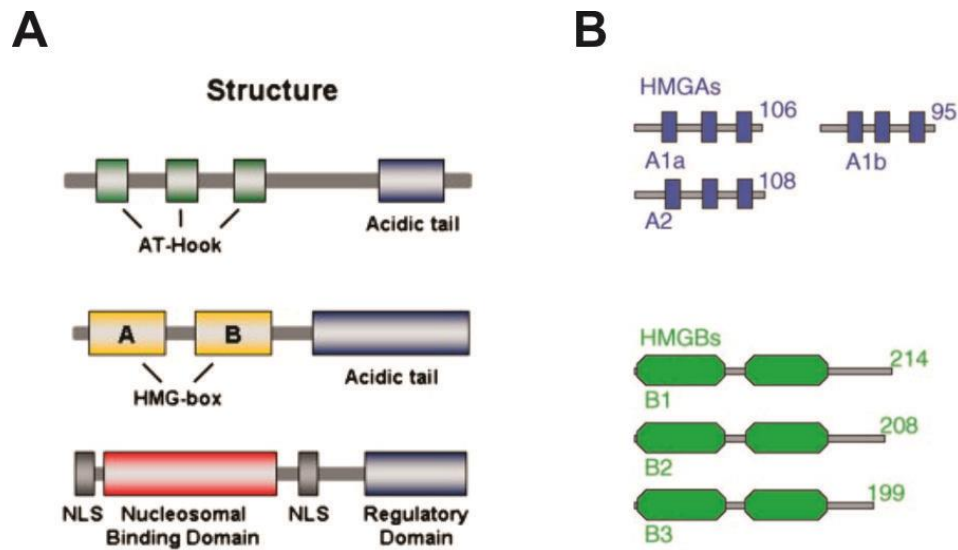
abundante en el núcleo y se ha observado su participación en distintos procesos celulares como la transcripción, replicación y reparación del ADN (Reeves, 2010).

Estas proteínas poseen una gran variedad de acciones que permiten modular la estructura de la cromatina, permitiendo la accesibilidad y el reclutamiento de factores de transcripción y complejos remodeladores de cromatina. Entre sus acciones se encuentran: 1) La capacidad de doblar el ADN al unirse al surco menor de éste. 2) Competir con la histona H1 por sitios de unión similares a la cromatina, generando una descompactación de la cromatina. 3) Interaccionar con el ADN nucleosomal generando un *loop* de éste, lo que conduce a exponer regiones del ADN nucleosomal que se encontraban anteriormente inaccesibles para algunas proteínas (Travers, 2003; Catez *et al.* 2004; Bianchi y Agresti, 2005). En la Figura 3 se muestra una representación esquemática de estas acciones para HMGB1, un miembro de la familia HMGB que ha sido ampliamente estudiado. Existen tres familias de estas proteínas, denominadas: HMGA, HMGB y HMGN, las cuales se diferencian por el motivo de unión al ADN que poseen. Estos motivos de unión son: “*AT-hook*”, “*HMG box*” y “*Nucleosome binding domain*”, respectivamente (Figura 4A) (Reeves, 2010).



**Figura 3: Mecanismos propuestos para las proteínas HMGB1.** A) HMGB1 compite con la histona H1 por sitios de unión similares a la cromatina, generando efectos opuestos. La unión de la histona H1 genera una compactación en la cromatina, por lo tanto, inaccesibilidad para la unión de proteínas al ADN. La unión de HMGB1 contribuye a la descompactación de la cromatina, lo que permite la accesibilidad de proteínas al ADN. B) HMGB1 puede unirse al ADN generando un doblamiento de este, permitiendo la unión de otras proteínas y facilitando procesos como la transcripción. C) HMGB1 puede unirse al ADN nucleosomal generando un *loop*, lo que permitirá la accesibilidad de proteínas con dominios de unión al ADN. Además HMGB1 puede reclutar a proteínas a sus respectivos sitios de unión. Algunos de estos mecanismos pueden extenderse a otras proteínas HMG. Fuente: Modificado de Bianchi y Agresti, 2005.





**Figura 4: Esquema de las proteínas HMGA.** A) En el esquema se puede observar una representación de la estructura de HMGA, HMGB y HMGN, indicando los motivos de unión al ADN: “AT-hook”, “HMG box” y “Nucleosomal Binding Domain”, respectivamente. Además se pueden observar otros elementos comunes en estas proteínas (Catez y Hock, 2010). B) En el esquema se muestran los miembros de la familia HMGA y HMGB, con sus respectivos números de aminoácidos mostrados al lado derecho de cada proteína. En los rectángulos azules se muestran los motivos “AT-hook” presentes en las proteínas HMGA. En los hexágonos verdes se muestran los motivos “HMG box” presentes en las proteínas HMGB. Para HMGA1 se muestran dos isoformas, HMGA1a y HMGA1b, las cuales se muestran una al lado de la otra de manera horizontal. Fuente: Bianchi y Agresti, 2005.

Las proteínas HMGA se caracterizan por poseer tres motivos de unión al ADN llamados “AT-Hook” (Figura 4). Este motivo consiste en repeticiones de residuos prolina-arginina-glicina-arginina-prolina, aunque también incluye residuos de lisina que junto con los residuos de arginina, le dan un carácter positivo al motivo, permitiéndole unirse preferentemente al surco menor del ADN en regiones ricas en AT (Reeves, 2001; Reeves, 2010). Entre las funciones principales de las proteínas HMGA, está coordinar la formación de complejos multiproteicos en regiones regulatorias de genes como los *enhancer* (Enhanceosoma) que contienen secuencias ricas en AT (Sgarra *et al.* 2010). Esta familia a su vez se divide en dos subfamilias HMGA1 y HMGA2, en

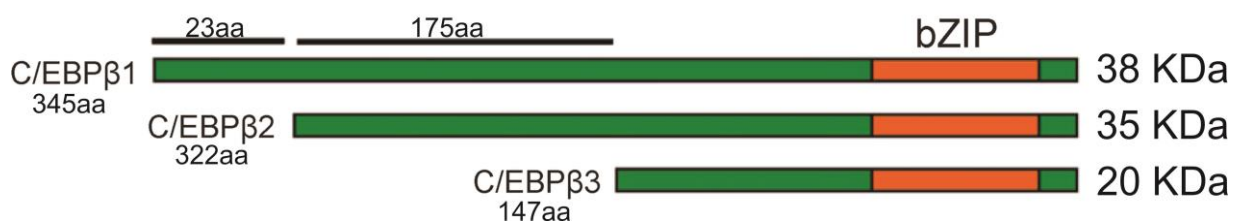
donde HMGA1 posee tres isoformas, HMGA1a (106 residuos; aproximadamente 11.5 KDa), HMGA1b (95 residuos; aproximadamente 10.6 KDa) y HMGA1c (179 residuos; aproximadamente 19.7 KDa), los cuales son producidos por splicing alternativo del ARN mensajero correspondiente al gen HMGA1. La ausencia de 11 aminoácidos en HMGA1b respecto de HMGA1a, tiene como consecuencia que los motivos “AT-Hook” I y II quedan más cercanos en aquella isoforma (Figura 4) (Friedmann *et al.* 1993; Reeves, 2001; Peluso y Chiappetta, 2010). Aunque ambas isoformas sean altamente similares, estudios han demostrado que éstas pueden actuar de diferente manera en procesos celulares (Sumter *et al.* 2016); A modo de ejemplo, Reeves *et al.* (2001) demostraron que al sobreexpresar HMGA1a y HMGA1b en células MCF-7, la sobreexpresión de HMGA1b causa el progreso mucho más rápidamente a un fenotipo maligno que la sobreexpresión de HMGA1a. Además, en éste estudio se realizaron ensayos de microarrays y western blot demostraron un perfil de expresión distinto, lo que demostraba que estas isoformas regulan la expresión de genes diferentes.

Las proteínas HMGB poseen un motivo de unión al ADN llamado “HMG box” (Figura 4), el cual se compone de tres  $\alpha$ -hélices dobladas en “conformación L” que permite unión al surco menor del ADN. Sin embargo, a diferencia de lo observado con la familia HMGA, el motivo HMG box no posee especificidad de secuencia en su unión a ADN (Thomas y Travers, 2001), con excepción en ciertos miembros miembros (Laudet *et al.* 1993; Soullier *et al.* 1999). Se ha observado que este mismo motivo a veces permite interactuar con otras proteínas, formando complejos multiproteicos (Bianchi y Agresti, 2005). Se sabe que las proteínas de esta familia están involucradas en varios procesos como transcripción, replicación y reparación del ADN. Entre las características de proteínas HMGB se ha observado que pueden facilitar el reclutamiento de complejos remodeladores de cromatina que inducen el deslizamiento de nucleosomas (Reeves, 2010) y también pueden mejorar la unión de factores de transcripción a su secuencia consenso (Ueda y Yoshida, 2010).

### 1.3 Factores de transcripción: C/EBP $\beta$

C/EBP (*CCAAT/enhancer-binding protein*), es una familia de proteínas que interaccionan con la secuencia CCAAT en el ADN, que se encuentra en muchos promotores (Saint-Auret *et al.* 2011; Meyer *et al.* 2014). Esta interacción ocurre a través de un dominio llamado bZIP (*Basic Leucine Zipper Domain*) que se caracteriza por la presencia de una región básica de aminoácidos involucrada en la unión al ADN seguido por un motivo de dimerización denominado “*leucine zipper*” (Vinson *et al.* 1989); el dominio se encuentra en el C-terminal de las proteínas C/EBP (Poli *et al.* 1990). Para que exista unión al ADN es prerequisite que ocurra dimerización del dominio (Ramji y Foka, 2002). Existen seis miembros designados con letras griegas (C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , C/EBP $\gamma$ , C/EBP $\delta$ , C/EBP $\epsilon$  y C/EBP $\zeta$ ) según su orden de descubrimiento (Cao *et al.* 1991). Los genes de C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , C/EBP $\gamma$  y C/EBP $\delta$ , no poseen intrones (Poli *et al.* 1990; Roman *et al.* 1990; Cao *et al.* 1991), mientras que C/EBP $\epsilon$  posee dos exones y un intrón, C/EBP $\zeta$  posee cuatro exones (Luethy *et al.* 1990; Williams *et al.* 1991). Algunos de estos miembros poseen más de una isoforma, ya sea por distintos inicios de la traducción o por splicing alternativo, como es el caso de C/EBP $\beta$  y C/EBP $\epsilon$  respectivamente (Ramji y Foka, 2002).

C/EBP $\beta$  está implicado en muchos procesos celulares, como regulación del ciclo celular y diferenciación celular (Nerlov, 2010), en los cuales pueden estar participando cualquiera de sus tres isoformas, que corresponden a C/EBP $\beta$ 1 (LAP\*), C/EBP $\beta$ 2 (LAP) y C/EBP $\beta$ 3 (LIP); de 38 kDa, 35 kDa y 20 kDa, respectivamente (Figura 5). Estas isoformas se generan por la presencia de distintos inicios de la traducción en un único ARN mensajero (Ramji y Foka, 2002).



**Figura 5: Representación esquemática de las isoformas de hC/EBP $\beta$ .** El dominio bZip (mostrado en naranja), comprende el motivo cierre de leucina adyacente a la región básica de unión al ADN. El dominio de transactivación (198 aminoácidos), presente en la región N-terminal, se pierde en C/EBP $\beta$ 3. Fuente: Modificado de Nerlov, 2010.

Se ha encontrado que estas isoformas participan de distinta manera regulando los procesos anteriormente mencionados, en donde C/EBP $\beta$ 1 y C/EBP $\beta$ 2 se les ha asociado una actividad tanto activadora como represora de la transcripción, junto con participar en procesos de diferenciación celular (Nerlov, 2010). Por su parte, C/EBP $\beta$ 3 ha sido asociado mayoritariamente con actividad represora de la transcripción, debido a que este pierde completamente el dominio de transactivación (Kowenz-Leutz y Leutz, 1999). A esta isoforma se la ha asociado con participar en procesos de progresión del ciclo celular, así como también C/EBP $\beta$ 2 (Nerlov, 2010).

Una de las funciones más características de C/EBP $\beta$ , es la regulación de genes en tejidos de respuesta a insulina, en donde se ha observado que insulina puede alterar la expresión de las isoformas de C/EBP $\beta$  conduciendo a cambios en la expresión de sus genes blancos. Específicamente en células 3T3-L1, se ha observado que insulina aumenta la expresión de todas las isoformas de C/EBP $\beta$  (McDougald *et al.* 1995; Du y Ding, 2009). Para el caso de líneas celulares de hepatoma como H4IIE, se ha observado que en respuesta a insulina se expresa predominantemente C/EBP $\beta$ 3 (Duong *et al.* 2002). Por otro lado, también se ha observado que insulina puede alterar la transactivación de las isoformas largas, al alterar la interacción con proteínas activadoras (Guo *et al.* 2001). En células HepG2, en respuesta a insulina se activa la vía mTOR (Khamzina *et al.* 2005), lo que puede explicar el aumento en la expresión

de C/EBP $\beta$ 3, ya que se ha demostrado que la activación de esta vía conduce a un aumento en los niveles de esta isoforma (Calkhoven *et al.* 2000).

También se ha descrito que C/EBP $\beta$  puede participar en la progresión maligna de células mamarias, en cuyo caso principalmente se encuentra sobreexpresado C/EBP $\beta$ 3. Se ha correlacionado la sobreactivación del receptor HER2 con la sobreexpresión de esta isoforma, proceso que ocurre a través de la vía mTOR (Arnal-Estapé *et al.* 2010). Posteriormente se determinó en la línea celular MCF-7, que usando un ligando para el receptor HER2, se puede activar la vía que conduce a un aumento en los niveles de C/EBP $\beta$ 3. El ligando usado fue heregulin (Park *et al.* 2013). Por otro lado se tiene conocimiento que TGF- $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* ) tiene un efecto anti tumoral, en parte al regular a C/EBP $\beta$ , específicamente al favorecer la expresión de la isoformas largas (Scott *et al.* 2013).

#### **1.4 Interconexión entre C/EBP $\beta$ y HMGs**

Existen estudios que relacionan a las proteínas HMG con el factor de transcripción C/EBP $\beta$ . Se ha demostrado que HMGA1 puede interaccionar física y funcionalmente con C/EBP $\beta$ ; en el primer caso, en la formación de un complejo estable entre HMGA1, C/EBP $\beta$  y Sp1 en el promotor del gen del receptor de insulina, donde la unión de HMGA1 es necesaria para el reclutamiento de los otros factores al promotor, lo que lleva a la transactivación del gen (Foti *et al.* 2003); en el segundo caso al participar en la adipogénesis y diferenciación a adipocitos, lo se debería a que HMGA1 interaccionaría con retinoblastoma (RB) y cooperaría con C/EBP $\beta$  en la regulación de los genes *Id1* y *leptina* (Melillo *et al.* 2001; Esposito *et al.* 2009). Sin embargo, en todos los estudios realizados no se ha tomado en cuenta la interacción diferencial entre las isoformas de C/EBP $\beta$  y las proteínas HMGA1. Tampoco se ha descrito interacción de C/EBP $\beta$  con otras proteínas HMG, aunque se ha identificado que C/EBP $\beta$ 1 podría poseer un motivo de interacción con HMGB1 (Dintilhac y Bernués, 2002) y además se

ha descrito, en estudios separados, que tanto C/EBP $\beta$  como HMGB1 pueden regular al gen de ciclina D1 (Steinberg *et al.* 2012; Feng *et al.* 2014).

Estudiar la interacción diferencial de estas proteínas es de suma importancia para relacionarlas con funciones o patologías observadas, donde éstas se encuentran implicadas. Por ejemplo, se ha observado que HMGA1 y HMGB1 pueden estar implicados en muchos procesos malignos, y ambos ya son considerados como posibles biomarcadores para detectar estas patologías (Fedele y Fusco, 2010; Tang *et al.* 2010). También se ha observado que la expresión diferencial de las isoformas de C/EBP $\beta$  puede estar relacionada con progresión tumoral, donde generalmente la expresión preferencialmente de C/EBP $\beta$ 2 o C/EBP $\beta$ 3 es la que conduce a esta patología (Arnal-Estapé *et al.* 2010). Estudios preliminares de interacción proteína-proteína, a través de ensayos de GST pull-down asociado a espectrometría de masas realizadas en el Laboratorio de Regulación Transcripcional de la Universidad de Concepción, sugieren que existe interacción diferencial de las isoformas de hC/EBP $\beta$  con HMGA1a, HMGA1b, HMGB1 e histona H1. En los datos contenidos en la Tabla 1, al comparar los valores de "Spectral count" se puede observar que las isoformas largas de hC/EBP $\beta$  interaccionan preferentemente con las proteínas HMG, mientras que hC/EBP $\beta$ 3 interacciona preferencialmente con la histona H1. Estos resultados coincidirían con el hecho de que tanto las proteínas HMG como las isoformas largas de C/EBP $\beta$  actúan usualmente como activadores transcripcionales, mientras que C/EBP $\beta$ 3 y la histona H1 son considerados usualmente como represores transcripcionales (Nerlov, 2010; Reeves, 2010).

En el presente trabajo de tesis se estudió la interacción diferencial de las isoformas de C/EBP $\beta$  con las proteínas HMGA1a, HMGA1b, HMGB1 e histona H1; junto con estudiar el efecto de estas interacciones en la unión al ADN de estas proteínas, en ensayos *in vitro* y en promotores de genes blancos seleccionados. Además se estudió el efecto de las distintas isoformas de C/EBP $\beta$  sobre los niveles de mensajero de genes blanco seleccionados.

**Tabla 1: Detección de proteínas que interaccionan con C/EBP $\beta$  mediante análisis de espectrometría de masas, MudPIT (*Multidimensional Protein Identification Technology*).**

Protein	Protein ID	C/EBP $\beta$ 1			C/EBP $\beta$ 2			C/EBP $\beta$ 3			GST		
		P	S	SC	P	S	SC	P	S	SC	P	S	SC
H1.2 histone	005310.1	7	15	27,7	6	13	20,66	7	60	20,66	4	10	15,96
HMGA1a	665911.1	3	16	41,12	3	7	41,12	1	4	14,95	1	5	14,95
HMGA1b	665912.1	2	17	34,38	2	6	34,38	0	0	0	1	1	14,58
HMGB1	002119.1	4	10	20	0	0	0	0	0	0	1	1	6,05

Se realizó GST pull-down con cada isoforma de C/EBP $\beta$ , usando un extracto nuclear de células HeLa. Una vez realizado el experimento, se envió a espectrometría de masas para su análisis. P: (*Peptide count*) número de péptidos diferentes correspondientes a una proteína dada. S: (*Spectral count*) número total de eventos de detección de péptidos correspondientes a una proteína dada. SC: (*Sequence Coverage*) porcentaje de la secuencia proteica cubierta por los péptidos detectados en el análisis. Fuente: Elaboración propia.



## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.**

### **2.1 Hipótesis:**

Tanto HMGA1, HMGB1 como histona H1, interaccionan de manera diferencial con las isoformas de hC/EBP $\beta$ , lo que implica diferencias en la regulación de la expresión de genes blancos de este factor.

### **2.2 Objetivo general:**

Analizar la interacción física de las isoformas de hC/EBP $\beta$  con proteínas HMGA1, HMGB1 e histona H1, y los efectos funcionales asociados a las respectivas interacciones.

### **2.3 Objetivos específicos:**

- Confirmar la existencia de interacción física de las distintas isoformas de hC/EBP $\beta$  con HMGA1, HMGB1 e histona H1, definiendo si estas interacciones se dan de manera diferencial entre las distintas isoformas.
- Determinar genes blancos comunes para hC/EBP $\beta$  y HMGA1 por un lado, y hC/EBP $\beta$  y HMGB1 por otro.
- Determinar la presencia física de HMGA1 y HMGB1, en los promotores de los genes seleccionados en función de la presencia de las isoformas de hC/EBP $\beta$ .



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

#### 3.1 Transformación de bacterias competentes

Se utilizaron bacterias de cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  para obtención de plásmidos y BL-21 *codon plus* para la expresión de proteínas recombinantes (Carstens *et al.* 2001). Se tomaron por separado 100 $\mu$ l de bacterias CaCl<sub>2</sub> competentes y se agregaron entre 10 y 100ng del ADN de interés, dependiendo del ensayo. 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 $\mu$ 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 $\mu$ l, en los que se resuspendió el pellet de células. Éste se sembró en placas con medio de cultivo sólido (agar-LB-ampicilina 100ng/ $\mu$ l) y se dejó entre 12 y 16 horas de incubación en estufa a 37°C.

#### 3.2 Expresión y purificación de las isoformas de hC/EBP $\beta$ en fusión a GST

Una colonia positiva de bacterias transformadas con plásmido pGEX-4T-1\_hC/EBP $\beta$ 1, pGEX-4T-1\_hC/EBP $\beta$ 2, pGEX-4T-1\_hC/EBP $\beta$ 3 o pGEX-4T-1 (ver sección 1, Materiales y Métodos), se cultivó en 5ml de medio LB-ampicilina (100ng/ $\mu$ l), incubando entre 12 a 16 horas a 37°C con agitación constante. Luego, 3ml del cultivo se traspasaron a 300ml de medio LB-ampicilina (100ng/ $\mu$ l) y se incubó a 28°C con agitación constante, hasta alcanzar una O.D.<sub>600</sub> entre 0.6 a 0.8, para luego inducir con isopropil  $\beta$ -D1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 100 $\mu$ 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 15ml de PBS 1x frío (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + inhibidores de proteasas (0.5mM

PMSF, 7µg/ml TPCK, 10µg/ml inhibidor de Tripsina, 5µg/ml Leupeptin, 1µg/ml pepstatin A), y se sonicó con 5 pulsos de 20 segundos a 30 watts de potencia, teniendo en cuenta 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 200µl de resina glutathione sepharose 4B (GE Healthcare) (previamente equilibrada con PBS 1x + inhibidores de proteasas), por 1 hora en rotación a temperatura ambiente, para luego ser traspasada a una columna BioRad, donde se dejó escurrir. Posteriormente la resina fue lavada en la columna con PBS 1x frío + inhibidores de proteasas, y a continuación, la resina fue traspasada a un tubo de 1.5ml para ser lavada tres veces en *batch* con 2 volúmenes (volumen de resina) de Buffer de lavado (5mM Glutación, 50mM Tris-HCl pH 8.0, 120mM NaCl) + inhibidores de proteasas, en cada lavado se incubó por 10 minutos en rotor a temperatura ambiente. Luego la resina (con la proteína de fusión unida) fue lavada con PBS 1x frío + inhibidores de proteasas, y enseguida fue guardada a 4°C, dejando la resina al 25% (p/v) en esta solución. Para el caso de GST, se pasó por alto toda la etapa de los lavados con Glutación.

El análisis de las resinas que contienen las proteínas recombinantes y las cuantificaciones fueron realizados a través de electroforesis en gel de poliacrilamida denaturante SDS-PAGE (Raymond y Weintraub, 1959) al 12% y su posterior tinción con azul de coomassie (ver sección 4, Materiales y Métodos). En el caso de las cuantificaciones, en las electroforesis se incluyó una curva de calibración con cantidades conocidas de Albúmina de Suero Bovino (BSA) (BioRad) y se cuantificó por densitometría usando el programa UN-SCAN-IT gel 6.1.

### **3.3 Expresión y purificación de hHMGA1 y hHMGB1**

Una colonia positiva de bacterias transformadas con plásmido pQE-80L-hHMGA1a, pQE-80L-hHMGA1b o pQE-80L-hHMGB1 (ver sección 1, Materiales y Métodos) se

cultivó en 5ml de medio LB-ampicilina (100ng/μl), incubando entre 12 a 16 horas a 37°C, con agitación constante. Luego 3ml del cultivo se traspasaron a 300ml de medio LB-ampicilina (100ng/μl) y se incubó a 28°C con agitación constante (a 16°C para el caso de HMGB1), hasta alcanzar una O.D.<sub>600</sub> entre 0.6 a 0.8, para luego inducir con IPTG a una concentración final de 200μM por 2 horas a 28°C (por 3 horas a 16°C para el caso de HMGB1), con agitación constante. Luego el cultivo fue centrifugado a 7.700xg por 10 minutos a 4°C y el pellet fue resuspendido en 15ml de Buffer de lisis frío (300mM NaCl, 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20mM Imidazol) + 5mM DTT + 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 200μl 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. Posteriormente la resina fue lavada en la columna con 4 volúmenes (volumen de resina) de Buffer de lavado frío (300mM NaCl, 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 1mM DTT + inhibidores de proteasas, conteniendo concentraciones de entre 20mM a 50mM de Imidazol. Luego se procedió a eluir la proteína con Buffer de elución frío (300mM NaCl, 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 1mM DTT + inhibidores de proteasas, conteniendo concentraciones de entre 60mM a 150mM de Imidazol.

Las distintas eluciones fueron recolectadas y se les adicionó glicerol para dejar al 15% concentración final. A continuación, las eluciones fueron concentradas usando el sistema Microcon (10.000 MWCO, MILLIPORE), siguiendo las indicaciones del fabricante. El análisis de las purificaciones y las cuantificaciones fueron realizados a través de electroforesis en gel de poliacrilamida denaturante SDS-PAGE (Raymond y Weintraub, 1959) al 12% y su posterior tinción con azul de coomassie (ver sección 4, Materiales y Métodos). En el caso de las cuantificaciones se incluyó en las electroforesis una curva de calibración con cantidades conocidas de Albúmina de

Suero Bovino (BSA) y luego las concentraciones de las proteínas recombinantes fueron calculadas por densitometría usando el programa UN-SCAN-IT gel 6.1.

### **3.4 Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)**

Las proteínas recombinantes se desnaturalizaron con adición en frío de 0.2 volúmenes de Buffer 6x de carga [300mM Tris-HCl pH 6.5, 600mM DTT, 12% dodecilsulfato sódico (SDS), 0.3% azul de bromofenol y 30% Glicerol] 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 100V, aproximadamente por 30 minutos y luego a 150V hasta finalizar la corrida, utilizando un Buffer de corrida (25mM Tris-HCl, 192mM Glicina, 0.1% SDS). El gel se fijó y tiñó durante toda la noche en solución colorante azul de coomassie (50% Metanol, 10% Ácido acético, 0.05% Azul de coomassie), luego se trató por 45 minutos con solución fijadora (50% Metanol, 10% Ácido acético) y acto seguido se decoloró por al menos 1 hora con solución decolorante (5% Metanol, 7% Ácido acético). Finalmente se realizaron varios lavados con agua *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.

### **3.5 Western blot**

Luego de ser sometidas a SDS-PAGE (ver sección 4, Materiales y Métodos), las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (previamente tratada con metanol) (Immobilon-P, MILLIPORE) en Buffer de transferencia (192mM glicina, 25mM Tris-HCl, 0.1% SDS, 20% metanol) a un amperaje constante de 250mA durante 2 horas. Posteriormente se incubó con anticuerpos específicos, adicionados en una

solución de PBS 1X + 0.05% Tween 20 a 4°C durante toda la noche. Luego se hicieron lavados sucesivos de 10 minutos con una solución PBS 1X + 0.05% Tween 20. 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 + 0.05% Tween 20 durante 1 hora a temperatura ambiente. Seguidamente la membrana se lavó con una solución de PBS 1X + 0.05% Tween 20, 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.

