

Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



“Caracterización de la interacción de Rrn7 con los factores transcripcionales TF_{II}B y TBP en promotores que contienen la caja HomOLD en *Schizosaccharomyces pombe*”

Matías Ignacio Montes Serey

Memoria para optar al Título Profesional de Bioquímico

Director de Tesis
Dr. Edio Maldonado M.

Prof. Patrocinante
Dr. Sergio Lobos C.

Co-Directora de Tesis
Dr. Sandra Moreira R.

Facultad de Medicina
Instituto de Ciencias Biomédicas
Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Qcas. y Farmacéuticas
Depto. de Bioquímica y Biol. Molecular
Universidad de Chile

Agosto 2014

Índice de contenidos

I. INTRODUCCIÓN	1
II. HIPÓTESIS	11
III. OBJETIVOS	11
IV. MATERIALES Y METODOLOGÍA	12
1. MATERIALES:	12
2. CEPAS Y MEDIOS DE CULTIVOS UTILIZADOS	13
3. PURIFICACIÓN DE Rrn7 RECOMBINANTE	13
4. GENERACIÓN DE SONDA MARCADA RADIOACTIVAMENTE	15
5. PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES	15
6. ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY (EMSA)	16
7. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (CHIP)	17
a. Extracción y purificación de la cromatina	17
b. Inmunoprecipitación de Cromatina	19
8. PURIFICACIÓN DE DNA Y PCR	20
V. RESULTADOS	22
1. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE Rrn7 RECOMBINANTE	22
2. ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD DE Rrn7 RECOMBINANTE PURIFICADA MEDIANTE EMSA	24
3. ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD DE ANTICUERPOS POLICLONALES PURIFICADOS PARA TBP Y TF_{II}B	26
4. EFFECTO DE TF_{II}B SOBRE LA UNIÓN DE Rrn7 A LA CAJA HOMOLD	27
5. EFFECTO DE TBP SOBRE LA UNIÓN DE Rrn7 A LA CAJA HOMOLD	31
6. EFFECTO DE ANTICUERPOS SOBRE LA MODULACIÓN PROVOCADA POR TBP Y TF_{II}B EN LA UNIÓN DE Rrn7 A LA CAJA HOMOLD	34
6. IDENTIFICACIÓN <i>IN VIVO</i> DE LOS FACTORES TBP Y TF_{II}B EN EL PIC SOBRE LA CAJA HOMOLD	36
VI. DISCUSIÓN	42
VII. CONCLUSIONES	53
VIII. BIBLIOGRAFÍA	54
IX. ANEXO	61
1. TABLAS	61

Índice De Figuras

Figura 1. Maquinaria transcripcional de la RNAP I	3
Figura 2. Etapas de la transcripción por la maquinaria de la RNAP II sobre promotores con caja TATA.....	5
Figura 3. Interacción entre TF _{II} B y el complejo TBP-DNA en la caja TATA.....	6
Figura 4. Interacción de Rrn7 con el factor TF _{II} B y el factor TBP	10
Figura 5. Partidores utilizados para los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina....	21
Figura 6. Análisis de las fracciones eluidas tras la purificación de Rrn7 Recombinante ...	22
Figura 7. Estudio del enriquecimiento de las fracciones eluidas tras la purificación de Rrn7 recombinante.....	23
Figura 8. Evaluación de la funcionalidad de Rrn7 recombinante purificada	24
Figura 9. Análisis cualitativo de la funcionalidad de Rrn7 recombinante purificada	25
Figura 10. Identificación de la funcionalidad y especificidad del anticuerpo policlonal contra TF _{II} B.	26
Figura 11. Identificación de la funcionalidad y especificidad del anticuerpo policlonal contra TBP	27
Figura 12. Efecto de TF _{II} B sobre la unión de Rrn7 a la caja HomID	28
Figura 13. Efecto de la incubación diferida de TF _{II} B sobre la unión de Rrn7 a la caja HomID	30
Figura 14. Efecto de TBP sobre la unión de Rrn7 a la caja HomID	32
Figura 15. Efecto de la incubación diferida de TBP sobre la unión de Rrn7 a la caja HomID	33
Figura 16. Efecto de anticuerpos sobre la modulación provocada por TBP y TFIIB en la unión de Rrn7 a la caja HomID	35
Figura 17. Amplificación por PCR del primer exón del gen de actina como control negativo de la CHIP	37
Figura 18. Amplificación por PCR de una parte del gen <i>nmt1</i> que contiene la caja TATA como control positivo de la CHIP.....	38
Figura19. Amplificación por PCR de una parte del gen <i>rpk5</i> que contiene la caja HomID	39
Figura20. Gráfico resumen de las inmunoprecipitaciones de cromatina con los factores TBP y TF _{II} B.....	40
Figura21. Inmunoprecipitación de cromatina utilizando una cepa modificada de levadura Taf3-TAP y una cepa silvestre como control negativo	49
Figura22. Modelo propuesto para el PIC sobre la caja HomID.....	50

Lista de Abreviaturas

BRE: “TF_{II}B Recognition Element” (Elemento que reconoce TF_{II}B)
CF: “Core Factor” (Factor Central)
ChIP: “Chromatin Immunoprecipitation” (Inmunoprecipitación de cromatina)
CPE: “Core Promoter Elements” (Elementos del promotor Mínimo)
CTD: “Carboxy-Terminal Domain” (Dominio carboxilo-terminal)
DCE: “Downstream Core Element” (Elemento central río-abajo)
DSE: “Distal Sequence Element” (Elemento de secuencia distal)
EMSA: “Electrophoretic Mobility Shift Assay” (Ensayo en geles de retardo)
GTFs: “General Transcription Factors” (Factores de transcripción generales)
Inr: “Initiator” (Iniciador)
pb: Pares de bases
PCR: “Polymerase Chain Reaction” (Reacción en cadena de la polimerasa)
PIC: “Pre Initiation Complex” (Complejo de pre-iniciación)
PSE: “Proximal Sequence Element” (Elemento de secuencia proximal)
MTE: “Motif Ten Element” (Elemento del motivo diez)
rpK5: “Ribosomal Protein K5” (Proteína ribosomal K5)
SL1: “Selectivity Factor 1” (Factor de selectividad 1)
SRP: “Signal Recognition Particle” (Partícula de reconocimiento de señal)
TAF: “TBP-Associated Factor” (Factor Asociado a TBP)
TBP: “TATA Binding Protein” (Proteína de unión a caja TATA)
TF: “Transcription Factor” (Factor de transcripción)
TSS: “Transcription Start Site” (Sitio de inicio de la transcripción)
UAF: “Upstream Activating Factor” (Factor activador río-arriba)
UAS: “Upstream Activator Sequence” (Secuencia activadora río-arriba)
UBF: “Upstream Binding Factor” (Factor de unión río-arriba)
UPE: “Upstream Promoter Element” (Elemento del promotor río-arriba)
XCPE: “X Core Promoter Element” (Elemento del promotor mínimo X)

Resumen

La transcripción del DNA, primera etapa de la expresión génica, corresponde a la conversión de un DNA molde a RNA por acción enzimática de la RNA polimerasa (RNAP). En las células de los organismos eucariontes existen tres clases de RNA polimerasas nucleares (RNAP I, II y III). Cada clase de RNAP reconoce promotores específicos mediante la formación de complejos de pre-iniciación (*Pre-initiation Complex* o PIC) entre la RNAP y el uso factores de transcripción generales (*General Transcription Factors* o GTFs), siendo estos últimos los que dan especificidad a cada PIC. Los promotores son secuencias de DNA, normalmente ubicadas río arriba del inicio de la transcripción (*Transcription Start Site* o TSS), relativamente conservadas en el genoma, que poseen todos los elementos en *cis* necesarios para el inicio y la regulación de la transcripción de un gen. Los promotores de la RNAP II son los más estudiados y se clasifican en los que poseen caja TATA y en los que no, llamados TATA-Less. Entre los factores de transcripción que se unen a estos promotores están TF_{II}B, TF_{II}D, TF_{II}A, entre otros.

La caja HomID es un elemento del promotor mínimo que se encuentra en un promotor de tipo TATA-less de secuencia consenso CAGTCACA, descubierto en genes de proteínas ribosomales de *Schizosaccharomyces pombe*, y que es capaz de reclutar la RNAP II e iniciar la transcripción. Estudios recientes indican que para iniciar la transcripción desde estos promotores se necesitan los siguientes GTFs: TF_{II}D, TF_{II}B, TF_{II}F, TF_{II}H y TF_{II}E. Además, se ha propuesto que el factor Rrn7 (antes conocido como miembro de la maquinaria de la RNAP I) podría interaccionar con algunos de estos GTFs, como por ejemplo TF_{II}B y/o TBP (miembro del complejo TF_{II}D), lo que le conferiría a Rrn7 la facultad de unirse a la caja HomID y dirigir la transcripción. Sin embargo, aún se desconoce cuáles de estos factores junto a Rrn7 conforman el PIC, que se ensambla sobre la caja HomID.

En este trabajo se estudió la participación de los factores TF_{II}B y TBP, como miembros candidatos del complejo de pre-iniciación formado sobre la caja Hom1D. Mediante ensayos en geles de retardo o EMSA y ensayos de inmunoprecipitación de cromatina se analizaron las interacciones DNA-proteína y proteína-proteína. Para realizar los ensayos de EMSA fue necesario expresar y purificar la proteína Rrn7 recombinante utilizando una etiqueta de histidina, la que se utilizó junto a TBP y TF_{II}B. Además, se purificaron anticuerpos policlonales contra ambos factores, y fueron usados en ensayos de EMSA a modo de control. Los resultados de los EMSA muestran una intensificación de la banda representativa al complejo Rrn7-caja Hom1D al agregar cada factor a la reacción (TF_{II}B o TBP).

Los ensayos de ChIP se realizaron en una cepa silvestre de *S. pombe* utilizando los mismos anticuerpos purificados contra los factores TBP y TF_{II}B. El DNA obtenido, fue sometido a amplificación mediante PCR utilizando partidores específicos para la caja Hom1D. Además se realizaron dos controles, uno utilizando partidores que amplificaron parte del promotor y del primer exón del gen *nmt1* para la caja TATA como control positivo, y otros para una región del gen de actina (*act1*) como control negativo. Se observó amplificación del DNA representativo a la caja Hom1D, al precipitar cada factor, reflejando la presencia de éstos en la región promotora.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran *in vitro* (EMSA) un efecto potenciador de TBP y TF_{II}B sobre la formación del complejo Rrn7-caja Hom1D, lo que es complementario a la presencia mostrada *in vivo* (ChIP) de estos factores en el promotor. De estos experimentos se concluye la participación de ambos factores en la formación del complejo de pre-iniciación sobre la caja Hom1D. Además los resultados de EMSA indicaron que TF_{II}B posee un efecto potenciador mayor que TBP a una determinada concentración. Por otro lado, en ensayos EMSA ambos factores produjeron un desplazamiento o retardo de la banda del complejo Rrn7-Hom1D, pero el desplazamiento provocado por TBP fue más intenso y estable, a diferencia del de TF_{II}B que fue solo temporal. Estos resultados

sugieren que los roles que cumplen los factores TF_{II}B y TBP en el PIC en la caja HomolD, son el de un factor reclutador de Rrn7 al promotor y el de un factor potenciador de la interacción proteína-DNA, respectivamente.

“Characterization of the interaction between Rrn7 and the transcriptional factors TF_{II}B and TBP in HomolD box containing promoters of *Schizosaccharomyces pombe*”

DNA transcription, the first stage of gene expression, is defined as the conversion of a template DNA to RNA by the enzymatic action of the RNA polymerase (RNAP). In the eukaryotic cells there are three classes of nuclear polymerases (RNAP I, II and III). Each class of RNAP recognizes specific promoters through the formation of pre initiation complexes (PIC) between the polymerase and general transcription factors (GTF). The latter provide the specificity to each PIC. These promoters are relatively conserved DNA sequences that usually are located upstream from the transcriptional start site (TSS), and have all the *cis* elements needed for the start and regulation of the transcription of a gene. RNAP II promoters are the most studied ones, and are categorized as those that have a TATA box or those that lack a TATA box, called TATA-less promoters. The factors that bind to these promoters are TF_{II}B, TF_{II}A and TF_{II}D, among others.

The HomolD box is a core promoter element (CPE) that is found in a TATA-less type promoter, whose consensus sequence is CAGTCACA. This CPE was discovered in ribosomal protein genes of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, and recruits RNAP II and starts transcription. Recent studies have shown that to start transcription from these RNAP II promoters the GTFs: TF_{II}D, TF_{II}B, TF_{II}F, TF_{II}H and TF_{II}E are needed. Furthermore, it has been proposed that the Rrn7 factor (formerly known as a member of the RNAP I machinery) interacts with some of these GTFs, for instance with TF_{II}B and/or TBP (member of the TF_{II}D complex), which could confer Rrn7 the ability to bind the HomolD box and promote

transcription. However, it is still unknown which of these factors in addition to Rrn7 conform the PIC that assembles over the HomolD box.

In this work the participation of the factors TBP and TF_{II}B, as candidate members of the PIC formed over the HomolD box, was studied. Using Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) and Chromatin Immunoprecipitation assays (ChIP), DNA-protein and protein-protein interactions were analyzed. To carry out the EMSA studies, it was necessary to express and purify the recombinant Rrn7 protein using a 6xHis tag, which was then used with the factors TBP and TF_{II}B, also recombinant from *S. pombe*. Additionally, polyclonal antibodies for both factors were purified and used in EMSA experiments as a control. The EMSA results showed an intensification of the band representative of the complex when each factor was added to the reaction (TBP or TF_{II}B).

ChIP assays were performed in a wild type *S. pombe* strain, using the same antibodies purified for TF_{II}B and TBP. The DNA obtained was amplified with PCR using specific primers for the HomolD box. Two controls were carried out, one using primers that amplified part of the promoter and the first exon of the *nmt1* gene for the TATA box as a positive control. The other control used primers for a region of the actin gene (*act1*) as a negative control. When each factor was precipitated, an amplification of the HomolD box sequence, revealing the presence of both factors at the promoter region.

Results obtained in this work show *in vitro* (EMSA) an enhancer effect of TBP and TF_{II}B on the formation of the Rrn7-HomolD box complex, which is complementary to the presence shown *in vivo* (ChIP) of these factors in the promoter. From these experiments it is concluded that both factors participate in the formation of the PIC over the HomolD box. Furthermore, the EMSA results indicate that TF_{II}B has a greater enhancer effect than TBP. On the other side, EMSA assays of both factors produced a shift of the complex Rrn7-HomolD band, but the one produced by TBP was more intense and stable, in comparison with the complex produced by TF_{II}B, which was temporal and less intense. These results

suggest that TF_{II}B recruits Rrn7 to the PIC and that TBP enhances the interaction between protein and DNA of the PIC at the HomolD box.

I. Introducción

La transcripción del DNA es uno de los procesos más importantes para cualquier ser vivo, ya que constituye la primera etapa en la expresión génica, y corresponde a la conversión de un DNA molde a RNA por acción enzimática de la RNA polimerasa (RNAP), la que se encuentra conformada por varias subunidades en organismos eucariontes (Hurwitz y cols., 1961; Werner y Grohmann, 2011).

En eucariontes existen tres clases de RNAP nucleares (RNAP I, II y III), a diferencia de los procariontes que poseen solo una enzima. Además, en plantas se han descrito dos RNA polimerasas adicionales encargadas de la transcripción de RNAs pequeños para el silenciamiento génico (Haag y Pikaard, 2011). Si bien las tres RNAP nucleares catalizan la misma reacción, varían en el número de subunidades que poseen. La RNAP I tiene 14 subunidades, la RNAP II posee 12 y la RNAP III por su parte posee 17 subunidades, compartiendo cinco subunidades comunes a las tres (Rbp5, 6, 8, 10 y 12), las que junto a otras cinco subunidades componen el núcleo catalítico de 10 subunidades, característico de las RNA polimerasas eucariotas (Cramer y cols., 2008; Vannini y Cramer, 2012). Esta característica estructural de las RNAP está relacionada principalmente con la especialización de cada una de ellas, debido a la capacidad de interactuar con diferentes factores accesorios según sea el caso. Cada RNAP sintetiza distintos tipos de RNA: la RNAP I es la encargada de la síntesis del RNA ribosomal (18S, 5.8S y 28S) el cual es transcrito como un RNA precursor de 35S que luego es procesado (Laferté y cols., 2006); la RNAP II transcribe el RNA nuclear heterogéneo o pre-mRNA además de RNAs nucleares pequeños (Kuhlman y cols., 1999); y la RNAP III es la encargada de la transcripción del RNA de transferencia o tRNA, el RNA ribosomal de la subunidad mayor 5S, el RNA U6 del spliceosoma, y también del RNA 7SL parte del complejo ribonucleoproteico SRP (*Signal Recognition Particle*), entre otros (Paule y White, 2000; White, 2005).

Si bien cada una de las estructuralmente complejas RNAP son las enzimas encargadas de la transcripción del DNA, las tres requieren de proteínas

accesorias, llamadas factores de transcripción generales (GTFs por su nombre en inglés), que junto a cada RNAP componen el aparato transcripcional basal. Esta maquinaria transcripcional basal es relativamente conservada entre las tres clases de RNAP (Krishnamurthy y Hampsey, 2009; Vannini y Cramer, 2012).

En las células eucariontes los encargados del reclutamiento de la maquinaria transcripcional basal, son los promotores. Estos constan de secuencias relativamente conservadas en el genoma, poseyendo todos los elementos en *cis* requeridos para el inicio y la regulación de la transcripción de un gen. Estos elementos en *cis* están situados a una posición relativamente fija en torno al sitio de inicio de la transcripción (TSS por su nombre en inglés), siendo el promotor mínimo (*core promoter*) el que se constituye como la región mínima necesaria para que la maquinaria transcripcional basal (RNAP + GTFs) inicie la transcripción (Butler y Kadonaga, 2002). Este promotor mínimo contiene los elementos básicos del promotor (CPE por su nombre en inglés). Además del promotor mínimo, en la región promotora se encuentran diversos elementos de carácter regulatorio adicionales, tales como potenciadores o *enhancers* (que aumentan la transcripción de un gen de manera distante), aisladores o *insulators* (que pueden reprimir la acción de los potenciadores), elementos proximales del promotor, secuencias activadoras río-arriba (UAS por su nombre en inglés, similares a los potenciadores pero presentes en levadura), entre otros. Todos estos elementos unen diversos y muy ubicuos factores de transcripción (TF por su nombre en inglés) (Struhl, 1989; Riethoven, 2010; Maston y cols., 2006).

Cada una de las tres maquinarias basales en eucariontes reconoce regiones promotoras específicas en los genes que transcribe. Los promotores de la RNAP I en levadura, constan de un promotor mínimo entre los -38 a +5 pb respecto al TSS y un elemento del promotor río-arriba (UPE por su nombre en inglés) que localizado entre -155 a -60 pb respecto al TSS (Figura 1) que actúa como secuencia reguladora (Meier y Thoma, 2005). Los factores auxiliares que requiere la RNAP I son tres: el Factor Central (CF por su nombre en inglés) en levadura o SL1 en humanos, necesario para el inicio de la transcripción y que consta a su vez

de cuatro proteínas, entre ellas la proteína de unión a la caja TATA (**TBP** por *TATA Binding Protein*) (Paule y White, 2000), la cual está presente en los tres clases de complejos transcripcionales basales (Hernandez, 1993); y los factores transcripcionales Rrn11, Rrn6 y **Rrn7** (Keys y cols., 1994; Lin y cols., 1996), el factor UAF, compuesto de Rrn5, 9 y 10, que en vertebrados es el polipéptido simple UBF y que estimula la transcripción uniéndose a UPE y el factor Rrn3 que interactúa directamente con la RNAP I (Figura 1), posiblemente reclutándola al promotor gracias a la capacidad de unión a DNA que posee y que además formaría un puente entre la RNAP I y CF (Moorefield y cols., 2000; Miller y cols., 2001; Stepanchick y cols., 2013).

