

Imágenes de la portada:

Baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) 3 ZEISS AURIGA 60 FIB-SEM Preparation: High pressure frozen, freeze fractured SEM: frozen hydrated. Prof. Dr. Gerhard Wanner, LMU Munich, Faculty of Biology. Publicada en Flickr bajo una licencia Creative Commons (CC BY-NC-ND 2.0). <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/deed.es>

Nucleus. All media © 2001-2006 Samir S. Patel.
<https://sites.google.com/site/sspatel/nuclearporecomplex>

Papel de Sus1 y proteínas relacionadas en el proceso de expresión génica por Encarnación García Oliver se encuentra bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 3.0 Unported. Para ver una copia de esta licencia, visita <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>





Programa de Doctorado en Biotecnología
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Papel de Sus1 y proteínas relacionadas en el proceso de expresión génica

Tesis Doctoral
Encarna García Oliver
Directora: Susana Rodríguez Navarro

Valencia 2013

Susana Rodríguez Navarro, Doctora en Ciencias Biológicas e Investigadora del Centro de Investigación Príncipe Felipe,

INFORMA: que **Encarna García Oliver**, licenciada en Ciencias Biológicas por la Universitat de València, ha realizado bajo su dirección el trabajo cuyo título “Papel de Sus1 y proteínas relacionadas en el proceso de expresión génica” aquí se presenta. Revisado el presente trabajo, expresa su conformidad para la presentación del mismo por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente, para optar al grado de Doctora por la Universitat de València.

En Burjassot, Marzo 2013

Directora

Fdo: Dra. Susana Rodríguez Navarro

Para hacer las cosas bien es necesario:
primero, el amor, segundo, la técnica

Antoni Gaudí

Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de una forma u otra han contribuido a la realización de esta tesis:

A mi directora, Dr. Susana Rodríguez Navarro, porque sin la oportunidad que me brindó hace cuatro años nada de esto hubiera sido posible.

Al Dr. Frank Holstege y a Tineke Lenstra por realizar el análisis de los perfiles transcripcionales. Al Dr. Martin Kupiec por la realización de los *Southern blots*. Al Dr. Kobayashi por la cesión del anticuerpo α -Sem1. A la Dra. Luz Valero por realizar los análisis de espectrometría de masas. Al Dr. Pedro San Segundo por la realización de las imágenes de microscopía de fluorescencia. A la Dra. Amparo Galán y a Varnia García por las aportaciones críticas al manuscrito.

A todos los miembros del lab con los he compartido bancada, conocimiento, risas e ilusiones. Especialmente a Eloísa, Amparo, Ali, Varinia, Paula, Pau y Ana. Gracias, sin vosotras nada hubiera sido lo mismo, habéis sido un equipazo de lujo. A Varinia, por haber sido una gran compañera de laboratorio, por los favores, por el apoyo, por la ciencia, por su paciencia y por su amistad. En general gracias a todo el equipo por hacer que este largo camino de tesis haya sido un auténtico placer.

A mis amigas, especialmente a Elenita, Marta, Silvia, Luis y Ana, por haber crecido juntas, por vuestros puntos de vista tan distintos y enriquecedores, por vuestro apoyo y cercanía y por compartir conmigo la alegría de todas las cosas conseguidas. En general gracias a todos mis amigos que siempre han estado ahí.

Por supuesto, gracias a mi familia. Especialmente a mis padres, mi hermana y mi abuela. Gracias a las dos Encarnas, Lorenzo y M^a Ángeles. Gracias por ayudarme y apoyarme en todas mis decisiones, por animarme, por divertirme y por toda la libertad que me habéis permitido siempre. Os agradezco vuestro esfuerzo en intentar entender todo lo que hago. Sin vosotros nada de esto hubiera sido posible. Gracias.

Y, por último, aunque no menos importante, gracias a Ana Llopis. En estos cuatro años de tesis has sido mi punto de apoyo y mi compañera. Gracias por contagiarme todo tu amor por la ciencia y por haberme acercado a ella con tanta paciencia y entusiasmo. Gracias por haberme enseñado tanto. Gracias por tus millones de besos y abrazos. Has hecho que este camino fuera mucho más fácil y sobretodo muy muy divertido, simplemente gracias por estar siempre a mi lado.

Índice

Abreviaturas	17
INTRODUCCIÓN	23
Dinámica y regulación del genoma	25
Organización de la cromatina: las histonas y su regulación	28
Modificaciones postraduccionales de las histonas	33
Estructura y función de los telómeros	46
La expresión génica: de la cromatina al citoplasma	54
Inicio de la transcripción	55
El complejo SAGA: estructura y función	58
La transcripción de los genes <i>GAL1</i> y <i>ARG1</i>	63
Elongación transcripcional de los mRNAs	68
Exportación de los mRNAs	70
El complejo TREX-2: estructura y función	74
Acoplamiento entre maquinarias de la expresión génica	79
Papel de la desubcuiitación de H2B en el metabolismo de los mRNAs	79
La coordinación entre los complejos SAGA y TREX-2, la proteína Sus1	84
La coordinación SAGA-TREX-2 en el contexto celular	88
OBJETIVOS	101
MATERIALES	105
Anticuerpos	107
Kits comerciales	108
Oligonucleótidos	109
Plásmidos	110
Cepas	112
MÉTODOS	121
Medios de cultivo y ensayos de crecimiento	123
Métodos de manipulación de microorganismos	124
Transformación de levadura	124
Deleción de genes y etiquetado de proteínas	125
Métodos de manipulación y análisis de ácidos nucleicos	127
Aislamiento de DNA plasmídico de <i>Escherichia coli</i>	127

Aislamiento de DNA total genómico de levadura	127
Aislamiento de RNA total de levadura	128
Reacción en cadena de la polimerasa	130
Transcripción reversa o síntesis de cDNA	130
PCR cuantitativa	132
<i>Southern blot</i>	133
Separación de ácidos nucleicos por electroforesis	133
Electroforesis de DNA en geles de agarosa	133
Electroforesis de RNA en geles de agarosa en tampón TAE	134
Métodos de manipulación y análisis de proteínas	134
Obtención de extractos proteicos	134
Separación electroforética de proteínas	136
Tinción con Coomassie coloidal	137
Transferencia e inmunotinción	137
Cromatografía por filtración en gel	138
Purificación de proteínas. La técnica TAP	139
Identificación de proteínas por espectrometría de masas y aproximaciones proteicas	141
Inmunoprecipitación de proteínas	142
Inmunoprecipitación de cromatina y doble Inmunoprecipitación de cromatina	143
Ensayos de actividades enzimáticas	145
Ensayo de la actividad β -galactosidasa	145
Ensayo de la actividad desubicitinasa	146
Análisis de imagen	147
Técnicas microscópicas	148
Localización <i>in vivo</i> de proteínas	148
Hibridación <i>in situ</i> de RNAs poliadenilados	148
RESULTADOS	151
Sus1 interacciona genéticamente con proteínas implicadas en diferentes procesos	153
Sus1 interacciona genética y físicamente con la chaperona de histonas Asf1	155
Asf1 exacerba el defecto en la exportación de los mRNAs que presenta <i>sus1</i> Δ	158
La asociación de Sus1 con TREX-2 depende de Nup60	159
La localización intranuclear de Sus1 depende de Nup60	162

Nup60 altera las proporciones normales de transcritos de Sus1 procesados y sin procesar	164
Sus1 interacciona genética y físicamente con la maquinaria de regulación de telómeros	169
Sus1 es necesario para el mantenimiento óptimo de la longitud de los telómeros	178
La subunidad Sem1 interacciona físicamente con Sus1	182
La subunidad de TREX-2, Sem1, es necesaria para la interacción entre sus componentes y para la estabilidad del complejo	185
La localización intranuclear de Sus1 no depende de Sem1	191
Los factores Sem1 y Sus1 están relacionados funcionalmente	192
Sem1 interacciona físicamente con SAGA, influyendo en la asociación de Sus1 con SAGA y SLIK	199
Sem1 participa en el proceso de la activación de la transcripción	210
Sem1 es necesario para la inducción de los genes regulados por SAGA, ARG1 y GAL1	211
Sem1 es esencial para la integridad de SAGA en el promotor de GAL1	216
Sem1 participa en la actividad desubicitinasa dependiente de SAGA	222
TREX-2 promueve la actividad desubicitinasa dependiente de SAGA	230
DISCUSIÓN	235
Asf1 interacciona física y genéticamente con Sus1	237
Nup60 es necesario para la asociación de Sus1 con TREX-2 y para su expresión	240
Sus1 participa junto con la maquinaria de regulación de telómeros en el control de los mismos	243
Sem1 interacciona físicamente con Sus1 y es necesaria para la estabilidad y función de TREX-2	246
Sem1 participa durante la transcripción génica a través de Sus1 y SAGA	249
CONCLUSIONES	257
BIBLIOGRAFÍA	261

Abreviaturas

APEX	<i>absolute protein expression</i> (expresión absoluta de proteínas)
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (seroalbúmina bovina)
cDNA	<i>complementary DNA</i> (DNA complementario)
C-terminal	carboxilo terminal
ChDIP	<i>chromatin double immunoprecipitation</i> (doble inmunoprecipitación de cromatina)
ChIP	<i>chromatin immunoprecipitation</i> (inmunoprecipitación de cromatina)
COMPASS	<i>complex proteins associated with Set1</i> (proteínas de complejo asociadas a Set1)
CTD	<i>Carboxyl-terminal domain</i> (dominio carboxilo terminal)
Cy3	fluoróforo de cianina 3
DAPI	diclorhidrato de 4 ,6-diamidino-2-fenilindol
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
dNTPs	<i>deoxyribonucleotide triphosphate</i> (desoxinucleótidos trifosfato)
DRYGIN	<i>data repository of yeast genetic interactions</i> (repositorio de interacciones genéticas de levadura)
DTT	1,4-ditiotreitol

DUB	<i>deubiquitylation module</i> (módulo de desubicuitinación)
EDTA	<i>etilendiaminotetraacetic acid</i> (ácido etilenodiaminotetraacético)
ES	error estándar
FACT	<i>facilitates chromatin transcription</i> (facilitador de la transcripción de la cromatina)
G+C	contenido en guaninas y citosinas
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (proteína verde fluorescente)
GTFs	<i>general transcription factors</i> (factores generales de la transcripción)
HA	hemaglutinina
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico
HAT	<i>histone acetyltransferases</i> (histona acetiltransferasa)
HAT/Core	<i>histone acetyltransferase catalytic core</i> (histona acetiltransferasa/sitio catalítico)
HDAC	<i>histone deacetylases</i> (histona desacetilasa)
HMT	<i>histone methyltransferases</i> (histona metiltransferasa)
IgG	inmunoglobulina G
IP	inmunoprecipitado

iTRAQ	<i>isobaric tags for relative and absolute quantification</i> (etiquetas isobáricas para cuantificación relative y absoluta)
LB	medio <i>Luria-Bertani</i>
LC	<i>liquid chromatography</i> (cromatografía líquida)
Kb	kilobase
KDa	kilodalton
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico mensajero)
mRNP	<i>messenger ribonucleoprotein particle</i> (ácido ribonucleico mensajero)
MALDI-TOF	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight</i> (desorción/ionización por láser asistida por matriz)
MS	<i>mass spectrometry</i> (espectrometría de masas)
NMD	<i>nonsense-mediated mRNA decay</i> (decaimiento del mRNA mediado por codones sin sentido)
NPC	<i>nuclear pore complex</i> (complejo de poro nuclear)
NP-40	nonidet P40
N-terminal	amino terminal
OD₆₀₀	<i>optical density 600nm</i> (densidad óptica a 600nm)
Oligo(dT)	oligonucleótidos deoxitimina
ONPG	o-nitrofenil-β-D-galactopiranidoso
ORF	<i>open reading frame</i> (pauta abierta de lectura)

PAF	<i>RNA Pol II-associated factor complex</i> (complejo asociado a la RNA Pol II)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
PEG	polietilenglicol
PIC	<i>pre-initiation complex</i> (complejo de preinicio)
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
poli(A)+	poliadenilado
p/v	peso/volumen
qRT-PCR	<i>quantitative reverse transcription PCR</i> (PCR cuantitativa de retrotranscripción)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
RNP	<i>ribonucleoprotein particle</i> (partícula ribonucleoproteica)
rpm	revoluciones por minuto
RNA Pol II	RNA polimerasa II
RSC	<i>chromatin structure remodeling complex</i> (complejo remodelador de la cromatina)
SAGA	<i>Spt/Ada/Gcn5 acetyltransferase complex</i> (complejo acetiltransferasa Spt/Ada/Gcn5)
SA_SPT	<i>SAGA-associated SuPpressors of Ty</i>
SA_TAF	<i>SAGA-associated TBP-associated factors</i>
SC	<i>synthetic complete medium</i> (medio sintético completo)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (dodecilsulfato sódico)

SDS-PAGE	<i>SDS polyacrylamide gel electrophoresis</i> (electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS)
SGD	<i>saccharomyces genome database</i> (base de datos del genoma de <i>Saccharomyces</i>)
SIR	<i>silent information regulator</i> (regulador del silenciamiento)
SLIK	<i>SAGA-like</i> (complejo similar a SAGA)
SM	sulfometurón metilo
SUMO	<i>small ubiquitin-related modifier</i> (modificación pequeña similar a la ubiquitina)
TAE	tris-acetato sódico EDTA
TAFs	<i>TBP-associated factors</i> (factores asociados a la proteína TBP)
TAP	<i>tandem affinity purification</i> (purificación por afinidad en tandem)
TBE	tris-borato EDTA
TBP	<i>TATA-binding protein</i> (proteína de unión a TATA)
TCA	ácido tricloroacético
TEMED	N, N, N', N', tetrametiletileno-diamino
TERRA	<i>telomeric repeat-containing RNA</i> (RNA constituido por repeticiones teloméricas)
TF	<i>transcriptional factor</i> (factor transcripcional)
Tris	tris (hidroximetil) aminometano

TREX-2	<i>transcription export complex 2</i> (complejo transcripción-exportación 2)
UAS	<i>upstream activation sequence</i> (secuencia de activación aguas arriba)
UTR	<i>unstralated region</i> (región no traducida)
UV	ultravioleta
v/v	volumen/volumen
WB	<i>western blot</i>

INTRODUCCIÓN

Dinámica y regulación del genoma

El material genético de la célula eucariota se encuentra confinado en el núcleo mediante la membrana nuclear, la cual es interrumpida por los complejos del poro nuclear (NPCs). Este aislamiento proporciona un ambiente especializado dentro del núcleo que facilita el mantenimiento y regulación del genoma. El DNA genómico no está desnudo en el núcleo, sino que se encuentra asociado a proteínas en forma de cromatina. La cromatina es una entidad dinámica que actúa como soporte estructural empaquetando el DNA dentro del núcleo. Su versatilidad le permite adoptar diferentes estados de compactación, regulando así la accesibilidad a la información contenida en el DNA. De esta forma participa activamente en la regulación de procesos celulares esenciales como el ciclo celular, la reparación del DNA o la respuesta transcripcional.

El genoma de *Saccharomyces cerevisiae* contiene aproximadamente 6200 genes distribuidos en 16 cromosomas. Estos adoptan una distribución topológica determinada dentro del núcleo, donde cada uno ocupa territorios subnucleares definidos, favoreciendo contactos inter e intracromosomales (Meaburn & Misteli, 2007). La organización del genoma en territorios cromosómicos origina espacios intercromosómicos, relacionados con una mayor actividad transcripcional (Lanctot *et al.*, 2007; Meaburn & Misteli, 2007). La cromatina situada en

Introducción

estos espacios se encuentra en un estado más relajado, facilitando la transcripción de los genes localizados en esas zonas. Se ha observado que los genes coregulados pueden agruparse e interactuar físicamente entre ellos para facilitar su expresión, como es el caso del regulón génico *GAL* (Brown *et al.*, 2006; Brown *et al.*, 2008; Schoenfelder *et al.*, 2010; Brickner *et al.*, 2012). Esta organización favorece la interacción de la cromatina con la maquinaria transcripcional, así como la consiguiente exportación de los RNAs mensajeros (mRNA) al citoplasma a través de los poros nucleares (Xu & Cook, 2008; Schoenfelder *et al.*, 2010). Este proceso sugiere una coordinación espacio-temporal entre los mecanismos de transcripción génica y exportación de las moléculas mensajeras que serán traducidas en el citoplasma. Por otro lado, la heterocromatina y los dominios silenciados parecen alejarse de dichos espacios, agrupándose en territorios intracromosómicos y asociándose topológicamente a la periferia nuclear donde se establecen en agrupaciones aisladas delimitadas por elementos barrera (Capelson & Corces, 2004; Brassat & Vaury, 2005). Los telómeros representan un ejemplo de esta organización, se asocian a la periferia del núcleo estabilizando así el genoma de la célula (Mekhail & Moazed, 2010; Nagai *et al.*, 2011) (Figura 1).

Introducción

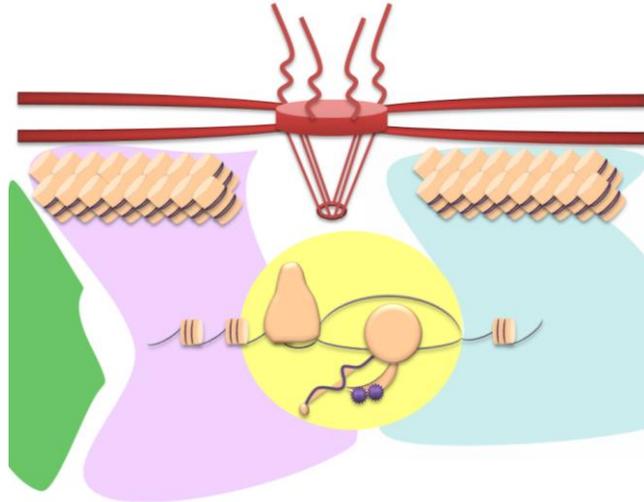


Figura 1. **Modelo de organización funcional de la cromatina.** Los cromosomas ocupan territorios definidos dentro del núcleo (regiones verde, morada y azul). Entre estos territorios existen espacios intercromosómicos (amarillo) de mayor actividad transcripcional. Esta organización favorece la interacción de la cromatina con la maquinaria transcripcional, así como la consiguiente exportación de los mRNAs al citoplasma a través de los poros nucleares. La heterocromatina y los dominios silenciados se asocian topológicamente a la periferia nuclear.

Por lo tanto, la organización de los genes dentro del núcleo está determinada por su actividad transcripcional. Sin embargo, el mecanismo molecular por el que se controla el posicionamiento de los genes dentro del núcleo todavía no está claro. Se han estudiado distintos ejemplos de este fenómeno en levadura, donde muchos genes inducibles, incluyendo *GAL1*, *INO1* y *HSP104*, se localizan preferentemente en la periferia nuclear en condiciones de

Introducción

inducción (Cabal *et al.*, 2006; Dieppois *et al.*, 2006; Taddei, 2007; Brickner, 2009; Ahmed *et al.*, 2010; Egecioglu & Brickner, 2011). Esta recolocación viene mediada por la interacción física entre la maquinaria transcripcional con los componentes del NPC (Cabal *et al.*, 2006; Schmid *et al.*, 2006; Luthra *et al.*, 2007; Ahmed *et al.*, 2010; Light *et al.*, 2010). La reorganización de los genes tiene como consecuencia una transcripción más eficiente de estos (Brickner & Walter, 2004; Menon *et al.*, 2005; Taddei *et al.*, 2006; Brickner *et al.*, 2007; Ahmed *et al.*, 2010). Estos datos ponen de manifiesto una coordinación entre los mecanismos de transcripción génica y de exportación de los mRNAs.

La organización del genoma en el núcleo es fundamental en procesos celulares tan importantes como la división celular, el silenciamiento de la cromatina, el mantenimiento del estado epigenético y la regulación de la expresión génica. Por lo tanto, estudiar cómo se organiza el genoma en el interior del núcleo es de gran relevancia para entender el desarrollo de los distintos procesos celulares.

Organización de la cromatina: las histonas y su regulación

Como se ha mencionado anteriormente, las moléculas de DNA se asocian a diferentes proteínas compactándose en

Introducción

una estructura organizada y jerárquica denominada cromatina (Widom, 1998; Hansen, 2002). Esta compactación es necesaria para resolver el problema estérico que supone el espacio limitado del núcleo y es clave en el establecimiento de la organización nuclear. La unidad básica de la cromatina es el nucleosoma (Kornberg, 1974), en el cual 146 pb de DNA se enrollan alrededor de un complejo octamérico de cuatro histonas. El octámero de histonas consiste en dos copias de las histonas H3, H4, H2A y H2B, que se organizan en dos dímeros de H2A-H2B y un tetrámero de H3 y H4. Una quinta histona, H1, interacciona con el DNA espaciador que une dos nucleosomas consecutivos, permitiendo la transición a una estructura de mayor nivel de compactación cromatínica. Las histonas son proteínas conservadas en todos los organismos eucariotas, de alrededor de 11 kDa, cargadas positivamente y ricas en argininas y lisinas, lo que les confiere un fuerte carácter básico. Desde el punto de vista estructural presentan dos dominios diferenciados. El extremo C-terminal consta de un dominio globular que posee un motivo estructural característico de las histonas, denominado plegamiento de histona (*histone-fold*). Este motivo es fundamental para establecer contactos moleculares entre las histonas de un nucleosoma y entre las histonas y el DNA. El extremo N-terminal consiste en una cola de 15 a 30 aminoácidos no estructurados, la cual es imprescindible en el plegamiento de los nucleosomas para formar estructuras de orden superior.

Introducción

Este extremo es especialmente sensible a sufrir modificaciones postraduccionales, las cuales, afectarán a las interacciones entre las histonas de un nucleosoma y entre las histonas y el DNA (Peterson & Laniel, 2004).

La síntesis de histonas es un proceso altamente regulado que tiene lugar durante la fase S del ciclo celular y está acoplada a la replicación del DNA (Osley, 1991; Eriksson *et al.*, 2012). En levadura, la regulación de esta síntesis tiene lugar principalmente a nivel de la transcripción (Lycan *et al.*, 1987; Eriksson *et al.*, 2012), mientras que en eucariotas superiores el mecanismo principal reside en la regulación de la estabilidad de los mRNAs. En la célula existe un delicado equilibrio entre la síntesis de histonas y su incorporación en la cromatina durante la replicación del DNA. Esta incorporación viene mediada por las chaperonas de histonas, las cuales facilitan la deposición y ensamblaje de las histonas sobre el nuevo DNA replicado. De esta forma, la célula consigue mantener unos niveles mínimos y aproximadamente constantes de histonas libres. Esta regulación es de gran importancia ya que un exceso de histonas puede resultar tóxico para la célula (Gunjan & Verreault, 2003). Dada la naturaleza básica y el pequeño tamaño de las histonas, tienden a unirse inespecíficamente a moléculas con una alta densidad de carga negativa, como es el caso del DNA y otros

Introducción

polímeros, generando daños en la célula cuando se encuentran en exceso (Polo & Almouzni, 2005).

En términos generales una chaperona molecular es una proteína que se asocia a otras evitando su plegamiento incorrecto y la formación de agregados inactivos. Por extensión las chaperonas de histonas evitan la interacción inespecífica de las mismas con otras proteínas y con el propio DNA. Más allá de su función como chaperonas, estas proteínas actúan facilitando la correcta deposición de las histonas en los nucleosomas (Ransom *et al.*, 2010). Las células disponen de diferentes tipos de chaperonas de histonas. Una de las chaperonas mejor caracterizadas es Asf1 (*anti-silencing function*), originalmente identificada como un factor cuya sobreexpresión inhibe el silenciamiento de la cromatina en *S. cerevisiae* (Le *et al.*, 1997). Asf1 interacciona físicamente con las histonas H3 y H4, participando activamente en el ensamblaje y desensamblaje de los nucleosomas y por ello en la regulación de la expresión génica, el mantenimiento de la heterocromatina y la respuesta al daño en el DNA (Mousson *et al.*, 2007). El hecho de que la sobreexpresión de Asf1 antagonice el silenciamiento, sugiere que puede participar en el establecimiento de la heterocromatina (Le *et al.*, 1997). En este sentido, el mutante *asf1Δ* también muestra defectos de silenciamiento en telómeros (Singer *et al.*, 1998). Por otro lado, el análisis del perfil transcripcional del mutante *asf1Δ* ha demostrado que la

Introducción

expresión de un gran número de genes está afectado en este mutante (Zabaronick & Tyler, 2005). Estos datos sugieren que Asf1 facilita la disociación de H3 durante la transcripción activa y su reclutamiento en condiciones represivas (Schwabish & Struhl, 2006). Además, Asf1 se ha visto implicado en el ensamblaje de la histona H3 acoplado a la transcripción (Schwabish & Struhl, 2006). Se ha descrito que Asf1 se une preferentemente a genes altamente transcritos por la RNA Pol II. En el mutante *asf1*Δ el reclutamiento de la RNA Pol II disminuye en genes con altas tasas de transcripción (*GAL10*), mientras que la ocupación de la histona H3 aumenta. Además, en condiciones de represión transcripcional el reclutamiento de la histona H3 es menor en el mutante *asf1*Δ comparado con la cepa silvestre. Por otro lado, Asf1 participa con la maquinaria de respuesta al daño al DNA reorganizando nucleosomas (Emili *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2001).

En base a estos datos, se ha propuesto que Asf1 participa en aquellas funciones relacionadas con la cromatina mediante su papel en el ensamblaje y desensamblaje de los nucleosomas, incluyendo la activación transcripcional, el mantenimiento de la heterocromatina y la respuesta al daño en el DNA (Figura 2).

Introducción

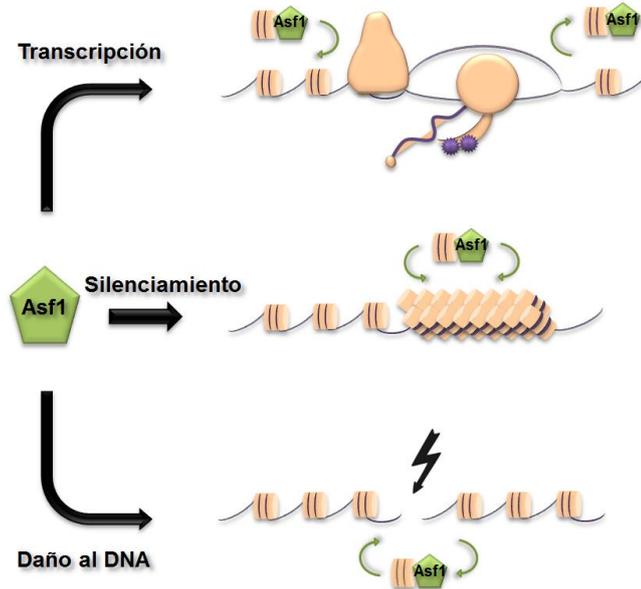


Figura 2. **Función de Asf1 en la organización de la cromatina.** La chaperona Asf1 interviene en procesos celulares que requieren intercambio de nucleosomas. Durante la transcripción Asf1 se encarga de desensamblar nucleosomas para permitir el avance de la RNA Pol II y de reensamblarlos tras su paso. Asf1 también participa en el ensamblaje de los nucleosomas para mantener la correcta estructura de la cromatina silenciada. Durante la respuesta celular al daño al DNA, Asf1 coopera con la maquinaria de reparación del DNA reorganizando nucleosomas.

Modificaciones postraduccionales de las histonas

Como se ha descrito anteriormente, la cromatina está formada por la asociación de proteínas y DNA, lo que da lugar a una estructura altamente compactada que inhibe procesos como la transcripción, la reparación y la replicación del DNA. Sin embargo, la cromatina no es una estructura estática, sino

Introducción

versátil y dinámica, que participa activamente en la regulación de todos estos procesos. Existen diferentes mecanismos por los que la célula modula la estructura de la cromatina, compactándola o relajándola según los requerimientos ambientales. Entre estos mecanismos se encuentran los complejos que remodelan la cromatina mediante el empleo de la energía del ATP, las variantes de histonas y las modificaciones postraduccionales de las histonas. Las tres maquinarias juegan un papel esencial adaptando la organización de la cromatina a los cambios ambientales. Las modificaciones postraduccionales se producen principalmente en el extremo N-terminal de las histonas, aunque también se han observado algunas modificaciones en el extremo C-terminal. Estas modificaciones son uniones covalentes y alteran las interacciones físicas dentro de un mismo nucleosoma y entre nucleosomas diferentes. De esta forma se generan nuevos sitios de unión a otras proteínas modificadoras de histonas. Las alteraciones estructurales que se producen en la cromatina pueden ser transitorias o perdurar varias generaciones en la célula (Berger, 2007). Las histonas, y por lo tanto los nucleosomas, pueden alterar sus propiedades a través de la adición postraduccional de modificaciones químicas como la acetilación, metilación, ubiquitinación, sumoilación y fosforilación (Rando & Winston, 2012). Además, las histonas pueden sufrir otros tipos de modificaciones menos estudiadas como la ADP-ribosilación

Introducción

(Adamietz & Rudolph, 1984), la glicosilación (Liebich *et al.*, 1993), la biotilación (Hymes *et al.*, 1995) y la carbonilación (Wondrak *et al.*, 2000). La diversidad de estas modificaciones y la combinación entre ellas sugiere la existencia de un código de modificaciones de histonas, el cual proporciona un enorme potencial de regulación a modo de respuestas funcionales en la célula (Jenuwein & Allis, 2001; Turner, 2002; Thiagalingam *et al.*, 2003). El número de modificaciones que puede sufrir un nucleosoma es suficiente para hacerlo único en todo el genoma. Estas modificaciones se engloban bajo el término de marcas epigenéticas.

Se conoce una gran variedad de enzimas que modifican residuos de histonas. La acetilación es la modificación más estudiada, puesto que fue la primera en identificarse (Allfrey *et al.*, 1964; Allfrey *et al.*, 1964; Allfrey & Mirsky, 1964). Es llevada a cabo por un buen número de enzimas que se encargan de transferir el grupo acetilo desde la molécula de Acetil-CoA al aminoácido de lisina. Las enzimas acetiltransferasas (HATs) se presentan asociadas a complejos multiproteicos, lo que les confiere mayor eficiencia en su actividad y especificidad de sustrato (Lee & Workman, 2007). La acetilación de las lisinas neutraliza la carga positiva del aminoácido, lo que sugiere que esta modificación podría disminuir la afinidad de la interacción de la histona con el DNA, afectando así a la estructura de la cromatina. La acetilación

Introducción

esta catalizada por enzimas HATs y puede ser eliminada por enzimas histona desacetilasas (HDACs). Aunque la acetilación de las histonas siempre ha estado vinculada a la regulación de la transcripción (Allfrey *et al.*, 1964), la primera enzima HAT identificada en levadura, Hat1, no mostraba ninguna función durante este proceso (Travis *et al.*, 1984; Kleff *et al.*, 1995; Parthun *et al.*, 1996). No fue hasta más tarde cuando se identificaron distintas HATs de histonas con un papel claro durante este proceso (Millar & Grunstein, 2006; Li & Greene, 2007; Smith & Shilatifard, 2010). La caracterización de Gcn5, previamente identificada como un factor implicado en el inicio de la transcripción (Penn *et al.*, 1983; Berger *et al.*, 1990; Georgakopoulos *et al.*, 1995), como una enzima HAT (Brownell & Allis, 1996) constituyó la primera demostración de que la acetilación de las histonas juega un papel fundamental durante la activación de la transcripción *in vivo*. Se demostró que la pérdida de la actividad HAT en el mutante *gcn5Δ* provocaba defectos transcripcionales. Este hecho sugirió que la actividad HAT de Gcn5 debía asociarse a los promotores, aunque estudios recientes demuestran que Gcn5 tiene una actividad global y extendida por todo el genoma (Rhee & Pugh, 2011). Sin embargo, sólo un pequeño grupo de promotores requiere la acetilación para la expresión normal del gen que regula. El siguiente gran paso fue la identificación de los complejos que contienen estas enzimas, y por lo tanto, poseen la actividad HAT en *S. cerevisiae*. Para ello, se purificaron complejos

Introducción

proteicos nucleares que contenían actividad HAT y se procedió a su identificación.

El complejo mejor estudiado que contiene Gcn5 es SAGA (Spt-Ada-Gcn5-Acetiltransferasa), un complejo multiproteico y multifuncional fuertemente involucrado durante el inicio y la elongación de la transcripción en eucariotas (Koutelou *et al.*, 2010). SAGA acetila las histonas H3 y H2B a través de Gcn5 (Grant *et al.*, 1997). Como ya hemos mencionado, en *S. cerevisiae* la ausencia de Gcn5 provoca una alteración en los niveles de mRNA de un gran número de genes, aunque sólo un pequeño número de ellos está regulado por SAGA (Lee *et al.*, 2000). Estudios realizados de inmunoprecipitación de cromatina hibridados en chips de DNA (ChIP-on-chip) han demostrado que Gcn5 se localiza en todos los promotores activos de forma proporcional al nivel de actividad transcripcional de dichos promotores (Robert *et al.*, 2004). Se ha observado que Gcn5 no sólo es responsable de la activación transcripcional, sino que también es capaz de reprimir la transcripción de ciertos genes en levadura (Ricci *et al.*, 2002; Helmlinger *et al.*, 2008).

Además de Gcn5, otras HATs han sido identificadas en *S. cerevisiae*: Sas2, Sas3, y Esa1. Esta última es la única HAT esencial descubierta en *S. cerevisiae* (Reifsnyder *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1998; Clarke *et al.*, 1999). Sas3 y Esa1 se encuentran formando parte de los complejos HAT NuA3 y NuA4 respectivamente (Grant *et al.*, 1997; Allard *et al.*, 1999),

Introducción

mientras que Sas2 participa en el establecimiento del silenciamiento telomérico en levadura (Kimura *et al.*, 2002; Suka *et al.*, 2002). El complejo NuA4, el cual contiene Esa1, también ha sido caracterizado extensamente (Allard *et al.*, 1999) Doyon (Doyon & Cote, 2004). A diferencia de Gcn5, Esa1 acetila H4 y H2A. De forma interesante, NuA4 comparte subunidades con los complejos SAGA/SLIK, RSC y SWR1. Análisis publicados de CHIP-on-chip, demuestran que NuA4 se localiza en todos los promotores activos en unos niveles que se correlacionan con su actividad (Robert *et al.*, 2004), indicando que NuA4 juega un papel general en la regulación de la transcripción.

Además de las diversas HATs, varias HDACs también participan en el control del inicio de la transcripción, generalmente mediante la represión (Millar & Grunstein, 2006; Krebs, 2007), aunque en algunos genes se ha observado que participan de manera positiva (Sharma *et al.*, 2007). Las HDACs juegan un papel global durante la transcripción (Robyr *et al.*, 2002) y normalmente son reclutadas por el complejo represor Cyc8/Tup1 (Davie *et al.*, 2003). Estudios sobre diversos genes sugieren que un equilibrio entre la acetilación y desacetilación juega un papel clave en la regulación de la transcripción (Krebs *et al.*, 1999).

