



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

**“Estudio de los requerimientos de factores generales de la transcripción (GTFs) y coactivadores en la transcripción dependiente de Homol D en *Schizosaccharomyces pombe*”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

**Nelly Sofía Nova Lobos**

**Director Seminario de Título:** Edio Maldonado Maldonado

**Patrocinante:** Marcelo Baeza Cancino

SANTIAGO – 2018

*Dedicado a mis padres, por  
estar siempre a mi lado y  
creer en mí, incluso cuando  
yo había perdido la  
esperanza, ustedes la  
tuvieron por mí. Los Amo*

## INDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	ii
INDICE DE CONTENIDOS.....	iii
INDICE DE TABLAS.....	v
INDICE DE FIGURAS.....	vi
ABREVIATURAS.....	vii
ABSTRACT.....	xi
RESUMEN.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 RNA Polimerasa.....	1
1.2. Elementos del Núcleo del Promotor (CPE).....	3
1.3. Factores Transcripcionales.....	9
1.4. Cofactores Generales.....	17
1.5. Transcripción.....	19
1.6. Secuencias Homol.....	22
1.7 Hipótesis.....	25
1.8 Objetivo general.....	25
1.9 Objetivos específicos.....	25
2. MATERIALES Y METODOS.....	26
2.1 Materiales.....	26
2.1.1 Células.....	26
2.1.2 Reactivos químicos.....	26
2.2 Métodos.....	26
2.2.1. Condiciones de Cultivo <i>S. pombe</i> en medio sólido y líquido.....	26
2.2.2. Preparación extractos de proteínas de <i>S. pombe</i> .....	27

2.2.3. Purificación de anticuerpos policlonales desde sueros de conejos.....	28
2.2.4. Western Blot.....	29
2.2.5. Transcripción <i>in vitro</i> e Inmunodepleción.....	31
2.2.6. Preparación sonda de DNA marcadas con P <sup>32</sup> γATP.....	32
2.2.7. EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay).....	34
3. RESULTADOS.....	35
3.1. Verificación de la actividad de los anticuerpos purificados.....	35
3.2. Determinación de los GTFs necesarios para la transcripción comandada por la caja Homol D.....	37
3.3. Análisis de unión de los GTFs a caja Homol D.....	42
4. DISCUSION.....	45
4.1. Obtención de anticuerpos.....	45
4.2. GTFs necesarios para la transcripción comandada por la caja Homol D.....	46
4.3. Unión de los GTFs a la caja Homol D.....	47
5. CONCLUSIONES.....	51
6. BIBLIOGRAFIA.....	52

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Función de los factores generales de la transcripción de la RNA Pol II.....	12
--	----

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Elementos del núcleo del promotor (CPE) y los factores que los reconocen....	8
Figura 2. Vías de Formación del Complejo de Preiniciación.....	20
Figura 3. Verificación anticuerpos mediante ensayo Western Blot.....	36
Figura 4. Requerimientos de GTFs de la transcripción dirigida por el promotor ribosomal K5 en <i>S. pombe</i> .....	38
Figura 5. Rescate de la transcripción dirigida por el promotor ribosomal K5 en <i>S.</i> <i>pombe</i> .....	40
Figura 6. Rescate de la transcripción dirigida por el promotor ribosomal K5 con Homol D invertida en <i>S. pombe</i> .....	41
Figura 7. Ensayos EMSA utilizando una sonda con el promotor ribosomal K5 de <i>S.</i> <i>pombe</i> .....	44

## ABREVIATURAS

CPE	Elementos del Núcleo del Promotor (Core Promoter Elements)
PIC	Complejo de Preiniciación (Pre-Initiation Complex)
GTFs	Factores Generales de la Transcripción (General Transcription Factors)
TBP	Proteína de unión a TATA (TATA Binding Protein)
TFII	Factor de Transcripción de la RNA Polimerasa II (A, B, E, F y H)
RNA Pol	RNA polimerasa (I, II, III, IV y V)
mRNA	RNA mensajero
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EMSA	Geles de Retardo (Electrophoretic Mobility Shift Assay)
TAF	Factor Asociado a TBP (1, 2, 5, 6 y 9)
RNA	Ácido Ribonucleico
rRNA	RNA ribosomal
tRNA	RNA de transferencia
siRNA	RNA pequeño de interferencia (Small Interfering RNA)
kDa	Kilodalton

CTD	Dominio del Carbono Terminal (C-terminal Domain)
Tyr	Tirosina
Ser	Serina
Pro	Prolina
Thr	Treonina
Pol IIA	RNA Polimerasa II inactiva o sin fosforilar (hipofosforilada)
Pol IIO	RNA Polimerasa II activa o fosforilada (hiperfosforilada)
UAS	Upstream Activator Sequence
URS	Upstream Repressor Sequence
CP	Núcleo del Promotor (Core Promoter)
BRE	Elemento de reconocimiento de TFIIB
Inr	Iniciador
MTE	Motif Ten Element
DPE	Downstream Promoter Element
DCE	Downstream Core Element
A	Adenina
T	Timina

G	Guanina
C	Citosina
TBP	TATA Binding Protein
Py	Pirimidina
XCPE	X Core Promoter Element (1y 2)
TFB	Transcription Factor B
CCD	Charged Cluster Domain
Glu	Ácido Glutámico
Asp	Ácido Aspártico
ATP	Adenosin Trifosfato
NER	Nucleotide Excision Repair
CAK	Ciclin-Activating Kinasa Complex
XPB	Helicasa que desenvuelve la hebra de DNA en la dirección 3'-5'
XPD	Helicasa que desenvuelve la hebra de DNA en el sentido 5'-3'
DBD	Dominio de unión a DNA (DNA-binding Domain)
AD	Dominio de Activación (Activation Domain)
USA	Upstream Stimulatory Activity

PC	Cofactores Positivos (1, 2, 3 y 4)
NC1	Cofactor Negativo 1
SRBs	Suppressors of RNA polymerase B mutations
Rpm	Revoluciones por minuto
DTT	Ditiotreitrol o Reactivo de Cleland
EDTA	Ácido Etilén Diaminotetraacético
EGTA	Ácido Tetraacético Etilenglicol
HEPES	Ácido 4- (2-hidroxietyl)-1-piperazinetanosulfónico
PMSF	Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo
APS	Persulfato de Amonio
SDS	Dodecilsulfato de sodio
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TEMED	N,N,N',N' - tetrametil etilen diamina
BSA	Albumina de Suero Bovino
BCIP	5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil Fosfato
NBT	P-Nitro Blue Tetrazolium
Cpm	Cuentas por minuto

## ABSTRACT

The transcription process is initiated by the Core Promoter Elements (CPE), leading the formation of the Pre-Initiation Complex (PIC) which reclutes the transcription proteins (General Transcription Factors, GTFs) and RNA Polymerase II (RNA Pol II) that bind to the CPE. These GTFs are: TBP, TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIF and TFIIH in the case of promoter recognized by the RNA Pol II that synthesizes the mRNA molecule using DNA sequence as template. Among the CPE are the TATA box, the TFIIB-recognition Element (BRE), the Initiator (Inr), the Motif Ten Element (MTE), Downstream Promoter Element (DPE) and the Downstream Core Element (DCE) (Thomas y Chiang, 2006) Data collected during the laboratory experimental work suggest that the DNA sequence named Homol D is a universal CPE in *S. pombe* and that the genes containing this element are transcribed by the RNA Pol II, which is also the target of a new factor or protein complex that determined the initiation site of transcription.

We aim to determine which GTFs are required for Homol D box dependent gene transcription, through *in vitro* transcription assays, immunodepletion and Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA). Here we show the analysis of the following specific antibodies for GTFs of interest (TBP, TAF1, TFIIB, TFIIE, TFIIH, TFIIF and the subunit of Srb4 mediator).

Protein extract of *S. pombe* were used as GTFs source, while ribosomal K5 gene (that possess the Homol D box) were used as DNA template. To carry out transcription was used a purified RNA Pol II.

The *in vitro* transcription and immunodepletion experiments allowed us to observe that transcription does not occur when each transcription factor studied is depleted by using a specific antibody for each GTF. When using a promoter with an inverted Homol D as DNA template the same results were observed. When a rescue of the transcription reaction is performed by supplementing the depleted GTF after the immunodepletion, the reaction occurred for both the normal and the inverted Homol D box. Therefore the studied GTFs, TBP, TFIIB, TFIIE, TFIIH and TFIIF are necessary for initiation of the transcription process in the K5 promoter which contains Homol D box. For the EMSA assays it was initially obtained a purified protein fraction with Homol D union and antibodies against each GTF to make an immunodepletion of each GTFs and afterwards the reaction was incubated with P<sup>32</sup>γATP labeled probe. This assays allowed us to observe that the studied transcription factors are not the ones that recognize directly the Homol D box sequence.

According with the work performed in this work, the GTFs TBP, TAF1, TFIIB, TFIIE, TFIIH, TFIIF and Srb4 are necessary for the formation of PIC but not for the recognition of the Homol D box in the K5 promoter, suggesting the existence of another factor/s o protein complex that recognizes the sequence of Homol D box.

## RESUMEN

El proceso de la transcripción es iniciado por los Elementos del Núcleo del Promotor (Core Promoter Element, CPE), que dirigen la formación del Complejo de Preiniciación (Pre-Initiation Complex, PIC), el cual está compuesto por los Factores de Transcripción Generales (General Transcription Factors, GTFs) y la RNA Polimerasa II (RNA Pol II). TBP, TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIF y TFIIH corresponden a los GTFs que participan en la transcripción dirigida por promotores reconocidos por la RNA Pol II que sintetiza la molécula de mRNA a partir de una secuencia de DNA. Entre los CPE se encuentran la caja TATA, el elemento de reconocimiento de TFIIB (BRE), el Iniciador (Inr), el Motif Ten Element (MTE), el Downstream Promoter Element (DPE) y el Downstream Core Element (DCE) (Thomas y Chiang, 2006). Antecedentes recopilados durante el trabajo experimental de laboratorio sugieren que la secuencia de DNA denominada Homol D es un CPE universal en *S. pombe* y que los genes que poseen este elemento son transcritos por la RNA Pol II, la que además es blanco de un nuevo factor o complejo proteico que determina el sitio de inicio de la transcripción.

Como objetivo de esta tesis se determinaron los requerimientos de GTFs necesarios para la transcripción de genes con promotores que poseen la caja Homol D, a través de ensayos de transcripción *in vitro*, inmunodepleción y geles de retardo (EMSA), en los cuales se utilizaron anticuerpos específicos para los distintos GTFs estudiados (TBP, TAF1, TFIIB, TFIIE, TFIIH, TFIIF y una subunidad del mediador Srb4).

Como fuente de GTFs se utilizaron extractos de proteínas del organismo *S. pombe* y como DNA molde fue utilizado el promotor del gen ribosomal K5 que posee la caja Homol D. Para llevar a cabo la transcripción se utilizó una RNA Pol II purificada.

Los experimentos de transcripción *in vitro* e inmunodepleción, permitieron observar que la transcripción no ocurre al retirar cualquiera de los factores de transcripción por acción del anticuerpo específico para dicho GTFs. Además los ensayos usando como DNA molde un promotor con la caja Homol D invertida, permitieron observar los mismos resultados, es decir que la transcripción no ocurre al faltar alguno de los GTFs analizados en esta tesis. Al realizar un rescate de la reacción de transcripción, es decir, luego de hacer la inmunodepleción se suplementa el GTFs eliminado, se observó que la reacción ocurría, tanto para la caja Homol D normal como para la invertida, por lo tanto la presencia de todos los GTFs estudiados, TBP, TFIIB, TFIIE, TFIIH y TFIIIF son necesarios para que se inicie el proceso de transcripción en el promotor K5 que posee la caja Homol D.

Para los ensayos EMSA se utilizó extracto de proteínas totales que contenía la proteína con unión a Homol D y anticuerpos contra cada GTF, para realizar una inmunodepleción de ellos y luego se incubó con una sonda de DNA que contenía la caja Homol D marcada con  $P^{32}\gamma$ ATP. Estos ensayos permitieron observar que los factores de transcripción estudiados no son los que reconocen de manera directa la secuencia de la caja Homol D, ya que a pesar de que ellos son retirados de la reacción se observa la aparición del complejo proteína/Homol D, reflejado como una banda en el film fotográfico.

De acuerdo al trabajo realizado en este seminario de título, los GTFs TBP, TAF1, TFIIB, TFIIE, TFIIH, TFIIF y Srb4 son necesarios para la formación del PIC pero no para el reconocimiento de la caja Homol D en el promotor K5, sugiriendo que existiría otro factor o complejo proteico que reconoce la secuencia de la caja Homol D.

## 1. INTRODUCCION

En la célula ocurren muchos procesos que permiten su mantención y sobrevivencia, entre ellos se pueden mencionar los mecanismos moleculares enmarcados dentro del llamado Dogma Central de la Biología Molecular: Replicación, Transcripción y Traducción, donde a partir de DNA, se puede transcribir distintos RNAs y luego traducir estos a proteínas las que funcionarán como moléculas ejecutoras o señales de los procesos de la célula. Así, la Transcripción se encarga de la síntesis de las moléculas de RNA, desde un molde de DNA, por la acción de la RNA Polimerasa (RNA Pol).