### **3.6 Obtención de extracto nuclear**

Se tomaron 16 placas de 100mm con células HeLa (entre 90 y 100% de confluencia) cultivadas en medio DMEM alto en glucosa HyClone (4500mg/L Glucosa) + 2mM L-Glutamina + 10% (v/v) Suero de bovino fetal + 50U/ml Penicilina/Estreptomicina y se lavaron con PBS 1x frío + inhibidores de proteasas para desprender células muertas y restos de medio de cultivo. A continuación se agregó 10ml de PBS 1x frío y se desprendieron las células con un "Scraper" (TrueLine), pasándolas luego a un tubo de 50ml. Se centrifugaron las células a 1.500rpm por 5 minutos a 4°C y luego se retiró el sobrenadante para resuspender el pellet en 10ml de PBS 1x frío y volver a centrifugar a 1.500rpm por 5 minutos a 4°C. Posteriormente se resuspendió el pellet en 5 volúmenes de Buffer A (10mM HEPES pH 7.8, 10mM KCl, 0.2mM EDTA pH 8.0) + 1mM DTT + inhibidores de proteasas y se incubó en hielo por 10 minutos. Se transfirió la suspensión celular a un homogenizador "Dounce" y se lisó las células con 20 golpes usando el bastón "A" (tight), todo el procedimiento se realizó en hielo. Luego se transfirió el lisado celular a un tubo de 15ml y se centrifugó a 3.000rpm por 5 minutos a 4°C. En el pellet queda la fracción nuclear, a la cual se le agregó 5 volúmenes de Buffer A, se resuspendió y se centrifugó a 9.000rpm por 18 minutos a 4°C, retirándose

luego el sobrenadante. A continuación se resuspendió el pellet en 1 volumen de Buffer C (20mM HEPES pH 7.8, 420mM KCl, 0.2mM EDTA pH 8.0, 25% Glicerol) + 1mM DTT + inhibidores de proteasas y se incubó en rotación constante por 1 hora a 4°C. Por último se centrifugó a 10.000rpm por 30 minutos a 4°C y el sobrenadante se alicuotó y se guardó a -80°C.

La cuantificación de los extractos nucleares se realizó por el método de Bradford (Bio-Rad, Protein Assay). Para ello se realizó una curva de calibración con distintas concentraciones de Albúmina de Suero Bovino (BSA) y se cuantificó 1ul de extracto nuclear, siguiendo las indicaciones del fabricante. Para este procedimiento se midió la absorbancia a 595nm, usando un espectrofotómetro SmartSpec Plus de Bio-RAD.

### 3.7 GST pull-down

En las reacciones se usaron aproximadamente 2µg (10µl volumen seco de resina) de la proteína recombinante GST-hC/EBPβ1 y cantidades equimolares de GST-hC/EBPβ2, GST-hC/EBPβ3 y GST, completándose a 10µl de resina (volumen seco) con resina previamente equilibrada en PBS 1x. Cada una de éstas fue equilibrada con Buffer PDB-100 (20mM HEPES pH 7.9, 0.1% Tween-20, 100mM NaCl, 10% Glicerol, 1mM EDTA) + 1mM DTT + inhibidores de proteasas y dejada al 25% hasta el momento de su uso. En el ensayo para detectar interacción con histona H1, se usó 50µg de extracto nuclear de células HeLa (aproximadamente 10µl), el cual fue pre-aclarado con 10µl de resina glutathione sepharose 4b (previamente equilibrada con PBS 1x) y Buffer PDB-P (aproximadamente 40µl) (20mM HEPES pH 7.9, 0.1% Tween-20, 7% Glicerol, 1mM EDTA) + 1mM DTT + inhibidores de proteasas, con incubación en rotación por 2 horas a 4°C. Posteriormente el extracto pre-aclarado fue mezclado con cada isoforma de C/EBPβ por separado o GST, y se incubó en rotación por 2 horas a 4°C. Luego de la incubación se retiró el extracto no unido, y se lavó tres veces la resina con 20 volúmenes (volumen de resina) de Buffer PDB-200 (20mM HEPES pH 7.9, 0.1%

Tween-20, 200mM NaCl, 10% Glicerol, 1mM EDTA) + 1mM DTT + inhibidores de proteasas, sin incubación. A continuación la resina de cada reacción se resuspendió en Buffer de carga 1x y fue sometida a electroforesis en gel de poliacrilamida denaturante (SDS-PAGE) al 15% (ver sección 4, Materiales y Métodos) y posteriormente a western blot (ver sección 5, Materiales y Métodos), donde se detectó usando un anticuerpo contra H1.2 (Abcam).

Para las proteínas hHMGA1a, hHMGA1b y hHMGB1, se usaron aproximadamente 160ng de proteína purificada, y se siguió la misma metodología usada para histona H1; sólo se cambió la composición del Buffer PDB-P (100mM NaCl, 7.5% Glicerol). A continuación la resina de cada reacción fue sometida a SDS-PAGE al 12% (ver sección 4, Materiales y Métodos) y posteriormente a western blot (ver sección 5, Materiales y Métodos), donde se detectó usando un anticuerpo dirigido al epítipo 6xHis (Clontech).

### **3.8 Selección de genes blancos**

Se buscaron genes blancos comunes para C/EBP $\beta$  y HMGA1. Separadamente, se buscó blancos comunes para C/EBP $\beta$  y HMGB1. Para ambos casos se buscaron experimentos de análisis masivos de CHIP-seq o CHIP-on-chip para estos factores, encontrándose información en bases de datos solamente para C/EBP $\beta$ . Para este caso se analizaron tres bases de datos, dos de ellas pertenecientes a la base datos de GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) para las líneas celulares HepG2 (GSM1010778) y MCF-7 (GSM1010889), y la otra presente en una publicación de los autores Saint-Auret *et al.* (2011), en la cual usaron la línea celular Hep3B. En este último caso la data ya se encontraba anotada y además se relaciona con una data de RNA-seq para cada isoforma de C/EBP $\beta$ . Para los casos de la data extraída de la base de datos de GEO, todo el procesamiento general, incluido el protocolo usado para realizar el experimento, la verificación de la data y la determinación de los peaks con respecto a los controles, se explica en la misma página (<http://genome.ucsc.edu/cgi->

bin/hgTrackUi?db=hg19&g=wgEncodeHaibTfbs). Solo hubo que anotar la data y dejarla en un formato apto para visualizar en el programa IGV 2.3 (archivo .bed), trabajo que se realizó mediante el uso de la plataforma Galaxy (<https://usegalaxy.org/>).

Para el caso de HMGA1 y HMGB1, solo se buscó por literatura genes blancos de estos, ya sea donde se demuestre unión o cambios en la expresión del gen. Para el caso de HMGB1 solamente se encontraron genes blanco comunes con C/EBP $\beta$  en estudios de expresión, ya que HMGB1 no presenta secuencia consenso de unión, por lo que es más difícil encontrar análisis de ChIP en algún gen; los pocos que se encontraron no coincidieron con los blancos de C/EBP $\beta$ . Cabe mencionar que para C/EBP $\beta$  también se buscó por literatura, para disponer de validación en los casos que fuera posible.

Para todos los casos (excepto HMGB1) se realizaron análisis bioinformáticos (TRANSFACT, <http://gene-regulation.com/>), para buscar posibles sitios de unión para C/EBP $\beta$  y para HMGA1 en los genes seleccionados.

### **3.9 Cultivo celular**

Células HepG2 fueron cultivadas en placas de 100mm con medio DMEM bajo en glucosa (1000mg/L Glucosa, 4mM L-Glutamina) + 10% Suero fetal bovino + 50U/ml Penicilina-Estreptomicina. Se incubaron con 5% CO<sub>2</sub> a 37°C y se expandieron tras tratamiento con tripsina al llegar a 100% confluencia en estas placas.

#### **3.9.1 Transfección celular**

En la preparación de cultivos para transfección las células fueron expandidas a placas de 12 pocillos (para análisis de ARN mensajero). Para sembrar células en estas placas, estas fueron removidas de placas en las que previamente se cultivaron usando



tratamiento con tripsina y se centrifugaron a 800rpm por 5min a 4°C, para remover el medio con tripsina. A continuación las células se resuspendieron en una solución con medio DMEM bajo en glucosa completo y enseguida se agregó 1ml (aproximadamente 80.000 células/ml) de dicha mezcla en cada pocillo de una placa de 12, con el objetivo de que tras 18 horas de incubación la confluencia aproximada fuera entre 50-60%.

Una vez confirmada la densidad poblacional esperada se cambió el medio a todos los pocillos, lavándolos 1 vez con PBS 1x, y luego se procedió con el protocolo de transfección. Para evaluar funcionalmente *in vitro* la actividad que ejercen las isoformas de hC/EBP $\beta$  sobre distintos genes seleccionados, células HepG2 (hepatoma humano) se transfectaron transientemente con un vector que contenía la secuencia codificante de alguna de las tres isoformas de hC/EBP $\beta$  o con el vector parental vacío (pcDNA3.1HisC) (ver sección 16, Materiales y Métodos). Las transfecciones se realizaron utilizando el reactivo vehículo *TransIT*<sup>®</sup>-LT1 (Mirus), siguiendo las instrucciones del fabricante; se usó una relación 1:4 (ADN: Vehículo), donde la cantidad total de ADN (1 $\mu$ g) se mantuvo constante para las distintas transfecciones de cada ensayo. A las aproximadamente 40 horas de incubación post transfección las células fueron preparadas para la extracción de ARN total o el análisis de las proteínas nucleares.

Para placas de 100mm se escalaron todos los volúmenes, manteniendo el protocolo.

### **3.10 Purificación y cuantificación de ARN**

Posterior a aproximadamente 40 horas de realizadas las transfecciones en las placas de 12 pocillos, se llevó a cabo la extracción y purificación del ARN total de las células. Esto se realizó usando el kit *Quick-RNA*<sup>™</sup> MiniPrep (ZYMO RESEARCH #R1054), siguiendo las instrucciones del fabricante. El análisis de la purificación se observó por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% en buffer TAE durante 45 minutos a 60V.

Una vez verificada la pureza de ésta, se realizó la medición del ARN total por espectrofotometría (SmartSpec™ Plus), usando una relación de 1 unidad de absorbancia equivalente a 40µg/ml de ARN. Una segunda medición se realizó en el equipo The Qubit® 2.0 Fluorometer (INVITROGEN), instrumento que cuantifica ADN, ARN y proteínas. Para medir ARN fue necesario utilizar el kit Qubit® RNA HS Assay Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **3.11 Análisis de proteínas nucleares**

Para analizar las proteínas nucleares provenientes de un cultivo de células HepG2 transfectadas (placa de 12 posillos) con cada isoforma de hC/EBPβ, el primer paso fue eliminar el medio de cultivo desde la placa y se lavaron las células con 500µl de PBS 1x en hielo. Las células se recolectaron de forma mecánica en PBS1x, usando un “Scraper” (TrueLine) y se depositaron en un microtubo de 1.5ml. A continuación se centrifugó a 5.000rpm por 5 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante. El pellet de células se lavó dos veces con 1ml de PBS 1x frío. Se añadieron 5 volúmenes de Buffer de extracción I (10mM HEPES pH 7.9, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM KCl, 1% NP-40) + inhibidores de proteasas + 1mM DTT, homogenizando con el uso de vortex y pipeteo por 10 segundos. Se incubó en hielo por 10 minutos con agitación intermitente en vortex. Luego se centrifugó a 5.000rpm por 5 minutos para precipitar los núcleos y eliminar el extracto citoplasmático (sobrenadante). Los núcleos se resuspendieron en 10 volúmenes de Buffer de carga 1X y se cargaron en un gel para SDS-PAGE al 12% (ver sección 4, Materiales y Métodos) y posteriormente se sometió a western blot (ver sección 5, Materiales y Métodos) utilizando un anticuerpo dirigido contra C/EBPβ (C-19, Santa Cruz Biotechnology).

## 3.12 Determinación de niveles de ARN mensajero

### 3.12.1 Síntesis de ADNc

Se utilizó 2µg de ARN total (sección 10, Materiales y Métodos) de cada set de muestras para la realización de la reacción de transcripción reversa (RT). El ARN total se mezcló con 0.5µg de Anchored Oligo (dT)<sub>20</sub> Primer (Invitrogen) completando con agua comercial libre de RNasa (ZYMO RESEARCH) a volumen final de 22µl. Esta mezcla se incubó a 70°C durante 5 minutos para permitir el desplegamiento de la estructura secundaria de las moléculas de ARN, transfiriendo el tubo inmediatamente sobre hielo. Luego se le agregó a la mezcla 8µl de solución tampón M-MLV RT 5X Buffer (Promega), 0.8µl de una solución que contiene los 4 dNTPs a 10mM cada uno (Promega), y se completó a volumen de 39µl con agua libre de RNasa. Luego se agregó 1µl (200 U/µl) de transcriptasa reversa M-MLV (Promega), incubando la reacción durante 1 hora a 42°C. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su uso en reacciones de PCR.

### 3.12.2 PCR tiempo real

Las muestras de ADNc obtenidas fueron analizadas por PCR en tiempo real utilizando el kit Brilliant III Ultra-Fast SYBR<sup>®</sup> Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies). Para ello se usó 0.5µl de ADNc, 5µl de 2X Brilliant III SYBR<sup>®</sup> Green QPCR Master Mix, 0.15µl de Reference Dye ROX (2µM), 1µl de una solución que contiene ambos partidores a una concentración de 5µM cada uno y se completó con agua *nanopure* hasta llegar a un volumen de 10µl. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Stratagene Mx3000p (Agilent Technologies). Los niveles de ARNm fueron determinados usando una curva estándar para cada set de partidores. Como gen de referencia se usó el gen *HPRT1* (Chua *et al.* 2011), luego de determinar los genes de referencia que variaban menos al transfectar con cada isoforma de hC/EBPβ.

En la Tabla 2 se muestran todos los sets de partidores usados para los análisis de ARNm y en la Tabla 3 se muestra el programa usado en el termociclador para todos los genes.

**Tabla 2: Sets de partidores usados para medir niveles de ARNm.**

<b>Genes</b>	<b>Partidores</b>
<b>HPRT1</b>	F:5'CCAGTCAACAGGGGACATAA3' R:5'CTTGCGACCTTGACCATCTT3'
<b>BRCA2</b>	F:5'AGTGGCGACCAGAATCCAAATCAG3' R:5'CCACTTGGGATCATTGTCATGCAG3'
<b>ALB</b>	F:5'GCATGGGCAGTAGCTCGCCTG3' R:5'CTTGGCAAGGTCCGCCCTGT3'
<b>CCND1</b>	F:5'CTGTGCTGCGAAGTGGAAACCAT3' R:5'TTCATGGCCAGCGGGAAGACCTC3'
<b>ERBB2</b>	F:5'TGTCAACTGCAGCCAGTTCCTT3' R:5'GTCCAAAACAGGTCACTGAGCCAT3'
<b>INSR</b>	F:5'GACCTGGTCTCCACCATTG3' R:5'CACCAGTGCCTGAAGAGGTT3'
<b>SMAD6</b>	F:5'AATCTCCGCCACCTCCCTACT3' R:5'GGAGACATGCTGGCGTCTGAGAAT3'
<b>STAT3</b>	F:5'AATACCATTGACCTGCCGATGTCC3' R:5'GTCGTATCTTTCTGCAGCTTCCGT3'
<b>CFLAR</b>	F:5'GTGGAATTCAAGGCTCAGAAGCGA3' R:5'TGAAGATCCAGGAGTGGGCGTTTT3'
<b>PCNA</b>	F:5'TAAGGGCCGAAGATAACGCGGATA3' R:5'ACGTGCAAATTCACCAGAAGGCAT3'
<b>FGA</b>	F:5'GGCTGCAGGATGAAAGGGTTGATT3' R:5'CCTCTGACACTCGGTTGTAGGTAT3'

Se muestran todos los genes seleccionados con sus respectivos sets de partidores para medir los niveles de ARNm. Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 3: Programa usado en la PCR en tiempo real.**

Programa qPCR		
Tiempo	Temperatura	Ciclos
3 minutos	95°C	1
30 segundos	95°C	40
30 segundos	60°C	
30 segundos	95°C	1
30 segundos	55°C	
30 segundos	95°C	

Se muestran todas las etapas presentes en la qPCR, mostrando el tiempo, la temperatura y el número de ciclos. Fuente: Elaboración propia.

### **3.13 Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)**

#### **3.13.1 Obtención de extractos nucleares**

Las placas de cultivo celular de 100mm se colocaron en hielo y se lavaron las células dos veces con PBS 1X frío. Luego se realizó el entrecruzamiento con formaldehído al 1% en PBS por 10 minutos a temperatura ambiente con agitación suave (5ml por placa de 100 mm). Posteriormente se adicionó glicina a una concentración final de 0.125M y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Las células se lavaron dos veces con PBS 1x frío y se colectaron en 5ml total de PBS 1X por condición con inhibidores de proteasas. Se centrifugó a 4°C por 5 minutos a 300xg y el pellet se resuspendió en Buffer de Lisis (50mM Hepes pH 7.8, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 20mM de KCl, 0.1% NP-40) + inhibidores de proteasas (1ml por placa de 100mm). Luego de 10 minutos de incubación en hielo se homogenizó la muestra con un homogenizador Dounce (20 golpes bastón tight), manteniendo en hielo durante el proceso, y se centrifugó a 180xg por 5 minutos a 4°C, para obtener los núcleos. Estos últimos se resuspendieron en Buffer de Sonicación (50mM Hepes pH 7.9, 140mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% desoxicolato de sodio, 0.1% SDS) con inhibidores de proteasas (0.3ml por

placa de 100mm). La mezcla se sonicó a una potencia de 20% (6-9 Watt) durante 4 minutos y 30 segundos (18 pulsos) con pulsos de 15 segundos más 20 segundos de descanso en hielo. Finalmente se centrifugó por 15 minutos a velocidad máxima y el sobrenadante se congeló en Nitrógeno líquido y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Para analizar el tamaño de la cromatina resultante de la sonicación se tomaron 10 $\mu\text{l}$  y se llevó a 100 $\mu\text{l}$  en Buffer de Elución (50mM  $\text{NaHCO}_3$ , 1% SDS), se revirtió el entrecruzamiento (ver sección 13.2, Materiales y Métodos) y se tomaron 25 $\mu\text{l}$  para analizar por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

### **3.13.2 Inmunoprecipitación**

En el primer día de esta etapa se cuantificaron los extractos nucleares a una absorbancia de 260nm y se utilizaron 20 $\mu\text{g}$  de cromatina (estimado como ADN) para cada reacción de inmunoprecipitación. Se tomó la cantidad necesaria de extracto nuclear en cada caso y se completó a 150 $\mu\text{l}$  con buffer de Sonicación + inhibidores de proteasas, al Input no se le agregó Buffer de Sonicación. Seguidamente, se realizó el preaclaramiento de los extractos nucleares agregando 10 $\mu\text{l}$  de proteína A/G plus-agarosa (Santa Cruz Biotechnology) + 1 $\mu\text{g}$  de IgG Normal (Santa Cruz Biotechnology) a cada tubo y se incubó en rotación por 2 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ . Luego se centrifugó a  $4^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos a 1.000xg, se retiró el sobrenadante y a este se le adicionó el anticuerpo correspondiente (2 $\mu\text{g}$ ). Esta mezcla se incubó en rotación toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  (el input se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$  y no se le agregó anticuerpo específico).

Al segundo día se adicionó a cada tubo 20 $\mu\text{l}$  de resina proteína A/G plus-agarosa y se dejó en rotación a  $4^{\circ}\text{C}$  por 1.5 horas. Mediante centrifugación se descartó el sobrenadante dejando la resina, la cual fue lavada con 500 $\mu\text{l}$  de los siguientes buffers y en el siguiente orden: 1 lavado con Buffer de Sonicación, 2 lavados con IP Wash Buffer (500mM LiCl, 100mM Tris-Cl pH 8.0, 1% NP-40, 0.1% desoxicolato de sodio) y

1 lavado con Tris-EDTA pH 8.0 (todos los buffer con inhibidores de proteasas con excepción del Buffer Tris-EDTA), entre cada lavado hubo una incubación en rotación durante 5 minutos a 4°C. Posterior al último lavado se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la resina en 100µl de Buffer de Elución y se incubó 15 minutos a 65°C, centrifugando luego a 16.000g por 1 minuto. El sobrenadante se traspasó a otro tubo, se le adicionó NaCl a una concentración final de 200mM y 1µl de RNasa A 10mg/ml y se incubó a 65°C durante la noche, en esta etapa se incluyó el input (20ug de cromatina llevados a 100µl con Buffer de Elución, adición de NaCl, de RNasa e incubación durante la noche).

Al tercer día, a cada mezcla se adicionó 2.5µl de Proteinasa K 10mg/ml y se incubó durante 4 horas a 42°C. Luego se adicionó a cada muestra 200µl de TE pH 8.0 y se realizó la extracción del ADN con un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) (300ul), se centrifugó a 16.000g por 5 minutos a temperatura ambiente, se tomó el sobrenadante y se trató con un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (300µl), con igual centrifugación. Finalmente el sobrenadante se traspasó a otro tubo y se precipitó el ADN con 2.5 volúmenes de etanol absoluto, 0.1 volumen de acetato de sodio 3M pH 7.0 y 1µl de acrilamida lineal 5mg/ml (Ambion) dejándose toda la noche a -20°C.

Al cuarto día las muestras se centrifugaron a 16.000xg por 20 minutos a 4°C, para obtener el pellet de ADN, el que se lavó con 500µl de Etanol 70%. Finalmente, las muestras se resuspendieron en 30µl TE pH 8.0 y los Input en 100µl. Las muestras se almacenaron a -20°C.

### **3.13.3 Análisis de muestras**

Las muestras se analizaron mediante PCR en tiempo real de manera similar a la detallada anteriormente (ver sección 12.2, Materiales y Métodos). Se usaron partidores

específicos para amplificar la región con sitios de unión para C/EBP $\beta$  y sitios ricos en AT, según sea el caso, una lista de los partidores usados se muestra en la Tabla 4. En cada reacción se usó 0.5-1 $\mu$ l de ADN y el programa fue el mismo mostrado en la Tabla 3, con excepción del gen *INSR* en donde la temperatura se cambió a 65°C en vez de 60°C. La curva estándar se realizó con el Input para cada gen.

**Tabla 4: Sets de partidores usados para amplificar los sitios de unión de las proteínas de interés.**

<b>Genes</b>	<b>Partidores</b>
<b>ALB (-413/-177)</b>	F:5'TGCAATTTGGGACTTAACTC3' R:5'CCACAAGACCTTGTCAATG3'
<b>CCND1 (-708/-465)</b>	F:5'GCGCATGCTAAGCTGAAATCCC3' R:5'CGCATTTC AAGAACGCCAC3'
<b>INSR (-988/-786)</b>	F:5'GAGGAAAGGCGAGTGAGACA3' R:5'CAGCGGCACAGATCCTTTC3'
<b>BRCA2 (-597/-433)</b>	F:5'GAGCGAGTTAAGATGGGT3' R:5'TGTGTGGTTGTGGATGAC3'
<b>SMAD6 (-571/-377)</b>	F:5'AGATCCGCTACCCCAACATA3' R:5'CTGAGACTCGGACGCAAA3'

Se muestran todos los genes seleccionados con sus respectivos sets de partidores para amplificar la región donde se encuentran los sitios de unión para C/EBP $\beta$  y las secuencias ricas en AT según corresponda. *ALB* y *CCND1*, fueron escogidos como blancos de C/EBP $\beta$  y HMGB1, mientras que *INSR*, *BRCA2* y *SMAD6*, fueron escogidos como blancos de C/EBP $\beta$  y HMGA1. Fuente: Elaboración propia.

### 3.14 Expresión y purificación de las isoformas de hC/EBP $\beta$ para EMSA

A partir de una colonia positiva de bacterias transformadas con los plásmidos pGEX-4T-1\_hC/EBP $\beta$ 1-His, pGEX-4T-1\_hC/EBP $\beta$ 2-His y pGEX-4T-1\_hC/EBP $\beta$ 3-His, respectivamente (ver sección 1, Materiales y Métodos), se cultivaron 5ml de medio LB-ampicilina (100ng/ $\mu$ l) y se incubó entre 12 a 16 horas a 37°C, con agitación constante. Luego se traspasó 3ml del cultivo a 300ml de medio LB-ampicilina (100ng/ $\mu$ l) y se incubó a 28°C con agitación constante, hasta alcanzar una O.D.<sub>600</sub> entre 0.6 a 0.8,



para luego inducir con IPTG a una concentración final de 100 $\mu$ 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 15ml de PBS 1x + inhibidores de proteasas, tras lo que se sonicó con 5 pulsos de 20 segundos a 30 watts de potencia, teniendo en cuenta 20 segundos de descanso en hielo entre cada pulso. Posteriormente se centrifugó a 12.000xg por 20 minutos a 4°C, paso que se realizó dos veces. El sobrenadante del centrifugado fue incubado con 200 $\mu$ l de resina glutathione sepharose 4b (GE Healthcare) (previamente equilibrada), por 1 hora en rotación a temperatura ambiente, para luego ser traspasada a una columna BioRaD, donde se dejó escurrir. Luego la resina fue lavada en la columna con PBS frío y a continuación la resina fue traspasada a un tubo de 1.5ml para ser lavada tres veces en *batch* con 2 volúmenes (volumen de resina) de Buffer de lavado (5mM Glutación, 50mM Tris-HCl pH 8.0, 120mM NaCl) + inhibidores de proteasas. En cada lavado se incubó por 10 minutos en rotor a temperatura ambiente y se centrifugó a 2.000xg por 2 minutos a 4°C. La resina fue luego lavada repetidamente con 1ml de PBS 1x sin inhibidores de proteasas, para luego ser tratada con 20 unidades de trombina (GE Healthcare) en un volumen completado a 500 $\mu$ l con PBS 1x y se incubó en rotación por 4 horas a temperatura ambiente, lo que permitió liberar la proteína recombinante de la resina y también de GST. A continuación se centrifugó a 2.000xg por 2 minutos a 4°C. El sobrenadante fue rescatado y se le agregó inhibidores de proteasas y glicerol al 15% concentración final. Por último las proteínas se guardaron a -80°C.

El análisis de las purificaciones y las cuantificaciones se realizó a través de electroforesis en gel de poliacrilamida denaturante SDS-PAGE al 12% y su posterior tinción con azul de coomassie (ver sección 4, Materiales y Métodos). En el caso de las cuantificaciones se incluyó una curva de calibración de concentración de Albúmina de Suero Bovino (BSA) y se cuantificó usando el programa UN-SCAN-IT gel 6.1.

### 3.15 Obtención de vectores con sitio de unión para HMGA y sitio de unión para C/EBP $\beta$

Se diseñaron oligonucleótidos, sentido y antisentido, para crear casetes doble hebras al ser alineados. Estos se diseñaron para que contengan hacia un extremo la secuencia de unión consenso para el factor de transcripción C/EBP $\beta$  (Osada *et al.* 1996), terminando con un sitio *Pst*I, y al otro extremo el sitio de restricción *Not*I. Entre el sitio C/EBP $\beta$  y el sitio *Not*I se incluyó una secuencia rica en A/T, como sitio de unión para HMGA, secuencia que anteriormente fue probada en el laboratorio y que efectivamente sirve como sitio de unión para esta proteína HMG (Del Rio, 2012). De igual forma se diseñó un oligonucleótido control, sentido y antisentido, el cual no posee la secuencia rica en A/T, conteniendo en cambio una secuencia aleatoria de 35pb entre el sitio de unión para C/EBP $\beta$  y el sitio *Not*I (Figura 16).

Luego se realizó un alineamiento de los correspondientes oligonucleótidos, para lo cual se mezcló 100pmol de cada oligonucleótido y 60mM de Tris-HCl pH 8.0 (concentración final) en un volumen final de 200 $\mu$ l. 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 pGEM-3Z/601 que previamente se digirió con las enzimas *Not*I y *Pst*I (New England Biolabs); el vector digerido se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% en TBE 0.5X a 60V por 2 horas y luego se extrajo usando un kit de extracción (QIAEX II Gel Extraction Kit, Qiagen). Para facilitar la identificación del plásmido linearizado, el vector que efectivamente se digirió y trató de esta forma fue el pGEM-3Z/601-C/EBP $\beta$  que se encontraba generado anteriormente en el laboratorio, lo que no influye en la estrategia, ya que al digerir con *Not*I y *Pst*I se remueve todo el fragmento que tiene el sitio C/EBP $\beta$ , quedando la porción de interés del vector pGEM-3Z/601. Se denominará en adelante como pGEM-3Z/601 para facilitar las descripciones de protocolos y resultados.