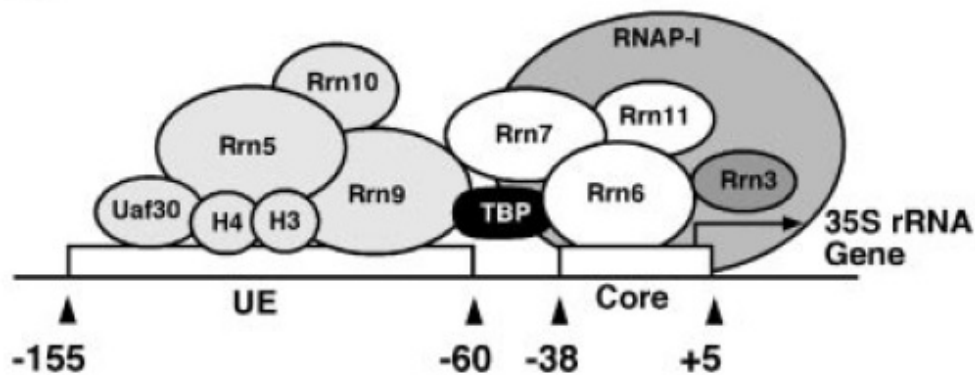


Figura 1. *Maquinaria transcripcional de la RNAP I.* Promotor perteneciente al gen del RNA ribosomal 35S de levadura, representativo de los promotores de la RNAP I, se aprecian los 2 elementos que constituyen estos promotores, además de los 2 complejos multiproteicos que se unen a estos, con las principales proteínas que los componen. Tomado de Meier A, Thoma F. (2005).

Los promotores de la RNAP III constan de tres tipos principales, dos de los cuales se encuentran en los genes tRNA y del RNA 5S respectivamente, y se ubican río-abajo del TSS. Los promotores de los tRNA constan de dos elementos llamados cajas A y B, que se ubican alrededor del +55 y +80. Estas cajas son secuencias conservadas a las que se une el factor TF_{III}C y luego el complejo TF_{III}B que consta de **TBP**, Brf1 y Bdp1 (o B^{''}); lo que promueve el reclutamiento final de la RNAP III. El promotor del RNA 5S, por otro lado, consta también de dos secuencias conservadas que corresponden a las cajas A y C, a las que de manera similar a lo anterior se les une TF_{III}A a la caja A y luego TF_{III}C a la caja C,

permitiendo el reclutamiento de TF_{III}B y finalmente de la RNAP III (Schramm y Hernandez, 2002).

El tercer tipo de promotor de los genes de la clase III, presente en algunos vertebrados, se encuentra río-arriba respecto al TSS, y consta normalmente de tres elementos: un elemento TATA característico en genes de la clase II (RNAPII), el forma parte del promotor mínimo y a la que se le une directamente TF_{III}B. Además, se distinguen otros dos elementos que ayudan a mejorar la eficiencia transcripcional, el elemento de secuencia proximal (PSE por su nombre en inglés) y el elemento de secuencia distal (DSE por su nombre en inglés), a los que se les unen los factores PTF/SNAPc y Oct-01, respectivamente (Paule y White, 2000).

Los promotores de la RNAP II han sido los más estudiados durante años, debido principalmente a que son los que se encuentran presentes en los genes codificantes para las distintas proteínas de los organismos eucariontes. Es así que uno de los primeros elementos descritos en los promotores eucariontes fue la caja TATA, una secuencia conservada en varios promotores y que se ubica alrededor de 40 a 100 pb río-arriba del TSS en *Saccharomyces cerevisiae* y alrededor de 25 a 35 pb en animales, y que consta de una secuencia conservada TATAWA (W=A/T) (Butler y Kadonaga, 2002; Dikstein, 2011). A esta secuencia se le une de manera ordenada la maquinaria transcripcional de la RNAP II, iniciando este proceso la unión de **TBP** contenida en el complejo multiproteico **TF_{II}D**, el que contiene otras proteínas llamados factores asociados a **TBP** (TAF por **TBP-Associated Factors**), para luego unirse cooperativamente los factores TF_{II}A y **TF_{II}B**, lo cual permite finalmente el reclutamiento de la RNAP II al promotor, la que viene asociada al factor TF_{II}F (que aumenta la interacción con TF_{II}B). Para terminar el proceso de ensamblaje del Complejo de Pre-Iniciación (PIC por su nombre en inglés), gracias a la presencia de TF_{II}F se unen los factores TF_{II}E y TF_{II}H (Figura 2), siendo este último muy importante para el inicio de la transcripción ya que es capaz de fosforilar la región carboxilo terminal (CTD por su nombre en inglés) de la RNAP, además de poseer otras actividades enzimáticas (Krishnamurthy y Hampsey, 2009; Hahn, 2004).

En lo que respecta al factor TBP y a su estructura aminoacídica deducida, se ve que al comparar entre distintas especies, este factor presenta por un lado una región amino terminal muy poco conservada entre los distintos organismos, y una región carboxilo terminal altamente conservada entre estos (la mayoría sobre 70% de identidad), la cual además posee dos copias de secuencias repetidas largas separadas por una secuencia repetida básica. La proteína adquiere una conformación tridimensional simétrica similar a una silla de montar, permitiéndole situarse sobre la caja TATA en el promotor, cuya cara cóncava interactúa con el DNA mientras que la región convexa permitiría las interacciones proteína-proteína (Hernandez, 1993; Nikolov y cols., 1996).

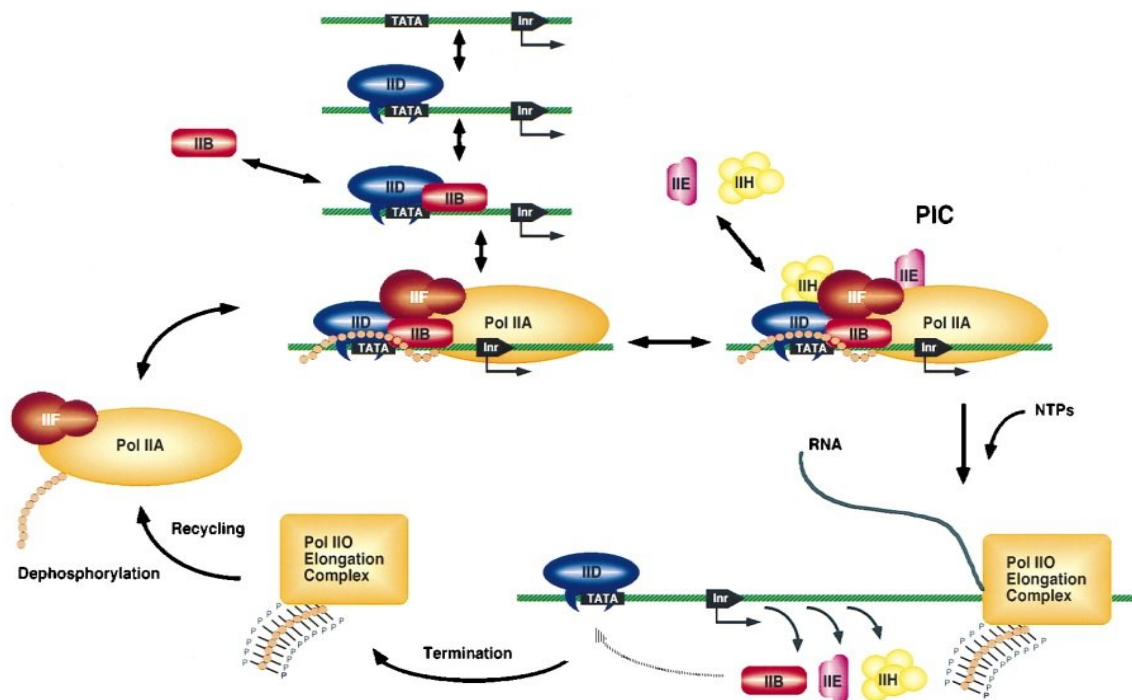


Figura 2. *Etapas de la transcripción por la maquinaria de la RNAP II sobre promotores con caja TATA.* Se aprecia la formación secuencial del complejo de pre iniciación de la RNAP II sobre la caja TATA; seguida del inicio de la transcripción, para luego pasar a la elongación de la cadena de RNA. Finalmente ocurre la fase de terminación para reciclar los componentes y re iniciar el ciclo nuevamente. Tomado de Nikolov y Burley, (1997).

TF_{II}B posee un motivo que une átomos de zinc en el extremo N-terminal, el que es bastante conservado entre los TF_{II}B de varias especies. Este motivo es

flanqueado por una región altamente conservada llamada dedo-B (*B-finger*), y finalmente presenta una región carboxilo terminal que posee dos secuencias repetidas directas llamada la región núcleo (*core domain*), y que participa principalmente en las interacciones proteína-proteína. La región N-terminal también denominada cinta de zinc (*zinc ribbon*) participa en el reclutamiento de la RNAP II, mientras que la región núcleo interactúa con TBP cuando ésta se une a la caja TATA, además de interactuar con ciertas regiones en el DNA río arriba y río abajo de la caja TATA, llamadas BRE (*TF_{II}B Recognition Element*) (Tubon y cols., 2004; Deng y Roberts, 2007).

La interacción entre **TF_{II}B** y **TBP**, tal como se mencionó anteriormente, se establece entre la región carboxilo terminal de TF_{II}B y la región convexa de **TBP**, cuando esta se dobla para unirse al DNA, principalmente debido a puentes salinos formados entre aminoácidos básicos de **TF_{II}B** y los aminoácidos de carácter ácido de **TBP** (Figura 3), además de presentar interacciones de Van der Waals y puentes de hidrógeno (Deng y Roberts, 2007; Buratowski y cols., 2002).

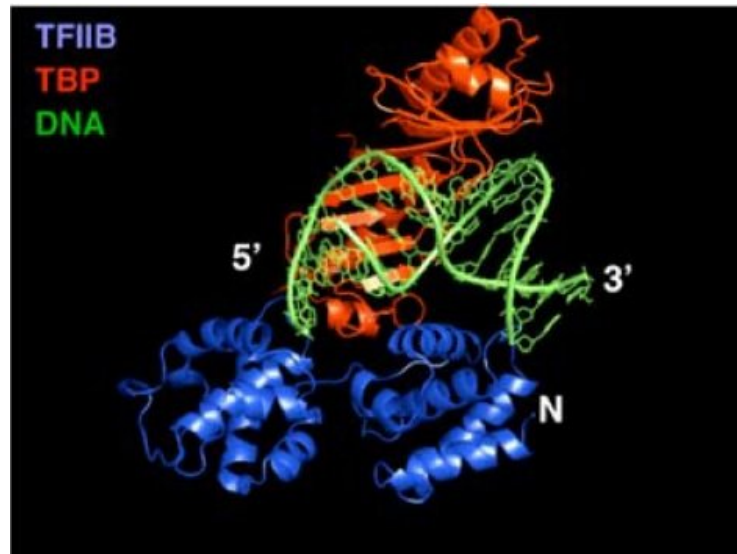


Figura 3. Interacción entre TF_{II}B y el complejo TBP-DNA en la caja TATA. Se aprecia cómo se dobla el factor TBP para unirse al DNA, lo que permite que TF_{II}B interactúe con este y con sectores del DNA, principalmente con las hélices de las secuencias repetidas directas. Tomado de Deng y Roberts, (2007).

Estudios recientes han demostrado que tan solo el 24% de los genes transcritos por la RNAP II en humanos y el 46% en levadura contienen un

elemento tipo caja TATA (incluida la secuencia canónica que en humanos corresponde a alrededor de solo al 10% del mencionado 24%) en sus regiones promotoras, y que por lo tanto la mayoría de los genes poseerían promotores de tipo TATA-Less (Dikstein, 2011; Yang y cols., 2007). Como su nombre lo indica, estos promotores poseen otros elementos o secuencias de DNA, distintos a la caja TATA, los que permiten la transcripción de un vasto número de genes. Entre los diferentes CPE que se encuentran presentes en el grupo de promotores TATA-Less, está el elemento iniciador (*Inr* por su nombre en inglés), que se ubica alrededor del TSS (entre -2 a +4 pb) y que posee una secuencia de consenso YYANWYY (W=A/T, Y=T/C, N=A/T/C/G) en mamíferos (Dikstein, 2011; Yang y cols., 2007). El elemento *Inr* puede encontrarse también en promotores que poseen caja TATA y asociado con otros elementos en *cis*, incluso se encuentra solo, donde podría funcionar de manera independiente y reclutar a la RNAP II junto a los GTF y promover la transcripción (Dikstein, 2011). Otro elemento presente en promotores TATA-Less es el elemento río-abajo del promotor (DPE de su nombre en inglés) de secuencia RGWYVT (R=G/A, W=A/T, V=G/C/A, Y=T/C) en *Drosophila*, ubicado alrededor de +28 a +33 del TSS, que se encuentra asociado generalmente con el elemento *Inr* (Smale y Kadonaga, 2003; Baumann y cols., 2010). Además, esta asociación se ve también en promotores que contienen el elemento MTE (*Motif Ten Element*) que tiene como consenso CSARCSSAAC (R=G/A, S=G/C) ubicado desde el +18 al +22 respecto al TSS (Baumann y cols., 2010). Otros elementos que se encuentran en promotores TATA-Less son el elemento río-abajo del promotor mínimo (DCE de su nombre en inglés), el anteriormente mencionado elemento de reconocimiento de TF_{II}B (BRE por su nombre en inglés) tanto río arriba (BRE^u) como río abajo (BRE^d), y el elemento del promotor mínimo X 1 y 2 (XCPE1 y 2 por sus nombres en inglés) (Baumann y cols., 2010; Smale y Kadonaga, 2003; Anish y cols., 2009; Juven-Gershon y cols., 2008; Dikstein, 2011). Cabe mencionar que algunos de estos últimos elementos, al igual a lo que ocurre con *Inr*, pueden presentarse en distintas combinaciones con otros elementos, encontrándose en promotores TATA-Less, como también en

otros que poseen caja TATA e inclusive actuar como elementos únicos para iniciar la transcripción por sí solos (Juven-Gershon y cols., 2008).

Recientemente se identificó, un nuevo CPE tipo TATA-Less en el genoma de la levadura de fisión ***Schizosaccharomyces pombe***, utilizada como modelo para el estudio de la maquinaria transcripcional eucarionte, debido a su gran similitud con los eucariontes superiores (Glick, 1996; Choi, 2002). Este elemento, presente en 140 de 141 promotores de genes que codifican proteínas ribosomales (79 distintas) y en 59 que codifican otras proteínas (Egel, 2004), fue llamado caja **Homoid** y posee una secuencia de consenso CAGTCACA, ubicada 40 a 55 pb río arriba del TSS (Witt y cols., 1993). Además, en algunos de estos genes se encontró otro elemento del promotor, llamado caja HomoidE de secuencia conservada AGGGTAGGGT, el que actúa como un UAS (Witt y cols., 1995).

La caja **Homoid** también ha sido identificado en otras especies como *D. melanogaster* (Li y cols., 2005), humanos (Contreras-Levicoy y cols., 2012) y plantas (datos obtenidos desde base de datos “*The Eukaryotic Promoter Database*” [EPD]). Mediante análisis bioinformáticos se ha revelado su presencia en promotores de genes no ribosomales, como en algunas proteínas G o ATPasas (Contreras-Levicoy y cols., 2012). Uno de los genes que posee caja **Homoid** en su región promotora es el gen ***rpK5*** o ***rp18-1*** codificante para la proteína ribosomal L2 (L8 en mamíferos), que forma parte de la subunidad mayor 60S del ribosoma en ***S. pombe*** y que además constituye un puente inter-subunidad en el ribosoma (Gatermann y cols., 1989; Meskauskas y cols., 2008; Gross y Käufer, 1998). La maquinaria transcripcional relacionada con el promotor del gen ***rpK5*** aún está en estudio y recientemente se ha identificado el factor **Rrn7**, antes mencionado como implicado en la maquinaria de la RNAP I, como el factor que se une al elemento **Homoid** (Rojas y cols., 2011). Además, para que la transcripción ocurra desde este promotor se requiere la participación de **Rrn7**, y de los GTFs TF_{II}D, TF_{II}B, TF_{II}F, TF_{II}H y TF_{II}E (Rojas y cols., 2011).

En **Rrn7** se ha identificado un dominio de coordinación de átomos de zinc, particularmente del tipo “cintas de zinc” (perteneciente al grupo de los dominios

llamados “dedos de zinc”), que consta de dos horquillas beta, las que forman dos motivos estructuralmente similares en el N-terminal de la proteína, los que unen átomos de zinc (Krishna y cols., 2003). Estos motivos además de participar en la interacción proteína-DNA, también son importantes en la interacción proteína-proteína y podrían estar implicados en la interacción con otros factores de la maquinaria transcripcional tal como ocurre con TF_{II}B (Tubon y cols., 2004). Por otro lado se sabe que CF (del que forma parte **Rrn7**) puede ser fosforilado por algunas proteínas quinasas como CDK1 y CK2 (Heix y cols., 1998), siendo esta última muy importante en la regulación transcripcional, ya que regula también otros factores relacionados, tales como UBF (Panova y cols., 2006) y algunos de la maquinaria de RNAP II (Cabrejos y cols., 2004) por lo que CK2 se presenta como un candidato para regular **Rrn7**. Efectivamente, estudios recientes de nuestro grupo demuestran la fosforilación de **Rrn7** por parte de la subunidad catalítica de CK2 (CK2 α), aunque aún no se tiene certeza de los sitios en los que esto ocurre (Moreira-Ramos y cols., manuscrito enviado a publicación).

En resumen, la participación de **Rrn7** en el reclutamiento de la maquinaria transcripcional y la formación del PIC en la **caja Homoid** es aún una interrogante a resolver, especialmente en cuanto al orden de ensamblaje de este y de los participantes involucrados. Estudios de *Pull-Down*, inmunoprecipitación y *Far Western Blot*, realizados en nuestro laboratorio, han demostrado que existe interacción entre **Rrn7** y **TBP**, y entre el factor **TF_{II}B** y **Rrn7** (Figura 4). Además, también han sido descritas interacciones de **Rrn7** con factores como Srb4, parte del complejo mediador, o **TF_{II}E** (Moreira-Ramos y cols., manuscrito enviado a publicación; Rojas y cols., 2013).

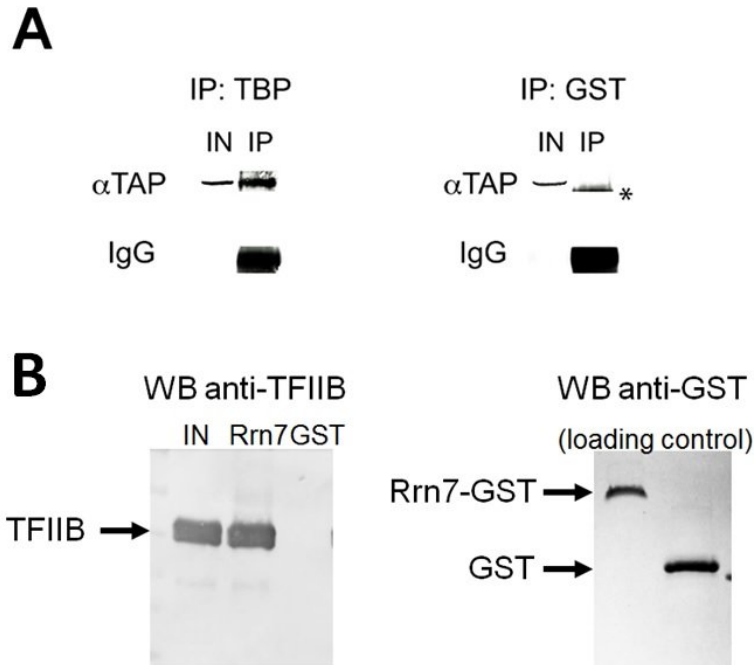


Figura 4. **Interacción de Rrn7 con el factor TFIIB y el factor TBP.** (A) Co-inmunoprecipitación utilizando anticuerpo anti TBP (o anti GST como control) para la inmunoprecipitación de extractos totales de proteína de una cepa modificada de *S. pombe* Rrn7-TAP y anticuerpo anti TAP para la detección. (B) Ensayo de Pull-Down utilizando perlas de agarosa-glutatión para la captura de la proteína de fusión Rrn7-GST, y luego incubando con TFIIB (o GST como control), para finalmente utilizar anticuerpo anti TFIIB para la detección; a la derecha se muestra el control de carga detectado con anticuerpo anti GST. IN = input o extracto total de proteínas, WB= western Blot realizado con respectivo anticuerpo, IP = inmunoprecipitación realizada con el respectivo anticuerpo. * = representa una banda no específica. Tomado de Rojas D.A. et al. (2013).