### **1.1. RNA Polimerasa**

La RNA Pol es una enzima formada por varias subunidades, que utiliza ribonucleótidos trifosfato como sustrato y como molde la hebra de DNA que va en sentido 3'-5', siendo esta la dirección en la cual la enzima puede leer la secuencia nucleotídica, permitiéndole sintetizar una hebra de RNA en sentido 5'-3' que mantiene la complementariedad de bases nitrogenadas. En las células procariotas la transcripción ocurre en el citoplasma y un solo tipo de RNA Polimerasa se ocupa de la síntesis de todos los tipos de RNA, mientras que en las células eucariontes se han descrito hasta el momento tres clases de esta enzima, que sintetizan diferentes tipos de RNA: RNA Pol I sintetiza RNA ribosomales (rRNA) y se encuentra principalmente en el nucléolo; RNA Pol II ubicada en el nucleoplasma y encargada de transcribir los RNA mensajeros (mRNA), y la RNA Pol III que transcribe RNA de transferencia (tRNA) y otros RNAs de menor tamaño, localizada mayoritariamente en el nucleoplasma (Lewin, 2004). En

plantas se han encontrado dos tipos adicionales de RNA polimerasas (RNA Pol IV y V) involucradas en la síntesis de ciertos RNA pequeños de interferencia (Small Interfering RNA, siRNA) y silenciamiento epigenético. Estudios sobre la composición de sus subunidades han demostrado que éstas evolucionaron como versiones especializadas de la RNA Pol II (Cramer y cols, 2008, Haag y Pikaard, 2011).

Las RNA Pol I, II y III poseen 14, 12 y 17 subunidades, con un peso molecular aproximado de 589, 514 y 693 kDa, respectivamente. Diez de estas subunidades conforman el núcleo, el cual se mantiene altamente conservado entre las distintas RNA Pol, mientras que el resto de las subunidades se ubican en la periferia del núcleo, formando la estructura proteica final (Cramer y cols, 2008). Estas enzimas requieren, para el establecimiento y desarrollo de la transcripción, diversos factores proteicos auxiliares denominados Factores Generales de la Transcripción (General Transcription Factors, GTF), que se unen a la RNA Polimerasa permitiendo su posicionamiento en el sitio correcto de inicio de la transcripción (Orphanides y cols, 1996).

En la RNA Pol II se ha observado la existencia de un dominio C-terminal (CTD, C-terminal Domain), de una de las subunidades grandes (Rpb1) del núcleo de esta enzima. El CTD corresponde a una secuencia de heptapéptidos repetidos en tándem (Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser), cuyo número de repeticiones varía entre 26 y 52 según la complejidad del organismo, siendo su secuencia altamente conservada entre los organismos eucariontes (Orphanides y cols, 1996, Hampsey, 1998). El CTD es de gran importancia para el proceso de transcripción, ya que su fosforilación permite la conversión de la enzima, de una forma inactiva implicada en el ensamblaje de PIC y la

iniciación de la transcripción (Pol IIA, hipofosforilada o sin fosforilar) a una activa (Pol IIO, hiperfosforilada), que se encuentra involucrada en el proceso de elongación y terminación de la transcripción. Durante el inicio de la transcripción el CTD es fosforilado en múltiples residuos de serina y treonina, lo cual genera que algunos de los factores de transcripción de PIC se liberen y se unan otros distintos, conformándose el Complejo de Elongación, que continuará con la síntesis del transcrito de RNA. El proceso de fosforilación del CTD estaría regulado por los factores de transcripción TFIIF y TFIIH, siendo este último el que cumpliría la función de quinasa. Mientras que el TFIIF, activaría a una fosfatasa con el objeto de desfosforilar al CTD y así permitir el reciclaje de la enzima para un nuevo proceso de transcripción.

Para el caso de la RNA Pol II, la polimerasa más estudiada, se conoce que los factores de transcripción TBP, TFIIB, TFIIE, TFIIF y TFIIH son esenciales para que ocurra correctamente el inicio de la transcripción (Hampsey, 1998).

## **1.2. Elementos del Núcleo del Promotor (CPE)**

Para que los procesos celulares ocurran en forma adecuada, debe existir una regulación génica de los elementos implicados en dichos procesos, es decir deben existir mecanismos moleculares que controlen la expresión tanto de los genes de expresión constante como de los de expresión variable, lo cual permita el correcto desarrollo y control de las funciones celulares. Dentro de esta regulación, la transcripción juega un rol fundamental, ya que es en este proceso donde el DNA puede ser transcrito a una molécula de mRNA, la cual contiene la información nucleotídica necesaria para la

síntesis proteica, haciéndose imprescindible mantener un control permanente en partes claves del proceso.

Dentro del proceso de la transcripción, la fase de inicio es un paso esencial y altamente controlado, por ser uno de los puntos clave en la regulación génica. El control de este proceso se realiza a través de 2 elementos: los elementos *cis*, que son secuencias propias del DNA y los elementos *trans*, que son proteínas que reconocen y se unen a los elementos *cis*, como GTF, represores y activadores.

Los elementos *cis* se pueden clasificar en elementos muy lejanos, lejanos y proximales. Los elementos muy lejanos corresponden a secuencias que se encuentran a varios kilobases del sitio de inicio de la transcripción (denominado como +1), tanto río abajo como río arriba de éste. A modo de ejemplo, se pueden mencionar los enhancer o potenciadores. Los elementos lejanos son secuencias que se encuentran a un par de cientos de bases del promotor pero solo río arriba de éste, como son las secuencias reguladoras río arriba, ya sea UAS (Upstream Activator Sequence) en levaduras o URS (Upstream Repressor Sequence). Tanto los elementos lejanos como los muy lejanos, son esenciales para el inicio eficiente y correcto de la transcripción, pero no poseen la capacidad de establecer dicha fase por sí solos, ya que no contienen la información necesaria para el reclutamiento de toda la maquinaria transcripcional, sin embargo la eliminación de ellos puede afectar el nivel de la transcripción (Lewin, 2004).

Finalmente los elementos proximales se encuentran a no más de 100 pares de bases del sitio de inicio de la transcripción y son necesarios para este proceso, como

ejemplo fundamental se puede mencionar a los Elementos del Núcleo del Promotor (CPE) los cuales contienen la información mínima para el establecimiento de la transcripción y son a la vez parte del núcleo del promotor (Core Promoter, CP) o promotor mínimo (Smale y Kadonaga, 2003). El núcleo del promotor define la clase de RNA Polimerasa que realizará la transcripción así como también qué elemento regulador actuará (Butler y Kadonaga, 2002).

También parece importante mencionar otros factores que participan en la regulación génica, los cuales modifican la estructura de la cromatina permitiendo un control en la accesibilidad de la maquinaria de transcripción a las regiones CP en el DNA templado, pudiendo actuar en combinación tanto con los elementos *cis* como *trans*.

Actualmente se han descrito varios CPE para la RNA Pol II, los cuales poseen un rol fundamental en la selectividad y especificidad de la transcripción (Figura 1), dentro de ellos se pueden nombrar: la caja TATA, el elemento de reconocimiento de TFIIB (BRE), el elemento Iniciador (Inr), el Motif Ten Element (MTE), el Downstream Promoter Element (DPE) y el Downstream Core Element (DCE).

La caja TATA es el CPE más descrito dentro de la literatura (Concino y cols, 1984, Thomas y Chiang, 2006), y corresponde a una secuencia rica en A/T localizada aproximadamente entre 25 a 30 nucleótidos río arriba del sitio de inicio de la transcripción, su secuencia consenso corresponde a TATA(A/T)A(A/T)(A/G), la cual es reconocida por el factor de transcripción TBP (TATA Binding Protein) y que permite el

reclutamiento de todos los elementos necesarios para la formación PIC (Smale y Kadonaga, 2003).

El CPE BRE, se encuentra contiguo a la caja TATA tanto río arriba como río abajo de ésta, corresponde a una secuencia de 7 nucleótidos que varía según su posición en el promotor y es el sitio de unión de TFIIB (Lagrange y cols, 1998, Thomas y Chiang, 2006). La interacción de BRE con TFIIB permite la correcta orientación de PIC en el promotor y provee de más puntos de unión para el factor TFIID estimulando así la transcripción. También se cree que este elemento regularía la transición del complejo de preiniciación al de elongación (Evans y cols, 2001).

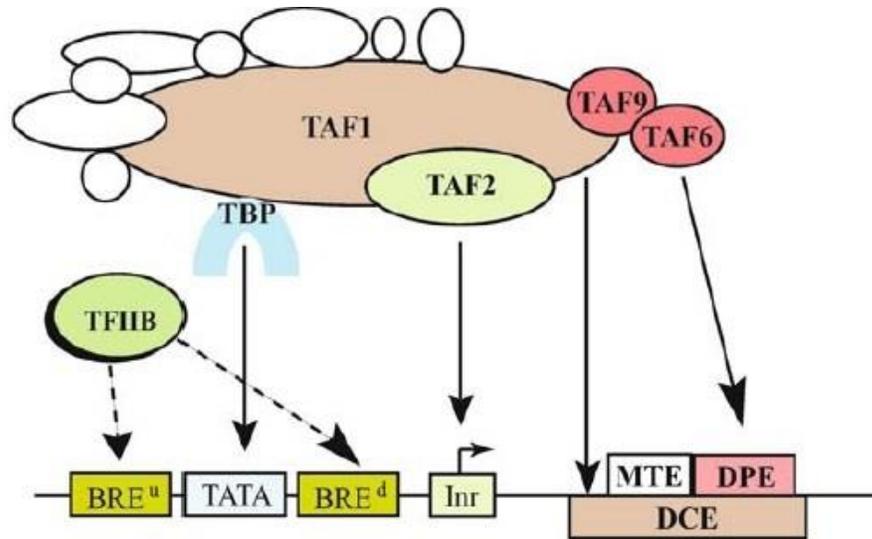
Por su parte el Iniciador (Inr) se ha observado tanto en mamíferos como en *Drosophila* (Arkhipova, 1995), corresponde a una secuencia conservada rica en pirimidinas, PyPyA<sub>+1</sub>N(T/A)PyPy y se ubica dentro de promotor, conteniendo en sí el sitio de inicio de la transcripción (A<sub>+1</sub>) (Smale y Baltimore, 1989). Este elemento es capaz de dirigir, ya sea solo o en conjunto con otro CPE, el inicio de la transcripción. Los componentes TAF1 y TAF2 del factor TFIID han sido identificados como los encargados de reconocer la secuencia de este elemento (Thomas y Chiang, 2006).

El DPE (Downstream Promoter Element) se encuentra comúnmente en promotores sin caja TATA y esta conservado desde *Drosophila* hasta humanos. Posee una secuencia consenso correspondiente a (A/G)G(A/T)CGTG, a la cual se une el factor de transcripción TFIID (Burke y Kadonaga, 1996, 1997), siendo TAF6 y TAF9 los encargados de reconocer este elemento. Se ubica entre 28 a 34 pares de bases río abajo

del sitio inicio de transcripción, a una distancia conservada del elemento Inr. La modificación de una base entre ambos elementos genera una disminución en la actividad transcripcional y en la unión de TFIID, ya que este factor de transcripción se une sinérgicamente a ambos elementos (Kutach y Kadonaga, 2000, Thomas y Chiang, 2006).

El *Motif Ten Element* (MTE) se encuentra entre 18 y 29 nucleótidos río abajo del sitio de inicio de la transcripción, con una secuencia consenso correspondiente a C(G/C)A(A/G)C(G/C)(G/C)AACG(G/C) y es conservado desde *Drosophila* hasta humanos. Su función es dependiente del elemento Iniciador, con el cual debe mantener una distancia conservada para una correcta actividad transcripcional. Este elemento puede reemplazar la función tanto de la caja TATA y/o del DPE, o bien trabajar en conjunto con ellos para aumentar la actividad del promotor (Lim y cols, 2004, Thomas y Chiang, 2006). Hasta el momento no se ha identificado el factor transcripción que reconocería a este elemento, aunque probablemente sea reconocido por el complejo TAF6-TAF9 al igual que DPE (Sainsbury y col, 2015).

El DCE (Downstream Core Element) se ha encontrado en una gran variedad de promotores, mayoritariamente en aquellos que poseen caja TATA. Su secuencia se encuentra desde 6 a 34 nucleótidos río abajo del sitio de inicio de la transcripción y está dividida en 3 subelementos (CTTC, CTGT y AGC), los cuales son reconocidos por el factor TFIID, específicamente TAF1. Se ha observado que DPE y DCE son excluyentes entre sí, no encontrándose nunca ambos en el mismo promotor (Lee y cols, 2005, Thomas y Chiang, 2006).



Elementos del Núcleo del Promotor	Posición	Secuencia Consenso (5' → 3')	Proteína de Unión
<b>BRE<sup>u</sup></b>	-38 a -32	(G/C)(G/C)(G/A)CGCC	TFIIB
<b>TATA</b>	-31 a -24	TATA(A/T)A(A/T)(A/G)	TBP
<b>BRE<sup>d</sup></b>	-23 a -17	(G/A)I(T/G/A)(T/G)(G/T)(T/G)(T/G)	TFIIB
<b>Inr</b>	-2 a +5	PyPyAN(T/A)PyPy	TAF1/TAF2
<b>MTE</b>	+18 a +29	C(G/C)A(A/G)C(G/C)(G/C)AACG(G/C)	n.a.
<b>DPE</b>	+28 a +34	(A/G)G(A/T)CGTG	TAF6/TAF9
<b>DCE</b>	3 subelementos +6 a +11 +16 a +21 +30 a +34	S <sub>I</sub> CTTC S <sub>II</sub> CTGT S <sub>III</sub> AGC	TAF1

**Figura 1. Elementos del Núcleo del Promotor (CPE) y los factores que los reconocen.** Los CPE son parte del promotor mínimo y poseen la información necesaria para el establecimiento de la transcripción. En la parte superior se muestra un esquema de la interacción entre los factores y los siete CPE descritos. En la parte inferior se presenta una tabla con las correspondientes secuencias consenso y posiciones de los CPE dentro del promotor. Los nucleótidos río arriba del sitio de inicio de la transcripción (+1) se denotan con el signo menos (-) y los ubicados río abajo con el signo más (+) (Modificado de Thomas y Chiang, 2006).