La ligación de 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 20µl. Se incubó a 16°C por 16 horas, terminando a 65°C por 10 minutos. Por último se realizaron transformaciones con la ligaciones (ver sección 1, Materiales y Métodos) y posteriormente se obtuvieron los plásmidos (ver sección 16, Materiales y Métodos) pGEM-3Z/601-C/EBPβ/ATx6/GCx4, pGEM-3Z/601-C/EBPβ/ATx6/GCx4/Inv y pGEM-3Z/601-C/EBPβ/35pb. Los vectores se confirmaron realizando una digestión con la enzima *XhoI* (sitio presente sólo en el vector original pGEM-3Z/601-C/EBPβ) y digestiones dobles con las enzimas *NotI* + *PvuII* y *PstI* + *BamHI* (como comprobación de los patrones de corte) y posteriormente se confirmó el detalle de su identidad por secuenciación automática Sanger (servicio PUC). Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5: Oligonucleótidos usados para generación de vectores a ser utilizados para generación de sondas de EMSA.**

Oligo	Secuencia
ATx6/GCx4-C/EBPβ	Sentido: 5'- GGCCGCTAAAATGGCCTAAAATGGCCTAAAATATTGCGCAATCCG GACCTGCA -3' Antisentido: 5'- GGTCCGGATTGCGCAATATTTTAGGCCATTTTAGGCCATTTTAGC -3'
ATx6/GCx4-C/EBPb/inv	Sentido: 5'- GGCCGCATTTTAGGCCATTTTAGGCCATTTTAATTGCGCAATCCGG ACCTGCA -3' Antisentido: 5'- GGTCCGGATTGCGCAATAAAATGGCCTAAAATGGCCTAAAATGC - 3'
Control (35pb)	Sentido: 5'- GGCCGCGTATCTGGACCATCTGTGCTCCATCGATTGCGCAATCCGG ACCTGCA -3' Antisentido: 5'- GGTCCGGATTGCGCAATCGATGGAGCACAGATGGTCCAGATACGC -3'

Se muestran las secuencias de los respectivos oligonucleótidos usados. En la columna izquierda el nombre de cada uno de éstos. Fuente: Elaboración propia.

### 3.16 Obtención de plásmidos

Esta se realizó a partir de 5ml de medio de cultivo bacteriano (caldo LB-ampicilina 100ng/μl), cultivado entre 12 y 16 horas a 37°C con agitación. Luego de esto, se realizó la purificación utilizando el kit E.Z.N.A. *Plasmid Miniprep* (OMEGA Bio-Tek), siguiendo lo descrito en el manual del kit.

### 3.17 Marcaje de oligonucleótidos con [γ-<sup>32</sup>P]-ATP

#### 3.17.1 Para PCR radioactiva

Se marcó en su extremo 5' 25pmol del partidor sentido a ser usado para la realización de la PCR radioactiva. Para ello se usó la enzima T4 polinucleótido quinasa (New England Biolabs), en presencia de 150μCi de [γ-<sup>32</sup>P]-ATP (6.000 Ci/mmol, Perkin Elmer) en un volumen final de 25μl. Esta reacción procedió a 37°C durante 30 minutos. Luego, pasado el tiempo de la reacción, se adicionó 1μl de EDTA 0.5M pH 8.0 para detener la reacción (esta reacción se escaló tres veces, para realizar tres PCR, para cada vector respectivamente). 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 19, Materiales y Métodos) y luego se resuspendió el partidor en 10μl de agua.

#### 3.17.2 Para hibridación de oligos

Se marcó en su extremo 5' 10pmol de uno de los oligos (Tabla 6) a ser usado para la hibridación. Para ello se usó la enzima T4 polinucleótido quinasa (New England Biolabs), en presencia de 60μCi de [γ-<sup>32</sup>P]-ATP (6.000 Ci/mmol, Perkin Elmer) en un

volumen final de 15µl. Esta reacción procedió a 37°C durante 30 minutos. Luego, pasado el tiempo de la reacción, se adicionó 1µl de EDTA 0.5M pH 8.0 para detener la reacción. A continuación se procedió a precipitar las muestras (ver sección 19, Materiales y Métodos) y luego se resuspendió el partidor en 10µl de TE pH 8.0. El oligo marcado se guardó a -20°C.

**Tabla 6: Oligonucleótidos usados para hibridación de oligos radioactivo.**

Oligo	Secuencia
A4-02-CEBP	Sentido: 5'- GCGGCCGCGGATAAAAATGGCCTAAAATGGCCTAAAATCGATTGCGCAATCCTGC GCTCGGA -3'
	Antisentido: 5'- TCCGAGCGCAGGATTGCGCAATCGATTTTAGGCCATTTTAGGCCATTTATCCGGC GGCCGC -3'

Se muestran las secuencias de los respectivos oligonucleótidos usados. En la columna izquierda el nombre de cada uno de éstos. Fuente: Elaboración propia.

### 3.18 Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) radioactiva

Se prepararon stocks de 1ng/µl de los vectores pGEM-3Z/601-C/EBPβ/ATx6/GCx4, pGEM-3Z/601-C/EBPβ/ATx6/GCx4/Inv y pGEM-3Z/601-C/EBPβ/35pb. En las reacciones de PCR se usó 1ng de cada vector, respectivamente, junto con 5U de la enzima Paq5000 DNA *Polymerase* (Stratagene), 0.5µM del partidor marcado, 0.5µM del partidor frío, 0.2mM de cada dNTP y Buffer de Paq5000 (1x). Cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50µl usando el programa mostrado en la Tabla 8. 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

19, Materiales y Métodos) y se resuspendieron en 20µl de TE pH 8.0. Los partidores utilizados se muestran en la Tabla 7.

**Tabla 7: Partidores usados para realizar la PCR de marcaje radioactivo.**

<b>Partidores</b>	<b>Secuencia</b>
Sentido	5'ACAGGATGTATATATCTGACACGTGC3'
Antisentido	5' CCTGCAGGCATGCAAGCTTGAGTATT 3'

Se muestra la secuencia de los partidores usados en la PCR radioactiva. Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 8: Programa de la PCR de marcaje radioactivo.**

<b>Programa PCR</b>		
<b>Tiempo</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Ciclos</b>
5 minutos	95°C	1
30 segundos	95°C	30
30 segundos	55°C	
30 segundos	72°C	
10 minutos	72°C	1

Se muestran todas las etapas presentes en la PCR, mostrando el tiempo, la temperatura y el número de ciclos. Fuente: Elaboración propia.

### **3.19 Precipitación de ADN**

La precipitación de ADN se realizó agregando 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío. La mezcla se mantuvo por 2 horas a –20°C ó 30 minutos a –80°C y luego se centrifugó a 16.000xg durante 15 minutos a 4°C. El precipitado se lavó dos veces con etanol 70% frío y se centrifugó a 16.000xg durante 15 minutos a 4°C. El precipitado se resuspendió en un volumen adecuado de buffer 10mM Tris-HCl pH 8.0, para el caso de muestras que serían utilizadas en reacciones enzimáticas posteriores y 10mM TE pH 8.0 en los demás casos.

### **3.20 Purificación fragmentos de PCR por gel de poliacrilamida no denaturante**

La purificación se realizó con el uso de electroforesis en gel de poliacrilamida no denaturante al 5% (ver sección 23, Materiales y Métodos). A las muestras se les agregó glicerol para dejar al 10% y luego se cargaron en el gel. Antes de cargar las muestras se realizó una precorrida de la electroforesis a 100V durante 50 minutos. La electroforesis procedió a 200V durante 3 horas 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 durante aproximadamente 5 minutos, 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 0.6ml con un pequeño agujero en la parte inferior; el tubo se introdujo a su vez en un tubo de 1.5ml. Se realizó un breve centrifugado (spin down), para que el gel pasara a través de la apertura al tubo de 1.5ml (sin sobrepasar 5.000rpm en microcentrífuga). Luego se agregó 300µl 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 16.400xg por 2 minutos a temperatura ambiente, y se rescató el sobrenadante. A continuación se procedió a precipitar las muestras (ver sección 19, Materiales y Métodos) y se resuspendieron en 10µl de TE pH 8.0.

### **3.21 Determinación de la concentración de los productos de PCR marcados con <sup>32</sup>P**

En primer lugar se cargó 0.5µl de uno de los fragmentos en un gel de agarosa al 1% y se sometió a electroforesis en TBE 0.5X a 80V por 1 hora. Finalizada la corrida electroforética se tomó una fotografía digital y se cuantificó la banda por densitometría usando el programa UN-SCAN-IT gel 6.1 tomando en cuenta la banda correspondiente

a 200pb del marcador de tamaño molecular (100pb DNA Ladder; NEW ENGLAND BioLabs). Posteriormente se diluyó este fragmento a una concentración de 4fmol/ $\mu$ l y una alícuota de los demás fragmentos marcados generados a una concentración nominal de 4fmol/ $\mu$ l, tomando como supuesto el que todos los fragmentos tienen la misma concentración que el fragmento de concentración conocida. La dilución se realizó en buffer de condiciones finales de reconstitución (100mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 7.4, 1mM EDTA, 0.5mM PMSF, 5mM DTT, 0.05% NP-40, 100ng/ $\mu$ l BSA, 10% Glicerol). De los stocks diluidos se cargaron 10fmoles (nominales en el caso de los fragmentos no cuantificados en gel de agarosa) en un gel de poliacrilamida no denaturante al 5% y se sometió a electroforesis como se detalla en la sección 23. 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 HydroTech™ *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. De esta forma, la concentración de los fragmentos no cuantificados en gel de agarosa se determinó usando como estándar el que sí lo fue. Una vez definidas sus concentraciones, se preparó stocks 4fmol/ $\mu$ l de cada uno de ellos.

### **3.22 Reconstitución nucleosomal**

La reconstitución nucleosomal se llevó a cabo mediante el método de transferencia de octámero de histonas (Owen-Hughes *et al.* 1999). Para esto se mezcló 0.5pmol del ADN marcado, 1.5 $\mu$ g de oligonucleosomas cortos (SON), previamente obtenidos desde núcleos de células HeLa (Owen-Hughes *et al.* 1999) y NaCl a una concentración final 1M, completándose a 12,5  $\mu$ l con Buffer de Dilución (10mM Tris-HCl pH 7.4, 1mM EDTA, 0.5mM PMSF, 5mM DTT). Luego se incubó por 20 minutos a 37°C. Transcurrido ese tiempo se realizaron diluciones seriadas adicionando 3.13 $\mu$ l, 5.20 $\mu$ l,



10.42µl y 31.25µl de Buffer de dilución, todas seguidas por incubaciones de 20 minutos a 30°C. Por último, se agregó 62.5µl de buffer de dilución final (10mM Tris-HCl pH 7.4, 1mM EDTA, 0.5mM PMSF, 5mM DTT, 0.1% NP-40, 200ng/µl BSA, 20% glicerol) incubando por 20 minutos a 30°C, quedando un volumen final de 125µl, que se guardó a 4°C. La composición de la solución en la que queda el mononucleosoma reconstituido es la misma del buffer de condiciones finales de reconstitución (100mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 7.4, 1mM EDTA, 0.5mM PMSF, 5mM DTT, 0.05% NP-40, 100ng/µl BSA, 10% Glicerol), quedando el mononucleosoma reconstituido a una concentración de 4fmol/µl. La reconstitución se verificó al someter 10fmol de la muestra a electroforesis en gel de poliacrilamida no denaturante al 5% (ver sección 23, Materiales y Métodos).

### **3.23 Electroforesis en geles de poliacrilamida no denaturante**

Estos ensayos se hicieron en geles de poliacrilamida no denaturante al 5% (40:1; Acrilamida:BisAcrilamida). La dilución de la acrilamida se realiza en Buffer TBE 0.3x (27mM Tris-Borato, 6.7mM EDTA), a los que se adiciona 0.1% PSA y 0.1% TEMED, 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 100V por 50 minutos a 4°C. Típicamente se cargan 13.5µl de muestra (carriles de 8 mm de ancho) y la electroforesis procede a 200V por 3 horas a 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.

### **3.24 Ensayos de retardo electroforético**

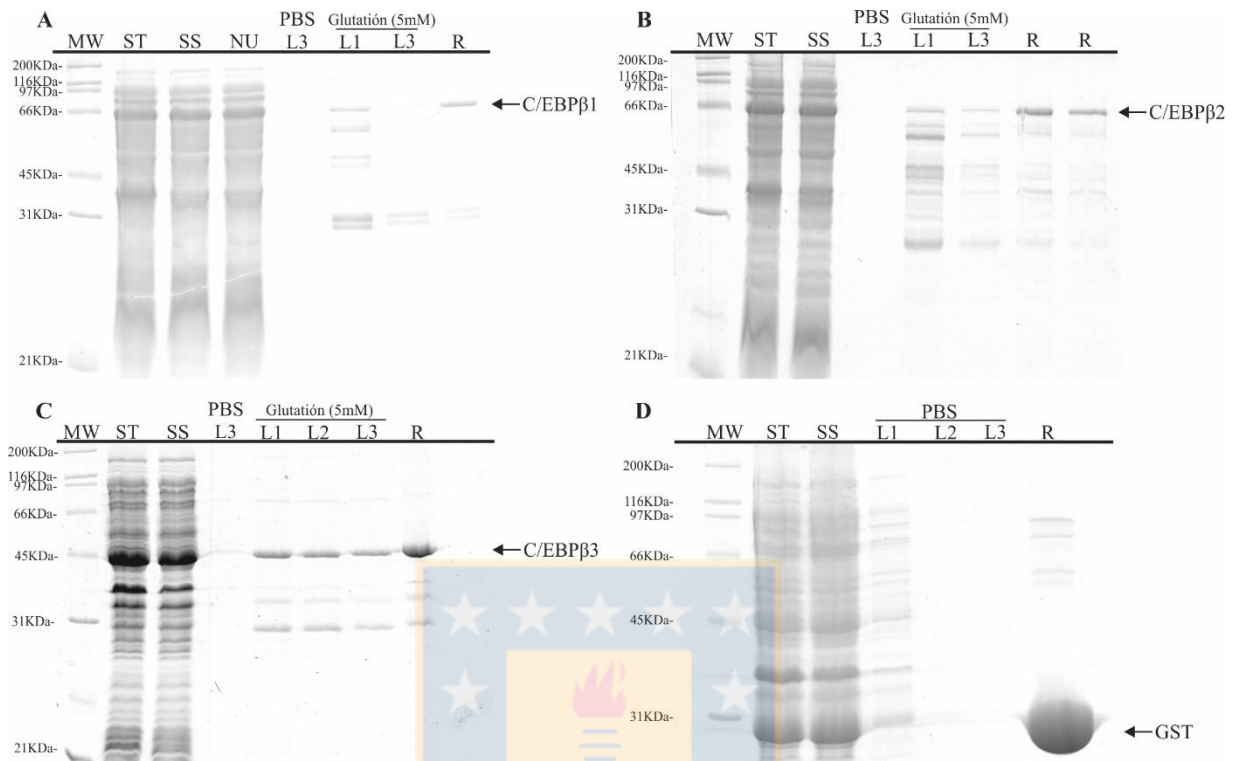
Para los ensayos de unión de las proteínas hC/EBP $\beta$  y/o hHMGs, se mezclaron 2.5 $\mu$ l (10fmol) de la sonda marcada (ADN o nucleosoma) con 0.5 $\mu$ l de hC/EBP $\beta$  o Buffer de hC/EBP $\beta$  (PBS 1x, inhibidores de proteasas, 1mM DTT, 15% Glicerol), 0.5 $\mu$ l de hHMG o Buffer de Dilución de HMG (10mM HEPES pH 7.9, 100mM KCl, 15% Glicerol), 3 $\mu$ l de Buffer de hSWI/SNF (10mM HEPES pH 7.9, 150mM NaCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05% TritonX-100, inhibidores de proteasas, 1mM DTT, 15% Glicerol), 0.6 $\mu$ l de agua *nanopure*, 0.5 $\mu$ l de SON (300ng/ $\mu$ l) o buffer de condiciones finales de reconstitución (100mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 7.4, 1mM EDTA, 0.5mM PMSF, 5mM DTT, 0.5% NP-40, 100ng/ $\mu$ l BSA, 10% Glicerol) y 7.4 $\mu$ l de buffer de remodelación (20mM HEPES pH 7.9, 84mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM DTT, 0.5mM PMSF, 0.05% NP-40, 100ng/ $\mu$ l BSA, 10% glicerol). La mezcla se incubó 30 minutos a 30°C, seguido de 10 minutos a 4°C. Por último, se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida no denaturante al 5% (Ver sección 23, Materiales y Métodos).

## 4. RESULTADOS.

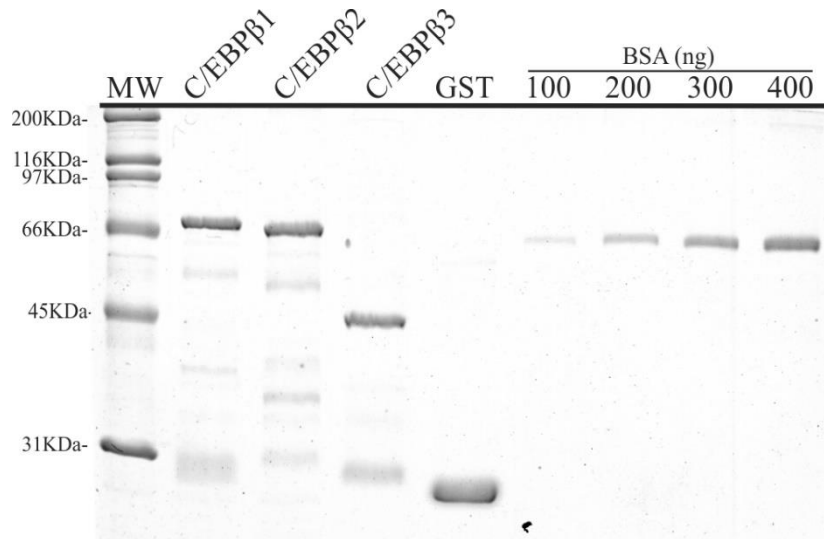
### 4.1 Purificación de las isoformas de hC/EBP $\beta$ en fusión a GST

La purificación de las isoformas de hC/EBP $\beta$  como proteínas de fusión a GST, se llevó a cabo para los posteriores ensayos de GST *pull-down*. Dado el tipo de ensayo, el objetivo de la purificación fue dejar las proteínas recombinantes unidas a la resina, debido a que éstas serían usadas como “carnada” en las reacciones de GST pull-down. Debido a la necesidad de eliminar contaminantes y, a la vez, mantener estas proteínas de fusión unidas a la resina, se realizaron lavados con concentraciones bajas de glutatión. Previamente se tenía conocimiento de que estas concentraciones bajas de glutatión no poseen un efecto marcado de elución de las isoformas de C/EBP $\beta$  desde la resina.

La purificación de las isoformas fue realizada en varias oportunidades, variando la temperatura de unión a la resina y la concentración de glutatión en los lavados. Finalmente se optó por incubar a temperatura ambiente y lavar con 5mM de glutatión para GST-hC/EBP $\beta$ 1, GST-hC/EBP $\beta$ 2, y GST-hC/EBP $\beta$ 3, para el caso de GST no se realizaron lavados con glutatión, como se indica en Materiales y Métodos. Un resultado representativo de estas purificaciones puede observarse en la Figura 6. En la mayoría de los casos la proteína de fusión asociada a la resina posee algunas bandas contaminantes, incluso después de los lavados con glutatión. De todas formas, esto no es un problema significativo, debido a que al comparar la intensidad de las bandas contaminantes con la proteína recombinante se puede deducir que existe una diferencia importante en la concentración. Posterior a la purificación y a la verificación del estado de las proteínas, se prosiguió a cuantificar (Figura 7) del modo descrito en Materiales y Métodos. Este método de purificación, el cual se realizó en varias oportunidades, permitió obtener concentraciones de entre 200 a 500ng/ $\mu$ l ( $\mu$ l de resina) de cada proteína recombinante, con excepción de GST, del que se obtuvo concentraciones en torno a los 3.000 a 4.000ng/ $\mu$ l.



**Figura 6: Purificación de GST y las isoformas de hC/EBP $\beta$  en fusión a GST.** Análisis de las purificaciones mediante SDS-PAGE en un gel al 12% y posterior tinción con azul de Coomassie. Se sembró 10 $\mu$ l de cada muestra y 2.5 $\mu$ l de resina (volumen seco). MW: Marcador de tamaño molecular; ST: Sonicado total; SS: Sobrenadante del sonicado; NU: No unido a la resina; L: Lavados. R: resina, equivalente a la muestra de proteína purificada. Con flechas se indica la migración de cada proteína recombinante; las otras bandas en los carriles R son contaminantes de la purificación. (A) Purificación de hC/EBP $\beta$ 1. (B) Purificación de hC/EBP $\beta$ 2. (C) Purificación de hC/EBP $\beta$ 3. (D) Purificación de GST. Fuente: Elaboración propia.



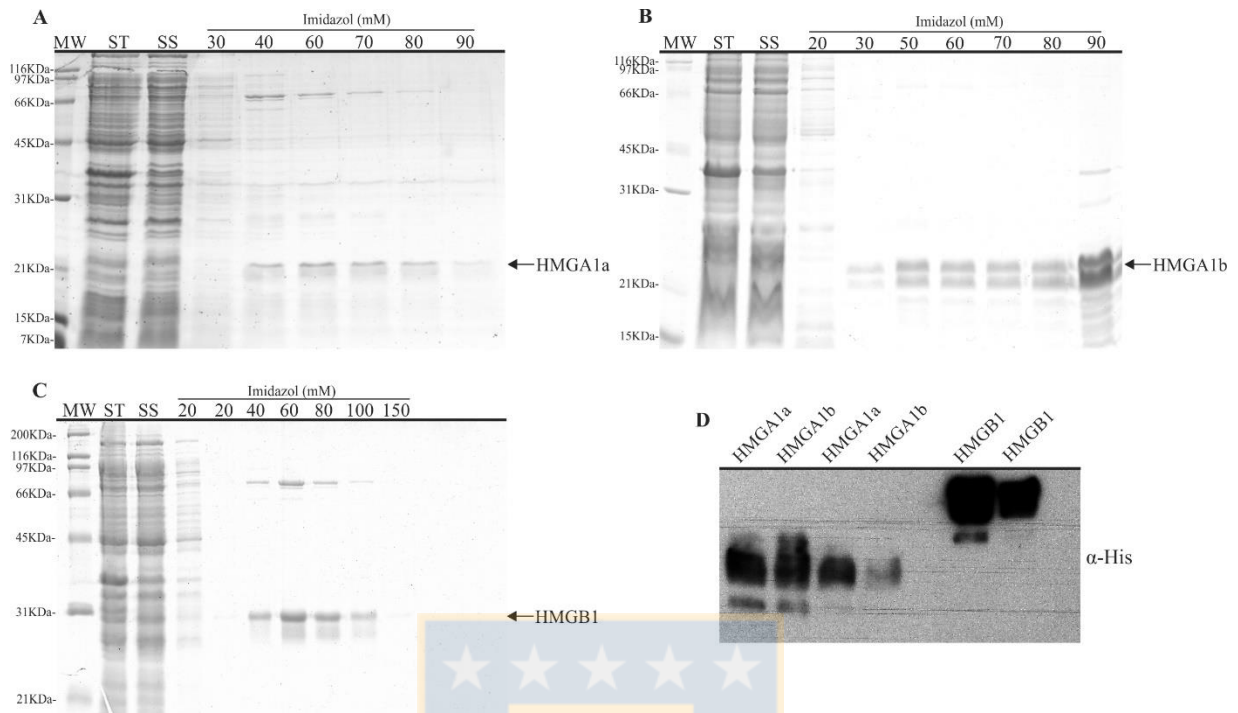
**Figura 7: Cuantificación de GST y las isoformas de hC/EBP $\beta$  en fusión a GST.** Foto usada para cuantificar las proteínas recombinantes. Se realizó un SDS-PAGE en un gel al 12% y posterior tinción con azul de Coomassie. Se sembró cada una de las proteínas recombinantes purificadas y cantidades crecientes de Albúmina de Suero Bovino (BSA). MW: Marcador de tamaño molecular. Fuente Elaboración propia.

#### 4.2 Purificación de hHMGA1 y hHMGB1 recombinantes

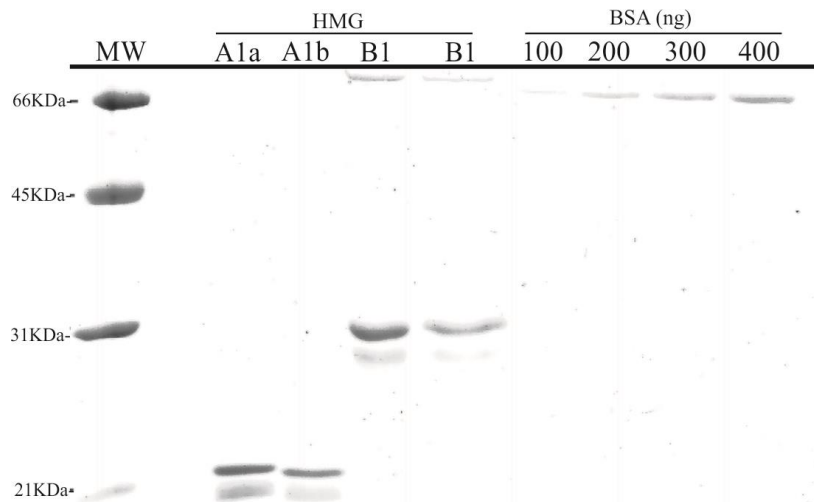
Para poder hacer los posteriores ensayos de interacción de proteínas HMG con las isoformas de C/EBP $\beta$ , primero fue necesario purificar y almacenar las proteínas recombinantes a usar. Estas fueron purificadas como se explica en la sección de Materiales y Métodos; los respectivos análisis de éstas se observaron a través de un gel SDS-PAGE al 12% teñido luego con azul de Coomassie. La purificación partió con los plásmidos pQE-80L que se tenían para HMGA1a, HMGA1b y HMGB1. Para estos casos la proteína se eluyó de la resina, por ser la “presa” en las reacciones de GST pull-down.

En el resultado de las purificaciones obtenidas (Figura 8) se puede observar que en todas las purificaciones aparece una banda por debajo de la proteína recombinante.

Esta banda también es detectada al someter las muestras a western blot usando un anticuerpo anti-His (Clontech) (Figura 8D), por lo que podría corresponder a degradación de la proteína recombinante y no a una contaminante no relacionada. Además de la banda mencionada anteriormente, también se puede observar que aparecen bandas contaminantes de mayor tamaño en las eluciones con concentraciones de imidazol más bajas, por lo que se optó por usar concentraciones mayores de imidazol (80mM a 150mM) para eluir la proteína recombinante, lo que derivó en tener concentraciones más bajas de proteína, pero con mayor pureza. Después de observar el resultado de las purificaciones, se escogieron las mejores eluciones y se concentraron, como se explica en Materiales y Métodos, para luego ser cuantificadas a través de un gel SDS-PAGE al 12% usando una curva de calibración de BSA, como se puede observar en la Figura 9. Un detalle observado, fue que después de concentrar las proteínas, la banda inferior se redujo relativamente a la banda principal, probablemente debido a la etapa de concentración de la proteína. Las concentraciones obtenidas fueron de entre 10 a 50ng/μl para hHMGA1a (elución 80mM imidazol), hHMGA1b (elución 90 mM imidazol) y hHMGB1 (elución 100mM imidazol).