Además de contribuir durante el inicio de la transcripción, la acetilación también tiene lugar a lo largo de la región transcrita de los genes (Fuchs *et al.*, 2009; Smith &

Introducción

Shilatifard, 2010). SAGA y NuA4 acetilan los nucleosomas durante la elongación transcripcional. Diversos trabajos han demostrado que la acetilación dependiente de ambos complejos tiene lugar a lo largo de toda la región codificante durante la elongación transcripcional (Ginsburg *et al.*, 2009). Experimentos de inmunoprecipitación de cromatina, han demostrado que tanto SAGA (Govind *et al.*, 2007; Wyce *et al.*, 2007) como NuA4 (Ginsburg *et al.*, 2009) están asociados a las regiones codificantes. En otro estudio se ha demostrado que SAGA aumenta los niveles de acetilación en H3 facilitando el desensamblaje de los nucleosomas en *GAL1* y aumentando a su vez los niveles de RNA Pol II y mRNAs (Govind *et al.*, 2007). Por otro lado, NuA4 estimula la acetilación de H4 facilitando el reclutamiento de RSC y el consiguiente desensamblaje de los nucleosomas, necesario para la elongación de la RNA Pol II (Ginsburg *et al.*, 2009).

Otra modificación que afecta a las histonas es la metilación. Las histona metiltransferasas (HMTs) catalizan la metilación de las lisinas y argininas. Esta modificación no altera la carga neta de las histonas pero aumenta su basicidad e hidrofobicidad, aumentando la afinidad de las colas de histonas por moléculas aniónicas como el DNA (Rice & Allis, 2001). Tradicionalmente la metilación de histonas se ha considerado una modificación estable, pero en la actualidad ya se han identificado lisina-desmetilasas (*LSD1*) y arginina-

Introducción

desmetilasas (*PAD4*) (Cuthbert *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2004). Las HMTs involucradas durante la regulación transcripcional en levadura son Set1, Set2 y Dot1. Son responsables de modificar la histona H3 en las lisinas 4, 36 y 79 respectivamente y están desencadenadas por la ubiquitinación en H2BK123 (Figura 3). La metilación en K4 está implicada en el inicio y en la elongación de la transcripción (Krogan *et al.*, 2003; Ng *et al.*, 2003). La metilación en K36 está asociada al reclutamiento de la actividad represora de las HDACs durante la elongación de la transcripción (Carrozza *et al.*, 2005; Keogh *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007). El papel de la metilación de K79 no está todavía bien definido y tiene lugar en promotores y regiones codificantes de los genes transcripcionalmente activos (Sims *et al.*, 2004). Esta modificación parece también estar relacionada con los procesos de reparación y silenciamiento del DNA (van Leeuwen *et al.*, 2002; Giannattasio *et al.*, 2005; Bostelman *et al.*, 2007; Onishi *et al.*, 2007; Ehrentraut *et al.*, 2011).

El papel de la metilación de las histonas durante la regulación de la transcripción todavía no ha sido esclarecido completamente. En la mayoría de los casos su mecanismo de acción se produce a través del reclutamiento de otros factores implicados en la regulación de la transcripción. La metilación de H3K4 tiene lugar generalmente sobre histonas ubicadas en las regiones codificantes de los genes (Bernstein *et al.*, 2002; Santos-Rosa *et al.*, 2002; Ng *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2005;

Introducción

Pokholok *et al.*, 2005). La metilación de H3K4 es dependiente de la metiltransferasa Set1, asociada al complejo COMPASS (Miller *et al.*, 2001; Roguev *et al.*, 2001; Nagy *et al.*, 2002). El reclutamiento de este complejo a los genes inducidos es dependiente de la ubiquitinación de la histona H2B (Dover *et al.*, 2002; Sun & Allis, 2002), que a su vez es dependiente del complejo PAF (Ng *et al.*, 2003; Wood *et al.*, 2003; Warner *et al.*, 2007). Un papel más claro se ha establecido en el caso de la metilación de H3K36, la cual requiere la metiltransferasa Set2 (Strahl *et al.*, 2002; Schaft *et al.*, 2003). De forma parecida a la trimetilación en H3K4, la trimetilación de H3K36 se ha localizado de manera global sobre los genes transcripcionalmente activos. Set2 es reclutada a la región codificante de los genes en transcripción a través de su interacción con la forma elongante de la RNA Pol II (Krogan *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2003; Pokholok *et al.*, 2005; Rao *et al.*, 2005). La actividad enzimática de Set2 requiere interacciones específicas con las histonas H3, H4, y H2B (Du *et al.*, 2008; Du & Briggs, 2010). La metilación de H3K36 no es necesaria para la elongación de la transcripción, sino para activar el complejo desacetilasa de histonas Rpd3 a lo largo de la cromatina transcrita, produciendo una desacetilación de los genes que se están transcribiendo (Carrozza *et al.*, 2005; Joshi & Struhl, 2005; Keogh *et al.*, 2005; Pokholok *et al.*, 2005; Drouin *et al.*, 2010; Govind *et al.*, 2010). Menos claro es el papel que desempeña la metilación en H3K79. La metiltransferasa

Introducción

encargada de esta modificación es Dot1 (Feng *et al.*, 2002; Ng *et al.*, 2002; van Leeuwen *et al.*, 2002). Esta modificación fue inicialmente identificada como reguladora del silenciamiento en los telómeros (Singer *et al.*, 1998). Como en H3K4, la metilación de K3K79 es dependiente de la ubiquitinación de la histona H2B (Briggs *et al.*, 2002; Wood *et al.*, 2003). Se trata de una modificación global que tiene lugar a lo largo de las regiones codificantes, aunque a diferencia de la metilación de K4 y K36, los niveles de metilación de K79 muestran muy poca correlación con los niveles transcripcionales. La metilación de H3K79 bloquea la unión del complejo SIR a la cromatina. Éste se encarga de mantener el silenciamiento en la cromatina, por lo que, la pérdida de la metilación en el mutante *dot1Δ* produce un defecto en el silenciamiento. En este mutante se produce una unión promiscua del complejo SIR a lo largo del genoma, extendiendo el posicionamiento del complejo SIR más allá de sus regiones silenciadas (van Leeuwen *et al.*, 2002).

Otra modificación remarcable de las histonas es la ubiquitinación. La ubiquitinación de lisinas está catalizada por un sistema de tres enzimas: E1 (enzima activador de ubiquitina), E2 (enzima conjugante de ubiquitina) y E3 (ubiquitina ligasa) (Braun & Madhani, 2012). Este mecanismo produce la conjugación covalente de ubiquitina, una proteína de 76 aminoácidos (9 kDa), a un residuo de lisina en las histonas H2B y H2A (Braun & Madhani, 2012). En general

Introducción

todas las proteínas, incluyendo las histonas, pueden ser poliubiquitinadas. Esta modificación constituye una marca de señalización de degradación para el proteasoma. Por otra parte se ha descrito que la monoubiquitinación de lisinas no está asociada con la degradación de proteínas, sino que participa en la regulación de su actividad. De esta forma, determinados precursores inactivos de factores transcripcionales son procesados en el proteasoma para dar lugar a sus formas activas. Por lo tanto, además de participar directamente en la regulación de la transcripción, el proteasoma también puede modular de manera indirecta este proceso (Braun & Madhani, 2012). La monoubiquitinación de la histona H2B es esencial para llevar a cabo diversos procesos celulares, como por ejemplo, el silenciamiento génico, el crecimiento celular y el inicio y elongación de la transcripción (Pavri *et al.*, 2006). Ésta modificación es llevada a cabo por las proteínas Rad6 (ligasa de ubiquitina E2), y Bre1 (ubiquitina ligasa E3) y Lge1 (Hwang *et al.*, 2003; Wood *et al.*, 2003). La ubiquitinación de la histona H2B parece ser el desencadenante de una ruta ordenada de modificaciones de histonas a lo largo de la transcripción (Osley, 2004; Braun & Madhani, 2012) (Figura 3). La monoubiquitinación de la histona H2B es a su vez sustrato de dos ubiquitina proteasas específicas Ubp10 y Ubp8. La actividad de Ubp10 tiene lugar mayoritariamente sobre la heterocromatina, estando relacionada con los procesos de silenciamiento génico en los telómeros (Osley,

Introducción

2006). Por otro lado, Ubp8 es un componente del coactivador transcripcional SAGA y desubicitina la histona H2B tanto *in vivo* como *in vitro* (Henry *et al.*, 2003; Daniel *et al.*, 2004). De esta forma, Ubp8 controla los niveles de ubiquitinación en la histona H2B, permitiendo así un correcto inicio de la transcripción. Por otro lado, la actividad de Ubp8 también es necesaria para reclutar la quinasa Ctk1 (fosforila la cola CTD, C-terminal domain, de la RNA Pol II) y permitir así la correcta elongación del mRNA (Wyce *et al.*, 2007).

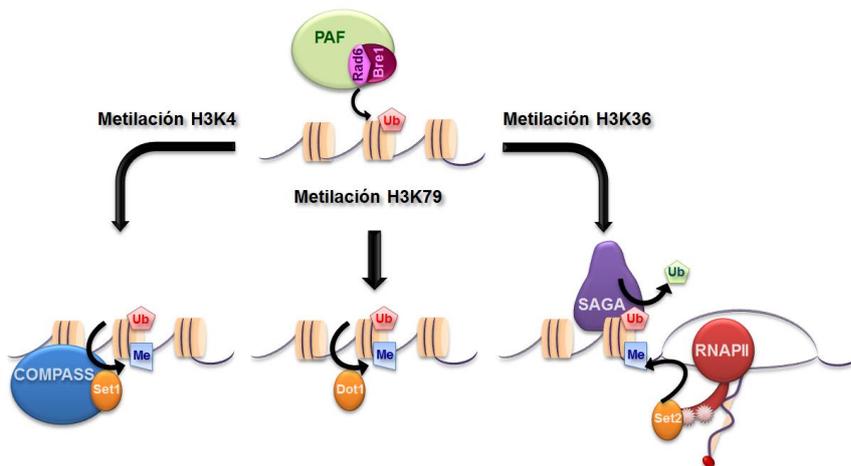


Figura 3. **La ubiquitinación de la histona H2B promueve la metilación de H3.** El complejo PAF es necesario para que la enzima conjugante de ubiquitina, Rad6, y la ubiquitina ligasa, Bre1, ubiquitinen la histona H2B en K123. La ubiquitinación en H2BK123 estimula la metilación de H3 en las lisinas K4 y K79 mediante la metiltransferasas Set y Dot1 respectivamente. La histona H3 es metilada en K36 por la metiltransferasa Set2. Ésta se ancla a la cola CTD de la RNA Pol II elongante, la cual se activa tras la desubicitinación de H2BK123 por SAGA.

Introducción

De manera similar a la ubiquitinación, la sumoilación modifica a las histonas mediante la conjugación a las mimas de una pequeña proteína denominada SUMO (*small ubiquitin-related modifier*). Se han detectado marcas de sumoilación en las cuatro histonas (Nathan *et al.*, 2006). La sumoilación de histonas ha sido relacionada con procesos de represión transcripcional mediada por el reclutamiento de HATs y de HP1 (*heterochromatin protein 1*) (Shiio & Eisenman, 2003; Verger *et al.*, 2003). También se ha sugerido que esta marca participa en la atenuación de la expresión de genes transcripcionalmente activos, que posteriormente serán reprimidos (Nathan *et al.*, 2003). Del mismo modo, se ha demostrado que la sumoilación actúa en oposición a las marcas de activación transcripcional como la acetilación y ubiquitinación, produciendo represión transcripcional (Nathan *et al.*, 2006).

Por último, otra modificación que afecta a las histonas es la fosforilación de serinas y treoninas, catalizada por histona quinasas. La fosforilación introduce dos cargas negativas en el residuo modificado, y se ha relacionado tanto con la activación transcripcional como con la condensación mitótica de los cromosomas (Berger, 2002).

Un aspecto interesante de las enzimas modificadoras de histonas es que la mayoría modifican también sustratos no

Introducción

histonas. Por ejemplo, Gcn5 no sólo acetila histonas, sino que regula al complejo RSC a través de la acetilación de Rsc4 (VanDemark *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2008) y ha sido recientemente identificado como acetilador del complejo remodelador SWI/SNF (Kim *et al.*, 2010). Una búsqueda global de dianas proteicas del complejo NuA4 HAT identificó diversas proteínas no histonas que requieren la acetilación para ser enzimáticamente activas (Lin *et al.*, 2009). Resultados similares se han observado para las metilasas de histonas. Por lo tanto, la separación de la función de estas enzimas en las modificaciones de histona de las modificaciones de proteínas no histona, será fundamental en el futuro para entender los fenotipos de los mutantes de enzimas modificantes.

Estructura y función de los telómeros

Los telómeros son estructuras cromatínicas especializadas en la protección del genoma, están localizados en los extremos de los cromosomas de las células eucariotas (Wellinger & Zakian, 2012). Su función principal es evitar que la región terminal de los cromosomas sea reconocida por los mecanismos celulares de reparación de rotura de la doble cadena DNA, lo que provocaría la fusión de cromosomas y la formación de estructuras aberrantes con gravísimas consecuencias para la célula. Otra función esencial que cumplen los telómeros es proporcionar a la célula un

Introducción

mecanismo por el cual la longitud de los cromosomas se mantenga constante a lo largo de los distintos ciclos replicativos.

En levadura, el DNA telomérico está constituido por unos 300 pb de secuencias altamente repetitivas ($C_{1-3}ATG_{1-3}$) (Ungar *et al.*, 2009), precedidas por una región denominada subtelomérica. El DNA telomérico se organiza asociándose directamente a proteínas esenciales para la estabilidad de los cromosomas, formando la cromatina telomérica. Entre las proteínas que se unen al DNA telomérico en levaduras se encuentran Rap1, Rif1, el complejo SIR y el heterodímero YKu70/YKu8. La proteína Rap1 dirige la unión al DNA telomérico de las proteínas Rif1 y Rif2, que participan regulando negativamente la extensión de los telómeros por la telomerasa. Rap1 también está implicada en el reclutamiento del complejo SIR, responsable del silenciamiento de los genes situados en las regiones subteloméricas mediante su actividad desacetilasa de histonas. Este fenómeno se conoce como TPE (*telomere position effect*) (Fisher & Zakian, 2005). Yku80 junto a Yku70 forman un complejo que evita la recombinación entre telómeros, la cual es esencial para la estabilidad del genoma (Marvin *et al.*, 2009) y para el mantenimiento de la longitud de los telómeros (Boulton & Jackson, 1996; Porter *et al.*, 1996; Gravel *et al.*, 1998; Polotnianka *et al.*, 1998).

Introducción

Los telómeros proporcionan a la célula un mecanismo por el cual las DNA polimerasas pueden replicar los extremos de las moléculas lineales de DNA sin perder información genética en cada ronda de replicación. De no ser así, se produciría un acortamiento de los cromosomas en cada división celular. La enzima encargada de evitar este acontecimiento es la telomerasa, una transcriptasa reversa especializada que elonga los extremos protuberantes de los cromosomas formados por una cadena sencilla rica en guanina, utilizando para ello una molécula molde de RNA que forma parte del complejo telomerasa. A continuación, la DNA polimerasa sintetiza una cadena complementaria a la cadena elongada y genera así una molécula de doble hebra (Ungar *et al.*, 2009). El complejo ribonucleoproteico que conforma la telomerasa se compone de cinco factores, una subunidad catalítica (Est2), una molécula de RNA que actúa como molde (*TLC1*) y las proteínas asociadas Est1, Est3 y Cdc13 (Nugent & Lundblad, 1998; Fisher & Zakian, 2005). En los mutantes para cualquiera de los componentes de la telomerasa (*tlc1Δ*, *est2Δ*, *est1Δ*, *est3Δ* o *cdc13Δ*) se produce un acortamiento progresivo de los telómeros ocasionando la muerte de la mayor parte de la población tras varias generaciones (Chan *et al.*, 2008). *CDC13* es el único gen esencial de la telomerasa. Est2 y *TLC1* conforman el sitio catalítico, mientras que Est1, Est3 y Cdc13 participan regulando el proceso de elongación (Zakian, 1996; Lowell & Pillus, 1998; Dubrana *et al.*, 2001;

Introducción

Taggart & Zakian, 2003; Smogorzewska & de Lange, 2004). Cdc13 se une a la cadena sencilla protuberante de los telómeros, anclando a su vez a Est1. Esta interacción es necesaria para posicionar al resto del complejo telomerasa sobre los extremos cromosómicos (Taggart & Zakian, 2003). En la célula existe un equilibrio dinámico entre la adición de repeticiones por parte de la telomerasa y la degradación de las regiones teloméricas a cargo de nucleasas específicas, de esta forma se regula la longitud de los telómeros (Wellinger & Zakian, 2012).

No es sorprendente que un gran número de otras proteínas afecte a la biología de los telómeros, por ejemplo, aquellas que juegan un papel general durante la replicación y recombinación del DNA, ciclo celular y síntesis tanto de proteínas como de RNA (Dahlseid *et al.*, 2003; Mozdy *et al.*, 2008). Existen trabajos de búsqueda de genes involucrados en el metabolismo de telómeros que confirman esta idea (Askree *et al.*, 2004; Gatbonton *et al.*, 2006; Addinall *et al.*, 2008). Por ejemplo, los genes *HST3*, *SEM1*, *MLP2*, *NUP60*, *SAP30*, *SWD1*, *RSC2*, *ESC2* y *UPF2* se han visto implicados de forma indirecta en el metabolismo de los telómeros.

La cromatina telomérica es una heterocromatina condensada que a pesar de ello es capaz de transcribirse, dando lugar a una nueva clase de RNA no codificante llamado TERRA (*telomeric repeat-containing RNA*) (Azzalin *et al.*, 2007; Luke *et al.*, 2008; Iglesias *et al.*, 2011). La presencia de

Introducción

TERRA se ha detectado en la mayoría de los eucariotas (levaduras, plantas, vertebrados y mamíferos) lo que sugiere una función conservada (Luke & Lingner, 2009; Feuerhahn *et al.*, 2010). TERRA está compuesto por RNAs que contienen tanto secuencias subteloméricas como teloméricas y se ha visto asociado al DNA telomérico. Su tamaño abarca desde los 100 hasta los 1200 nt. Sorprendentemente, TERRA es transcrito al igual que los RNAs codificantes por la RNA Pol II. De la misma forma que los transcritos de la RNA Pol II, TERRA también está poliadenilado. Las funciones de TERRA se han asociado con el control de las marcas epigenéticas en los telómeros, la longitud de estos y su replicación (Luke *et al.*, 2008).

Recientemente se han descrito factores que regulan la estabilidad y localización de TERRA en la célula. La maquinaria del NMD (*nonsense-mediated mRNA decay*), o degradación del RNA mensajero mediada por mutaciones de terminación, es un mecanismo celular de vigilancia responsable del reconocimiento y degradación de los mRNA que contienen codones prematuros de terminación y cuya función es evitar la expresión de proteínas truncadas o erróneas (Kervestin & Jacobson, 2012; Varsally & Brogna, 2012). Se ha demostrado, que esta maquinaria ejerce una función importante deslocalizando TERRA de los telómeros humanos (Azzalin *et al.*, 2007; Chawla & Azzalin, 2008). También se ha observado que los componentes de la

Introducción

maquinaria del NMD pueden interactuar directamente con TERRA en los telómeros (Azzalin *et al.*, 2007). Hasta el momento se desconoce si en levadura TERRA se asocia a los telómeros, por lo tanto, aún no se han descrito reguladores de la localización de TERRA en este organismo. Sin embargo, la inactivación de la maquinaria del NMD en *S. cerevisiae* produce telómeros acortados (Dahlseid *et al.*, 2003; Enomoto *et al.*, 2004). Los mutantes de la maquinaria del NMD no afectan a los niveles globales de TERRA (Luke *et al.*, 2008), pero de manera similar a las células humanas, podrían estar afectando a TERRA localmente, por lo que el efecto resultante no sería detectable mediante las técnicas utilizadas. Se ha determinado que la estabilidad de TERRA en levaduras está altamente regulada por Rat1. TERRA es degradado rápidamente por la RNA exonucleasa Rat1, la cual también está involucrada en el procesado de los mRNAs (Rosonina *et al.*, 2006; Luke *et al.*, 2008; Rondon *et al.*, 2010). En células silvestres TERRA es casi indetectable mediante Southern blot, pero se acumula significativamente cuando Rat1 se inactiva. Además, Rat1 se ha visto asociado a telómeros. Por otro lado, Xrn1, el parálogo citoplasmático de Rat1 no tiene efecto sobre los niveles de TERRA, lo que apoya que TERRA en levaduras tiene una localización nuclear (Luke & Lingner, 2009).

Existen evidencias experimentales que demuestran que TERRA participa en la regulación de la longitud de los telómeros. En el mutante *rat1-1*, donde TERRA se acumula,

Introducción

los telómeros se acortan respecto a las células silvestres debido a un mal funcionamiento de la telomerasa (Luke *et al.*, 2008). Por otro lado, la sobreexpresión de RNasaH reduce los niveles de TERRA, lo que recupera el fenotipo silvestre. Este dato indica que la formación de un híbrido DNA/TERRA es el responsable del fenotipo de telómeros acortados. Otro experimento que apoya el papel de TERRA como inhibidor de la telomerasa surge de la observación de que una transcripción forzada de los telómeros (a través del uso del promotor *GAL*) produce el acortamiento del telómero transcrito en *cis* (Sandell *et al.*, 1994).

La existencia de TERRA añade un nivel más de complejidad a la regulación de los telómeros. TERRA, al igual que otros ncRNAs (*non-coding RNA*), es sintetizado en el mismo lugar donde lleva a cabo su función. Por lo tanto, su nivel de síntesis está relacionado directamente con los cambios estructurales que sufre la cromatina. Por ello, TERRA parece ideal para desempeñar una respuesta apropiada a estos cambios. Existen evidencias experimentales de la participación de TERRA sobre el mantenimiento de los telómeros, bien durante el ensamblaje de la heterocromatina, contribuyendo en la regulación de la telomerasa, o bien contribuyendo a la respuesta al daño al DNA producida en los telómeros acortados. La mayoría de estas funciones son todavía especulativas, y el mecanismo de acción todavía está por resolver. Para ello, es importante aclarar el mecanismo de

Introducción

biogénesis y degradación de TERRA, identificar las proteínas que interaccionan y colaboran con TERRA, y elucidar su mecanismo de acción (Figura 4).

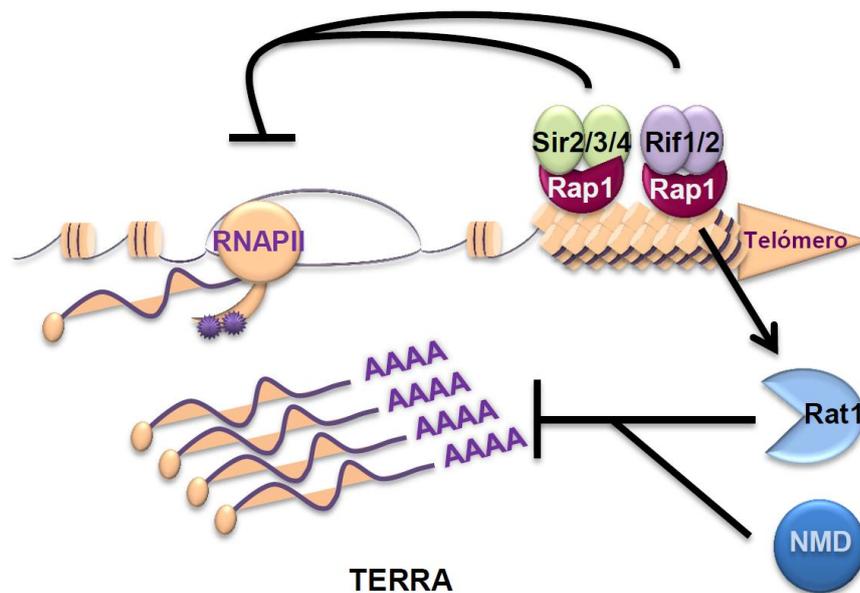


Figura 4. **Mecanismos de regulación de la transcripción telomérica.** La RNA Pol II es capaz de transcribir regiones teloméricas originando transcritos provistos de caperuza y colas poliA. La transcripción es inhibida mediante los complejos SIR y RIF a través de la proteína de unión a telómeros Rap1. Ésta a su vez estimula la actividad exonucleasa de Rat1, la cual degrada los transcritos de TERRA. Se ha demostrado que la maquinaria NMD también participa en la degradación de TERRA.

La expresión génica: de la cromatina al citoplasma

La regulación de la expresión génica es un proceso esencial para la viabilidad celular. La célula ha desarrollado múltiples niveles de control para este proceso: el acceso al DNA, la síntesis y el procesamiento de los RNAs, el transporte del RNA fuera del núcleo y su traducción en proteínas. Todas estas etapas se llevan a cabo de manera acoplada y coordinadas entre sí hasta lograr una respuesta celular óptima acorde con los cambios ambientales.

La expresión génica se inicia con el ensamblaje de la maquinaria transcripcional sobre el promotor de los genes. Acto seguido, esta maquinaria se desplaza a lo largo del gen para descifrar la información contenida en el DNA. La actividad de la RNA Pol II da lugar a la conversión de la información genética en moléculas de RNAs prematuras. Éstas sufren diversas etapas de procesamiento y modificaciones hasta convertirse en mRNAs maduros. El procesamiento incluye la adición de la caperuza, el corte y empalme de exones, el corte del extremo 3' y la poliadenilación (Proudfoot *et al.*, 2002; Reed & Hurt, 2002). Los mRNAs ya maduros y asociados a diversas proteínas, formando RNPs, son exportados a través de los NPCs hacia el citoplasma. La correcta exportación depende tanto de las etapas nucleares ya mencionadas como

Introducción

de fases posteriores que tienen lugar en el citoplasma (Bentley, 2005; Buratowski, 2005; Rosonina *et al.*, 2006). Las maquinarias que actúan en las distintas etapas de la expresión génica interactúan entre sí estableciendo múltiples interacciones físicas y funcionales coordinando todo el proceso.

Inicio de la transcripción

En eucariotas, el inicio de la transcripción de los genes codificantes de proteínas viene dado por una señal de activación transcripcional e implica el ensamblaje coordinado de la RNA Pol II y los factores generales de la transcripción (GTFs) para formar el complejo de preinicio (PIC) (Shandilya & Roberts, 2012). Estos componentes configuran la maquinaria basal de la transcripción. La transcripción se modula a través de reguladores específicos de unión a DNA (activadores y represores) y de complejos modificadores que se asocian específicamente a estos reguladores (coactivadores y correpresores). Los reguladores se asocian normalmente a secuencias del DNA próximas al promotor y los coactivadores y correpresores median los efectos de los reguladores sobre la maquinaria de transcripción basal, bien a través de contactos directos con los GTFs o la RNA Pol II y/o bien modificando la estructura de la cromatina. Los coactivadores tratan de revertir el estado represivo que habitualmente presenta la cromatina y

Introducción

los correpresores colaboran para volver a este estado una vez la transcripción ha tenido lugar. De esta manera, los niveles de expresión de determinados genes se corresponden con las señales ambientales recibidas por la célula (Shandilya & Roberts, 2012).

El empaquetamiento del DNA en nucleosomas produce asociaciones estables DNA-proteína que dificultan el acceso de los reguladores a la cromatina (Felsenfeld, 2003; Mellor, 2005; Williams & Tyler, 2007), constituyendo esta etapa uno de los primeros puntos de regulación de la expresión génica. Para ello, la participación de las chaperonas de histonas, los complejos modificadores de histonas y los remodeladores de la cromatina es indispensable (Narlikar *et al.*, 2002). Se han identificado distintos complejos capaces de modificar la cromatina a nivel de los promotores, como por ejemplo el remodelador SWI/SNF y el coactivador SAGA. Los complejos remodeladores utilizan la energía del ATP con el fin de ejercer cambios en la localización de los nucleosomas de una región determinada de DNA. Por otro lado, como hemos visto en la sección anterior, los complejos modificadores introducen modificaciones postraduccionales sobre las histonas. Ambos tipos de complejos actúan de manera sinérgica con el objetivo de reestructurar la cromatina, dejándola accesible a los distintos factores necesarios para iniciar la transcripción. Así, los nucleosomas acetilados por SAGA son a su vez

Introducción

desplazados por el complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF (Chandy *et al.*, 2006).

En levadura existen dos vías principales para activar la transcripción, cada una está mediada por dos complejos coactivadores diferentes: TFIID (*Transcription Factor IID*) y SAGA (Brownell & Allis, 1996; Mizzen *et al.*, 1996; Grant *et al.*, 1997). El 90% de los genes de *S. cerevisiae* están regulados por la vía del coactivador TFIID, el cual está implicado en la activación transcripcional de genes que se expresan constitutivamente. Los promotores de estos genes se caracterizan por la ausencia de la secuencia consenso TATA. Por otro lado, los genes regulados por SAGA constituyen un 10% del genoma, siendo mayoritariamente genes implicados en la respuesta a estrés ambiental. Este grupo de genes está regulado por promotores que contienen la secuencia consenso TATA (Lee *et al.*, 2002; Huisinga & Pugh, 2004). Recientemente, Pugh y colaboradores han demostrado que el reclutamiento de factores transcripcionales a los genes regulados por TFIID y SAGA difiere cualitativa y cuantitativamente (Venters *et al.*, 2011), poniendo de manifiesto dos vías de regulación claramente diferenciadas. Se ha observado que algunos factores que regulan la cromatina se asocian preferencialmente con un mecanismo u otro. Por ejemplo, NuA4 está vinculado principalmente al complejo TFIID, y por otro lado, los complejos SWI/SNF, *RAD6/BRE1*,

Introducción

RSC y las histonas desacetilasas están vinculadas a SAGA. Otro hecho importante es la distinta organización espacial que adoptan los reguladores en el promotor de cada tipo de gen. Por otro lado, los factores presentes mayoritariamente en los genes regulados por SAGA tienden a ocupar regiones cercanas al nucleosoma -1, a diferencia de los genes regulados por TFIID donde estos factores ocupan preferentemente las regiones del nucleosoma +1 (Venters *et al.*, 2011).

El complejo SAGA: estructura y función

Como ya hemos mencionado, SAGA es un coactivador transcripcional encargado de modificar la cromatina para facilitar la transcripción. Estructuralmente es un complejo de 1.8 MDa compuesto por 21 proteínas y organizado en módulos con funciones propias. Las subunidades que lo conforman están conservadas evolutivamente (Grant *et al.*, 1997; Martinez *et al.*, 2001; Weake *et al.*, 2008; Rodriguez-Navarro, 2009). SAGA posee dos actividades catalíticas inherentes, la actividad acetiltransferasa de histonas (Grant *et al.*, 1997; Sterner *et al.*, 1999) y la actividad desubicitinasa de la histona H2B (Henry *et al.*, 2003; Daniel *et al.*, 2004; Daniel & Grant, 2007). Ambas actividades son esenciales para llevar a cabo la reestructuración de la cromatina a una forma abierta y

Introducción

relajada, facilitando el inicio y la elongación de la transcripción (Suganuma & Workman, 2008).

Para comprender el funcionamiento de SAGA como un complejo completo es necesario comprender la estructura y relación de cada uno de sus módulos. Recientemente se ha propuesto un modelo en el que el complejo SAGA se ensambla en cuatro módulos discretos (Lee *et al.*, 2011). El módulo de desubicitinación (DUBm), el cual desarrolla la actividad desubicitinasa de la histona H2B, está compuesto por cuatro proteínas: la proteasa específica de ubiquitina Ubp8, Sgf11, Sus1, y Sgf73 (Ingvarsdottir *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005; Kohler *et al.*, 2006; Kohler *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009). El módulo histona acetiltransferasa (HAT/Core), contiene las subunidades Gcn5, Ada2, Ada3 y Sgf29. Este módulo reconoce la histona metilada H3K4, facilitando el reclutamiento de SAGA a la cromatina (Balasubramanian *et al.*, 2002; Bian *et al.*, 2011). Por otra parte, el módulo SA_TAF está compuesto por las subunidades TAF (*TATA-binding protein (TBP)-associated factors*). Estas proteínas actúan como mediadoras de la actividad HAT, participando en el reclutamiento de la maquinaria basal de la transcripción (Dymlacht *et al.*, 1991; Grant *et al.*, 1998; Struhl & Moqtaderi, 1998). Por último, el módulo SA_SPT está compuesto por las subunidades SPT (*suppressor of Ty*) y las proteínas Ada1 y Tra1 (Figura 5). Ésta última se encarga de reclutar el complejo HAT/Core (Brown *et al.*, 2001). Algunas de las subunidades de este último módulo

Introducción

han sido identificadas como elementos estructurales de SAGA, por ejemplo, la delección de *SPT20*, *SPT7* o *ADA1* compromete la integridad del complejo (Grant *et al.*, 1997; Sterner *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2004). El proceso llevado a cabo por la célula para ensamblar el complejo completo se desconoce hasta la fecha, pero se ha especulado con la posibilidad de que los diferentes módulos se ensamblen de forma independiente para después formar el macrocomplejo. Esta idea sugiere que los módulos podrían tener capacidad para funcionar independientemente, lo cual está siendo objeto de estudio pero aún no ha sido demostrado.

La cristalografía de rayos X ha sido extensamente utilizada para resolver la estructura de multitud de complejos. Dos estudios recientes han resuelto mediante este método la estructura del módulo DUB (Kohler *et al.*, 2010; Samara *et al.*, 2010). Ambos estudios concluyen que existe una intrincada interacción física entre las cuatro proteínas que forman el módulo, lo cual explica porqué la presencia de las cuatro subunidades es esencial para que el módulo sea enzimáticamente activo (Kohler *et al.*, 2008; Weake & Workman, 2008; Lee *et al.*, 2009). Los datos cristalográficos también desvelan que el módulo DUB se asocia al resto del complejo SAGA a través del dominio central de Sgf73, y que Sgf11 juega un papel importante en la activación de Ubp8. Sgf11 mantiene la conformación correcta del sitio catalítico,

Introducción

favoreciendo la desubicitinación de la lisina 123 de la histona H2B (Kohler & Hurt, 2010; Samara *et al.*, 2010).

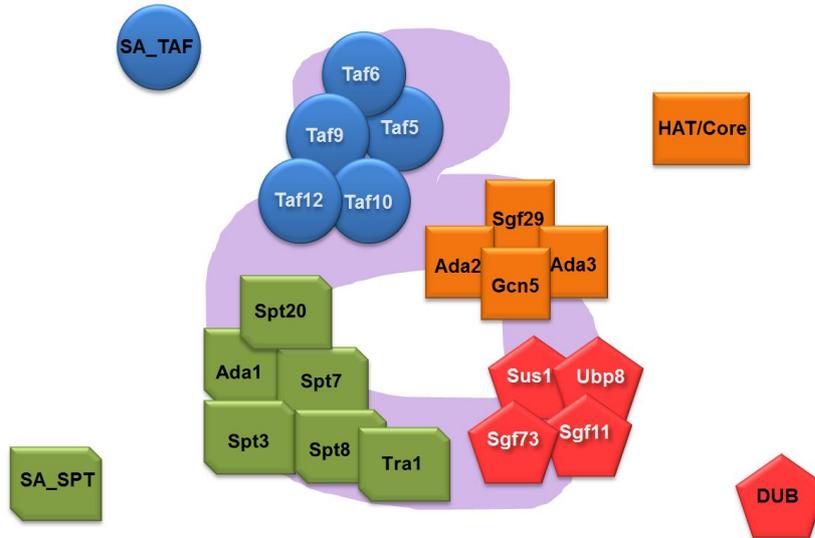


Figura 5. **Estructura modular del complejo SAGA.** Las subunidades de SAGA se encuentran situadas en cuatro módulos diferenciados. El módulo DUB, en rojo, está compuesto por Sgf11, Sus1, Sgf73 y la proteasa específica de ubiquitina Ubp8. El módulo HAT/Core, en naranja, contiene las subunidades Ada2, Ada3, Sgf29 y la histona acetiltransferasa Gcn5. El módulo SA_TAF, en azul, lo forma las subunidades TAFs. El módulo SA_SPT, en verde, está compuesto por las subunidades SPTs y las proteínas Ada1 y Tra1. La estructura global del complejo, mostrada en morado, está basada en el modelo propuesto a partir de datos obtenidos mediante microscopía electrónica (Wu *et al.*, 2004).