Más recientemente se han identificado dos nuevos CPE, XCPE1 (X Core Promoter Element 1) y XCPE2 (X Core Promoter Element 2), en el promotor del gen X del virus de la Hepatitis B. Estos CPE se encuentran mayoritariamente en promotores sin caja TATA, que poseen múltiples sitios de inicio de la transcripción. Su ubicación en el promotor es -8 a +2 y -9 a +2 respectivamente. Lo que diferencia a estos elementos es que XCPE1 es un CPE que depende de activadores para conducir el inicio de la transcripción mientras que XCPE2 puede hacerlo por sí solo. Ambos CPE necesitan para llevar a cabo la fase de inicio TFIID o TBP libre, por lo tanto pueden conducir la transcripción independiente de los TAFs, pudiendo ser esta la clase de mecanismo que utilizarían los promotores sin caja TATA en eucariontes superiores. Para ambos casos el factor que reconoce su secuencia dentro del promotor continua sin ser identificado (Tokusumi y cols, 2007, Anish y cols, 2009).

### **1.3. Factores Transcripcionales**

Los factores transcripcionales corresponden a proteínas capaces de reconocer y unirse a secuencias nucleotídicas específicas del DNA, determinando la posición y eficacia del inicio de la transcripción, ya sea favoreciendo o dificultando la unión de la RNA Polimerasa al promotor o regulando el nivel transcripcional del gen. Los genes que codifican a estos factores se encuentran alejados de aquellos genes en cuya regulación participan. Se pueden definir tres tipos de factores *trans*, dependiendo de a que elemento *cis* se unan, es así que existen los factores *trans* inducibles, proximales y generales. Los factores transcripcionales inducibles reconocen los elementos *cis* muy lejanos y facilitan o dificultan la formación o actividad de PIC. Pertenecen a este grupo los potenciadores

(enhancer) o silenciadores. Por su parte, los factores proximales se unen a la secuencia nucleotídica de los elementos *cis* lejanos y al igual que los factores anteriores, pueden permitir o impedir la formación o actividad de PIC. Por último, los factores generales reconocen a los CPE, es decir se unen a los elementos que forman parte del promotor mínimo. Estos factores definen el sitio de inicio de la transcripción, uniéndose a los distintos elementos del promotor y permitiendo el correcto reclutamiento de la maquinaria transcripcional. En el caso de la RNA Pol II, estos factores de transcripción general corresponden a TBP, TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIF y TFIIH (Tabla 1).

TFIID es un complejo multiproteico que contiene a TBP y aproximadamente 14 proteínas TAF y se sospecha que su estructura sería similar a un octámero de histonas (Thomas y Chiang, 2006). Tanto TBP como algunas TAFs son capaces de reconocer CPE, haciendo que este complejo pueda reconocer promotores con o sin caja TATA. La proteína TBP se encuentra en una variedad de organismos, considerándosele un factor de transcripción universal en eucariontes. Además se ha observado que es esencial en la transcripción dirigida por la RNA Pol I y III. Su peso molecular varía entre 22 a 38 kDa, dependiendo del organismo y en su forma libre es capaz de reconocer promotores con caja TATA. Estudios han permitido observar que al unirse TBP a su sitio de reconocimiento, el DNA se dobla, siendo este cambio topográfico necesario para el resto del ensamblaje de la maquinaria transcripcional. Además esta nueva conformación impide la compactación de nucleosomas para la formación de cromatina (Orphanides y cols, 1996, Thomas y Chiang, 2006). TFIID contiene al menos 8 factores TAFs (en humanos se han identificado 14) las cuales se encuentran filogenéticamente conservadas

en organismos como humanos, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *C. elegans* y *D. melanogaster*. Las proteínas TAFs, cuyos pesos moleculares van desde 15 a 250 kDa, poseen dominios de unión a otros GTFs y RNA Pol, que ayudan al reclutamiento de éstos al promotor facilitando el ensamblaje de PIC. Además TAFs son requeridos para la transcripción dependiente de activadores. La unión de TFIID es el paso limitante en el ensamblaje de la maquinaria transcripcional tanto en promotores con o sin caja TATA. Este factor también funciona como un coactivador modulando la interacción entre activadores y la maquinaria transcripcional, permitiendo un mejor ensamblaje de PIC (Orphanides y cols, 1996, Thomas y Chiang, 2006).

El factor TFIIA posee 3 subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) cuyos pesos moleculares son 35, 19 y 12 kDa respectivamente, y son codificadas por 2 genes (un mismo gen codifica para las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ ). El rol de TFIIA ha sido controversial durante el tiempo. En un principio se describió como un GTF esencial para que ocurriera la transcripción comandada por la RNA Pol II *in vitro*, pero otros estudios sugerían lo contrario. Investigaciones recientes han mostrado que este factor no es necesario para la transcripción basal ni para aquella dependiente de activadores en sistemas de transcripción altamente purificados; sin embargo en sistemas parcialmente purificados, este factor se vuelve relevante. Por lo tanto, se cree que TFIIA funcionaría mayoritariamente como un anti-represor, aumentando la afinidad de TBP o TFIID por el DNA, potenciando el ensamblaje de PIC, pero sin ser esencial para que este complejo se arme. TFIIA estabiliza la unión TBP/caja TATA, a través del contacto directo con TBP y una secuencia inmediatamente río arriba de la caja TATA. También se ha descrito que

TFIIA regularía la formación de PIC posterior a la unión de TBP, estimulando la función de GTFs como TFIIE y TFIIF. TFIIA también actúa como coactivador, haciendo contacto con activadores, cofactores y otros componentes de la maquinaria transcripcional. En el caso de la transcripción independiente de TAF, este factor cumple un rol de activador estimulando la unión de TBP a la caja TATA. Finalmente, TFIIA es importante para la transcripción de cierto grupo de genes, pero no es universalmente requerido (Hampsey, 1998, Thomas y Chiang, 2006).

Tabla 1: Función de los factores generales de la transcripción de la RNA Pol II

<b>Factor</b>	<b>Subunidades</b>	<b>Función</b>
TFIIA	$\alpha$ , $\beta$ y $\gamma$	Anti-represor. Estabiliza complejo TBP-TATA. Coactivador.
TFIIB	1	Selección sitio inicio transcripción. Estabiliza complejo TBP-TATA. Recluta RNA Pol II/TFIIF.
TFIID	TBP + TAFs	Reconocimiento CPE. Recluta a TFIIA y TFIIB. Coactivador.
TFIIE	$\alpha_2$ y $\beta_2$	Recluta a TFIIF y estimula su actividad helicasa. Participa en el correcto inicio de transcripción por parte de RNA Pol II. Participa en el escape del promotor.
TFIIF	RAP30 y RAP74	Se une a RNA Pol II y facilita su reclutamiento al promotor. Recluta a TFIIE y TFIIF. Junto con TBP y RNA Pol II participa en la selección del sitio de inicio de la transcripción. Facilita el escape de RNA Pol II del promotor. Aumenta la eficiencia y especificidad de la RNA Pol II.
TFIIF	9	Actividad ATPasa para iniciación transcripción, apertura y escape del promotor. Actividad helicasa para el escape de la zona promotora. Actividad quinasa para fosforilar CTD de RNA Pol II. Respuesta NER al daño del DNA.

*Modificada de Thomas y Chiang, 2006*

TFIIB corresponde a un monómero de aproximadamente 38 kDa (33 kDa en humanos), que se mantiene evolutivamente conservado, encontrándose su símil incluso en *Archaea* (TFB, Transcription Factor B). Este factor se une a PIC luego de TBP o TFIID, estabilizando la unión al DNA y es requisito para la unión de la RNA Pol II/TFIIF al complejo. Al mismo tiempo, cumple un rol fundamental en especificar el sitio de inicio de la transcripción, ya que se ha observado en levaduras que cuando está ausente o es mutado, el sitio de inicio cambia río abajo de su ubicación normal. TFIIB interactúa directamente con TBP, RNA Pol II, así como con otros GTFs y activadores transcripcionales. TFIIB posee en su extremo C-terminal un motivo estructural que hace contacto con las secuencias CPE que son sitio de unión de este factor (BRE). Por su parte, en el extremo N-terminal existe una zona altamente conservada denominada B-finger (o CCD, Charged Cluster Domain) que interactúa con el canal de salida del RNA naciente en la polimerasa. Por lo tanto el factor TFIIB debe separarse de PIC para que se forme el complejo de elongación. El B-finger funcionaría como un interruptor molecular que regularía el cambio conformacional de TFIIB, modulando su función en el reconocimiento del promotor, selección del sitio inicio y correcta activación transcripcional. Se ha observado que mutaciones puntuales en el dominio B-finger causan cambio en el sitio de inicio, pero no afectan la formación de PIC (Orphanides y cols, 1996, Thomas y Chiang, 2006).

El factor TFIIF es un heterotetrámero compuesto por RAP30 y RAP74, cuya secuencia proteica primaria es similar al factor  $\sigma$  de bacterias (Orphanides y cols, 1996). RAP 30 (~26 kDA), posee tres dominios funcionales que le permiten interactuar con

RNA Pol II, con la subunidad RAP74 y con el factor TFIIB. Por su parte la subunidad RAP74 (~58 kDA) posee también tres dominios funcionales con los que puede interactuar con RAP30, TAF1 (TFIID), TFIIA, TFIIB, RNA Pol II y la fosfatasa FCP1. La región central de esta subunidad, está enriquecida en aminoácidos Glu y Asp, sensible a la fosforilación por TAF1 y CK2. Todas estas interacciones son de gran importancia para el rol que cumple TFIIF en el ensamblaje de PIC, iniciación y elongación del proceso de transcripción. La interacción de RAP74 con FCP1, permite que ésta desfosforile el dominio CTD de la RNA Pol II, permitiendo que la enzima sea reciclada y se encuentre disponible para iniciar otro proceso de transcripción. Cada dominio de RAP74 puede servir como blanco de activadores transcripcionales, que facilitan el reclutamiento de TFIIF al PIC.

La interacción TFIIF/RNA Pol II, ayuda a que la polimerasa se una al complejo TFIID/TFIIB/promotor. Además TFIIF estabiliza esta unión al proveer más zonas de contacto DNA/proteína y generando un cambio en la topología de la molécula de DNA que estabiliza la unión de los factores incorporados. Otra de las funciones de TFIIF es el reclutamiento directo del factor TFIIE y consecuentemente de TFIIH. Adicionalmente TFIIF, en conjunto con RNA Pol II y TFIIB, es importante para la selección del sitio de inicio de la transcripción ya que este factor, al igual que TFIIB, interactúa con el sitio catalítico de la polimerasa. Finalmente, TFIIF aumenta la eficiencia y especificidad de la RNA Pol II evitando una iniciación falsa, inhibiendo o revirtiendo la unión de la polimerasa a secuencias de DNA que no corresponden a promotores (Orphanides y cols, 1996, Thomas y Chiang, 2006).

TFIIE es un heterotetrámero compuesto de dos subunidades,  $\alpha$  (~56 kDa) y  $\beta$  (~34 kDa). El extremo N-terminal de la subunidad  $\alpha$ , es importante para la interacción con la subunidad  $\beta$  y con la RNA Pol II, como también en la transcripción basal y la transición entre la fase de inicio y elongación, estimulando al factor TFIIF para fosforilar el CTD de la polimerasa. Por su parte, la región C-terminal de la misma subunidad está involucrada en la interacción con el factor TFIIF, facilitando el ingreso de éste al PIC. Por otro lado, la región N-terminal de la subunidad  $\beta$  posee varios dominios funcionales, entre ellos una zona rica en serinas que favorecería la fosforilación de CTD mediada por TFIIF. El extremo C-terminal de ésta subunidad permite la interacción con RNA Pol II, TFIIB y RAP30 del factor TFIIF, haciendo que también esté involucrada en la transición de la fase de inicio a la de elongación.

TFIIE y TFIIF son esenciales para que las hebras de DNA se separen en la zona promotora y en la transición desde iniciación a elongación. El requerimiento de estos factores para la transcripción de genes, dependen de la topología del DNA como de la secuencia del promotor (Thomas y Chiang, 2006).

TFIIF es un complejo multiproteico, compuesto por nueve subunidades. Se le han relacionado tres actividades enzimáticas esenciales para la transcripción: ATPasa dependiente de DNA, Helicasa dependiente de ATP y CTD quinasa. Además alguno de los componentes de este factor participaría en la respuesta NER (Nucleotide Excision Repair) al daño de DNA. El factor TFIIF puede ser dividido en 2 subcomplejos: el CAK (Ciclin-Activating Kinasa Complex) y un complejo central. CAK es responsable de la fosforilación del dominio CTD de la RNA Pol II y consiste en CDK7, Ciclina H y

MAT1. El complejo central se compone de helicasa XPB, p62, p52, p44 y p34, los cuales estarían implicados en la reparación del DNA.

La actividad ATPasa de este factor se requiere en el inicio de la transcripción para el escape del promotor. De hecho, esta actividad es esencial para la apertura del promotor y la formación del primer enlace fosfodiéster, ya que sin el factor TFIIH, RNA Pol II tiende a estancarse en las regiones cercanas al promotor llevando a una transcripción abortiva.

TFIIH posee dos helicasas, XPB que desenvuelve la hebra de DNA en la dirección 3'-5' y XPD que lo hace en el sentido 5'-3', haciendo de este factor una helicasa bidireccional. Mientras XPB es importante tanto para la transcripción como para la reparación del DNA, XPD solo es requerida en la reparación. XPB es esencial para el despeje del promotor, lo cual ocurre dentro de la formación de los primeros 20 nucleótidos del RNA naciente, definiendo la transición entre la fase de inicio y elongación. Una vez que la polimerasa ha dejado el promotor, este factor no es requerido. Estudios sobre este factor han establecido que su actividad ATPasa es fundamental en la apertura del promotor, mientras que la actividad helicasa es crucial para el despeje del promotor.

La quinasa CDK7 del complejo CAK es la responsable de fosforilar la serina 5 del dominio CTD de la RNA Pol II. Se encuentra regulada por la Ciclina H, MAT1 y TFIIE. Esta fosforilación permite el reclutamiento de la enzima que forma el cap en el extremo 5' del RNA transcrito y que está implicado en el despeje del promotor, permitiendo la

transición desde la fase de inicio a la de elongación. Además TFIIH fosforila activadores transcripcionales como p53 y cofactores generales como PC4.