**Figura 8: Purificación de HMGA1a, HMGA1b y HMGB1.** Análisis de las purificaciones mediante SDS-PAGE en un gel al 12% y posterior tinción con azul de Coomassie. Se sembraron 10 $\mu$ l de cada muestra. Además se analizaron algunas eluciones mediante Western Blot, incubando la membrana con un anticuerpo contra el epítipo 6xHis. Con flechas se indica la migración de cada proteína recombinante, las otras bandas son contaminantes de la purificación, con excepción de la banda por debajo de la proteína recombinante, la cual también es detectada por el anticuerpo. Las distintas concentraciones de imidazol utilizadas en los lavados y eluciones se indican en la parte superior de cada imagen. MW: Marcador de tamaño molecular; ST: Sonicado total; SS: Sobrenadante del sonicado. (A) Purificación de hHMGA1a. (B) Purificación de hHMGA1b. (C) Purificación de hHMGB1. (D) Western blot usando un anticuerpo contra 6xHis (Clontech), para dos eluciones diferentes de HMGA1a, HMGA1b y HMGB1. Fuente: Elaboración propia.



**Figura 9: Cuantificación de HMGA1a, HMGA1b y HMGB1.** Fotografía usada para cuantificar las proteínas recombinantes. Se realizó un SDS-PAGE en un gel al 12% y posterior tinción con azul de Coomassie. Se sembró una elución de HMGA1a, HMGA1b y dos eluciones de HMGB1. Se sembraron cantidades crecientes de Albúmina de Suero Bovino (BSA). MW: Marcador de tamaño molecular. Fuente: Elaboración propia.

### 4.3 Estudio de la interacción diferencial de las isoformas de hC/EBP $\beta$ con las proteínas HMG e histona H1

Para confirmar la existencia de la interacción sugerida por los resultados previos mostrados en la Tabla 1, se determinó realizar nuevamente ensayos de GST-pulldown, solo que esta vez se usaron proteínas purificadas para el caso de las HMGs y para histona H1 se usó extractos nucleares y detección con un anticuerpo específico (anti-H1.2). Para cada reacción se usaron entre 2 a 2.5 $\mu$ g de C/EBP $\beta$ 1 y cantidades equimolares del resto de las isoformas y GST; el resto del procedimiento se detalla en la sección de Materiales y Métodos.

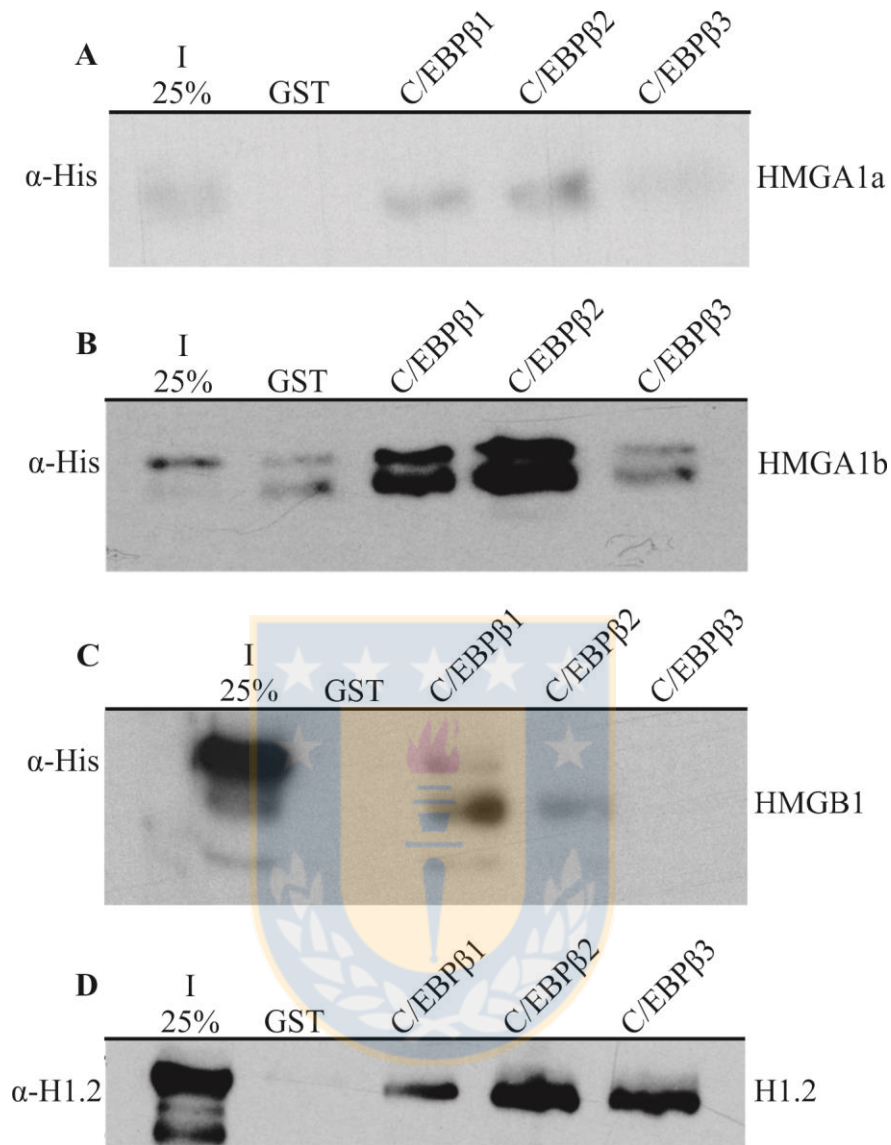
Como se puede observar en la Figura 10, todas las proteínas HMGs y la histona H1 interaccionan con C/EBP $\beta$ . Sin embargo, se puede notar existencia de interacción



diferencial de las isoformas de C/EBP $\beta$  con las proteínas HMG, preferentemente interacción con C/EBP $\beta$ 1 y C/EBP $\beta$ 2. Estos datos coinciden con los mostrados en la Tabla 1, con excepción de HMGB1 que solo mostraba interacción con C/EBP $\beta$ 1. Para el caso de la histona H1 se esperaba interacción preferentemente con C/EBP $\beta$ 3. Sin embargo, no se observa una interacción diferencial con las isoformas de C/EBP $\beta$ .

En el trabajo de Foti *et al.* (2003) se demostró que HMGA1 interacciona con C/EBP $\beta$ . Sin embargo, en el trabajo de estos autores se utilizó extracto nuclear de células 3T3-L1 y no se determinó cuál isoforma de C/EBP $\beta$  presenta interacción con HMGA1. En nuestro caso los resultados mostrados en la Tabla 1, junto con los GST pull-down realizados en esta tesis, demuestran que la interacción es diferencial y solo es con las isoformas largas de C/EBP $\beta$ . Además se observa interacción con HMGB1, la cual no se había descrito anteriormente y también es de tipo diferencial.

Para el caso de HMGA1b se observa que la cantidad de proteína presente en el input es muy baja en relación a la proteína mostrada en la interacción, esto se debe a que nuestra proteína HMGA1b es muy susceptible a degradación durante el ensayo y de alguna manera la interacción con C/EBP $\beta$  impide esta degradación. Sin embargo, este es un detalle que hay que abordar para obtener una imagen que muestra la cantidad adecuada mostrada en el input.



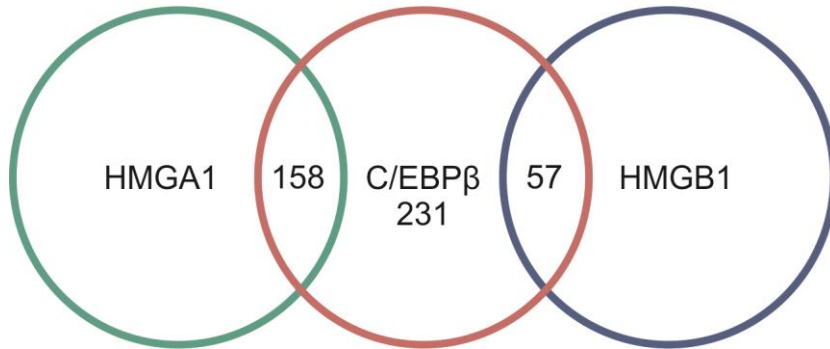
**Figura 10: Análisis de la interacción de las isoformas de hC/EBPβ con proteínas HMGs e histona H1.** Ensayos de GST pull-down llevados a cabo con cada una de las isoformas de hC/EBPβ fusionado a GST y las proteínas HMGs e histona H1. En la imagen se muestran cuatro experimentos independientes para observar la interacción de las isoformas de C/EBPβ con HMGA1a (A), HMGA1b (B), HMGB1 (C) y con histona H1.2 (D). Para el caso de las proteínas HMGs, se usaron proteínas recombinantes, mientras que para histona H1 se usó extracto nuclear de células HeLa. I: Input. Fuente: Elaboración propia.

#### 4.4 Selección de genes blancos

Una vez confirmada la existencia de interacción diferencial entre las isoformas de hC/EBP $\beta$  y las proteínas HMG estudiadas, se prosiguió a buscar genes blancos tanto para C/EBP $\beta$  y HMGA1, como para C/EBP $\beta$  y HMGB1 (Figura 11). En primer lugar el objetivo fue encontrar genes en donde se haya descrito unión de ambas proteínas al promotor, tanto en literatura como en experimentos masivos de ChIP-seq o ChIP-on-chip. Sin embargo, para el caso de la proteína HMGB1 prácticamente no se encontraron reportes en donde se estudiara la unión de esta proteína a promotores de genes, lo que es debido básicamente a que ésta no presenta sitio de unión consenso en el ADN (Thomas y Travers, 2001). Para el caso de HMGA1 aunque no se encontraron análisis masivos de unión, sí se encontraron en literatura promotores de genes a los cuales HMGA1 se une, siendo un regulador de estos. Para el caso de C/EBP $\beta$  se encontraron dos análisis masivos de ChIP-seq sacados de la base de datos GEO para las líneas celulares HepG2 y MCF-7, y un análisis masivo de ChIP-on-chip realizado por los autores Saint-Auret *et al.* (2011). Además, también se encontraron genes blanco en literatura para esta proteína. Las líneas celulares nombradas anteriormente fueron en las que se enfocó la búsqueda, debido a que ha sido descrito ampliamente la participación de C/EBP $\beta$  en distintos procesos celulares en hepatocitos y tejido mamario, tanto normales como malignos (Ramji y Foka, 2002; Nerlov, 2010).

En todos los casos también se buscó en literatura genes en donde las proteínas estudiadas afectaran su expresión, para el caso de HMGB1 todos los genes fueron seleccionados por expresión. Finalmente se escogieron cinco genes para C/EBP $\beta$  y HMGA1, y cinco genes para C/EBP $\beta$  y HMGB1. Un resumen de los genes seleccionados se encuentra en la Tabla 9.

## Genes blancos



**Figura 11: Representación esquemática de los genes blancos seleccionados.** En el diagrama de Venn se muestra una representación de los genes blanco seleccionados, tanto para C/EBP $\beta$  y HMGA1, como para C/EBP $\beta$  y HMGB1. Para el caso de C/EBP $\beta$  los genes se obtuvieron de dos experimentos de ChIP-seq y un experimento de ChIP-on-chip. Para el caso de HMGA1 y HMGB1, los genes se obtuvieron por literatura. Los números indican la cantidad de genes encontrados para cada grupo. Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 9: Genes blancos seleccionados.**

Genes	C/EBP $\beta$	HMGA1	HMGB1
<b>BRCA2</b>	MCF-7 (GSM1010889); HepG2 (GSM1010778)	MCF-7 (Maia <i>et al.</i> 2012)	
<b>ALB</b>	HepG2 (GSM1010778); HepG2 (Trautwein <i>et al.</i> 1996)		HepG2 (Yu <i>et al.</i> 2008)
<b>CCND1</b>	MCF-7 (GSM1010889); HepG2 (GSM1010778); HepG2 (Steinberg <i>et al.</i> 2012)		MGC-803 (Song <i>et al.</i> 2012)
<b>ERBB2</b>	HepG2 (GSM1010778); Hep3B (Saint-Auret <i>et al.</i> 2011)	Breast carcinoma cells (Chiappetta <i>et al.</i> 2004)	
<b>INSR</b>	HepG2 (GSM1010778); HepG2 (Foti <i>et al.</i> 2003)	HepG2 (Foti <i>et al.</i> 2003)	
<b>SMAD6</b>	MCF-7 (GSM1010889); HepG2 (GSM1010778); Hep3B (Saint-Auret <i>et al.</i> 2011)	Predicción Bioinformática (TRANSFACT)	

<b>STAT3</b>	MCF-7 (GSM1010889); HepG2 (GSM1010778); Hep3B (Saint-Auret <i>et al.</i> 2011)	Human erythroleukemia cells (Hillion <i>et al.</i> 2008)	
<b>CFLAR</b>	MCF-7 (GSM1010889); HepG2 (GSM1010778); Hep3B (Saint-Auret <i>et al.</i> 2011)		DCs cells (Melki <i>et al.</i> 2010)
<b>PCNA</b>	MCF-7 (GSM1010889); HepG2 (GSM1010778); Hep3B (Saint-Auret <i>et al.</i> 2011)		GAC cells (Zhang <i>et al.</i> 2014)
<b>FGA</b>	MCF-7 (GSM1010889); HepG2 (GSM1010778); Hep3B (Saint-Auret <i>et al.</i> 2011)		HepG2 (Yu <i>et al.</i> 2008)

En la tabla se muestran diez genes seleccionados, cinco genes para C/EBP $\beta$  y HMGA1, y cinco genes para C/EBP $\beta$  y HMGB1. Cada gen muestra la base de datos o bibliografía que lo respalda, junto al tipo celular en donde se observó el resultado. Para C/EBP $\beta$  y HMGA1, se encontraron experimentos de unión y expresión, mientras que para HMGB1 solo se encontraron experimentos de expresión. TRANSFACT (<http://gene-regulation.com/>). Fuente: Elaboración propia.

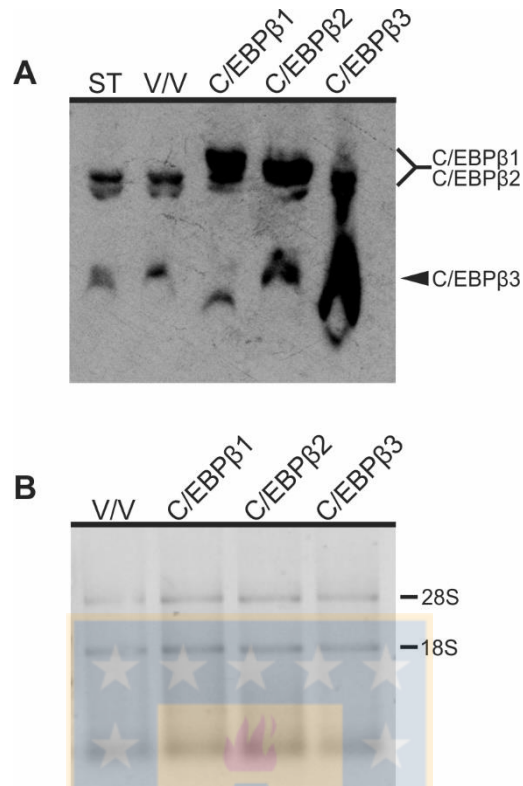
#### 4.5 Análisis de la expresión génica de los genes blancos seleccionados

Anteriormente se mencionó que usualmente las isoformas largas de C/EBP $\beta$  actúan como activadores transcripcionales, mientras que la isoforma más corta actúa como represor transcripcional (Nerlov, 2010). Para poder corroborar esta tendencia en los genes seleccionados, se usó la línea celular HepG2 por las razones descritas anteriormente (ver sección 4, Resultados), no se pudo trabajar con la línea celular MCF-7 en este trabajo de tesis por limitaciones de tiempo. Las células HepG2 se transfectaron transientemente con vectores que contenían las secuencias codificantes para cada una de las tres isoformas de hC/EBP $\beta$ , para luego medir por qRT-PCR los cambios en los niveles de mensajero en los genes seleccionados. Las transfecciones se verificaron por western blot usando un anticuerpo específico para C/EBP $\beta$  (ver

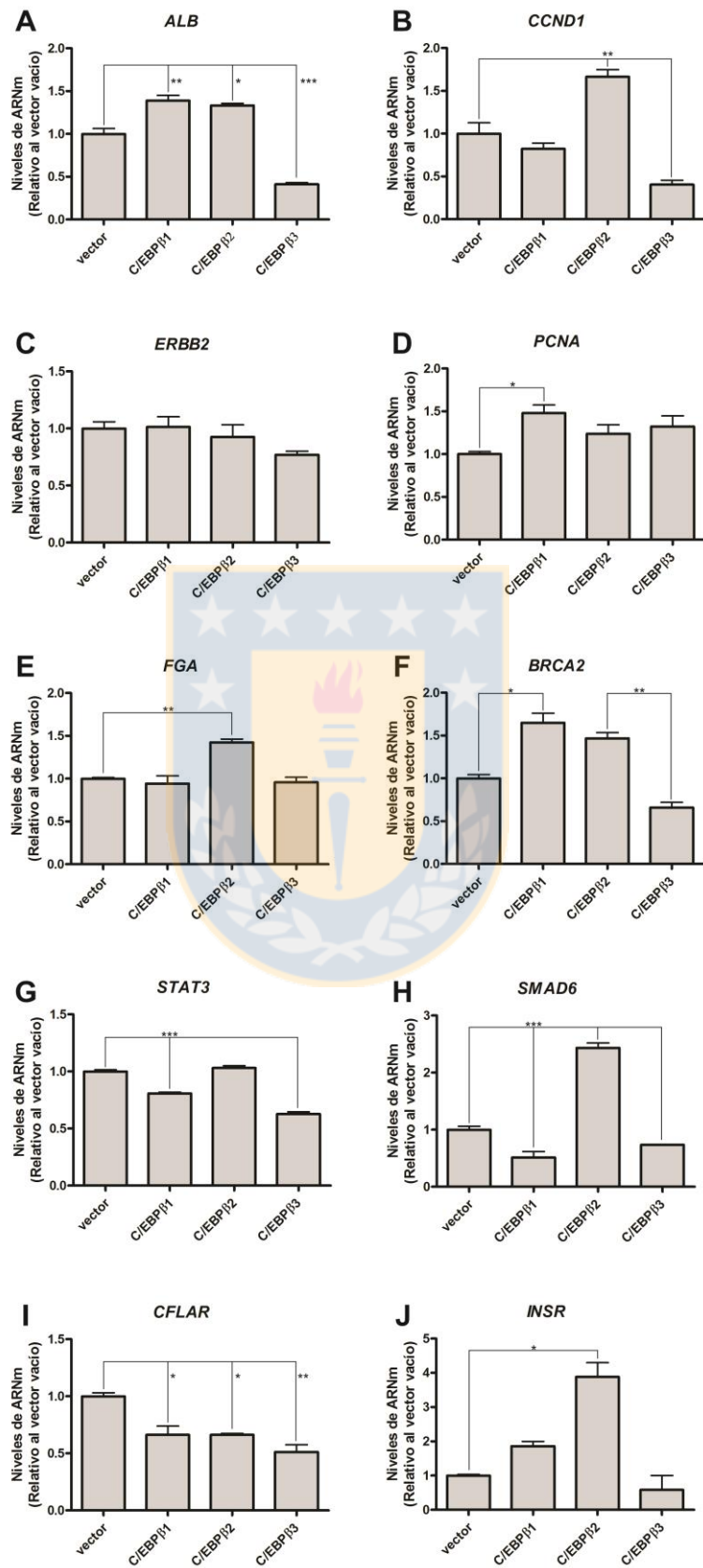
sección 11, Materiales y Métodos) (Figura 12A); el análisis del ARN extraído se puede observar en la Figura 12B.

Para realizar estos estudios se diseñaron partidores específicos para cada gen, los cuales se muestran en la Tabla 2. Los resultados de las qRT-PCR para los distintos genes se pueden observar en la Figura 13. En esta se pueden identificar algunos genes que siguen el patrón esperado en este trabajo, de aumento de niveles de mensajero por sobreexpresión de las isoformas largas, como son los genes *ALB* y *BRCA2* (Figura 13A y F). Otros genes solo mostraron un aumento con C/EBP $\beta$ 2, como son *CCND1*, *FGA*, *SMAD6* y *INSR* (Figura 13B, E, H y J). El resto de los genes no mostraron el patrón esperado en éste trabajo (aumento de los niveles de mensajero con hC/EBP $\beta$ 1 y/o hC/EBP $\beta$ 2; no cambio o disminución de los niveles de mensajero con hC/EBP $\beta$ 3), por lo que no se siguió adelante con ellos.

Para corroborar de mejor manera los genes seleccionados, lo ideal hubiese sido el también transfectar con vectores de expresión de las proteínas HMG estudiadas en este trabajo, para tener la certeza de que estas estarían actuando como activadores transcripcionales sobre los genes seleccionados. Sin embargo, por limitaciones de tiempo no se abordó este aspecto.



**Figura 12: Verificación de transfecciones en células HepG2.** Células HepG2 fueron transfectadas con vectores codificantes para alguna de las tres isoformas de C/EBP $\beta$  o con el vector vacío (pcDNA3.1HisC). (A) Western blot (gel 12%) para la verificación de las transfecciones, usando un anticuerpo específico para C/EBP $\beta$  (Santa Cruz Biotechnology). (B) Electroforesis en gel de agarosa 1.5% para analizar integridad del ARN purificado para cada condición, donde se logra observar los fragmentos 28S y 18S del ARNr. ST: Células HepG2 no transfectadas; V/V: Células HepG2 transfectadas con el vector vacío. Fuente: Elaboración propia.





**Figura 13: Análisis del efecto de las isoformas de hC/EBP $\beta$  sobre los niveles de ARN mensajero de los genes seleccionados.** Células HepG2 fueron transfectadas con vectores codificantes para alguna de las tres isoformas de C/EBP $\beta$  o con el vector vacío (pcDNA3.1HisC), para luego medir por qRT-PCR como se afectan los niveles de ARNm de diez genes blanco de C/EBP $\beta$ . Para cada condición, los valores obtenidos en la cuantificación del ARNm fueron normalizados con el ARNm del gen de referencia *HPRT1*. Los valores se graficaron relativo a la transfección con el vector vacío. Las barras de error para los datos de las qRT-PCR representan la desviación estándar de las reacciones de PCR realizados por triplicados. Los asteriscos muestran diferencias significativas (\* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ ), obtenidas desde ANOVA de una vía. Las células se transfectaron con 1  $\mu$ g de cada vector, respectivamente. Fuente: Elaboración propia.

#### 4.6 Análisis de unión de C/EBP $\beta$ y proteínas HMGs a los promotores de genes seleccionados

Una vez seleccionados los genes que seguían el patrón esperado de aumentar los niveles de ARNm al sobreexpresar alguna de las isoformas largas de C/EBP $\beta$ , se procedió a verificar si a estos promotores se encontraba C/EBP $\beta$  unido bajo nuestras condiciones de estudio en células HepG2. Para lograr este objetivo se diseñaron partidores dirigidos a la región donde se encuentran los sitios de unión para C/EBP $\beta$  y para HMGA, según sea el caso, para los genes *ALB*, *BRCA2*, *INSR*, *CCND1* y *SMAD6* (Tabla 4). Se usaron dos anticuerpos específicos contra C/EBP $\beta$  para realizar experimentos de inmunoprecipitación de cromatina, uno que reconoce las tres isoformas (C/EBP $\beta$  C-19, Santa Cruz Biotechnology) y el otro que solo reconoce las isoformas largas (C/EBP $\beta$  21A1, Thermo). El usar estos dos anticuerpos nos permite tener mayor claridad de las isoformas que se encuentran en el promotor. El resultado de las inmunoprecipitaciones de cromatina (ChIP) se pueden observar en la Figura 14.

Los resultados demuestran que efectivamente C/EBP $\beta$  se encuentra unido a los promotores de los genes seleccionados, verificando la selección de genes realizada anteriormente. Para los genes *ALB*, *SMAD6*, *BRCA2*, *INSR* y *CCND1*, se comprobó la presencia de C/EBP $\beta$  en sus promotores. Esto, junto con los resultados de las qRT-

PCR realizados anteriormente, comprobó a estos genes como los indicados para realizar los estudios de cómo se afecta la presencia de HMGA1 y HMGB1 por la presencia de las distintas isoformas de C/EBP $\beta$ , y viceversa.

Los resultados obtenidos en este punto solo demuestran que C/EBP $\beta$  se encuentra en los promotores de los genes seleccionados, y al usar un anticuerpo que reconoce las tres isoformas (C-19) y otro que reconoce las isoformas largas solamente (21A1), se puede deducir que en las células HepG2, bajo nuestras condiciones de ensayo, en los promotores de los genes *ALB*, *SMAD6* y *BRCA2* hay unida una mayor proporción de las isoformas largas de C/EBP $\beta$ , en comparación con los genes *INSR* y *CCND1*, donde la proporción de isoforma corta unida es mayor. Dado que se desconoce cuál de los anticuerpos posee una mayor eficiencia de inmunoprecipitación, no podemos determinar si hay mayor o menor unión de isoformas largas o corta en un gen particular (a no ser que obtengamos nula inmunoprecipitación de uno de los anticuerpos por sobre el control de IgG, que no es el caso para ninguno de los promotores analizados), pero sí podemos observar la variación de proporción en los términos relativos recién indicados.

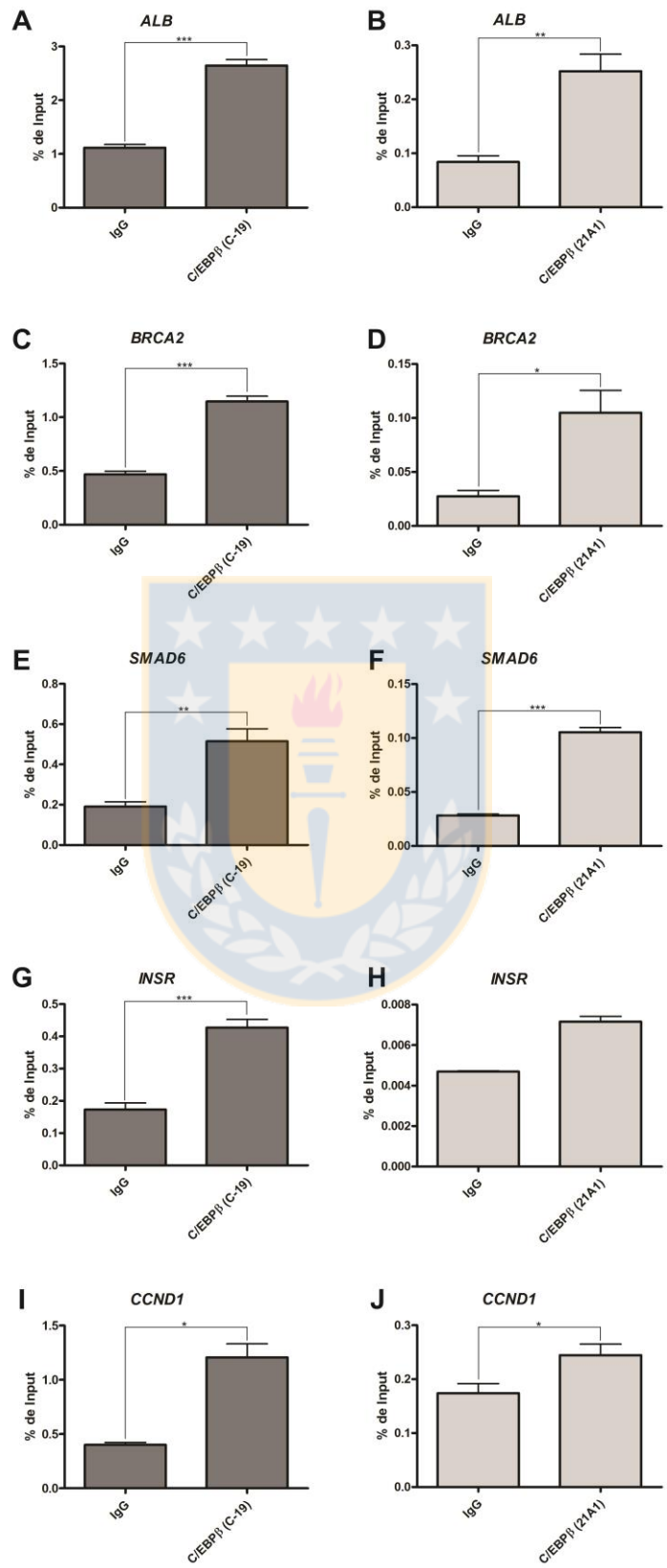
A continuación se procedió a inmunoprecipitar con anticuerpos específicos para HMGA1 (ab4078; Abcam) y HMGB1 (ab18256; Abcam), para observar la ocupancia de estas en los promotores de los genes blanco seleccionados al sobreexpresar C/EBP $\beta$ 1. Por limitaciones de tiempo no se realizó el experimento con las otras formas de C/EBP $\beta$ . Debido a que anteriormente determinamos que existe interacción entre C/EBP $\beta$ 1 y las proteínas HMGA1 y HMGB1, esperábamos que la presencia de C/EBP $\beta$ 1 en los promotores de genes coincidiera con la presencia de las proteínas HMG estudiadas.