Por lo tanto, la importancia de la participación de **Rrn7** en los promotores **caja Homoid** es clara. Sin embargo aún quedan muchas interrogantes respecto al mecanismo mediante el cual promueve el reclutamiento de la maquinaria transcripcional y con cuales factores interacciona directamente.

II. Hipótesis

Dado que **Rrn7** es la proteína de unión a la caja HomolD en promotores de genes de proteínas ribosomales en *Schizosaccharomyces pombe*, y a que la transcripción controlada por la caja **HomolD** requiere de factores de la maquinaria de la RNA polimerasa II, se plantea la siguiente hipótesis:

“TF_{II}B y TBP forman parte del complejo de pre iniciación reclutado por promotores que contienen la caja HomolD en *Schizosaccharomyces pombe*, modulando la unión de Rrn7 al DNA.”

III. Objetivos

Objetivo General

Caracterizar el efecto de los factores **TF_{II}B** y **TBP** sobre la interacción DNA-proteína entre **Rrn7** y la caja **HomolD**; y su presencia en promotores que contienen este elemento en *S. pombe*.

Objetivos Específicos

- Expresar y purificar la proteína **Rrn7** recombinante.
- Estudiar el efecto de los factores **TF_{II}B** y **TBP** sobre la formación *in vitro* del complejo Rrn7-caja HomolD mediante geles de retardo (EMSA).
- Identificar la presencia *in vivo* de los factores **TF_{II}B** y **TBP** en el complejo Rrn7-caja HomolD mediante inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).

IV. Materiales y Metodología

1. Materiales:

Todos los reactivos fueron adquiridos de Winkler Ltda. Chile a excepción de los mencionados a continuación en esta sección.

[γ -P³²]-ATP (Perker-Elmer, EEUU)

Anticuerpo anti *6xHis-Tag* de ratón monoclonal (Abcam, Reino Unido)

Anticuerpo anti conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Promega, EEUU)

Anticuerpo anti ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Promega, EEUU)

Complete mini EDTA-Free (Roche, Alemania)

DNA sintético Co-polimérico poli dl-dC (Sigma-Aldrich, EEUU)

Enzima Polinucleótido quinasa de T4 (Promega, EEUU)

Enzima Proteinasa K grado PCR (Roche, Alemania)

Espectrofotómetro Epoch (Biotek, EEUU)

Evaporador centrífugo DNA *Speed Vac* (Thermo Fisher Scientific, EEUU)

Film auto-radiográfico para quimioluminiscencia y radioactividad Carestream BiomaX (Kodak, EEUU)

PageRuler Prestained Protein Ladder 10-170K (Pierce, EEUU)

Perlas de vidrio de 150-212 micrones (Sigma-Aldrich, EEUU)

Plasmidio pQE-30 (Quiagen, EEUU)

Reactivo de Bradford Quick Start Protein Assay (Bio-Rad, EEUU)

Reactivo Químio-luminiscente Visiglo (Amresco, EEUU)

Resina de poliacrilamida P-10 (Bio-rad, EEUU)

Resina Ni-NTA/agarosa (Invitrogen, EEUU)

Resina Proteína A/agarosa (Roche, Alemania)

2. Cepas y medios de cultivos utilizados: Para la purificación de proteína recombinante se trabajó con la cepa M15 de *Escherichia coli*, utilizándose los medios *Terrific Broth* [TB (extracto de levadura al 2,4%, triptona al 1,2%, glicerol al 0,4%, KH_2PO_4 0,17 M y K_2HPO_4 0,72 M)]; y agar Luria-Bertoni [LB (triptona al 1%, extracto de levadura al 0,5%, NaCl al 1%, agar al 1,5% pH 7)]. Para los ensayos en levadura se utilizó la cepa silvestre de *Schizosaccharomyces pombe* (972 h^{-s}); el cultivo de esta se realizó con el medio *Yeast-Peptone-Dextrose* (YPD) tanto líquido como sólido que constan de: extracto levadura al 1%, peptona al 2% y D-glucosa al 2%, adicionalmente el medio sólido posee agar al 1,5%.

3. Purificación de Rrn7 recombinante: Se transformaron bacterias *E. coli* M15 electro-competentes, por medio de electroporación, con el plasmidio pQE-30, el cual contenía la secuencia codificante de Rrn7 unido a una etiqueta de 6 histidinas en el extremo 3'. Las células transformadas se sembraron en una placa con agar LB suplementada con ampicilina 0,1 mg/mL (Amp) y kanamicina 0,05 mg/mL (Kana), la que se incubó toda la noche a 37 °C. De esta placa se seleccionó una colonia aislada y se cultivó como pre-inóculo en 5 mL de medio TB-Amp-Kana durante toda la noche con agitación constante y a 37 °C. El pre-inóculo se escaló a 500 mL de medio TB-Amp-Kana, incubado con agitación a 37 °C hasta alcanzar una A_{600nm} de 0,7 para posteriormente inducir la expresión de la proteína con Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 5mM durante 3 horas a 37 °C con agitación constante. Luego de la inducción los cultivos se centrifugaron a 5250 g durante 15 minutos y el sedimento se congeló a -50 °C.

Los sedimentos se re-suspendieron en 20 mL totales de tampón STE (NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM), a los que se agregó lisozima 0,1 mg/mL y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras esto, se aplicaron 5 pulsos de sonicación de 30 segundos cada uno, enfriando en hielo durante 20 segundos entre cada pulso. El lisado resultante se colectó y centrifugó a 4°C durante 45 minutos a 5250 g y el precipitado se re-suspendió en una solución de lisis (HEPES 50 mM pH 7.9, glicerol al 5%, β -mercaptoetanol 1 mM, DOC al 0,05% y tritón X-100 al 1%) y luego se lavó dos veces con solución que

contenía HEPES 50 mM pH 7.9, glicerol al 5% y β -mercaptoetanol 1 mM, centrifugando siempre durante 30 minutos en las mismas condiciones antes mencionadas. Finalmente, el precipitado se re-suspendió en una solución de cloruro de guanidinio (cloruro de guanidinio 6M, HEPES 10 mM pH 7.9, β -mercaptoetanol 5mM) y se incubó a 4 °C durante toda la noche.

Al día siguiente, la solución resultante se centrifugó durante 30 minutos en las condiciones utilizadas anteriormente, rescatándose el sobrenadante, el cual se agregó lentamente sobre una solución de dilución (HEPES 10 mM pH 7.9, β -mercaptoetanol 5 mM y glicerol al 20%), incubándose a 4°C durante toda la noche con agitación suave. Al día siguiente la dilución se dializó contra una solución de equilibrio Ni-NTA (Tris-HCl 20 mM pH 7.6, glicerol al 10%, PMSF 0,1 mM, pepstatina 0,5 μ g/mL, β -mercaptoetanol 1 mM, KCl 0,5 M, Tritón X-100 al 0,01%, imidazol 20 mM) durante 4 horas a 4 °C, tras lo cual se colectó el dializado y se centrifugó durante 30 minutos en iguales condiciones, congelándose finalmente a -80 °C.

Posteriormente, se empacó una columna de 10 mL con 500 μ L de resina níquel-ácido nitriloacético (Ni-NTA), la que se lavó con 20 volúmenes de agua bidestilada, y luego equilibrada con 20 volúmenes de solución de equilibrio Ni-NTA. Tras esto se pasaron 50 mL del dializado obtenido previamente a través de la columna. Luego se lavó con 20 volúmenes de solución de equilibrio Ni-NTA y 10 volúmenes de solución de imidazol 50 mM (imidazol 50 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7.6, glicerol al 10%, PMSF 0,1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, KCl 0,5 M, Tritón X-100 al 0,01%). Finalmente, se realizó la elución con una solución de imidazol 300 mM (Tris-HCl 20 mM pH 7.6, glicerol al 10%, PMSF 0,1 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, KCl 0,5 M, Tritón X-100 al 0,01%, imidazol 300 mM), colectándose 10 fracciones de 500 μ L, las que posteriormente fueron analizadas mediante SDS-PAGE al 11%. Se revelaron los geles mediante tinción con azul de Coomassie, y por *Western Blot* utilizando anticuerpo anti *6xHis-Tag* con una dilución 1:500 como anticuerpo primario y anti *mouse* 1:7000 conjugado con fosfatasa alcalina como anticuerpo secundario. Además, se midió la concentración de la proteína utilizando

una curva de calibración de albumina de suero bovino (BSA por su nombre en inglés) como estándar y reactivo de Bradford como indicador, en un espectrofotómetro Epoch a $A_{595\text{ nm}}$.

4. Generación de sonda marcada radioactivamente: A 1 μg de oligonucleótido doble hebra (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) correspondiente al promotor del gen *rpK5*, se le agregó 2 μL del tampón 10X de reacción de la enzima polinucleótido quinasa de T4 (T4 PNK), 5 μCi de $[\gamma\text{-P}^{32}]\text{-ATP}$, 2 μL de T4 PNK (10 U/ μL) y se completó a un volumen final de 20 μL con agua nanopura estéril. La mezcla se incubó a 37 °C durante 30 minutos, se le agregó 20 μL de tampón TE (Tris 10 mM pH 7.8, EDTA 1 mM) y finalmente fue pasada por una columna de 2 mL previamente empacada con resina P10. La sonda marcada fue recolectada por centrifugación y cuantificada en un contador de centelleo líquido. Para los ensayos se diluyó la sonda a 20000 cpm/ μL con tampón H-O (HEPES 20 mM pH 7.9, EGTA 2 mM, DTT 5 mM y PMSF 0,1 mM).

5. Purificación de anticuerpos policlonales: Se empacó una columna de 2 mL con 100 μL de proteína A-Agarosa y se lavó 2 veces con 20 volúmenes de TBS 1X (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM). Tras esto, se utilizó suero obtenido de conejo previamente tratado con el antígeno de interés (TBP o TF_{II}B recombinante de *S. pombe*), incubándose 1 mL del suero con la resina durante 1 hora a 4°C con agitación suave. Una vez transcurrido este tiempo se descartó lo que no se unió a la resina, la cual fue lavada con 20 volúmenes de TBS 1X. Finalmente, se eluyeron 10 fracciones de 100 μL cada una con una solución de glicina 0,2M pH 2.5, las que fueron analizadas con reactivo de Bradford para determinar las fracciones más enriquecidas. Las fracciones con mayor cantidad de proteína correspondieron a las cinco primeras eluidas, las cuales fueron dializadas contra una solución de diálisis de anticuerpos (Hepes 20 mM pH 7.9, KAc 20 mM, glicerol al 10%, DTT 1 mM, EDTA 0,1 mM, PMSF 0,5 mM) durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, se midió su concentración utilizando una curva de calibración de

BSA como estándar y reactivo de Bradford como indicador, en un espectrofotómetro Epoch a $A_{595\text{ nm}}$.

Para determinar la funcionalidad de los anticuerpos purificados, estos se utilizaron como anticuerpo primario (dilución 1:5000) en un *western blot* detectando TBP o TF_{II}B recombinantes respectivamente. Las membranas fueron bloqueadas con BSA al 5% en TBS 1X a 4°C durante toda la noche, luego incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente con sus respectivos anticuerpos primarios y finalmente durante 30 minutos con el anticuerpo secundario anti *rabbit* dilución 1:7000 conjugado con fosfatasa alcalina, para luego revelarlas utilizando el reactivo quimio-luminiscente Visiglo.

6. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA): Las fracciones eluidas de Rrn7 se juntaron en dos grupos (las más enriquecidas y las menos enriquecidas) y se dializaron, de manera seriada, contra soluciones tampón que conformaban una gradiente de concentración de KCl (KCl 300, 200, 100 y 50 mM respectivamente; además de HEPES 20 mM pH 7.9, DTT 20 mM, EDTA 0,1 mM, MgCl₂ 50 mM, glicerol al 20% y PMSF 0,1 mM), dializándose durante 1 hora a 4°C contra cada solución.

Para los ensayos de gel de retardo se utilizó un gel de poliacrilamida al 6%, y glicerol al 10%, todo en tampón TBE 0,5X, el cual una vez gelificado fue pre-corrido a 100V durante al menos 30 minutos a 4°C. Cada experimento se realizó con 0,5 µg de un DNA sintético co-polimérico poli dl-dC, 1 µg de BSA y 2 µL de tampón de unión 10X (HEPES 0,2 M pH 7.9, KCl 0,5 M, MgCl₂ 0,5 M, EDTA 1 mM, DTT 0,2 M, glicerol al 20%, PMSF 1 mM) completando a un volumen final de 20 µl con tampón H-O. A esta mezcla se le agregaron las respectivas proteínas recombinantes dependiendo del experimento y la sonda K5 marcada radioactivamente (20000 cpm). Para la evaluación de la funcionalidad de Rrn7 purificada, se utilizaron cantidades crecientes de proteína de ambas fracciones dializadas (0; 10,5; 21; 31,5 y 42 pmoles); mientras que para los ensayos con TBP y TF_{II}B se utilizó la cantidad fija de 21 pmoles de Rrn7 y cantidades crecientes de

TBP (11, 33, 66 y 88 pmoles) y de TF_{II}B (7,5; 15; 22,5 y 30 pmoles), respectivamente. En los ensayos con incubaciones diferidas, primero se incubaron 21 pmoles de Rrn7 con la sonda marcada por 15 minutos a 30°C. Una vez transcurrido el tiempo, se agregó TF_{II}B (3, 6, 9, 15 y 30 pmoles), TBP (11, 33, 55 y 77 pmoles) o solución tampón H-O (a modo de control) según fuera el caso, para proceder a incubar los tubos durante 30 minutos adicionales a 30°C.

Para el ensayo con anticuerpos se utilizaron 28 pmoles de Rrn7, 11 pmoles de TBP y 24 pmoles de TF_{II}B, junto a 3,4 µg de anticuerpo anti TBP y 3,6 µg de anticuerpo contra TF_{II}B. La mezcla se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y luego se agregó la sonda radioactiva, incubando finalmente a 30°C durante 15 minutos, antes de cargar en el gel. Todos los EMSA se sometieron a electroforesis a 100 V durante dos horas a 4°C. Posteriormente se expuso una película con el gel para auto-radiografía.

7. Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP)

a. Extracción y purificación de la cromatina: La cepa silvestre de *S. pombe* fue cultivada en medio sólido de agar YPD durante tres días a 30°C, hasta obtener colonias aisladas. Se inoculó una colonia en 10 mL de medio YPD suplementado con kanamicina (0,05 mg/mL) y se incubó a 30°C con agitación constante durante toda la noche, para generar un pre-inóculo. Este cultivo fue usado para sembrar 250 mL de medio YPD suplementado con kanamicina, el que se incubó a 30°C con agitación constante hasta alcanzar una A_{600nm} de 0,7. Para producir el entrecruzamiento *in vivo* del DNA a las proteínas en células de levadura y fijar las interacciones proteína-DNA se agregó formaldehído al cultivo con la densidad óptica apropiada hasta una concentración final del 1% y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación. Una vez terminada esta incubación, se centrifugó el cultivo inmediatamente a 5200 g durante 15 minutos a 4°C y el precipitado obtenido se lavó dos veces con TBS 1X frío, luego se re-suspendió en 10 mL de TBS 1X y finalmente se incubó a 4°C durante toda la

noche. Al día siguiente la solución fue centrifugada en iguales condiciones a las anteriores y se re-suspendió el precipitado en 5 mL de solución tampón (Tris pH 9.4 0,1 M y DTT 10 mM), incubándose en hielo durante 20 minutos. Luego de una nueva centrifugación se re-suspendió el precipitado en 5 mL de HEPES/Sorbitol (Hepes pH 7.8 20 mM, sorbitol 1.2M). Esta solución fue finalmente centrifugada y re-suspendida en 5 mL de la misma solución anterior pero suplementada con un cóctel de inhibidores de proteasas 1X (Complete mini EDTA-Free), NP-40 al 1%, DOC al 1% y 1 gr de perlas de vidrio de 150-212 micrones, luego se dividió en tubos de centrifuga de 1,5 mL. La solución se agitó en *vortex* durante cuatro minutos por cinco ciclos, dejándola reposar en hielo durante 2 minutos entre cada ciclo. Una vez finalizados los ciclos, se dejó reposar en hielo durante 10 minutos y se colectaron los sobrenadantes, mientras que cada precipitado se lavó con 500 μ L de Hepes/Sorbitol/MgCl₂ (Hepes pH 7.9 20 mM, Sorbitol 1.2M, MgCl₂ 1 mM y PSMF 0,5 mM), dejándose decantar y recuperándose nuevamente el sobrenadante que se mezcló con el obtenido previamente. Las soluciones resultantes se centrifugaron a 4500 g durante 7 minutos a 4°C, cuyo precipitado fue lavado con TBS 1X suplementado con coctel inhibidores de proteasas, centrifugándose nuevamente en iguales condiciones. El precipitado se lavó con 1 mL de solución Tritón/Hepes (tritón X-100 al 0.25%, EDTA 10 mM, EGTA 0,5 mM, Hepes pH 6.5 10 mM) y luego con 1 mL de solución NaCl/Hepes (NaCl 200 mM, EDTA 1 mM, EGTA 0,5 mM, Hepes pH 6.5 10 mM, coctel inhibidor de proteasas 1X), siempre centrifugando a 4500 g durante 7 minutos y descartando el sobrenadante. El precipitado obtenido luego se re-suspendió en 200 μ L de NaCl/Hepes y se centrifugó a 850 g durante 1 minuto para dejarlo decantar a 4°C durante 10 minutos, el precipitado obtenido se re-suspendió en 400 μ L de solución de lisis (SDS al 1%, EDTA 10 mM, Tris 50 mM pH 8.1 y cóctel de inhibidores de proteasas 1X). Esta solución se sonicó cuatro veces, aplicando 20 pulsos cada vez y dejando reposar en hielo durante 20 segundos entre cada pulso. Finalmente la mezcla se centrifugó a 14000 g durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante obtenido fue almacenado a esta misma temperatura.

b. Inmunoprecipitación de Cromatina: Se prepararon tres tubos de 1,5 mL para cada factor de transcripción (TBP y TF_{II}B) y otros tres como controles negativos. A cada tubo se agregó 50 µL de perlas entrecruzadas covalentemente al 6% de proteína A-Agarosa, previamente bloqueadas en solución de BSA al 0.1% en tampón TE, durante toda la noche a 4°C con rotación constante. Al día siguiente se realizaron dos lavados con tampón TE centrifugando a 850 g durante tres minutos. Posteriormente, cada tubo se incubó con 1,7 µg de anticuerpo anti TBP o 1,8 µg de anticuerpo anti TF_{II}B, según correspondiese, en 1 mL de solución TBS 1X, mientras que los controles negativos solo se incubaron con TBS 1X, a 4°C con agitación suave durante toda la noche. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 850 g durante tres minutos, descartándose el sobrenadante, y se lavaron tres veces con 1 mL de solución de lavado (tritón X-100 al 1%, EDTA 1 mM, Tris 15 mM pH 8, NaCl 150 mM), agitando suavemente cada vez durante cinco minutos a 4°C y centrifugando durante tres minutos a 850 g para descartar el sobrenadante. A continuación se agregaron a cada tubo 150 µL de cada una de las cromatinas extraídas previamente y se incubaron durante toda la noche a 4°C con agitación suave. Al día siguiente, los tubos se centrifugaron durante tres minutos a 850 g a 4°C descartando su sobrenadante, y luego se lavaron dos veces con 1 mL de solución TSE 150 (SDS al 0,1%, tritón X-100 al 1%, EDTA 2 mM, Tris-HCl pH 8.1 20 mM, NaCl 150mM), dos veces con 1 mL de solución TSE 500 (SDS al 0,1%, tritón X-100 al 1%, EDTA 2 mM, Tris-HCl pH 8.1 20 mM, NaCl 500 mM), dos veces con 1 mL de solución litio/detergente (LiCl 0,25 M, NP40 al 1%, DOC al 1%, EDTA 1 mM, Tris-HCl pH 8.1 10 mM), y dos veces con 1 mL de tampón TE, realizando en cada lavado incubaciones durante 5 minutos a 4 °C con agitación suave, centrifugando a 4°C durante 3 minutos a 850 g y descartando sus sobrenadante.