Durante la activación transcripcional SAGA se recluta sobre el promotor de los genes, donde la modificación de las histonas mediante su actividad HAT y DUB promueve el inicio

Introducción

de la transcripción. A su vez, estas modificaciones permiten el desplazamiento de los nucleosomas sobre la cromatina, facilitando la elongación. La actividad HAT de SAGA regula la activación transcripcional mediante la acetilación de la histona H3 (Kuo *et al.*, 1996; Balasubramanian *et al.*, 2002; Bhaumik & Green, 2002; Daniel *et al.*, 2004). El papel de SAGA durante la regulación transcripcional también implica su actividad desubicultinasa (Henry *et al.*, 2003; Daniel *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005; Shukla *et al.*, 2006). SAGA revierte la monoubicultinación de la histona H2B sobre la lisina 123 catalizada por Rad6 y Bre1 en respuesta a una señal de activación transcripcional. La monoubicultinación de H2B y su consiguiente desubicultinación a través de Ubp8 es a su vez esencial para la di- y trimetilación de H3K4, necesarias para activar la transcripción de los genes regulados por SAGA (Henry *et al.*, 2003; Shukla *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007; Weake & Workman, 2008; Nakanishi *et al.*, 2009). SAGA también es capaz de regular la transcripción de manera independiente a sus actividades enzimáticas. Las subunidades Spt3 y Spt8 actúan como adaptadores físicos, mediando la unión de TBP (TATA-binding protein) y del complejo PIC sobre los promotores de los genes dependientes de SAGA (Belotserkovskaya *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2003). Por otro lado, SAGA participa reclutando al mediador en el dominio de activación de genes específicos (Roberts & Winston, 1997; Lee *et al.*, 2010). El mediador es un complejo multiproteico que

Introducción

actúa como coactivador transcripcional, interaccionando directamente con los activadores, los GTFs, y la RNA Pol II (Taatjes, 2010).

La transcripción de los genes *GAL1* y *ARG1*

Existen distintos genes modelo regulados por SAGA en *S. cerevisiae* cuya activación transcripcional ha sido extensamente estudiada. Éste es el caso de los genes *GAL1* y *ARG1*. Ambos son elementos de sistemas de respuesta a nutrientes y su expresión está fuertemente regulada (Lohr, 1997). El gen *GAL1* codifica la enzima galactoquinasa, necesaria para que la célula pueda utilizar la galactosa como fuente de carbono (Johnston, 1987; Lohr *et al.*, 1995). Este gen está incluido en el regulón *GAL* de *S. cerevisiae*, el cual contiene tres genes necesarios para el metabolismo de la galactosa: *GAL1*, *GAL7* y *GAL10*. En relación a su expresión se pueden definir tres estados característicos dependiendo de la fuente de carbono disponible en el medio: estado inducido (en ausencia de glucosa y presencia de galactosa), estado no inducido (en ausencia de glucosa y presencia de otras fuentes de carbono, como rafinosa) o estado reprimido (en presencia de glucosa) (Houseley *et al.*, 2008). En ausencia de galactosa Gal80 inhibe a Gal4 interaccionando directamente con su dominio de activación (Johnston, 1987). En presencia de galactosa Gal3 secuestra al inhibidor Gal80 en el citoplasma,

Introducción

produciéndose la liberación de Gal4. La inducción génica se da a través de la unión del activador específico Gal4 a la región promotora de *GAL1*. El activador Gal4 ancla a SAGA al promotor de *GAL1* a través de su interacción con Tra1. Esta asociación queda estabilizada mediante la acción de la subunidad 19S RP del proteasoma (Bhaumik, 2011). El papel de la subunidad 19S RP del proteasoma también es esencial para el anclaje del mediador al promotor (Bhaumik, 2011). SAGA, principalmente a través de Spt3, ancla a la proteína TBP a la secuencia consenso TATA, permitiendo la formación del PIC y el inicio de la transcripción (Larschan & Winston, 2001; Bhaumik, 2011). Sorprendentemente, el sitio de unión de Gal4 en el promotor de *GAL1* se encuentra permanentemente libre de nucleosomas, de manera que Gal4 puede unirse a esta región sin que resulte necesaria la actuación de un remodelador de la cromatina (Lohr, 1984; Fedor & Kornberg, 1989; Cavalli & Thoma, 1993; Lohr, 1993). Bajo condiciones de no inducción, Gal4 se encuentra unido al promotor, preparando a las células para una inducción rápida en caso de que la galactosa esté disponible en el medio (Lohr *et al.*, 1995). Por último, bajo condiciones de crecimiento de no inducción sí existen nucleosomas posicionados sobre los sitios de unión de Gal4 en el promotor de *GAL1* (Lohr, 1984; Fedor & Kornberg, 1989; Cavalli & Thoma, 1993; Lohr, 1993). Estos nucleosomas ayudan a reprimir la expresión génica, aunque se ha observado una depleción parcial de nucleosomas en presencia

Introducción

de fuentes de carbono diferentes a la galactosa que permite una expresión parcial de *GAL1* (Han & Grunstein, 1988). La inducción por galactosa desencadena el desensamblaje de los nucleosomas dependiente de Gal4, lo que facilita el acceso de la maquinaria basal al promotor de *GAL1* (Lohr, 1997) (Figura 6A). Recientemente se ha descrito que el mantenimiento de los niveles y la estabilización de un RNA no codificante antisentido de *GAL10* es un proceso crítico durante la regulación de la transcripción de *GAL1*, aportando a la célula nuevos niveles de la regulación transcripcional de este gen (Geisler *et al.*, 2012).

Por otro lado, *S. cerevisiae* es capaz de inducir un programa de expresión de genes de respuesta a arginina cuando la célula detecta carencias de este aminoácido. Para ello, el gen *ARG1*, que codifica para la arginosuccinato sintetasa una enzima necesaria en la ruta de la biosíntesis de la arginina, se ha empleado como gen modelo de estudio. En relación a su expresión, se pueden definir dos estados característicos: estado inducido (en ausencia de arginina) y estado reprimido (en presencia de arginina). En presencia de arginina el complejo ArgR/Mcm1, compuesto por Arg80, Arg81, Arg82, y Mcm1, bloquea el promotor de *ARG1* reprimiendo su transcripción (Bechet *et al.*, 1970; Delforge *et al.*, 1975; Dubois *et al.*, 1987; Crabeel *et al.*, 1990; Qiu *et al.*, 1990; Crabeel *et al.*, 1995; Amar *et al.*, 2000; El Bakkoury *et al.*, 2000). Bajo

Introducción

condiciones de carencia de arginina, el activador transcripcional Gcn4 se une al promotor de *ARG1* activando su transcripción a través del reclutamiento de múltiples factores (Delforge *et al.*, 1975; Hinnebusch, 1986; Swanson *et al.*, 2003; Qiu *et al.*, 2004; Govind *et al.*, 2005). La unión de Gcn4 se da simultáneamente a la unión de SAGA, SWI/SNF, y el mediador (Govind *et al.*, 2005). Estos coactivadores junto con el remodelador RSC coordinan a su vez la unión de TBP, TFIID y la RNA Pol II al promotor, promoviendo la formación del PIC y la elongación de *ARG1* (Roeder, 2005). Además, se ha demostrado que la transcripción de *ARG1* depende negativamente de las modificaciones postraduccionales de histonas como la ubiquitinación de la histona H2B en la lisina 123 y la metilación de H3 en la lisina 4, promovidas por el complejo PAF (Crisucci & Arndt, 2012). Estas modificaciones inhiben la unión del activador Gcn4 al promotor de *ARG1* (Crisucci & Arndt, 2012). Sorprendentemente, en este mismo estudio se ha descrito que la acción del complejo PAF inhibe la transcripción antisentido a lo largo del promotor de *ARG1*, la cual regula positivamente la transcripción sentido de ese mismo gen (Crisucci & Arndt, 2012) (Figura 6B).

Introducción

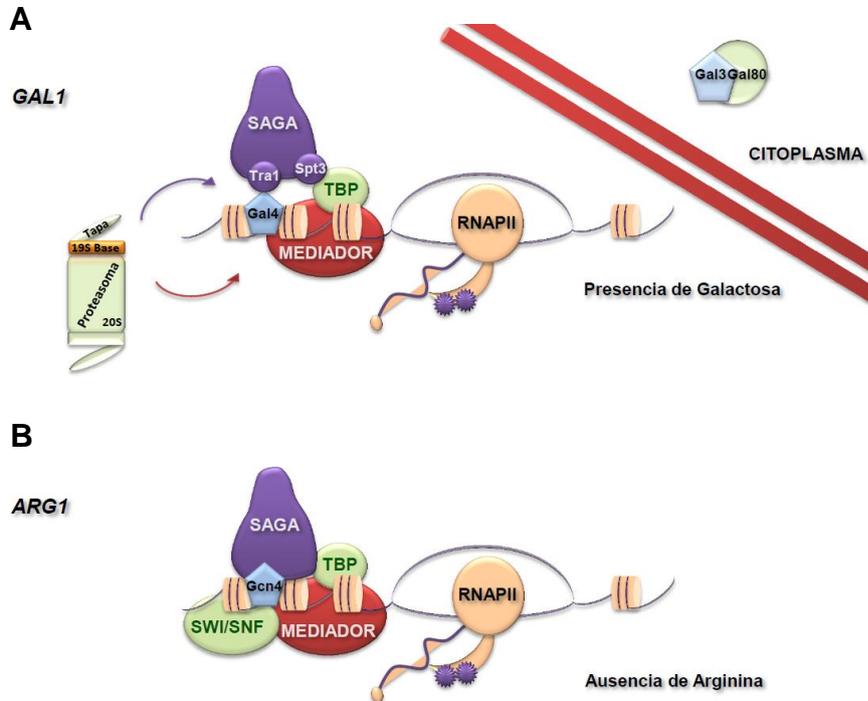


Figura 6. **Mecanismo de activación transcripcional de *GAL1* y *ARG1*.** (A) El gen *GAL1* se induce en presencia de galactosa. En esta situación Gal3 secuestra al inhibidor Gal80 en el citoplasma produciéndose la liberación de Gal4 en el núcleo. El activador Gal4 se une al promotor de *GAL1* facilitando la unión de SAGA a través de la subunidad Tra1. La interacción Gal4-SAGA queda estabilizada por la subunidad base de la región reguladora 19S del proteasoma. Esta misma subunidad es necesaria para la correcta unión del mediador a la cromatina. Por otro lado, SAGA ancla a la proteína TBP a la región TATA del promotor a través de Spt3. Los componentes unidos a *GAL1* conforman el PIC, el cual permite la entrada de la RNA Pol II y el inicio de la transcripción. (B) El gen *ARG1* se induce en ausencia de arginina. En este contexto el activador transcripcional Gcn4 se une al promotor de *ARG1*, lo que desencadena la unión de SAGA, SWI/SNF y el mediador. Estos coordinan a su vez la unión de TBP y la RNA Pol II, promoviendo la formación del PIC y la elongación de *ARG1*.

Elongación transcripcional de los mRNAs

La elongación transcripcional es un proceso dinámico donde diversos factores regulan la progresión de la RNA Pol II y múltiples complejos se coordinan para asegurar que la mRNP que se está sintetizando alcance sin ningún contratiempo su destino final. Al igual que ocurre durante el inicio de la transcripción, el desensamblaje de los nucleosomas es esencial para llevar a cabo la elongación del mRNA. Con tal de salvaguardar este impedimento la célula ha desarrollado diversos mecanismos, como son los factores modificadores y remodeladores de la cromatina y las chaperonas de histonas (Li *et al.*, 2007).

Además de participar durante el inicio de la transcripción, el modificador SAGA también está involucrado en la elongación del mRNA. SAGA es capaz de desensamblar los nucleosomas mediante su actividad modificadora de histonas HAT y DUB. El desensamblaje de los nucleosomas favorece el desplazamiento de SAGA desde el promotor hasta la región codificante de los genes. Además, la eliminación de la molécula de ubiquitina de la histona H2B llevada a cabo por Ubp8 es esencial para generar una elongación productiva (Govind *et al.*, 2007; Wyce *et al.*, 2007; Pascual-Garcia *et al.*, 2008). Concretamente, la acción de Ubp8 es necesaria para reclutar al complejo que contiene la quinasa Ctk1. Ésta fosforila el residuo de la Ser-2 del dominio CTD de la RNA Pol

Introducción

II (Wyce *et al.*, 2007). Durante el proceso de elongación el dominio CTD de la RNA Pol II incrementa su estado de fosforilación (Egloff *et al.*, 2012). Las modificaciones en el dominio CTD afectan a la capacidad de los distintos complejos implicados en la elongación transcripcional para asociarse con la RNA Pol II (Egloff *et al.*, 2012). La RNA Pol II es susceptible de pararse durante el proceso de la elongación. Así, para que la RNA Pol II lleve a cabo una elongación productiva necesita la intervención de distintos factores que van a intervenir en el proceso facilitando su progresión (Saunders *et al.*, 2006). Concretamente, la fosforilación del residuo de la Ser-2 del dominio CTD de la RNA Pol II por parte de Ctk1 es necesaria para el posterior reclutamiento de Set2 que metila la lisina 36 de la histona H3 (Briggs *et al.*, 2002; Krogan *et al.*, 2003; Youdell *et al.*, 2008) y facilita el reclutamiento del complejo Rpd3 (Carrozza *et al.*, 2005; Keogh *et al.*, 2005). Este complejo con actividad HDAC regula la transcripción de un buen número de genes bien activándolos o bien reprimiéndolos. Dentro de las funciones de SAGA durante la elongación, el componente del módulo DUB de SAGA, Sus1, copurifica con la forma elongante fosforilada de la RNA Pol II y con factores de exportación de mRNA (Pascual-García *et al.*, 2008). Por lo tanto, SAGA participa en el proceso de elongación a través de sus actividades enzimáticas y de su interacción con factores de exportación mediante Sus1.

Introducción

Los complejos remodeladores de la cromatina, como RSC, también facilitan el paso de la RNA Pol II durante la transcripción (Koyama *et al.*, 2002; Carey *et al.*, 2006). Se ha demostrado que el reclutamiento de este complejo a la cromatina es dependiente de la actividad de Gcn5 (Kastenmayer *et al.*, 2006).

Durante la elongación transcripcional la dinámica nucleosomal está también regulada por la presencia de chaperonas de histonas como Asf1, Spt6 y Spt16/FACT (Krogan *et al.*, 2002; Singer & Johnston, 2004; Adkins & Tyler, 2006; Schwabish & Struhl, 2006). Estas chaperonas participan tanto en el desensamblaje como en el reposicionamiento de los nucleosomas tras el paso de la RNA Pol II (Belotserkovskaya *et al.*, 2003; Mason & Struhl, 2003; Saunders *et al.*, 2003). Se ha descrito que la histona H2B ubiquitinada (H2BUB) regula el reensamblaje de los nucleosomas en el gen *GAL1*, cooperando con Spt16/FACT en el restablecimiento de la estructura de la cromatina y evitando los inicios crípticos de la transcripción (Fleming *et al.*, 2008).

Exportación de los mRNAs

La envoltura nuclear de eucariotas actúa como una barrera que separa física y funcionalmente los procesos que ocurren durante la expresión génica entre el núcleo y el citoplasma, como son la transcripción y la traducción. Esta

Introducción

compartimentalización hace necesaria una comunicación en forma de tráfico de moléculas entre el núcleo y el citosol, la cual tiene lugar a través del complejo del poro nuclear (NPC).

El NPC es una estructura multiproteica de alrededor de 30 proteínas diferentes. Estas proteínas llamadas nucleoporinas se organizan formando ocho bloques que configuran un octógono regular (Rout *et al.*, 2000; Taddei & Gasser, 2012). Este complejo tiene un tamaño de unos 66 MDa, en el caso de las levaduras (Rout *et al.*, 2000; Cronshaw *et al.*, 2002). La arquitectura básica del NPC se puede dividir en tres partes: la canasta nuclear, el dominio central y las fibrillas citoplasmáticas (Alber *et al.*, 2007; Alber *et al.*, 2007). Las nucleoporinas de tipo FG (repeticiones fenilalanina y glicina) presentan por un extremo un pequeño dominio estructural que sirve para anclarlos al resto del NPC y por el otro una región desestructurada donde se encuentran las repeticiones FG (Alber *et al.*, 2007; Alber *et al.*, 2007). Las nucleoporinas FG están implicadas en el transporte activo de los mRNAs, interaccionando directamente con los transportadores específicos de éstos, como Mex67-Mtr2. Esta interacción se da de manera transitoria facilitando el paso de las moléculas a través del NPC (Rexach & Blobel, 1995; Strasser *et al.*, 2000).

El mecanismo de transporte a través del NPC depende del tamaño de las moléculas. Por ejemplo, las moléculas de pequeño tamaño como iones y metabolitos difunden

Introducción

libremente a través del NPC. Por otro lado, las proteínas que realizan su función en el núcleo como las histonas, las DNA y RNA polimerasas, los factores de procesamiento de RNAs o los factores de transcripción son importados selectivamente desde el citosol. Finalmente, los RNAs sintetizados en el núcleo necesitan receptores de transporte específicos (Mex67-Mtr2) y energía para atravesar los NPCs y ser exportados al citoplasma. Entre estos RNAs se encuentran los mensajeros (mRNAs), que una vez en el citoplasma se traducen a proteínas; los de transferencia (tRNA), necesarios en la traducción de los mRNAs; los nucleares de pequeño tamaño (snRNAs) y los ribosomales (rRNAs), que son exportados al citosol para formar parte de las subunidades ribosomales. Los mRNAs difieren del resto de RNAs en tamaño, secuencia y estructura, y por lo tanto emplean estrategias diferentes a las del resto para ser exportados del núcleo (Kohler & Hurt, 2007).

En algunos casos se ha descrito que la activación de la transcripción tiene como resultado el acercamiento de la cromatina activa al NPC, permitiendo el contacto físico entre ambos (Brickner & Walter, 2004; Casolari *et al.*, 2005; Cabal *et al.*, 2006; Schmid *et al.*, 2006; Taddei *et al.*, 2006; Brickner *et al.*, 2007). El transcrito interacciona con las nucleoporinas FG y con el receptor de exportación Mex67-Mtr2. Debido al gran tamaño de la mRNP madura, es necesaria la energía del ATP para atravesar el poro. Esta energía es proporcionada por la

Introducción

helicasa Dbp5, la cual es reclutada por la maquinaria transcripcional en los primeros pasos de la transcripción (Hodge *et al.*, 1999; Estruch & Cole, 2003). Cuando el transcrito alcanza el NPC, Dbp5 se ancla a éste mediante su asociación con Nup159 y Gle1. Gle1 se une al inositol hexafosfato (IP6) y promueve la actividad RNA helicasa de Dbp5. Este mecanismo garantiza que la acción remodeladora de Dbp5 ocurra en el momento y lugar adecuados (Suntharalingam *et al.*, 2004; Weirich *et al.*, 2004). A medida que la mRNP atraviesa el NPC, Dbp5 se encarga de disociar el receptor de exportación Mex67 y otros factores a su paso por la cara citoplasmática del anillo nuclear (Lund & Guthrie, 2005). Una vez en el citoplasma, los mRNAs serán traducidos por los ribosomas en las proteínas correspondientes.

La coordinación entre los distintos pasos de la biogénesis del mRNA como la transcripción, el *capping*, el corte y empalme, el corte y la poliadenilación es necesaria para obtener mRNPs competentes de ser exportadas (Aguilera, 2005; Buratowski & Moazed, 2005; Cole & Scarcelli, 2006). Sólo aquellos mRNAs correctamente procesados serán exportados al citoplasma a través del NPC. De esta forma la célula adquiere otro nivel de regulación de la expresión génica. Las moléculas de mRNP defectuosas consecuencia de errores durante el procesamiento del mRNA son retenidas en el NPC por los mecanismos de control y degradadas por exonucleasas (Villa *et al.*, 2008). El NPC, además de cumplir su función

Introducción

principal en la regulación del tráfico entre el núcleo y el citoplasma, opera como un sistema de control donde sólo las mRNP correctamente formadas pueden salir al citoplasma. Este sistema incluye a las proteínas Mlp1 y Mlp2 (Galy *et al.*, 2004; Vinciguerra *et al.*, 2005). Estas dos proteínas forman unas fibrillas que se extienden desde la canasta del NPC, donde interactúan con Nup60 y Pml39 (Palancade *et al.*, 2005), hacia el espacio nucleoplasmático. Concretamente, las proteínas Mlps retienen aquellos mRNAs que contienen intrones (Galy *et al.*, 2004). Además, establecen contactos con las proteínas de exportación Yra1, Nab2 y Npl3, asegurando la correcta formación de la mRNP (Green *et al.*, 2003; Galy *et al.*, 2004; Vinciguerra *et al.*, 2005).

El complejo TREX-2: estructura y función

TREX-2 es un complejo multiproteico conservado cuya función principal es exportar los mRNAs en levaduras (Fischer *et al.*, 2002; Gallardo *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2004; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2004; Wilmes *et al.*, 2008; Faza *et al.*, 2009). TREX-2 se localiza en la cara nuclear del NPC y está constituido por la asociación estable de la proteína multi-dominio Sac3 junto con las subunidades Thp1, Cdc31 y Sus1 (Gallardo *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2004; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2004). Durante el desarrollo de esta tesis, se ha demostrado en varios estudios que Sem1 también forma parte

Introducción

integral de TREX-2 (Wilmes *et al.*, 2008; Faza *et al.*, 2009). Esta proteína pequeña y cargada negativamente se asocia con TREX-2 aumentando la estabilidad del complejo (Wilmes *et al.*, 2008; Faza *et al.*, 2009; Jani *et al.*, 2009). Aunque se desconoce la función concreta de Sem1 dentro del complejo se sabe que Sem1 se asocia con un amplio número de complejos conservados, incluyendo la subunidad reguladora 19S del proteasoma (Sone *et al.*, 2004; Pick *et al.*, 2009; Faza *et al.*, 2010).

Al igual que hemos visto en el caso del complejo SAGA, estudios estructurales han aportado información sobre cómo se organiza el complejo TREX-2. En un primer trabajo se identificó el dominio CID de Sac3, el cual adopta una conformación en hélice α alrededor de la cual se enrollan una molécula de Cdc31 y dos de Sus1 (Jani *et al.*, 2009). Sac3 se encuentra establemente asociada al poro nuclear a través de las nucleoporinas Nup1 y Nup60. Por otro lado, Sus1 y Cdc31 actúan sinérgicamente para estabilizar el macrocomplejo NPC-TREX-2. Sac3 y Thp1 interaccionan a través del dominio SAC3 (Jani *et al.*, 2009; Ellisdon *et al.*, 2012). Esta asociación hace posible la interacción con diversas nucleoporinas, contribuyendo así a la estabilización de la unión NPC-TREX-2 (Fischer *et al.*, 2002). Recientemente se ha resuelto un fragmento de la estructura cristalizada de TREX-2 correspondiente a Sac3-Thp1-Sem1 (Ellisdon *et al.*, 2012). El

Introducción

análisis de la estructura revela que TREX-2 está constituido por una parte central formada por Sac3, al cual se unen el resto de componentes. Sem1 se une directamente a Thp1 estabilizando la unión Sac3-Thp1 y facilitando el ensamblaje del complejo completo (Ellisdon *et al.*, 2012). Thp1 y Sac3 también interaccionan con la exportina Mex67-Mtr2 (Fischer *et al.*, 2002) (Figura 7). Estos datos sugieren que TREX-2 junto con el NPC podrían proporcionar una plataforma molecular fundamental para la unión con los mRNAs, y por lo tanto, para la coordinación entre los procesos de transcripción y exportación. Sem1, a través de su papel en la estabilización de TREX-2, podría participar indirectamente en la coordinación de la expresión génica (Ellisdon *et al.*, 2012).

Introducción

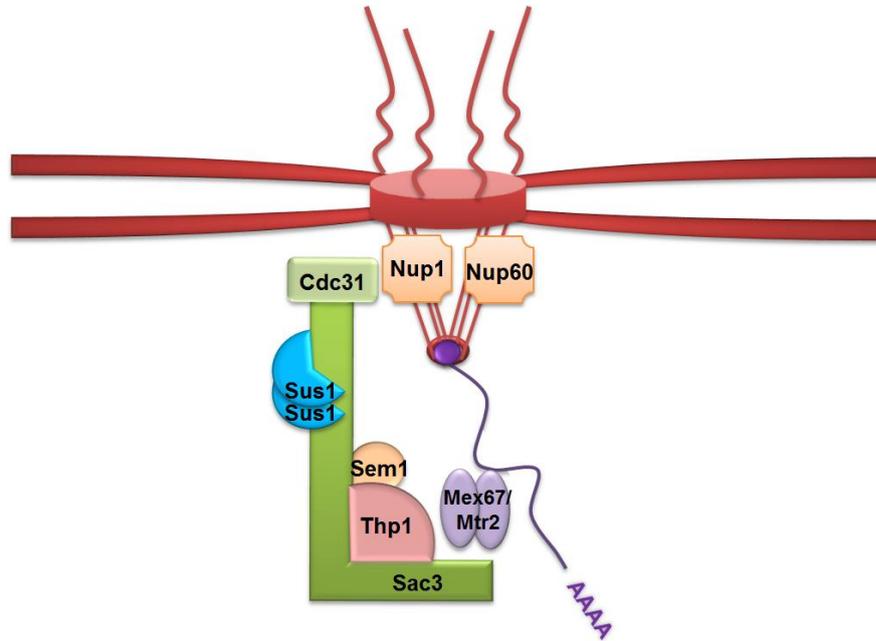


Figura 7. **Ilustración esquemática de la estructura del complejo TREX-2.** Sac3 actúa como soporte de todo el complejo anclando distintas proteínas a lo largo de su secuencia. La región C-terminal de Sac3 une Cdc31 y dos subunidades de Sus1. Ésta región se une a los componentes del poro nuclear Nup1 y Nup60. La región N-terminal de Sac3 une Thp1, la cual queda estabilizada por la proteína Sem1. Esta región N-terminal junto con Thp1 ancla los mRNAs a través de la interacción con Mex67/Mtr2. Esta interacción facilita la exportación de los mRNAs competentes a través del NPC.

TREX-2 facilita la asociación al poro de los genes transcripcionalmente activos, como *GAL1* (Blobel, 1985; Fischer *et al.*, 2004; Rodriguez-Navarro *et al.*, 2004; Cabal *et al.*, 2006) y favorece la memoria transcripcional así como la estabilidad genómica (Abruzzi *et al.*, 2006; Chekanova *et al.*,

Introducción

2008; Gonzalez-Aguilera *et al.*, 2008; Ahmed *et al.*, 2010; Light *et al.*, 2010; Egecioglu & Brickner, 2011; Tous *et al.*, 2011). El anclaje de los genes activos al poro tiene lugar mediante la asociación de TREX-2 a la cara nuclear del NPC por un extremo y a SAGA por el otro (Cabal *et al.*, 2006). Los mRNAs transcritos a partir de estos genes anclados se exportan con una mayor eficiencia a través de los poros (Brickner *et al.*, 2007). TREX-2 también participa en el establecimiento de la memoria transcripcional, donde los genes son retenidos en las inmediaciones del poro de forma postranscripcional con tal de generar una respuesta transcripcional más rápida en el caso de producirse una nueva señal (Abruzzi *et al.*, 2006; Chekanova *et al.*, 2008; Ahmed *et al.*, 2010; Light *et al.*, 2010). Las interacciones entre las proteínas Mlp1, Mex67 y distintas nucleoporinas también son importantes en este proceso (Egecioglu & Brickner, 2011). Por otro lado, la delección de alguno de los componentes de TREX-2 produce defectos en la transcripción e inestabilidad genómica (Gonzalez-Aguilera *et al.*, 2008).

Acoplamiento entre maquinarias de la expresión génica

Papel de la desubicitinación de H2B en el metabolismo de los mRNAs

La ubiquitinación de la histona H2B juega un papel esencial durante la regulación de la expresión génica. Se han descrito tres mecanismos moleculares mediante los cuales esta modificación afecta al transcurso de la transcripción: regula la accesibilidad de la maquinaria transcripcional al DNA, alterando la estructura de la cromatina; media el reclutamiento de factores que participan posteriormente en transcripción, mediante su activación o inhibición; y establece una comunicación en *trans* con otras histonas, provocando la consiguiente modificación en otras histonas que alteran a su vez la estructura y función de la cromatina (Zhang, 2003). La combinación de estos tres mecanismos es esencial en la coordinación de la expresión génica.

Cuando la célula recibe una señal ambiental que marca el inicio de la transcripción, los diferentes activadores se unen al promotor de los genes que se van a activar. Esto permite el ensamblaje de la maquinaria basal. Seguidamente, la fosforilación de la cola CTD de la RNA Pol II y el reclutamiento del complejo PAF permiten que las subunidades Rad6/Bre1 catalicen la ubiquitinación de H2B (Xiao *et al.*, 2005). Por otro

Introducción

lado, el complejo quinasa dependiente de ciclina, Bur1/Bur2, fosforila Rad6 y facilita el reclutamiento de PAF, contribuyendo a la actividad de Rad6/Bre1 (Laribee *et al.*, 2005; Wood *et al.*, 2005). El complejo PAF también actúa reclutando al complejo COMPASS sobre la RNA Pol II. COMPASS contiene una metiltransferasa de H3K4 llamada Set1. De esta forma PAF ayuda a establecer una red de interacciones que produce una comunicación en *trans* entre la ubiquitinación de la histona y la metilación (Ng *et al.*, 2002; Krogan *et al.*, 2003). Este mecanismo de comunicación viene mediado por Cps35, una subunidad de COMPASS necesaria para su actividad metiltransferasa (Lee *et al.*, 2007). Rad6/Bre1 ubiquitinan directamente a Cps35, el cual a su vez controla el reclutamiento de Spp1, otra subunidad de COMPASS necesaria para la trimetilación en H3K4 (Vitaliano-Prunier *et al.*, 2008).

La ubiquitinación de H2B también regula la dinámica de la cromatina durante la elongación transcripcional, afectando a su accesibilidad (Pavri *et al.*, 2006; Shukla & Bhaumik, 2007; Tanny *et al.*, 2007). H2Bub promueve la actividad del complejo remodelador FACT (Pavri *et al.*, 2006), el cual reorganiza la cromatina bien para facilitar el paso de la RNA Pol II elongante o bien para restaurar su estructura una vez finalizada la transcripción, previniendo así la transcripción críptica (Fleming *et al.*, 2008; Xin *et al.*, 2009). Por otro lado, H2BUB estabiliza

Introducción

los nucleosomas en el promotor (Chandrasekharan *et al.*, 2009), e interfiere con el orden superior de compactación de la cromatina dando lugar a una estructura accesible (Fierz *et al.*, 2011). Se especula que estos efectos contrarios podrían formar parte de distintos mecanismos en la regulación de la cromatina.

La ubiquitinación de H2B también desempeña un papel regulador durante el proceso de exportación de los mRNAs. El estudio llevado a cabo en el laboratorio de la Dra. Dargemont revela que la ubiquitinación de H2B controla la formación de mRNPs competentes (Vitaliano-Prunier *et al.*, 2012). En ausencia de ubiquitinación la exportación de los mRNAs queda bloqueada. Además, este efecto también se observa cuando el componente de COMPASS, Swd2, no se ubiquitina. Por lo tanto, la ubiquitinación de H2B y Swd2 es necesaria para la asociación de la maquinaria de exportación con el mRNA y su correcta actividad.

La complejidad del mecanismo por el que la ubiquitinación de H2B regula la expresión génica también se ve reflejada en el papel no menos importante que ejerce su desubiquitinación. Existen distintas enzimas desubiquitinasa en levadura. Como se ha citado anteriormente, Ubp8 y Ubp10 son las encargadas de desubiquitar la histona H2B (Henry *et al.*, 2003; Daniel *et al.*, 2004; Emre *et al.*, 2005; Gardner *et al.*,

Introducción

2005). Ubp8 forma parte del complejo SAGA y su actividad requiere el ensamblaje del módulo DUB completo (Ingvarsdottir *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005; Kohler *et al.*, 2010; Samara *et al.*, 2010). Ubp8 regula positivamente la transcripción y su eliminación altera los niveles de metilación de H3 en las lisinas K4 y K36 (Henry *et al.*, 2003; Daniel *et al.*, 2004). La presencia de ubiquitina en H2B impide el reclutamiento a la cromatina de la quinasa dependiente de ciclina Ctk1 (Wyce *et al.*, 2007). Ésta es necesaria para fosforilar la cola CTD de RNA Pol II, la cual promueve el reclutamiento de Set2 y la metilación de H3K36 durante la elongación (Krogan *et al.*, 2003; Krogan *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2003). Por lo tanto, H2BUb debe ser desubicitinada por Ubp8 para la correcta progresión de la elongación (Wyce *et al.*, 2007). Por otra parte, Ubp10 ejerce su función preferentemente en los telómeros. Es responsable de mantener bajos los niveles de H2B ubiquitinada, y por consiguiente de H3K4 y H3K79 metilados. Estos niveles bajos de marcas de histonas promueven la asociación de la desacetilasa de histonas Sir2 en los telómeros, manteniendo el silenciamiento de la cromatina telomérica (Emre *et al.*, 2005; Gardner *et al.*, 2005). Ubp8 no es necesaria para el silenciamiento de los telómeros, indicando que cada enzima DUB actúa en distintas regiones de la cromatina regulando conjuntos diferentes de histona H2B (Schulze *et al.*, 2011).

Introducción

La desubicitinación de H2B también es importante durante la exportación de los mRNAs. De hecho, los componentes del módulo DUB de SAGA, Sus1 y Sgf11 están directamente implicados en la exportación (Kohler *et al.*, 2006), mientras que Ubp8 y Sgf73 están implicados en la exportación de mRNAs específicos, como por ejemplo *GAL1* (Kohler *et al.*, 2008). A pesar de estos datos, se desconoce el mecanismo por el cual la desubicitinación de la histona H2B regula la exportación de los mRNAs.

Finalmente, la regulación de la transcripción mediante la ubiquitinación también puede ejercerse a través de los factores transcripcionales, bien sea regulando sus niveles, mediante la degradación del proteasoma; o su actividad, mediante marcas de ubiquitina no degradativas. Las marcas de ubiquitina también pueden afectar a la interacción entre proteínas y a la localización celular, lo que puede alterar significativamente el proceso de la expresión génica.

En resumen, H2BUb actúa como una marca polivalente que desempeña distintas funciones en la regulación de la expresión génica. La ubiquitinación de H2B regula la transcripción a través de la comunicación entre marcas de histonas, mediante el control de la dinámica de la cromatina, interfiriendo en la estructura cromatínica de orden superior y regulando la exportación de los mRNAs, mientras que su

Introducción

desubicitinación es esencial para la progresión de la elongación y la correcta exportación. Además, la ubiquitinación de proteínas no histonas añade un nivel más de complejidad al proceso. Trabajos en el futuro deberán aclarar las bases moleculares por las que la ubiquitinación y desubicitinación de la histona H2B, así como de otras proteínas, actúan a lo largo de la expresión génica.