En la Figura 15 se puede observar los resultados de las inmunoprecipitaciones para todos los genes estudiados, en donde se puede apreciar que al sobreexpresar C/EBP $\beta$ 1, los niveles de ocupancia de HMGB1 en los promotores aumenta para todos

los genes estudiados, incluso para los genes que en un principio no se seleccionaron como blancos de HMGB1 (*BRCA2*, *SMAD6* e *INSR*).

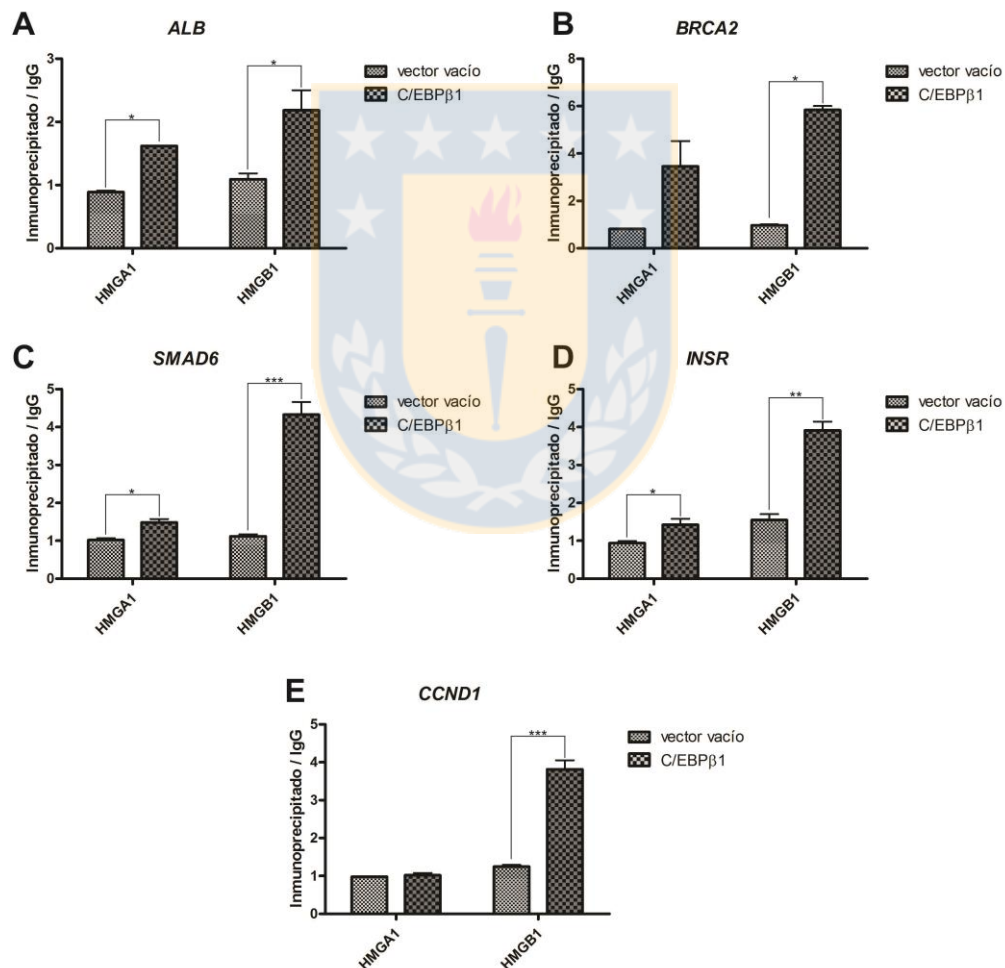
Para el caso de HMGA1 se logra apreciar un incremento en los genes blancos de este (*SMAD6*, *BRCA2* e *INSR*). Por otro lado, se observa un aumento de HMGA1 en el gen *ALB* el cual es un blanco de HMGB1, esto podría deberse a la presencia de secuencias ricas en AT cercanas al sitio de unión para C/EBP $\beta$ , en los cuales aún no se determina que HMGA1 pueda a unirse. En el caso del gen *CCND1*, se observa que no hay unión de HMGA1 lo que concuerda con lo esperado.





**Figura 14: Análisis de la ocupancia de C/EBPβ en los promotores de genes seleccionados.**

Células HepG2 fueron tratadas para obtener la cromatina e inmunoprecipitar con dos anticuerpos específicos para C/EBPβ: C-19 (barras grises oscuras) y 21A1 (Barras grises claras). Posteriormente se realizó PCR en tiempo real para medir la ocupancia de esta proteína en los promotores de los genes *ALB*, *BRCA2*, *SMAD6*, *INSR* y *CCND1*. El Input fue usado para realizar la curva estándar y cuantificar las muestras. Se realizaron inmunoprecipitaciones con anticuerpos IgG no específicos como controles. Las barras de error para los datos de las qPCR representan la desviación estándar de las reacciones de PCR realizadas por triplicados. Los asteriscos muestran diferencias significativas (\* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ ), obtenidas desde *t*-test. Fuente: Elaboración propia.



**Figura 15: Análisis de la ocupancia de HMG A1 y HMG B1 en los promotores de genes seleccionados.** Células HepG2 transfectadas con vector vacío (pcDNA3.1HisC) o C/EBPβ1 (pcDNA3.1HisC/C/EBPβ1), fueron tratadas para obtener la cromatina e inmunoprecipitar con

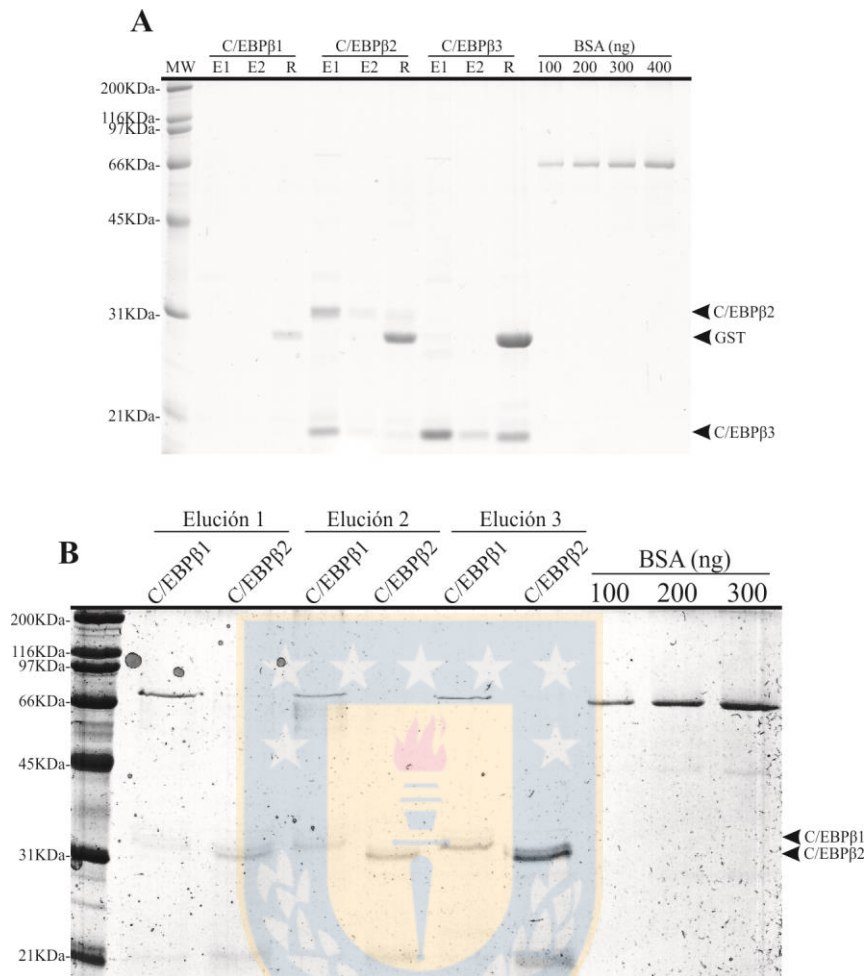
anticuerpos específicos para HMGA1 y HMGB1. Posteriormente se realizó PCR en tiempo real para medir la ocupancia de estas proteínas en los promotores de los genes *ALB*, *BRCA2*, *SMAD6*, *INSR* y *CCND1*. El Input fue usado para realizar la curva estándar y cuantificar las muestras. Se realizaron inmunoprecipitaciones con anticuerpo IgG no específico como controles (de conejo en todos los casos). Las barras de error para los datos de las qPCR representan la desviación estándar de las reacciones de PCR realizadas por triplicado. Los asteriscos muestran diferencias significativas (\* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ ), obtenidas desde *t*-test. Los resultados se muestran como veces de inmunoprecipitado con anticuerpo específico sobre lo inmunoprecipitado con anticuerpo IgG no relacionado. Fuente: Elaboración propia.

#### **4.7 Analisis del efecto de proteínas HMG sobre la unión de las isoformas de C/EBP $\beta$ a su secuencia consenso**

Para complementar los estudios de inmunoprecipitación de cromatina, se procedió a determinar el efecto de las isoformas de C/EBP $\beta$  sobre la unión de HMGA1 y HMGB1, sobre una secuencia ideal de ADN mediante ensayos de retardo electroforético (EMSA). Como se ha descrito anteriormente las proteínas HMG pueden estimular la unión de un factor de transcripción a su sitio de unión (Foti *et al.* 2003; Henderson *et al.* 2004; Bianchi y Agresti, 2005; Reeves, 2010). Además, Foti *et al.* (2003) han demostrado que HMGA1 estimula la unión de C/EBP $\beta$  a una región del promotor del gen del receptor de insulina (*INSR*). Sin embargo, estos ensayos fueron realizados usando extracto nuclear de células 3T3-L1, en el cual se demostró la presencia C/EBP $\beta$  (usando anticuerpo que reconoce las tres isoformas) mediante ensayos de *super shift*. Este grupo también demostró que HMGA1 interacciona con C/EBP $\beta$ , mediante GST pull-down. En el desarrollo del trabajo vinculado al primer objetivo de este trabajo se demostró la interacción diferencial entre las proteínas HMG con las isoformas de C/EBP $\beta$ , por lo que mediante ensayos de EMSA se decidió observar específicamente si la unión de las isoformas a su secuencia diana se ve afectada por HMGA1, realizándose el mismo tipo de análisis con HMGB1.

Para realizar los ensayos de EMSA fue necesario purificar las isoformas de C/EBP $\beta$ , ya que las purificadas anteriormente se encontraban fusionadas a GST; las proteínas HMG ya se encontraban purificadas en trabajos relacionados al objetivo 1 (ver sección 3, Materiales y Métodos). La fusión a GST implica un potencial problema en los ensayos de EMSA, ya que se ha descrito que GST puede dimerizar (Niedziela-Majka *et al.* 1998). Por otro lado, la presencia de GST (29 KDa) en las isoformas de C/EBP $\beta$  podría afectar la interacción de HMG con las isoformas de C/EBP $\beta$  en el contexto de la unión de estas proteínas al ADN. Es por este motivo que se decidió purificar estas proteínas nuevamente, para lo que se usaron los vectores mencionados anteriormente (ver sección 14, Materiales y Métodos), que generan una proteína en fusión a GST y también con el epítipo 6xHistidina, entre los que existe un sitio de corte para la enzima trombina. Esto permite purificar en primer lugar por una columna de glutatión-sefarosa y, posterior al corte con trombina, purificar por una columna de Níquel-agarosa. Sin embargo, la purificación por la columna de Níquel-agarosa no se logró con éxito, ya que por alguna razón las proteínas no pudieron ser eluidas de la segunda columna. Debido a este problema se decidió realizar la purificación hasta la etapa de corte con trombina, como se explica en la sección 14 de Materiales y Métodos. Una vez realizado el corte, se colectaron las eluciones y se les agregó inhibidores de proteasas y glicerol para dejar al 15%.

En las eluciones se mantuvieron algunas bandas contaminantes que no pudieron ser removidas, de aproximadamente 66KDa y 21KDa. Repetidos intentos por remover esas contaminantes no prosperaron, por lo que se escogieron las eluciones con la menor cantidad de contaminantes para trabajar. Se realizaron varias purificaciones para obtener concentraciones óptimas de proteína para los ensayos de EMSA, pero las concentraciones obtenidas al cuantificar siempre fueron bajas, en especial en las isoformas largas, rondando los 10ng/ $\mu$ l para C/EBP $\beta$ 1 y C/EBP $\beta$ 2, y los 40ng/ $\mu$ l para C/EBP $\beta$ 3 (Figura 16).



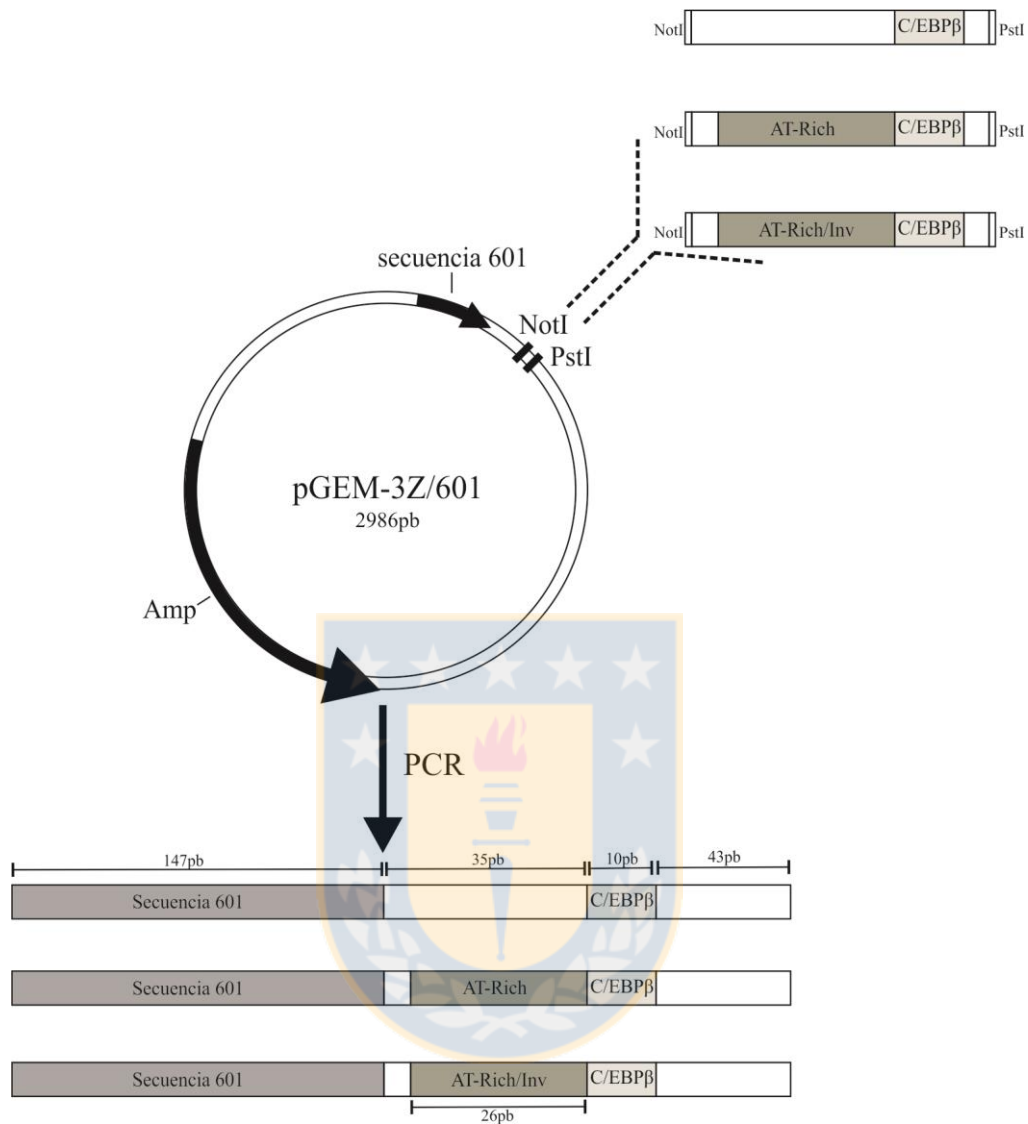
**Figura 16: Purificación y cuantificación de C/EBPβ1, C/EBPβ2 y C/EBPβ3 fusionados a epítoto 6xHis.** (A-B) Análisis de las purificaciones mediante SDS-PAGE en un gel al 12% y posterior tinción con azul de Coomassie. Con flechas se indican las bandas correspondientes a las proteínas obtenidas después la remoción de GST por corte con trombina. Se sembraron concentraciones crecientes de Albúmina de Suero Bovino (BSA). (B) Se sembraron distintas eluciones obtenidas de C/EBPβ1 y 2. MW: Marcador de tamaño molecular; R: Resina después del corte con trombina; E: Eluciones. Fuente: Elaboración propia.

Para poder obtener la sonda que se utilizó en los ensayos de EMSA, la cual debía poseer un sitio de unión para C/EBPβ y HMGA (HMGB1 no tiene sitio de unión consenso), fue necesario adquirir dos oligonucleótidos complementarios, para generar un cassette y este introducirlo al vector pGEM-3Z/601 (Anexo 1), el cual posee una



secuencia 601 que permite posicionar un nucleosoma. Este último elemento permite la generación de sondas que presenten una buena eficiencia de reconstitución a la forma de mononucleosomas, permitiendo mayor cercanía al contexto cromatínico en que se encuentran las secuencias regulatorias en la célula. Como se muestra en la Tabla 5, se generaron 3 cassettes distintos, cada uno para la generación de un vector particular: El primer cassette posee una secuencia rica en AT y el sitio de unión para C/EBP $\beta$ ; el segundo posee la secuencia rica en AT invertida respecto del primer cassette y el sitio de unión para C/EBP $\beta$ ; el tercero no posee la secuencia rica en AT, en cambio posee una secuencia al azar de igual extensión en pares de base y el sitio de unión para C/EBP $\beta$ . Todos estos cassettes poseen en sus extremos sitios de restricción para las enzimas *NotI* y *PstI*, utilizados para la inserción en el vector pGEM-3Z/601 (ver sección 15, Materiales y Métodos). La estrategia de generación de los vectores se muestra en la Figura 17.



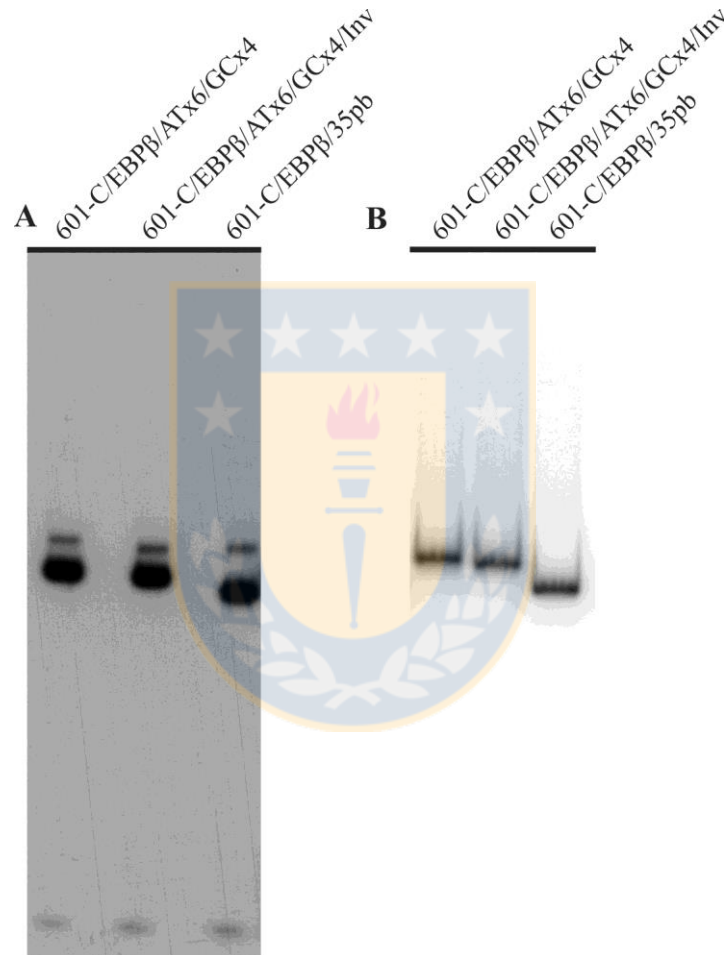


**Figura 17: Subclonamientos y generación de las sondas con secuencia rica en AT y sitio de unión para C/EBPβ.** Representación esquemática de las estrategias utilizadas para la generación de los vectores y la generación de las sondas. En primer lugar los cassettes con sitios de unión para HMGA y C/EBPβ se insertaron en el vector pGEM-3Z/601, previa digestión del vector con las enzimas *NotI* y *PstI*. Luego de la obtención de los vectores se realizó una reacción de PCR cada vez que se requería obtener las sondas, los que incluyen la secuencia posicionadora de nucleosoma (secuencia 601) presente previamente en el vector pGEM-3Z/601. Fuente: Elaboración propia.

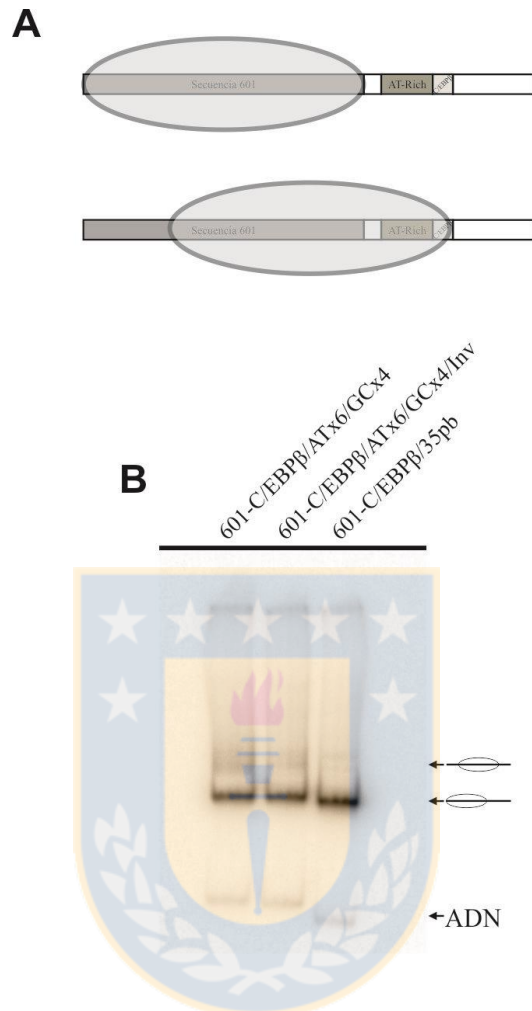
Una vez tenidos los vectores y proteínas correspondientes para la realización de los ensayos de EMSA, se procedió a realizar el marcaje del extremo 5' del *primer* sentido (ver sección 17, Materiales y Métodos). En todo momento durante el marcaje se fue corroborando la efectividad de la marca usando un contador Geiger. Una vez marcado el *primer* se procedió a realizar la PCR radioactiva, la cual anteriormente fue estandarizada en frío (sin radioactividad) (Anexo 2) para maximizar el rendimiento y la especificidad, un esquema de los productos generados se pueden observar en la Figura 17. Posterior a la PCR radioactiva se cargaron los productos de la PCR en un gel de poliacrilamida al 5% para realizar la respectiva purificación de los fragmentos, como se muestra en la Figura 18A, donde además se pueden apreciar otras bandas contaminantes de menor intensidad, las cuales son el motivo de realizar esta purificación por gel. Luego de tener los fragmentos purificados, se procedió a cuantificarlos, obteniendo concentraciones de entre 0.5 a 1pmol/ $\mu$ l (Figura 18B). Gracias a este procedimiento se pueden tener intensidades de bandas uniformes y únicas para cada especie en los ensayos de EMSA.

A continuación se procedió a realizar la reconstitución nucleosomal, lo que deja como resultado principal mononucleosomas con el octámero de histonas posicionado en la secuencia 601 y los sitios de unión para C/EBP $\beta$  y HMGA en la región de ADN extranucleosomal o *linker*. Estos mononucleosomas reconstituidos son denominados nucleosomas laterales, dada la ubicación de la secuencia 601, que parte desde uno de los extremos del segmento de ADN (Figuras 17 y 19A). El resultado de una reconstitución típica se puede observar en la Figura 19B, donde se aprecia que además de la banda correspondiente a los mononucleosomas laterales, también aparece una pequeña población de mononucleosomas centrales, la cual no debería presentar problemas en los ensayos posteriores, dada su baja abundancia relativa (Figura 19B). Además también se aprecia una pequeña cantidad de ADN libre que no se reconstituyó como mononucleosoma, la cual por su baja representación tampoco representa un problema en términos de generación de bandas de unión en los ensayos que interfieran con las derivadas del probador reconstituido como nucleosoma. Por

otro lado, hay que tener en consideración para los ensayos posteriores que estos stocks de mononucleosomas marcados obtenidos (de los que se usaron 2.5µl en reacciones de 15µl) están a una concentración de 4fmol/µl y que poseen una concentración de oligonucleosomas no marcados (SON) de entre 12 a 16ng/µl, provenientes de la reconstitución nucleosomal.



**Figura 18: Generación del ADN marcado.** Análisis de los productos de PCR correspondientes a las tres sondas marcadas con  $^{32}\text{P}$  en gel de poliacrilamida no denaturante al 5%. (A) Electroforesis preparativa para la purificación de las sondas; las otras bandas de menor intensidad son productos inespecíficos. (B) Análisis electroforético de las sondas marcadas luego del proceso de purificación desde gel (como el mostrado en la figura A), que se utiliza también para la cuantificación de las sondas para posteriormente proceder a la reconstitución nucleosomal. La sonda de menor tamaño aparente corresponde al control. Fuente: Elaboración propia.