Estudios han mostrado que muchos activadores pueden interactuar con TFIIH, por lo tanto éste puede actuar como un coactivador en sistemas de transcripción reconstruidos. Los activadores pueden actuar ya sea, aumentando el reclutamiento de TFIIH a PIC o estimulando las actividades enzimáticas de este factor, así como TFIIH puede modificar covalentemente residuos de aminoácidos críticos para la actividad de los activadores (Thomas y Chiang, 2006).

#### **1.4. Cofactores Generales**

Estas proteínas permiten la comunicación entre activadores de genes específicos y componentes de la maquinaria de transcripción general. Éstos funcionan como un puente molecular en la transcripción dependiente de activadores.

Los activadores poseen un dominio de unión a DNA (DBD, DNA-binding domain) que contacta secuencias específicas de DNA y un dominio de activación (AD, activation domain) que interactúa con los cofactores o algún componente de la maquinaria transcripcional. En este último grupo se incluyen las TAFs (parte del factor TFIID), los mediadores (casi siempre asociados al dominio CTD) y componentes derivados de USA (Upstream Stimulatory Activity). Algunos mediadores y derivados de USA son capaces de reprimir la transcripción basal en ausencia de activadores y activar la transcripción en presencia de ellos. Otros cofactores generales son los implicados en la modificación de

la cromatina, como enzimas modificadoras de histonas y complejos remodeladores de cromatina.

Los mediadores transmiten las señales regulatorias desde factores de transcripción de genes específicos a la maquinaria transcripcional. Estimulan tanto la transcripción basal como la dependiente de activadores, permitiendo la entrada de la RNA Pol II a PIC. La actividad del mediador puede ocurrir en ausencia de TAFs, sugiriendo que ambos factores realizarían una función redundante en la transcripción. Además el mediador aumenta la unión de TBP a la caja TATA, estabilizando el complejo TFIIA/TFIID/TFIIE/TFIIH/mediador, facilitando la reiniciación de la transcripción en el mismo promotor. El mediador también presenta otras actividades enzimáticas como quinasa (subunidad CDK8) que puede fosforilar el dominio CTD de la RNA Pol II antes del ensamblaje de PIC y a TFIIH (subunidad Ciclina H) actuando como un represor de la transcripción.

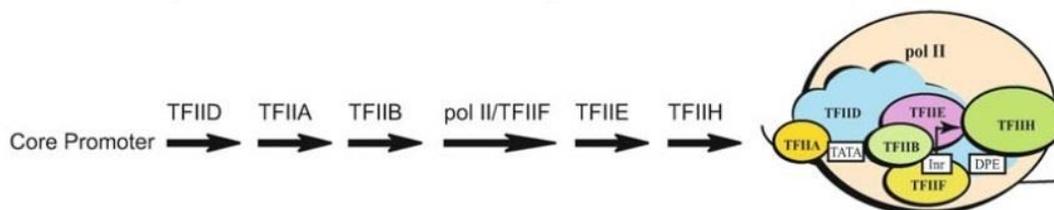
En el caso de los componentes derivados de USA, se han identificado 4 cofactores positivos (PC1, PC2, PC3 y PC4) y uno negativo (NC1). Sin embargo, todos ellos poseen un rol dual potenciando la transcripción dependiente de activadores y reprimiendo la transcripción basal cuando los activadores están ausentes (Thomas y Chiang, 2006).

## **1.5. Transcripción**

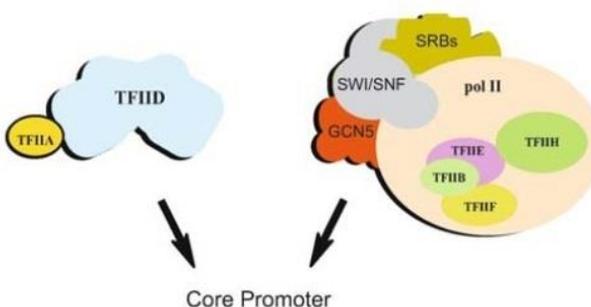
El proceso de transcripción permite la síntesis de RNA utilizando como molde el DNA. Se pueden distinguir tres etapas en este proceso: Inicio, Elongación y Término. El inicio de la transcripción ocurre en tres etapas: La separación de las hebras de DNA en la región promotora (Promoter Melting), la formación del primer enlace fosfodiéster del transcrito de RNA y el escape de la RNA polimerasa del promotor (Promoter Clearance). La transición a la etapa de elongación ocurre debido a la fosforilación del dominio CTD de la polimerasa.

La etapa de ensamblaje de PIC es fundamental para el inicio de la transcripción, ya que es éste el que permite el correcto posicionamiento de la RNA polimerasa sobre la hebra de DNA y que la síntesis de la molécula de RNA se efectuó correctamente. Esta etapa puede ocurrir de dos formas: de manera secuencial (Figura 2A), donde uno o un conjunto de GTFs reconoce a uno o varios CPE específicos, permitiendo el reclutamiento ordenado del resto de la maquinaria transcripcional hasta completar la formación de PIC. La segunda forma es a través del Complejo Holoenzima, donde la RNA polimerasa se encuentra asociada a SRBs (Suppressors of RNA polymerase B mutations), con o sin un grupo de GTFs y otras proteínas involucradas en remodelamiento de la cromatina, reparación DNA, etcétera. Este complejo se uniría con el complejo TFIID/TFIIA, facilitando su ingreso a la región promotora (Figura 2B). Ambas formas de ensamblaje de PIC se pueden encontrar *in vivo*, sin embargo aún queda por descubrir bajo que señales moleculares o ambiente del promotor responde cada una (Thomas y Chiang, 2006).

## A) Ensamblaje Secuencial



## B) Complejo Holoenzima



**Figura 2. Vías de Formación del Complejo de Preiniciación.** La formación de PIC puede ocurrir de 2 formas: A) Los GTFs son reclutados de forma secuencial y ordenada al promotor o B) El reclutamiento del Complejo Holoenzima (RNA polimerasa, SRBs, GTFs y otras proteínas) y el complejo TFIID/TFIIA a la región promotora (Modificado de Thomas y Chiang, 2006)

El inicio de la transcripción en promotores con la caja TATA dependientes de la RNA Pol II es uno de los más estudiados (Burley y Roeder, 1996; Orphanides y cols, 1996; Martinez, 2002; Orphanides y Reinberg, 2002). La formación de PIC comienza por el reconocimiento de la caja TATA por el factor TFIID a través de TBP, el cual es ayudado en su labor por los otros componentes de éste factor (TAFs). La unión TATA/TFIID se ve estabilizada por la incorporación de TFIIA y TFIIIB, que reconocen sus respectivos CPE. TFIIIB es el responsable del reclutamiento de la RNA Pol II/TFIIF, siendo esta interacción la que permitirá un correcto reconocimiento del sitio de inicio de

la transcripción (Maldonado y cols., 1990). En seguida se une TFIIE, quien funciona como un punto de verificación de la formación de PIC, ya que este factor solo se incorpora cuando el CTD de la RNA polimerasa se encuentra desfosforilado. Además controla el reclutamiento y actividad de TFIIH. Este último regula la transición entre el inicio y elongación de la transcripción.

Luego de la síntesis de los primeros 20 nucleótidos del RNA naciente, el dominio CTD de la polimerasa se vuelve altamente fosforilado por la acción de TFIIH, produciendo que algunos GTFs escapen del sitio de transcripción. Nuevos factores se unen generando el Complejo de Elongación, que continuará con la síntesis del transcrito de RNA hasta que la polimerasa encuentra secuencias de término de la transcripción, produciendo la liberación del RNA y la separación del complejo de elongación de la hebra de DNA. Además, el dominio CTD de la RNA polimerasa es desfosforilado por acción de la fosfatasa FCP1, permitiendo su reciclaje para comenzar nuevamente el proceso (Hampsey, 1998). Existen algunos reguladores transcripcionales capaces de unirse directamente con los GTFs controlando la expresión génica, ya sea activando o reprimiendo el reclutamiento de la maquinaria transcripcional de la RNA polimerasa.

La caja TATA también es reconocida por la maquinaria transcripcional de las dos restantes RNA polimerasas, sin embargo, se desconoce el mecanismo que utilizarían (Hamada y cols., 2001). Utilizando promotores sintéticos se determinó que la RNA Pol III, en ausencia de otros CPE, identificaría una secuencia invertida de la caja TATA (Wang y Stumph, 1995).

En aquellos promotores que no poseen la caja TATA, se han identificados mecanismos para establecer el inicio de la transcripción independientes de TBP, pero en los cuales si participaría TFIID a través de las proteínas TAFs. En promotores que poseen el elemento Iniciador se ha identificado la participación de TAF1 y TAF2 (Verrijzer y cols. 1994, 1995), como también un mecanismo que funcionaría en ausencia de TAF utilizando otras proteínas de unión a DNA, tales como TFII-I, que tiene la capacidad de activar la transcripción *in vitro* (Cheriyath y cols., 1998) y YY1, que reconoce el Inr del promotor de la DNA polimerasa humana (Weis y Reinberg, 1997). Analizando en *Drosophila* promotores que contienen el elemento DPE, el cual casi siempre se encuentra asociado a Inr, se observó que DPE es reconocido por TFIID a través de TAF6 y TAF9 (Burke y Kadonaga, 1997, Kutach y Kadonaga, 2000) y además, recientemente se descubrió que en este tipo de promotores la transcripción requiere de la proteína quinasa CK2 y el coactivador PC4 (Lewis y cols., 2005).

### **1.6. Secuencias Homol**

Existen numerosos promotores que no contienen el elemento TATA u otro CPE, pero que son capaces de llevar a cabo la transcripción a través de mecanismos desconocidos. Entre estos promotores se encuentra el que controla la transcripción de los genes ribosomales de la levadura *Schizosaccharomyces pombe*. En este tipo de promotores se describieron regiones conservadas, denominadas Homol A, B, C, D y E (Gross y Kaiüfer, 1998), de las cuales cuatro (Homol A, B, C y E) presentaron características típicas de los elementos UAS (Witt y cols, 1995). La región Homol D se localizó entre 39 a 55 pares de bases río arriba del sitio de inicio de la transcripción,

ubicación similar a la presentada por la caja TATA en eucariontes superiores, sin embargo, su secuencia es altamente conservada y se ha encontrado tanto en el sentido 5'- CAGTCACA(G)-3' como en su forma invertida (TGTGACTG) (Witt y cols., 1993).

La región Homol D se presenta en otras especies de levaduras, encontrándose altamente conservada, sugiriendo que esta región sería un CPE ancestral, que habría formado parte de todos los promotores de genes que codifican para proteínas ribosomales, pero que a través del tiempo se fue modificando en las distintas especies de levaduras (Tanay y cols, 2005). Estudios realizados en base de datos de promotores permitieron observar que la caja Homol D se encuentra también en eucariontes superiores como *Drosophila*, Rata, Arroz y Humanos, ubicándose, en los promotores que no contienen la caja TATA o Iniciador como CPE, río arriba del sitio de inicio de la transcripción.

De acuerdo a trabajos previos, la región Homol D funcionaría de manera análoga a la caja TATA, siendo capaz de iniciar la transcripción basal por sí sola, reclutando a una o varias proteínas con distintas características a las que posee TBP, tanto en eucariontes inferiores como superiores (Witt y cols. 1993, 2003).

Debido a la importancia que conlleva el conocer cómo funcionan los mecanismos que están dirigiendo la transcripción en promotores que carecen de la caja TATA, es que este trabajo está dirigido a estudiar la maquinaria transcripcional que está participando en promotores que poseen la caja Homol D como CPE, utilizando como modelo de estudio la levadura *S. pombe*. Hasta el momento en *S. pombe* se han identificado 140

genes que codifican para 79 proteínas ribosomales que poseen en su región promotora la caja Homol D.

Investigaciones realizadas previamente en el laboratorio del Dr. Edio Maldonado, mediante transcripciones *in vitro* en presencia de micotoxina  $\alpha$ -amanitina, molécula que al unirse a la RNA Pol II inhibe la elongación del RNA (Brueckner y Cramer, 2008) no así en el caso de RNA Pol I y III de levaduras que son insensibles a esta toxina, se observó que la transcripción en promotores con la caja Homol D es dependiente de RNA Pol II, y por lo tanto sería ésta la maquinaria transcripcional que se estaría utilizando. También se pudo determinar que la orientación de la caja Homol D no afecta el inicio de la transcripción, pero sí que la mutación de al menos dos bases no permite el establecimiento de la maquinaria transcripcional (Rojas y cols, 2011). Sin embargo, resta conocer cuáles de los GTFs participa del inicio de la transcripción en este tipo de promotores. En este trabajo se intentará dilucidar ésta interrogante mediante ensayos de Inmunodepleción y Transcripción *in vitro*.

## **1.7 Hipótesis**

Los GTFs TBP, TFIIB, TFIIE, TFIIH, y TFIIF son necesarios para la formación de PIC en promotores que poseen el elemento Homol D como conductor de la transcripción dependiente de RNA Polimerasa II y por lo tanto la ausencia de cualquiera de ellos impide el proceso de transcripción. Además ninguno de estos GTF reconoce directamente a la caja Homol D en el promotor K5 de *S. pombe*,

## **1.8 Objetivo general**

Determinar los GTFs y coactivadores implicados en la transcripción de genes que poseen un promotor con una caja Homol D.

## **1.9 Objetivos específicos:**

1. Obtener anticuerpos purificados para los GTFs: TAF5, TFIIE, TFIIH y la subunidad del mediador Srb4.
2. Determinar los GTFs necesarios para la transcripción comandada por la caja Homol D.

## **2. MATERIALES Y METODOS**

### **2.1. Materiales**

#### **2.1.1. Células**

Para la realización de este seminario se utilizó la cepa wt972h de la levadura de fusión *Schizosaccharomyces pombe*, facilitada por el laboratorio del Dr. Danny Reinberg, Department of Biochemistry, Robert Wood Johnson Medical School, University of Medicine and Dentistry of New Jersey.