La coordinación entre los complejos SAGA y TREX-2, la proteína Sus1

La coordinación entre los distintos pasos de la biogénesis del RNA mensajero está mediada por las interacciones físicas que tienen lugar entre los factores involucrados a lo largo del proceso. De hecho, las proteínas involucradas en los primeros pasos de la transcripción interactúan con proteínas de las últimas etapas, como componentes del NPC, de la maquinaria de exportación y otros factores de exportación. Estos últimos son reclutados al transcrito durante los primeros pasos de la transcripción (Luna *et al.*, 2008; Schmid & Jensen, 2008). Muchas de estas interacciones físicas se establecen entre componentes de los complejos SAGA y TREX-2, permitiendo la correcta transcripción y exportación de las mRNPs a través del NPC. Por ejemplo, se ha observado que la subunidad de SAGA Tra1 copurifica con Thp1 en experimentos de purificación TAP (Fischer *et al.*, 2002). Del mismo modo, al purificar el factor de

Introducción

SAGA Ada2, se copurifican las proteínas de TREX-2 Sac3 y Thp1 (Kohler *et al.*, 2008). Por otro lado, se ha detectado mediante filtración en gel la existencia de un macrocomplejo que contiene proteínas de ambos complejos (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2004). Atendiendo a estos datos, la idea de una coordinación entre ambos complejos que facilite la activación transcripcional y la modificación de histonas junto con la exportación de los mRNA, cobra peso.

Sus1 tiene un papel potencial como coordinador de los complejos SAGA y TREX-2, ya que es un componente común a ambos complejos. Sus1 posee características peculiares en su secuencia codificante, lo que confiere un gran interés a su estudio. Sus1 es una proteína pequeña de 11 kDa y 441 nt. A diferencia de la mayoría de genes de levadura, los cuales están desprovistos de intrones, *SUS1* posee dos intrones. Los intrones de levadura poseen señales de corte y empalme conservados (Bon *et al.*, 2003), pero en *SUS1* estas señales no son canónicas (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2004; Hossain *et al.*, 2009; Pascual-García & Rodríguez-Navarro, 2009). Esta estructura genómica característica de *SUS1* está conservada evolutivamente (Cuenca-Bono *et al.*, 2011). Estos datos sugieren una regulación compleja del proceso de corte y empalme en este gen, poniéndose de manifiesto la importancia biológica de los intrones de Sus1 en la regulación de su propia expresión (Hossain *et al.*, 2011). El control minucioso de la expresión de Sus1 afecta a procesos fundamentales en la

Introducción

célula como son la correcta coordinación entre la transcripción y la exportación. Por otro lado, el análisis de las estructuras de cristal resueltas tanto para la unión de Sus1 a TREX-2, a través de Sac3 (Ellisdon *et al.*, 2012); como para la unión de Sus1 a SAGA, a través de Sgf11 (Samara *et al.*, 2012), ayudarán a elucidar el mecanismo molecular por el cual se coordinan estos complejos a través de Sus1. Durante el proceso de la activación transcripcional, Sus1 es incorporado al promotor de los genes a través de SAGA. La fosforilación de la RNA Pol II durante la elongación facilita la unión de Sus1 a lo largo de la región codificante. Tanto SAGA como TREX-2 son necesarios para esta asociación a la ORF. Sus1 coinmunoprecipita con Mex67 y Yra1, lo que sugiere que su unión a la forma elongante de la RNA Pol II se produce a través de estos factores (Pascual-Garcia *et al.*, 2008). La interacción de Sus1 con los factores de exportación, así como con los complejos SAGA y TREX-2 facilita la rápida inducción y transcripción de los genes regulados por SAGA. De acuerdo con esta coordinación, se ha visto que todas las subunidades de TREX-2 son necesarias para la correcta elongación de transcritos largos. Por otro lado, también se ha observado que la interacción entre SAGA y TREX-2 media el posicionamiento de los genes dentro del núcleo en condiciones de activación transcripcional (Cabal *et al.*, 2006; Chekanova *et al.*, 2008) (Figura 8). Estos datos bioquímicos sugieren que SAGA y TREX-2 actúan sinérgicamente para incorporar a Sus1 a la

Introducción

cromatina, promoviendo la activación transcripcional y asegurando la eficiencia de la elongación y exportación de los mRNA (Govind *et al.*, 2007; Wyce *et al.*, 2007; Gonzalez-Aguilera *et al.*, 2008; Pascual-Garcia *et al.*, 2008; Faza *et al.*, 2009).

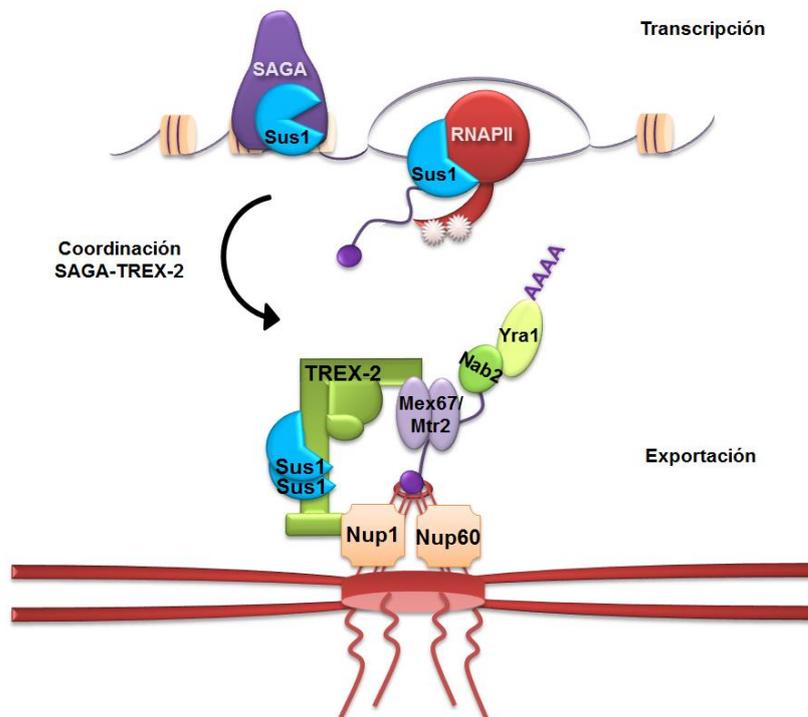


Figura 8. **Coordinación entre SAGA y TREX-2 a través de Sus1.** Sus1 participa en distintas etapas de la biogénesis del mRNA. El complejo SAGA, del cual Sus1 es parte estructural y funcional, es necesario durante el inicio de la transcripción. Sus1 también se une a la ORF de los genes, interviniendo durante la elongación transcripcional. Finalmente, Sus1 forma parte del complejo TREX-2, encargado de exportar los mRNAs competentes del núcleo al citoplasma. TREX-2 acerca los genes transcripcionalmente activos al entorno del poro a través de su interacción con Mex67/Mtr2 y las nucleoporinas. Por lo tanto, Sus1 coordina los procesos de transcripción y exportación a través de SAGA y TREX-2, haciendo el proceso de la expresión génica más eficiente.

Introducción

En el futuro, serán necesarios trabajos que aclaren las bases moleculares por las que SAGA y TREX-2 se coordinan durante la expresión génica.

La coordinación SAGA-TREX-2 en el contexto celular

Como hemos visto, la coordinación entre SAGA y TREX-2 es fundamental para la biogénesis del mRNA. Sin embargo, hay que tener en cuenta que esta coordinación tiene lugar dentro de un contexto celular donde otros complejos y mecanismos influyen sobre la expresión génica proporcionando a la célula una red compleja para su regulación.

El NPC es un ejemplo de la complejidad con que la célula regula la expresión génica. Actúa como una plataforma donde las diferentes etapas de la transcripción tienen lugar (Akhtar & Gasser, 2007; Brown & Silver, 2007; Ahmed *et al.*, 2010; Dieppois & Stutz, 2010). Los múltiples factores que actúan en las etapas iniciales de la transcripción, así como durante la exportación establecen multitud de conexiones con las nucleoporinas promoviendo el anclaje de los genes a la periferia nuclear y aumentando la eficiencia de la exportación. (Blobel, 1985; Cabal *et al.*, 2006; Dieppois *et al.*, 2006; Kurshakova *et al.*, 2007; Chekanova *et al.*, 2008; Kohler *et al.*, 2008). La interacción entre TREX-2 y SAGA media la unión de los genes al entorno del NPC bajo condiciones de activación

Introducción

transcripcional, de esta forma la procesividad de la transcripción y la estabilidad del genoma quedan aseguradas (Cabal *et al.*, 2006; Chekanova *et al.*, 2008; Gonzalez-Aguilera *et al.*, 2008; Pascual-Garcia *et al.*, 2008; Faza *et al.*, 2009; Capelson *et al.*, 2010). Algunos componentes de SAGA interaccionan directamente con proteínas del NPC, como Mlp1. Ésta es necesaria para el correcto anclaje de los genes al poro durante la activación transcripcional (Dieppois *et al.*, 2006; Luthra *et al.*, 2007; Tan-Wong *et al.*, 2009). Sus1 también es necesaria para establecer la asociación física entre TREX-2, SAGA y el NPC mediante su unión a la nucleoporina Nup1 (Fischer *et al.*, 2004; Kohler *et al.*, 2008; Jani *et al.*, 2009). Otras nucleoporinas como Nup2 y Nup60, ambas constituyentes de la región nucleoplasmática del NPC, también han sido identificadas como necesarias para la asociación gen-NPC (Casolari *et al.*, 2004; Fischer *et al.*, 2004; Schmid *et al.*, 2006; Kohler *et al.*, 2008; Jani *et al.*, 2009). Todas estas interacciones son necesarias para que la cromatina y la maquinaria transcripcional contacten con el NPC. De hecho, se ha demostrado que la maquinaria de exportación de los mRNAs, TREX-2, es crucial en el reclutamiento de los genes activos, como *GAL1* o *INO1*, a los NPCs (Cabal *et al.*, 2006; Taddei *et al.*, 2006; Akhtar & Gasser, 2007; Taddei, 2007; Ahmed *et al.*, 2010; Light *et al.*, 2010). Recientemente se ha descrito el mecanismo molecular por el cual el gen *INO1* se ancla al NPC (Ahmed *et al.*, 2010). Este mecanismo está

Introducción

regulado por dos secuencias de DNA situadas en su propio promotor, llamadas GRS I y GRS II (*gene recruitment sequences*) (Ahmed *et al.*, 2010). Estas secuencias difieren de aquellas regiones del promotor que controlan la transcripción de *INO1* (Ambroziak & Henry, 1994; Bachhawat *et al.*, 1995; Schwank *et al.*, 1995). Los elementos GRS actúan como códigos de DNA que anclan la cromatina a la periferia del núcleo, interaccionando físicamente con el NPC. Las mutaciones en las secuencias GRS bloquean el anclaje del gen a la periferia, produciendo defectos en la transcripción. Este resultado apoya la idea de que el anclaje al NPC facilita el proceso de la transcripción (Ahmed *et al.*, 2010). Por otra parte, la localización de *INO1* al NPC en condiciones de represión requiere otro código de DNA llamado MRS (*memory recruitment sequence*) (Light *et al.*, 2010). Por lo tanto, mientras GRS media la unión de *INO1* al NPC en condiciones de activación transcripcional para promover la transcripción, el anclaje mediado por MRS bajo condiciones de represión prepara al gen para una reactivación transcripcional rápida y eficiente (Light *et al.*, 2010). Estos dos mecanismos de anclaje requieren asociaciones entre diferentes proteínas del NPC y la maquinaria transcripcional. Algunos factores participan en los dos mecanismos de anclaje, como las nucleoporinas Nup60, Nup1 y Nup2 y algunos componentes de TREX-2 y SAGA. Sus1 participa directamente en ambos mecanismos de anclaje, indicando que la coordinación y estabilización del

Introducción

macrocomplejo TREX-2-SAGA-NPC es esencial para la regulación génica. Al NPC también se le han atribuido otras funciones durante la regulación transcripcional, en coordinación con los complejos SAGA y TREX-2. La asociación preferente de las proteínas Nup2 y Mlps con las regiones terminales de genes activos sugiere que el NPC puede ayudar a establecer dominios de cromatina activa organizando el DNA en una conformación de lazo (Gerasimova *et al.*, 2000; Burgess-Beusse *et al.*, 2002; Ishii *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2004; Casolari *et al.*, 2005; Noma *et al.*, 2006; Schmid *et al.*, 2006). La organización de la cromatina en lazos produce una interacción física entre las regiones 5' y 3' de los genes activos que está mediada por interacciones entre la maquinaria transcripcional y factores que intervienen en el procesamiento de la región 3' de los mRNAs (Ansari & Hampsey, 2005) (O'Sullivan *et al.*, 2004; Singh & Hampsey, 2007; Perkins *et al.*, 2008; Hampsey *et al.*, 2011). Recientemente, se ha propuesto que esta conformación en lazo facilita el reciclado de factores transcripcionales así como de la RNA Pol II durante rondas sucesivas de transcripción (Luna *et al.*, 2008). Este mecanismo aumenta la eficiencia de la expresión génica (Luna *et al.*, 2008). Por otro lado, el papel que juegan las secuencias 3' UTR de algunos genes en el anclaje al NPC refleja su función en la estabilización de los lazos (Abruzzi *et al.*, 2006; Taddei *et al.*, 2006). En este sentido, se ha demostrado que Mlp1 se asocia con ambos extremos de los genes anclados al NPC,

Introducción

manteniendo la conformación en lazo una vez finalizada la transcripción (Tan-Wong *et al.*, 2009). Por lo tanto, Mlp1 actúa estabilizando la estructura de lazo formada tras la activación transcripcional incluso después de la retirada de la RNA Pol II del DNA molde. La estructura de lazo formada por la interacción de la cromatina con el NPC proporciona un ambiente molecular con alta concentración de factores de transcripción, lo que permite una rápida unión de la maquinaria transcripcional con la cromatina y, por lo tanto, una rápida reactivación transcripcional tras un corto período de represión. A este fenómeno se le ha denominado MGL (*memory gene loop*) (Laine *et al.*, 2009; Tan-Wong *et al.*, 2009). En este contexto, SAGA y TREX-2 juegan un papel importante en el establecimiento de un anclaje eficiente entre la cromatina y el NPC, estabilizando las interacciones gen-NPC durante la activación transcripcional (Dieppois *et al.*, 2006; Luthra *et al.*, 2007; Tan-Wong *et al.*, 2009).

Dentro del contexto celular, el proteasoma es un ejemplo de cómo otros complejos influyen en la coordinación SAGA-TREX-2. El proteasoma ha sido relacionado con la periferia nuclear y con SAGA (Enenkel *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2005; Sexton *et al.*, 2007; Nagai *et al.*, 2008; Bhaumik, 2011). El proteasoma es la maquinaria proteolítica encargada de degradar proteínas poliubiquitinadas en la célula eucariota (Voges *et al.*, 1999; Coux, 2002). Éste consiste en dos

Introducción

subcomplejos, la partícula proteolítica 20S y la regulatoria 19S. El proteasoma completo está formado por dos partículas 19S ancladas a ambos extremos de una partícula 20S. La subunidad 19S ancla y despliega las proteínas ubiquitinadas empleando la energía del ATP, mientras que 20S posee la actividad proteolítica (Voges *et al.*, 1999; Coux, 2002). 19S se divide además en otros dos subcomplejos, la base y la tapa (Glickman *et al.*, 1999; Voges *et al.*, 1999; Coux, 2002; Bhaumik & Malik, 2008). La base contiene actividad ATPasa, utilizada para desplegar las proteínas facilitando así su incorporación en 20S. La tapa está compuesta por 8 proteínas, entre ellas Sem1, y se encarga de atrapar las cadenas de ubiquitina para iniciar su proceso de proteólisis en el proteasoma. (Larsen & Finley, 1997; Voges *et al.*, 1999; Coux, 2002). Como ya hemos mencionado, la actividad proteolítica del proteasoma puede regular la expresión génica controlando la abundancia de factores transcripcionales y alterando su localización celular (Bhaumik & Malik, 2008; Kwak *et al.*, 2011). De hecho, las subunidades del proteasoma están implicadas en distintas etapas de la transcripción, como por ejemplo el inicio y la formación del PIC y la elongación y terminación (Gillette *et al.*, 2004). En levaduras, la mutación de cualquier subunidad del proteasoma altera significativamente los niveles del 70% de los transcritos globales (Sikder *et al.*, 2006), ya sean genes regulados por el coactivador SAGA o por TFIID (Lee *et al.*, 2000; Huisinga & Pugh, 2004; Bhaumik & Malik,

Introducción

2008). Sorprendentemente, los genes son sub o sobreexpresados dependiendo de si la subunidad mutada pertenece a la subunidad 20S o 19S. Además, existen estudios donde se ha asociado la función de la subunidad 19S a la regulación de los genes dependientes de SAGA, mientras que 20S parece estar implicado en regular genes ribosomales controlados por el complejo TFIID (Fleming *et al.*, 2002; Dembla-Rajpal *et al.*, 2004; Sikder *et al.*, 2006; Sulahian *et al.*, 2006). Estos datos sugieren una correlación durante el proceso transcripcional entre las subunidades 19S y 20S con los complejos SAGA y TFIID respectivamente. De hecho, el laboratorio del Dr. Workman ha propuesto un modelo bioquímico mediante el cual 19S puede regular genes dependientes de SAGA (Lee *et al.*, 2005; Auld *et al.*, 2006; Bhaumik, 2011). La base de 19S RP estabiliza la interacción entre el activador Gal4 y SAGA, independientemente de la partícula 20S y la subunidad de la tapa de 19S a la que pertenece Sem1. Esta estabilización implica un cambio conformacional en SAGA, que requiere energía del ATP, para facilitar su asociación con Gal4. Por otro lado, la base de 19S también promueve la desestabilización de la asociación entre el activador y el promotor empleando para ello el ATP. Esta desestabilización tiene lugar cuando el activador Gal4 no se encuentra monoubicuitinado (Ferdous *et al.*, 2007). Además del papel de 19S en la regulación de las interacciones activador-promotor/coactivador, también se ha visto implicado

Introducción

en la formación del PIC en el promotor de *GAL1*. En este caso 19S estabiliza la red de interacciones formadas entre Gal4-SAGA y el mediador (Malik *et al.*, 2009) (Figura 9).

Por lo tanto, sólo las subunidades de la base de 19S del proteasoma están implicadas en la activación transcripcional de los genes regulados por SAGA, las subunidades de la tapa de 19S quedan excluidas de esta regulación (Malik *et al.*, 2009). Sorprendentemente, la subunidad de la tapa de 19S, Sem1, forma parte de TREX-2 de manera independiente del proteasoma (Funakoshi *et al.*, 2004; Sone *et al.*, 2004; Wilmes *et al.*, 2008; Faza *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2010). Sem1 es esencial para la estabilización de TREX-2, promoviendo la recolocación del DNA al NPC y la exportación de los mRNAs (Thakurta *et al.*, 2005; Mannen *et al.*, 2008; Faza *et al.*, 2009).

Introducción

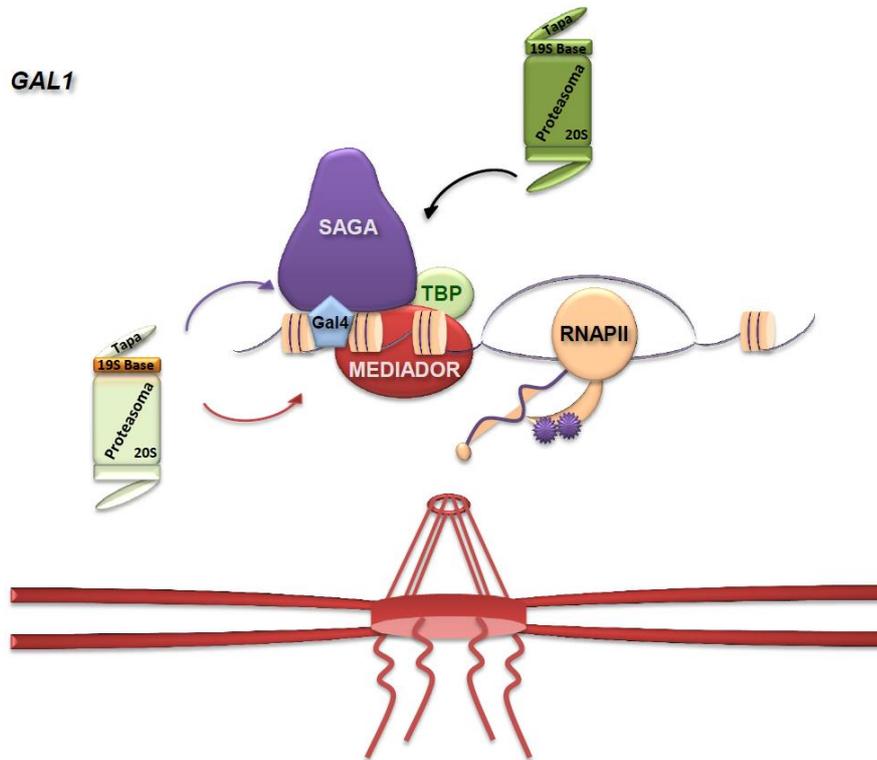


Figura 9. **Regulación de la transcripción génica a través del proteasoma.** El proteasoma es capaz de regular la expresión génica a distintos niveles. La región base de la subunidad reguladora 19S del proteasoma participa durante el inicio de la transcripción, estabilizando la interacción entre el activador y SAGA y entre el mediador y la cromatina. Por otro lado, el proteasoma es capaz de regular la concentración de componentes necesarios para la transcripción a través de su actividad proteolítica. Además, esta actividad es necesaria para degradar el activador Gal4 y permitir la elongación de la RNA Pol II.

Introducción

Otro ejemplo de como la coordinación SAGA-TREX-2 viene mediada por otros mecanismos celulares, lo ilustra el efecto barrera de la cromatina. Mediante análisis masivos se ha identificado que varias subunidades de SAGA actúan como elementos barrera (Oki *et al.*, 2004). La subunidad de SAGA, Ada2, se ancla a los telómeros de levadura actuando como un elemento barrera y previniendo la propagación de la heterocromatina (Jacobson & Pillus, 2009). Además, el homólogo en *Drosophila melanogaster* del componente de SAGA/TREX-2, Sus1 (Eny2), actúa como aislador cromatínico en conjunto con Su(Hw) y Wari (Kurshakova *et al.*, 2007; Erokhin *et al.*, 2010). Por lo tanto, las subunidades de SAGA parecen participar en el silenciamiento de la cromatina además de en la activación transcripcional (Jacobson & Pillus, 2009). Este papel de SAGA se desarrolla en la proximidad del poro nuclear. El contacto directo entre componentes de SAGA y los componentes Mlp1 y Nup1 del NPC (Fischer *et al.*, 2002; Luthra *et al.*, 2007) es necesario para el establecimiento de elementos barrera en el poro nuclear. Además, estas dos proteínas son esenciales para estabilizar la interacción gen-NPC durante la activación transcripcional en coordinación con TREX-2. En resumen, estos datos sugieren que muchos genes se asocian a los poros nucleares a través de SAGA-TREX-2-NPC, utilizándolos como puntos de anclaje para regular su expresión. La regulación génica en el contexto del NPC es de gran importancia funcional ya que se ha demostrado una

Introducción

relación directa con la manifestación de enfermedades del desarrollo y de cáncer (Capelson & Hetzer, 2009; Kohler & Hurt, 2010).

Otro mecanismo que puede afectar la coordinación SAGA-TREX-2 durante la transcripción tiene que ver con la maquinaria de control de la replicación. Con el objetivo de solventar la replicación de los genes transcripcionalmente activos y evitar la inestabilidad de la horquilla y el bloqueo del ciclo celular, la célula libera los genes activos de su anclaje a los poros nucleares. El mecanismo molecular que facilita esta segregación comienza con la activación de las quinasas Mec1/Tel1, implicadas en la respuesta de control del ciclo celular, sobre la horquilla de replicación bloqueada. Mec1/Tel1 activan a su vez a la quinasa Rad53, la cual fosforila a diversas nucleoporinas, como Mlp1, Nup1 y Nup60 con el fin de desestabilizar el macrocomplejo SAGA-TREX-2-NPC y facilitar la correcta replicación de la cromatina transcripcionalmente activa. De hecho, se ha demostrado que el defecto de replicación observado en ausencia de Rad53, donde la cromatina transcripcionalmente activa es incapaz de liberarse del poro, se suprime en aquellos mutantes en los que el anclaje de los genes al poro no tiene lugar. Entre los mutantes, cuya delección suprime el fenotipo mostrado por *rad53Δ*, encontramos a los componentes de TREX-2 Sac3, Thp1 y Sus1, distintos componentes del complejo THO y

Introducción

algunos factores del poro nuclear (Bermejo *et al.*, 2011). Estos datos indican que la transcripción es un proceso vinculado con la replicación en el contexto del NPC con el objetivo de mantener la integridad genómica en la célula. La coordinación de la transcripción y la exportación implica el anclaje de los mRNAs al poro nuclear, lo que genera un estrés de torsión en la cromatina. En este sentido, los eucariotas han desarrollado una respuesta que solventa la tensión topológica, permitiendo la progresión de la horquilla de replicación.

OBJETIVOS

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral hemos profundizado en el estudio de la regulación de la expresión génica a través de la coordinación entre los mecanismos de transcripción y exportación de las moléculas de RNA mensajero. La RNA Pol II se encarga de transcribir el DNA en mRNA, que posteriormente será traducido a proteína en el citoplasma. Durante este proceso diversas maquinarias moleculares actúan a lo largo del espacio y el tiempo, acoplándose y coordinándose para regular cada etapa de la expresión génica. Esta acción combinada asegura el éxito de cada etapa, ya que de lo contrario, existen sistemas que actúan como puntos de control de la transcripción y la formación de la mRNP que activan las maquinarias de degradación y retención de los transcritos malformados.

El objetivo fundamental de esta tesis ha sido identificar factores relacionados con la proteína Sus1, y para ello se establecieron dos objetivos principales:

1. Estudiar la relación física y funcional de Sus1 con distintos factores involucrados en la biogénesis del mRNA
2. Estudiar el papel de Sem1 en el contexto de la coordinación SAGA-TREX-2 durante el inicio de la transcripción

MATERIALES

Anticuerpos

En el desarrollo de esta tesis se han utilizado los siguientes anticuerpos a las concentraciones de trabajo indicadas para el análisis por *Western blot* (WB), inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) o inmunoprecipitación de proteínas (IP). Para la detección de la inmunotinción se ha utilizado el revelador *ECL Advance* o *ECL Prime*, de GE Healthcare.

Anticuerpos primarios

Nombre	Dilución	Origen
Ratón Anti-MYC	1:2.000 (WB) 2 µg (ChIP/IP)	Santa Cruz 9E10 Santa Cruz 9E10X
Conejo Anti-TAP	1:5.000	Thermo Scientific
Conejo Anti-SEM1	1:10.000	Kobayashi
Conejo Anti-H3	1:1.000	Abcam 1791
Ratón Anti-Flag	1:2.000	Sigma M2 F3165
Rata Anti-HA	1:1.000 (WB) 8 µg (ChIP/IP)	Roche 12CA5
Ratón Anti-PK	1:2000	ABD Serotec
Conejo Anti-Mex67	1:4000	Dra. Dargemont
Conejo Anti-Yra1	1:75000	Dr. Hurt
Conejo Anti-Taf6	1:2000	Dr. Fry

Materiales

Conejo Anti-Gcn5	1:500	Dr. Hinnebusch
Conejo Anti-Taf12	1:2000	Dr. Hinnebusch
Conejo Anti-Sus1	1:500	Dra. Rodríguez-Navarro

Anticuerpos secundarios

Nombre	Origen
Anti-Ratón-IgG-ECL™HRP	GE Healthcare
Anti-Conejo-IgG-ECL™HRP	GE Healthcare
Anti-Rata-IgG-ECL™HRP	DAKO

Kits comerciales

A lo largo de este trabajo se han utilizado los siguientes kits comerciales: Wizard™ Plus SV Minipreps DNA Purification System™ (Promega), Wizard™ SV Gel and PCR Clean-Up System™ (Promega), kit de inmunotinción Amersham Western Blotting Detection Kit™ (ECL normal, ECL Advance y ECL Prime, GE Healthcare), Coomassie coloidal Novex Colloidal Blue Staining Kit™ (Invitrogen), geles de gradiente NUPAGE 4-12% Bis-Tris Gel™, Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X) (Invitrogen). Estos kits comerciales se han utilizado siguiendo las instrucciones del fabricante.

Materiales

Oligonucleótidos

A continuación se indican los oligonucleótidos más relevantes utilizados en este trabajo, adquiridos en Sigma-Aldrich. Los oligonucleótidos utilizados para la RT-PCR en tiempo real se diseñaron según las recomendaciones dadas por LightCycler™ 480 Real-Time PCR System (T_m próxima a 60°C, tamaño del amplicón de 100 a 150 pb).

Oligonucleótidos		
Nombre	Secuencia 5' → 3'	Objetivo
yGAL1-PR-240-UP	AAAATTGGCAGTAACCTGGCC	PCR cuantitativa
yGAL1-PR-240-DN	CCCCAGAAATAAGGCTAAAAAACTAA	PCR cuantitativa
yGAL1-ORF+190-UP	TTGCTAGATCGCCTGGTAGAGTC	PCR cuantitativa
yGAL1-ORF+190-DN	GGCGCAAAGCATATCAAAATC	PCR cuantitativa
Up-SCR1-RT	AACCGTCTTTCCTCCGTCGTAA	PCR cuantitativa
Dw-SCR1-RT	AGAACTACCTTGCCGCACCA	PCR cuantitativa
yARG1-ORF-UP	CGGTACTGTCAGGGTTAGACTGT	PCR cuantitativa

Materiales

yARG1-ORF-UP	CGGTACTGTCAGGGTTAGACTGT	PCR cuantitativa
IntV-UP	TGTTCCCTTAAGAGGTGATGGTGA	PCR cuantitativa
IntV-DW	GTGCGCAGTACTTGTGAAAACC	PCR cuantitativa

Plásmidos

En la siguiente tabla se detallan los plásmidos que se han empleado como moldes para la obtención de los módulos de delección o etiquetaje (Gietz & Sugino, 1988; Sikorski & Hieter, 1989; Chavez & Aguilera, 1997; Longtine *et al.*, 1998; Snay-Hodge *et al.*, 1998; Puig *et al.*, 2001). También se detallan los plásmidos utilizados para el cálculo de cocientes GLAM.