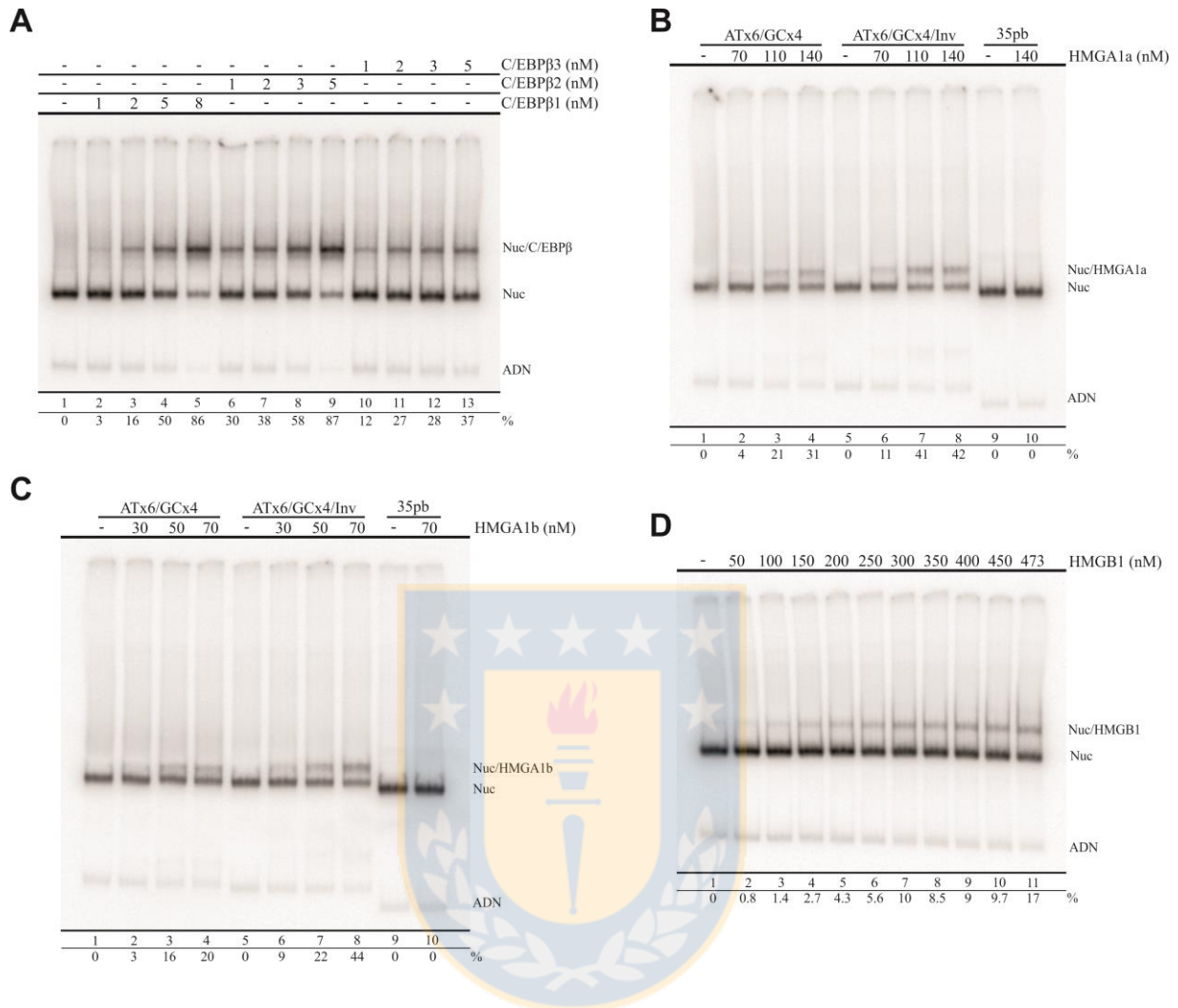


**Figura 19: Reconstitución nucleosomal.** Se realizó la reconstitución de las tres sondas marcadas radioactivamente. (A) Representación esquemática de los posibles resultados de una reconstitución promedio. (B) En la imagen se destacan las bandas de mayor intensidad correspondientes a los mononucleosomas laterales, las bandas superiores corresponden a mononucleosomas centrales y las bandas inferiores corresponden a ADN libre que no se reconstituyó. Fuente: Elaboración propia.

Una vez obtenidos los mononucleosomas marcados, se procedió a realizar una titulación con distintas concentraciones de cada isoforma de C/EBP $\beta$  y las proteínas HMG para observar los patrones de unión de éstas. Para el caso de C/EBP $\beta$  (Figura 20A) se usó la sonda control (35pb), debido a que el sitio de unión consenso de unión se encuentra en las tres sondas. Para el caso de las proteínas HMGA1a (Figura 20B)

y HMGA1b (Figura 20C) se realizó el análisis usando las sondas que poseen la secuencia rica en AT, para observar si existe un efecto por la inversión de la secuencia. Para el caso de la proteína HMGB1 (Figura 20D), que no posee un sitio de unión consenso al ADN, se usó la sonda control. Todos los ensayos fueron realizados en presencia de 190ng (12.7ng/μl) de SON como estrictez (40ng provenientes de la reconstitución más 150ng agregados a cada reacción de unión).

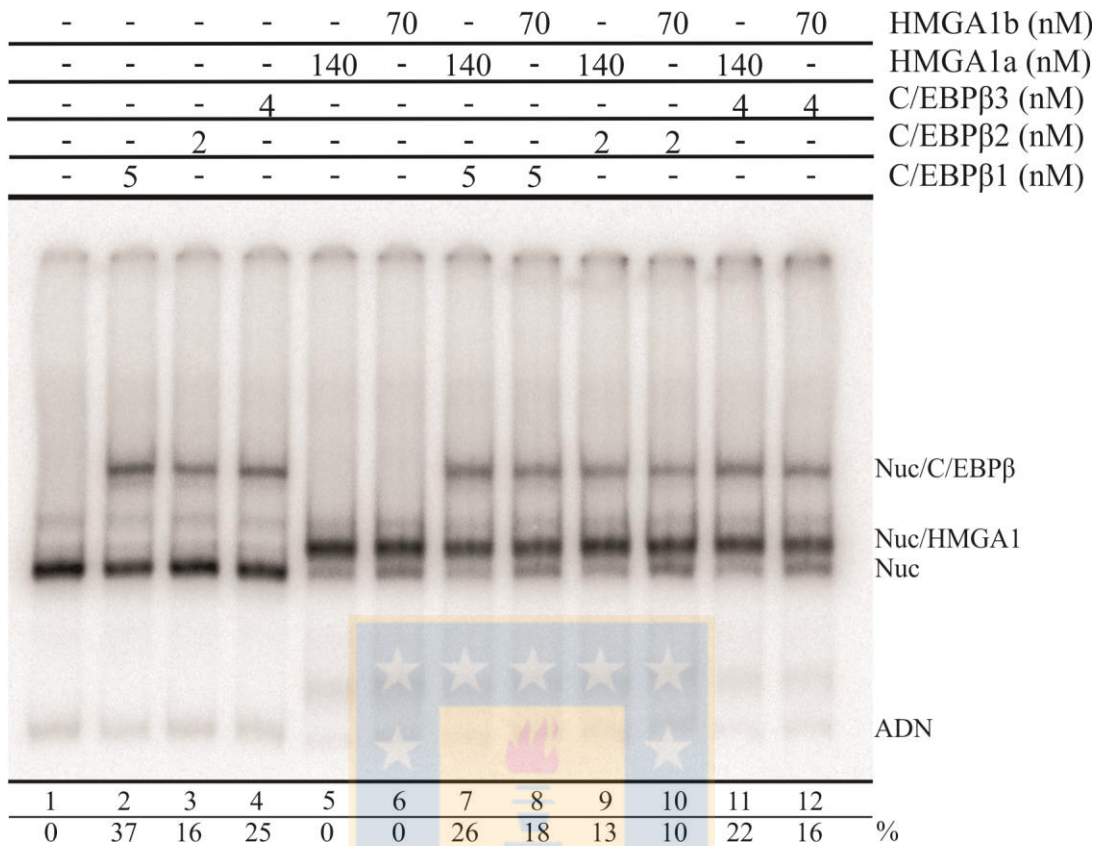
Como se puede observar en la Figura 20, todas las proteínas pueden unirse a los sitios de unión en el mononucleosoma, logrando niveles de unión adecuados para realizar los ensayos posteriores. Además, en todos los casos se observa una sola banda de unión, lo que indica que las contaminantes no se están uniendo al ADN. Para el caso de HMGA1 se observa que la unión es específica de la secuencia rica en AT, ya que en la sonda control no se observa unión con la máxima concentración usada. Por otro lado, las concentraciones usadas de HMGB1 para encontrar porcentajes de unión similares a los obtenidos con HMGA1a/b, fueron bastantes más altas que las usadas con estas proteínas. Esto es debido a que la estrictez usada afecta con una magnitud mayor la unión de HMGB1, dado que su unión a ADN no es secuencia específica, por lo que puede unirse tanto al ADN marcado como al no marcado presente en el SON, cosa que no sucede con C/EBPβ y sucede en menor grado con HMGA.



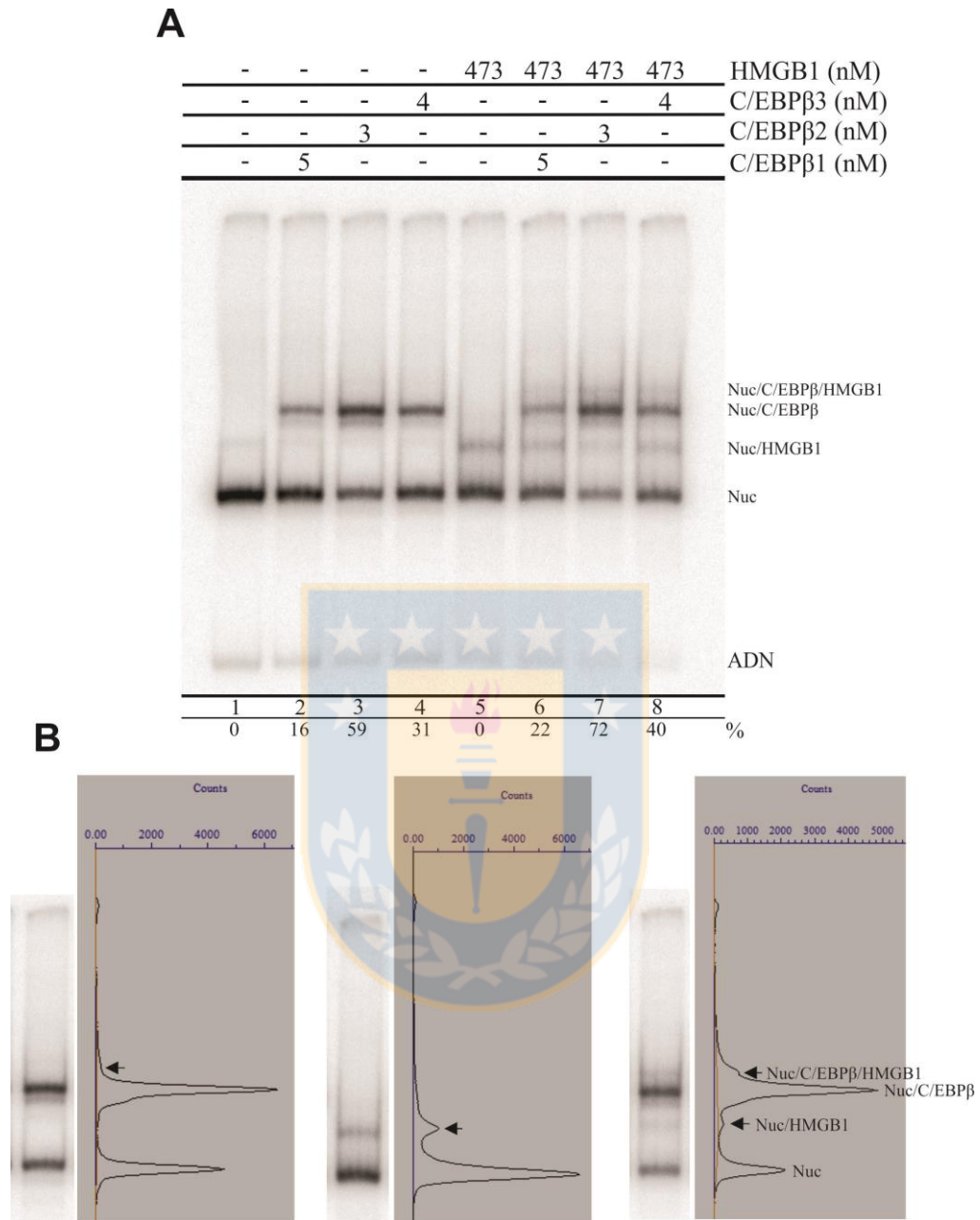
**Figura 20: Titulación de unión de proteínas al mononucleosoma.** Ensayo de unión de todas las proteínas usadas en este estudio. Las reacciones se realizaron bajo alta estrictez, consistente en la inclusión de 150ng de SON, quedando en 190 ng de SON totales por reacción (12,7 ng/μl). La unión de las proteínas se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida no denaturante al 5%. En la parte inferior de la imagen se muestra el porcentaje de unión de las proteínas. Nuc: Mononucleosoma. (A) Titulación de C/EBPβ al mononucleosoma control (35pb) usando concentraciones de entre 1 a 8nM de cada isoforma. (B) Titulación de HMGA1a a las tres sondas usando concentraciones de entre 70 a 140nM. (C) Titulación de HMGA1b a las tres sondas usando concentraciones de entre 30 a 70nM. (D) Titulación de HMGB1 al mononucleosoma control (35pb) usando concentraciones de entre 50 a 473nM. Fuente: Elaboración propia.

A continuación se procedió a realizar los ensayos de estimulación de la unión de las proteínas estudiadas. Todos los ensayos se realizaron bajo una estrictez de 190ng de SON y se usaron concentraciones de C/EBP $\beta$  que dieran bajo el 50% de unión. En la Figura 21 se puede observar que no existe estimulación de unión de ninguna de las isoformas de C/EBP $\beta$  por parte de HMGA1a y HMGA1b. Por el contrario, se observa una aparente disminución en la unión de C/EBP $\beta$  a la sonda ATx6/GCx4/Inv, resultado observado también para la sonda ATx6/GCx4; al parecer HMGA1 impide la unión del factor a la sonda, ya que si ambas estuvieran unidas a la sonda se observaría una banda de menor migración que la banda a Nuc/C/EBP $\beta$ . Para el caso de HMGB1 (Figura 22) se observa un resultado diferente: aunque a simple vista pareciera que también existe una disminución en la unión de C/EBP $\beta$ , al cuantificar se identifica un aumento en la unión del factor, junto a que también pareciera haber una unión conjunta de ambas proteínas a la sonda, lo que se observa por la aparición de una banda tenue de menor migración electroforética que la banda correspondiente al probador unido por C/EBP $\beta$ . Así, al comparar los perfiles de densidad de los carriles 3, 5 y 7, para observar el efecto con HMGB1 y C/EBP $\beta$ 2 (Figura 22B), se observa la disminución de la unión de HMGB1 y la aparición de un *peak* con una migración un poco menor a Nuc/C/EBP $\beta$ , lo que indicaría la unión de ambas proteínas al mononucleosoma. Esta pareciera depender de la concentración de C/EBP $\beta$  que está unida a la sonda, que en el caso de C/EBP $\beta$ 2 es mayor. Sin embargo, el aumento en la unión es para las tres isoformas de C/EBP $\beta$ , lo que en un principio no coincide con los análisis de interacción diferencial observados en el objetivo 1.





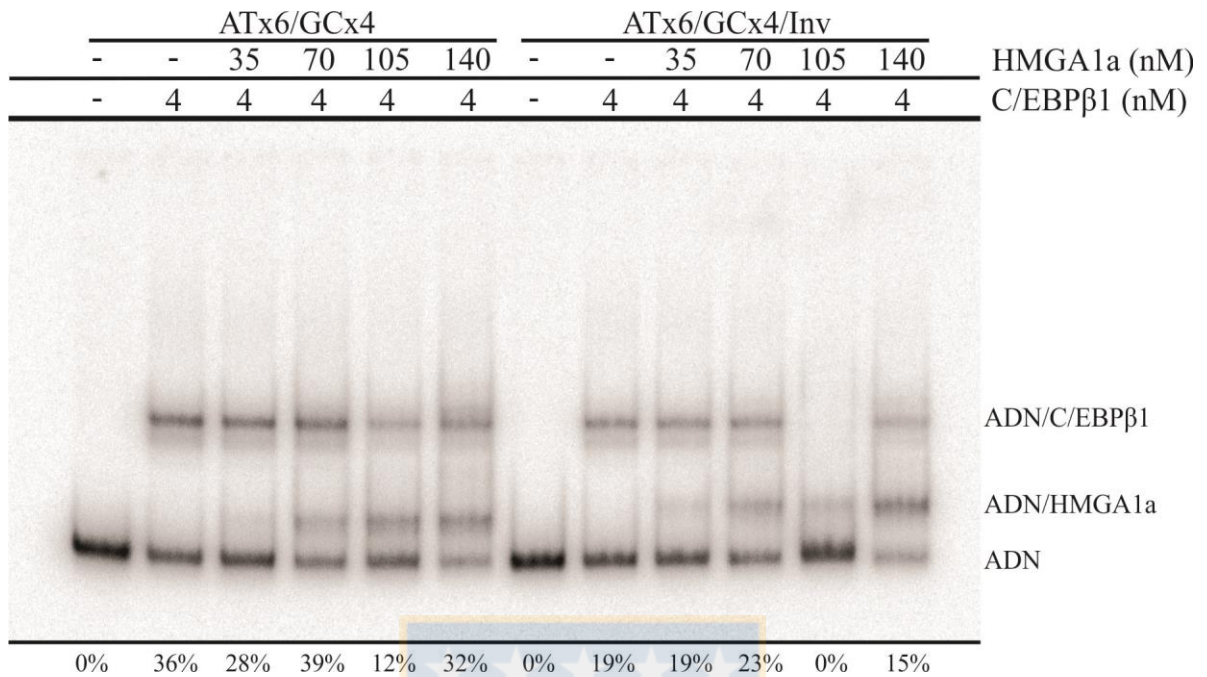
**Figura 21: Análisis de influencia de HMGA1 sobre la unión de C/EBPβ a un probador reconstituido como mononucleosoma.** Para todo el ensayo se usó la sonda ATx6/GCx4/Inv. Se usaron concentraciones de C/EBPβ que generan unión bajo el 50% y concentraciones de HMGA1 que generan unión sobre el 50%. En las reacciones se incluyó 190ng de SON. La imagen muestra el resultado de electroforesis en gel de poliacrilamida no denaturante al 5%. Los porcentajes de unión solo están basados en C/EBPβ. Los números inferiores corresponden al número del carril. Nuc: Mononucleosoma. Fuente: Elaboración propia.



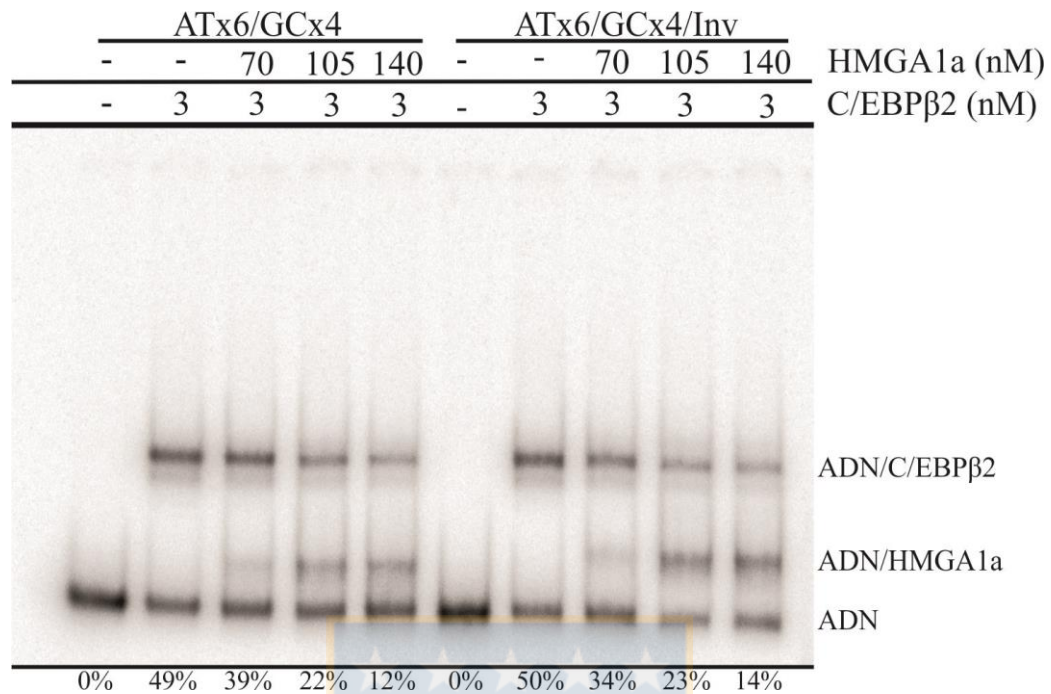
**Figura 22: Análisis de la unión conjunta de HMGB1 y C/EBP $\beta$  a un probador reconstituido como mononucleosoma.** (A) Para todo el ensayo se usó la sonda 35pb. Las reacciones fueron en condiciones de estrictez (190ng SON). La unión se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida no denaturante al 5%. Los porcentajes de unión solo están basados en C/EBP $\beta$ . Los números inferiores corresponden al número del carril. Nuc: Mononucleosoma. (B) Detalle del perfil de densidad entregado por el Quantity One de los carriles 3, 5 y 7. Fuente: Elaboración propia.

Como los resultados con HMGA1 no mostraron estimulación usando mononucleosomas, se realizó otro set de ensayos, pero esta vez el efecto se quiso ver sobre las sondas en la forma de ADN desnudo. Para ello solo se usó C/EBP $\beta$ 1 y HMGA1a, con una titulación de concentraciones de HMGA1a y una concentración fija de C/EBP $\beta$ 1 para observar cambios a medida que se aumenta la concentración de HMGA1a en ambas sondas de ADN (ATx6/GCx4 y ATx6/GCx4/Inv) (Figura 23). Como se puede observar, no existe estimulación en la unión de C/EBP $\beta$ 1. A simple vista se observa un efecto de disminución de la unión. Sin embargo, al cuantificar esta tendencia no es tan visible; en algunos carriles la unión se mantiene e incluso aumenta levemente, aunque estos cambios al ser muy leves pueden deberse al mismo error experimental. Por otro lado en los carriles en donde se observa una disminución, ésta tiende a ser mucho más marcada, lo que sería similar a lo observado en la Figura 21.

Para tener mayor claridad de la tendencia observada en los resultados, se realizó un ensayo cambiando la composición del buffer utilizado; en lugar de usar 20mM HEPES pH 7.9, se usó 10mM Tris-HCl pH 7.4. Además por problemas experimentales se usó C/EBP $\beta$ 2 en este ensayo, todo el resto se mantuvo igual al ensayo de la Figura 23. Como se observa en la Figura 24, en este buffer modificado tampoco ocurre estimulación en la unión de C/EBP $\beta$ 2. Sin embargo, en este ensayo se observa claramente la disminución de la unión de este factor al aumentar la concentración de HMGA1a.



**Figura 23: Influencia de HMGA1a sobre la unión de C/EBPβ1 al ADN.** Para el ensayo se usó las sondas ATx6/GCx4 y ATx6/GCx4/Inv y se mantuvo una concentración fija de C/EBPβ1, variando la concentración de HMGA1a. Las reacciones fueron en condiciones de estrictez (190ng SON). La imagen muestra el análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida no denaturante al 5%. Los porcentajes de unión solo están basados en C/EBPβ. Fuente: Elaboración propia.



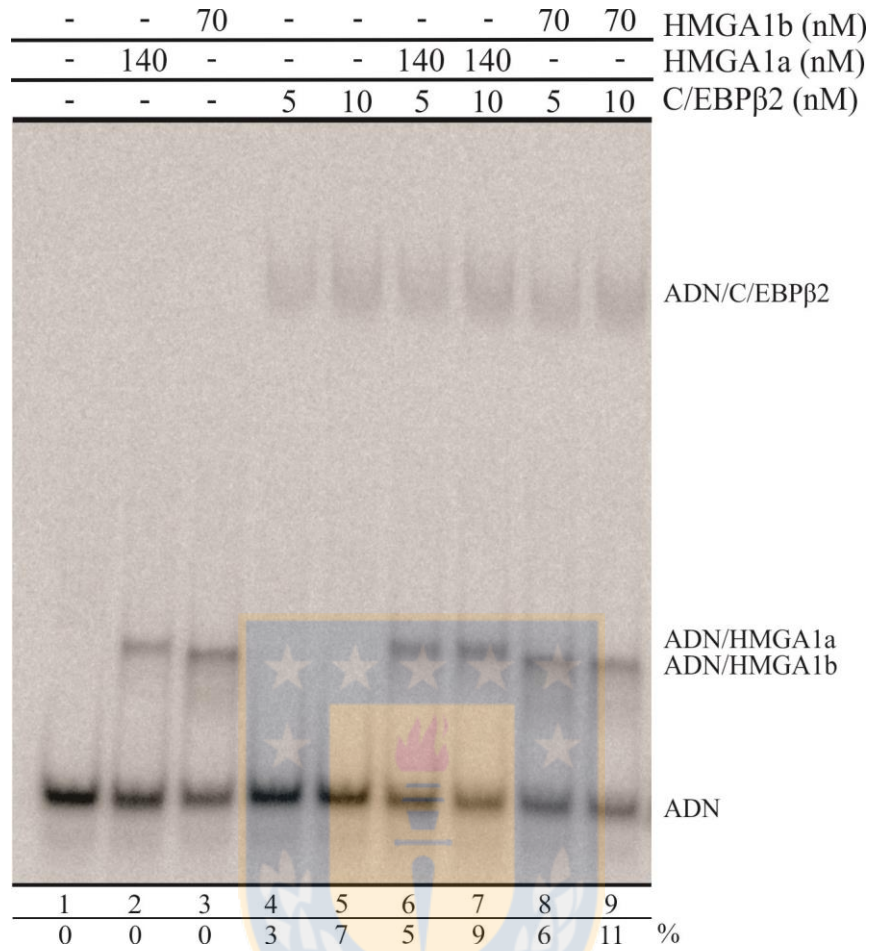
**Figura 24: Influencia de HMGA1a sobre la unión de C/EBPβ2 al ADN.** Para el ensayo se usó las sondas ATx6/GCx4 y ATx6/GCx4/Inv y se mantuvo una concentración fija de C/EBPβ2, variando la concentración de HMGA1a. Las reacciones fueron en condiciones de estrictez con 190ng SON y se cambió la composición del buffer en la solución de unión (ver detalles en el texto). La imagen muestra el resultado del análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida no denaturante al 5%. Los porcentajes de unión solo están basados en C/EBPβ. Fuente: Elaboración propia.

Debido a que los resultados de EMSA no resultaron como esperábamos al comienzo, observando por el contrario una inhibición en las uniones de C/EBPβ en presencia de HMGA1, planteamos la hipótesis de que la inhibición se puede deber a que los sitios de unión para ambas proteínas se encuentran juntos, generándose un impedimento físico en la unión de ambas. Para corroborar esta hipótesis se generó un cassette extra el cual posee la secuencia rica en AT y el sitio de unión para C/EBPβ (A4-02-CEBP), separados por dos nucleótidos y, a diferencia de la metodología usada anteriormente, este cassette no se insertó dentro del vector pGEM-3Z/601, sino que se marcó uno de los oligos (ver sección 17.2, Materiales y Métodos) y se hibridó junto al otro para generar como probador un oligonucleótido doble hebra marcado (ver sección 15,

Materiales y Métodos). En el ensayo se usó C/EBP $\beta$ 2 purificado por una columna de níquel (Anexo 3) al igual que las proteínas HMG (ver sección 3, Materiales y Métodos) y como estrictez se usó 100ng de ADN frío en un volumen de reacción de 15 $\mu$ l.

Como se muestra en la Figura 25, aparentemente no se observa disminución en la unión de C/EBP $\beta$ 2 en presencia de las HMGA1. Por el contrario, se observa un leve aumento en la unión de ésta. Sin embargo, el aumento observado es muy leve pudiendo deberse al mismo error experimental; debido al estado de decaimiento de la radioactividad no se pudieron realizar más experimentos de este tipo. De todas formas el resultado del ensayo muestra claramente que no existe disminución de la unión, por lo que más estudios con esta sonda o usando sondas con mayor separación entre los sitios de unión podrían entregar el resultados diferentes a los encontrados con las otras sondas analizadas en esta tesis.