Finalmente, las perlas se re-suspendieron en 250 µL de solución SDS al 1% /NaHCO₃ 0.1M, incubándose durante 15 minutos a temperatura ambiente con rotación constante. De cada tubo se tomaron 200 µL y también 200 µL de la cromatina extraída previamente (desde ahora DNA de la carga o *Input*) y se mezclaron en tubos de centrifuga nuevos junto con 10,38 µL de NaCl 4M. La mezcla se incubó a 56 °C durante toda la noche para lograr la reversión del

entrecruzamiento. Al día siguiente se agregaron 10 μ L de proteinasa K y se incubó durante 1 hora a 37°C.

8. Purificación de DNA y PCR: Se tomaron 300 μ L de cada CHIP realizada y del DNA de la carga (*input*), y se sometieron a extracción fenólica con 300 μ L de una solución de fenol básico saturado/cloroformo/alcohol isoamílico 25:24:1. Los tubos se agitaron enérgicamente y se centrifugaron durante 5 minutos a 14000 g a 4°C, recuperándose la fase acuosa, la cual se mezcló con 300 μ L de cloroformo y se repitió el procedimiento anterior. Nuevamente la fase acuosa fue recuperada y se precipitó con 1mL de isopropanol incubándose a -50 °C durante 30 minutos; a continuación se centrifugó durante 15 minutos a 14000 g a 4°C y el precipitado se lavó con 1 mL de etanol al 80%. Finalmente y tras centrifugar nuevamente, se secó el precipitado en un evaporador centrífugo DNA *Speed Vac* a 65 °C durante 5 minutos y luego se re-suspendió en 50 μ L de agua nanopura estéril. Se cuantificó el DNA purificado en un espectrofotómetro Epoch.

A continuación se utilizaron 10 ng de DNA de cada CHIP para una reacción de PCR semi-cuantitativo. Se utilizaron partidores para el promotor del gen *rpK5*, que incluye la caja HomID, el TSS y la región que codifica los primeros 11 aminoácidos de la proteína ribosomal; la secuencia Sentido de los partidores es 5' GGATGACCGAAAACAGTCAC 3' y Antisentido, 5' CCTCCACTCTTTCTTTGTGC 3'. También como control del experimento se utilizaron partidores para el primer exón del gen de actina *act1* con secuencia: Sentido, 5' TGCTCCTCCTGAGCGTAAACTCTGTCTG 3' y Antisentido, 5' AACGATACCAGGTCCGCTCTCATCATACTC 3'. Además se utilizaron partidores para el promotor mínimo del gen *nmt1* como control positivo, que incluye caja TATA y que corresponde al gen de la N-miristoiltransferasa 1 y cuyas secuencias son: Sentido, 5' GGAATCCGATTGTCATTCGG 3' y Antisentido, 5' GGAAAGTGATCTTGTTAGTAG 3'. El programa utilizado fue el mismo para cada pareja de partidores, con la excepción del número de ciclos: para *rpK5* fueron 35, para *act1* 30 y para *nmt1* 40. El programa utilizado consta de las siguiente etapas:

desnaturación inicial durante 1 minuto a 94°C, seguido por ciclos de desnaturalización durante 30 segundos a 94°C, apareamiento (*annealing*) durante 30 segundos a 53°C y extensión durante 30 segundos a 72°C, con una extensión final durante 2 minutos a 72°C. Finalmente, los amplicones obtenidos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Posteriormente se fotografiaron y cuantificaron utilizando los softwares computacionales ImageJ 1.47 (Wayne Rasband, NIH, EEUU) y Prism 6.01 (Graphpad Software Inc). En la Figura 5 se esquematizan las regiones promotoras con las que se trabajó, además de los pares de bases cubiertas por los partidores utilizados.

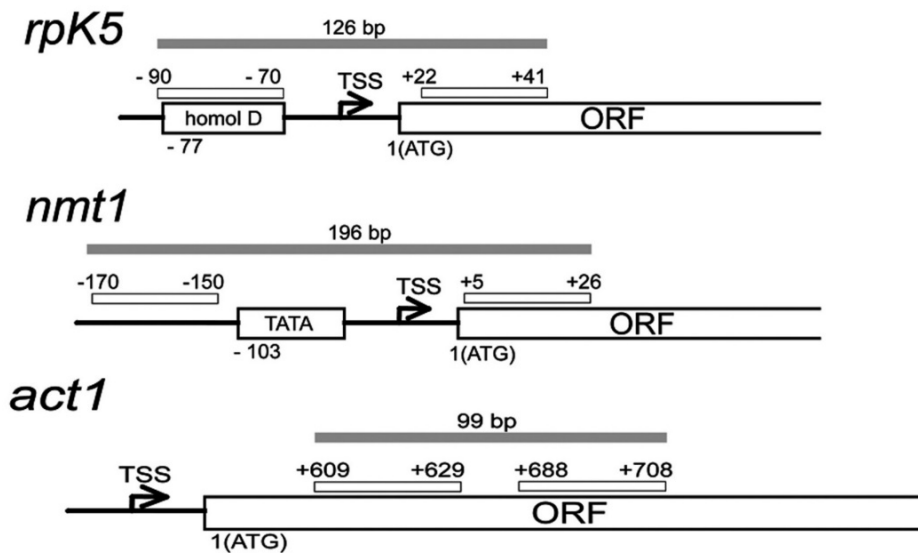


Figura 5. **Partidores utilizados para los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina.** En gris se indica la extensión del amplicón esperado para cada set de partidores, mientras que las regiones de anclaje de estos últimos se indica en blanco. RpK5 corresponde a la región promotora de dicho gen que contiene la caja HomolD. nmt1 corresponde a la región promotora del gen de la N-miristoiltransferasa 1 que contiene una caja TATA y act1 corresponde a uno de los exones de la proteína actina. Modificado de Rojas, D. A., y cols. (2011).

V. Resultados

1. **Expresión y purificación de Rrn7 Recombinante:** Para realizar cualquier investigación respecto al PIC que se forma sobre la caja HomolD se debe disponer del factor que une este elemento, la proteína Rrn7. Con este fin se introdujo la secuencia codificante de Rrn7 en bacterias *E. coli* electro-competentes, para que estas expresaran la proteína recombinante, la que fue posteriormente purificada gracias a la etiqueta de 6xHis que se agregó a su secuencia aminoacídica y que permite su unión a una resina níquel-agarosa. Una vez realizado esto se llevó a cabo el análisis de las fracciones obtenidas (véase Sección Materiales y Métodos, 2° Punto) mediante SDS PAGE (Figura 6).

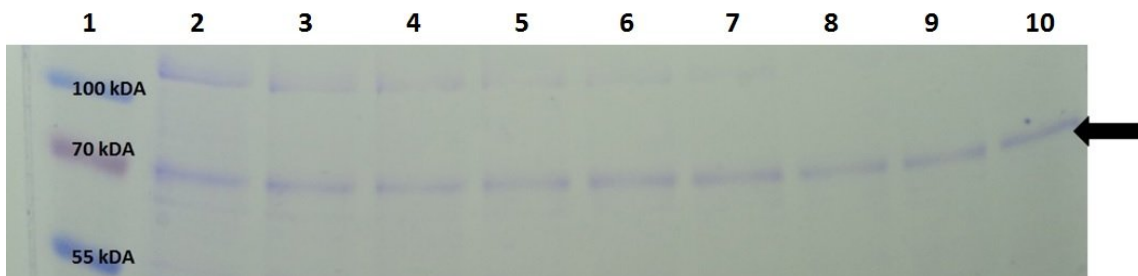


Figura 6. Análisis de las fracciones eluidas tras la purificación de Rrn7 Recombinante. El primer carril corresponde al estándar de proteínas. Los carriles 2-10 corresponden a las fracciones eluidas en dicho orden. La flecha negra indica la banda que representa la proteína purificada de alrededor de 70 kDa.

En la Figura 6 se aprecia una purificación parcial de la proteína, que se ve reflejado en una leve disminución de la concentración al aumentar el número de fracciones eluidas, como también un aumento de la pureza con las subsecuentes fracciones; y la consecuente disminución de contaminantes, correspondiente con la desaparición de ciertas bandas de mayor peso molecular (alrededor de los 100 kDa).

Adicionalmente se realizó un *western blot* para corroborar los resultados de la purificación anterior y validar que se trata específicamente de la proteína de interés y no de un contaminante de masa molecular similar cuyo resultado se refleja en la Figura 7.

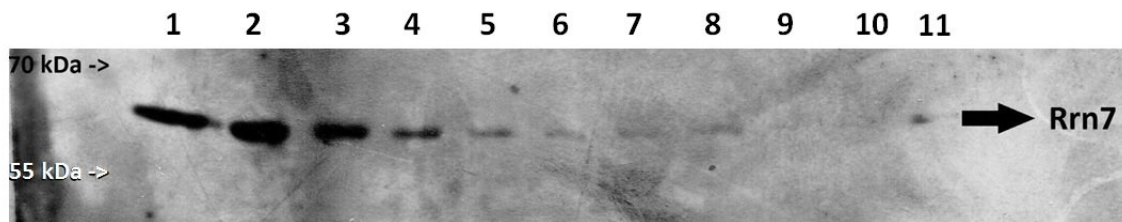


Figura 7. Estudio del enriquecimiento de las fracciones eluidas tras la purificación de Rrn7 recombinante. Se utilizó anti 6x-his como anticuerpo primario en una dilución 1:500 y un anticuerpo anti ratón como anticuerpo secundario. Los carriles 1 al 9 representan las fracciones eluidas en dicho orden. El carril 10 corresponde al lavado con una solución imidazol 20 mM y el carril 11 corresponde al lavado con imidazol 50 mM. La flecha negra indica la banda de Rrn7 recombinante de peso molecular cercano a los 70 kDa.

En este experimento se refleja el resultado de la purificación, ya que tal como se observa, las fracciones 1-4 contienen una mayor proporción de Rrn7 en comparación a las fracciones siguientes (5-11), lo que se visualiza en la desaparición de la banda de Rrn7 en las fracciones eluidas siguientes. Las bandas presentes en el gel de poliacrilamida en las fracciones restantes corresponden a otras proteínas, posiblemente a proteínas contaminantes de origen bacteriano (Figura 6). Por lo tanto la SDS-PAGE indica la cantidad de posibles contaminantes presentes en la purificación (Figura 6), mientras que el *western blot* a su vez indica el real enriquecimiento de las fracciones obtenidas (Figura 7). Aunque las primeras fracciones son las que poseen las mayores concentraciones de proteína recombinante, son también las que poseen una mayor cantidad de impurezas; por lo tanto debe ser determinado con experimentos adicionales, el cómo estas puedan afectar la funcionalidad de la proteína, principalmente en cuanto la unión a DNA, lo que puede ser verificado a través de EMSA.

La medición de la concentración de la proteína purificada [tras la diálisis de las fracciones eluidas más concentradas (1-4)], arrojó el valor de 3,72 pmoles/ μ L, que corresponde a un valor suficiente para los ensayos posteriores. Esto junto a los resultados obtenidos tras la SDS PAGE y el *western blot*, los que reflejaron una purificación parcial de la proteína recombinante, ya que se detectó la

presencia de algunos contaminantes, sin embargo se obtuvo una cantidad aceptable de proteína que puede ser utilizada para ensayos posteriores.

2. Estudio de la funcionalidad de Rrn7 recombinante purificada mediante

EMSA: Tal como se mencionó anteriormente, la proteína Rrn7 recombinante obtenida tras la purificación, si bien se encuentra en una concentración aceptable, hay contaminantes presentes en las fracciones más concentradas, y por tanto se debe estudiar si estos podrían afectar la funcionalidad de la proteína purificada en su unión a DNA. Lo anterior puede ser analizado mediante ensayos de EMSA, particularmente estudiando la formación del complejo Rrn7-caja HomolD. La figura 8, por lo tanto, muestra el resultado de EMSA realizado utilizando la sonda marcada K5 parte del promotor del gen *rpK5* (la que contiene la caja HomolD). Esta sonda se incubó con cantidades crecientes de la proteína Rrn7 purificada previamente. En dicha figura se corrobora la correcta funcionalidad de la proteína purificada, comprobándose su unión a la caja HomolD, tal y como se había descrito en ensayos anteriores (Rojas y cols., 2011).

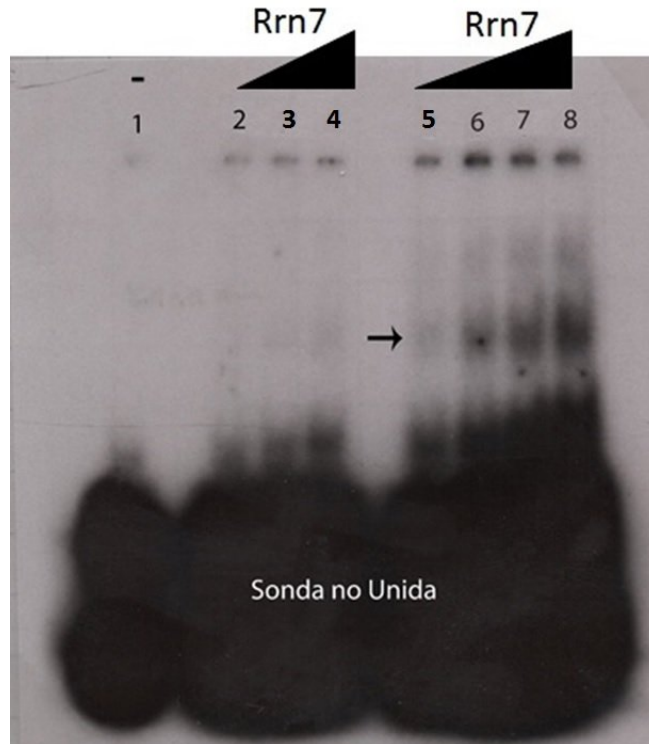


Figura 8. Evaluación de la funcionalidad de Rrn7 recombinante purificada. El carril 1 corresponde al control negativo sin proteína, los carriles 5-8 corresponden a cantidades crecientes de Rrn7 recombinante

proveniente de las fracciones más concentradas de la purificación. Los carriles 2-4 corresponden a cantidades crecientes de Rrn7 provenientes de las fracciones más diluidas de la purificación. La flecha negra indica la unión positiva y la formación del complejo DNA-Proteína y el cúmulo negro inferior corresponde a sonda libre no unida.

Las fracciones eluidas más concentradas, es decir las cuatro primeras obtenidas al realizar la elución y luego la diálisis, denotan una relación directa entre la concentración de la proteína utilizada con la unión a la caja HomID observada. Es decir, la proteína purificada es funcional ya que logra unirse a la caja HomID *in vitro*. Esto no ocurre con las fracciones que contenían la proteína más diluida, pues en este caso no es suficiente para obtener los complejos esperados, y las bandas representativas del complejo son extremadamente tenues. Cabe mencionar que se aprecian bandas de mayor y menor peso molecular respecto a la representativa del complejo, las cuales constituyen uniones inespecíficas, las que fueron estudiadas previamente en el laboratorio realizando ensayos con un competidor no específico, donde al aumentar la cantidad de este competidor se observó la desaparición de dichas bandas.

El análisis de la auto-radiografía demuestra aún mejor la relación antes mencionada entre la cantidad de proteína y la unión formada, al mantener constante la cantidad de DNA (Figura 9).

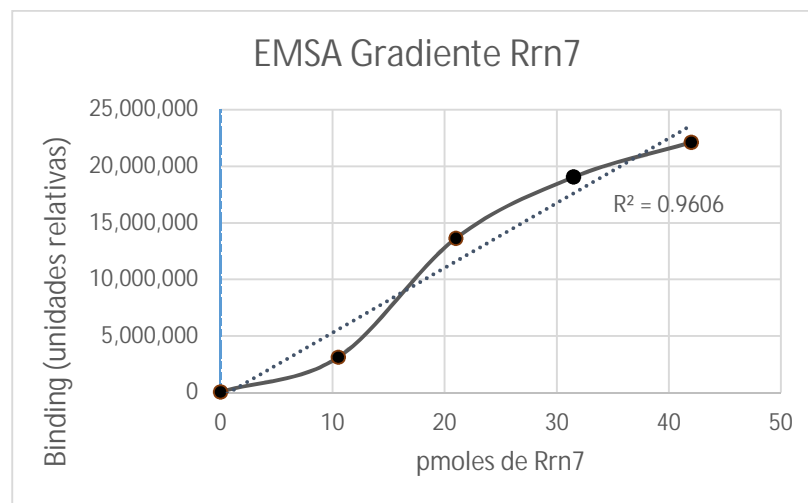


Figura 9. Análisis cualitativo de la funcionalidad de Rrn7 recombinante purificada. La cuantificación se realizó a partir de la Figura 8. En el eje X se indican los valores de concentración utilizados de Rrn7 en la incubación, en el eje Y se indican las unidades relativas de unión de la proteína al DNA.

En la Figura 9 se realizó un ajuste lineal y se obtuvo un valor de r^2 igual a 0,9606, denotando la proporcionalidad que existe entre ambas variables, confirmando nuevamente que la proteína recombinante Rrn7 purificada actúa como el factor transcripcional que se une a la caja HomolD y por tanto es funcional.

3. Estudio de la funcionalidad de anticuerpos policlonales purificados para TBP y TF_{II}B: Para realizar la identificación de los factores TBP y TF_{II}B en el PIC *in vivo* por medio de CHIP, se debe disponer de los respectivos anticuerpos. Además, disponer de estos permite utilizarlos para ensayos de EMSA con competición por anticuerpo. Por tanto para obtener los anticuerpos se realizó la purificación de cada uno por medio de la elusión del suero de conejo respectivo, previamente preparado, a través de una resina de proteína-A/Agarosa (véase Materiales y Métodos, 4° punto). Esta purificación fue corroborada por la realización de un *Western blot* utilizando cada uno de estos anticuerpos en la detección de su antígeno correspondiente (representados como proteína recombinante). En la Figura 10 se aprecian los resultados al utilizar anticuerpo contra TF_{II}B.

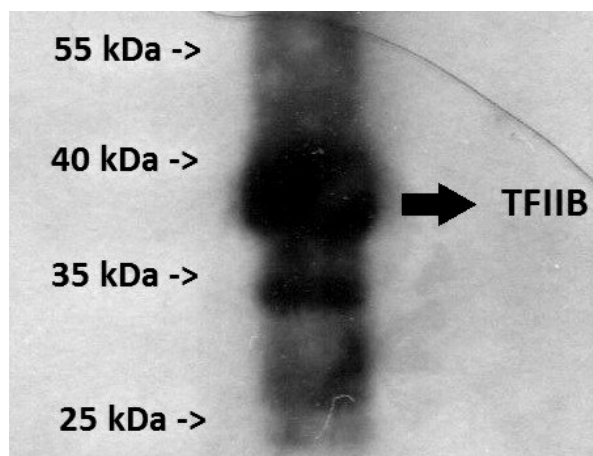


Figura 10. Identificación de la funcionalidad y especificidad del anticuerpo policlonal contra TF_{II}B. *Western Blot* utilizando como anticuerpo primario 1:5000 el anticuerpo policlonal purificado y 6 pmoles de TF_{II}B recombinante como antígeno. La flecha indica la banda de TF_{II}B detectada.

En la Figura 10 se observa una banda que refleja la detección mayoritaria de la proteína TF_{II}B, por tanto se comprueba la funcionalidad del anticuerpo anti

TF_{II}B purificado, y que por ende puede ser utilizado para experimentos posteriores. Por otro lado, en la Figura 10 se observa una banda adicional bajo la banda representativa a TF_{II}B, y que posiblemente corresponde a un producto de degradación de la misma proteína. Sin embargo, al comparar ambas bandas se aprecia que la intensidad de la banda inespecífica es mucho menor que la de TF_{II}B, demostrándose que la afinidad por la proteína del anticuerpo purificado es alta y que la especificidad es bastante aceptable.

De igual manera, se ensayó la especificidad y funcionalidad del anticuerpo policlonal purificado contra TBP. Esto se realizó mediante un ensayo de *Western blot* para detectar la proteína TBP recombinante (Figura 11).