#### **2.1.2. Reactivos químicos**

Los componentes de los medios de cultivo o reactivos químicos, se adquirieron de Sigma Chemical, Merck y Difco Laboratorios.

### **2.2. Métodos**

#### **2.2.1. Condiciones de Cultivo *S. pombe* en medio sólido y líquido**

La levadura *S. pombe* se creció en el medio sólido YPD-agar (1,5% agar, 2% D-glucosa, 1% extracto de levadura, 2% peptona) durante 3 días a 30°C. Se tomaron algunas colonias aisladas e inocularon en 10mL de medio YPD líquido (1 colonia por cada 10mL de medio) con agitación constante a 30°C durante la noche. A la mañana siguiente se recolectaron las levaduras y se colocaron en dos matraces con 1 litro de medio líquido YPD, donde se dejaron crecer por aproximadamente 20 horas con agitación constante y a una temperatura de 30°C. Pasado este tiempo, los cultivos fueron

recolectados, para lo cual se centrifugaron por 15 minutos a 5000 rpm. Los pellet de levaduras fueron lavados 3 veces con agua destilada y almacenados a -80°C.

### **2.2.2. Preparación extractos de proteínas de *S. pombe*.**

Para este seminario de título se utilizaron extractos totales de proteínas de *S. pombe* preparados con anterioridad en el laboratorio mediante el siguiente protocolo. Las levaduras almacenadas a -80°C se resuspendieron en 30mL de Buffer de Extracción (2,5mM DTT, 10mM EDTA, 5mM EGTA, 100mM HEPES pH 7,9, 250mM KCl, y 0,5mM PMSF) y se centrifugaron por 10 minutos a 4000rpm a 4°C. Luego el pellet fue colocado en una jeringa de 10mL estéril sin aguja y se agregó a un mortero con nitrógeno líquido para ser molido hasta conseguir un polvo fino, el cual se resuspendió nuevamente en Buffer de Extracción (1,3mL por gramo de polvo), agregándosele PMSF 1mM y pepstatin A 1 µg/ml. El volumen obtenido se separó en dos tubos y se centrifugó por 45 minutos a 35000rpm a 4°C (Ultracentrífuga, Sorvall Dupont, USA). Las proteínas fueron recolectadas con una pipeta Pasteur de vidrio y luego dializadas en bolsas de diálisis de celulosa (Sigma-Aldrich, Alemania) con un Buffer de Diálisis (2mM DTT, 1mM EDTA, 5mM EGTA, 20mM HEPES pH 7,9, 20% glicerol, 5mM MgSO<sub>4</sub>, 0,5 µg/ml pepstatin A, 0,1mM PMSF) durante 2 horas a 4°C. Finalmente los extractos fueron almacenados a -80°C y su concentración fue determinada por el método Bradford.

### **2.2.3. Purificación de anticuerpos policlonales desde sueros de conejos**

Se purificaron anticuerpos dirigidos contra TFIIH, TAF5, TFIIE y para la subunidad Srb4 del mediador, de cuatro sueros de conejos obtenidos en la unidad CESAT de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Se prepararon 4 columnas (Biorad) con 200µl de resina Proteína A agarosa (Invitrogen, Estados Unidos), a las cuales se le agregó 400µl de la suspensión de Proteína A agarosa, eliminándose el buffer hasta lograr la compactación de la resina. Se realizaron 2 lavados con 1mL de Buffer TBS 1X (0,9% NaCl, 0,05M Tris-HCl pH 8,4). Posteriormente, la resina fue incubada con 1mL de cada suero con agitación rotatoria a temperatura ambiente por 1 hora. Terminada la incubación se lavó con 1mL de Buffer TBS 1X (entre 3 o 4 veces) hasta no detectar la elución de proteínas mediante el método Bradford. Luego se eluyeron los anticuerpos a pH ácido (0,2M glicina, HCl pH 2,5) recolectando fracciones de aproximadamente 100µl, de los cuales 20µl fueron utilizados para elegir las más concentradas a través del método Bradford, para luego agruparlas en un solo tubo estéril de 1,5mL. Las muestras luego fueron dializadas en membranas de diálisis de celulosa (Sigma-Aldrich, Alemania), las cuales previamente fueron hidratadas con agua destilada estéril por aproximadamente 30 minutos. La diálisis se realizó con agitación constante a 4°C utilizando Buffer de Diálisis (20mM acetato de potasio, 1mM DTT, 0,1mM EDTA, 10% glicerol, 20mM HEPES, 0,5mM PMSF). Finalmente los anticuerpos dializados se guardaron en tubos estériles de 1,5mL y se midió su concentración utilizando un espectrofotómetro (JENWAY 6305 UV/Vis. Spectrophotometer).

#### **2.2.4. Western Blot**

Se utilizó este método para comprobar que los anticuerpos purificados fueran específicos para los GTFs para los cuales fueron construidos. Primero se armó una cámara de vidrio para hacer el gel de proteínas. Se preparó un gel separador SDS-PAGE 12% acrilamida-bis (12% acrilamida-bis, 50µl APS, 0,1% SDS, 0,375M Tris pH 8,8, 20µl TEMED) el cual se agregó a la cámara hasta 1cm del borde y sobre el gel separador se agregó 1mL de etanol o isopropanol para emparejar el gel y se dejó gelificar. Luego se retiró el etanol y se lavó 3 veces con agua destilada. Posteriormente se agregó el gel concentrador SDS-PAGE 5% acrilamida-bis (5% acrilamida-bis, 50µl APS, 0,1% SDS, 0,125M Tris pH 6,8, 20µl TEMED). Paralelamente, las proteínas que se utilizaran como muestras se descongelaron en hielo, a 40µl de cada una se le agregó 10µl Buffer de carga 5x SDS/β-mercaptoetanol (0,02% azul de bromofenol, 50% glicerol, 10% SDS, 250mM Tris pH 6,8) y luego se calentaron a 100°C por 5 minutos. El gel fue montado en la cámara de electroforesis (BioRad) con Buffer de corrida 1% SDS-Glicina (0,192M glicina, 1% SDS, 0,025M Tris pH 8,3), se cargaron las muestras junto con 10µl de marcador de proteínas utilizando una jeringa Hamilton y se corrió el gel por aproximadamente 1 hora a 250V. Para realizar la electrotransferencia a una membrana de transferencia se utilizó un sistema semi-seco a través de una cámara con electrodos de grafito. Tanto el gel como el papel inmunoblot (8 papeles de tamaño similar al gel) se colocaron en Buffer de Transferencia (0,192M glicina, 20% v/v metanol, 0,025M Tris pH 8,3) durante unos minutos. Se recortó un trozo de película PVDF de igual tamaño que el gel, se colocó en metanol hasta que se colocó transparente y luego se sumergió en

Buffer de Transferencia. Se armó el sistema de electrotransferencia cuidando de no dejar burbujas y se transfirió durante 1 hora a 120mA (2mA x cm<sup>2</sup> de gel). Terminada la transferencia, se lavó con TBS 1X. La membrana fue bloqueada durante toda la noche a 4°C, utilizando una solución de bloqueo (0,8g Albúmina (BSA), 20mL TBS 1X) y al día siguiente se lavó la membrana con TTBS 1X (TBS 1X, 0,5% Tween 20) durante 10 minutos. Pasado este tiempo la membrana se incubó con la solución de anticuerpo primario 1:5000 (5mL Solución de Bloqueo (BSA), 5mL TTBS 1X, 2µl anticuerpo primario) durante 2 horas con agitación a temperatura ambiente. Luego el anticuerpo fue lavado 3 veces con TTBS 1X por 10 minutos. El anticuerpo primario corresponde a los anticuerpos que se desean verificar para los GTFs. La membrana fue incubada por 30 minutos a temperatura ambiente con la solución del anticuerpo secundario 1:7000 (1µl anticuerpo anti rabbit AP, 7mL de TTBS 1X) y nuevamente se repitieron los lavados con TTBS 1X. Finalmente, se reveló la membrana por 2 minutos con 10mL de Solución de Revelado que se compone de 35µl BCIP (5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil Fosfato), 70µl NBT (P-Nitro Blue Tetrazolium) y Buffer AP pH 9,5. El anticuerpo secundario se encuentra marcado con la fosfatasa alcalina (AP) la cual hidroliza a BCIP generando un producto de coloración azul púrpura y por su parte NBT al ser reducido, como parte de la misma reacción, genera un producto de la misma coloración, intensificando el color y permitiendo una mejor detección de la banda.

### **2.2.5. Transcripción *in vitro* e Inmunodepleción**

Para realizar los ensayos de transcripción *in vitro* se utilizó como templado el promotor del gen ribosomal K5, que contiene la caja Homol D, previamente clonado en el laboratorio, junto a la caja G-less (Sawadogo y Roeder 1985). Los mRNA que contienen en su secuencia nucleotídica la base nitrogenada Guanina son degradados por la enzima RNasa T1, de esta forma solo se obtienen los mRNA que utilizaron como templado el que contenía la caja G-less. Como control se usó un DNA que contiene la misma caja Homol D pero en sentido inverso, llamado mutante 2 y como control positivo se realizó el mismo ensayo pero utilizando un anticuerpo irrelevante (anticuerpo contra la región no conservada del factor TFIIB de *S. cerevisiae*, denominado  $\alpha$ IR.). Además se utilizó como control de la reacción un DNA que contiene el promotor Ad-MLP (Adenovirus Major Late Transcription Promoter). En un volumen final de 24 $\mu$ l por tubo, se mezcló 0,4 $\mu$ g de DNA molde con 14 $\mu$ l Buffer H-O (5mM DTT, 2mM EGTA, 10% glicerol, 20mM HEPES pH 7,9, 0,1mM PMSF), 2 $\mu$ l PEG 20K, 3 $\mu$ l Buffer P10X (150mM acetato de magnesio, 25mM DTT, 50mM EGTA, 10% glicerol, 500mM HEPES pH entre 7,6-7,8, 900mM monofosfato de L-glutamato) y 1 $\mu$ l extracto total de *S. pombe*. La mezcla se dejó incubar por 10 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de PIC. Posteriormente se agregó 3 $\mu$ l de Buffer de Elongación E10X (80mM ácido fosfoenolpirúvico, 4mM rATP, 4mM rCTP, 4mM rGTP, 0,15mM rUTP.), 0,2 $\mu$ l RNasin (Promega Corp.), 0,8 $\mu$ l RNasa T1, 25 $\mu$ Ci [ $^{32}$ P]-UTP y se completó un volumen de 30 $\mu$ l con Buffer H-0, la reacción se dejó incubando a 25°C durante 1 hora, periodo en que ocurre la transcripción. Pasado este tiempo, la reacción se detuvo usando

la solución de bloqueo Stop HeLa (100mM acetato de sodio pH 5,5, 10mM EDTA, 0,2% SDS, 1mg/ml RNA carrier). A continuación se realizó la extracción fenólica del mRNA y se precipitó con etanol 100%. Luego el pellet fue secado y resuspendido en 20µl de Buffer de carga de RNA. Los transcritos obtenidos se corrieron en un gel 5% poliacrilamida y 7M urea, el cual fue expuesto en un film fotográfico (Kodak) por 3 días para luego ser observado en el escáner PhosphoImager (Personal Molecular Imager FX, BioRad).

Para hacer los ensayos de Inmunodepleción se mezcló 1µg del anticuerpo específico para el GTF que se desea estudiar, con el extracto total de proteínas de *S. pombe* y se dejó incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se agregó a la mezcla de 24µl para la formación de PIC, para luego continuar con el protocolo de transcripción descrito anteriormente. Para el caso de los Ensayos de Rescate de la transcripción, es decir, ensayos en los cuales se agrega el GTF que fue inmunodepletado a la reacción de transcripción, se siguió el mismo procedimiento descrito para la Inmunodepleción, solo que a la mezcla de 24µl se le agregó 100ng del GTF que fue retirado, con el fin de permitir su incorporación en la formación de PIC y luego se continuó con la reacción de transcripción siguiendo los pasos ya descritos.

#### **2.2.6. Preparación sonda de DNA marcadas con P<sup>32</sup>γATP**

Se utilizó como sonda un fragmento de DNA de doble hebra del promotor del gen ribosomal K5 que contiene la caja Homol D, la cual fue eluída en 1,2mL de solución de elución de oligonucleótidos (0,3M acetato de sodio pH 5,2, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% SDS,

10mM Tris-HCl pH 6,8) a una temperatura de 37°C con agitación constante durante una noche. Al día siguiente se centrifugó a 3000rpm por 15 minutos, siendo el sobrenadante precipitado con 4 volúmenes de etanol (Winkler Ltda., Chile) a -80°C por 30 minutos, luego se centrifugó a 13000rpm por 10 minutos y el pellet resultante fue lavado con etanol al 80% y posteriormente secado a 40°C por 5 minutos. Finalmente, se resuspendió en agua bidestilada y se midió la concentración de DNA por espectrofotometría (JENWAY 6305 UV/Vis. Spectrophotometer). Para la reacción de fosforilación se mezcló 1µg de la sonda de DNA con 2µL de Buffer 10X de la Enzima T4 polinucleótido quinasa (T4 PNK), 5 a 10µCi de [<sup>32</sup>P]-ATP (800 Ci/mmol), dependiendo del decaimiento que este presente. Se agregó 2µL de enzima T4 PNK (10 U/µL, Promega, USA) y se completó con agua destilada estéril un volumen final de 20µL. La mezcla se dejó incubando a una temperatura de 37°C por 30 minutos. Posteriormente, se agregaron 20µL de Buffer TE (1mM EDTA pH 8,0, 10mM Tris HCl pH 7,8). Luego la mezcla se purificó usando una columna con resina P10 (BioRad), fue secada en una columna de 2mL y centrifugada 5 minutos a 13000 rpm. Finalmente se cuantificó la sonda colectada en un contador de centelleo líquido (Delta 300, Estados Unidos) para determinar el número de cuentas por minuto (cpm) obtenidas.