**Figura 25: Influencia de HMGA1 sobre la unión de C/EBP $\beta$ 2 a la sonda A4-02-CEBP.** Para el ensayo se usó la sonda A4-02-CEBP y dos concentraciones de C/EBP $\beta$ 2 en presencia de concentraciones fijas de HMGA1a o HMGA1b. Las reacciones fueron en condiciones de estrictez (100ng ADN frío en 15 $\mu$ l de reacción). La imagen corresponde a electroforesis en gel de poliacrilamida no denaturante al 5%. Los porcentajes de unión solo están basados en C/EBP $\beta$ . Fuente: Elaboración propia.

## 5. DISCUSIÓN.

En este trabajo de tesis se estudió la relación entre las isoformas de C/EBP $\beta$  y las proteínas HMG e histona H1. Para ello primero se determinó la existencia de una interacción diferencial de las isoformas de C/EBP $\beta$  con las proteínas HMGA1a, HMGA1b, HMGB1 e histona H1. En segundo lugar se encontraron genes blancos para poder estudiar la presencia de C/EBP $\beta$  y las proteínas HMGA1 y HMGB1. Por último se estudió en los promotores de los genes blancos seleccionados y en una secuencia de ADN ficticia, la unión de las proteínas HMG en función de la presencia de C/EBP $\beta$ .

En primer lugar se procedió a purificar todas las proteínas recombinantes para realizar los ensayos de interacción proteína-proteína por GST pull-down. Las isoformas de C/EBP $\beta$  se purificaron como proteínas de fusión a GST. Dado que este procedimiento se realizó anteriormente en el laboratorio, no hubo mayores inconvenientes en las purificaciones. Para el caso de HMGA1a, HMGA1b y HMGB1, se pudo obtener las proteínas de interés, pero estas siempre co-purificaban con algunas otras proteínas contaminantes, lo cual no fue un problema significativo por su poca abundancia en comparación a la proteína recombinante de interés. A continuación se realizaron los ensayos de GST pull-down, los cuales para las proteínas HMG demostraron su interacción preferencialmente con C/EBP $\beta$ 1 y C/EBP $\beta$ 2; para el caso de histona H1 la interacción no fue diferencial, aunque sí se puede observar interacción preferencial con C/EBP $\beta$ 2 y C/EBP $\beta$ 3. Anteriormente se ha descrito que C/EBP $\beta$  interacciona con HMGA1 y que esta interacción tiene una relación funcional con el gen del receptor de insulina (Foti *et al.* 2003). Sin embargo, en ese estudio no se determinó qué isoforma(s) de C/EBP $\beta$  interacciona(n) con HMGA1. Así, nuestros resultados podrían ayudar a entender mejor los roles de las isoformas de C/EBP $\beta$  en la regulación de algunos genes como el receptor de insulina. Por extensión, puede ayudar a conocer de mejor manera aspectos en los que radican funciones disímiles de estas isoformas, ya que se ha asociado a las distintas isoformas de C/EBP $\beta$  con roles diferenciales en distintos procesos celulares (Nerlov, 2010). Para el caso de HMGB1 no existen publicaciones



que muestren existencia de interacción con C/EBP $\beta$ ; solo se ha descrito la presencia de un motivo presente exclusivamente en C/EBP $\beta$ 1 que permitiría la interacción (Dintilhac y Bernués, 2002), lo que nuestros resultados no estarían validando del todo. Esto debido a que observamos que sí existe interacción diferencial entre las distintas isoformas, pero HMGB1 estaría interaccionando no solo con C/EBP $\beta$ 1, sino que también con C/EBP $\beta$ 2. Estos resultados pueden abrir todo un campo de investigación, ya que el posible vínculo entre estas proteínas aún no se ha relacionado de alguna manera funcional con la regulación transcripcional ni con efectos sinérgicos en la dinámica de la cromatina, existiendo antecedentes de que HMGB1 puede participar en ambos procesos (Bianchi y Agresti, 2005; Reeves, 2010). En el caso de C/EBP $\beta$  e histona H1 tampoco se ha descrito interacción anteriormente, por lo que estos resultados obtenidos también podrían abrir un campo de estudio para ver la relación entre ambos en la regulación transcripcional y en la dinámica de la cromatina. Sin embargo, los resultados obtenidos con esta no concuerdan con los estudios previos de espectrometría de masas (Tabla 1), los que muestran que histona H1 interacciona preferencialmente con C/EBP $\beta$ 3. Tal vez el replicar más veces este ensayo, lo que no se pudo hacer por problemas experimentales y de tiempo, y el realizar otros enfoques para observar la interacción podría dilucidar si efectivamente es diferencial la interacción. Las diferencias observadas en los ensayos de GST pull-down realizados en este trabajo con respecto a los mostrados en la Tabla 1, se puede deber a que en los resultados de la Tabla 1 provienen del uso de extracto nuclear, mientras que para el caso de las HMG se usaron las proteínas purificadas. Así, se podría estar en presencia de un escenario en que las isoformas largas de C/EBP $\beta$ , que son usualmente activadores de la transcripción (Nerlov, 2010), pueden interaccionar con estas proteínas HMG, que generalmente también lo son (Travers, 2003; Catez *et al.* 2004; Bianchi y Agresti, 2005), mientras que C/EBP $\beta$ 3, que principalmente es un inhibidor de la transcripción (Kowenz-Leutz y Leutz, 1999), puede interaccionar preferencialmente con la histona H1, que también lo es (Wolffe *et al.* 1997; Thomas, 1999; Richmond y Davey, 2003). Si estudios adicionales determinan interacción de las tres isoformas de C/EBP $\beta$  con histona H1, de todas maneras estaríamos en presencia

de una propiedad diferencial de estas isoformas, dada por la no existencia de interacción de C/EBP $\beta$ 3 con las proteínas HMG estudiadas.

Una vez validada la interacción diferencial con proteínas HMG observada en la espectrometría de masas, se seleccionaron genes blancos comunes para C/EBP $\beta$  y estas proteínas HMG con el objetivo de poder determinar si en sus promotores se da la presencia de ambas proteínas y cómo afecta esta interacción diferencial observada en la presencia de éstas. Finalmente se seleccionaron diez genes, cinco para C/EBP $\beta$  y HMGA1 (*BRCA2*, *ERBB2*, *INSR*, *SMAD6* y *STAT3*) y cinco para C/EBP $\beta$  y HMGB1 (*ALB*, *CCND1*, *CFLAR*, *PCNA* y *FGA*). En el caso de C/EBP $\beta$ , estos genes fueron seleccionados en base a datos de análisis masivos de ChIP-seq, ChIP-on-chip o literatura. En el caso de las proteínas HMG, la selección se realizó solo por literatura como se detalla en la Tabla 9. Una vez seleccionados los genes se buscó por qRT-PCR los genes que se activaran transcripcionalmente por C/EBP $\beta$ 1 y/o C/EBP $\beta$ 2, siendo por su parte reprimidos por C/EBP $\beta$ 3 (o sin cambio en la actividad transcripcional en presencia de esta isoforma). Esto en vista de los resultados de interacción diferencial observados en los GST pull-down y de que las proteínas HMG actúan usualmente como activadores transcripcionales (Travers, 2003; Catez *et al.* 2004; Bianchi y Agresti, 2005). De los diez genes blancos, solo cinco dieron un patrón similar a lo buscado, los cuales fueron *ALB*, *INSR*, *CCND1*, *SMAD6* y *BRCA2*.

Para el gen *ALB* estudios previos ya han descrito que en su promotor existen elementos que pueden ser reconocidos por C/EBP $\beta$  (Chojkier, 2005), los cuales se han corroborado por análisis de ChIP en líneas celulares hepáticas (Masaki *et al.* 2006) y nosotros mediante la misma técnica lo hemos validado en nuestras condiciones de ensayo. Además, también se ha descrito que C/EBP $\beta$ 1 puede aumentar la actividad transcripcional de este gen (Trautwein *et al.* 1996), coincidiendo con los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis. Sin embargo nuestros resultados muestran que, aparte de C/EBP $\beta$ 1, C/EBP $\beta$ 2 también actuaría como un activador transcripcional y que C/EBP $\beta$ 3 actuaría como un represor transcripcional. Estas observaciones

sugieren que la actividad transcripcional del gen *ALB* podría ser afectada por variaciones en los niveles relativos de las distintas isoformas de C/EBP $\beta$ . Por otro lado, en un estudio realizado para observar el efecto de suprimir HMGB1 sobre ciertos genes blancos del factor de transcripción HNF1 $\alpha$ , se determinó que la supresión de HMGB1, usando un siRNA específico, inhibe la expresión del gen *ALB* (Yu *et al.* 2008). Además, nuestros ensayos de CHIP muestran que HMGB1 aumenta su unión al promotor de este gen al sobreexpresar C/EBP $\beta$ 1. Esta observación y nuestros resultados de interacción diferencial, qRT-PCR y CHIP, apuntan a una relación funcional entre HMGB1 con las isoformas largas de C/EBP $\beta$ .

En el caso del gen *INSR*, como se mencionó anteriormente, Foti *et al.* (2003) han descrito tanto interacción física como funcional entre C/EBP $\beta$  y HMGA1 al regular este gen. Sin embargo, en este estudio no se determinó cuál isoforma de C/EBP $\beta$  interaccionaría con HMGA1 en la activación del gen *INSR*. Nuestros resultados muestran que las isoformas largas interaccionan con HMGA1 y estas además son las que muestran la propiedad de activar la transcripción del gen, así mismo, observamos un leve aumento en la unión de HMGA1 al sobreexpresar C/EBP $\beta$ 1. En este contexto, se ha descrito que insulina puede activar la vía m-TOR conduciendo a un aumento de la isoforma corta de C/EBP $\beta$  (Calkhoven *et al.* 2000; Guo *et al.* 2001; Duong *et al.* 2002; Khamzina *et al.* 2005; Perino *et al.* 2014), lo que es consistente con el hecho de que insulina puede actuar como un regulador negativo de la expresión del gen *INSR* (Mamula *et al.* 1990) y con nuestros resultados que muestran que C/EBP $\beta$ 3 no activa la transcripción del gen.

Anteriormente el gen *CCND1* ya se ha descrito como gen blanco de C/EBP $\beta$ . De hecho en algunos estudios se ha analizado el efecto de las distintas isoformas en la expresión de este gen. Sin embargo, diferentes aproximaciones pueden llevar a resultados diferentes. En un caso usando células HepG2 se observó que todas las isoformas de C/EBP $\beta$  pueden activar la transcripción de este gen, siendo activado mayormente por C/EBP $\beta$ 1 y C/EBP $\beta$ 2 (Steinberg *et al.* 2012). Por otro lado, en un estudio usando

distintas líneas celulares de tejido mamario, se observó que es C/EBP $\beta$ 2 el activador de este gen y en algunas líneas celulares de cáncer mamario C/EBP $\beta$ 1 incluso lo reprime levemente; en el caso de C/EBP $\beta$ 3, éste actuaría como un represor transcripcional (Eaton *et al.* 2001). Nuestros resultados en células HepG2 muestran que efectivamente C/EBP $\beta$  se une al promotor de este gen y existe activación con C/EBP $\beta$ 2 y represión con C/EBP $\beta$ 3, patrón similar al de los resultados obtenidos por el grupo de Eaton *et al.* (2001), aunque no completamente al previamente observado en esta línea celular. Siguiendo en el contexto de la regulación transcripcional de *CCND1*, muchos estudios han relacionado a HMGB1 con su regulación, pero siempre de manera indirecta al ser HMGB1 una proteína que se puede encontrar en el núcleo y en el espacio extracelular. Estos estudios proponen por una parte que HMGB1 puede inducir la proliferación celular de manera extracelular al activar la vía de señalización PTEN/PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B, lo cual activa la transcripción de *CCND1* (Feng *et al.* 2014). Por otra parte, experimentos de *knockdown* de HMGB1 en distintos tipos celulares de cáncer, muestran que la expresión de *CCND1* disminuye junto con una disminución en la proliferación de las células (Feng *et al.* 2012). Se observa entonces que, si bien estos estudios previos no han profundizado en HMGB1 como regulador transcripcional directo de este gen, nuestros resultados muestran que existe interacción diferencial entre HMGB1 y las isoformas largas de C/EBP $\beta$ , además de observar un aumento de HMGB1 al promotor de este gen al sobreexpresar C/EBP $\beta$ 1, lo que daría indicios de que HMGB1 es un regulador directo de este gen y que participarían en conjunto con C/EBP $\beta$ . Con respecto a nuestros resultados, el aumento en la unión de HMGB1 se observó con C/EBP $\beta$ 1, lo que se podría extrapolar a C/EBP $\beta$ 2 considerando los resultados de interacción. Si consideramos esta idea, podría existir un rol activador conjunto de HMGB1 y de las isoformas largas de C/EBP $\beta$ , al menos con C/EBP $\beta$ 2. Con respecto al caso de C/EBP $\beta$ 1, no se descarta que pueda existir un rol activador junto a HMGB1, dado que se ha observado que este aumenta la transcripción de este gen en ciertas condiciones, por lo que nuestras condiciones muestran un resultado en la cual por algún otro factor, no se observa la activación de este gen.

Para el caso de *BRCA2*, C/EBP $\beta$  no ha sido implicado directamente en la regulación de éste. Sin embargo, ambos pueden participar en la progresión de cáncer de mama. Por un lado mutaciones en el gen supresor de tumores *BRCA2*, junto con muchas otras alteraciones en la expresión de este gen, conducen a la progresión del tumor (Skol *et al.* 2016). Por otro lado, el cambio en la relación de las isoformas de C/EBP $\beta$  también puede conducir a un fenotipo maligno, específicamente al aumentar C/EBP $\beta$ 3 (Zahnow, 2009; Arnal-Estapé *et al.* 2010; Park *et al.* 2013). En este contexto se ha observado que la proteína AURKA suprime al gen *BRCA2*, conduciendo a un fenotipo maligno (Yang *et al.* 2010). Nuestros resultados muestran que las isoformas largas activan la transcripción de este gen, mientras que C/EBP $\beta$ 3 muestra una leve represión, por lo que C/EBP $\beta$ 3 podría estar actuando como AURKA, pudiendo explicar en parte el efecto observado al cambiar la relación entre las isoformas largas y la isoforma corta, con la expresión del gen *BRCA2* y el fenotipo observado. Además, cabe destacar que se ha observado unión de C/EBP $\alpha$  y HMGA1, al promotor de este gen (Maia *et al.* 2012) y demostramos que la unión de HMGA1 aumenta al sobreexpresar C/EBP $\beta$ 1. Además, es conocido que los sitios de unión para C/EBP $\alpha$  y C/EBP $\beta$ , pueden ser compartidos (Ramji y Foka, 2002; Nerlov, 2010).

Para el último de los genes seleccionados para el set completo de análisis, *SMAD6*, no existe data que muestre que sea regulado por C/EBP $\beta$  ni tampoco por HMGA1. Sin embargo, por análisis *in silico* usando la base de datos EdgeExpressDB (FANTOM-RIKEN) y TFBIND INPUT, se pudo predecir posibles sitios de unión para nuestras proteínas de interés. Cabe mencionar que la vía de señalización Smad se relaciona con la activación de las isoformas largas de C/EBP $\beta$ , vía activada por TGF- $\beta$  (Gomis *et al.* 2006; Scott *et al.* 2013). Por lo que nuestros resultados de qRT-PCR podrían mostrar cómo las isoformas largas de C/EBP $\beta$  pueden regularse a sí mismas a través de la vía Smad, ya que *SMAD6* es un regulador negativo de esta vía y por lo tanto el incremento de su expresión puede funcionar como *feedback* negativo (Ishida *et al.* 2000; Li, 2015). Sin embargo, solo observamos aumento con C/EBP $\beta$ 2, mientras que

C/EBP $\beta$ 1 muestra una leve represión, un resultado similar al observado para el gen *CCND1*.

En todos los genes blancos seleccionados se procedió a validar los análisis masivos en términos de la unión de C/EBP $\beta$  a los promotores de estos genes, ya que para dos de nuestros genes (*BRCA2* y *SMAD6*) nunca se ha descrito en publicaciones específicas unión de C/EBP $\beta$  al promotor. Para ello se realizaron inmunoprecipitaciones de cromatina usando dos anticuerpos específicos para C/EBP $\beta$ , uno que reconoce las tres isoformas (C-19) y otro que reconoce solo las isoformas largas (21A1), con el objetivo de poder discriminar a grandes rasgos qué isoformas se encuentran unidas en el promotor. Tanto para *ALB*, *BRCA2* y *SMAD6*, se obtuvo mayor inmunoprecipitación con el anticuerpo que reconoce las isoformas largas, indicando mayor presencia de éstas en el promotor de estos genes. Esto en términos relativos a lo observado con el promotor de los genes *INSR* y *CCND1*, donde se obtuvo mayor inmunoprecipitación con el anticuerpo que reconoce las tres isoformas. Asumiendo que la variación en los niveles de ARNm de estos genes, derivados de la sobreexpresión de isoformas de C/EBP $\beta$ , se debe a variaciones en la actividad transcripcional de éstos, el encontrar a C/EBP $\beta$  unido a sus promotores sugiere fuertemente un efecto directo de este factor de transcripción sobre su transcripción. Como se ha mencionado anteriormente, la acción directa de C/EBP $\beta$  sobre algunos de estos genes se encuentra respaldada por otros estudios. Estos resultados también nos indican que la selección de genes hecha en base a resultados de qRT-PCR fue realizada correctamente.

Al sobreexpresar C/EBP $\beta$ 1 e inmunoprecipitar con anticuerpos específicos para HMGA1 y HMGB1, observamos que HMGB1 se une a los promotores de todos los genes, esto se puede explicar en medida porque HMGB1 no posee secuencia consenso de unión al ADN (Thomas y Travers, 2001) y estaría siendo guiada por C/EBP $\beta$ 1 a estos promotores, siempre considerando que esta no es una situación fisiológica ya que estamos sobreexpresando una proteína. Para el caso de HMGA1 se

observó aumento en sus genes blancos, aunque muy leve. Sin embargo, para el gen *ALB* se observó aumento aunque este no fue seleccionado como blanco de HMGA1, al realizar un análisis de secuencias cercanas al sitio de unión de C/EBP $\beta$  se observan secuencias AT que podrían servir como sitios de unión para HMGA1, aunque esta hipótesis se debería corroborar experimentalmente.

Para observar como es la dinámica en la unión de las isoformas de C/EBP $\beta$  y las proteínas HMG de manera directa y en un sistema más aislado, se propuso ver la cooperación de la unión de ambas proteínas en un sistema completamente *in vitro*. Aprovechando que ya se encontraban en disposición las proteínas HMG purificadas se procedió a realizar ensayos de EMSA para contestar de alguna manera la misma pregunta.

Para realizar los ensayos de EMSA fue necesario purificar las isoformas de C/EBP $\beta$ , ahora no fusionadas a GST, debido a que GST podría interferir en los ensayos. En un principio se intentó purificar las proteínas usando dos cromatografías de afinidad en tres pasos: i) Cromatografía de afinidad con una resina de glutatión; ii) Estando la proteína unida a la resina, realizar un corte con la enzima trombina para eluir la proteína; iii) Cromatografía de afinidad con una resina de Níquel. Sin embargo, el último paso de la purificación no resultó debido a que las proteínas no pudieron ser eluidas de la resina de Níquel, por lo que se optó por realizar lavados con 5mM de glutatión en la primera etapa y terminar la purificación en la elución con el corte con trombina. Una vez purificadas todas las proteínas se debió probar si estas eran funcionales en términos de su capacidad de unión a sus respectivas secuencias consenso. En el caso de HMGB1 esta prueba no requiere de una secuencia particular de ADN ya que esta HMG no posee secuencia consenso de unión (Thomas y Travers, 2001). Para C/EBP $\beta$  se usó la secuencia palindrómica 5'- ATTGCGCAAT -3' (Osada *et al.* 1996) y para HMGA1 se usó una secuencia rica en AT que anteriormente fue diseñada en el laboratorio para dar a cada motivo AT-Hook un segmento de unión en el ADN, separados por cuatro nucleótidos GC entre cada bloque rico en AT (Reeves y

Wolffe, 1996). También se utilizaron sondas con esta misma secuencia pero invertida respecto de las demás secuencias relevantes presentes en estas sondas (secuencia 601 y sitio de unión para C/EBP $\beta$ ). Posterior a la construcción de los plásmidos correspondientes se obtuvieron las sondas marcadas radioactivamente. En esta etapa se pudo observar que la secuencia control (que no posee la secuencia rica en AT) posee una migración electroforética distinta a las que poseen las sondas con secuencia rica en AT, lo que era inesperado ya que las tres sondas poseen el mismo tamaño (235pb). Se debe recordar que las electroforesis realizadas con estas sondas son de tipo no denaturante, por lo que este fenómeno se puede deber a la posible conformación estructural que toma la secuencia de ADN, la que podría estar generando una menor migración electroforética de las sondas con las secuencias ricas en AT. Al respecto, se ha demostrado que las secuencias repetitivas pueden curvar el ADN (Brukner *et al.* 1993; Reeves y Wolffe, 1996). Luego de tener las sondas marcadas, se realizaron los ensayos de unión, los cuales mostraron solo una banda con cada una de las proteínas, lo que es indicativo de que posibles contaminantes de las purificaciones no intervinieron en los ensayos posteriores.

Anteriormente se ha demostrado que HMGA1 estimula la unión de C/EBP $\beta$  al promotor del gen del receptor de insulina, estudio que incluyó ensayos de EMSA con uso de extracto nuclear de células 3T3-L1 y HMGA1 purificada (Foti *et al.* 2003). Nosotros, al tener cada isoforma de C/EBP $\beta$  purificada, procedimos a realizar ensayos de estimulación para cada una de estas e identificar cuál de estas es la que se ve estimulada. En un principio, luego de confirmar la interacción diferencial entre estas proteínas, esperábamos que HMGA1a y HMGA1b estimularan la unión de C/EBP $\beta$ 1 y C/EBP $\beta$ 2. Sin embargo, para nuestra sorpresa los resultados obtenidos mostraron algo totalmente inesperado, que ambas proteínas HMGA1 impiden la unión de las tres isoformas de C/EBP $\beta$  a su respectiva secuencia. Aparentemente, bajo nuestras condiciones de ensayo, ambas compiten por la unión a ADN.



Al realizar nuestros ensayos utilizando sondas a la forma de ADN desnudo en lugar de nucleosomas, se obtuvieron los mismos resultados. Este resultado se podría explicar por la cercanía de ambos sitios de unión en las sondas usadas, generándose una especie de impedimento en la unión de ambas. Al revisar la región del promotor de receptor de insulina (*INSR*) usada en el trabajo de Foti *et al.* (2003), se observa que los sitios de unión para ambas se encuentran a una distancia de aproximadamente cuatro a seis nucleótidos dependiendo de cómo considerar estrictamente el sitio de unión de C/EBP $\beta$ . Debido a esto aprovechamos una sonda que teníamos disponible en donde la distancia entre ambos sitios es de dos nucleótidos y realizamos el mismo ensayo usando solo C/EBP $\beta$ 2. El resultado obtenido muestra que no hay una disminución en la unión de C/EBP $\beta$  en presencia de HMGA1; se observa un leve incremento de la unión de C/EBP $\beta$ , aunque se requieren más réplicas como para sacar una conclusión en ese sentido. Este resultado apunta a que experimentos posteriores usando sondas con distintas distancias entre los sitios de unión pueden dar claridad sobre si realmente existe una cooperación en la unión de ambas proteínas.

Por otro lado, otro fenómeno posible que puede explicar las diferencias en los resultados, es que al utilizar el grupo de Foti *et al.* (2003) un extracto nuclear para ver la unión de C/EBP $\beta$ , en este se encuentren otras proteínas que podrían estar también jugando un papel en esta estimulación; además también podrían afectar a estos ensayos el hecho que C/EBP $\beta$  pueda estar con alguna modificación post-traduccional, como ya se han descrito muchas (Nerlov, 2008; Zahnow, 2009; Lee *et al.* 2010; Leutz *et al.* 2011; Tsukada *et al.* 2011). De todas formas se debe consignar que nuestros ensayos realizados funcionaron en términos de obtenerse uniones específicas y variaciones de estas. El hecho de no observar estimulación en la unión de C/EBP $\beta$  por HMGA1 puede aún estar vinculado a nuestras condiciones de trabajo y/o diseño de sondas, lo que se debe tener en cuenta en futuros experimentos.

Con respecto a HMGB1, se obtuvieron resultados positivos en relación a que ésta sí estaría estimulando la unión de C/EBP $\beta$ , aunque la estimulación al parecer no tendría

que ver con la interacción diferencial observada y más cooperatividad mutua dada por la interacción proteína-proteína, podemos estar frente a una estimulación de unión de C/EBP $\beta$  dada por HMGB1. Debido a que nuestros resultados muestran que se estimula la unión de las tres isoformas de C/EBP $\beta$ , el fenómeno se puede deber a otras propiedades de HMGB1, como su capacidad de doblar el ADN que podría facilitar la unión de C/EBP $\beta$  a su secuencia consenso, como ya se ha observado en otras oportunidades con otros factores de transcripción (Thomas y Travers, 2001; Bianchi y Agresti, 2005; Ueda y Yoshida, 2010).

El papel de las proteínas estudiadas en esta tesis es muy amplio, por lo que aún se pueden realizar muchos experimentos para aclarar los puntos abordados en este trabajo, en donde el primer paso sería finalizar de manera correcta el trabajo en los promotores de genes. Además, todas las proteínas estudiadas se han relacionado con el complejo SWI/SNF y otros complejos remodeladores de cromatina (Kowenz-Leutz y Leutz, 1999; Henderson *et al.* 2004; Ragab *et al.* 2006; Ducan y Zhao, 2007; Ugrinova *et al.* 2009; Steinberg *et al.* 2012; Hepp *et al.* 2014), por lo que se podría estudiar el efecto de estas interacciones en remodelación de cromatina y en accesibilidad a ciertas regiones del genoma. Finalmente, todos estos factores han mostrado ser de gran importancia en varios procesos celulares y también están implicados en varias patologías, como enfermedades metabólicas y cáncer (Kowenz-Leutz y Leutz, 1999; Melillo *et al.* 2001; Reeves *et al.* 2001; Esposito *et al.* 2009; Arnal-Estapé *et al.* 2010; Fedele y Fusco, 2010; Nerlov, 2010; Tang *et al.* 2010), lo que pone de relieve la relevancia de seguir avanzando en el conocimiento de los mecanismos mediante los cuales tanto estas proteínas HMG como las isoformas de C/EBP $\beta$  ejercen su acción de regulación transcripcional.

## 6. CONCLUSIONES.

- C/EBP $\beta$ 1 y C/EBP $\beta$ 2, no así C/EBP $\beta$ 3, interaccionan físicamente con las proteínas HMGA1a, HMGA1b y HMGB1, por lo que existe una interacción diferencial entre las isoformas de C/EBP $\beta$  y las proteínas HMG estudiadas.
- Histona H1.2 interacciona con C/EBP $\beta$ , aunque no se observó una evidente interacción diferencial.
- Los genes *ALB*, *CCND1*, *INSR*, *BRCA2* y *SMAD6*, son regulados de manera diferencial por las distintas isoformas de C/EBP $\beta$ .
- C/EBP $\beta$  se puede unir a los promotores de estos genes blancos.
- Nuestros resultados indican que *BRCA2* y *SMAD6* son genes blancos directos de C/EBP $\beta$ .
- Al sobreexpresar C/EBP $\beta$ 1 aumenta la unión de HMGB1 a los promotores de todos los genes blancos estudiados.
- HMGA1 en nuestras condiciones de ensayos no estimula la unión de las isoformas de C/EBP $\beta$  a su secuencia consenso.
- Existe una estimulación de la unión de C/EBP $\beta$  a su secuencia consenso dada por HMGB1. Al parecer la estimulación observada es independiente de su interacción proteína-proteína.