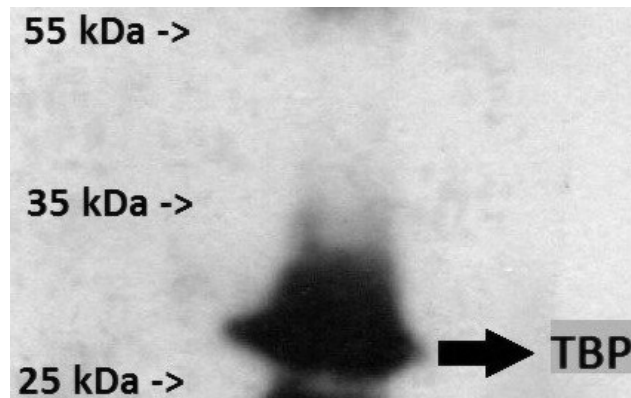


Figura 11. Identificación de la funcionalidad y especificidad del anticuerpo policlonal contra TBP. *Western Blot* utilizando como anticuerpo primario 1:5000 el anticuerpo policlonal purificado y 20 pmoles de TBP recombinante como antígeno. La flecha indica la banda de TBP detectada.

De manera similar se aprecia la unión mayoritaria a la proteína TBP por parte del anticuerpo. La banda que refleja la unión a TBP es de una gran intensidad, suficiente como para ser apropiadamente utilizada en experimentos posteriores. En conclusión ambos *Western blot* realizados demuestran que tanto el anticuerpo anti TF_{II}B como el anticuerpo TBP, detectan y unen sus respectivos factores de una manera específica y pueden, por tanto, ser utilizados para los ensayos antes mencionados.

4. Efecto de TF_{II}B sobre la unión de Rrn7 a la caja HomOLD: A continuación se evaluó si TF_{II}B tiene un efecto sobre la interacción de Rrn7 con la caja HomOLD.

Con este fin se realizaron ensayos EMSA, utilizando la sonda K5 que contenía la caja HomolD, incubada junto a la proteína Rrn7 recombinante purificada y a cantidades crecientes de TF_{II}B también recombinante. Los resultados de esto se muestran en la Figura 12.

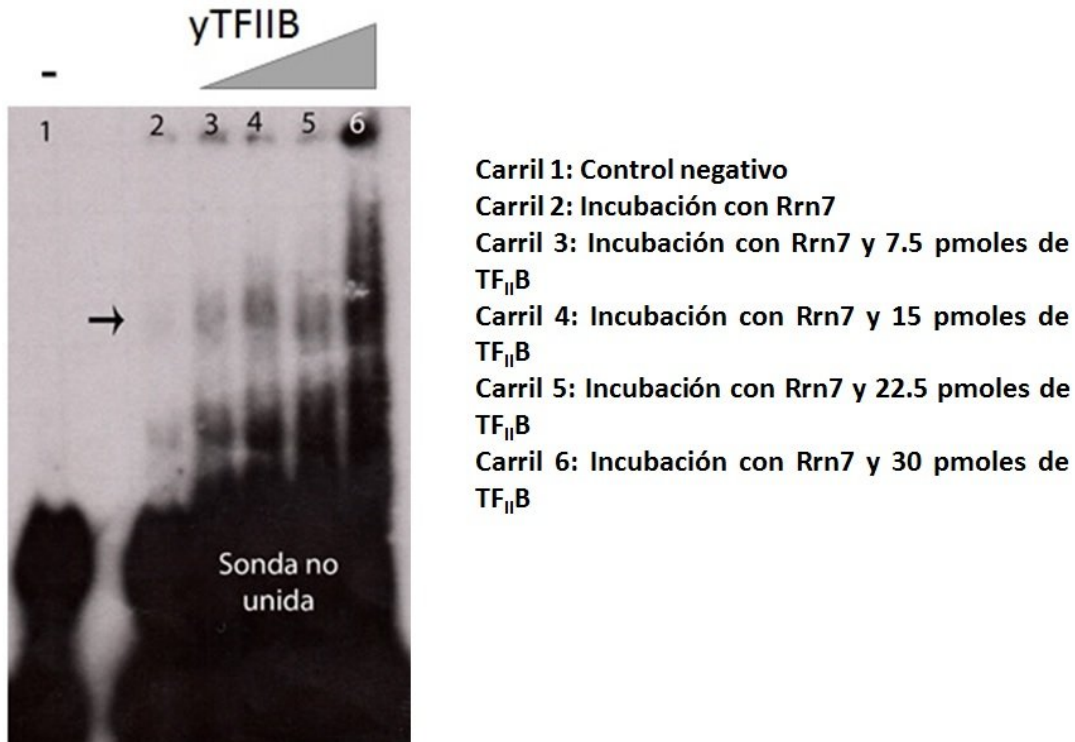
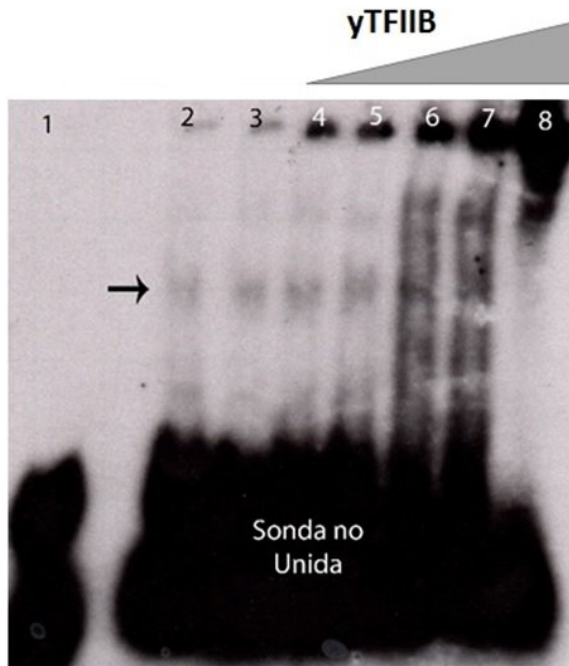


Figura 12. Efecto de TF_{II}B sobre la unión de Rrn7 a la caja HomolD. Auto-radiografía del EMSA realizado utilizando la sonda K5 que contiene la caja HomolD, incubada junto a la proteína Rrn7 recombinante y cantidades crecientes de TF_{II}B. Carril 1: control negativo sin proteína; carril 2: incubación de la sonda con solo Rrn7; carril 3: incubación con Rrn7 y 7.5 pmoles de TF_{II}B; carril 4: incubación con Rrn7 y 15 pmoles de TF_{II}B; carril 5: incubación con Rrn7 y 22.5 pmoles de TF_{II}B; carril 6: incubación con Rrn7 y 30 pmoles de TF_{II}B. La flecha indica la formación del complejo Rrn7-caja HomolD. En los carriles que se agregó Rrn7 se utilizaron siempre 21 pmoles.

En la Figura 12 se observa que al aumentar la cantidad de TF_{II}B (de 7.5 a 15 pmoles), específicamente entre los carriles 3, 4 y 5, se aprecia levemente la aparición de un complejo de mayor tamaño (retardo), el que desaparece en el carril 6 cuando se aumenta aún más la concentración del factor a 22,5 pmoles. Además, dicha interacción aumenta de manera proporcional (reflejado en una banda más prominente, indicada con una flecha en la Figura 12), al aumentar la cantidad de TF_{II}B, lo que se aprecia cuando se compara con la incubación de Rrn7

en ausencia de otros factores (Figura 12 carril 2). En el último carril (6) se aprecia un aumento del ruido de fondo, posiblemente debido al retardo producido por la formación de un complejo que a su vez es inestable y por tanto se desglosa en sus distintos componentes, sin embargo se observa también un aumento en la formación del complejo Rrn7-caja HomolD (relativo a la intensidad de su banda). Nuevamente se confirma la influencia del factor TF_{II}B en la formación del PIC a nivel del promotor, potenciándose al aumentar la concentración de esta proteína, y que alcanza hasta casi 20 veces más intensidad respecto al complejo con solo Rrn7. Por otro lado, si bien se aprecia la aparición y posterior desaparición de un retardo en el gel, la intensidad de la banda aumenta proporcionalmente sin decaer (Figura 12).

Para analizar si los resultados antes mencionados, son efectivamente provocados por la presencia del factor TF_{II}B, y no por algún otro motivo, se llevó a cabo un ensayo en el cual se agregó TF_{II}B de manera posterior a la incubación de Rrn7 con la sonda K5, realizándose una segunda incubación del complejo (Figura 13). El estudio realizado indicó un resultado similar al anterior, el que denota el aumento de la formación del complejo al aumentar la concentración del factor de transcripción TF_{II}B. Si bien el aumento no es tan significativo y se pierde de cierta forma la linealidad de la relación, esta relación aún se mantiene, tal como se aprecia en la Figura 13.



Carril 1: Control negativo

Carril 2: Rrn7 incubada por 15' a 30°C

Carril 3: Rrn7 incubada 15' primero y luego 30', ambas a 30°C

Carril 4: Primera incubación solo con Rrn7 15' a 30°C y una segunda incubación agregando 3 pmoles de TF_{II}B por 30' a 30°C

Carril 5: Primera incubación solo con Rrn7 15' a 30°C y una segunda incubación agregando 6 pmoles de TF_{II}B por 30' a 30°C

Carril 6: Primera incubación solo con Rrn7 15' a 30°C y una segunda incubación agregando 9 pmoles de TF_{II}B por 30' a 30°C

Carril 7: Primera incubación solo con Rrn7 15' a 30° y una segunda incubación agregando 15 pmoles de TF_{II}B por 30' a 30°C

Carril 8: Primera incubación solo con Rrn7 15' a 30°C y una segunda incubación agregando 30 pmoles de TF_{II}B por 30' a 30°C

Figura 13. Efecto de la incubación diferida de TF_{II}B sobre la unión de Rrn7 a la caja HomolD. Autoradiografía del EMSA realizado utilizando la sonda K5 que contiene la caja HomolD, incubada junto a la proteína Rrn7 recombinante y luego incubada tiempo adicional con cantidades crecientes de TF_{II}B. Carril 1: control negativo sin proteínas; carril 2: Rrn7 incubada por 15' a 30°C; carril 3: Rrn7 incubada 15' primero y luego 30' ambas a 30°C; carril 4: primera incubación de solo Rrn7 15' a 30°C y una segunda incubación con 3 pmoles de TF_{II}B por 30' a 30°C; carril 5: primera incubación de solo Rrn7 15' a 30°C y una segunda incubación con 6 pmoles de TF_{II}B por 30' a 30°C; carril 6: primera incubación de solo Rrn7 15' a 30°C y una segunda incubación con 9 pmoles de TF_{II}B por 30' a 30°C; carril 7: primera incubación de solo Rrn7 15' a 30°C y una segunda incubación con 15 pmoles de TF_{II}B por 30' a 30°C; carril 8: primera incubación de solo Rrn7 15' a 30°C y una segunda incubación con 30 pmoles de TF_{II}B por 30' a 30°C. Se cargaron 21 pmoles de Rrn7 en cada carril según correspondiese. La flecha indica la formación del complejo DNA-proteína.

Por otro lado, al igual que con el EMSA realizado con cantidades crecientes de Rrn7 (Figura 8), se observan nuevamente las bandas no específicas de mayor y menor peso molecular respecto al complejo; las que como se mencionó antes, constituyen uniones no específicas.

Además en la Figura 13 en los carriles 6 al 8 se aprecia un aumento del ruido de fondo, también posiblemente debido a la formación del complejo inestable visto anteriormente (Figura 12). Por otro lado, en el carril 8 se aprecia un aglutinamiento al inicio de este, específicamente en el sector correspondiente al

bolsillo donde se carga la muestra. Esto posiblemente se debe a la cantidad de proteína utilizada, o a la formación de un complejo de gran tamaño que no puede migrar a través del gel. A pesar de lo anterior, el aumento de la intensidad de las bandas se verifica al aumentar la concentración del factor.

Además, cabe mencionar que la variación entre los controles realizados es prácticamente despreciable (Figura 13, carriles 2 y 3), lo cual indica que los efectos observados en la formación del complejo no son atribuibles al aumento del tiempo de incubación de la proteína Rrn7 con la sonda. Así también, se aprecia un efecto similar al visto anteriormente cuando se incubó TF_{II}B junto a Rrn7 solo una vez (Figura 13), esta vez al incubar primero Rrn7 y luego agregar TF_{II}B para realizar una segunda incubación (Figura 12). Si se comparan los efectos obtenidos en ambos experimentos respecto a la concentración utilizada, se observan valores similares en la potenciación del complejo Rrn7-caja HomolD, como por ejemplo al utilizar 15 pmoles de TF_{II}B se observa un aumento 6 veces superior de la formación del complejo con Rrn7 en ausencia de otros factores. Con estos ensayos por tanto se comprueba que el factor TF_{II}B influye en la formación del complejo Rrn7-caja HomolD, potenciándolo.

5. Efecto de TBP sobre la unión de Rrn7 a la caja HomolD: De igual manera a TF_{II}B, se evaluó si TBP afecta la interacción de Rrn7 con la caja HomolD. Con este fin se realizaron ensayos de EMSA, utilizando la sonda K5 que contenía la caja HomolD, incubada junto a la proteína Rrn7 recombinante purificada y a cantidades crecientes de TBP también recombinante. Los resultados de esto se muestran en la Figura 14.

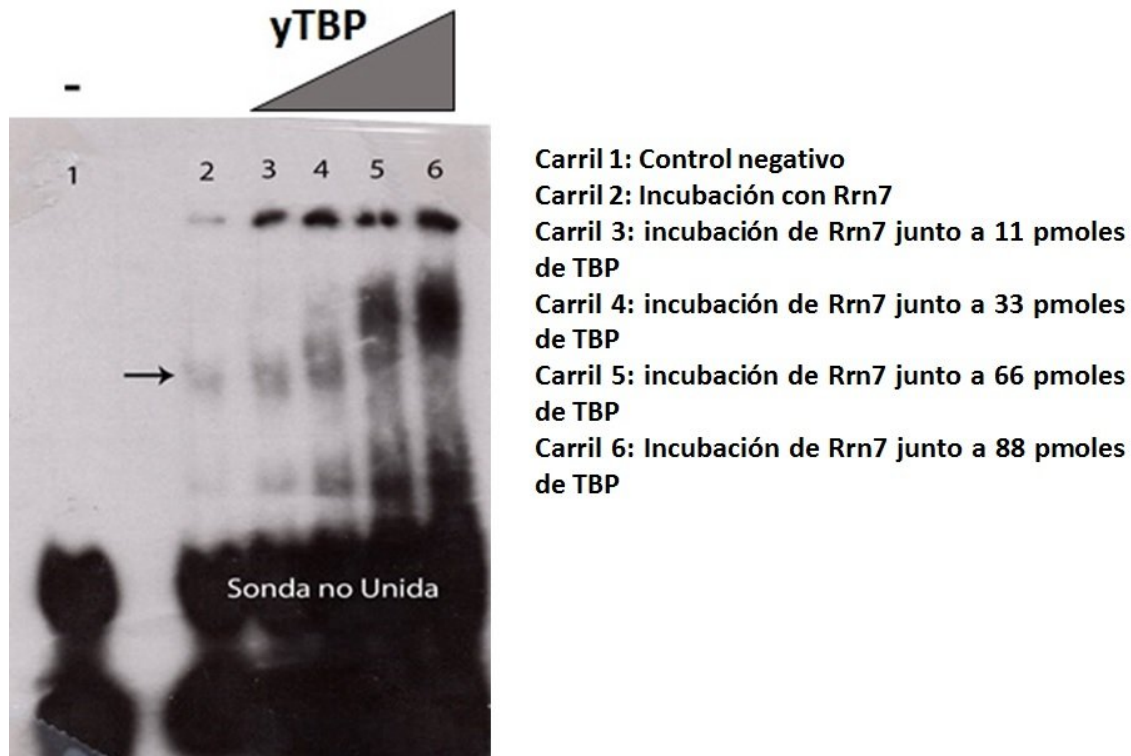


Figura 14. Efecto de TBP sobre la unión de Rrn7 a la caja HomolD. Auto-radiografía del EMSA realizado utilizando la sonda K5 que contiene la caja HomolD, incubada junto a la proteína Rrn7 recombinante y cantidades crecientes de TBP. Carril 1: control negativo sin proteína; carril 2: Rrn7 incubada sola junto a la sonda K5; carril 3: incubación de Rrn7 junto a 11 pmoles de TBP; carril 4: incubación de Rrn7 junto a 33 pmoles de TBP; carril 5: incubación de Rrn7 junto a 66 pmoles de TBP; carril 6: incubación de Rrn7 junto a 88 pmoles de TBP. La flecha representa el complejo DNA-proteína. Se utilizaron siempre 21 pmoles de Rrn7 en los carriles donde se agregó.

En forma similar al efecto provocado por TF_{II}B sobre el complejo Rrn7-caja HomolD, en los ensayos realizados con TBP se observa un aumento directamente proporcional en la intensidad de la aparición del complejo (representado con la banda marcada con una flecha), al aumentar la concentración de TBP (Figura 14). En estos ensayos también se produce un retardo de la banda representativa del complejo, aunque en esta ocasión es más evidente que lo visto en los ensayos utilizando TF_{II}B. Además, se observa un aumento progresivo del retardo de la banda al aumentar la concentración utilizada, reflejado en los carriles 4, 5 y 6 de la Figura 14. Para esta proteína se necesitaron 88 pmoles para obtener un aumento de la unión relativa a la sonda K5 (de la región promotora del gen *rpk5*) alrededor de 16 veces superior a la unión al DNA obtenida con Rrn7 en ausencia de otros

factores. Además, se aprecia que el aumento posee menor linealidad en comparación a lo observado en los ensayos con TF_{II}B (Figura 13).

Adicionalmente, se llevó a cabo un ensayo en el cual se agregó TBP de manera posterior a la incubación de Rrn7 con la sonda K5. En este experimento se produjo un aumento de la intensidad a los 54 pmoles, que luego decayó (Figura 15, carriles 5, 6 y 7), registrándose un comportamiento distinto al observado en la Figura 14, observándose una especie de punto crítico en la formación del complejo, es decir, a determinada concentración la intensidad de la banda representativa al complejo alcanza un máximo y luego decae al seguir aumentando la concentración de TBP.

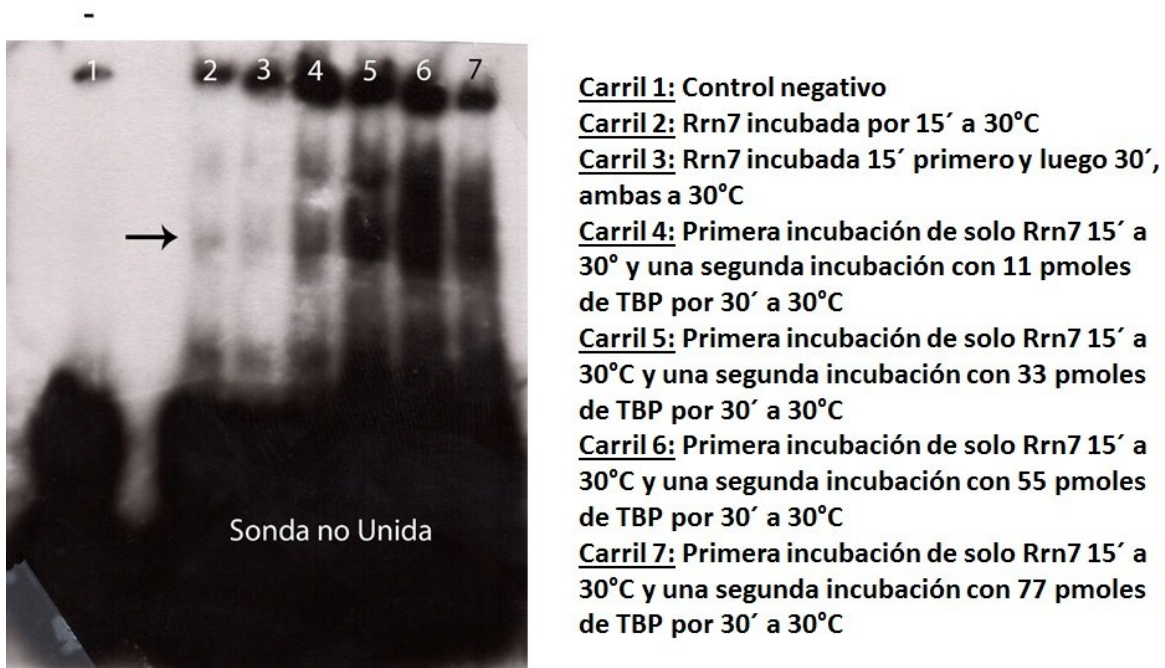


Figura 15. Efecto de la incubación diferida de TBP sobre la unión de Rrn7 a la caja HomolD. Autoradiografía del EMSA realizado utilizando la sonda K5 que contiene la caja HomolD, incubada junto a la proteína Rrn7 recombinante y luego incubada tiempo adicional con cantidades crecientes de TBP. Carril 1: control negativo sin proteínas; carril 2: Rrn7 incubada por 15' a 30°C; carril 3: Rrn7 incubada 15' primero y luego 30' ambas a 30°C; carril 4: primera incubación de solo Rrn7 15' a 30° y una segunda incubación con 11 pmoles de TBP por 30' a 30°C; carril 5: primera incubación de solo Rrn7 15' a 30°C y una segunda incubación con 33 pmoles de TBP por 30' a 30°C; carril 6: primera incubación de solo Rrn7 15' a 30°C y una segunda incubación con 55 pmoles de TBP por 30' a 30°C; carril 7: primera incubación de solo Rrn7 15' a 30°C y una segunda incubación con 77 pmoles de TBP por 30' a 30°C. Se cargaron 21 pmoles de Rrn7 en cada carril donde se utilizó. La flecha indica la formación del complejo DNA-proteína.