Cabe señalar que todos los experimentos realizados con elementos radioactivos fueron supervisados por personas que contaban con la licencia adecuada para realizar este tipo de experimentos, siguiendo las instrucciones de seguridad necesarias y utilizando dependencias pertinentes para trabajar con radioactividad.

### **2.2.7. EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)**

Para comprobar que los GTFs estudiados a lo largo de este seminario de título son requeridos para la transcripción, pero no para el reconocimiento de la caja Homol D, se realizaron los ensayos EMSA, que permiten observar la formación del complejo de unión a DNA. Estos ensayos se realizaron en un volumen final de 20 $\mu$ L, en los cuales se mezclaron 2 $\mu$ L Buffer de Binding 10X, 1 $\mu$ L p(dI-dC), 2 $\mu$ L PEG 20K, 10 $\mu$ L extracto de proteínas totales de *S. pombe*, 1 $\mu$ L BSA, 1 $\mu$ L PMSF y 2 $\mu$ L del anticuerpo específico para el GTFs (inmunodepleción GTF a analizar). La mezcla fue incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente, luego se agregó 1 $\mu$ L de sonda (a una concentración final de 2000cpm/  $\mu$ L). La sonda utilizada corresponde a la obtenida en la sección 2.2.5. Como control negativo se utilizó una mezcla sin extracto de proteínas y como controles positivos se usó una sin anticuerpos y uno con un anticuerpo sin relevancia (anticuerpo T.V. contra una proteína de *Trichomonas vaginalis*). La reacción se incubó por 10 minutos a 30°C y luego se cargó en un gel 5% acrilamida/10% glicerol en TBE 0,5X, que fue pre-corrído por 30 minutos a 100V en una cámara fría (4°C). El gel fue corrido por aproximadamente 2 horas a 100V a 4°C y posteriormente secado por 1 hora a 80°C al vacío. Transcurrido este tiempo, el gel fue expuesto por 3 días con un film fotográfico (Kodak) en un cassette a -80°C. Finalmente el film fue revelado en un cuarto oscuro utilizando soluciones reveladoras y fijadoras adecuadas.

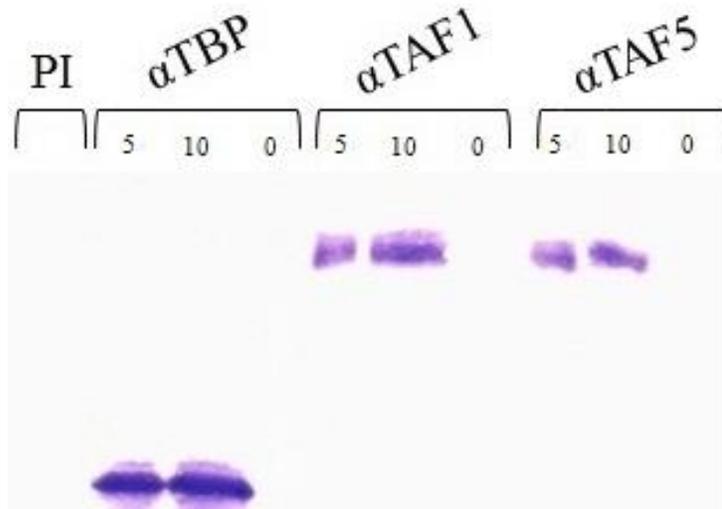
### 3. RESULTADOS

#### **3.1. Verificación de la actividad de los anticuerpos purificados**

Inicialmente se purificaron los anticuerpos policlonales de los factores de transcripción TAF5 (TAF72), TFIIE, TFIIH y la subunidad del mediador Srb4, utilizando el protocolo descrito en la sección 2.2.3. Para comprobar que éstos funcionaran correctamente y fueran capaces de unirse a las proteínas para los cuales fueron diseñados, se realizó un Western Blot utilizando como proteína blanco factores de transcripción purificados previamente. En este trabajo solo se comprobó el anti TAF5 ( $\alpha$ TAF5) junto con anti TBP ( $\alpha$ TBP) y TAF145 ( $\alpha$ TAF1) previamente purificados usando el mismo procedimiento (2.2.3). Con el anticuerpo de la subunidad del mediador Srb4 no se pudo realizar la comprobación, ya que no se contaba con la proteína blanco purificada. Los anticuerpos para los factores TFIIE y TFIIH habían sido previamente probados en el laboratorio con sus correspondientes proteínas blanco. En la membrana de Western Blot se cargaron 0, 5 y 10 ng de proteína blanco y un control negativo de suero preinmune (PI) proveniente de un conejo que no fue inoculado.

La Figura 3 muestra la membrana obtenida del análisis de los anticuerpos anti TBP, TAF1 (TAF145) y TAF5 (TAF72). En ella se puede observar que para el caso del suero PI y donde no se cargó nada de la proteína blanco (0 ng) no se obtuvieron bandas, demostrando que en el suero PI no existen péptidos que sean reconocidos por los anticuerpos contra los GTF analizados. En la misma figura se puede observar la aparición de bandas en todos los carriles donde se cargó los GTF analizados. Es posible

observar que al aumentar la cantidad de proteína blanco la banda se ve más intensa, debido a que existe más proteína y el anticuerpo posee un número mayor de moléculas al cual unirse.



**Figura 3. Verificación anticuerpos mediante ensayo Western Blot.** Imagen de la membrana del ensayo Western Blot donde se utilizó los factores de transcripción TBP recombinante y fragmentos recombinantes de TAF 1 y 5 como proteínas blanco, cargando para cada anticuerpo probado 0, 5 y 10 ng de ellas. De izquierda a derecha: El primer carril muestra el control negativo (suero PI), carril 2 a 4 muestran el ensayo para el anticuerpo anti TBP, los carriles 5 a 7 para el anticuerpo anti TAF1 (TAF145) y los carriles 8 a 10 para el anticuerpo anti TAF5 (TAF72).

Para el caso de anti TBP, se usó como proteína blanco TBP recombinante y para TAF 1 y 5, se utilizaron fragmentos de proteína recombinante para cada TAF, observándose bandas mismo tamaño para ambos.

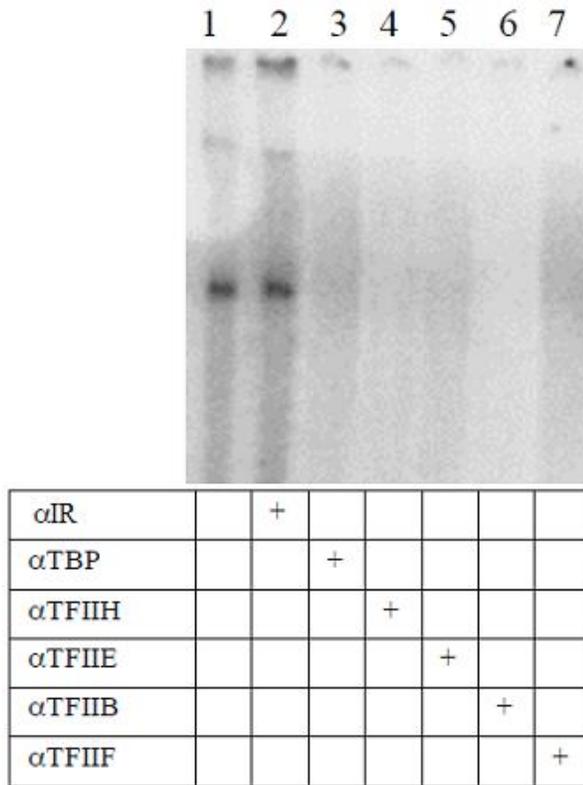
El ensayo Western Blot permite verificar que los anticuerpos analizados reconocen la proteína para la cual fueron construidos, por lo tanto pueden ser utilizados para los ensayos de transcripción *in vitro* e inmunodepleción.

### **3.2. Determinación de los GTFs necesarios para la transcripción comandada por la caja Homol D**

Para verificar que los componentes utilizados funcionaran de manera correcta, primero se realizó un ensayo de transcripción *in vitro* usando como DNA templado el promotor Ad-MLP, el cual posee la caja TATA y que anteriormente ya había sido utilizado en este laboratorio para estos ensayos. Luego de esto se procedió a realizar el ensayo utilizando como DNA templado del promotor ribosomal K5 que contiene la caja Homol D y como control positivo se utilizó el mismo ensayo pero utilizando un anticuerpo irrelevante (anticuerpo contra la región no conservada del factor TFIIB de *S. cerevisiae*, denominado en la Figura 4 como  $\alpha$ IR,).

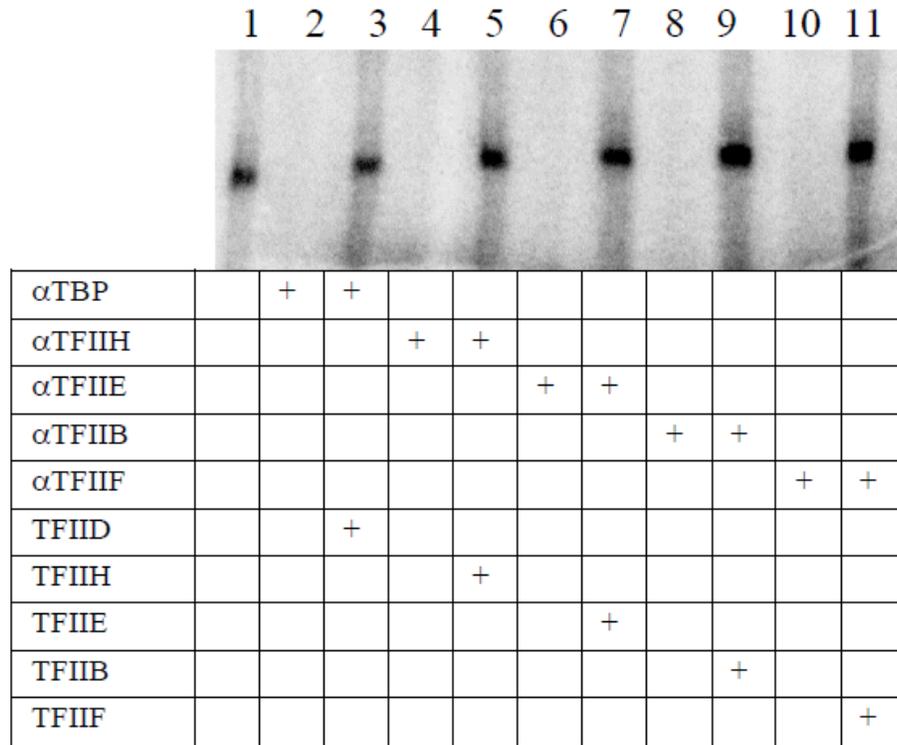
La Figura 4 muestra el film que se obtuvo al revelar el gel donde se corrieron los ensayos, observándose una banda correspondiente al transcrito cuando no se agregan anticuerpos a la reacción (carril 1). Lo mismo se observa en el caso del control positivo, donde al agregar  $\alpha$ IR la transcripción no se vio afectada (carril 2). Esto permite corroborar que este sistema puede ser utilizado para estudiar la transcripción conducida por el elemento Homol D. En la misma figura se puede ver el efecto de la inmunodepleción de los GTF analizados en este trabajo: TBP, TFIIH, TFIIE, TFIIB y TFIIF, observándose que en todas las inmunodeplecciones realizadas el proceso de

transcripción no se llevó a cabo, lo que indica que todos éstos GTF son importantes para que este proceso ocurra.



**Figura 4. Requerimientos de GTFs de la transcripción dirigida por el promotor ribosomal K5 en *S. pombe*.** Autoradiografía de los ensayos de transcripción *in vitro* utilizando como DNA templado el promotor ribosomal K5. El carril 1 indica el ensayo de transcripción en ausencia de anticuerpos y el carril 2 en presencia del anticuerpo irrelevante,  $\alpha$ IR. Los carriles 3-7 muestran la inhibición total de la transcripción luego de incubar el extracto celular con el anticuerpo respectivo. Los anticuerpos utilizados corresponden a anti-TBP (carril 3), anti-TFIIH (carril 4), anti-TFIIIE (carril 5), anti-TFIIIB (carril 6) y anti-TFIIIF (carril 7). En cada ensayo se agregó 1 $\mu$ g de cada anticuerpo.

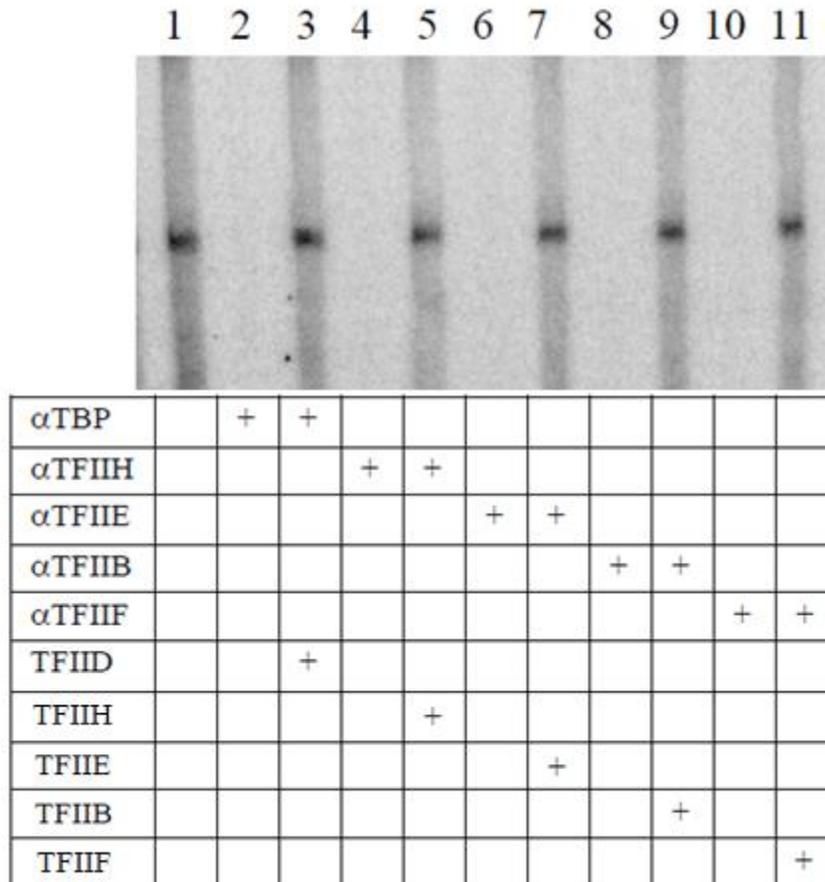
La Figura 5 muestra la autoradiografía obtenida de los ensayos de inmunodepleción y rescate utilizando el mismo DNA templado y los mismos anticuerpos de los ensayos anteriores (Figura 4). Todos los factores de transcripción utilizados para los ensayos de rescate se encontraban ya purificados en el laboratorio. En la figura se puede ver junto a cada inmunodepleción el rescate correspondiente, en donde se agregó a la reacción el GTF eliminado antes de la formación de PIC, con el fin de que el GTF pudiera unirse al complejo. Se puede observar que en todos los casos se obtiene el transcrito deseado, demostrando que la ausencia de solo uno de los GTF estudiados es suficiente para que el proceso de transcripción no ocurra y por lo tanto, cada uno de estos GTF es necesario para que se lleve a cabo la transcripción dirigida por la caja Homol D en extractos celulares de *S. pombe*.