Plásmido	Descripción	Origen
pFA6a-KanMX4	Integración del marcador <i>KanMX4</i> para la delección de genes	Wach <i>et al.</i> , 1994
pFA6a-HIS3	Integración del marcador <i>HIS3</i> para la delección de genes	Longtine <i>et al.</i> , 1998
pFA6a-	Integración del marcador	Longtine <i>et</i>

Materiales

URA3	<i>URA3</i> para la delección de genes	<i>al.</i> ,1998
pFA6a-GFP-HIS3	Integración de la etiqueta GFP con marcador <i>HIS3</i>	Longtine <i>et al.</i> ,1998
pFA6a-MYC-HIS3	Integración de la etiqueta MYC con marcador <i>HIS3</i>	Longtine <i>et al.</i> ,1998
pFA6a-HA-HIS3	Integración de la etiqueta HA con marcador <i>HIS3</i>	Longtine <i>et al.</i> ,1998
pBS1761	Integración de la etiqueta TAP con el marcador <i>TRP1</i>	Puig <i>et al.</i> , 2001
pBS1539	Integración de la etiqueta TAP con el marcador <i>URA3</i>	Puig <i>et al.</i> , 2001
pBTM116	Plásmido de 2 μ con el marcador <i>TRP1</i> y el dominio de unión LexA	Dr. Sternglanz
pBTM116-Sus1	Plásmido de 2 μ con el marcador <i>TRP1</i> y el dominio de unión LexA::SUS1	Pascual-García <i>et al.</i> , 2008
pUC19-3xPK-HIS3	Integración de 3 copias del epítipo PK con marcador <i>HIS3</i>	Lengronne <i>et al.</i> , 2006

Materiales

Cepas

Todas las cepas de levadura utilizadas en este trabajo se encuentran detalladas en la siguiente tabla.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
Nombre	Genotipo	Origen
BY4741	Mat a, leu2- Δ 0, his3- Δ 1, met15- Δ 0, ura3- Δ 0	EUROSCARF
SUS1-TAP	Mat α , ade2, his3, leu2, trp1, ura3, SUS1-TAP:: <i>TRP1</i>	Rodríguez-Navarro <i>et al.</i> , 2004
ASF1-TAP	Mat a, leu2- Δ 0, his3- Δ 1, met15- Δ 0, ura3- Δ 0, ASF1-TAP:: <i>KanMX4</i>	Dra. Pamblanco
SUS1-TAP <i>sem1</i> Δ	Mat a, leu2- Δ 0, his3- Δ 1, met15- Δ 0, ura3- Δ 0, SUS1-TAP:: <i>URA3</i> , <i>sem1</i> :: <i>KanMX4</i>	Esta tesis
SUS1-TAP <i>sgf73</i> Δ	Mat a, leu2- Δ 0, his3- Δ 1, met15- Δ 0, ura3- Δ 0, SUS1-TAP:: <i>URA3</i> , <i>sgf73</i> :: <i>KanMX4</i>	Pascual-García <i>et al.</i> , 2008
SUS1-TAP <i>nup60</i> Δ	Mat a, leu2- Δ 0, his3- Δ 1, met15- Δ 0, ura3- Δ 0, SUS1-TAP:: <i>URA3</i> , <i>nup60</i> :: <i>KanMX4</i>	Esta tesis
UBP8-TAP	Mat a, leu2- Δ 0, his3- Δ 1, met15- Δ 0, ura3- Δ 0, UBP8-TAP:: <i>URA3</i>	Esta tesis
UBP8-TAP <i>sem1</i> Δ	Mat a, leu2- Δ 0, his3- Δ 1, met15- Δ 0, ura3- Δ 0, UBP8-TAP:: <i>URA3</i> , <i>sem1</i> :: <i>KanMX4</i>	Esta tesis

Materiales

	<i>sem1::KanMX4</i>	
ADA2-TAP	Mat a, leu2- Δ 0, his3- Δ 1, met15- Δ 0, ura3- Δ 0, ADA2-TAP:: <i>URA3</i>	Esta tesis
ADA2-TAP <i>sem1Δ</i>	Mat a, leu2- Δ 0, his3- Δ 1, met15- Δ 0, ura3- Δ 0, ADA2-TAP:: <i>URA3</i> , <i>sem1::KanMX4</i>	Esta tesis
UBP8-TAP <i>thp1Δ</i>	Mat a, leu2- Δ 0, his3- Δ 1, met15- Δ 0, ura3- Δ 0, UBP8-TAP:: <i>URA3</i> , <i>thp1::KanMX4</i>	Esta tesis
SUS1-MYC	Mat a, leu2- Δ 0, his3- Δ 1, met15- Δ 0, ura3- Δ 0, SUS1-MYC:: <i>HIS3</i>	Pascual-García <i>et al.</i> , 2008
SUS1-MYC <i>thp1Δ</i>	Mat a, leu2- Δ 0, his3- Δ 1, met15- Δ 0, ura3- Δ 0, SUS1-MYC:: <i>HIS3</i> , <i>thp1::KanMX4</i>	Pascual-García <i>et al.</i> , 2008
SUS1-MYC <i>sac3Δ</i>	Mat a, leu2- Δ 0, his3- Δ 1, met15- Δ 0, ura3- Δ 0, SUS1-MYC:: <i>HIS3</i> , <i>sac3::KanMX4</i>	Pascual-García <i>et al.</i> , 2008
SUS1-MYC <i>sem1Δ</i>	Mat a, leu2- Δ 0, his3- Δ 1, met15- Δ 0, ura3- Δ 0, SUS1-MYC:: <i>HIS3</i> , <i>sem1::KanMX4</i>	Esta tesis
SUS1-MYC <i>gcn4Δ</i>	Mat a, leu2- Δ 0, his3- Δ 1, met15- Δ 0, ura3- Δ 0, SUS1-MYC:: <i>HIS3</i> , <i>gcn4::KanMX4</i>	Pascual-García <i>et al.</i> , 2008
UBP8-MYC	Mat a, leu2- Δ 0, his3- Δ 1, met15- Δ 0, ura3- Δ 0, UBP8-MYC:: <i>HIS3</i>	Esta tesis
UBP8-MYC <i>sem1Δ</i>	Mat a, leu2- Δ 0, his3- Δ 1, met15- Δ 0, ura3- Δ 0, UBP8-MYC:: <i>HIS3</i> , <i>sem1::KanMX4</i>	Esta tesis
ADA2-MYC	Mat a, leu2- Δ 0, his3- Δ 1, met15- Δ 0, ura3- Δ 0, ADA2-MYC:: <i>HIS3</i>	Esta tesis
ADA2-MYC	Mat a, leu2- Δ 0, his3- Δ 1, met15-	Esta tesis

Materiales

<i>sem1</i> Δ	Δ0, <i>ura3</i> -Δ0, <i>ADA2-MYC::HIS3</i> , <i>sem1::KanMX4</i>	
TAF9-MYC	Mat a, <i>leu2</i> -Δ0, <i>his3</i> -Δ1, <i>met15</i> - Δ0, <i>ura3</i> -Δ0, <i>TAF9-MYC::HIS3</i>	Esta tesis
TAF9-MYC <i>sem1</i> Δ	Mat a, <i>leu2</i> -Δ0, <i>his3</i> -Δ1, <i>met15</i> - Δ0, <i>ura3</i> -Δ0, <i>TAF9-MYC::HIS3</i> , <i>sem1::KanMX4</i>	Esta tesis
GCN5-MYC	Mat a, <i>leu2</i> -Δ0, <i>his3</i> -Δ1, <i>met15</i> - Δ0, <i>ura3</i> -Δ0, <i>GCN5-MYC::HIS3</i>	Esta tesis
GCN5-MYC <i>sem1</i> Δ	Mat a, <i>leu2</i> -Δ0, <i>his3</i> -Δ1, <i>met15</i> - Δ0, <i>ura3</i> -Δ0, <i>GCN5-MYC::HIS3</i> , <i>sem1::KanMX4</i>	Esta tesis
SPT8-MYC	Mat a, <i>leu2</i> -Δ0, <i>his3</i> -Δ1, <i>met15</i> - Δ0, <i>ura3</i> -Δ0, <i>SPT8-MYC::HIS3</i>	Esta tesis
SPT8-MYC <i>sem1</i> Δ	Mat a, <i>leu2</i> -Δ0, <i>his3</i> -Δ1, <i>met15</i> - Δ0, <i>ura3</i> -Δ0, <i>SPT8-MYC::HIS3</i> , <i>sem1::KanMX4</i>	Esta tesis
<i>ADA2-MYC</i> <i>thp1</i> Δ	Mat a, <i>leu2</i> -Δ0, <i>his3</i> -Δ1, <i>met15</i> - Δ0, <i>ura3</i> -Δ0, <i>ADA2-MYC::HIS3</i> , <i>thp1::KanMX4</i>	Esta tesis
TAF9-MYC <i>thp1</i> Δ	Mat a, <i>leu2</i> -Δ0, <i>his3</i> -Δ1, <i>met15</i> - Δ0, <i>ura3</i> -Δ0, <i>ADA2-MYC::HIS3</i> , <i>thp1::KanMX4</i>	Esta tesis
UBP8-MYC <i>thp1</i> Δ	Mat a, <i>leu2</i> -Δ0, <i>his3</i> -Δ1, <i>met15</i> - Δ0, <i>ura3</i> -Δ0, <i>UBP8::HIS3</i> , <i>thp1::KanMX4</i>	Esta tesis
SUS1-GFP	Mat a, <i>leu2</i> -Δ0, <i>his3</i> -Δ1, <i>met15</i> - Δ0, <i>ura3</i> -Δ0, <i>SUS1-GFP::HIS3</i>	Rodriguez- Navarro <i>et al.</i> , 2004
SUS1-GFP <i>nup60</i> Δ	Mat a, <i>leu2</i> -Δ0, <i>his3</i> -Δ1, <i>met15</i> - Δ0, <i>ura3</i> -Δ0, <i>SUS1-GFP::HIS3</i> ,	Esta tesis

Materiales

	nup60:: <i>KanMX4</i>	
SUS1-GFP <i>sem1Δ</i>	Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, SUS1-GFP:: <i>HIS3</i> , <i>sem1::KanMX4</i>	Esta tesis
SUS1-TAP SAC3-MYC	Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, SUS1-TAP:: <i>URA3</i> , SAC3-MYC:: <i>HIS3</i>	Cuenca-Bono <i>et al.</i> , 2010
SUS1-TAP SAC3-MYC <i>sem1Δ</i>	Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, SUS1-TAP:: <i>URA3</i> , SAC3-MYC:: <i>HIS3</i> , <i>sem1::KanMX4</i>	Esta tesis
SUS1-TAP THP1-MYC	Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, SUS1-TAP:: <i>URA3</i> , THP1-MYC:: <i>HIS3</i>	Esta tesis
SUS1-TAP THP1-MYC <i>sem1Δ</i>	Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, SUS1-TAP:: <i>URA3</i> , THP1-MYC:: <i>HIS3</i> , <i>sem1::KanMX4</i>	Esta tesis
MLP2-HA	Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, MLP2-HA:: <i>HIS3</i>	Esta tesis
SUS1-TAP MLP2-HA	Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, SUS1-TAP:: <i>URA3</i> , MLP2-HA:: <i>HIS3</i>	Esta tesis
SUS1-TAP RIF1-HA	Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, SUS1-TAP:: <i>URA3</i> , RIF1-HA:: <i>HIS3</i>	Esta tesis
SUS1-TAP MLP2-MYC	Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, SUS1-TAP:: <i>URA3</i> , MLP2-MYC:: <i>HIS3</i>	Esta tesis
SUS1-TAP RIF1-MYC	Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, SUS1-TAP:: <i>URA3</i> , RIF1-MYC:: <i>HIS3</i>	Esta tesis

Materiales

UPF2-PK	Mat a, leu2- Δ 0, his3- Δ 1, met15- Δ 0, ura3- Δ 0, UPF2-PK:: <i>HIS3</i>	Esta tesis
YKU80-PK	Mat a, leu2- Δ 0, his3- Δ 1, met15- Δ 0, ura3- Δ 0, YKU80-PK:: <i>HIS3</i>	Esta tesis
SUS1-TAP UPF2-PK	Mat a, leu2- Δ 0, his3- Δ 1, met15- Δ 0, ura3- Δ 0, SUS1-TAP:: <i>URA3</i> UPF2-PK:: <i>HIS3</i>	Esta tesis
SUS1-TAP YKU80-PK	Mat a, leu2- Δ 0, his3- Δ 1, met15- Δ 0, ura3- Δ 0, SUS1-TAP:: <i>URA3</i> , YKU80-PK:: <i>HIS3</i>	Esta tesis
UBP8-TAP SUS1-PK	Mat a, leu2- Δ 0, his3- Δ 1, met15- Δ 0, ura3- Δ 0, UBP8-TAP:: <i>URA3</i> , SUS1-PK:: <i>HIS3</i>	Esta tesis
UBP8-TAP SUS1-PK <i>sem1</i> Δ	Mat a, leu2- Δ 0, his3- Δ 1, met15- Δ 0, ura3- Δ 0, UBP8-TAP:: <i>URA3</i> , SUS1-PK:: <i>HIS3</i> , <i>sem1</i> :: <i>KanMX4</i>	Esta tesis
SGF29-TAP SUS1-PK	Mat a, leu2- Δ 0, his3- Δ 1, met15- Δ 0, ura3- Δ 0, SGF29- TAP:: <i>URA3</i> , SUS1-PK:: <i>HIS3</i>	Esta tesis
SGF29-TAP SUS1-PK <i>sem1</i> Δ	Mat a, leu2- Δ 0, his3- Δ 1, met15- Δ 0, ura3- Δ 0, SGF29- TAP:: <i>URA3</i> , SUS1-PK:: <i>HIS3</i> , <i>sem1</i> :: <i>KanMX4</i>	Esta tesis
<i>sus1</i> Δ	Mat a, leu2- Δ 0, his3- Δ 1, met15- Δ 0, ura3- Δ 0, <i>sus1</i> :: <i>HIS3</i>	Esta tesis
<i>asf1</i> Δ	Mat a, leu2- Δ 0, his3- Δ 1, met15- Δ 0, ura3- Δ 0, <i>asf1</i> :: <i>KanMX4</i>	EUROSCARF
<i>sem1</i> Δ	Mat a, leu2- Δ 0, his3- Δ 1, met15- Δ 0, ura3- Δ 0, <i>sem1</i> :: <i>KanMX4</i>	EUROSCARF
<i>sem1</i> Δ	Mat a, leu2- Δ 0, his3- Δ 1, met15- Δ 0, ura3- Δ 0, <i>sem1</i> :: <i>HIS3</i>	Esta tesis

Materiales

<i>thp1</i> Δ	Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, thp1::KanMX4	EUROSCARF
<i>sgf73</i> Δ	Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, sgf73::KanMX4	EUROSCARF
<i>gcn5</i> Δ	Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, gcn5::KanMX4	EUROSCARF
<i>mlp2</i> Δ	Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, mlp2::KanMX4	EUROSCARF
<i>hst3</i> Δ	Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, hst3::KanMX4	EUROSCARF
<i>swd1</i> Δ	Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, swd1::KanMX4	EUROSCARF
<i>sap30</i> Δ	Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, sap30::KanMX4	EUROSCARF
<i>esc2</i> Δ	Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, esc2::KanMX4	EUROSCARF
<i>rsc2</i> Δ	Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, rsc2::KanMX4	EUROSCARF
<i>mex67-5</i>	Mat a, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, mex67::HIS3 (pUN100-LEU2-mex67-5)	Segref <i>et al.</i> , 1997
<i>sus1</i> Δ <i>sem1</i> Δ	Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, sus1::HIS3, sem1::KanMX4	Esta tesis
<i>sgf73</i> Δ <i>sem1</i> Δ	Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, sem1::HIS3, sgf73::KanMX4	Esta tesis
<i>gcn5</i> Δ <i>sem1</i> Δ	Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, sem1::HIS3,	Esta tesis

Materiales

	<i>gcn5::KanMX4</i>	
<i>asf1Δsus1Δ</i>	Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, <i>asf1::KanMX4</i> , <i>sus1::HIS3</i>	Esta tesis
<i>mlp2Δsus1Δ</i>	Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, <i>mlp2::KanMX4</i> , <i>sus1::HIS3</i>	Esta tesis
<i>hst3Δsus1Δ</i>	Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, <i>hst3::KanMX4</i> , <i>sus1::HIS3</i>	Esta tesis
<i>swd1Δsus1Δ</i>	Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, <i>swd1::KanMX4</i> , <i>sus1::HIS3</i>	Esta tesis
<i>sap30Δsus1Δ</i>	Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, <i>sap30::KanMX4</i> , <i>sus1::HIS3</i>	Esta tesis
<i>esc2Δsus1Δ</i>	Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, <i>esc2::KanMX4</i> , <i>sus1::HIS3</i>	Esta tesis
<i>rsc2Δsus1Δ</i>	Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, <i>rsc2::KanMX4</i> , <i>sus1::HIS3</i>	Esta tesis
JB	Mat a, trp1-Δ9, ura3-Δ0, <i>ade2</i> , <i>ade3</i> , leu2-Δ0, his3-Δ1	Dr. Hurt
<i>rsc2Δ JB</i>	Mat a, trp1-Δ9, ura3-Δ0, <i>ade2</i> , <i>ade3</i> , leu2-Δ0, his3-Δ1, <i>rsc2::URA3</i>	Esta tesis
<i>esc2Δ JB</i>	Mat a, trp1-Δ9, ura3-Δ0, <i>ade2</i> , <i>ade3</i> , leu2-Δ0, his3-Δ1, <i>esc2::URA3</i>	Esta tesis
<i>sem1Δ JB</i>	Mat a, trp1-Δ9, ura3-Δ0, <i>ade2</i> ,	Esta tesis

Materiales

	ade3, leu2- Δ 0 , his3- Δ 1, sem1:: <i>URA3</i>	
<i>rsc2</i> Δ <i>sus1</i> Δ JB	Mat a, trp1- Δ 9, ura3- Δ 0, ade2, ade3, leu2- Δ 0, his3- Δ 1, rsc2:: <i>URA3</i> , sus1:: <i>KanMX4</i>	Esta tesis
<i>esc2</i> Δ <i>sus1</i> Δ JB	Mat a, trp1- Δ 9, ura3- Δ 0, ade2, ade3, leu2- Δ 0 , his3- Δ 1, esc2:: <i>URA3</i> , sus1:: <i>KanMX4</i>	Esta tesis
<i>sem1</i> Δ <i>sus1</i> Δ JB	Mat a, trp1- Δ 9, ura3- Δ 0, ade2, ade3, leu2- Δ 0, his3- Δ 1, sem1:: <i>URA3</i> , sus1:: <i>KanMX4</i>	Esta tesis
CTY10-5d	Mat a, ade2- Δ 01, his3- Δ 1, leu2- Δ 0, trp1- Δ 9, gal4, gal80, URA3:: <i>lexAop-lacZ</i>	Dr. Sternglanz
CTY10-5d <i>sem1</i> Δ	Mat a, ade2- Δ 01, his3- Δ 1, leu2- Δ 0, trp1- Δ 9, gal4, gal80, URA3:: <i>lexAop-lacZ</i> , sem1:: <i>KanMX4</i>	Esta tesis
htb-K123R	Mat a, hta1-htb1:: <i>LEU2</i> , hta2- htb2, ura3- Δ 0, trp1- Δ 1, leu2- Δ 0, his3- Δ 1, ade2- Δ 01, can1-100, GAPDH-HA-UBI4:: <i>URA3</i> <pZS146 HTA1-Flag-htb1- K123R, CEN, HIS3>	Fleming <i>et al.</i> , 2008
htb-K123R <i>sem1</i> Δ	Mat a, hta1-htb1:: <i>LEU2</i> , hta2- htb2, ura3- Δ 0, trp1- Δ 1, leu2- Δ 0, his3- Δ 1, ade2- Δ 01, can1-100, GAPDH-HA-UBI4:: <i>URA3</i> <pZS146 HTA1-Flag-htb1- K123R, CEN, HIS3> sem1:: <i>KanMX4</i>	Esta tesis
HTB1	Mat a, hta1-htb1:: <i>LEU2</i> , hta2-	Fleming <i>et al.</i> ,

Materiales

	htb2, ura3- Δ 0, trp1- Δ 1, leu2- Δ 0, his3- Δ 1, ade2- Δ 01, can1-100, GAPDH-HA-UBI4:: <i>URA3</i> <pZS145 HTA1-Flag- HTB1,CEN, <i>HIS3</i> >	2008
HTB1 <i>sem1</i> Δ	Mat a, hta1-htb1:: <i>LEU2</i> , hta2- htb2, ura3- Δ 0, trp1- Δ 1, leu2- Δ 0, his3- Δ 1, ade2- Δ 01, can1-100, GAPDH-HA-UBI4:: <i>URA3</i> <pZS145 HTA1-Flag- HTB1,CEN, <i>HIS3</i> > <i>sem1</i> :: <i>KanMX4</i>	Esta tesis

MÉTODOS

Medios de cultivo y ensayos de crecimiento

Para los cultivos de células de levadura sin auxotrofías se utilizó medio rico YP + Glucosa (extracto de levadura al 1% (p/v), bactopectona al 2% (p/v) y glucosa al 2% (p/v)); YP + Galactosa (en el que se proporciona galactosa al 2% (p/v) como fuente de carbono); YP + Rafinosa (en el que se proporciona rafinosa al 2% (p/v) como fuente de carbono); medio sintético completo o SC + todo que contiene base nitrogenada para levadura, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 0.5% (p/v) y Drop Out Mix al 0.2% (p/v). El Drop Out Mix contiene una mezcla de todos los aminoácidos proteicos al 0.2%. Las cepas auxótrofas transformadas con plásmidos o con módulos de integración fueron cultivadas en medio sintético mínimo o SC sin el aminoácido marcador de la auxotrofia. Las cepas que contienen plásmidos o módulos de integración asociados al gen de resistencia a geneticina (módulos de integración *KanMX4*) fueron seleccionadas suplementando los medios de cultivo con geneticina a 20 mg/mL.

El crecimiento se realizó en agitación constante a 160 rpm a una temperatura de 30°C. Para la elaboración de los soportes sólidos de crecimiento se agregó agar al 2% (p/v) al respectivo medio y las placas se incubaron a 30°C.

Para los ensayos de crecimiento en placa, los cultivos celulares de levadura se crecieron hasta una OD_{600} de 0.5 unidades, se prepararon cuatro diluciones seriadas (1; 1:10;

Métodos

1:100; 1:1000) y se replicaron con ayuda de un peine de replicación sobre las distintas placas. Éstas se incubaron a la temperatura requerida para el estudio durante 24-72 horas en placas YP + Glucosa o YP + Galactosa.

Métodos de manipulación de microorganismos

Transformación de levadura

Las cepas de levadura fueron transformadas siguiendo el protocolo basado en la incubación con Acetato de Litio (Gietz *et al.*, 1995). A partir de cultivos celulares crecidos en YP + Glucosa durante toda una noche se hicieron diluciones de una OD₆₀₀ de 0.2-0.3 unidades. Después de 3 generaciones se recogieron las células centrifugándolas 3 minutos a 1.800 rpm. Se lavaron con agua desionizada estéril y posteriormente con LiAc 0.1 M. Seguidamente, las células se resuspendieron en 0.5 mL de LiAc 0.1 M y se incubaron durante 15 minutos a 30°C. Transcurrido este tiempo, se añade a las células 5 µL de DNA de esperma de salmón desnaturalizado y disuelto en TE (1 M Tris-HCl pH 8.0, 0.5 M EDTA pH 8.0) a una concentración de 2 mg/mL y entre 1-5 µg del módulo de integración o delección obtenido por PCR o entre 0.1-1 µg si se trata de DNA plasmídico. A la mezcla se le añadió 240 µL de una solución de polietilenglicol al 50% (p/v), 30 µL de agua desionizada estéril y 30 µL de LiAc 1 M. El tubo que contiene toda la mezcla se agitó de forma vigorosa, se

Métodos

incubó a 30°C durante 30 minutos y seguidamente se le aplicó un choque térmico a 42°C en un termobloque durante 15 minutos. Finalmente, las células se recogieron por centrifugación, eliminándose el sobrenadante por aspiración, y se resuspendieron en 200 µL de agua desionizada estéril para ser sembradas en placa. En el caso de las transformaciones con plásmidos o módulos de integración que complementan auxotrofías de la cepa, las células se sembraron en medio mínimo selectivo. En las transformaciones en las que la selección se basa en la resistencia al antibiótico geneticina, las células se recuperaron en medio líquido de YP + Glucosa durante 2-5 horas en agitación a 30°C, lo que permitió a la células transformadas expresar la cantidad de antibiótico necesario para poder crecer en las placas con 0.2 mg/mL de geneticina.

Delección de genes y etiquetado de proteínas

Tanto para la delección de genes, como para la inserción de las etiquetas TAP, MYC, GFP, PK y HA se utilizó la estrategia de módulos de integración obtenidos por PCR (Baudin *et al.*, 1993). Estos módulos contienen un gen marcador flanqueado de secuencias de DNA homólogas a las secuencias del gen diana que queremos etiquetar o deleccionar. Después de la transformación con el módulo obtenido de esta manera se produce, por recombinación

Métodos

homóloga, la sustitución o etiquetado de la secuencia silvestre por la del gen marcador. Los genes marcadores empleados en este trabajo son *KanMX4*, que confiere a la célula resistencia al antibiótico geneticina, o genes que completan las auxotrofías que presentan los fondos genéticos de los microorganismos utilizados. Las amplificaciones de los módulos se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μL donde habitualmente se emplearon, 1.0 μL de una dilución 1:25 de DNA del plásmido molde procedente de una Mini Prep o 0.5 μL de DNA genómico; 0.3 μL de Taq polimerasa (1U/ μL Roche); 5 μL del tampón 10X de la Taq polimerasa (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl pH 8.3 y 250 mM MgCl_2); 0.5 mM de cada uno de los cebadores y 5 μL de una mezcla de los 4 dNTP a 2.5 mM. En general, se utilizó el siguiente protocolo de amplificación: 1 ciclo de 3 minutos a 94°C; 30 ciclos compuestos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a la temperatura óptima de hibridación para cada par de oligonucleótidos y un tiempo de extensión variable (1 minuto por Kb) a 72°C; finalmente se llevó a cabo 1 ciclo extra de extensión de entre 5 y 10 minutos a 72°C.

Para verificar la correcta integración de los cassettes de disrupción se llevó a cabo una reacción de PCR de colonia. Se recogieron en 20 μL de SDS al 0.01% la cantidad de células frescas crecidas en placa que caben en el extremo de una punta amarilla y se hirvió la muestra durante 3 minutos a 95°C. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 15 μL

Métodos

donde añadimos, 0.15 μL de Taq polimerasa (Invitrogen); 1.5 μL del tampón 10X de la Taq polimerasa (Invitrogen) que incluye MgCl_2 ; 0.45 μL de cada cebador 10 mM y 1.5 μL de una mezcla de los 4 dNTP a 2.5 mM. En la verificación de las integraciones de las diferentes etiquetas, además de la comprobación por PCR de colonia, realizamos una comprobación por WB, detallada más adelante.

Métodos de manipulación y análisis de ácidos nucleicos

Aislamiento de DNA plasmídico de *Escherichia coli*

Para la obtención de DNA plasmídico a pequeña escala se utilizó el sistema comercial *Wizard™ Plus SV Minipreps DNA Purification System™* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Aislamiento de DNA total genómico de levadura

La obtención de DNA genómico se llevó a cabo a partir de cultivos de 5 mL en YP + Glucosa crecidos durante toda la noche a 30°C. Las células se recogieron por centrifugación a 2.500 rpm durante 3 minutos y se lavaron dos veces con agua desionizada estéril. Al pellet de células se le añadió 200 μL de tampón de lisis (Triton X-100 al 2% (v/v), SDS al 1% (p/v), 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0), 200

Métodos

μL de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y 200 μL de perlas de vidrio. La mezcla se agitó durante 15 minutos en el vórtex modelo Genie-2 (Scientific Instruments) a 4°C. Seguidamente, se añadieron 200 μL de tampón TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0) y se centrifugó durante 5 minutos a 13.200 rpm a 4°C. Se recogió la fase acuosa en un nuevo tubo y se añadieron dos volúmenes de etanol al 96% (v/v) frío. Se dejó a -20°C 20 minutos para que precipitara el DNA y éste se recogió a 13.200 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante por aspiración y se lavó el DNA con etanol frío al 70% (v/v). Finalmente, se eliminó el sobrenadante y, cuando el precipitado estuvo seco, se resuspendió en un volumen de entre 50 y 100 μL agua desionizada estéril y se guardó a -20°C hasta su utilización.

Aislamiento de RNA total de levadura

Para la extracción de RNA total de levadura se recogieron por centrifugación 10 mL de cultivos crecidos en medio YP + Glucosa durante toda la noche a 30°C. Se lavaron dos veces con agua desionizada estéril fría y el pellet celular se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido, almacenándose a -80 °C hasta su procesamiento posterior. Las células se descongelaron en hielo y se resuspendieron en 0.5 mL de tampón LETS (0.1 M LiCl, 10 μM EDTA, 10 μM Tris-HCl, SDS al 0.2% (p/v)). Se añadieron 0.5 mL de

Métodos

fenol:cloroformo (5:1 pH 4.3) y 0.3 mL de perlas de vidrio. Las células se rompieron por agitación en el vórtex modelo Genie-2 (Scientific Instruments) durante seis períodos de 30 segundos entre los cuales las células se mantuvieron 30 segundos en hielo. Posteriormente, se centrifugaron las muestras durante 5 minutos a 13.200 rpm a 4°C. El sobrenadante se extrajo con la mezcla de fenol:cloroformo (5:1) y se realizó una segunda extracción con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). El RNA se precipitó con un volumen de LiCl 5 M a -80°C durante un mínimo de 3 horas. Se recogió por centrifugación durante 20 minutos a 13.200 rpm a 4°C, se lavó con etanol al 70% (v/v) y se resuspendió en agua desionizada estéril para volver a precipitarlo. Para ello se añadió acetato sódico a una concentración final 0.3 M y dos volúmenes de EtOH al 100% (v/v). Se volvió a dejar al menos 2 horas a -80°C para volver a centrifugar durante 20 minutos a 13.200 rpm a 4°C. El precipitado se lavó con EtOH al 70%, se dejó secar y finalmente se resuspendió en agua desionizada estéril. La concentración del RNA obtenido se evaluó midiendo la absorbancia a 260 nm mediante un espectrómetro (NanoDrop™ ND-1000).

Métodos

Reacción en cadena de la polimerasa

Las reacciones se realizaron en un volumen final de 50 μL (PCR para módulo de integración) o de 15 μL (PCR de comprobación). Para 50 μL de reacción se emplearon: 1 μL de DNA molde diluido 1:25 a partir de Miniprep comercial (Promega), 36.3 μL de agua desionizada estéril, 0.3 μL de Taq polimerasa (Invitrogen), 5 μL del tampón 10X de la Taq polimerasa (Invitrogen) que incluye MgCl_2 , 1.2 μL de cada cebador 10 mM y 5 μL de una mezcla de los 4 dNTPs a 2.5 mM. Para las PCRs de comprobación se empleó 1 μL de DNA molde a partir de colonia, 9.55 μL de agua desionizada estéril, 0.15 μL de Taq polimerasa (Invitrogen), 1.5 μL del tampón 10X de la Taq polimerasa (Invitrogen) que incluye MgCl_2 , 0.45 μL de cada cebador 10 mM, 1.5 μL de una mezcla de los 4 dNTPs a 2.5 mM y 0.4 μL Triton al 10%. En general se utilizó el siguiente protocolo de amplificación: 1 ciclo de 3 minutos a 94°C; 30 ciclos compuestos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a la temperatura óptima de hibridación para cada par de oligonucleótidos y un tiempo de extensión variable (1 minuto por kb) a 72°C; finalmente se llevó a cabo 1 ciclo extra de extensión de entre 5 y 10 minutos a 72°C.

Transcripción reversa o síntesis de cDNA

Se incubaron 2 μg de RNA con 1 unidad de DNasa (Sigma 20U/ μL) en un volumen final de 20 μL a temperatura

Métodos

ambiente durante 15 minutos. El RNA se extrajo dos veces con la mezcla de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y se realizó una tercera extracción con cloroformo:isoamílico (24:1). El RNA se precipitó durante toda la noche con dos volúmenes de EtOH al 96% y 1 μ L de glucógeno. Se centrifugó durante 20 minutos a 13.200 rpm a 4°C, se lavó con etanol al 70% (v/v) y se resuspendió en 20 μ L de agua desionizada. A continuación se incubó el RNA digerido con 2 μ L de oligos random y 2 μ L de una mezcla de los cuatro dNTPs a una concentración de 10 mM cada uno, a 65°C durante 5 minutos, tras lo cual se transfirió la mezcla al hielo. Se añadieron entonces 8 μ L de tampón 5X First-strand (Invitrogen), 4 μ L de DTT 0.1 M y 1 μ L de inhibidor de RNasa Out (Invitrogen). En este punto la mitad de la mezcla se empleó como control negativo de presencia de DNA y el resto para la retrotranscripción, para lo que se añadió 1 μ L de transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen). Las muestras se incubaron durante 50 minutos a 37°C y finalmente se inactivó la enzima incubando a 70°C durante 15 minutos. Para la amplificación del producto de la transcripción reversa (cDNA) se realizó una dilución 1/20 del cDNA obtenido y se utilizaron 3 μ L como molde de la qPCR. El volumen de reacción para estos estudios fue de 10 μ L.

Métodos

PCR cuantitativa

Los análisis de expresión génica de *GAL1* y *ARG1* se llevaron a cabo mediante RT-PCR cuantitativa en el termociclador LightCycler™ 480. Se utilizó el kit Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X) (Invitrogen). El diseño de oligonucleótidos, la mezcla de reacción y las condiciones de amplificación se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. Se hizo triplicado de PCR para todas las muestras y para el procesamiento de los datos se empleó el método $\Delta\Delta CT$ (Livak & Schmittgen, 2001), comparando los resultados del amplificado de la muestra con el gen de referencia *SCR1*. Así, se calculó el $\Delta\Delta CT$ como:

$$\Delta\Delta CT = (CT \text{ control positivo} - CT \text{ muestra})_{GAL1} - (CT \text{ control positivo} - CT \text{ muestra})_{SCR1}$$

La eficiencia de los oligos empleada para el procesamiento de los datos se comprobó en cada qPCR empleando el siguiente cálculo:

$$\text{Eficiencia} = (10^{-1/\text{pendiente}})$$

Métodos

Southern blot

El análisis de la longitud de los telómeros fue llevado a cabo por el Dr. Martin Kupiec (George S Weiss Faculty of Life Science, Tel Aviv University, Israel). Para ello, se extrajo el DNA genómico de las cepas a estudiar y se digirió durante toda la noche con *XhoI*. El DNA digerido se separó en un gel de agarosa durante 16-20 horas a 1.4 V/cm. El *Southern blot* se llevó a cabo utilizando membranas Hybond-N (Amersham Biosciences). Las membranas se hibridaron con sondas de DNA telomérico repetitivo y con secuencias específicas marcadas con $\alpha\text{-P}^{32}$. Estas sondas específicas se emplearon como controles internos de tamaño. Las hibridaciones se llevaron a cabo con un tampón Na_2HPO_4 200 mM y SDS al 2%.

Separación de ácidos nucleicos por electroforesis

Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La separación de fragmentos de DNA se realizó en geles de agarosa de concentración variable (0.8%-2% (p/v)) según los tamaños de los fragmentos de DNA a separar. Los geles se prepararon en tampón TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA pH 8.0), que también fue utilizado como tampón de electroforesis. Los geles se prepararon añadiendo 3 μL de bromuro de etidio 10 mg/mL por cada 50 mL de gel. Las muestras se mezclaron con tampón de carga 6X (azul de

Métodos

bromofenol al 0.25% (p/v), azul de xilencianol al 0.25% (p/v), glicerol al 30% (v/v) hasta una concentración final 1X y la electroforesis se realizó a voltaje constante (6-10 V/cm) durante un tiempo variable en función de la resolución requerida.

Electroforesis de RNA en geles de agarosa en tampón TAE

La integridad del RNA obtenido tras las extracciones se comprobó mediante la visualización de 2 µg de RNA total en un gel TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA pH 8.0) con agarosa al 1% (p/v). Estas electroforesis se llevaron a cabo durante 10-15 minutos a 10 V/cm. La concentración del RNA obtenido se evaluó midiendo la absorbancia a 260 nm mediante un espectrómetro (NanoDrop™ ND-1000).

Métodos de manipulación y análisis de proteínas

Obtención de extractos proteicos

Para la obtención de extractos proteicos, los cultivos celulares se recogieron por centrifugación (3 minutos a 2.500 rpm) y se lavaron con agua destilada estéril fría. Las células se resuspendieron en 1000 µL de agua y se añadió 100 µL de NaOH 0.2 M. Se dejaron 10 minutos en hielo y se

Métodos

centrifugaron durante 1 minuto a 13.200 rpm. Se aspiró el sobrenadante, se resuspendió el precipitado en 50 μ L de tampón de carga de proteínas SDS-PAGE 2X (250mM Tris-HCl pH 6.8, 140 mM SDS, 30 mM azul de bromofenol, 27 μ M glicerol) conteniendo DTT 0.1 mM y se incubaron las muestras a 95°C durante 5 minutos. Se centrifugaron de nuevo durante 10 minutos a 13.200 rpm y el sobrenadante, que constituye el extracto proteico, se transfirió a un tubo nuevo. Los extractos proteicos extraídos mediante TCA siguieron el siguiente procedimiento. Los cultivos celulares se recogieron por centrifugación durante 3 minutos a 2.500 rpm y se lavaron con agua destilada estéril fría. El pellet de células se resuspendió en 100 μ L de agua desionizada fría, 20 μ L de TCA al 100% y 100 μ L de perlas de vidrio. La mezcla se agitó en vórtex modelo Genie-2 (Scientific Instruments) durante 15 minutos a 4°C. Al lisado se le añadió 1 mL de TCA al 5% (v/v) frío y se centrifugó durante 20 minutos a 13.200 rpm a 4°C. Se desechó el sobrenadante, junto con las perlas de vidrio y el pellet se resuspendió en 50 μ L de tampón de carga de proteínas SDS-PAGE 2X conteniendo un 4% de β -mercaptoetanol y se añadieron 20 μ L de Tris-base 2 M para su neutralización. Las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 13.200 rpm para eliminar las perlas y restos celulares. El extracto se incubó durante 5 minutos a 95°C antes de ser separado por electroforesis en un gel de poliacrilamida.

Métodos

Para la obtención de extractos proteicos nativos, los cultivos celulares se recogieron mediante centrifugación durante 3 minutos a 2.500 rpm y se lavaron con PBS 1X en frío. Las células se resuspendieron en tampón nativo (NativePAGE Sample Buffer 1X (Invitrogen), 0.2 mM EDTA, NP-40 al 0.1%, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) y se lisaron en el vórtex aplicando 5 pulsos de 1 minuto de duración. Se centrifugó durante 30 minutos a 4°C y 14.000 rpm. El sobrenadante se incubó con 2 mM MgCl₂ y 1U/μL de muestra de Benzonasa (Novagen) durante 30 minutos a 16°C. Tras la incubación, se centrifugó durante 30 minutos a 4°C y 14.000 rpm.

Separación electroforética de proteínas

Los extractos proteicos fueron separados en función de su tamaño mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida que se prepararon siguiendo las especificaciones detalladas en Sambrook y Russell (Sambrook & Russell, 2001). Los geles en gradiente desnaturizante de poliacrilamida fueron adquiridos a Invitrogen. La electroforesis se desarrolló en cubetas Mini Protean II (Bio-Rad) a voltaje constante de 150 V durante 90 minutos. El tampón de electroforesis se preparó con 100 mL de tampón de electroforesis (30.28 g Tris-base, 144.14 g glicina y agua hasta 1 L), 10 mL de SDS al 10% (p/v) y agua destilada hasta 1 L.