En la Figura 15 se observa que las intensidades al variar la concentración de TBP alcanzan un máximo de intensidad, la que luego disminuye al aumentar la concentración de TBP, comportamiento distinto al observado cuando se incubó la proteína solo una vez por 15 minutos junto a Rrn7 (Figura 14). Posiblemente producto de la desestabilización del complejo tras el desarrollo del ensayo. Se observan además nuevamente en ambos experimentos las bandas no específicas de mayor y menor peso molecular respecto al complejo; las que como se mencionó antes, constituyen uniones no específicas.

Cabe mencionar también, que al igual que lo que se observó en el experimento con TF_{II}B (Figura 13), la variación entre los controles realizados es prácticamente despreciable (Figura 15, carriles 2 y 3), lo cual indica que los efectos observados en la formación del complejo no son atribuibles al aumento del tiempo de incubación de la proteína Rrn7 con la sonda. Sin embargo, esto no se observó al comparar este experimento (donde se incubó primero Rrn7 y luego se agregó TBP para realizar una segunda incubación), con el ensayo donde se incubó TBP junto a Rrn7 (Figura 14), ya que en este último el aumento de la intensidad del complejo fue relativamente lineal respecto a la cantidad de proteína utilizada. En cambio, al realizar las dos incubaciones sucesivas se observó un máximo de intensidad. Tras alcanzar dicho nivel, la intensidad de la banda disminuyó cuando se agregó mayor cantidad de proteína a la reacción, observándose por tanto, un efecto de la concentración distinto cuando se realizan incubaciones diferidas. Con estos ensayos por tanto se demuestra que es el factor TBP, el que influye en la formación del complejo Rrn7-caja HomID, potenciándolo.

6. Efecto de anticuerpos sobre la modulación provocada por TBP y TF_{II}B en la unión de Rrn7 a la caja HomID: Para confirmar que los efectos observados anteriormente en ensayos tanto con TBP como con TF_{II}B, efectivamente son generados debido a la presencia de estos factores y no por alguna condición puntual del ensayo (efecto de algún tampón utilizado por ejemplo) o sean algún

artefacto, se realizaron experimentos de competencia con los anticuerpos respectivos para cada proteína a modo de control, con el fin de bloquear el efecto visto en los ensayos anteriores (Figura 16).

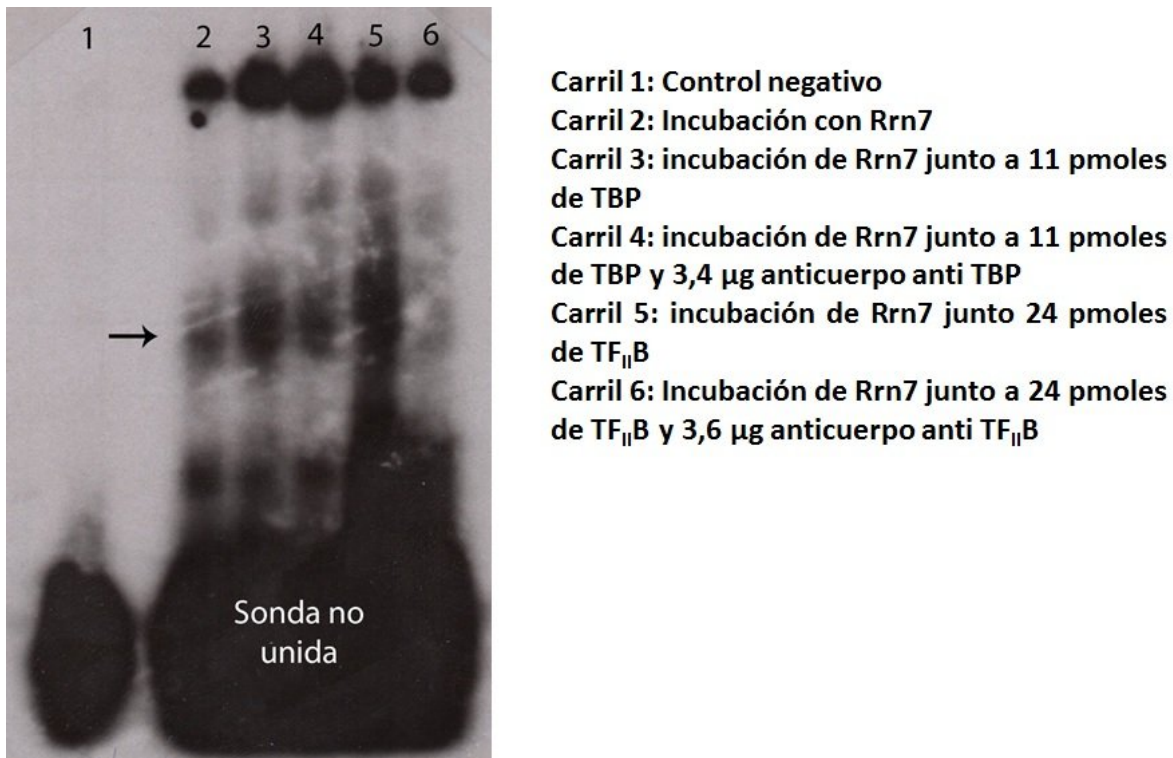


Figura 16. Efecto de anticuerpos sobre la modulación provocada por TBP y TFIIIB en la unión de Rrn7 a la caja HomolD. Auto-radiografía del EMSA realizado utilizando la sonda K5 que contiene la caja HomolD, incubada junto a la proteína Rrn7 recombinante, además de los factores TBP y TFIIIB y sus respectivos anticuerpos. Carril 1: control negativo sin proteínas; carril 2: incubación con Rrn7 sola junto a la sonda K5; carril 3: Rrn7 junto a 11 pmoles de TBP; carril 4: Rrn7 junto a 11 pmoles de TBP y 3,4 µg anticuerpo anti TBP; carril 5: Rrn7 junto 24 pmoles de TFIIIB; carril 6: Rrn7 junto a 24 pmoles de TFIIIB y 3,6 µg anticuerpo anti TFIIIB. Se utilizaron 28 pmoles de Rrn7 en cada carril que se agregó. La flecha indica la formación del complejo DNA-Proteína.

Se observa que la incubación en presencia de anticuerpos logra inhibir la formación del complejo Rrn7-caja HomolD, ya sea de manera parcial en el caso de TBP (Figura 16, carriles 3 y 4), como de manera total en el caso de TFIIIB (Figura 16, carriles 5 y 6). Al igual que en los ensayos anteriores con TBP y TFIIIB, ambos factores por sí solos logran intensificar la banda representativa del complejo DNA-Rrn7 (Figuras 12, 14 y 16), siendo TFIIIB la proteína que mayor efecto causa, en contraste al efecto provocado por TBP que es más discreto al comparar con la

intensidad basal del complejo con solamente Rrn7 (Figura 16, carriles 2, 3 y 5). Además, se presentan bandas no específicas tanto de mayor peso molecular del complejo como de menor peso molecular, que ya habían sido detectadas en ensayos anteriores.

Por otro lado, se observa que el efecto provocado por el anticuerpo anti TF_{II}B es superior al efecto provocado por el anticuerpo anti TBP, esto en cuanto a la modulación por parte de los respectivos factores en la formación del complejo Rrn7-caja Homold. En otras palabras, al comparar la intensidad de la banda representativa del complejo DNA-Rrn7, se aprecia mayor disminución de esta cuando se aplica anticuerpo anti TF_{II}B que cuando se agrega anticuerpo anti TBP. En conclusión este ensayo demuestra que los efectos observados en los experimentos realizados previamente, tanto con TBP como con TF_{II}B, fueron provocados por estos factores y no por otras circunstancias, además se reforzaron los resultados donde TBP y TF_{II}B ejercen un efecto potenciador en la formación del complejo.

6. Identificación *in vivo* de los factores TBP y TF_{II}B en el PIC sobre la caja

Homold: Para responder la interrogante respecto a la presencia de TBP y de TF_{II}B en el PIC que se forma sobre la caja Homold *in vivo*, se realizaron inmunoprecipitaciones de cromatina, utilizando para esto los anticuerpos respectivos purificados para cada factor. Además para este ensayo se amplificó el DNA obtenido mediante PCR, para la cual se utilizaron tres set de partidores, de los cuales dos correspondieron a controles del experimento. La PCR realizada con partidores para el primer exón del gen de actina (*act1*), se presentó como un control negativo de la inmunoprecipitación de cromatina (Figura 17).

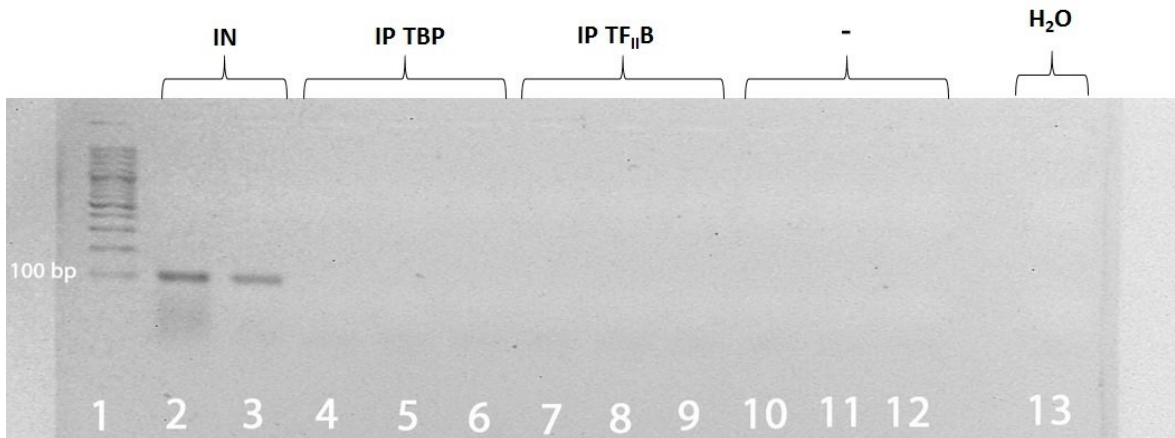


Figura 17. **Amplificación por PCR del primer exón del gen de actina como control negativo de la ChIP.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% de la PCR realizada utilizando partidores para el primer exón del gen de actina (*act1*). Carril 1: estándar de DNA 3000-100 bp; carriles 2 y 3: input; carriles 4 a 6: ChIP con TBP; carriles 7 a 9: ChIP con TF_{II}B; carriles 10 a 12: control negativo sin anticuerpos; carril 13: corresponde a un control con H₂O. IN = input, IP = Inmunoprecipitación.

En la Figura 17 se observa que tras la inmunoprecipitación no se eluyó DNA contaminante alguno, reflejándose una correcta realización del experimento y por lo tanto el DNA eluído y purificado corresponde específicamente al DNA unido a los factores de interés (TBP y TF_{II}B). Solo se observan dos bandas (Figura 17, carriles 2 y 3) correspondientes al DNA de la carga (*input*), el cual posee todo el DNA extraído de las levaduras, y que por lo tanto debía presentar amplificación, lo que no ocurrió con las bandas representativas de las inmunoprecipitaciones (Figura 17, carriles 4 al 9). El control negativo de la PCR, al que se agregó solo H₂O, verifica que la técnica se realizó correctamente y no se produjeron contaminaciones en esta.

La PCR para determinar la presencia de TBP y TF_{II}B sobre el promotor que contiene la caja TATA corresponde al control positivo del ensayo, ya que se sabe que tanto TBP como TF_{II}B se localizan en la maquinaria ensamblada sobre la caja TATA (Figura 18).

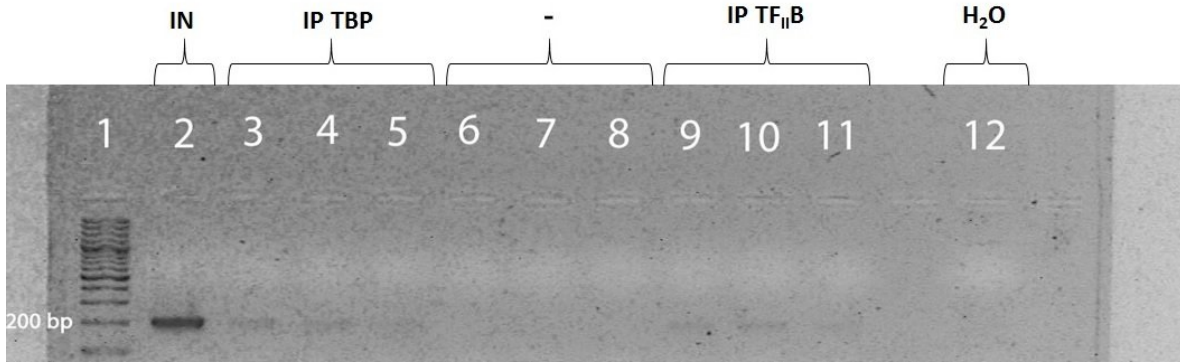


Figura 18. **Amplificación por PCR de una parte del gen *nmt1* que contiene la caja TATA como control positivo de la ChIP.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% de la PCR realizada utilizando partidores para una parte de la región promotora que contiene la caja TATA y el primer exón del gen *nmt1*. Carril 1: estándar de DNA 3000-100 bp; carril 2: input; carriles 3 a 5: ChIP con TBP; carriles 6 a 8: control negativo sin anticuerpos; carriles 9 a 11: ChIP con TF_{II}B; carril 12: control con H₂O. IN = input, IP = Inmunoprecipitación.

En la Figura 18 se observa la amplificación en ambas inmunoprecipitaciones de cromatina (tanto con TBP como con TF_{II}B), aunque de una menor intensidad respecto a la intensidad del amplicón correspondiente al DNA de la carga (*input*). Se debe considerar que el rendimiento de la técnica no es muy alto, sin embargo las Figuras 17 y 18 verifican la pureza de la inmunoprecipitación. Respecto a este último punto, las contaminaciones son descartadas tanto para la inmunoprecipitación de cromatina como para la PCR, debido a que no se observa amplificación por parte los controles negativos, ni tampoco se observa amplificación en la reacción en que solo se agregó H₂O.

Finalmente el tercer set de partidores utilizado fue para el gen *rpK5*, el cual contiene en su región promotora la caja HomID, sobre la que se busca determinar la presencia de TBP y TF_{II}B (Figura 19).

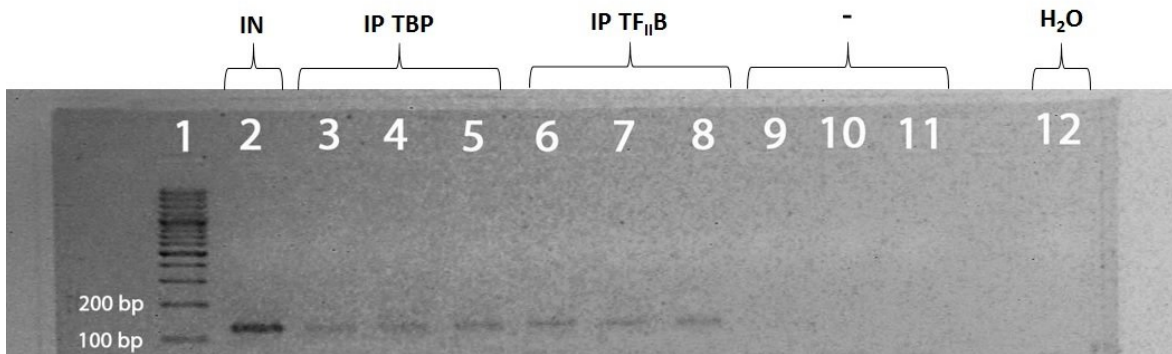


Figura 19. **Amplificación por PCR de una parte del gen *rpK5* que contiene la caja *HomolD*.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% de la PCR realizada utilizando partidores para una parte de la región promotora que contiene la caja *HomolD* y el primer exón del gen *rpK5*. Carril 1: estándar de DNA 3000-100 bp; carril 2: input, carriles 3 a 5: ChIP con TBP; carriles 6 a 8: ChIP con $TF_{II}B$; carriles 9 a 11: control negativo sin anticuerpos, Carril 12: control con H_2O . IN = input, IP = Inmunoprecipitación.

En la Figura 19 se verifica la presencia de ambos factores en la región promotora del gen *rpK5*, debido a la amplificación de las secuencias específicas del DNA obtenido tras las inmunoprecipitaciones. Se aprecian bandas al nivel esperado tanto en las inmunoprecipitaciones de cromatina con $TF_{II}B$ como con TBP. Si bien estas bandas, al igual que las de la Figura 18, son menores en intensidad respecto al DNA de la carga (*input*), debido principalmente al rendimiento de la inmunoprecipitación de cromatina, pues se recupera poco DNA tras esta. Además, hay que recordar que el DNA de la carga (*input*) corresponde a la extracción total de DNA realizada a la levadura, siendo las inmunoprecipitaciones solo una fracción del DNA presente originalmente en el DNA de la carga (*input*). Una vez más se descartan las contaminaciones tanto para la inmunoprecipitación de cromatina debido a que no se observa amplificación por parte los controles negativos, como para la PCR al tampoco observarse amplificación en la reacción en que solo se agregó H_2O .

La amplificación tanto de $TF_{II}B$ como de TBP, si bien es baja respecto a la amplificación del DNA de la carga (*input*), es lo suficientemente alta respecto a los controles negativos, tal cual como se aprecia en la Figura 20 que grafica la cuantificación relativa hecha para ambos promotores. En esta se analizaron las bandas obtenidas (figura 17, 18 y 19), las que fueron normalizadas

porcentualmente respecto al DNA de la carga (*input*), ya que como se mencionó previamente, este corresponde al DNA inicial que se utilizó para realizar las inmunoprecipitaciones de cromatina.

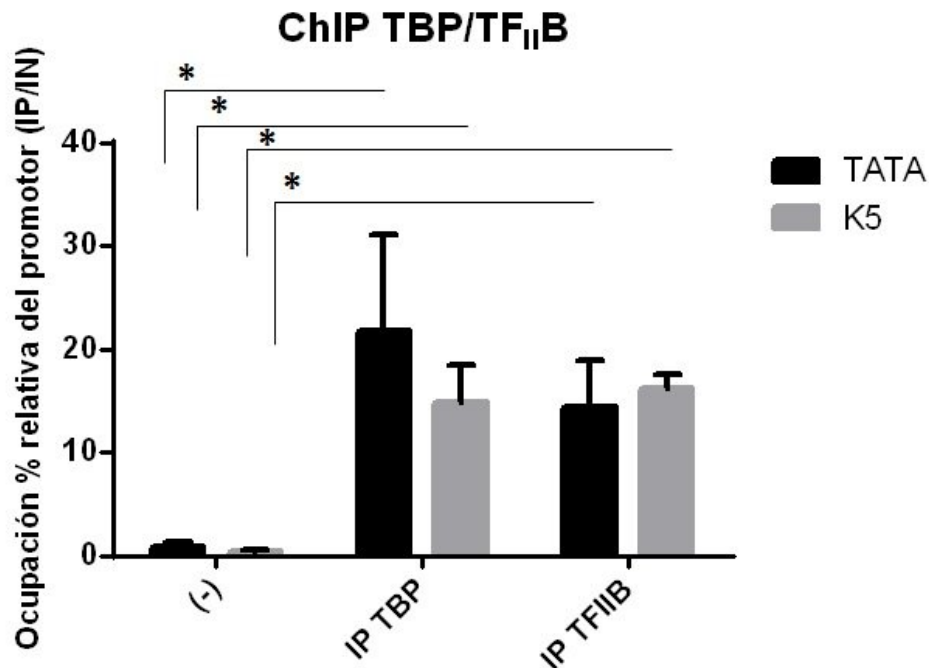


Figura20. Gráfico resumen de las inmunoprecipitaciones de cromatina con los factores TBP y TF_{II}B. El gráfico fue construido por medio de un análisis semi cuantitativo de los datos obtenidos en las Figuras 18 y 19. Estos datos fueron normalizados en base a los datos correspondientes al DNA input de ambas Figuras, y expresados de manera porcentual. El eje X corresponde a los distintos experimentos realizados con ambos factores además de los controles sin proteína, tanto para el promotor que contiene caja HomolD como para el que contiene caja TATA. Los datos fueron colectados de experimentos realizados en triplicado, las barras representan la desviación estándar entre estos valores. * Valor $P > 0,0001$.