**Figura 5. Rescate de la transcripción dirigida por el promotor ribosomal K5 en *S. pombe*.** Autoradiografía de los ensayos de transcripción *in vitro* utilizando como DNA templado el promotor ribosomal K5. El carril 1 muestra el ensayo de transcripción sin presencia de anticuerpos. Los carriles 2, 4, 6, 8 y 10 señalan los ensayos de inmunodepleción utilizando el siguiente orden de anticuerpos: anti-TBP, anti-TFIIH, anti-TFIIIE, anti-TFIIB y anti-TFIIF. Los carriles 3, 5, 7, 9 y 11 muestran los ensayos de rescate donde se adicionó el factor de transcripción retirado TFIID, TFIH, TFIIIE, TFIIB y TFIIF, respectivamente, indicando una recuperación de la transcripción en todos los casos. Para la inmunodepleción se agregó 1 $\mu$ g de cada anticuerpo y en los ensayos de rescate 100ng del GTF respectivo.

Además se realizaron ensayos de inmunodepleción y rescate utilizando como DNA templado el promotor K5 con la caja Homol D invertida (Figura 6), analizando los mismos factores de transcripción anteriores. De análisis anteriores en el laboratorio, se conocía que este templado podía conducir la transcripción, lo cual queda comprobado al observar que los mismos factores son requeridos para que ocurra la transcripción

utilizando este DNA como molde y que al agregar dicho factor a la reacción la transcripción se recupera en todos los casos.



**Figura 6. Rescate de la transcripción dirigida por el promotor ribosomal K5 con Homol D invertida en *S. pombe*.** Autoradiografía de los ensayos de transcripción *in vitro* utilizando como DNA templado el promotor ribosomal K5 con caja Homol D invertida. El carril 1 muestra el ensayo de transcripción sin presencia de anticuerpos. Los carriles 2, 4, 6, 8 y 10 señalan los ensayos de inmunodepleción utilizando el siguiente orden de anticuerpos: anti-TBP, anti-TFIIH, anti-TFIIIE, anti-TFIIIB y anti-TFIIF. Los carriles 3, 5, 7, 9 y 11 muestran los ensayos de rescate donde se adicionó el factor de transcripción depletado TFIID, TFIH, TFIIIE, TFIIIB y TFIIF, respectivamente, indicando una recuperación de la transcripción en todos los casos. Para la inmunodepleción se agregó 1 $\mu$ g de cada anticuerpo y en los ensayos de rescate 100ng del GTF respectivo.

### **3.3. Análisis de unión de los GTFs a caja Homol D**

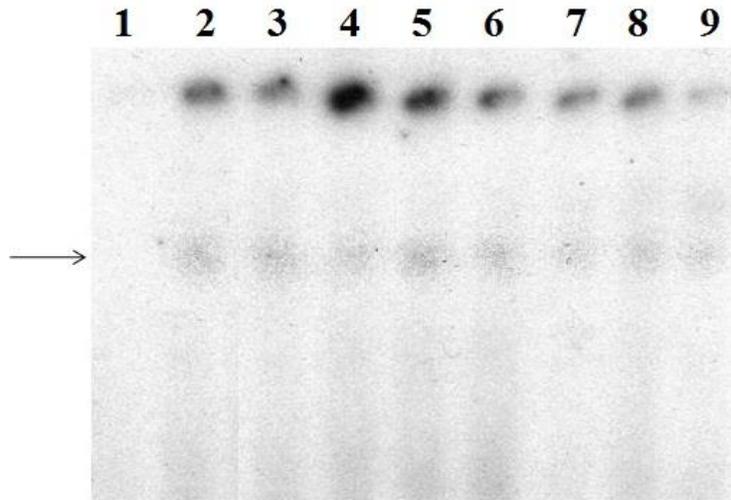
Los ensayos EMSA permitieron demostrar que los GTFs estudiados en el desarrollo de esta tesis no son las proteínas que reconocen la caja Homol D y por lo tanto no intervienen en el primer paso del reconocimiento del promotor, pero sí en el proceso de transcripción. Para esto se utilizó como sonda un fragmento de doble hebra del promotor del gen ribosomal K5 que contiene la caja Homol D, el cual fue marcado con  $P^{32}\gamma$ ATP. Se realizaron dos controles, uno donde la mezcla de reacción no contiene ningún anticuerpo y otro que contenía un anticuerpo sin relevancia ( $\alpha$ T.V, anticuerpo T.V. contra una proteína de *Trichomonas vaginalis*), éstos permiten observar si existe la aparición del complejo proteína/DNA al no utilizarse ningún anticuerpo específico para la proteína de reconocimiento de la caja Homol D. Como control negativo se utilizó una mezcla sin extracto celular, lo que permitirá observar que no existe la aparición de banda a menos que esté presente el extracto, ya que es éste el que contiene la proteína de reconocimiento de la secuencia Homol D y por lo tanto sin él no se puede formar el complejo promotor/proteína que genera la banda.

En la Figura 7 se puede observar la autoradiografía obtenida de los ensayos EMSA donde se utilizaron los anticuerpos contra los siguientes GTFs: TBP, TAF1, TFIIB, TFIIE, TFIIH y la subunidad del mediador Srb4. Se muestra la aparición de una banda de similar tamaño en todas las columnas (señalada por la fecha) que contenían anticuerpos para los GTFs analizados, es decir, ninguno de los factores de transcripción aquí estudiados reconocen la secuencia de la caja Homol D y por lo tanto al ser éstos

retirados, no afectan la formación del complejo promotor/proteína, que en este caso corresponde a la secuencia Homol D/proteína de unión a DNA.

En la misma figura se observa que ambos controles positivos (carril 2 y 9) presentan la misma banda que en los otros carriles, lo cual concuerda con lo esperado ya que en ninguno de ellos se utilizó un anticuerpo contra la proteína de reconocimiento de la caja Homol D y la formación del complejo promotor/proteína tampoco se vio afectada. De igual forma, se puede ver que el carril correspondiente al control negativo (carril 1) no presentó banda, ya que en él no existía extracto celular y por lo tanto la proteína que reconoce a la caja Homol D no se encontraba en la mezcla para formar el complejo. Las bandas que se observan en la parte superior de la figura corresponden a los pocillos de carga del gel, los cuales también se ven marcados al retener una parte de la sonda radioactiva, lo cual es común en este tipo de ensayos y que depende de la fuente de BSA, proteína que se utiliza para evitar interacciones inespecíficas. A la vez, estas bandas funcionan como un control de carga, para verificar que en cada pocillo se cargó una cantidad similar de sonda.

Estos resultados demuestran que los GTF: TBP, TFIIH, TFIIE, TFIIB y TFIIF no corresponden a las proteínas que reconocen la secuencia Homol D en el promotor, pero que sí son necesarios para que el proceso de transcripción se lleve a cabo como se observó en los resultados de los ensayos de inmunodepleción. Lo mismo ocurre con TAF1 (TAF145) y la subunidad del mediador Srb4, lo cual ya se había corroborado con anterioridad en el laboratorio.



$\alpha$ TBP			+						
$\alpha$ TAF1				+					
$\alpha$ TFIIB					+				
$\alpha$ TFIIIE						+			
$\alpha$ TFIIH							+		
$\alpha$ Srb4								+	
$\alpha$ T.V									+

**Figura 7. Ensayos EMSA utilizando una sonda con el promotor ribosomal K5 de *S. pombe*.** Autorradiografía de los ensayos EMSA utilizando una sonda radioactiva que posee el promotor ribosomal K5. El carril 1 muestra el control negativo que no contiene extracto celular. El carril 2 corresponde al control positivo donde no se cargó ningún anticuerpo. En los carriles 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 se agregaron anticuerpos en el siguiente orden: anti-TBP, anti-TAF1, anti-TFIIB, anti-TFIIIE, anti-TFIIH, anti-Srb4 y anti-T.V (control positivo). La flecha señala la banda correspondiente al complejo DNA/proteína. Para este ensayo se utilizó 10 $\mu$ g de extracto celular y 200ng de cada anticuerpo.

## 4. DISCUSION

### 4.1. Obtención de anticuerpos

Los factores generales de la transcripción analizados a lo largo de este seminario de título fueron escogidos debido a su importancia, ya que corresponden a los principales GTFs conocidos para la transcripción dirigida por la enzima RNA Pol II en promotores con caja TATA, por lo que los resultados obtenidos podrían ser generalizados para todas las transcripciones realizadas por esta enzima y que sean comandadas por la secuencia promotora Homol D. Como se mencionó en los resultados (Sección 3.1), para los ensayos de Western Blot se utilizó fragmentos de las proteínas recombinantes TAF1 y 5, los cuales permitieron demostrar que dichos anticuerpos reconocen las proteínas TAFs para los cuales fueron diseñados. Debido a que se usó un fragmento de las proteínas recombinantes, se obtuvieron bandas de similar tamaño para anti TAF1 y anti TAF5 (Figura 3). Por su parte, el anticuerpo anti TBP fue probado utilizando TBP recombinante.

Los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* de inmunodepleción y rescate de transcripción realizados con extracto celular de *S. pombe* (Sección 3.2) muestran que al hacer el rescate agregando el GTF que fue retirado, el proceso de transcripción ocurre normalmente (Figura 5 y 6). Esto permite inferir que dichos anticuerpos están uniéndose efectivamente a su proteína blanco correspondiente y que por lo tanto estarían cumpliendo la función para la cual se utilizaron en este seminario de título.

#### **4.2. GTFs necesarios para la transcripción comandada por la caja Homol D**

Un punto que cabe destacar es que los ensayos de transcripción *in vitro* son experimentos sensibles, en los cuales se debe mantener un control sobre todos los factores que puedan influenciar en él, puesto que incluso la temperatura ambiental o la de los mismos componentes del ensayo pueden afectar el correcto desarrollo de éste. Además es importante mantener el orden correcto al agregar los reactivos, para así permitir que las etapas del proceso de transcripción se establezcan de forma adecuada. Es por esto que se hace necesario verificar inicialmente, con un control positivo (en este caso se utilizó el DNA molde el promotor Ad-MLP que contiene la caja TATA, sección 3.2), que la reacción ocurra de manera correcta, así como también verificar las condiciones ambientales en las que se realizarán los ensayos. Además, el hecho de utilizar un ribonucleótido trifosfato radioactivo hace que se deban tener precauciones adicionales, procurando una correcta manipulación de este compuesto, como también mantener en cuenta la vida media útil de este elemento, haciendo que la planificación de los experimentos sea esencial.

Los ensayos *in vitro* de inmunodepleción y rescate de la transcripción demostraron que los factores de transcripción TBP, TFIIH, TFIIE, TFIIB y TFIIF son necesarios para que ocurra el proceso de transcripción en promotores con caja Homol D, y que la ausencia de cualquiera de ellos interfiere con la formación exitosa de PIC, presumiblemente al no permitir que la RNA Pol II se posicione en el lugar correcto para el comenzar el proceso de síntesis de la hebra de RNA. Una explicación alternativa a estos resultados podría ser que, al retirar un GTF con un anticuerpo específico, se

extraiga a la vez a otro factor que esté unido a ese GTF y que sea este segundo factor el necesario para que ocurra la transcripción, y no el que es reconocido por el anticuerpo. Para comprobar esto podría utilizarse una columna de proteína A, la cual se una fuertemente con la cadena pesada de los anticuerpos, fijándolos en la columna. Luego, hacer pasar un extracto de proteínas totales donde un GTF específico se unirá al anticuerpo quedando retenido y, en caso de que exista un segundo factor que se una a ese GTF, también quedará inmovilizado en la columna. Posteriormente al liberar el complejo anticuerpo/GTF de la columna de proteína A se puede realizar un análisis de proteínas para determinar cuál es la identidad de esos factores.

#### **4.3. Unión de los GTFs a la caja Homol D**

Los ensayos EMSA permitieron observar que los factores de transcripción TBP, TFIIH, TFIIE, TFIIB y TFIIF no corresponden al factor que reconoce en el promotor la secuencia Homol D, ya que al inmunodepletarlos no se ve afectada la aparición de la banda que identifica al complejo promotor/proteína (Figura 7). Estos resultados, en conjunto con los obtenidos en los ensayos de inmunodepleción y rescate de la transcripción, mostraron que estos GTFs son necesarios para que se lleve a cabo la síntesis de la hebra de RNA, pero no para el reconocimiento de la caja Homol D, quien es la encargada de comandar este proceso, siendo además el sitio de ensamblaje de la maquinaria transcripcional. Como se mencionó en la sección de resultados (3.3), se observa el mismo fenómeno tanto para TAF1 (TAF145) como para la subunidad Srb4

del mediador, lo cual ya fue demostrado con anterioridad en el laboratorio. Estos ensayos, a pesar de ser menos sensibles que los de transcripción *in vitro*, deben ser realizados con mucha precaución y detalle, ya que la concentración y temperatura de los componentes es un factor determinante. Además, como también se utiliza una sonda de DNA marcada radioactivamente, se debe trabajar bajo las normas de seguridad adecuadas y tener un calendario de trabajo que considere la vida media del elemento que se está usando.