Métodos

En el caso de los geles en gradiente adquiridos en Invitrogen se utilizaron los tampones proporcionados por la casa comercial, MOPS y MES, según la aplicación. En el caso de los extractos nativos, los complejos se resolvieron en un gel de poliacrilamida no desnaturizante al 5% en 0.5X de tampón Tris-borato, durante dos horas a un voltaje constante de 100 voltios a 4°C en un tampón de electroforesis Tris-borato 0.5X.

Tinción con Coomassie coloidal

Una vez separadas las proteínas mediante electroforesis, el gel se tiñó con Coomassie coloidal. El gel se sumergió en solución colorante durante al menos 30 minutos, y después se realizaron varios lavados con solución decolorante (metanol al 30% (v/v), ácido acético al 5% (v/v)) hasta eliminar el exceso del colorante.

Transferencia e inmunotinción

Las proteínas separadas mediante electroforesis se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0.45 μm (Hybond-ECL Amersham Biosciences) con un *mini trans-blot cell* de Biorad siguiendo el procedimiento descrito en Sambrook y Russell (Sambrook & Russell, 2001). El tampón de transferencia utilizado contiene 25 mM Tris pH 8.3, 192 mM glicina, SDS al 0.1% (p/v) y metanol al 20% (v/v). Las proteínas transferidas se tiñeron con una solución de *Ponceau*

Métodos

al 1% (p/v) en ácido acético al 1% (v/v) durante 1 minuto, lavando con ácido acético al 1% (v/v). El colorante se eliminó lavando la membrana con TBS (0.02 M Tris-HCl pH 7.6 y NaCl al 0.8% (p/v))-Tween-20 al 0.01% (v/v) (TBS-Tween). La membrana se bloqueó con TBS-Tween suplementado con agente bloqueante al 2% (p/v) de (*ECL-Advance*, GE Healthcare) durante 40 minutos a temperatura ambiente. El anticuerpo primario se diluyó en TBS-Tween con agente bloqueante al 2% (p/v) y la membrana se incubó en esta disolución durante una hora a 4°C. La membrana se lavó tres veces durante 15 minutos con TBS-Tween. El anticuerpo secundario se preparó también en TBS-Tween con agente bloqueante al 2% (p/v) y se incubó la membrana con él durante 1 hora a 4°C. Se realizaron 3 lavados adicionales de 10 minutos con TBS-Tween y la detección quimioluminiscente se realizó mediante el sistema *ECL Advance* (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cromatografía por filtración en gel

La separación cromatográfica por filtración en gel se llevó a cabo en un sistema LC System. Se utilizaron columnas Superdex 200 5/150 con un flujo de 200 µl/min en un tampón de 50 mM Tris a pH 7.2 y 150 mM NaCl. Se recogieron fracciones de 50 µl mediante el colector Fraction Collector Frac-950. Las fracciones fueron analizadas mediante WB

Métodos

utilizando anticuerpos α -MYC según los procedimientos estándares.

Purificación de proteínas. La técnica TAP

Esta metodología permite recuperar complejos proteicos nativos altamente purificados a partir de extractos totales (Schmitt et al., 1999). Para ello, se debe sustituir la copia silvestre de la región codificante de la proteína de interés por una versión que contiene la etiqueta de afinidad. Esta etiqueta está constituida por dos unidades de proteína A de *Staphylococcus aureus*, seguida de un sitio de corte para la proteasa TEV (*Tobacco Etch Virus*), y finalmente por el péptido de unión a calmodulina. Estos experimentos siguieron el protocolo descrito en los trabajos de Rigaut (Schmitt et al., 1999) y Puig (Puig et al., 2001). Se crecieron 2 L de células hasta una OD₆₀₀ de 2.5, equivalente a 12 gr de pellet celular aproximadamente, se recogieron por centrifugación y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido conservándose a -80°C hasta su utilización. Las células se resuspendieron en tampón de lisis (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, glicerol al 20% (v/v), Nonidet P-40 al 0.1% (v/v), 1 mM PMSF, 1 mM DTT y media tableta de cóctel inhibidor de proteasas Complete, (Roche) y se introdujeron en los contenedores del BeadBeater (*Fritsch-Pulverisette*) junto con 25 mL de perlas de vidrio. Se mantuvo todo en frío. La rotura

Métodos

se realizó mediante 3 rondas de 4 minutos a 490 rpm con una pausa de 1 minuto entre cada ronda. El lisado se centrifugó durante 1 hora a 4°C a 14.000 rpm. El lisado resultante se incubó con 250 µL de suspensión de resina *IgG-Sepharose 6 Fast Flow*[™] (Amersham Biosciences) que tiene avidéz por el epítopo PA, durante 1 hora a 4°C en agitación rotatoria. La resina fue lavada tres veces con tampón LB (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, glicerol al 20% (v/v), Nonidet P-40 al 0.1% (v/v)). Posteriormente, se incubaron los purificados con 3-4 µg de la proteasa TEV durante 2.5 horas a 16°C en agitación rotatoria. Esta digestión produce la liberación del epítopo PA de la etiqueta TAP, liberando un eluído enriquecido en nuestra proteína de interés. Por último, se volvió a purificar el eluído con una segunda cromatografía de afinidad, incubando el purificado con 300 µL de la resina afín a la calmodulina (*Calmodulin Affinity Resin*[™], Stratagene) en presencia de una concentración 2 mM de CaCl₂. La incubación de la resina con el eluído anterior se efectuó durante 1 hora a 4°C con agitación rotatoria. A continuación, la resina fue lavada con 5 mL de tampón LB suplementado con 2 mM de CaCl₂ y 1 mM DTT. La elución final se llevó a cabo incubando la resina con tampón de elución (5 mM EGTA, 10 mM Tris-HCl pH 8.0 y 50 mM NaCl) en 3 rondas de 10 minutos a 37°C. El eluído enriquecido en las proteínas que interaccionan con nuestra proteína de interés fueron precipitados con TCA a una concentración final del 10% (v/v). Los elúidos fueron resueltos

Métodos

generalmente por SDS-PAGE. En otras ocasiones, tras la precipitación con TCA se analizó el pellet total de proteínas por LC-MS/MS.

Identificación de proteínas por espectrometría de masas y aproximaciones proteicas

La identificación de proteínas mediante espectrometría de masas, así como el análisis proteómico mediante la tecnología iTRAQ (*Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification*) y la aplicación de la herramienta APEX (*Absolute Protein Expression*), fue llevada a cabo por el personal de la sección de Espectrometría de Masas del *Servei Central de Suport a la Investigació* (SCSIE) de la Universitat de València que está integrado y sigue los estándares de Proteored España (<http://www.proteored.org/> y http://scsie.uv.es/scsie_new/web_cod/SCSIE/MAS/es/index.php).

La herramienta APEX estima la cantidad absoluta de proteína calculando la proporción entre la abundancia de la proteína y el número de sus péptidos proteotípicos *versus* la concentración total de proteína y todos los péptidos proteotípicos (Braisted *et al.*, 2008).

La tecnología iTRAQ™ permite hacer una cuantificación relativa entre 4 muestras simultáneamente al etiquetar cada muestra con un ión de un peso molecular concreto (Aggarwal *et al.*, 2006).

Métodos

Inmunoprecipitación de proteínas

Para la inmunoprecipitación de proteínas, se crecieron 50 mL de células en medio YP + Glucosa hasta una OD₆₀₀ de 0.5. Se recogieron un mismo número de ODs de las diferentes cepas y condiciones. Después se lavaron las células y se resuspendieron en 250 µL de tampón de lisis (50 mM HEPES-KOH pH 7.5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, glicerol al 10%, NP-40 al 0.5%, 1 mM PMSF y media tableta de cóctel inhibidor de proteasas Complete (Roche)). Las células se rompieron aplicando 4 pulsos de 1 minuto de duración con un vórtex modelo Genie-2 (Scientific Instruments) a 4°C. Previamente a la lisis, se conjugó el anticuerpo α-MYC con las bolas magnéticas, que presentan en su superficie IgGs que reconocen específicamente al anticuerpo α-MYC que estamos usando en el experimento. La conjugación se llevó a cabo durante al menos 3 horas a 4°C en agitación rotatoria. Del extracto lisado se separó una alícuota de 20 µL (INPUT) a la que se añadió 20 µL de tampón de carga de proteínas al 4X, el resto se incubó con las bolas conjugadas con el anticuerpo durante 2 horas a 4°C en agitación rotatoria. El inmunoprecipitado se lavó 3 veces con 1 mL del tampón de lisis durante 10 minutos y finalmente se resuspendió en 50 µL de tampón de carga de proteínas al 4X (IP).

Métodos

Inmunoprecipitación de cromatina y doble Inmunoprecipitación de cromatina

Para la inmunoprecipitación de cromatina, necesaria para el análisis de la ocupación del gen *GAL1* por nuestra proteína interés, se utilizaron células procedentes de cultivos de 120 mL en medio YP + Rafinosa crecidas a una OD₆₀₀ de 0.5. Las células se indujeron agregando al medio glucosa o galactosa al 2% durante 25 minutos, 90 en el caso de la doble inmunoprecipitación. En el caso del gen *ARG1*, se añadieron directamente 13 µL de sulfometurón metilo (SM) a una concentración 0.6 µg/mL en DMSO durante 25 minutos. En este caso se usaron las cepas etiquetadas con el epítipo MYC en el mutante *gcn4Δ* como control negativo del experimento. Las células se entrecruzaron *in vivo* con formaldehído al 1%, durante 20 minutos a temperatura ambiente. El entrecruzamiento se detuvo añadiendo glicina (125 mM) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron 4 veces con 25 mL de TBS frío y se congelaron a -20°C. Las células se lisaron con 300 µL de tampón de lisis (HEPES-KOH 50 mM pH 7.5, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 al 1% (v/v), desoxicolato sódico al 0.1% (p/v), PMSF 1 mM, Benzamidina 1 mM e inhibidor de proteasas Complete (Roche) y 300 µL de perlas de vidrio. La lisis se llevó a cabo durante 13 minutos a 4°C en un vórtex modelo Genie-2 (*Scientific Industries*) a máxima potencia. Tras eliminar las

Métodos

perlas de vidrio, la cromatina se fragmentó (tamaño medio entre 400 y 800 pb) por sonicación (14 pulsos de 30 segundos a la máxima potencia con un sonicador BioRuptor Diagenode) y se centrifugó a 12.000 rpm durante 20 minutos. Diez microlitros del extracto fue utilizado como INPUT y se mantuvo sin purificar para su posterior procesamiento con el resto de muestras. La mitad del extracto (IP) se incubó a 4°C en agitación rotatoria durante 2 horas con el anticuerpo preconjugado a las bolas magnéticas Dynabeads Pan Mouse IgG (Invitrogen) para la etiqueta MYC. La otra mitad de la muestra se incubó con bolas magnéticas sin conjugar con ningún anticuerpo (BACKGROUND). Las bolas magnéticas se lavaron 2 veces con tampón de lisis, dos veces con tampón de lisis suplementado con 500 mM NaCl, dos veces con tampón de lavado (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 250 mM LiCl, NP-40 al 0.5% (v/v), desoxicolato sódico al 0.5% (p/v) y 1mM EDTA) y una vez con tampón TE (Tris-HCl y EDTA 1mM). La elución se realizó con tampón de elución (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA y 10% SDS (p/v)) calentando a 65°C durante 10 minutos dos veces consecutivas. El entrecruzamiento se revirtió a 65°C durante toda la noche. El eluido se digirió durante 90 minutos a 37°C con 0.33 mg/mL de proteinasa K. El DNA se purificó mediante extracción con fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1). En todos los casos se calculó la media y el error estándar de tres experimentos independientes.

Métodos

Ensayos de actividades enzimáticas

Ensayo de la actividad β -galactosidasa

Se recogieron 10 mL de células transformadas con los plásmidos pBTMs a una OD_{600} 0.6-0.8 crecidas en SC sin triptófano. Una vez lavadas, se resuspendieron en 1 mL de tampón Z (60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM NaH_2PO_4 , 10 mM KCl, 1 mM $MgSO_4$, 50 mM β -mercaptoetanol) y se midió la OD_{600} , obteniéndose así el valor que D para el cálculo posterior. Las células se permeabilizaron con 25 μ L de SDS al 0.1% (p/v) y con 50 μ L de cloroformo agitando intensamente durante 15-20 segundos. Las células se incubaron durante 15 minutos en un termobloque a 30°C, tiempo tras el cual añadimos 200 μ L de una solución de 4 mg/mL de ONPG preparado en tampón Z. La progresión de la reacción enzimática se detectó por la aparición de color amarillo en la muestra producida por la hidrólisis del ONPG. Se detuvo la reacción añadiendo 500 μ L de Na_2CO_3 1M y se anotó el tiempo de reacción al que llamamos T. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación y se determinó la OD_{420} del sobrenadante para evaluar la intensidad de color amarillo desarrollado en la reacción.

Métodos

Las unidades de actividad β -galactosidasa se calcularon a través de la siguiente fórmula:

$$U = \frac{OD_{420} * 1000}{D * T}$$

Siendo:

U: Actividad β -galactosidasa

D: OD₆₀₀ de las células ensayadas

T: tiempo en parar la reacción (en minutos)

Ensayo de la actividad desubcunitinasa

En primer lugar se purificó la histona H2B que servirá de sustrato en el ensayo. Para ello, se recogió la cepa HTB1 que tiene deleciónado el gen codificante para la histona H2B y contiene el plásmido pZS145 HTA1-Flag-HTB1-CEN-HIS3 y la construcción GAPDH-3HA-UB14::URA3. Se lavó con ácido tricloroacético al 20% y se rompió en el vórtex modelo Genie-2 (Scientific Instruments) a 4°C durante 15 minutos con perlas de vidrio. El lisado se centrifugó durante 10 minutos a 3.000 rpm. El pellet se resuspendió en 0.2 mL de tampón de carga de proteínas y en 50 μ L de Tris 2 M, para neutralizar el pH. La muestra se hirvió durante 3 minutos y se centrifugó 10 minutos a 3.000 rpm. 50 μ l del sobrenadante se guardó como control y el resto se incubó con 800 μ L de tampón IP (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, NP-40 al 0.5%, y 0.5 mg/ml BSA) con 25 μ L de resina M2 anti-Flag (Sigma). Tras una incubación de una

Métodos

hora a 4°C, la resina se lavó con tampón IP tres veces y se eluyó la histona enriquecida incubando la resina con 2 µL de péptido Flag a una concentración de 4 mg/ml en 40 µL de tampón IP durante 30 minutos a temperatura ambiente.

El ensayo se realizó incubando 5 µL de histona purificada (H2B-Flag ubiquitinada y sin modificar) con 100 µL de eluido nativo purificado por la técnica TAP durante 30 minutos a 30°C. Como control negativo se incubó la histona junto con el tampón de elución de la TAP, o bien, junto con un purificado nativo procedente de la cepa *Sus1-TAP sgf73Δ*. La actividad se detectó mediante WB empleando anticuerpos anti-HA (Sigma), lo que permitió inmunodetectar la cantidad de histona H2B ubiquitinada.

Análisis de imagen

La cuantificación de las bandas de WB, correspondientes a los ensayos de desubiquitinación realizados, y de las imágenes procedentes del microscopio de fluorescencia, procedentes de las hibridaciones *in situ*, se realizó usando el programa de análisis de imagen Image J (Instituto Nacional de la salud (NIH) de EE.UU).

Métodos

Técnicas microscópicas

Localización *in vivo* de proteínas

La visualización de proteínas etiquetadas con GFP se llevó a cabo directamente en células vivas crecidas en el medio correspondiente a una OD₆₀₀ de 0.3-0.5. Las células se lavaron con agua y se resuspendieron en un volumen final de 100 µL de H₂O. Se utilizó el microscopio de fluorescencia DM6000B de Leica con el objetivo 63X PL APO.

Hibridación *in situ* de RNA poliadenilado

La hibridación de los mRNA poliadenilados se realizó empleando cultivos de 50 mL con una OD₆₀₀ entre 0.2 y 1. Las células se fijaron con formaldehído al 4% (v/v) y se incubaron a temperatura ambiente durante 60 minutos. Tras recoger las células por centrifugación a 2.500 rpm 3 minutos, se resuspendieron en 5 mL de una disolución formada por formaldehído al 4% (v/v) y K₃PO₄ 0.1 M pH 6.4. Se lavaron las células dos veces con 10 mL de K₃PO₄ 0.1 M pH 6.4. Se hizo un lavado adicional con el tampón K₃PO₄ 0.1 M, sorbitol 1.2 M, y se resuspendieron las células en 1 mL de este mismo tampón. Las células se transfirieron a un nuevo tubo. Se centrifugó 1 minuto a 6.000 rpm y se volvió a resuspender en 1000 µL de tampón de lavado. Se añadieron 10 µL de solución de Zymoliasa 10T (5 mg de Zymoliasa en 10 mL de tampón de

Métodos

lavado), incubando 30 minutos a 30°C con agitación. Tras una centrifugación de 3 minutos a 3.000 rpm y un lavado con 1 mL de tampón K_3PO_4 0.1 M, sorbitol 1.2 M, el sedimento se resuspendió en 30 μ L de este tampón. Toda la solución se añadió a pocillos recubiertos de poli-L-lisina. Estos pocillos fueron preparados con anterioridad, añadiendo 20 μ L de poli-L-lisina 3 mg/mL en cada uno de los pocillos de la placa que se iban a utilizar, dejando 10 minutos a temperatura ambiente y eliminando entonces el exceso con una bomba de vacío. Una vez aplicada la muestra en los pocillos así tratados, se dejó secar durante 20 minutos y las células no adheridas fueron retiradas por aspiración. A partir de este momento las muestras se mantuvieron, para evitar que se secaran, en una cámara húmeda. Los pocillos se lavaron con 100 μ L/pocillo de SSC 2X y las muestras se incubaron en la misma solución durante 10 minutos. Se retiró el SSC 2X, se añadió 25 μ L de tampón de prehibridación (sulfato de dextrano al 10% (p/v), formamida desionizada al 50% (v/v), tRNA de *Escherichia coli* 125 μ g/mL, DNA de salmón 500 μ g/mL, Denhart 1X, DTT 1mM y RNasina 4 unidades/mL) y se incubó al menos 1 hora a 37°C. Se añadió 1 pmol de la sonda y se incubó a 37°C durante toda la noche. Los pocillos se lavaron introduciendo la placa dentro de un vaso de precipitados con 100 mL de SSC 2X y se dejaron 5 minutos del mismo modo en SSC 1X. Se dejó secar la placa, se añadió 3.5 μ L/pocillo de Mowiol, el cual contiene DAPI (Calbiochem-Merck), se colocó un cubre y se

Métodos

dejó al menos 1 hora a temperatura ambiente para que el Mowiol solidificara antes de observar la preparación al microscopio de fluorescencia DM6000B de Leica con el objetivo 63X PL APO.

RESULTADOS

Sus1 interacciona genéticamente con proteínas implicadas en diferentes procesos

Hasta el momento se ha identificado a Sus1 como un componente estable de dos complejos, SAGA y TREX-2 (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2004). Además, se ha descrito que también es capaz de establecer interacciones transitorias con otros factores (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2004; Pascual-García *et al.*, 2008; Cuenca-Bono *et al.*, 2010). Con el fin de profundizar en el mecanismo molecular por el cual Sus1 coordina la transcripción y la exportación de los mRNAs nos propusimos identificar qué otros factores interaccionan funcionalmente con Sus1. Puesto que la red de interacciones genéticas para un gen dado proporciona una información muy valiosa en la comprensión de su papel dentro del contexto celular, decidimos analizar la red completa de interacciones genéticas descritas para el gen *SUS1*, facilitada por la base de datos DRYGIN (*Data Repository of Yeast Genetic Interactions*). DRYGIN es una base de datos de interacciones genéticas de *S. cerevisiae*. La información que contiene se ha adquirido a partir de los estudios masivos realizados en el laboratorio del Dr. Charles Boone (Universidad de Toronto) (Baryshnikova *et al.*, 2010; Costanzo *et al.*, 2010; Koh *et al.*, 2010). Esta base de datos permite el análisis y la visualización

Resultados

de las interacciones genéticas tanto positivas como negativas de una colección de dobles mutantes de *S. cerevisiae*.

El resultado de esta búsqueda desveló una serie de genes cuya interacción funcional con Sus1 era ya conocida, entre ellos aquellos cuyas proteínas forman parte de los complejos SAGA y TREX-2. Además, se identificaron otros genes no relacionados funcionalmente con Sus1 entre los cuales nos interesó investigar los siguientes: *ASF1*, *NUP60*, *SEM1* y aquellos involucrados en el metabolismo de telómeros: *MLP2*, *HST3*, *SAP30*, *SWD1*, *ESC2* y *RSC2* (Figura 10). Estos resultados sugieren que una amplia variedad de genes con funciones celulares dispares en la célula pueden estar influyendo en el papel de Sus1 durante la expresión génica.

Resultados

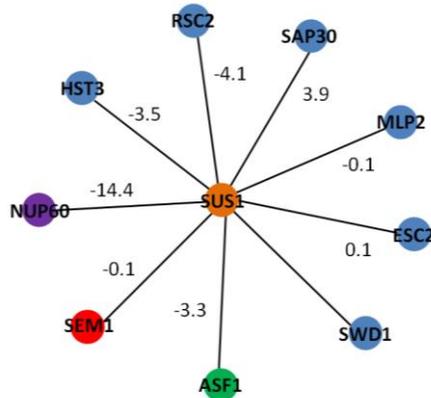


Figura 10. **Red de interacciones genéticas de Sus1.** En la figura se muestran aquellos genes que nos interesó investigar en este trabajo. Los genes están representados por nodos y las interacciones por las líneas que los unen. El azul se muestran los genes relacionados con el metabolismo de telómeros. Los datos de las interacciones provienen de la base de datos: DRYGIN, y SGD.

Sus1 interacciona genética y físicamente con la chaperona de histonas Asf1

Como se vio en la introducción, Asf1 es una chaperona de histonas que interacciona con las histonas H3 y H4, jugando un papel importante durante el ensamblaje y desensamblaje de la cromatina durante los procesos de replicación, transcripción y reparación del DNA (Emili *et al.*, 2001; Adkins & Tyler, 2004; Green *et al.*, 2005; Schwabish & Struhl, 2006). A través de la regulación del estado de la cromatina Asf1 contribuye de una manera fundamental en la regulación global de la expresión génica (Zabaronick & Tyler,

Resultados

2005). Además, se ha demostrado una conexión funcional entre Asf1 y la RNA polimerasa II (RNA Pol II) a través de la proteína Bdf1 (Chimura *et al.*, 2002). Estos datos sugieren que la función de Asf1 en la célula podría verse relacionada con el papel de Sus1 durante la transcripción del RNA mensajero.

Con el objetivo de validar la posible interacción genética entre Sus1 y Asf1 sugerida a partir de los experimentos de análisis masivo, analizamos los defectos de crecimiento del doble mutante *sus1Δasf1Δ*. El ensayo de crecimiento en medio YP + Glucosa, tanto a 30°C como a 37°C, reveló un retardo más acusado en el crecimiento celular del doble mutante respecto al que presentan los mutantes sencillos (Figura 11). Estos datos sugieren una relación funcional entre los genes *ASF1* y *SUS1* que podría resultar en una potencial acción acoplada durante el inicio de la expresión génica.

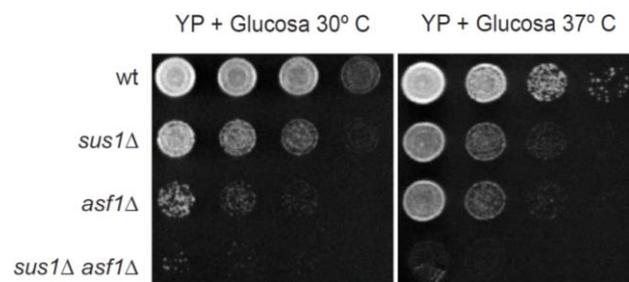


Figura 11. **Análisis del crecimiento celular del doble mutante *sus1Δasf1Δ***. Se crecieron células de wt, *asf1Δ*, *sus1Δ* y *sus1Δasf1Δ* hasta alcanzar una OD de 0.5. Se sembraron diluciones seriadas de las cepas indicadas en placas YP + Glucosa. Se incubaron durante 48 h a 30°C (panel izquierdo) y 37°C (panel derecho).

Resultados

Por otro lado, existen evidencias experimentales que apoyan una interacción funcional de Asf1 con SAGA, por ejemplo, se ha demostrado que Asf1 se recluta al gen regulado por SAGA *GAL1* en condiciones de activación transcripcional (Schwabish & Struhl, 2006). Además, se ha descrito que Asf1 regula la unión de SAGA tanto al promotor de *HO* (Takahata *et al.*, 2009) como al de *PHO5* (Adkins *et al.*, 2007). Sin embargo, hasta el momento no se ha demostrado ninguna interacción física de Asf1 con componentes de SAGA. Con el objetivo de verificar una posible interacción física entre estos factores, purificamos Asf1 mediante la técnica TAP y analizamos la presencia del componente de SAGA Sus1 mediante *Western blot* (WB).

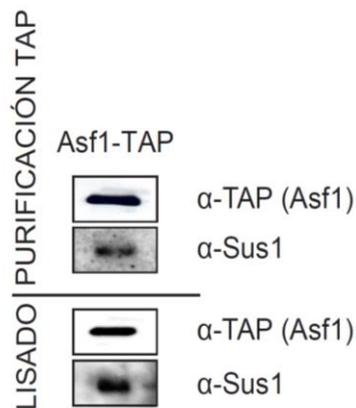


Figura 12. **Purificación TAP de Asf1 en una cepa silvestre.** La presencia de Sus1 y los niveles de la proteína cebo Asf1 se comprobaron en el purificado (panel superior) y en los lisados (panel inferior) mediante WB utilizando anticuerpos α -Sus1 y α -TAP respectivamente.

Resultados

El resultado de la purificación demuestra que Asf1 interacciona físicamente con Sus1, si bien, no podemos concluir si la interacción es directa o indirecta (Figura 12). Estos resultados apoyan la existencia de una interacción tanto genética como física entre las proteínas Sus1 y Asf1, que junto con los antecedentes experimentales indicados, sugiere una posible acción coordinada durante la activación génica, donde Asf1 cooperaría adecuando el estado de la cromatina a las distintas señales de activación transcripcional, mientras que Sus1 favorecería la formación del PIC y la sucesiva expresión génica a través del coactivador SAGA.

Asf1 exacerba el defecto en la exportación de los mRNAs que presenta *sus1*Δ

El hecho de que SAGA y Asf1 estén funcionalmente relacionadas durante el proceso de la transcripción, y de que Asf1 mantenga una interacción física con Sus1, nos llevó a cuestionar el papel de Asf1 en la función de Sus1 como factor de exportación. Para ello analizamos el posible defecto en la exportación de los mRNAs de la cepa mutante *asf1*Δ en comparación con el mutante *sus1*Δ, mediante un experimento de hibridación *in situ*. El resultado reveló que existe un defecto de exportación de los mRNAs en el mutante *asf1*Δ, puesto que presenta un acúmulo de mRNAs en el núcleo a 30°C (Figura

Resultados

13). Por lo tanto, Asf1 es necesario para una exportación eficiente de los mRNAs.

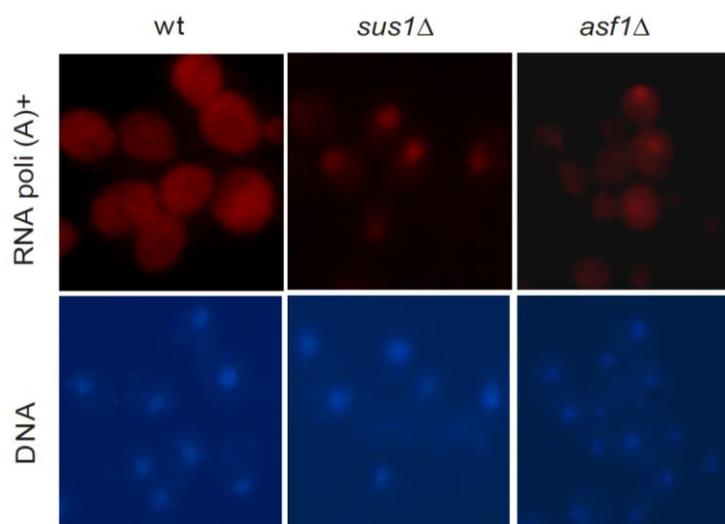


Figura 13. **Análisis de la exportación de los RNAs poli(A)+ en las cepas wt, *sus1Δ* y *asf1Δ*.** Las cepas fueron crecidas en YP + Glucosa a 30°C. La localización de los RNAs poli(A)+ se comprobó mediante hibridación *in situ* utilizando una sonda Oligo(dT) marcada con Cy3. Los núcleos fueron detectados mediante el marcaje del DNA con DAPI. Las imágenes mostradas son una muestra representativa de las fotografías obtenidas en el microscopio de fluorescencia.

La asociación de Sus1 con TREX-2 depende de Nup60

De los posibles interactores funcionales de Sus1, otra de las proteínas que nos interesó fue Nup60. Se trata de una nucleoporina localizada en la parte nucleoplasmática del

Resultados

complejo del poro nuclear (NPC) (Rout *et al.*, 2000). Nup60 es necesaria para el correcto reclutamiento de mRNAs específicos al NPC bajo condiciones de inducción (Ahmed *et al.*, 2010; Powrie *et al.*, 2011), así como para establecer un punto de control donde sólo las mRNP correctamente procesados puedan ser exportados al citoplasma (Powrie *et al.*, 2011). También se ha demostrado que influye en la regulación del proceso de corte y empalme de intrones en levadura (Galy *et al.*, 2004). Todas estas evidencias experimentales indican que Nup60 contribuye directamente en la expresión y exportación de los mRNAs. Además, se ha visto que el NPC establece contacto directo tanto con subunidades de SAGA (Luthra *et al.*, 2007), como con TREX-2 (Jani *et al.*, 2009), donde Sus1 participa formando parte estructural y funcional de ambos complejos. Estos datos sugieren que la coordinación y estabilización entre los complejos TREX-2-SAGA-NPC es esencial para la correcta regulación génica.

Los antecedentes bibliográficos descritos, junto con la posible interacción genética existente entre Nup60 y Sus1, sugiere un posible papel de Nup60 en la estabilización de Sus1 a los complejos SAGA y TREX-2 a través del NPC. Para verificar esta posibilidad realizamos una purificación TAP utilizando como cebo a Sus1. El resultado de purificar Sus1 en ausencia de *NUP60* fue comparado con el de una cepa silvestre. El eluido purificado fue analizado tanto en un gel de Coomassie como mediante espectrometría de masas. Ambos

Resultados

estudios desvelaron un perfil de interacciones de Sus1 distinto en ausencia de *NUP60* en comparación con la cepa silvestre. El análisis del gel de Coomassie muestra una diferencia significativa en la asociación de las subunidades de TREX-2, Sac3 y Thp1 a Sus1 (Figura 14A). Este resultado fue corroborado al analizar por espectrometría de masas el eluido de proteínas que copurifican con Sus1 (Figura 14B). Además, en ausencia de Nup60, tampoco se identificaron péptidos correspondientes a la subunidad de SAGA Spt8 en el eluido enriquecido (Figura 14B). Estos resultados sugieren que, el componente del poro nuclear Nup60 es necesario para el correcto anclaje de Sus1 a TREX-2 y SAGA, poniéndose en evidencia la importancia de la coordinación entre los complejos TREX-2-SAGA-NPC.

Resultados

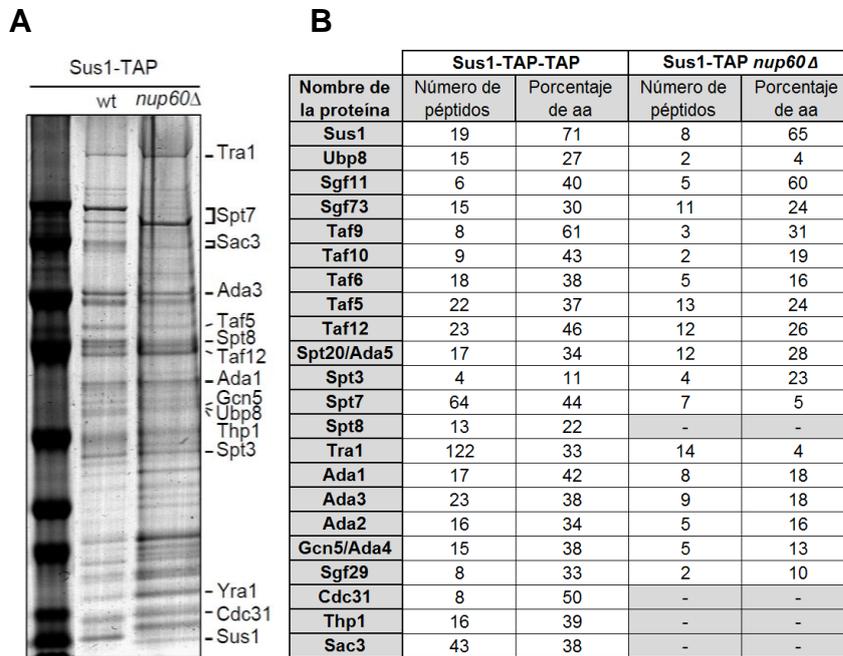


Figura 14. **Análisis del perfil de interacción de Sus1 en una cepa silvestre y mutante *nup60Δ*.** (A) Purificación TAP de Sus1 en una cepa silvestre y mutante *nup60Δ*. Las purificaciones se analizaron en un gel de gradiente de poliacrilamida (4-12%) y las proteínas fueron teñidas con Coomassie coloidal. Las subunidades de SAGA y TREX-2 indicadas en la figura fueron detectadas por espectroscopía de masas. (B) Identificación MudPIT de los péptidos obtenidos en las purificaciones TAP mencionadas. En la tabla se indica el número de péptidos encontrados para cada proteína identificada, así como el porcentaje de secuencia aminoacídica que estos representan respecto al total de la proteína.

La localización intranuclear de Sus1 depende de Nup60

Nuestros experimentos bioquímicos han determinado que Sus1 se encuentra asociada a los complejos SAGA y

Resultados

TREX-2. Ambos complejos se encuentran localizados preferentemente en el núcleo, donde desarrollan su papel durante las distintas etapas de la transcripción. Dentro del núcleo cada complejo presenta una localización diferenciada. SAGA, como coactivador transcripcional, ejerce su función sobre la cromatina y se localiza preferentemente en el nucleoplasma, mientras que TREX-2 lo hace en la periferia nuclear asociado al NPC. Atendiendo a esta doble localización subcelular de Sus1 dependiente de ambos complejos, Sus1 puede ser detectado tanto en el nucleoplasma como asociado al poro (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2004).

Como hemos descrito anteriormente, la asociación de Sus1 a TREX-2 viene mediada por Nup60, por lo que cabe esperar que en su ausencia Sus1 presente una localización mayoritariamente nucleoplasmática. Con el fin de verificar esta hipótesis, estudiamos la localización *in vivo* por microscopía de fluorescencia de una cepa Sus1 etiquetada en su copia genómica con el epítipo GFP, tanto en una cepa silvestre como en el mutante *nup60Δ*. Como habíamos anticipado, detectamos una deslocalización de Sus1-GFP hacia el interior del núcleo al comparar la cepa mutante con células Sus1-GFP silvestres (Figura 15). Por lo tanto, los datos de localización *in vivo* de Sus1 corroboran los resultados bioquímicos obtenidos y refuerzan el papel de Nup60 en la dinámica de interacción de Sus1 con los complejos SAGA y TREX-2.