En la Figura 20 se observa la diferencia entre los controles negativos y las inmunoprecipitaciones de TBP y de TF_{II}B. Estas últimas muestran una mayoritaria ocupación porcentual relativa del promotor en comparación a los controles. A pesar que una leve diferencia se podría visualizar en la figura entre las PCR de la caja TATA de ambas proteínas y las PCR del gen *rpK5* de ambas proteínas, las diferencias no son estadísticamente significativas.

Al realizar un análisis de ANOVA de dos colas, se comprueba lo antes mencionado en cuanto a la diferencia entre los controles negativos y las

inmunoprecipitaciones de cromatina. Tras este se determinó que existe una diferencia estadísticamente significativa ($P > 0,0001$) al comparar los valores de amplificación tanto de las inmunoprecipitaciones con las de los controles negativos, para el caso de K5 y de TATA. Además que la diferencia entre IP y control negativo en ambos casos es similar, y no existe una diferencia estadísticamente significativa de comportamiento al comparar ambos grupos (K5 y TATA), se descarta alguna tendencia entre los 2 promotores. Tampoco se vio una diferencia estadísticamente significativa al comparar los valores entre TATA y K5, de las inmunoprecipitaciones de cromatina, ni tampoco al comparar los valores de los controles negativos de K5 y TATA. En conclusión los resultados obtenidos tras las inmunoprecipitaciones de cromatina y las posteriores PCR realizadas, demuestran la presencia de los factores TBP y TF_{II}B en el entorno de la caja HomID, reforzando aún más la idea de que estos formarían parte del PIC que se forma sobre la caja HomID.

VI. Discusión

Todas las funciones del DNA dependen de su interacción con diversas proteínas. Estas interacciones pueden consistir en uniones inespecíficas o específicas a determinadas secuencias de DNA. Estas últimas pueden ser directas, cuando la proteína posee un dominio de unión a DNA, o indirectas a través de una segunda proteína (interacciones proteína-proteína). La especificidad de la interacción de las proteínas con el DNA se debe a la formación de múltiples contactos con las bases del DNA. Estas interacciones proteína-DNA son cruciales para la supervivencia de los organismos, debida a su implicancia en procesos tan importantes como la replicación, reparación y transcripción del DNA.

La transcripción del DNA, primera etapa de la expresión génica, requiere de la participación de diferentes factores de origen proteico, los que se asocian entre sí y con el DNA. Por mucho tiempo se creyó que la única región promotora en el DNA que estaba involucrada en la transcripción de genes era la llamada caja TATA, sin embargo el descubrimiento de nuevas regiones, agrupadas en los promotores denominados TATA-less, demostró que la mayoría de los genes requería de otros elementos en sus promotores. Es así, que la investigación se centró además de la búsqueda de nuevos promotores, a tratar de dilucidar cuáles son las moléculas participantes involucradas en la formación de PICs en estos promotores TATA-less, descubriéndose por lo tanto un sinnúmero de nuevas proteínas, como también identificándose nuevas funciones de otras proteínas ya conocidas.

En la levadura de fisión *S. pombe*, se identificó el factor transcripcional Rrn7 como la proteína de unión a la caja HomID (Rojas y cols, 2011). Es por esto que para identificar los otros factores que componen el PIC formado sobre el elemento HomID, Rrn7 debe ser considerado como una piedra angular en las investigaciones y ensayos que se realicen con este fin. Debido a esto, para poder realizar experimentos cuyos resultados sean reproducibles, se debe partir por disponer del factor Rrn7 puro y funcional. Esto se consiguió parcialmente en este trabajo, tras la expresión y purificación relativa realizada, lo que fue luego

corroborado por los experimentos de *Western blot*, *SDS-PAGE* teñido con azul de *Coomassie* y la cuantificación realizada utilizando reactivo de Bradford. Mediante estos ensayos se verificó que la proteína obtenida tenía una pureza y concentración adecuadas para ser utilizada en la investigación. Esto además fue demostrado utilizando una gradiente de concentraciones de la proteína purificada en EMSA junto a la sonda K5 (Figura 8). En este ensayo se observó la proporcionalidad directa existente entre concentración y aumento de la unión al DNA reflejado en la intensidad de las bandas representativas del complejo DNA-proteína formado.

Una de las técnicas principales para el estudio de la interacción entre DNA y proteína, corresponde al *Electrophoretic Mobility Shift Assay* o EMSA por sus siglas en inglés. Este ensayo intenta replicar *in vitro* las interacciones proteína-DNA que ocurren en el contexto intracelular o específicamente nuclear, en el cual determinadas proteínas o factores de transcripción interaccionan con regiones del DNA. Es así que el patrón de bandas observado en la gradiente de concentración de Rrn7 implica la unión de dicha proteína con la caja HomeID contenida en la región promotora del gen *rpK5*. Sin embargo, esta técnica permite estudiar la formación de los PIC, ya que también se puede analizar el efecto que provocan otros miembros del complejo, acercándose cada vez más al contexto real intranuclear. Tal como se describe en otras investigaciones, como por ejemplo en la realizada con el elemento XCPE2, donde se determina la participación de proteínas tales como TF_{II}F, TF_{II}B y el complejo mediador entre otras por medio de EMSA (Anish y cols. 2009); o también, en el estudio del promotor U6 de la RNAP III, donde se analizó la participación factores como Brf1, Brf2 o Bdp1 (Saxena y cols, 2005) y en el estudio respecto al activador génico VPN, el que facilita el reclutamiento del PIC cuando hay presencia de TF_{II}B (Hori y cols., 2004).

En este trabajo se utilizaron los factores TBP y TF_{II}B, conocidos integrantes de la maquinaria transcripcional de la RNAP II, junto a Rrn7 para estudiar el efecto que provocan en la formación del complejo ya descrito en investigaciones anteriores (Rojas y cols, 2011). Ambas proteínas resultaron ejercer un efecto

potenciador sobre la formación del complejo DNA-proteína, lo que se evidencia al intensificarse la banda observada cuando se incubó Rrn7 en ausencia de otros factores (Figura 8,12 y 14; flecha negra), en una relación casi directamente proporcional a la concentración utilizada. Esta intensificación representa por tanto, el aumento de la unión de Rrn7 con la región promotora, por acción de los factores transcripcionales antes mencionados, lo cual concuerda con los resultados que se habían obtenido en experimentos anteriores donde se demostró la interacción entre Rrn7 y dichos factores (Moreira-Ramos S. y cols., manuscrito enviado a publicación; Rojas y cols., 2013). Además, se refuerza la hipótesis de la participación de cada uno de estos factores como miembros del PIC formado en los promotores que contienen caja HomID, y que tienen como factor principal a Rrn7.

Para confirmar la participación de estos factores en el PIC sobre HomID, se deben llevar a cabo experimentos adicionales, dado que los resultados obtenidos anteriormente por sí solos no son concluyentes. Para descartar la participación de contaminantes provenientes de la purificación, y asegurar que el efecto es por acción de los factores de transcripción, se adicionaron anticuerpos tanto para TBP como para TF_{II}B. Generalmente cuando se utilizan anticuerpos en los experimentos de EMSA se espera que ocurra el llamado súper corrimiento o retardo mayor (Hellman y Fried, 2007; Kristie y Roizman, 1986), en este trabajo se obtuvo una disminución del efecto provocado por cada factor, registrado en los experimentos previos (Figura 12,14 y 16). En este caso el nombre que recibe la técnica, al utilizar anticuerpos de esta manera en EMSA, es “*ensayo de competición por anticuerpo*”, tal como se ha visto en otros experimentos (Rauch y cols., 2005; Hu y cols., 2008; Burgess y cols., 2009).

Lo anterior se puede explicar si se considera que los anticuerpos utilizados son de tipo policlonal, es decir provienen de un grupo de moléculas generadas contra cierto antígeno (contra cada uno de los factores en este caso) y reconocen diferentes epítomos de este, lo que significa que se unen en distintas fracciones de la proteína, incluyendo las regiones de reconocimiento proteína-proteína o también

proteína-DNA. Esto provoca la desestabilización del complejo ternario a nivel del promotor (DNA-Proteína-Proteína) lo que se refleja como una disminución en la intensidad de la banda en la Figura 16. Para realizar el súper corrimiento usualmente se utilizan anticuerpos monoclonales, los que reconocen un solo epítipo, el que debe encontrarse en una región que no afecte las interacciones ni con el DNA ni con otras proteínas del PIC. Al unirse el anticuerpo, a la proteína asociada al DNA o al resto del complejo se produce un retraso en su migración a través del gel.

Además de usar anticuerpos, se estudió el efecto de pre incubar Rrn7 junto a la sonda K5 antes de agregar TBP o TF_{II}B. En estos ensayos se observó un comportamiento similar que al incubar todos los componentes del complejo en forma simultánea, con la excepción de TBP, donde se apreció una disminución y un posterior aumento en la intensidad de la banda (Figura 13 y 15). Sin embargo, debido a que las concentraciones ensayadas no fueron exactamente las mismas en ambos experimentos con TBP, es posible que en las incubaciones diferidas se produjese la misma oscilación en la intensidad vista al incubar Rrn7 junto a TBP, pero que no pudo ser observado debido a que no se trabajó en el rango de concentraciones donde esto ocurre. Por lo tanto falta realizar nuevas mediciones para corroborar esta teoría, y analizar posibles concentraciones límite (definiendo concentraciones límite como la concentración de cada proteína que produce el mayor aumento en la formación del complejo).

Parte de lo que se realizó en este trabajo fue intentar analizar el efecto de TBP y TF_{II}B en la formación del complejo Rrn7-caja HomolD y su posible participación en el PIC. Se determinó, que cada factor por sí solo produce una intensificación en la formación del complejo, lo que representa una conclusión general de dichos experimentos. Sin embargo, al analizar los comportamientos individuales de cada factor transcripcional, se observaron diferencias cruciales respecto a la forma en cómo cada uno potencia la formación del complejo Rrn7-caja HomolD.

En lo que respecta al factor TF_{II}B, cuando se compara el aumento de intensidad producido por este, y considerando la concentración utilizada con los mismos parámetros generados por el factor TBP, se aprecia que se requieren cantidades menores de proteína TF_{II}B para producir la misma intensidad del complejo respecto a TBP (Figura 12 y 14). En otras palabras, el factor TF_{II}B, genera una mayor intensidad complejo Rrn7-caja HomolD que la generada por TBP. Esto también se aprecia al analizar los efectos provocados por los anticuerpos en cada caso, donde el anticuerpo anti TF_{II}B disminuye de manera potente la intensidad de la banda que representa al complejo, volviendo prácticamente al nivel basal producido utilizando Rrn7 en ausencia de otros factores (Figura 16). Mientras que el efecto que produce el anticuerpo anti TBP, es de menor intensidad que el efecto provocado por el anticuerpo anti TF_{II}B, pero no por eso menos relevante, ya que logra disminuir alrededor de la mitad la potenciación producida por TBP en ausencia del anticuerpo (Figura 16). Una de las explicaciones que surgen respecto a lo anterior, es que posiblemente TF_{II}B estaría actuando en el PIC como un factor reclutador de Rrn7 hacia el promotor, para que este a su vez reclute al resto de la maquinaria. TBP se une posteriormente al complejo de pre-iniciación, promoviendo aún más la interacción DNA-proteína previamente formada constituyéndose, por tanto, como un factor potenciador.

TBP también muestra un comportamiento interesante en los EMSA, pues a concentraciones superiores de proteína se aprecia un retardo (Figura 14.A) implicando la formación de un complejo de mayor tamaño. Esto se presenta como un respaldo adicional a lo propuesto anteriormente, donde TBP formaría parte del PIC asociándose con Rrn7 y fortaleciendo su unión al promotor. En lo que respecta a TF_{II}B se aprecia también un retardo (Figura 12.A), sin embargo es muy leve y luego desaparece, manteniéndose solo el aumento de intensidad al utilizar mayor cantidad de proteína, lo cual podría representar y reforzar la idea de dicho factor como agente reclutador, favoreciendo y potenciando luego la unión de Rrn7 a la región promotora. TBP estaría formando parte de manera transitoria del PIC (ya que el complejo ternario formado se presenta como relativamente inestable).

Los resultados de este trabajo no son concluyentes respecto a estas particulares interacciones y son necesarios experimentos adicionales para confirmarlas.

Los experimentos de EMSA entregaron resultados relevantes respecto al efecto de TF_{II}B y TBP sobre el complejo formado por Rrn7 y la caja HomolD, y dan indicios en cuanto a cómo estos podrían formar parte del PIC, sin embargo estos solo representan un contexto *in vitro*. En consecuencia no descartan que se produzcan interacciones y comportamientos generados de manera artificial, a pesar de utilizar los tampones adecuados, representativos del medio intracelular. Por lo tanto para estudiar el contexto más cercano a la realidad, se deben hacer experimentos *in vivo*, y así estudiar con mayor representatividad las interacciones que ocurren al interior de la célula.

La inmunoprecipitación de cromatina o ChIP es una técnica utilizada para el estudio de las interacciones DNA-proteína al interior del núcleo. Esta técnica se ha utilizado en otras investigaciones, como por ejemplo en el estudio de la dinámica del PIC en promotores de la RNAP II (Grimaldi y cols., 2014) o en el descubrimiento de Brp como GTF de la RNAP I en plantas (Imamura y cols., 2008). Las inmunoprecipitaciones de cromatina realizadas en este trabajo permitieron corroborar *in vivo* los resultados anteriormente obtenidos en los EMSA, con los ensayos de ChIP se logró la precipitación y posterior amplificación de la caja HomolD contenida en la región promotora del gen *rpK5* cuando se utilizó el anticuerpo indicado para cada factor transcripcional, lo que no ocurrió con los controles negativos sin anticuerpos (Figura 19). Además se observó la amplificación respectiva para la caja TATA (contenida en la región promotora del gen *nmt1*) como control positivo (Figura 18). Esto refleja, por tanto, la presencia de dichos factores como miembros del PIC, que se conforma sobre la caja HomolD. Si bien la inmunoprecipitación de cromatina determina solamente la presencia o ausencia de determinados factores transcripcionales en las regiones promotoras, el encontrar tanto a TBP como a TF_{II}B en el entorno de la caja HomolD, da un indicio de la cercanía suficiente para establecer un contacto entre estas, y también, con el factor Rrn7, sugiriendo a todos estos como miembros del PIC.

La holgada diferencia entre las inmunoprecipitaciones y sus respectivos controles negativos, es estadísticamente significativa, y confirma la presencia de cada factor en el entorno del promotor, formando parte en la generación del PIC (Figura 20). Por otro lado, se aprecia una leve diferencia entre la ocupación relativa del promotor del gen *rpK5* en cada uno de los factores, la cual es un poco mayor en TF_{II}B, sin embargo esta diferencia no es estadísticamente significativa y por lo tanto no se puede concluir nada al respecto. Algo similar ocurre con el promotor TATA donde se aprecia mayor ocupación por parte de TBP respecto a la ocupación de TF_{II}B, pero tampoco es una diferencia significativa.

Cabe mencionar que no resulta extraño detectar la presencia de TBP y de TF_{II}B a nivel de la región promotora del gen *rpK5*, debido a los antecedentes de la interacción entre cada uno y la proteína Rrn7 (Moreira-Ramos S. y cols., manuscrito enviado a publicación). Además, no debe olvidarse que TBP ha sido identificada en los promotores de las tres clases de RNAP nucleares en organismos eucariontes (Hernández N., 1993), y por lo tanto no es raro encontrarla también presente en promotores que contengan la caja Homold. En el caso de TF_{II}B, si bien no está presente en todos los promotores de las distintas RNAP, participa en otros promotores tipo TATA-Less (Deng y Roberts, 2006). También en promotores de la RNAP III existe una proteína análoga y perteneciente a la familia de TF_{II}B, llamada Brf1 (Colbert y Hahn, 1992), como también en promotores de la RNAP I la misma Rrn7 sería la proteína análoga a TF_{II}B (Knutson y Hahn, 2013).

Cabe recordar que el factor TBP forma parte de un gran complejo de la maquinaria de la RNAP II llamado TF_{II}D. Parte de los experimentos realizados en este trabajo buscan no solo relacionar a TBP con el PIC formado en la caja Homold, sino también definir la posible participación de TF_{II}D como complejo, ya sea con todas o algunas de las proteínas que lo constituyen. Existen antecedentes de la interacción entre algunos de estos factores tales como TBP, Taf1 o Taf5 con Rrn7 (Rojas y cols., 2013), por lo tanto los datos obtenidos respecto a TBP sirven para confirmar a TF_{II}D como miembro del PIC sobre la caja Homold, algo que se

había logrado vislumbrar ya en investigaciones previas realizadas en el laboratorio tal como se aprecia en la Figura 21.

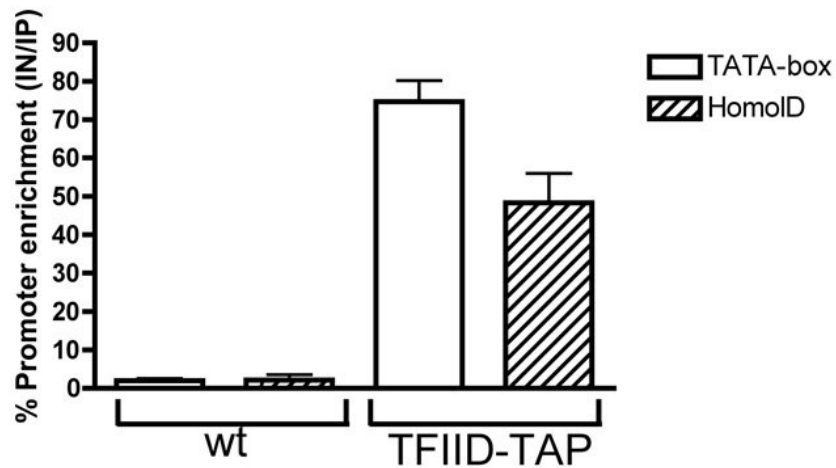


Figura21. *Inmunoprecipitación de cromatina utilizando una cepa modificada de levadura Taf3-TAP y una cepa silvestre como control negativo. Ambas cepas fueron precipitadas con IgG-sefarosa y su DNA amplificado por PCR convencional utilizando partidores para las cajas HomolD y TATA. Los datos se encuentran normalizados contra los datos obtenidos del DNA total extraído o "input".*

En la Figura 21 se aprecia la presencia del complejo TFIID en el contexto de la región promotora del gen *rpK5*, reafirmando la presencia de TBP en dicha región promotora como miembro del PIC reclutado en HomolD. Además, la Figura 21 sugiere que el complejo completo TFIID podría ser parte del PIC, sin embargo es necesario realizar experimentos adicionales con otros TAF(II)s para confirmar este modelo.

Por tanto tras los resultados presentados en este trabajo, sumado a los resultados obtenidos previamente en el laboratorio, se propone un modelo teórico representativo del PIC que se forma sobre la caja HomolD.