La autoradiografía que se obtiene de los ensayo EMSA, además de mostrar las bandas correspondientes al complejo promotor/proteína de unión, indican unas bandas en la parte superior correspondiente a los pocillos de carga del gel de EMSA y una gran banda en la zona inferior. Los pocillos se observan marcados luego de revelar el film fotográfico debido a que retienen una parte de la sonda radioactiva al momento de cargar el gel. Por su parte la banda en la zona inferior corresponde a la sonda libre que migra hasta el final del gel EMSA. Estas dos bandas funcionan como controles de carga en este experimento, ya que permiten observar si en cada carril se cargó una cantidad similar de sonda, además permiten verificar que la sonda radioactiva se vea correctamente al momento de revelar el film. En la figura 7 solo se muestran la banda correspondiente a los pocillos de carga y la del complejo promotor/proteína, para facilitar su visualización en este trabajo. Las bandas correspondientes al complejo promotor/proteína se ven mucho más claras que la bandas superiores, debido a que la cantidad de sonda radioactiva que se une con la proteína que reconoce la secuencia Homol D es mucho menor que la cantidad de sonda libre que se agrega en cada ensayo, haciendo que las

bandas correspondientes a los pocillos de carga se vean más oscuras. En la misma figura se puede observar que las bandas que se obtuvieron no son lo suficientemente nítidas, debido a la baja resolución de la imagen obtenida en el proceso de digitalización del escáner, pero que era detectable al observar el film directamente.

Los resultados obtenidos en los ensayos EMSA en este seminario de título indican que TBP como TAF1 no corresponden a la proteína de reconocimiento de la secuencia Homol D, y de igual forma, que ninguno de los otros factores estudiados serían la proteína de unión a la secuencia Homol D (Figura 7). Investigaciones más recientes en este laboratorio demostraron que la proteína Rrn7 reconoce la secuencia Homol D en el promotor y permiten el reclutamiento de la maquinaria transcripcional de la RNA Pol II. Además Rrn7 presenta interacción con los factores TBP y TFIIB (Rojas y cols, 2011) y además ha sido identificada como miembro de la maquinaria transcripcional de la RNA Pol I en *S. cerevisiae* (Keys y cols., 1994, Lin y cols., 1996). También se ha identificado que la proteína quinasa CK2 regularía a Rrn7, mediante la fosforilación del residuo Thr67, inhibiendo la unión de Rrn7 a la secuencia Homol D impidiendo, de esta forma, la actividad transcripcional dirigida por Homol D (Moreira-Ramos y cols, 2015).

Resultados similares a los mencionados en este seminario se obtuvieron en paralelo con células humanas, usando como DNA molde el promotor del gen que codifica para la ATPasa lisosomal. Utilizando las mismas técnicas de estudio y analizando los mismos factores de transcripción aquí mencionados, se pudo observar que estos GTFs son imprescindibles para que ocurra el proceso de transcripción comandado por la RNA Pol II, pero no intervienen directamente en el reconocimiento de la caja Homol D humana.

Sin embargo, las proteínas DDB1 (DNA damage-binding protein 1) y RECQL (ATP-dependent DNA helicase Q1) poseen unión específica a la caja Homol D en células humanas. Esto permitiría concluir que los promotores con dicha caja necesitan la maquinaria transcripcional de la RNA Pol II y de las proteínas DDB1 y RECQL para que el proceso de transcripción ocurra de manera correcta (Contreras-Levicoy y cols., 2012).

## 5. CONCLUSIONES

- Se purificaron anticuerpos para los GTFs estudiados y se verificó su especificidad con el fin de utilizarlos en los siguientes ensayos de esta tesis.
- Mediante los experimentos aquí reportados fue posible determinar que los GTFs de la maquinaria transcripcional de la RNA Pol II (TBP, TFIIH, TFIIE, TFIIB Y TFIIF), son determinantes para que ocurra la transcripción de los genes comandados por la secuencia promotora Homol D.
- Se pudo establecer que los factores TBP, TAF1, TFIIB, TFIIE, TFIIH y la subunidad del mediador Srb4 no corresponden a la proteína que reconoce la secuencia Homol D.
- Basándose en todos los resultados obtenidos, se puede concluir que los promotores que poseen la secuencia Homol D dirigen la transcripción dependiente de RNA polimerasa II, utilizando para ello su maquinaria transcripcional y que una proteína distinta a las estudiadas en este seminario (Rrn7) que reconoce y se une a esa secuencia Homol D permitiendo el ensamblaje de PIC.

## 6. BIBLIOGRAFIA

**Anish R, Hossain MB, Jacobson RH, Takada S.** 2009. Characterization of Transcription from TATA-Less Promoters: Identification of a New Core Promoter Element XCPE2 and Analysis of Factor Requirements. PLoS ONE 4(4): e5103.

**Arkhipova IR.** 1995. Promoter elements in *Drosophila melanogaster* revealed by sequence analysis. Genetics 139(3): 1359-1369.

**Brueckner F, Cramer P.** 2008. Structural basis of transcription inhibition by  $\alpha$ -amanitin and implications for RNA polymerase II translocation. Nat Struct Mol Biol. 15(8): 811-818.

**Burke TW, Kadonaga JT.** 1996. *Drosophila* TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. Genes Dev. 10(6): 711-724.

**Burke TW, Kadonaga JT.** 1997. The downstream core promoter element, DPE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by TAFII60 of *Drosophila*. Genes Dev. 11(22): 3020-3031.

**Burley SK, Roeder RG.** 1996. Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). Annu Rev Biochem. 65: 769-799.

**Butler JE, Kadonaga JT.** 2002. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. Genes Dev. 16(20): 2583-2592.

**Cheriyath V, Novina CD, Roy AL.** 1998. TFII-I regulates Vbeta promoter activity through an initiator element. *Mol Cell Biol.* 18(8): 4444-4454.

**Concino MF, Lee RF, Merryweather JP, Weinmann R.** 1984. The adenovirus major late promoter TATA box and initiation site are both necessary for transcription *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* 12(19): 7423-7433.

**Contreras-Levicoy, J., Moreira-Ramos, S., Rojas, DA., Urbina, F. y Maldonado, E.** 2012. Transcription directed by human core promoters with a HomolD box sequence requires DDB1, RECQL and RNA polymerase II machinery. *Gene* 505(2): 318-323.

**Cramer P, Armache K-J, Baumli S, Benkert S, Brueckner F, Buchen C, Damsma GE, Dengl S, Geiger SR, Jasiak AJ, Jawhari A, Jennebach S, Kamenski T, Kettenberger H, Kuhn C-D, Lehmann E, Leike K, Sydow JF, Vannini A.** 2008. Structure of Eukaryotic RNA polymerases. *Annu. Rev. Biophys.* 37: 337-352.

**Evans R, Fairley JA, Roberts SG.** 2001. Activator-mediated disruption of sequence-specific DNA contacts by the general transcription factor TFIIB. *Genes Dev.* 15(22): 2945-2949.

**Gross T, Käufer N.F.** 1998. Cytoplasmic ribosomal protein genes of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* display a unique promoter type: a suggestion for nomenclature of cytoplasmic ribosomal proteins in databases. *Nucleic Acids Res.* 26(14): 3319-3322.

**Haag JR, Pikaard CS.** 2011. Multisubunit RNA polymerases IV and V: purveyors of non-coding RNA for plant gene silencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12(8): 483-492.

**Hamada M, Huang Y, Lowe TM, Marais RJ.** 2001. Widespread use of TATA elements in the core promoters for RNA Polymerases III, II, and I in fission yeast. *Mol Cell Biol.* 21(20): 6870-6881.

**Hampsey M.** 1998. Molecular genetics of the RNA Polymerase II General Transcriptional machinery. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62(2): 465-503.

**Keys DA, Vu L, Steffan JS, Dodd JA, Yamamoto RT, Nogi Y, Nomura M.** 1994. RRN6 and RRN7 encode subunits of a multiprotein complex essential for the initiation of rDNA transcription by RNA polymerase I in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 8(19): 2349-2362.

**Kutach AK, Kadonaga JT.** 2000. The downstream promoter element DPE appears to be as widely used as the TATA box in *Drosophila* core promoters. *Mol Cell Biol.* 20(13): 4754-4764.

**Lagrange T, Kapanidis AN, Tang H, Reinberg D, Ebricht RH.** 1998. New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: Sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes Dev.* 12(1): 34-44.

**Lee DH, Gershenzon N, Gupta M, Ioshikhes IP, Reinberg D, Lewis BA.** 2005. Functional characterization of core promoter elements: the downstream core element is recognized by TAF1. *Mol Cell Biol.* 25(21): 9674-9686.

**Lewin B.** 2004. Genes VIII. Pearson Education, Inc. Chapter 21, pp 597-630.

**Lewis BA, Sims RJ 3rd, Lane WS, Reinberg D.** 2005. Functional characterization of core promoter elements: DPE-specific transcription requires the protein kinase CK2 and the PC4 coactivator. *Mol Cell.* 18(4): 471-481.

**Lim CY, Santoso B, Boulay T, Dong E, Ohler U, Kadonaga JT.** 2004. The MTE, a new core promoter element for transcription by RNA polymerase II. *Genes Dev.* 18: 1606-1617.

**Lin CW, Moorefield B, Payne J, Aprikian P, Mitomo K, Reeder RH.** 1996. A Novel 66-Kilodalton Protein Complexes with Rrn6, Rrn7, and TATA-Binding Protein To Promote Polymerase I Transcription Initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 16(11): 6436-6443.

**Maldonado E, Ha I, Cortes P, Weis L, Reinberg D.** 1990. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: role of transcription factors IIA, IID, and IIB during formation of a transcription-competent complex. *Mol Cell Biol.* 10(12): 6335-6347.

**Martinez E.** 2002. Multi-protein complexes in eukaryotic gene transcription. *Plant Mol. Biol.* 50: 925–947.

**Moreira-Ramos S, Rojas DA, Montes M, Urbina F, Miralles VJ, Maldonado E.** 2015. Casein kinase 2 inhibits HomolD-directed transcription by Rrn7 in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS J* 282(3): 491-503.

**Orphanides G, Lagrange T, Reinberg D.** 1996. The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev.* 10(21): 2657-2683.

**Orphanides G, Reinberg D.** 2002. A unified theory of gene expression. *Cell.* 108(4): 439-451.

**Rojas DA, Moreira-Ramos S, Zock-Emmenthal S, Urbina F, Contreras-Levicoy J, Käufer NF, Maldonado E.** 2011. Rrn7 protein, an RNA polymerase I transcription factor, is required for RNA polymerase II-dependent transcription directed by core promoters with a HomolD box sequence. *J. Biol. Chem.* 286(30): 26480-26486.

**Sainsbury S, Bernecky C, Cramer P.** 2015. Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16(3): 129-143.

**Sawadogo M, Roeder RG.** 1985. Factors involved in specific transcription by human RNA polymerase II: analysis by a rapid and quantitative in vitro assay. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82(13): 4394-4398.

**Smale ST, Baltimore D.** 1989. The “initiator” as a transcription control element. *Cell.* 57(1): 103-113.

**Smale ST, Kadonaga JT.** 2003. The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem.* 72: 449–479.

**Tanay A, Regev A, Shamir R.** 2005. Conservation and evolvability in regulatory networks: the evolution of ribosomal regulation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(20): 7203-7208.

**Thomas MC, Chiang CM.** 2006. The General Transcription Machinery and General Cofactors. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 41(3): 105-178.

**Tokusumi Y, Ma Y, Song X, Jacobson RH., Takada S.** 2007. The New Core Promoter Element XCPE1 (X Core Promoter Element 1) directs activator-, mediator-, and TATA-binding protein-dependent but TFIID-independent RNA polymerase II transcription from TATA-less promoters. *Mol Cell Biol.* 27(5): 1844-1858.

**Verrijzer CP, Yokomori K, Chen JL, Tjian R.** 1994. *Drosophila* TAFII150: similarity to yeast gene TSM-1 and specific binding to core promoter DNA. *Science.* 264(5161): 933-941.

**Verrijzer CP, Chen JL, Yokomori K, Tjian R.** 1995. Binding of TAFs to core elements directs promoter selectivity by RNA polymerase II. *Cell.* 81(7): 1115-1125.

**Wang Y, Stumph WE.** 1995. RNA polymerase II/III transcription specificity determined by TATA box orientation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(19): 8606-8610.

**Weis L, Reinberg D.** 1997. Accurate positioning of RNA polymerase II on a natural TATA-less promoter is independent of TATA-binding-protein-associated factors and initiator-binding proteins. *Mol Cell Biol.* 17(6): 2973-2984.

**Witt I, Straub N, Käufer NF, Gross T.** 1993. The CAGTCACA box in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* functions like a TATA element and binds a novel factor. *EMBO J.* 12(3): 1201-1208.

**Witt I, Kwart M, Gross T, Käufer NF.** 1995. The tandem repeat AGGGTAGGGT is, in the fission yeast, a proximal activation sequence and activates basal transcription mediated by the sequence TGTGACTG. *Nucleic Acids Res.* 23(21): 4296-4302.

**Witt I, Kivinen K, Käufer NF.** 2003. Core Promoters in *S. pombe*: TATA and homolDboxes. *The molecular biology of Schizosaccharomyces pombe: Genetics, Genomics and Beyond.* Springer. Chapter 22. pp. 343-351.