Resultados

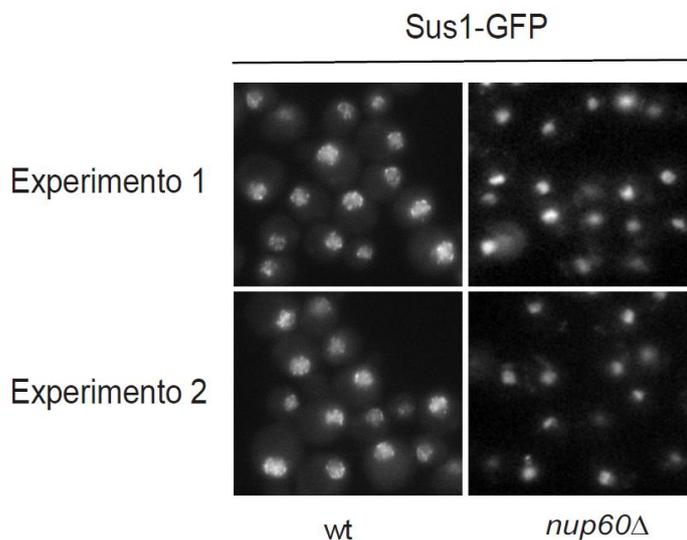


Figura 15. **Localización celular *in vivo* de Sus1-GFP mediante microscopía de fluorescencia en una cepa wt y mutante *nup60Δ*.** Las imágenes mostradas son una muestra representativa de todas las obtenidas en el microscopio de fluorescencia.

Nup60 altera las proporciones normales de transcritos de Sus1 procesados y sin procesar

En *S. cerevisiae* la presencia de intrones dentro de las regiones codificantes es un hecho raro, tan sólo un 5% de los genes contiene intrones, de los cuales sólo 10 han sido descritos como portadores de dos intrones (Juneau *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007; Nagalakshmi *et al.*, 2008; Parenteau *et al.*, 2008). Sorprendentemente, a diferencia de la mayoría

Resultados

de los casos estudiados, el gen *SUS1* contiene dos intrones cuyas señales de corte y empalme no están conservadas (Bon *et al.*, 2003; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2004; Hossain *et al.*, 2009; Pascual-García & Rodríguez-Navarro, 2009). Esta estructura genómica característica de *SUS1* está conservada evolutivamente (Cuenca-Bono *et al.*, 2011). Estos datos sugieren una regulación compleja del proceso de corte y empalme en este gen, poniéndose de manifiesto la importancia biológica de los intrones de *Sus1* en la regulación de su propia expresión (Cuenca-Bono *et al.*, 2011; Hossain *et al.*, 2011). Una observación sorprendente de este estudio fue la existencia de una proteína pequeña formada por un fragmento de *Sus1*, supuestamente traducida a partir de un transcrito portador del intron 1 (Cuenca-Bono *et al.*, 2011).

Una observación más exhaustiva del gel de Coomassie analizado en el apartado anterior reveló una movilidad electroforética atípica de *Sus1* en la cepa mutante *nup60Δ*. Puesto que la estructura genómica de *SUS1* es bastante inusual y existen precedentes de la existencia de versiones truncadas de *Sus1* traducidas en la célula (Cuenca-Bono *et al.*, 2011), consideramos conveniente profundizar en este dato. Para visualizar el tamaño de la proteína *Sus1* tras la purificación TAP (introducida en C-terminal), se analizó su presencia en los eluidos de calmodulina mediante WB utilizando tanto anticuerpos anti-TAP como anti-*Sus1*. La inmunotinción mostró que en ausencia de *NUP60* existe una

Resultados

proteína Sus1-TAP idéntica en tamaño a la observada en la cepa silvestre, pero sorprendentemente también existen subespecies de Sus1 de movilidad electroforética menor (Figura 16). Estas especies de menor tamaño podrían provenir de transcritos procesados a través del fenómeno del corte y empalme alternativo.

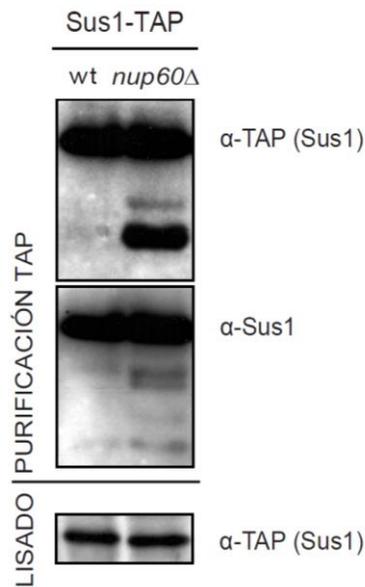


Figura 16. **Purificación TAP de Sus1 en una cepa silvestre y mutante *nup60Δ*.** La presencia de Sus1 y sus diferentes especies se comprobó en el purificado (panel superior) mediante WB utilizando anticuerpos α -TAP y α -Sus1. La presencia de la proteína cebo Sus1-TAP también se detectó en los lisados (panel inferior) empleando anticuerpos α -TAP.

Resultados

Con el objetivo de investigar si este cambio a nivel de proteína se debe a un producto artefactual del experimento, o por el contrario puede verse reflejado a nivel de RNA mensajero, analizamos los mRNAs de *Sus1* tanto de una cepa silvestre como de una deficiente en la proteína *Nup60*. Para ello, extrajimos el RNA total de la célula y llevamos a cabo una retrotranscripción del RNA. El RNA retrotranscrito obtenido se analizó realizando una PCR convencional empleando oligonucleótidos que hibridan coincidiendo con el inicio y final de la ORF de *SUS1*, tanto en 5' como en 3' (Figura 17A). Como se observa en la figura 17B, en ausencia de *NUP60* la proporción de especies procesadas y sin procesar del RNA mensajero de *Sus1* varía respecto a la cepa silvestre. La especie mayoritaria de RNA retrotranscrito que aparece en la cepa silvestre es aquella en la que ambos intrones han sido eliminados (mRNA) y posee una movilidad electroforética mayor, por lo tanto dará lugar a una proteína completa formada por los tres exones de *Sus1* más grande. Este resultado está de acuerdo con datos ya publicados (Cuenca-Bono *et al.*, 2011; Hossain *et al.*, 2011). Sin embargo, la especie mayoritaria de RNA retrotranscrito que aparece en la cepa mutante corresponde al mRNA que contiene ambos intrones (I1&I2), movilidad electroforética menor, y que podrá dar lugar a proteínas truncadas más pequeñas como las observadas en el gel de Coomassie.

Resultados

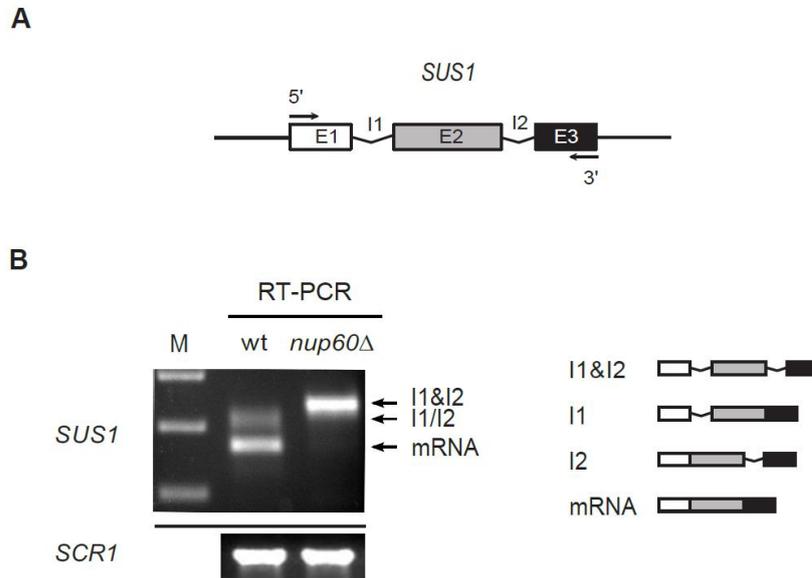


Figura 17. **Representación de la ORF de *SUS1* y análisis de los transcritos de *SUS1* mediante RT-PCR.** (A) ORF de *SUS1* donde se indica la posición de los oligonucleótidos tanto en 5' como en 3'. (B) Las bandas correspondientes con las distintas especies de RNA retrotranscrito han sido indicadas (I1&I2: RNA retrotranscrito que contiene ambos intrones, I1/I2: RNA retrotranscrito que contiene el intron 1 o el intron 2, mRNA: RNA retrotranscrito sin intrones).

En resumen, los datos bioquímicos y de localización analizados refuerzan el papel de Nup60 en la dinámica de interacción de Sus1 con los complejos SAGA y TREX-2, estabilizando el macrocomplejo SAGA-TREX-2 en el NPC. Por otro lado, Nup60, a través de su función de control de calidad de los mRNAs que van a ser exportados, es esencial para la

Resultados

regulación del proceso de corte y empalme por el que se controla la expresión génica de *Sus1*.

Sus1 interacciona genética y físicamente con la maquinaria de regulación de telómeros

Los telómeros son estructuras complejas y conservadas que se localizan en los extremos de los cromosomas de eucariotas. Están compuestos de DNA repetitivo y proteínas (Cervantes & Lundblad, 2002). Su función principal es evitar la inestabilidad genómica en la célula, protegiendo los extremos cromosómicos de la degradación (Louis & Vershinin, 2005). La localización intranuclear de los mismos se ha asociado a la heterocromatina de la periferia nuclear (Hediger & Gasser, 2002) situada en el entorno del NPC (Therizols *et al.*, 2006), donde se producen los efectos de barrera y silenciamiento.

Distintas subunidades de SAGA han sido identificadas como elementos barrera que ayudan a aislar dominios transcripcionalmente silenciados (Oki *et al.*, 2004). Concretamente, la subunidad de SAGA Ada2 se une a los telómeros evitando la expansión de la heterocromatina (Jacobson & Pillus, 2009) y el homólogo de *Sus1*, *ENY2*, en conjunto con Su(Hw) y Wari, actúa como elemento barrera en *Drosophila melanogaster* (Kurshakova *et al.*, 2007; Erokhin *et al.*, 2010). El papel de SAGA en el mantenimiento de la

Resultados

heterocromatina tiene lugar en la proximidad del NPC, donde el contacto entre subunidades de ambos complejos es necesario para establecer el efecto barrera (Fischer *et al.*, 2004; Luthra *et al.*, 2007).

La búsqueda de interacciones genéticas con *SUS1* en la base de datos DRYGIN desveló una serie de genes relacionados con el metabolismo y regulación de los telómeros: *SEM1*, *MLP2*, *HST3*, *SWD1*, *SAP30*, *ESC2* y *RSC2* (Tabla 1). Cabe resaltar que la proteína Nup60, mencionada en el apartado anterior, es también responsable de anclar al complejo Mlp1/Mlp2 al NPC (Feuerbach *et al.*, 2002), formando parte a su vez del mecanismo de regulación de telómeros. La existencia de estas interacciones genéticas, junto con los antecedentes bibliográficos que apuntan una interacción funcional entre *Sus1* y el mantenimiento de la cromatina telomérica, nos llevó a profundizar el estudio del papel de *Sus1* en esta materia.

Resultados

Nombre sistemático	Nombre	Función
YDR363W-A	<i>SEM1</i>	Componente de la región de la tapa de la subunidad 19S RP del proteasoma; componente del complejo TREX-2 involucrado en la exportación del mRNA; involucrado en el silenciamiento de los telómeros
YIL149C	<i>MLP2</i>	Proteína asociada a la envoltura nuclear, conecta el NPC con el nucleoplasma; involucrada en el mecanismo de control de la longitud de los telómeros
YOR025W	<i>HST3</i>	Miembro de la familia de las desacetilasas Sir2; involucrado, junto con Hst4, en el silenciamiento de telómeros, la progresión del ciclo celular, estabilidad genómica
YAR003W	<i>SWD1</i>	Subunidad del complejo COMPASS, el cual metila a la histona H3 en la lisina 4 y es necesario para el silenciamiento transcripcional en las inmediaciones de los telómeros
YMR263W	<i>SAP30</i>	Subunidad de un complejo histona desacetilasa, junto con Rpd3 y Sin3, involucrado en el silenciamiento de los telómeros, del rDNA, y del <i>loci</i> de determinación sexual; involucrado en el mantenimiento de los telómeros
YDR363W	<i>ESC2</i>	Previene la acumulación de intermediarios tóxicos durante la reparación por recombinación asociada a replicación; involucrado en el silenciamiento, período de vida, cohesión de la cromatina y en el punto de control de la fase S del ciclo celular
YLR357W	<i>RSC2</i>	Componente del complejo remodelador de la cromatina RSC; necesario para la expresión de los genes tardíos específicos de la esporulación; involucrado en el mantenimiento de los telómeros

Tabla 1. Descripción de los genes obtenidos en la búsqueda de interacciones genéticas de *SUS1* en la base de datos DRYGIN relacionados con el metabolismo y regulación de los telómeros.

En primer lugar, quisimos verificar las interacciones genéticas obtenidas a partir de los análisis masivos. Para ello, se construyeron dobles mutantes de los factores descritos en la tabla 1 y se analizó su crecimiento (Figura 18).

Resultados

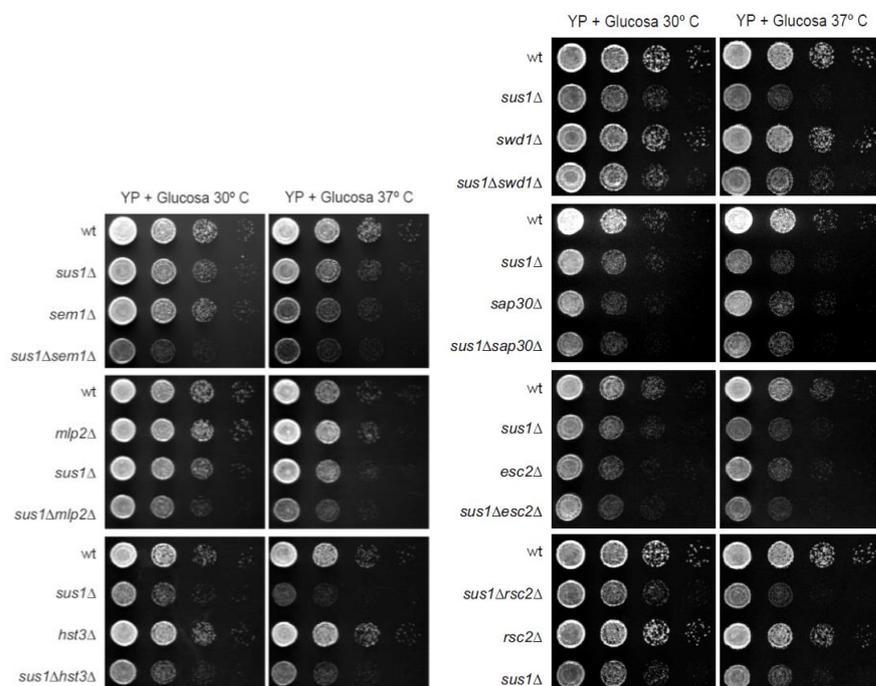


Figura 18. **Análisis del crecimiento celular de los factores descritos en la tabla 1.** Se crecieron las células indicadas hasta alcanzar una OD de 0.5. Se sembraron diluciones seriadas de cada cepa en placas YP + Glucosa. Se incubaron durante 48 h a 30°C (panel izquierdo) y 37°C (panel derecho).

Como se observa en la figura 18, existe una interacción genética entre *SUS1* y los distintos factores relacionados con el metabolismo de telómeros. En el caso de *SEM1*, *MLP2*, y *ESC2* el crecimiento de los dobles mutantes es menor que el crecimiento que presentan los mutantes simples. En el caso de *HST3* y *RSC2*, el crecimiento del doble mutante parece suprimir parcialmente el fenotipo del mutante simple *SUS1*.

Resultados

Este resultado apoya la relación funcional que *SUS1* mantiene con la regulación de los telómeros a través del complejo SAGA y su coordinación con el NPC.

A la vista de estos resultados, decidimos estudiar una posible interacción física entre *Sus1* y los componentes de la regulación de telómeros. Para ello, realizamos una purificación TAP utilizando como cebo *Sus1*. El eluido purificado se analizó por espectrometría de masas, donde sorprendentemente se detectaron péptidos únicos correspondientes a las proteínas: *Mlp2*, *Rif1*, *Yku80* y *Upf2*, todas ellas relacionadas con la maquinaria de regulación telomérica. *Mlp2* participa a través de *Nup60* en el anclaje de telómeros al poro; *Rif1* participa junto con *Rif2* en la regulación transcripcional de TERRA a través del complejo *Sir2/3/4* o de la exonucleasa *Rat1* (Iglesias *et al.*, 2011); *Yku80* junto a *Yku70* forman un complejo que evita la recombinación entre telómeros, esencial para la estabilidad del genoma (Marvin *et al.*, 2009) y el mantenimiento de la longitud de los telómeros (Boulton & Jackson, 1996; Porter *et al.*, 1996; Gravel *et al.*, 1998; Polotnianka *et al.*, 1998) y *Upf2* forma parte de la maquinaria de degradación de mRNAs defectuosos (NMD) (Baker & Parker, 2004; Isken & Maquat, 2007), cuya inactivación resulta en un aumento de los transcritos de TERRA (Feuerhahn *et al.*, 2010).

Con el objetivo de confirmar la asociación de *Sus1* a estas proteínas, construimos las cepas *Sus1*-TAP donde las

Resultados

copias genómicas de Mlp2 y Rif1 fueron etiquetadas con el epítipo HA. El análisis mediante WB corroboró las identificaciones obtenidas por espectrometría de masas. Luego, existe una interacción física entre Sus1 y las proteínas de la maquinaria de regulación telomérica Mlp2 y Rif1 (Figura 19).

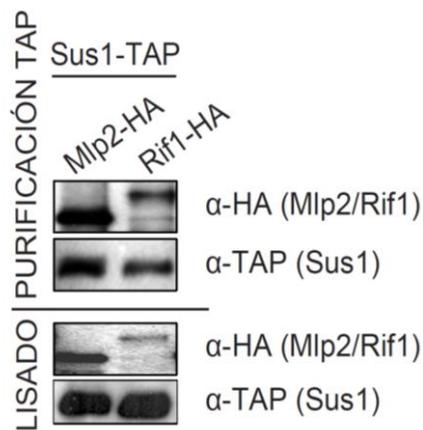


Figura 19. **Purificación TAP de Sus1 en cepas que expresan Mlp2-HA y Rif1-HA.** La presencia de Mlp2 y Rif1 y los niveles de la proteína cebo Sus1 se comprobaron en el purificado (panel superior) y en los lisados (panel inferior) mediante WB utilizando anticuerpos α -HA y α -TAP respectivamente.

Con el fin de confirmar esta interacción y excluir que la asociación observada es inespecífica, realizamos una purificación TAP a partir de una cepa Mlp2-HA que ejercería como control negativo al no tener el epítipo específico TAP. El

Resultados

análisis por WB de esta cepa, junto con la cepa de interés Sus1-TAP Mlp2-HA, desveló la presencia de la proteína Mlp2-HA tanto en el purificado de la cepa de interés como en el control negativo, lo que sugiere que el epítipo HA se inmunoprecipita inespecíficamente durante el experimento y no es válido para verificar interacciones en nuestras condiciones experimentales (Figura 20).

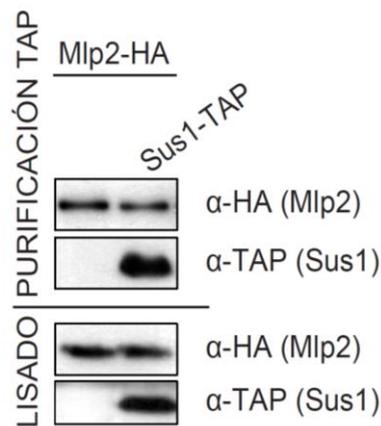


Figura 20. **Purificación TAP de Sus1 en cepas que expresan Mlp2-HA.** Sus1 se purificó en la cepa Sus1-TAP Mlp2-HA, en paralelo se purificó la cepa Mlp2-HA desprovista del epítipo TAP como control negativo del experimento. La presencia de Mlp2 y los niveles de la proteína cebo Sus1 se comprobaron en el purificado (panel superior) y en los lisados (panel inferior) mediante WB utilizando anticuerpos α -HA y α -TAP respectivamente.

A fin de esclarecer la interacción de estas proteínas con Sus1, optamos por la estrategia recíproca. Para ello,

Resultados

construimos las cepas Sus1-TAP Mlp2-MYC y Sus1-TAP Rif1-MYC e inmunoprecipitamos el epítipo MYC. El análisis de la presencia de Sus1 en el purificado, mediante WB, aclaró la interacción entre estas proteínas. Tal como se había anticipado mediante el resultado de espectrometría de masas, existe una asociación física entre Sus1 y los factores Rif1 y Mlp2 (Figura 2).

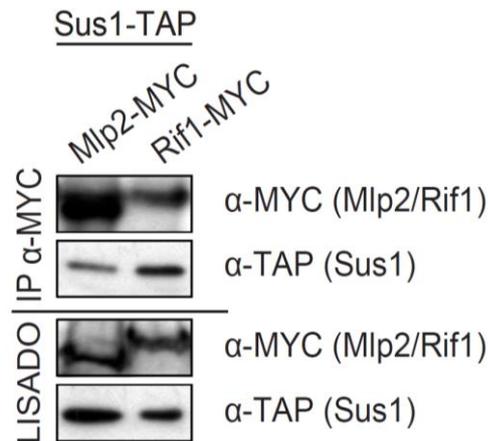


Figura 21. **Inmunoprecipitación α -MYC de Mlp2 y Rif1 en cepas que expresan Sus1-TAP.** La presencia de Sus1 y los niveles de las proteínas cebo Mlp2-MYC y Rif1-MYC se comprobaron en el inmunoprecipitado (panel superior) y en los lisados (panel inferior) mediante WB utilizando anticuerpos α -TAP y α -MYC respectivamente.

Con el propósito de confirmar la interacción entre Sus1 y las otras dos proteínas identificadas por LC-MS/MS: Yku80 y

Resultados

Upf2, construimos las cepas Sus1-TAP donde las copias genómicas de Yku80 y Upf2 fueron etiquetadas con el epítipo PK. Por otro lado, construimos las correspondientes cepas desprovistas del epítipo específico TAP que actuarían como control negativo. El análisis mediante WB, corroboró la interacción física entre Sus1 y estas proteínas. Por lo tanto, existe una asociación física entre Sus1 y los factores Yku80 y Upf2 (Figura 22).

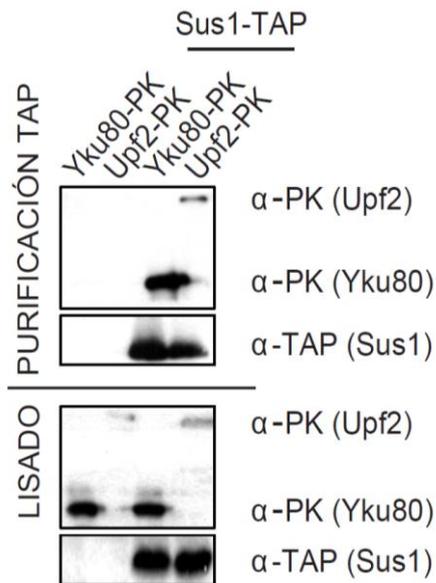


Figura 22. **Purificación TAP de Sus1 en cepas que expresan Yku80-PK y Upf2-PK.** En paralelo se purificaron las cepas Yku80-PK y Upf2-PK desprovistas del epítipo TAP como control negativo del experimento. La presencia de Yku80 y Upf2 y los niveles de la proteína cebo Sus1 se comprobaron en el purificado (panel superior) y en los lisados (panel inferior) mediante WB utilizando anticuerpos α -PK y α -TAP respectivamente.

Sus1 es necesario para el mantenimiento óptimo de la longitud de los telómeros

A diferencia de lo que se pensaba, la heterocromatina telomérica no es transcripcionalmente inactiva, sino que es transcrita a RNA no codificante denominado TERRA (Luke *et al.*, 2008). Los transcritos de TERRA se localizan en las inmediaciones de los telómeros donde hay evidencias experimentales que apoyan su papel como regulador epigenético de la cromatina telomérica y como inhibidor de la telomerasa, participando en la regulación de la longitud de los telómeros (Luke & Lingner, 2009). Al igual que los mRNAs, la síntesis de TERRA está mediada por la RNA Pol II, cuya unión a los telómeros también ha sido descrita (Luke *et al.*, 2008). El hecho de que la transcripción de TERRA la lleve a cabo la RNA Pol II, al igual que en los mRNAs, abre la posibilidad de que la maquinaria transcripcional que regula los RNAs codificantes esté implicada en la regulación de TERRA, y por consiguiente en la longitud de los telómeros. Por otro lado, la identificación de la interacción física entre Sus1 y las proteínas Mlp2, Rif1, Yku80 y Upf2 que forman parte directa de la maquinaria de regulación de los telómeros y de los niveles transcripcionales de TERRA; junto con los estudios que revelan una relación funcional entre SAGA y el silenciamiento de telómeros nos llevó a estudiar el papel de Sus1 en la regulación de la longitud telomérica.

Resultados

Para el desarrollo de este estudio se estableció una colaboración con el grupo de investigación del Dr. Martin-Kupiec (George S Weiss Faculty of Life Science, Tel Aviv University, Israel) que nos permitió llevar a cabo el análisis de la longitud de los telómeros en células de levadura en condiciones de senescencia.

El análisis mediante la técnica *Southern blot* de una cepa silvestre junto con otra mutada en el gen *SUS1* en tres fondos genéticos distintos, desveló un aumento más acusado en la longitud de los telómeros en la cepa mutante del fondo JB respecto a los otros fondos genéticos (Figura 23).

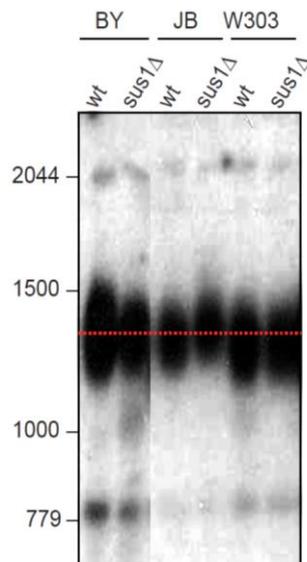


Figura 23. **Análisis de la longitud de los telómeros mediante *Southern blot*.** Se crecieron cepas wt y mutantes *sus1Δ* en tres fondos genéticos diferentes, se extrajo el DNA en cada caso y se

Resultados

digirió con *Xho*I. El resultado se analizó mediante *Southern blot*. La membrana se hibridó con DNA telomérico repetitivo marcado con α - P^{32} y con secuencias específicas que sirven de marcador. La línea horizontal representa la media de la longitud de los telómeros en una cepa silvestre.

Con tal de profundizar en el estudio, analizamos en este mismo fondo genético (JB) algunos mutantes de los genes descritos en el apartado de interacciones genéticas como *RSC2*, *SEM1* y *ESC2*, para los cuales se ha demostrado que poseen defectos en la longitud de telómeros (Askree *et al.*, 2004; Gatbonton *et al.*, 2006). Además, construimos dobles mutantes que combinaban estas mutaciones con la delección de *SUS1*. Como se puede observar, los mutantes sencillos *RSC2*, *SEM1* y *ESC2* presentan un fenotipo de telómeros acortados, mientras que la delección de *SUS1* provoca el alargamiento de telómeros. Al analizar los dobles mutantes podemos ver como el fenotipo de *SUS1* prevalece, siendo su fenotipo dominante (Figura 24).

Resultados

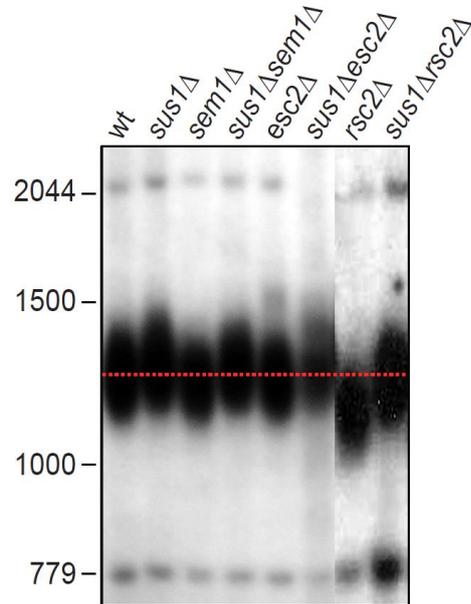


Figura 24. **Análisis de la longitud de los telómeros mediante *Southern blot*.** Se crecieron cepas wt y mutantes *sus1Δ*, *sem1Δ*, *esc2Δ*, *rsc2Δ*, *sus1Δsem1Δ*, *sus1Δesc2Δ* y *sus1Δrsc2Δ*. Se extrajo el DNA en cada caso y se digirió con *XhoI*. El resultado se analizó mediante *Southern blot*. La membrana se hibridó con DNA telomérico repetitivo marcado con $\alpha\text{-P}^{32}$ y con secuencias específicas que sirven de marcador. La línea horizontal representa la media de la longitud de los telómeros en una cepa silvestre.

Estos datos sugieren que *Sus1* podría estar implicado en el proceso del metabolismo de telómeros, posiblemente en una posición aguas arriba dentro del mecanismo molecular que regula la longitud de los mismos.

Resultados

La subunidad Sem1 interacciona físicamente con Sus1

Como se ha mencionado anteriormente, Sus1 coordina la transcripción y la exportación de los mRNAs. Es por ello que la búsqueda de nuevos factores capaces de interactuar funcionalmente con Sus1 es de gran interés, puesto que permiten profundizar en el mecanismo molecular por el cual se produce dicha coordinación entre procesos. Con el objetivo de identificar posibles interactores físicos de Sus1, purificamos esta proteína mediante la técnica TAP y analizamos el eluido enriquecido utilizando la tecnología multidimensional de identificación de proteínas (MudPIT). Esta técnica nos permite identificar por completo la mezcla polipeptídica obtenida en la purificación TAP. Sorprendentemente, además de identificar proteínas predichas como las histonas, componentes de SAGA y TREX-2 (datos no mostrados), también se encontraron péptidos correspondientes a la proteína Sem1 (Figura 25). Sem1 es una proteína pequeña que forma parte estructural de distintos complejos funcionalmente distanciados como el proteasoma (Funakoshi *et al.*, 2004; Sone *et al.*, 2004), responsable de la degradación proteolítica celular, y el signalosoma (Wilmes *et al.*, 2008; Pick *et al.*, 2009), regulador de numerosas rutas de señalización celular. Se cree que en todos ellos podría actuar como un elemento estabilizador, manteniendo la integridad del complejo completo

Resultados

Mascot Search Results

Match to: SEM1_YEAST Score: 64
26S proteasome complex subunit SEM1 OS=Saccharomyces cerevisiae GN=SEM1
PE=1 SV=1
Found in search of D:\QStar data\PP_079 TCA.wiff

Nominal mass (Mr): 10380; Calculated pI value: 4.16
NCBI BLAST search of SEM1_YEAST against nr
Unformatted sequence string for pasting into other applications

Taxonomy: Saccharomyces cerevisiae

Variable modifications: Acetyl (N-term), Deamidated (NQ), Oxidation (M)
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Sequence Coverage: 40%

Matched peptides shown in Bold Red

1 **MSTDVAAAQA QSK**IDLTKKK NEEINKK**SLE EDEFEDFPI DTWANGETIK**
51 SNAVTQTNIW EENWDDVEVD DDFTELKAE LDYKRENQ

Residue Number

Start-End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	Miss	Sequence
1-13	451.2000	1350.5782	1350.5973	-14	0	-.MSTDVAAAQAQSK.I Acetyl
1-13	684.2356	1366.4567	1366.5922	-99	0	-.MSTDVAAAQAQSK.I Acetyl
1-13	609.8060	1217.5975	1217.5888	7	0	M.STDVAAAQAQSK.I Acetyl
28-50	13511298	27002450	27001602	31	0	K.SLEEDDEFEDFPIDTWANGETIK.S

Figura 25. **Identificación de la proteína Sem1 mediante espectrometría de masas.** El eluido obtenido mediante la purificación TAP de Sus1 se analizó mediante espectrometría de masas (MudPIT). Los datos obtenidos se validaron con la información almacenada en las bases de datos de secuencias conocidas mediante el motor de búsqueda MASCOT. La figura muestra la secuencia aminoacídica de la proteína Sem1. Los péptidos identificados en el análisis se han resaltado en rojo.

Con el fin de verificar si Sem1 interacciona físicamente con Sus1 purificamos Sus1 mediante la técnica TAP y examinamos la presencia de Sem1 en el purificado. El análisis mediante WB, empleando anticuerpos contra Sem1, desveló la presencia de Sem1. Este resultado apoya el dato obtenido por

Resultados

espectrometría de masas, donde se identificaron péptidos específicos de Sem1 (Figura 26).

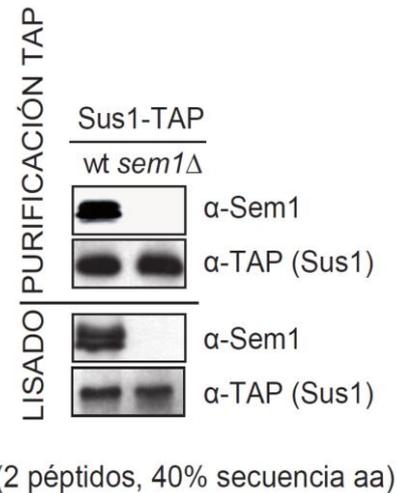


Figura 26. **Purificación TAP de Sus1 en una cepa wt y mutante *sem1Δ***. La presencia de Sem1 y los niveles de la proteína cebo Sus1 se comprobaron en el purificado (panel superior) y en los lisados (panel inferior) mediante WB utilizando anticuerpos α-Sem1 y α-TAP respectivamente. El análisis del purificado mediante MudPIT detectó dos péptidos correspondientes con la proteína Sem1, los cuales representan un 40% de su secuencia aminoacídica.

La interacción física entre Sem1 y Sus1 sugiere una posible relación funcional entre ellas. De hecho, la identificación de la red de interacciones genéticas de *SUS1* en la base de datos DRYGIN desveló la asociación entre los genes *SEM1* y *SUS1* (Figura 10). Por otro lado, existen estudios de ensayos globales donde se ha establecido una

Resultados

interacción genética entre los complejos SAGA, TREX-2 y Sem1 (Ingvarsdottir *et al.*, 2005; Keogh *et al.*, 2005; Wilmes *et al.*, 2008). Estos datos sugieren que Sem1 puede estar relacionado funcionalmente con Sus1.

La subunidad de TREX-2, Sem1, es necesaria para la interacción entre sus componentes y para la estabilidad del complejo

Durante el transcurso de este trabajo, Sem1 ha sido identificada como parte estructural de TREX-2 (Wilmes *et al.*, 2008; Faza *et al.*, 2009). Además, la estructura cristalizada de un fragmento de TREX-2, formado por Sem1, Sac3 y Thp1, ha sido resuelta recientemente (Ellisdon *et al.*, 2012; Ellisdon & Stewart, 2012). A pesar de que la interacción de Sem1 con los componentes de TREX-2, Sac3 y Thp1, ha sido descrita en diferentes trabajos (Wilmes *et al.*, 2008; Faza *et al.*, 2009; Ellisdon *et al.*, 2012), su relación con Sus1 no ha sido investigada. Con el objetivo de estudiar la influencia de las subunidades Sac3 y Thp1 sobre la interacción Sus1-Sem1, se inmunoprecipitó la proteína Sus1 en cepas donde Thp1 y Sac3 fueron deletadas y se investigó la presencia de Sem1 mediante WB. En este experimento podemos ver como los factores de TREX-2, Sac3 y Thp1 son necesarios para la asociación Sus1-Sem1 (Figura 27).