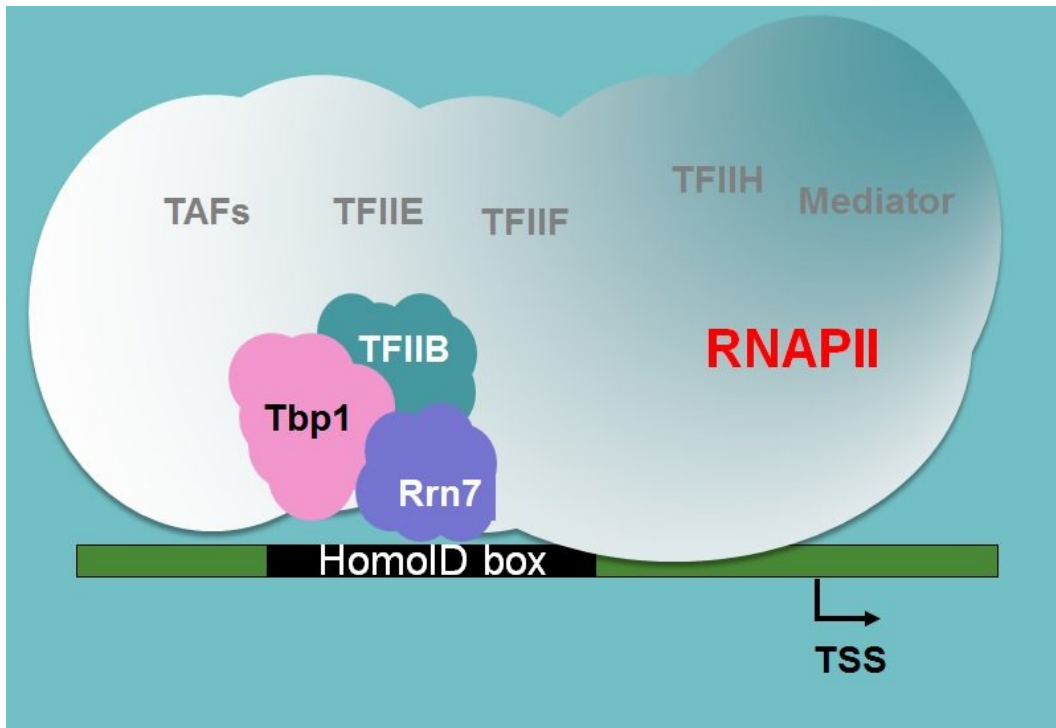


Figura22. **Modelo propuesto para el PIC sobre la caja HomolD.** Se presenta a Rrn7 como el factor que se une a la caja HomolD, interaccionando directamente con los factores TF_{II}B y TBP.

El modelo propuesto en la Figura 22 muestra la participación de Rrn7 como el factor que une la caja HomolD, siendo crucial en la formación del PIC en promotores que contengan dicho elemento. Por otro lado los factores TF_{II}B y TBP se asociarían directamente con Rrn7, formando parte del complejo, posiblemente para ayudar luego al reclutamiento de la RNAP II. Adicionalmente se muestran otros factores con los cuales se ha demostrado interacción con Rrn7 y/o participación en la transcripción por acción de la caja HomolD. Sin embargo hasta la fecha, se desconocen su participación y función en el PIC. En el modelo propuesto en la Figura 22 se excluye la secuencialidad de formación del PIC, pues esto aún se desconoce y por tanto se requieren experimentos adicionales para su determinación, tal como se logró con la maquinaria relacionada con la caja TATA (Buratowski y cols., 1989).

Los resultados obtenidos dan pie para un nuevo rumbo en la investigación respecto a la caja HomolD y al PIC que promueve la transcripción en los genes que la contengan. Si bien el descubrimiento de Rrn7 como un miembro crucial del

complejo marcó el inicio en la investigación, los descubrimientos respecto al resto de los participantes permiten mantener vigente la investigación para comprender a cabalidad el proceso de transcripción en promotores que contienen a HomID. Para cumplir este objetivo se necesitan experimentos adicionales que complementen los datos obtenidos en este trabajo, principalmente estudiar si TF_{II}B tiene algún grado de unión al DNA en las cercanías de la caja HomID. Antecedentes de que esta proteína una DNA han sido demostrados antes (Deng y Roberts, 2006). También podría ocurrir que exista interacción entre TF_{II}B con Rrn7 antes de que esta se una al promotor, potenciando la unión basal a la caja HomID.

Por otro lado, experimentos previos demuestran que no solo participa TBP, sino que todo el complejo TF_{II}D podría ser el que forma parte del PIC. Sin embargo otros experimentos son necesarios para obtener más datos respecto a lo anterior, como por ejemplo EMSA utilizando el complejo TF_{II}D completo o algunos TAF(II)s, como también inmunoprecipitaciones de cromatina utilizando qPCR (PCR en tiempo real) para la amplificación del DNA precipitado, lo que podría respaldar y corroborar aún más los resultados obtenidos en este trabajo, utilizando anticuerpos tanto contra los factores ya analizados como contra nuevos como por ejemplo algunos TAF(II)s de los que se tiene antecedentes. Queda abierta la investigación para entender el funcionamiento de este tipo de promotores que contienen la caja HomID, y de la maquinaria transcripcional que en estos opera. Lineamientos futuros implican por tanto el descubrimiento de nuevos factores participantes, además de entender los roles específicos que cumplen tanto los factores identificados como los a identificar en el PIC, como también el estudio de la secuencialidad de formación de este complejo. No se debe olvidar que la interacción entre TBP y TF_{II}B ha sido demostrada (Buratowski y cols., 2002), y por lo tanto, el efecto en conjunto de estas proteínas sobre la formación del complejo entre Rrn7 y la caja HomID debe ser también estudiado.

Por ahora se visualiza que la investigación de nuevos promotores TATA-less avanza y que estos tienen una mayor importancia respecto a lo que se

pensaba años atrás, no solo por el gran número de promotores diferentes descubiertos, sino también por su ubiquidad en los diferentes genes eucariontes. Lo anterior implica que estos serían los verdaderos grandes reguladores de la expresión génica y, por tanto, el conocimiento y entendimiento de estos es crucial para poder regular la expresión génica. Aún más, esta capacidad de regulación es de mucha utilidad en un sin número de campos, como por ejemplo el desarrollo de nuevas técnicas biotecnológicas en agricultura o en la minería, así también para el desarrollo de nuevas tecnologías biomédicas terapéuticas o simplemente el entendimiento de enfermedades prevalentes hoy en día. Este gran desafío podría dar respuesta al sin número de preguntas que aún quedan por contestar.

VII. Conclusiones

- En este trabajo se logró expresar y purificar parcialmente la proteína recombinante Rrn7, la cual se obtuvo en buenas condiciones para su uso en análisis posteriores.
- Se logró determinar dos nuevos miembros del complejo de pre-iniciación PIC que se forma en los promotores que contienen la caja HomolD: TF_{II}B y TBP. Ambos miembros son conocidos constituyentes de la maquinaria transcripcional basal de la RNAP II. Estos factores actuarían potenciando la interacción DNA-proteína de Rrn7 con el promotor, lo que fue demostrado en experimentos tanto *in vitro* como *in vivo*.
- En este estudio se obtuvieron indicios del rol que cumplirían cada uno de estos factores en el PIC. Por una parte TF_{II}B podría actuar como factor reclutador de la proteína Rrn7 hacia el promotor iniciando la formación del complejo, mientras que TBP se uniría a Rrn7 ayudando a potenciar su unión al DNA.

VIII. Bibliografía

Anish, R, Hossain, MB., Jacobson, RH. y 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.

Baumann, M, Pontiller, J. y Ernst, W. (2010) "Structure and basal transcription complex of RNA polymerase II core promoters in the mammalian genome: an overview". *Mol Biotechnol.* **45**(3):241-7.

Buratowski S., Hahn, S., Guarente, L. y Sharp, PA. (1989) "Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II". *Cell.* **56**(4):549-61.

Buratowski RM., Downs, J. y Buratowski, S. (2002). "Interdependent interactions between TFIIB, TATA binding protein, and DNA". *Mol Cell Biol.* **22**(24):8735-43.

Burgess, ST., Shen, C., Ferguson, LA., O'Neill, GT., Docherty, K., Hunter, N. y Goldmann, W. (2009). "Identification of adjacent binding sites for the YY1 and E4BP4 transcription factors in the ovine PrP (Prion) gene promoter". *J Biol Chem.* **284**(11):6716-24.

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

Cabrejos, M. E., Allende, C. C. y Maldonado, E. (2004). "Effects of phosphorylation by protein kinase CK2 on the human basal components of the RNA polymerase II transcription machinery." *J Cell Biochem* **93**(1): 2-10.

Choi, W. S., Yan, M., Nusinow, D. y Gralla, J. (2002). "In vitro transcription and start site selection in *Schizosaccharomyces pombe*." *J Mol Biol* **319**(5): 1005-1013.

Colbert, T. y Hahn, S. (1992). "A yeast TFIIB-related factor involved in RNA polymerase II Transcription". *Genes Dev.* **6**(10):1940-9.

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, KJ., 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, CD., Lehmann, E., Leike, K., Sydow, JF. y Vannini, A. (2008). "Structure of eukaryotic RNA polymerases." *Annu Rev Biophys* **37**: 337-352.

Deng, W. y Roberts, SG. (2006). "Core promoter elements recognized by transcription factor IIB". *Biochem Soc Trans.* **34**(Pt 6):1051-3.

Deng, W. y Roberts, SG. (2007). "TFIIB and the regulation of transcription by RNA polymerase II". *Chromosoma.* **116**(5):417-29

Dikstein, R. (2011). "The unexpected traits associated with core promoter elements." *Transcription* **2**(5): 201-206.

Egel, R. (2004). "The molecular biology of *Schizosaccharomyces pombe* genetics, genomics and beyond". (1° Ed.) Alemania: Springer Verlagl. Cap.22.

Gatermann, K. B., Teletski, C., Gross, T. y Käufer, NF. (1989). "A ribosomal protein gene family from *Schizosaccharomyces pombe* consisting of three active members." *Curr Genet* **16**(5-6): 361-367.

Glick, BS. (1996). "Cell biology: alternatives to baker's yeast." *Curr Biol* **6**(12): 1570-1572.

Grimaldi, Y., Ferrari, P. y Strubin, M. (2014). "Independent RNA polymerase II preinitiation complex dynamics and nucleosome turnover at promoter sites *in vivo*". *Genome Res.* **24**(1):117-24.

Gross, T. y Käufer, NF. (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):3319-22.

Haag, J. R. y Pikaard, C. S. (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.

Hahn, S. (2004). "Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery." *Nat Struct Mol Biol* **11**(5): 394-403.

Heix, J., Vente, A., Voit, R., Budde, A., Michaelidis, TM. y Grummt, I. (1998). "Mitotic silencing of human rRNA synthesis: inactivation of the promoter selectivity factor SL1 by cdc2/cyclin B-mediated phosphorylation." *EMBO J* **17**(24): 7373-7381.

Hellman, LM. y Fried, MG. (2007). "Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions". *Nat Protoc.* **2**(8):1849-61.

Hernandez, N. (1993). "TBP, a universal eukaryotic transcription factor?" *Genes Dev* **7**(7B): 1291-1308.

Hori, RT., Xu, S., Hu, X. y Pyo, S. (2004). "TFIIB-facilitated recruitment of preinitiation complexes by a TAF independent mechanism". *Nucleic Acids Res.* **32**(13):3856-63.

Hu, Y., Sun, M., Nadiminty, N., Lou, W., Pinder, E. y Gao, AC. (2008). "Transcriptional regulation of human RANK ligand gene expression by E2F1". *Biochem Biophys Res Commun.* **370**(3):440-4.

Hurwitz, J., Furth, J. J., Anders, M., Ortiz, PJ. y August, JT. (1961). "The enzymatic incorporation of ribonucleotides into RNA and the role of DNA." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **26**: 91-100.

Imamura, S., Hanaoka, M. y Tanaka, K. (2008). "The plant-specific TFIIB-related protein, pBrp, is a general transcription factor for RNA polymerase I". *EMBO J.* **27**(17):2317-27.

Juven-Gershon, T., Hsu, JY., Theisen, JW. y Kadonaga, JT. (2008). "The RNA polymerase II core promoter - the gateway to transcription." *Curr Opin Cell Biol* **20**(3): 253-259.

Keys, DA., Vu, L., Steffan, JS., Dodd, JA., Yamamoto, RT., Nogi, Y. 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 *Schizosaccharomyces cerevisiae*." *Genes Dev* **8**(19): 2349-2362.

Knutson, BA. y Hahn, S. (2013). "TFIIB-related factors in RNA polymerase I transcription". *Biochim Biophys Acta*. **1829**(3-4):265-73.

Kuhlman, TC., Cho, H., Reinberg, D. y Hernandez N. (1999). "The general transcription factors IIA, IIB, IIF, and IIE are required for RNA polymerase II transcription from the human U1 small nuclear RNA promoter." *Mol Cell Biol* **19**(3): 2130-2141.

Krishna, SS., Majumdar, I. y Grishin, N. V. (2003). "Structural classification of zinc fingers: survey and summary." *Nucleic Acids Res* **31**(2): 532-550.

Krishnamurthy, S. y Hampsey, M. (2009). "Eukaryotic transcription initiation." *Curr Biol* **19**(4): R153-156.

Kristie, TM. y Roizman, B. (1986). "Alpha 4, the major regulatory protein of herpes simplex virus type 1, is stably and specifically associated with promoter-regulatory domains of alpha genes and of selected other viral genes". *Proc Natl Acad Sci USA*. **83**(10):3218-22.

Laferté, A., Favry, E., Sentenac, A., Riva, M., Carles, C. y Chédin, S. (2006). "The transcriptional activity of RNA polymerase I is a key determinant for the level of all ribosome components." *Genes Dev* **20**(15): 2030-2040.

Li, X., Zhong, S. y Wong, WH. (2005). "Reliable prediction of transcription factor binding sites by phylogenetic verification." *Proc Natl Acad Sci USA* **102**(47): 16945-16950.

Lin, CW., Moorefield, B., Payne, J., Aprikian, P., Mitomo, K. y Reeder, RH. (1996). "A novel 66-kilodalton protein complexes with Rrn6, Rrn7, and TATA-binding protein to promote polymerase I transcription initiation in *Schizosaccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* **16**(11): 6436-6443.

Maston, GA., Evans, SK. y Green, MR. (2006). "Transcriptional regulatory elements in the human genome." *Annu Rev Genomics Hum Genet* **7**: 29-59.

Meier, A. y Thoma, F. (2005). "RNA polymerase I transcription factors in active yeast rRNA gene promoters enhance UV damage formation and inhibit repair". *Mol Cell Biol.* **25**(5):1586-95.

Meskauskas, A., Russ, JR. y Dinman, JD. (2008). "Structure/function analysis of yeast ribosomal protein L2". *Nucleic Acids Res.* **36**(6):1826-35

Miller, G., Panov, KI., Friedrich, JK., Trinkle-Mulcahy, L., Lamond, AI. y Zomerdijk, JC. (2001). "hRRN3 is essential in the SL1-mediated recruitment of RNA Polymerase I to rRNA gene promoters". *EMBO J.* **20**(6):1373-82

Moorefield, B., Greene, EA. y Reeder, RH. (2000). "RNA polymerase I transcription factor Rrn3 is functionally conserved between yeast and human." *Proc Natl Acad Sci USA* **97**(9): 4724-4729.

Nakshatri, H., Nakshatri, P. y Currie, RA. (1995). "Interaction of Oct-1 with TFIIB. Implications for a novel response elicited through the proximal octamer site of the lipoprotein lipase promoter". *J Biol Chem.* **270**(33):19613-23

Nikolov DB y Burley SK. (1997). "RNA polymerase II transcription initiation: a structural view". *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**(1):15-22

Nikolov, DB., Chen, H., Halay, ED., Hoffman, A., Roeder, RG. y Burley, SK. (1996). "Crystal structure of a human TATA box-binding protein/TATA element complex." *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**(10):4862-7.

Panova, TB., Panov, KI., Russell, J. y Zomerdijk, JC. (2006). "Casein kinase 2 associates with initiation-competent RNA polymerase I and has multiple roles in ribosomal DNA transcription." *Mol Cell Biol* **26**(16): 5957-5968.

Paule, MR. y White, RJ. (2000). "Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III." *Nucleic Acids Res* **28**(6): 1283-1298.

Rauch, T., Zhong, X., Pfeifer, GP. y Xu, X. (2005). "53BP1 is a positive regulator of the BRCA1 promoter". *Cell Cycle.* **4**(8):1078-83.

Riethoven, JJ. (2010). "Regulatory regions in DNA: promoters, enhancers, silencers, and insulators." *Methods Mol Biol* **674**: 33-42.

Rojas, DA., Moreira-Ramos, S., Zock-Emmenthal, S., Urbina, F., Contreras-Levicoy, J., Käufer, NF. y 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.

Rojas, DA., Moreira-Ramos, S., Montes, M., Urbina, F. y Maldonado, E. (2013). "A Preinitiation complex over HomolD box core promoters shows an interaction between Rrn7 and members of RNAPII machinery in *Schizosaccharomyces pombe*". Poster presentado en la quinta reunión EMBO, Ámsterdam, Holanda.

Saxena, A., Ma, B., Schramm, L. y Hernandez, N. (2005). "Structure-function analysis of the human TFIIB-related factor II protein reveals an essential role for the C-terminal domain in RNA polymerase III transcription". *Mol Cell Biol.* **25**(21):9406-18.

Schramm, L. y Hernandez, N. (2002). "Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters". *Genes Dev.* **16**(20):2593-620

Smale, ST. y Kadonaga, JT. (2003). "The RNA polymerase II core promoter". *Annu Rev Biochem.* **72**:449-79.

Stepanchick A, Zhi H, Cavanaugh AH, Rothblum K, Schneider DA y Rothblum LI. (2013). "DNA binding by the ribosomal DNA transcription factor rrn3 is essential for ribosomal DNA transcription". *J Biol Chem.* **288**(13):9135-44

Struhl, K. (1989). "Molecular mechanisms of transcriptional regulation in yeast." *Annu Rev Biochem* **58**: 1051-1077.

Tubon, TC., Tansey, WP. y Herr, W. (2004). "A nonconserved surface of the TFIIB zinc ribbon domain plays a direct role in RNA polymerase II recruitment." *Mol Cell Biol* **24**(7): 2863-2874.

Vannini, A. y Cramer, P. (2012). "Conservation between the RNA polymerase I, II, and III transcription initiation machineries." *Mol Cell* **45**(4): 439-446.

Werner, F. y Grohmann, D. (2011). "Evolution of multisubunit RNA polymerases in the three domains of life." *Nat Rev Microbiol* **9**(2): 85-98.

White, RJ. (2005). "RNA polymerases I and III, growth control and cancer." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(1): 69-78.

Witt, I., Kwart, M., Gross, T. y 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., Straub, N., Käufer, NF. y 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.

Yang, C., Bolotin, E., Jiang, T., Sladek, FM. y Martinez, E. (2007). "Prevalence of the initiator over the TATA box in human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human TATA-less core promoters." *Gene* **389**(1): 52-65.

IX. ANEXO

1. Tablas

Tabla 1. Cuantificación Rrn7 recombinante purificada y dializada para EMSA

Nombre	Factor Dil.	A ₅₉₅	Conc x Dil (µg/mL)	Promedio (µg/mL)	Dev Est	CV (%)
Rrn7	20	0,567	218,765	230,492	16,584	7,2
Rrn7	20	0,582	242,218			

Tabla 2. Cuantificación del DNA eluido tras inmunoprecipitación de cromatina.

	Control (-) 1	Control (-) 2	Control (-) 3	Input	TBP 1	TBP 2	TBP 3	TFIIB 1	TFIIB 2	TFIIB 3
A 260	0,01	0,008	0,011	3,429	0,061	0,019	0,011	0,154	0,063	0,01
A 280	0,007	0,007	0,009	1,537	0,029	0,014	0,009	0,07	0,035	0,007
260/280	1,511	1,271	1,177	2,23	2,073	1,363	1,177	2,186	1,787	1,519
ng/µL	10,477	8,391	10,555	3429,13	61,151	18,651	10,555	153,894	63,26	10,406

Tabla 3. Análisis estadístico ANOVA 2 vías

Fuente de la variación	% de variación total	Valor P	Resumen Valor P	¿Significativo?
Factor de interacción	4,414	0,2592	ns	No
Factor de Filas	76,98	< 0,0001	****	Si
Factor de columnas	1,117	0,3985	ns	No