## 7. PROYECCIONES.

Nuestros resultados apuntan a la existencia de interacción física y funcional diferencial entre las isoformas de C/EBP $\beta$  y las proteínas HMG estudiadas, lo que da pie a realizar estudios que permitan confirmar los hallazgos realizados y profundizar en el conocimiento de los efectos funcionales que estas interacciones pueden tener. Estos estudios pueden incluir:

- Analizar el efecto de distintos niveles de sobreexpresión de las isoformas de C/EBP $\beta$  sobre los niveles de ARNm de los genes blanco seleccionados *ALB*, *SMAD6*, *BRCA2*, *INSR* y *CCND1*, a realizarse mediante transfección con distintas cantidades de los vectores de expresión de las diferentes isoformas y posterior medición de ARNm de estos genes blancos por qRT-PCR. Además, análisis de qRT-PCR para estos genes bajo sobreexpresión de HMGA1a, HMGA1b o HMGB1, permitirá definir o confirmar si estos genes son blanco de estas proteínas HMG.
- Evaluar la unión de HMGA1 y HMGB1 a los promotores de los genes seleccionados al sobreexpresar C/EBP $\beta$ 2 y C/EBP $\beta$ 3, mediante ensayos de ChIP.
- Estudiar mediante EMSA la dinámica de la unión de C/EBP $\beta$  y HMGA al variar la distancia entre los sitios de unión de ambas proteínas. De obtenerse distancias compatibles con un efecto cooperativo de unión, evaluar - mediante ensayos de gen reportero- la acción de ambos factores sobre promotores artificiales con distancias definidas entre los sitios.
- Determinar los genes en que se pueda dar uniones conjuntas de C/EBP $\beta$  y las proteínas HMG estudiadas, mediante experimentos de ChIP-seq en líneas celulares que expresen individualmente las distintas isoformas de C/EBP $\beta$ . Estos estudios, complementados con análisis de RNA-seq, pueden dar indicios de todos los genes que se ven regulados diferencialmente por este factor, en términos de la acción

conjunta con HMGA1 y HMGB1. En este ámbito, si la unión cooperativa de C/EBP $\beta$  y HMGA1 depende de la distancia entre sus sitios de unión en el ADN, cabe entonces esperar el no encontrar influencia mutua de unión a todos los genes que presentan ambas secuencias regulatorias.



## 8. REFERENCIAS.

Arnal-Estapé A., Tarragona M., Morales M., Guiu M., Nadal C., Massagué J., Gomis R.R. 2010. HER2 silences tumor suppression in breast cancer cells by switching expression of C/EBP $\beta$  isoforms. *Cancer Res.* **70**(23):9927-9936

Bianchi M.E., Agresti A. 2005. HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation. *Curr Opin Genet Dev.* **15**(5):496-506

Brukner I., Dlakic M., Savic A., Susic S., Pongor S., Suck D. 1993. Evidence for opposite groove-directed curvature of GGGCCC and AAAAA sequence elements. *Nucleic Acids Res.* **21**(4):1025-1029

Calkhoven C.F., Müller C., Leutz A. 2000. Translational control of C/EBP $\alpha$  and C/EBP $\beta$  isoform expression. *Genes Dev.* **14**(15):1920-1932

Campos E.I., Reinberg D. 2009. Histones: annotating chromatin. *Annu Rev Genet.* **43**:559-599

Cao Z., Umek R.M., McKnight S.L. 1991. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev.* **5**(9):1538-1552

Carstens C.P., Bonnardel J., Allen R., Waesche A. 2001. BL21-CodonPlus™ Cells Correct Expression Problems Caused by Codon Bias. *Stratagene.* **14**:3

Catez F., Hock R. 2010. Binding and interplay of HMG proteins on chromatin: lessons from live cell imaging. *Biochim Biophys Acta.* **1799**(1-2):15-27

Catez F., Yang H., Tracey K.J., Reeves R., Misteli T., Bustin M. 2004. Network of dynamic interactions between histone H1 and high-mobility-group proteins in chromatin. *Mol Cell Biol.* **24**(10):4321-4328

Chiappetta G., Botti G., Monaco M., Pasquinelli R., Pentimalli F., Di Bonito M., D'Aiuto G., Fedele M., Iuliano R., Palmieri E.A., Pierantoni G.M., Giancotti V., Fusco A. 2004. HMGA1 protein overexpression in human breast carcinomas: correlation with ErbB2 expression. *Clin Cancer Res.* **10**(22):7637-7644

Chojkier M. 2005. Inhibition of albumin synthesis in chronic diseases: molecular mechanisms. *J Clin Gastroenterol.* **39**(4 Suppl 2):S143-146

Chua S.L., See Too W.C., Khoo B.Y., Few L.L. 2011. UBC and YWHAZ as suitable reference genes for accurate normalisation of gene expression using MCF7, HCT116 and HepG2 cell lines. *Cytotechnology.* **63**(6):645-654

Clapier C.R., Cairns B.R. 2009. The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Biochem.* **78**:273-304

Del Rio V. 2012. Influencia de proteínas HMGA en la actividad catalítica de hSWI/SNF. Tesis para optar al Título de Bioquímico. Universidad de Concepción. Facultad de Farmacia

Dintilhac A., Bernués J. 2002. HMGB1 interacts with many apparently unrelated proteins by recognizing short amino acid sequences. *J Biol Chem.* **277**(9):7021-7028

Du K., Ding J. 2009. Insulin regulates TRB3 and other stress-responsive gene expression through induction of C/EBPbeta. *Mol Endocrinol.* **23**(4):475-485

Ducan B., Zhao K. 2007. HMGA1 mediates the activation of the CRYAB promoter by BRG1. *DNA Cell Biol.* **26**(10):745-752

Duong D.T., Waltner-Law M.E., Sears R., Sealy L., Granner D.K. 2002. Insulin inhibits hepatocellular glucose production by utilizing liver-enriched transcriptional inhibitory protein to disrupt the association of CREB binding protein and RNA polymerase II with the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene promoter. *J Biol Chem.* **277**(35):32234-32242

Eaton E.M., Hanlon M., Bundy L., Sealy L. 2001. Characterization of C/EBPbeta isoforms in normal versus neoplastic mammary epithelial cells. *J Cell Physiol.* **189**(1):91-105

Esposito F., Pierantoni G.M., Battista S., Melillo R.M., Scala S., Chieffi P., Fedele M., Fusco A. 2009. Interaction between HMGA1 and retinoblastoma protein is required for adipocyte differentiation. *J Biol Chem.* **284**(38):25993-26004

Fedele M., Fusco A. 2010. HMGA and cancer. *Biochim Biophys Acta.* **1799**(1-2):48-54

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

Feng X., Hao J., Liu Q., Yang L., Lv X., Zhang Y., Xing L., Xu N., Liu S. 2012. HMGB1 mediates IFN- $\gamma$ -induced cell proliferation in MMC cells through regulation of cyclin D1/CDK4/p16 pathway. *J Cell Biochem.* **113**(6):2009-2019

Feng X.J., Liu S.X., Wu C., Kang P.P., Liu Q.J., Hao J., Li H.B., Li F., Zhang Y.J., Fu X.H., Zhang S.B., Zuo L.F. 2014. The PTEN/PI3K/Akt signaling pathway mediates HMGB1 induced cell proliferation by regulating the NF- $\kappa$ B/cyclin D1 pathway in mouse mesangial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* **306**(12):C1119-1128



Foti D., Iuliano R., Chiefari E., Brunetti A. 2003. A nucleoprotein complex containing Sp1, C/EBP beta, and HMGI-Y controls human insulin receptor gene transcription. *Mol Cell Biol.* **23**(8):2720–2732

Friedmann M., Holth L.T., Zoghbi H.Y., Reeves R. 1993. Organization, inducible-expression and chromosome localization of the human HMG-I(Y) nonhistone protein gene. *Nucleic Acids Res.* **21**(18):4259–4267

Gomis R.R., Alarcón C., Nadal C., Van Poznak C., Massagué J. 2006. C/EBPbeta at the core of the TGFbeta cytosstatic response and its evasion in metastatic breast cancer cells. *Cancer Cell.* **10**(3):203-214

Guo S., Cichy S.B., He X., Yang Q., Ragland M., Ghosh A.K., Johnson P.F., Unterman T.G. 2001. Insulin suppresses transactivation by CAAT/enhancer-binding proteins beta (C/EBPbeta). Signaling to p300/CREB-binding protein by protein kinase B disrupts interaction with the major activation domain of C/EBPbeta. *J Biol Chem.* **276**(11):8516-8523

Henderson A., Holloway A., Reeves R., Tremethick D.J. 2004. Recruitment of SWI/SNF to the human immunodeficiency virus type 1 promoter. *Mol Cell Biol.* **24**(1):389-397

Hepp M.I., Alarcon V., Dutta A., Workman J.L., Gutiérrez J.L. 2014. Nucleosome remodeling by the SWI/SNF complex is enhanced by yeast high mobility group box (HMGB) proteins. *Biochim Biophys Acta.* **1839**(9):764-772

Hillion J., Dhara S., Sumter T.F., Mukherjee M., Di Cello F., Belton A., Turkson J., Jaganathan S., Cheng L., Ye Z., Jove R., Aplan P., Lin Y.W., Wertzler K., Reeves R., Elbahlouh O., Kowalski J., Bhattacharya R., Resar L.M. 2008. The high-mobility group A1a/signal transducer and activator of transcription-3 axis: an achilles heel for hematopoietic malignancies? *Cancer Res.* **68**(24):10121-10127

Ishida W., Hamamoto T., Kusanagi K., Yagi K., Kawabata M., Takehara K., Sampath T.K., Kato M., Miyazono K. 2000. Smad6 is a Smad1/5-induced smad inhibitor. Characterization of bone morphogenetic protein-responsive element in the mouse Smad6 promoter. *J Biol Chem.* **275**(9):6075-6079

Khamzina L., Veilleux A., Bergeron S., Marette A. 2005. Increased activation of the mammalian target of rapamycin pathway in liver and skeletal muscle of obese rats: possible involvement in obesity-linked insulin resistance. *Endocrinology.* **146**(3):1473-1481

Kowenz-Leutz E., Leutz A. 1999. A C/EBP beta isoform recruits the SWI/SNF complex to activate myeloid genes. *Mol Cell.* **4**(5):735-743

Längst G., Becker P.B. 2004. Nucleosome remodeling: one mechanism, many phenomena? *Biochim Biophys Acta.* **1677**(1-3):58-63

Laudet V., Stehelin D., Clevers H. 1993. Ancestry and diversity of the HMG box superfamily. *Nucleic Acids Res.* **21**(10):2493-2501

Lee S., Shuman J.D., Guszczynski T., Sakchaisri K., Sebastian T., Copeland T.D., Miller M., Cohen M.S., Taunton J., Smart R.C., Xiao Z., Yu L.R., Veenstra T.D., Johnson P.F. 2010. RSK-mediated phosphorylation in the C/EBP{beta} leucine zipper regulates DNA binding, dimerization, and growth arrest activity. *Mol Cell Biol.* **30**(11):2621-2635

Leutz A., Pless O., Lappe M., Dittmar G., Kowenz-Leutz E. 2011. Crosstalk between phosphorylation and multi-site arginine/lysine methylation in C/EBPs. *Transcription.* **2**(1):3-8

Li Q. 2015. Inhibitory SMADs: potential regulators of ovarian function. *Biol Reprod.* **92**(2):50

Lodish H., Kaiser C., Berk A., Krieger M., Matsudaira P., Scott M. 2005. Mecanismos genéticos moleculares básicos. *Biología celular y molecular.* 5ª ed. Buenos Aires, Argentina. Editorial médica panamericana

Luethy J.D., Fargnoli J., Park J.S., Fornace A.J. Jr., Holbrook N.J. 1990. Isolation and characterization of the hamster gadd153 gene. Activation of promoter activity by agents that damage DNA. *J Biol Chem.* **265**(27):16521-16526

MacDougald O.A., Cornelius P., Liu R., Lane M.D. 1995. Insulin regulates transcription of the CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) alpha, beta, and delta genes in fully-differentiated 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* **270**(2):647-654

Maia A.T., Antoniou A.C., O'Reilly M., Samarajiwa S., Dunning M., Kartsonaki C., Chin S.F., Curtis C.N., McGuffog L., Domchek S.M.; EMBRACE, Easton D.F., Peock S., Frost D., Evans D.G., Eeles R., Izatt L., Adlard J., Eccles D.; GEMO Study Collaborators, Sinilnikova O.M., Mazoyer S., Stoppa-Lyonnet D., Gauthier-Villars M., Faivre L., Venat-Bouvet L., Delnatte C., Nevanlinna H., Couch F.J., Godwin A.K., Caligo M.A.; SWE-BRCA, Barkardottir R.B.; kConFab Investigators, Chen X., Beesley J., Healey S., Caldas C., Chenevix-Trench G., Ponder B.A. 2012. Effects of BRCA2 cis-regulation in normal breast and cancer risk amongst BRCA2 mutation carriers. *Breast Cancer Res.* **14**(2):R63

Mamula P.W., McDonald A.R., Brunetti A., Okabayashi Y., Wong K.Y., Maddux B.A., Logsdon C., Goldfine I.D. 1990. Regulating insulin-receptor-gene expression by differentiation and hormones. *Diabetes Care.* **13**(3):288-301

Masaki T., Matsuura T., Ohkawa K., Miyamura T., Okazaki I., Watanabe T., Suzuki T. 2006. All-trans retinoic acid down-regulates human albumin gene expression through the induction of C/EBPbeta-LIP. *Biochem J.* **397**(2):345-353

Melillo R.M., Pierantoni G.M., Scala S., Battista S., Fedele M., Stella A., De Biasio M.C., Chiappetta G., Fidanza V., Condorelli G., Santoro M., Croce C.M., Viglietto G., Fusco A. 2001. Critical role of the HMGI(Y) proteins in adipocytic cell growth and differentiation. *Mol Cell Biol.* **21**(7):2485-2495

Melki M.T., Saïdi H., Dufour A., Olivo-Marin J.C., Gougeon M.L. 2010. Escape of HIV-1-infected dendritic cells from TRAIL-mediated NK cell cytotoxicity during NK-DC cross-talk--a pivotal role of HMGB1. *PLoS Pathog.* **6**(4):e1000862

Meyer M.B., Benkusky N.A., Pike J.W. 2014. The RUNX2 cistrome in osteoblasts: characterization, down-regulation following differentiation, and relationship to gene expression. *J Biol Chem.* **289**(23):16016-16031

Németh A., Längst G. 2004. Chromatin higher order structure: opening up chromatin for transcription. *Brief Funct Genomic Proteomic.* **2**(4):334-343

Nerlov C. 2008. C/EBPs: recipients of extracellular signals through proteome modulation. *Curr Opin Cell Biol.* **20**(2):180-185

Nerlov C. 2010. Transcriptional and translational control of C/EBPs: the case for "deep" genetics to understand physiological function. *Bioessays.* **32**(8):680-686

Niedziela-Majka A., Rymarczyk G., Kochman M., Ozyhar A. 1998. GST-Induced dimerization of DNA-binding domains alters characteristics of their interaction with DNA. *Protein Expr Purif.* **14**(2):208-220

Osada S., Yamamoto H., Nishihara T., Imagawa M. 1996. DNA binding specificity of the CCAAT/enhancer-binding protein transcription factor family. *J Biol Chem.* **271**(7):3891-3896

Owen-Hughes T., Utlely R.T., Steger D.J., West J.M., John S., Côté J., Havas K.M., Workman J.L. 1999. Analysis of nucleosome disruption by ATP-driven chromatin remodeling complexes. *Methods Mol Biol.* **119**:319-331

Park B.H., Kook S., Lee S., Jeong J.H., Brufsky A., Lee B.C. 2013. An isoform of C/EBP $\beta$ , LIP, regulates expression of the chemokine receptor CXCR4 and modulates breast cancer cell migration. *J Biol Chem.* **288**(40):28656-28667

Peluso S, Chiappetta G. 2010. High-Mobility Group A (HMGA) Proteins and Breast Cancer. *Breast Care (Basel).* **5**(2):81-85

Perino A., Pols T.W., Nomura M., Stein S., Pellicciari R., Schoonjans K. 2014. TGR5 reduces macrophage migration through mTOR-induced C/EBP $\beta$  differential translation. *J Clin Invest.* **124**(12):5424-5436

Poli V., Mancini F.P., Cortese R. 1990. IL-6DBP, a nuclear protein involved in interleukin-6 signal transduction, defines a new family of leucine zipper proteins related to C/EBP. *Cell.* **63**(4932):643-653

Ragab A., Thompson E.C., Travers A.A. 2006. High mobility group proteins HMGD and HMGZ interact genetically with the Brahma chromatin remodeling complex in *Drosophila*. *Genetics.* **172**(2):1069-1078

Ramji D.P., Foka P. 2002. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J.* **365**(pt 3):561-575

Raymond S., Weintraub L. 1959. Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. *Science*. **130**(3377):711

Reeves R. 2001. Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function. *Gene*. **277**(1-2):63-81

Reeves R. 2010. HMG Nuclear Proteins: Linking Chromatin Structure to Cellular Phenotype. *Biochim Biophys Acta*. **1799**(1-2):3

Reeves R., Edberg D.D., Li Y. 2001. Architectural transcription factor HMGI(Y) promotes tumor progression and mesenchymal transition of human epithelial cells. *Mol Cell Biol*. **21**(2):575-594

Reeves R., Wolffe A.P. 1996. Substrate structure influences binding of the non histone protein HMG-I(Y) to free nucleosomal DNA. *Biochemistry*. **35**(15):5063-5074

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

Roman C., Platero J.S., Shuman J., Calame K. 1990. Ig/EBP-1: a ubiquitously expressed immunoglobulin enhancer binding protein that is similar to C/EBP and heterodimerizes with C/EBP. *Genes Dev*. **4**(8):1404-1415

Saint-Auret G., Danan J.L., Hiron M., Blache C., Sulpice E., Tendil S., Daveau M., Gidrol X., Salier J.P. 2011. Characterization of the transcriptional signature of C/EBPbeta isoforms (LAP/LIP) in Hep3B cells: implication of LIP in pro-survival functions. *J Hepatol*. **54**(6):1185-1194

Scott J.M., Lakoski S., Mackey J.R., Douglas P.S., Haykowsky M.J., Jones L.W. 2013. The potential role of aerobic exercise to modulate cardiotoxicity of molecularly targeted cancer therapeutics. *Oncologist*. **18**(2):221-231

Sgarra R., Zammiti S., Lo Sardo A., Maurizio E., Arnolde L., Pegoraro S., Giancotti V., Manfioletti G. 2010. HMGA molecular network: From transcriptional regulation to chromatin remodeling. *Biochim Biophys Acta*. **1799**(1-2):37-47

Skol A.D., Sasaki M.M., Onel K. 2016. The genetics of breast cancer risk in the post-genome era: thoughts on study design to move past BRCA and towards clinical relevance. *Breast Cancer Res*. **18**(1):99

Song B., Song W.G., Li Z.J., Xu Z.F., Wang X.W., Wang C.X., Liu J. 2012. Effect of HMGB1 silencing on cell proliferation, invasion and apoptosis of MGC-803 gastric cancer cells. *Cell Biochem Funct*. **30**(1):11-17

Soullier S., Jay P., Poulat F., Vanacker J.M., Berta P., Laudet V. 1999. Diversification pattern of the HMG and SOX family members during evolution. *J Mol Evol*. **48**(5):517-527

Steinberg X.P., Hepp M.I., Fernández García Y., Suganuma T., Swanson S.K., Washburn M., Workman J.L., Gutiérrez J.L. 2012. Human CCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$  interacts with chromatin remodeling complexes of the imitation switch subfamily. *Biochemistry*. **51**(5):952-962

Sumter T.F., Xian L., Huso T., Koo M., Chang Y.T., Almasri T.N., Chia L., Inglis C., Reid D., Resar L.M. 2016. The High Mobility Group A1 (HMGA1) Transcriptome in Cancer and Development. *Curr Mol Med*. **16**(4):353-393

Tang D., Kang R., Zeh H.J. 3<sup>rd</sup>., Lotze M.T. 2010. High-mobility group box 1 and cancer. *Biochim Biophys Acta*. **1799**(1-2):131-140

Thomas J.O. 1999. Histone H1: location and role. *Curr Opin Cell Biol*. **11**(3):312-317

Thomas J.O., Travers A.A. 2001. HMG1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins. *Trends Biochem Sci*. **26**(3):167-174

Trautwein C., Rakemann T., Pietrangelo A., Plümpe J., Montosi G., Manns M.P. 1996. C/EBP-beta/LAP controls down-regulation of albumin gene transcription during liver regeneration. *J Biol Chem*. **271**(36):22262-22270

Travers A.A. 2003. Priming the nucleosome: a role for HMGB proteins? *EMBO*. **4**(2):131-136

Tsukada J., Yoshida Y., Kominato Y., Auron P.E. 2011. The CCAAT/enhancer (C/EBP) family of basic-leucine zipper (bZIP) transcription factors is a multifaceted highly-regulated system for gene regulation. *Cytokine*. **54**(1):6-19

Ueda T., Yoshida M. 2010. HMGB proteins and transcriptional regulation. *Biochim Biophys Acta*. **1799**(1-2):114-118

Ugrinova I., Pashev I.G., Pasheva E.A. 2009. Nucleosome binding properties and Co-remodeling activities of native and in vivo acetylated HMGB-1 and HMGB-2 proteins. *Biochemistry*. **48**(27):6502-6507

Vinson C.R., Sigler P.B., McKnight S.L. 1989. Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science*. **246**:911-916



Williams S.C., Cantwell C.A., Johnson P.F. 1991. A family of C/EBP-related proteins capable of forming covalently linked leucine zipper dimers in vitro. *Genes Dev.* **5**(9):1553-1567

Wolffe A.P., Khochbin S., Dimitrov S. 1997. What do linker histones do in chromatin? *Bioessays.* **19**(3):249-255

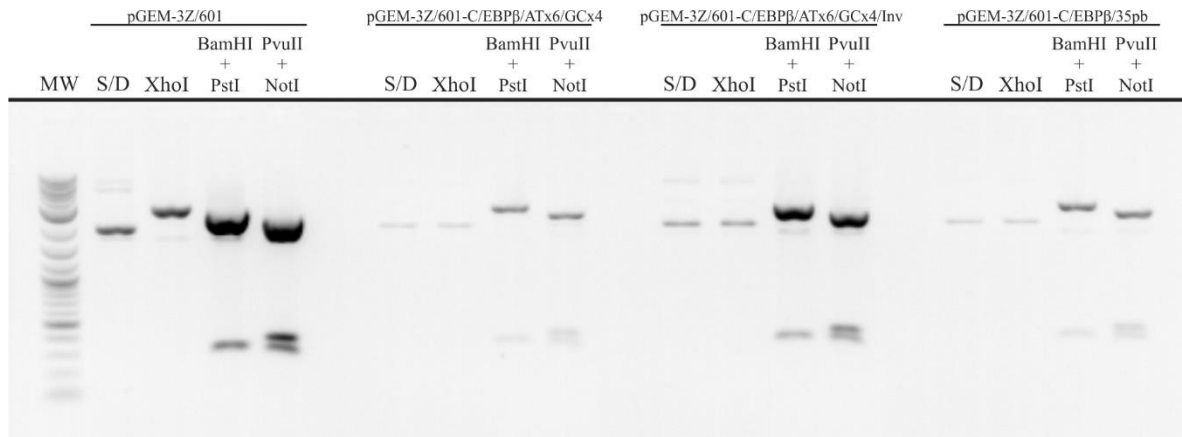
Yang G., Chang B., Yang F., Guo X., Cai K.Q., Xiao X.S., Wang H., Sen S., Hung M.C., Mills G.B., Chang S., Multani A.S., Mercado-Uribe I., Liu J. 2010. Aurora kinase A promotes ovarian tumorigenesis through dysregulation of the cell cycle and suppression of BRCA2. *Clin Cancer Res.* **16**(12):3171-3181

Yu M., Wang J., Li W., Yuan Y.Z., Li C.Y., Qian X.H., Xu W.X., Zhan Y.Q., Yang X.M. 2008. Proteomic screen defines the hepatocyte nuclear factor 1alpha-binding partners and identifies HMGB1 as a new cofactor of HNF1alpha. *Nucleic Acids Res.* **36**(4):1209-1219

Zahnow C.A. 2009. CCAAT/enhancer-binding protein beta: its role in breast cancer and associations with receptor tyrosine kinases. *Expert Rev Mol Med.* **11**:e12

Zhang J., Kou Y.B., Zhu J.S., Chen W.X., Li S. 2014. Knockdown of HMGB1 inhibits growth and invasion of gastric cancer cells through the NF- $\kappa$ B pathway in vitro and in vivo. *Int J Oncol.* **44**(4):1268-1276

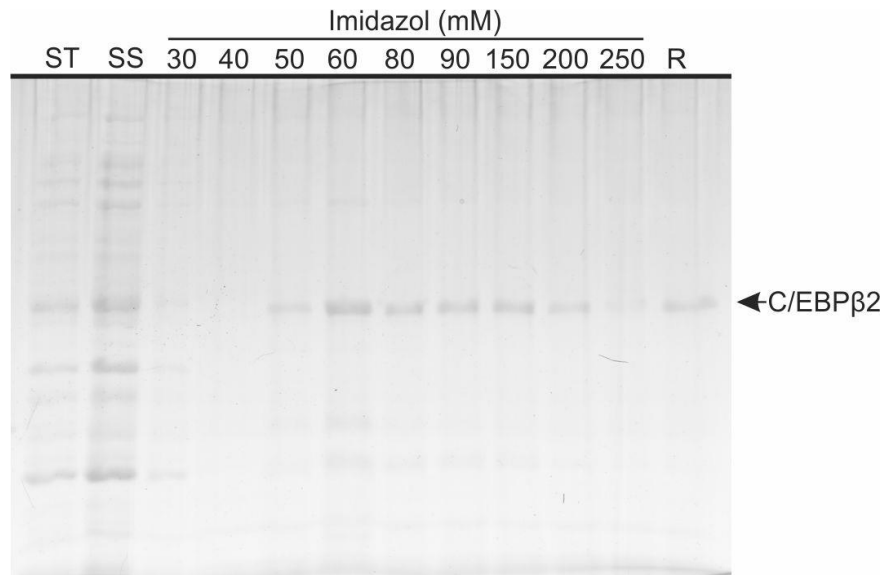
## ANEXOS.



**Anexo 1: Análisis de los vectores pGEM-3Z/601 con secuencia rica en AT y sitio de unión para C/EBP $\beta$ .** Se realizaron múltiples digestiones con las enzimas mostradas en la figura, para comprobar los vectores. pGEM-3Z/601 (pGEM-3Z/601-C/EBP $\beta$ ) corresponde al vector de partida y posee un sitio para *XhoI*, todos los demás vectores generados pierden este sitio. Las digestiones dobles realizan cortes fuera del sitio donde se inserta nuestro cassette, por lo que debería mantenerse el patrón en todos los vectores. Gel de agarosa al 1%. MW: Marcador de peso molecular. Fuente: Elaboración propia.



**Anexo 2: PCR en frío de las sondas.** Análisis del producto de la PCR en frío de las tres sondas generadas, en gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio. Todos los productos obtenidos tienen un peso cercano al esperado (223pb). MW: Marcador de peso molecular. Fuente: Elaboración propia.



**Anexo 3: Purificación de C/EBP $\beta$ 2-His.** Análisis de la purificación mediante SDS-PAGE en un gel al 12% y posterior tinción con azul de Coomassie. Se sembraron 10 $\mu$ l de cada muestra, excepto de ST que se sembraron 5 $\mu$ l. En el caso de la resina se sembraron 2.5 $\mu$ l de resina. La flecha indica la migración de C/EBP $\beta$ 2, las otras bandas son contaminantes de la purificación. Las distintas concentraciones de imidazol utilizadas en los lavados y eluciones se indican en la parte superior de la imagen. ST: Sonicado total; SS: Sobrenadante del sonicado; R: Resina. Fuente: Elaboración propia.