Resultados

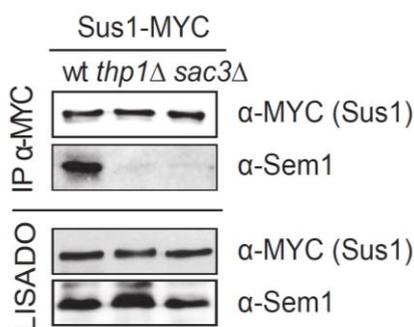


Figura 27. **Inmunoprecipitación α -MYC de Sus1 en una cepa wt y en los mutantes $sac3\Delta$ y $thp1\Delta$.** La presencia de Sem1 y los niveles de la proteína cebo Sus1-MYC se comprobaron en el inmunoprecipitado (panel superior) y en los lisados (panel inferior) mediante WB utilizando anticuerpos α -Sem1 y α -MYC respectivamente.

Estos resultados sugieren que la interacción entre Sus1 y Sem1 es indirecta y está mediada por el resto de los componentes de TREX-2. Estos datos concuerdan con los obtenidos en el análisis estructural de TREX-2, donde se ha descrito que Sem1 y Sus1 interaccionan estructuralmente con diferentes regiones del complejo TREX-2 (Ellisdon *et al.*, 2012; Ellisdon & Stewart, 2012). Cada vez más datos apoyan el modelo de TREX-2 como un andamio molecular en el contexto del NPC, facilitando la interacción con otras maquinarias de la expresión génica. En esta línea, aunque la interpretación de los datos de la estructura cristalina predice que Sem1 no influye sobre la interacción Sus1-TREX-2, decidimos analizar

Resultados

la relevancia de Sem1 en esta asociación. Para ello, purificamos la proteína Sus1 en cepas donde las subunidades Sac3 y Thp1 fueron marcadas con el epítipo MYC tanto en cepas silvestres como mutadas en el gen *SEM1*. Como podemos observar tras el análisis por WB anti-MYC, la unión de Sus1 tanto a Sac3, como a Thp1, se ve significativamente reducida en ausencia de Sem1 (Figura 28).

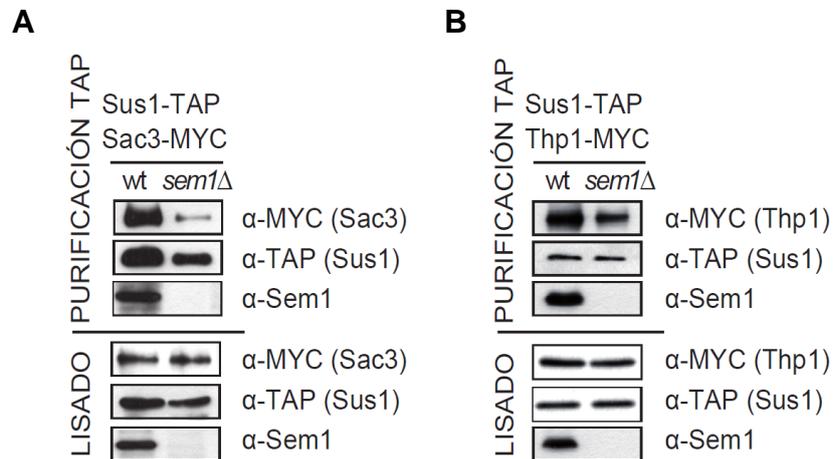


Figura 28. **Purificaciones TAP de Sus1.** (A) Purificación TAP de Sus1 en una cepa que expresa Sac3-MYC en presencia y ausencia de Sem1. La presencia de Sac3 y Sus1 en el purificado se analizó mediante WB utilizando anticuerpos α -MYC y α -TAP respectivamente (panel superior). La comprobación de los niveles de cada proteína en el lisado se realizó empleando los anticuerpos mencionados (panel inferior). (B) Purificación TAP de Sus1 en una cepa que expresa Thp1-MYC en presencia y ausencia de Sem1. La presencia de Thp1 y Sus1 se analizó mediante WB utilizando anticuerpos α -MYC y α -TAP respectivamente (panel superior). La comprobación del lisado se realizó mediante WB como en A (panel inferior).

Resultados

Estos experimentos demuestran que Sem1 es necesario para la correcta asociación de Sus1 con TREX-2, ejerciendo una acción estabilizadora sobre todo el complejo.

Con el propósito de estudiar con mayor detalle el papel que desempeña Sem1 en la estabilidad de la estructura de TREX-2, separamos mediante cromatografía por filtración en gel los extractos proteicos nativos de las cepas Sus1-MYC y Sus1-MYC *sem1* Δ . La cromatografía por filtración en gel permite la separación de proteínas, y complejos, en base a su peso molecular. La presencia de Sus1 en las distintas fracciones cromatográficas se detectó mediante WB, empleando para ello anticuerpos α -MYC. Como podemos observar en el WB hay una disminución en la asociación de Sus1 en aquellas fracciones correspondientes a los pesos moleculares elevados que coinciden con los estimados para TREX-2 (1000-450 KDa) en la cepa *sem1* Δ respecto a la silvestre. También se observa un incremento en la asociación de Sus1 a complejos de menor tamaño (250-150 KDa) (Figura 29).

Resultados

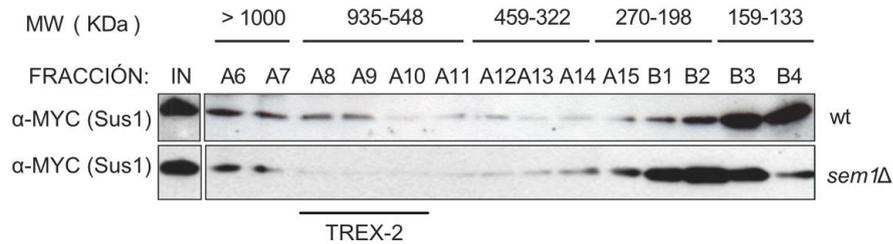


Figura 29. **Cromatografía por filtración en gel de las cepas Sus1-MYC y Sus1-MYC *sem1Δ*.** Se realizaron extractos proteicos nativos de ambas cepas y se separaron mediante cromatografía por filtración en gel (Superdex 200 5/150, Ettan LC System). Las fracciones correspondientes al tamaño molecular de TREX-2 se analizaron mediante WB empleando anticuerpos α-MYC.

Con el fin de profundizar en el papel de Sem1 en la estabilidad de la estructura nativa de TREX-2, decidimos separar por electroforesis no desnaturizante los extractos nativos de una cepa silvestre Sus1-MYC y sus correspondientes mutantes *sem1Δ*, *sac3Δ* y *thp1Δ*. Durante la electroforesis no desnaturizante las proteínas mantienen su estructura tridimensional, conservándose la estructura nativa del complejo al que pertenecen. Las proteínas o complejos analizados en condiciones nativas se resuelven no sólo en función de su carga eléctrica, sino también según su tamaño y forma. La electroforesis nativa es aplicable para la detección de subunidades de un complejo mediante WB o mediante una segunda dimensión desnaturizante, así como para determinar masas moleculares de proteínas en estado nativo.

Resultados

También es utilizada para la realización de ensayos de actividad enzimática en el mismo gel (zimogramas). La presencia de Sus1 en los distintos complejos nativos se detectó mediante WB, empleando para ello anticuerpos anti-MYC. El gel no desnaturizante muestra un cambio en la movilidad electroforética equivalente en ausencia de los tres componentes de TREX-2, Sem1, Thp1 y Sac3 en aquellos complejos compuestos por Sus1-MYC (Figura 30).

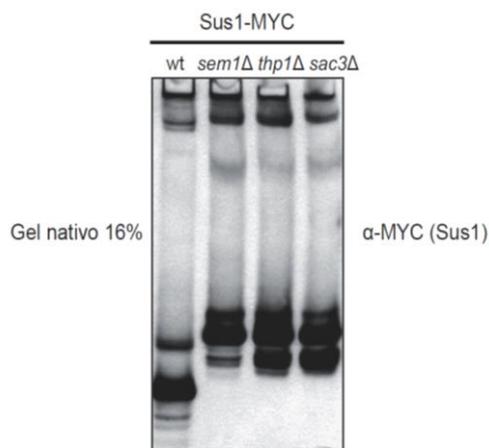


Figura 30. **Electroforesis no desnaturizante de extractos nativos de las cepas Sus1-MYC y Sus1-MYC *sem1Δ*.** Los extractos nativos se separaron en un gel Tris-Borato al 16%. La detección de los distintos complejos constituidos por Sus1 se realizó mediante WB empleando anticuerpos α-MYC.

En resumen, nuestros datos bioquímicos indican que Sem1 es necesario para la asociación de Sus1 al complejo

Resultados

TREX-2 en condiciones nativas, lo que apoya el modelo en el que Sem1 ejerce una acción estabilizadora sobre el complejo quizá manteniendo también la conformación nativa de éste.

La localización intranuclear de Sus1 no depende de Sem1

A raíz de los datos bioquímicos presentados hasta ahora, sabemos que Sem1 es necesario para la correcta asociación de Sus1 con el complejo TREX-2. Sus1 se localiza tanto en el nucleoplasma como en la periferia nuclear (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2004). Cuando Sus1 pierde su asociación a SAGA (mutante *ubp8Δ*) se localiza principalmente en el NPC (Kohler *et al.*, 2006) y cuando la pierde con TREX-2 (mutante *sac3Δ*) se enriquece su fracción nucleoplasmática (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2004), por lo que cabe esperar que la distribución celular de Sus1 en *sem1Δ* (donde la interacción Sus1-Sac3 se ve afectada) fuera semejante a la localización nucleoplasmática mostrada en *sac3Δ*. Para aclarar esta cuestión, estudiamos la localización *in vivo* por microscopía de fluorescencia de una cepa Sus1 etiquetada en su copia genómica con el epítipo GFP en el mutante *sem1Δ*. No detectamos un enriquecimiento de Sus1-GFP en el nucleoplasma cuando lo comparamos con células Sus1-GFP silvestres (Figura 31). Estos datos sugieren que Sem1 no participa directamente en la distribución celular de Sus1, o que

Resultados

la fracción de Sus1 que ve afectada su localización es indetectable en estas condiciones.

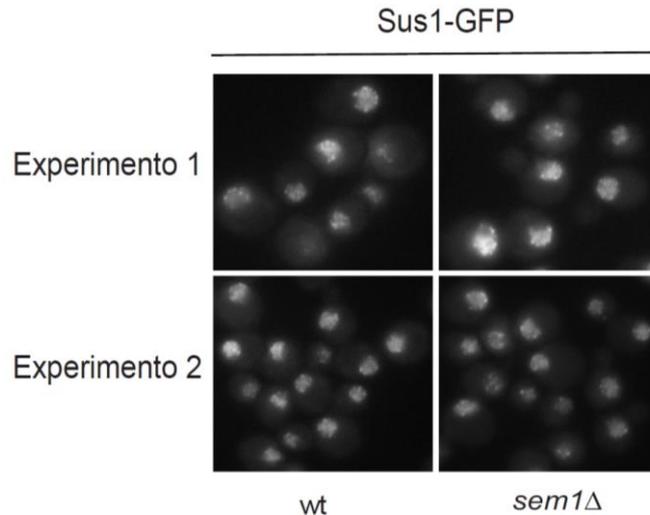


Figura 31. **Localización celular *in vivo* de Sus1-GFP mediante microscopía de fluorescencia en una cepa wt y en el mutante *sem1Δ*.** Las imágenes mostradas son una muestra representativa de todas las obtenidas en el microscopio de fluorescencia.

Los factores Sem1 y Sus1 están relacionados funcionalmente

Como hemos visto en el apartado anterior, Sem1 estabiliza la unión de Sus1 con TREX-2 y además está relacionado genéticamente con Sus1 (Figura 18). Con el fin de estudiar el posible papel de Sem1 en el proceso de exportación de los mRNAs, llevamos a cabo experimentos de

Resultados

hibridación *in situ* de RNAs poli(A)+ con una sonda de Oligo(dT) marcada con el fluoróforo Cy3, tanto en mutantes sencillos *sus1* Δ y *sem1* Δ como en el doble mutante *sus1* Δ *sem1* Δ .

El defecto de exportación fue cuantificado en cada cepa midiendo la acumulación de RNAs poli(A)+ en el núcleo respecto al citoplasma. El mutante condicional *mex67-5* se utilizó como control positivo y su ratio se estableció como un 100% de defecto de exportación.

La retención en el núcleo de los mRNAs en el doble mutante *sus1* Δ *sem1* Δ se vio aumentada en un 45% respecto al mutante *sus1* Δ . De esta manera, pudimos concluir que la ausencia de *SEM1* incrementa el defecto de exportación producido por la delección de *SUS1*, por lo que Sem1 presenta una función directa en la exportación general de los mRNAs (Figura 32).

Resultados

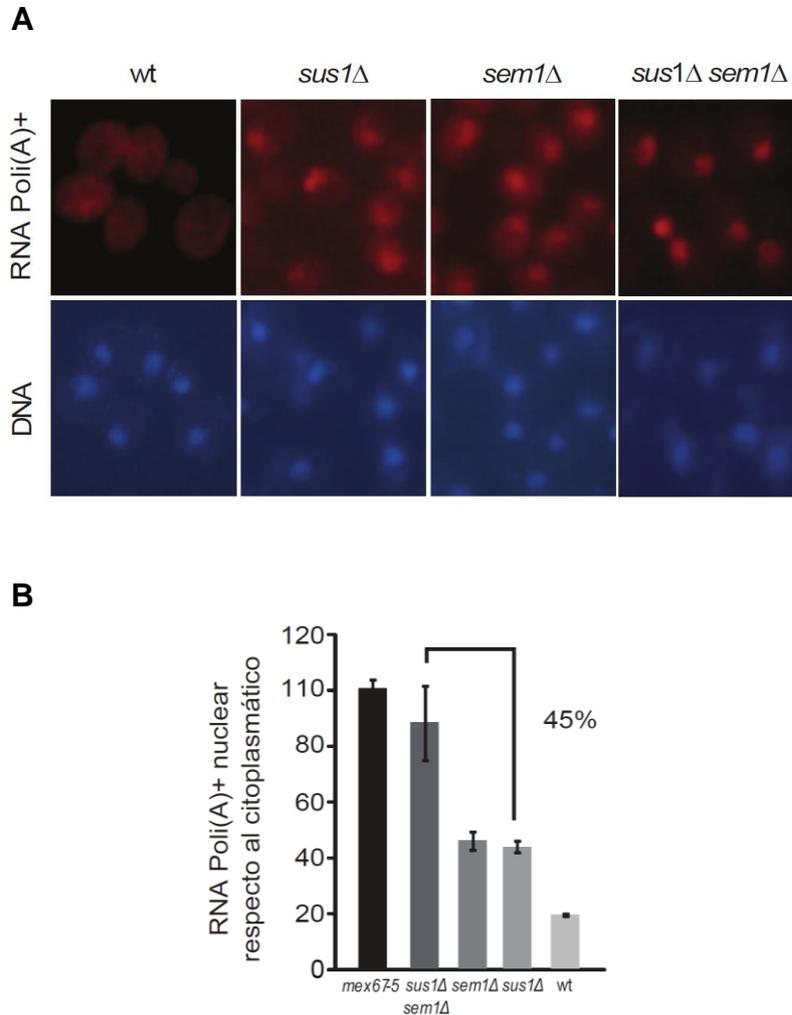


Figura 32. **Análisis de la exportación de los RNAs poli(A)+ en las cepas wt, *sus1*Δ, *sem1*Δ y *sus1*Δ*sem1*Δ crecidas en YP + Glucosa a 30°C.** (A) La localización de los RNAs poli(A)+ se comprobó mediante hibridación *in situ* utilizando una sonda Oligo(dT) marcada con Cy3. Los núcleos fueron detectados mediante el marcaje del DNA con DAPI (panel inferior). Las imágenes mostradas son una muestra representativa de las fotografías obtenidas en el microscopio de fluorescencia. (B) El histograma muestra el análisis cuantitativo del defecto de exportación de los RNAs poli(A)+. Se cuantificó la intensidad de la fluorescencia del núcleo respecto a la del citoplasma. Los valores de

Resultados

cada cepa representan el porcentaje de defecto respecto al de *mex67-5* que representa un defecto de exportación del 100%. Las barras de error representan el error estándar de al menos tres experimentos independientes.

El hecho de que exista una correlación entre perfiles transcripcionales para un par de mutantes en genes particulares es indicativo de una posible relación funcional entre ellos. Con el fin de estudiar la correlación entre los perfiles transcripcionales de Sem1 y otros componentes de los complejos a los que se une Sus1 se estableció una colaboración con el grupo de investigación del Dr. Frank Holstege (University Medical Center Utrecht, The Netherlands). Una vez obtenidos los perfiles transcripcionales para cada mutante se obtuvo un diagrama de agrupaciones jerárquicas, donde los genes son clasificados según su grado de relación entre los patrones de expresión (Figura 33A). En la figura 33B se muestra un dendrograma de similitudes, donde se agrupan los genes con perfiles de expresión relacionados. Aquí, los pares de genes cuyos mutantes tienen perfiles similares se destacan en tonos amarillos y aquellos cuyos perfiles no se correlacionan se destacan en tonos azules. El dendrograma indica que los cambios en la expresión génica obtenidos en *sem1Δ* se correlacionan con aquellos obtenidos para *sus1Δ*. Este dato apoya la hipótesis de una relación funcional entre Sem1 y Sus1. Además, se observa como los perfiles de *SUS1*

Resultados

y *SEM1* también guardan una similitud significativa con los de las subunidades de TREX-2, Thp1 y Sac3. La figura 33C es una representación gráfica de los datos de las correlaciones transcripcionales de una forma más visual. En esta red Sus1 queda posicionado entre los complejos SAGA y TREX-2, poniéndose de manifiesto su papel como coordinador entre ambos complejos. Además de la correlación con mutantes de componentes de TREX-2, el perfil transcripcional de *SEM1*, se asemeja en cierta medida con el de la subunidad de SAGA *ADA2*. Esta correlación pone de manifiesto una posible implicación funcional SAGA-Sem1 que estudiaremos más adelante.

Resultados

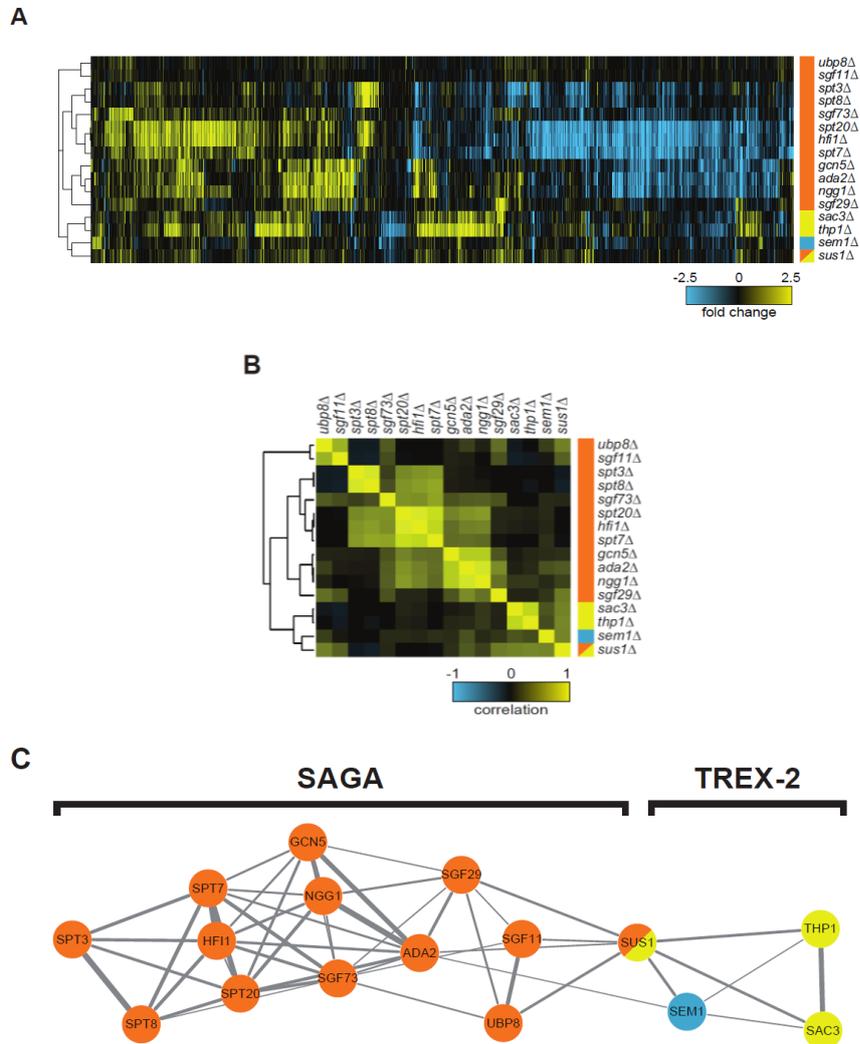


Figura 33. **Análisis de perfiles transcripcionales de mutantes de subunidades de SAGA y TREX-2.** (A) Diagrama de agrupación jerárquica de los perfiles de expresión de los mutantes de las subunidades de SAGA y TREX-2. Se muestran todos los genes que cambian significativamente ($p < 0.05$, $FC > 1.7$) en cada uno de los mutantes. El color azul indica baja expresión y el color amarillo alta expresión. El color negro indica ausencia de cambio. Los cambios están referenciados a la cepa silvestre. (B) *Heatmap* donde se correlacionan los perfiles transcripcionales de los mutantes de las

Resultados

subunidades de SAGA y TREX-2 analizados. El color azul y amarillo indican baja y alta correlación respectivamente. Los colores del eje de las x representan: SAGA naranja, TREX-2 amarillo. (C) Red de interacciones entre Sem1 y las subunidades de SAGA y TREX-2. Los nodos representan las subunidades mutadas, coloreadas según el complejo al que pertenecen (SAGA naranja, TREX-2 amarillo). Las líneas entre nodos se han representado para aquellas correlaciones mayores a 0.3. El grosor de las líneas está directamente relacionado con la correlación entre los nodos que une. La red está construida siguiendo el algoritmo empleado en el trabajo Van Bakel, 2004 (van Bakel & Holstege, 2004).

Un análisis más detallado del conjunto de genes afectados en el mutante *sem1Δ*, puso de manifiesto que se trata mayoritariamente de aquellos que contienen la caja consenso TATA en su promotor (Tabla 2). Este tipo de genes están regulados generalmente por el coactivador SAGA (Huisinga & Pugh, 2004; Venters *et al.*, 2011).

id	Name	P-value	Annotated Genes
<i>sem1Δ</i> vs wt	TATA-containing promoters	0.002283	<i>SMF1, GPM1, CHA1, YOR052C, ACC1, FAS1, HXT1, YRA1, PGA3, GEX2, OAC1, MFA1, VHT1, CUP1-2, TMA10, SRO77, AAD10, MET6, ARN2, YLR042C, BIO2</i>

Tabla 2. **Análisis específico del perfil transcripcional de mutante *sem1Δ*.** En la tabla se indican los 21 genes con caja TATA que presentan un cambio significativo en su expresión en el mutante *sem1Δ*.

Resultados

Estos datos transcripcionales sugieren que Sem1 puede jugar un papel importante durante el proceso de la transcripción mediante la acción de Sus1 y SAGA. Esta hipótesis fue estudiada en detalle más adelante.

Sem1 interacciona físicamente con SAGA, influyendo en la asociación de Sus1 con SAGA y SLIK

La coordinación entre los complejos SAGA y TREX-2 es fundamental durante el acoplamiento de los procesos de transcripción y exportación del mRNA (Garcia-Oliver *et al.*, 2012). Además, se han descrito interacciones físicas entre componentes de ambos complejos, lo que apoya todavía más esta relación (Fischer *et al.*, 2002; Rodriguez-Navarro *et al.*, 2004; Kohler *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta que Sem1 es un componente estructural de TREX-2 y que su ausencia genera un perfil de expresión con cierta desregulación de genes dependientes de SAGA, nos planteamos que Sem1 podría estar involucrado en la coordinación de los procesos de transcripción y exportación dependientes de SAGA y TREX-2, de una forma similar a Sus1. Para apoyar esta idea, quisimos verificar si Sem1 interaccionaba físicamente con el complejo SAGA. Para ello, etiquetamos los componentes de SAGA, Ada2 y Ubp8, con la etiqueta TAP y analizamos la presencia de Sem1 en los eluidos enriquecidos de la primera

Resultados

inmunoprecipitación mediante la técnica TAP. Como podemos ver en la figura 34, Sem1 copurifica con las subunidades de SAGA, Ada2 y Ubp8, al igual que lo hacen Sac3 y Thp1 (Kohler *et al.*, 2008).

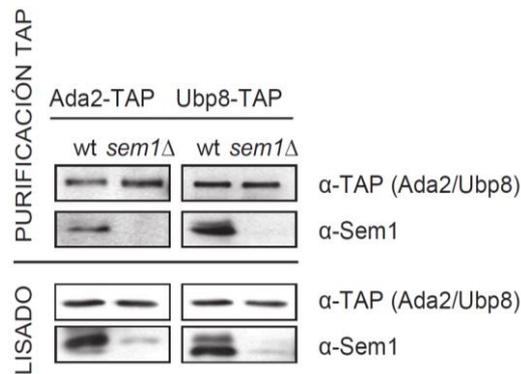


Figura 34. **Purificación TAP de Ada2 y Ubp8 en presencia y ausencia de Sem1.** La presencia de Sem1 y los niveles de las proteínas cebo Ada2-TAP y Ubp8-TAP se comprobaron en el purificado (panel superior) y en los lisados (panel inferior) mediante WB utilizando anticuerpos α -Sem1 y α -TAP respectivamente.

Con tal de profundizar en el papel Sem1 en el contexto de SAGA nos propusimos analizar su influencia sobre las interacciones físicas de Sus1 con SAGA. Para ello purificamos Sus1 mediante la técnica TAP en una cepa silvestre y mutante *sem1* Δ . Los eluidos purificados fueron analizados tanto por electroforesis en gel de gradiente como por análisis LC-MS/MS. El estudio de las diferencias en el perfil de bandas de la cepa mutante con la silvestre confirmó una reducción en la cantidad de Sac3 en *sem1* Δ , mientras que las bandas

Resultados

correspondientes a las subunidades de SAGA no parecen estar afectadas en ninguna de las cepas (Figura 35A). Además, los datos obtenidos mediante LC-MS/MS corroboraron el resultado del gel (Figura 35B). Por lo tanto, los resultados de la purificación demuestran que Sus1 disminuye su asociación con TREX-2, mientras que permanece unido a SAGA en ausencia de *SEM1*.

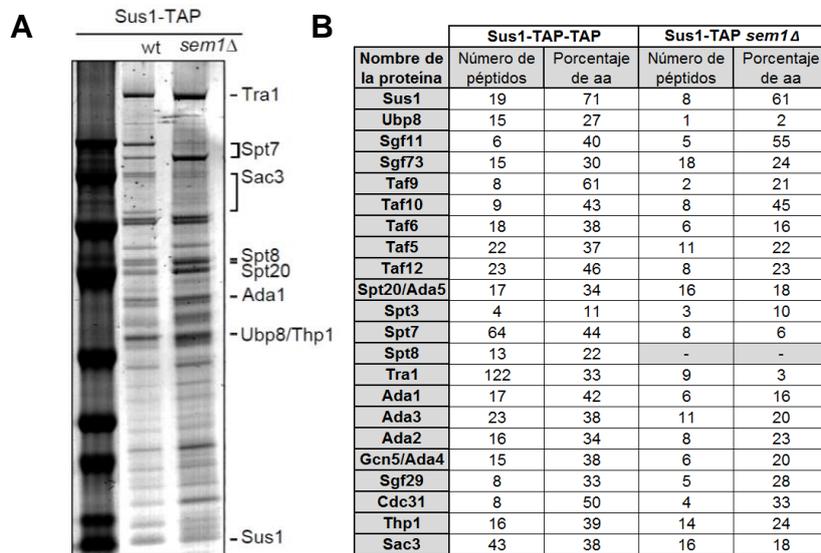


Figura 35. **Análisis del perfil de interacción de Sus1 en presencia y ausencia de Sem1.** (A) Purificación TAP de Sus1 en una cepa silvestre y otra mutante *sem1Δ*. Las purificaciones se analizaron en un gel de gradiente de poliacrilamida (4-12%) y las proteínas fueron teñidas con Coomassie coloidal. Las subunidades de SAGA y TREX-2 indicadas en la figura fueron detectadas por espectroscopía de masas. (B) Identificación MudPIT de los péptidos obtenidos en las purificaciones TAP mencionadas. En la tabla se indica el número de péptidos encontrados para cada proteína identificada, así como el porcentaje de secuencia aminoacídica que estos representan respecto al total de la proteína.

Resultados

Un estudio más detallado del resultado obtenido por LC-MS/MS en el mutante *sem1Δ* mostró la ausencia de péptidos correspondientes a la subunidad de SAGA, Spt8 (Figura 35B). Este dato nos pareció de gran relevancia, ya que, Spt8 es un componente distintivo de SAGA. La ausencia de esta subunidad se correlaciona con la presencia del complejo SLIK (SAGA-Like complex). SLIK es un complejo acetiltransferasa de histonas estructuralmente equivalente a SAGA, a excepción de que contiene una forma truncada en C-terminal de la proteína Spt7 y que carece de la subunidad Spt8 (Pray-Grant *et al.*, 2002). Aunque hasta el momento poco se conoce acerca de la función celular de SLIK en la célula, se ha relacionado con la llamada respuesta retrógrada, que señala la disfunción de la mitocondria al núcleo vía factores transcripcionales regulados por Gcn5 (Pray-Grant *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004). Con tal de verificar si Sus1 interacciona preferentemente con SLIK en ausencia de *SEM1*, examinamos la secuencia de los péptidos correspondientes a Spt7 identificados mediante espectrometría de masas. El análisis LC-MS/MS del eluido purificado de Sus1-TAP *sem1Δ*, procedente de dos experimentos independientes, identificó péptidos correspondientes a la proteína Spt7. Curiosamente, ninguno de los péptidos observados en los diferentes análisis correspondían a la secuencia extremo C-terminal de Spt7, que está ausente en el complejo SLIK (Figura 36). Este dato concuerda con la detección en el gel de gradiente de una

Resultados

forma truncada de menor movilidad electroforética de Spt7, probablemente en C-terminal (Figura 35A). Estos datos sugieren que Sus1 se asocia preferentemente al complejo SLIK en ausencia de la subunidad de TREX-2, Sem1.

Matched peptides shown in **Bold Red**

```
1 MTERIPKINY QRTNAKALLK LTEKLFNKNF FDLYLTSQQL VVLEYLLSIS
51 SEEDKLAWD YFLKGNIALN VEKSFPLTQE EEHHGAVSPA VDTRSDDVSS
101 QTIKDNNTN TNTSISNENH VENEIEDKGD NAIANEDNFV NNEESDNVEE
151 DLFKLDLEDL KQISGTRFI GNLSLKIRYV LWQCAIDYIY CDRNEFGDEN
201 DTEYTLLDVE EKEEEEICKN ERPQNKEGIS KFAEDEDYDD EDENYDEEST
251 DVKNVDDPPK NLDSSISSNI EIDDERRLVL NISISKETLS KLKTNNVEEI
301 MGNWNKIYHS FEYDKETMIK RLKLEESDKM IEKGGKKRSR SDLEAATDEQ
351 DRENTNDEPD TNQKLPTEPG STFSDTGNKR PKQSNLDLTV NLGLENLSLK
401 HLLSSIQQKK SQLGISDYEL KHLIMDVRKN RSKWTSDERI GQEELYEACE
451 KVVLELRNYT EHSTPFLNKV SKREAPNYHQ IIKKSMDLNT VLKCLKSFQY
501 DSKQEFVDDI MLIWKNCLTY NSDPHFHFRG HAIAMQKKS LQIRMIPIIT
551 IRNRADLEKE IEDMEKDKDY ELDEEEEVAG SGRKGLNMGA HMLAKENKGV
601 SEKDSKTKVK DEAPTNDKDL TSVIPEGEKE KDKTASSTVT VHENVNKNEI
651 KENGKNEEQD MVEESSKTED SSKDADAARK DTEDGLQDKT AENKEAGENN
701 EEEEDDDDED EDEDMVDSQS YLLEKDDDRD DLEISVWKTV TAKVRAEICL
751 KRTEYFKNGK LNSDSEAFK NPQRMKRFDQ LFLYKEQKA LESYRQKIEQ
801 NSIMKNGFGT VLKQEDDDQL QFHNDHSLNG NEAFKQPNQ IELDDTRFLQ
851 EYDISNAIPD IVYEGVNTKT LDKMEDASVD RMLQNGINKQ SRFLANKDLG
901 LTPKMNQIT LIQQIRHICH KISLIRMLQS PLSAQNSRSN PNAFLNNHIY
951 NYTIIDDSLID IDPVSQLPTH DYKNNRELIV KFMHKNISKV AMANGFETAH
1001 PSAINMLTEI AGDYLSNLIK TLKLHHTNS LNRGTVNVEL QTTLENGIN
1051 RPDDLFSYVE SEFGKTKKL QDIKQLESF LRALLRPTLQ ELSERNFEDE
1101 SQSFFTGDFA SELTGEDFFG FRELGLEKEF GVLSSSVPLQ LLTTQFQTVD
1151 GETKVQAKKI QPEESDSIVY KKITKGMLEDA GSFWNTLLPL LQKDYERSKA
1201 YIAKQSKSSA NDKTSMSTSE DNSFALLEED QFVSKKTATK ARLPPTGKIS
1251 TTYKKKPIAS AFILPEEDLE NDVKADPTTT VNAKVGAEND GDSSFLRLTP
1301 QPLDPLDMD AFDDTNMGSN SSFSLSLPRL NQ
```

Figura 36. **Identificación de la proteína Spt7 mediante espectrometría de masas.** El eluido obtenido mediante la purificación TAP de Sus1 en el mutante *sem1Δ* se analizó mediante espectrometría de masas (MudPIT). Los datos obtenidos se validaron con la información almacenada en las bases de datos de secuencias conocidas mediante el motor de búsqueda MASCOT. La figura muestra la secuencia aminoacídica de la proteína Spt7. Los péptidos identificados en el análisis se han resaltado en rojo. Esta figura es una muestra representativa de al menos 3 experimentos independientes.

Con el fin de obtener información cuantitativa acerca de la abundancia de las proteínas en las purificaciones Sus1-TAP y Sus1-TAP *sem1Δ*, los datos obtenidos a partir de la

Resultados

espectrometría de masas fueron analizamos mediante el método APEX. Este método es una herramienta bioinformática que permite evaluar la abundancia de las proteínas a partir de la cuantificación de los péptidos identificados en la purificación (Kuntumalla *et al.*, 2009). Este método, permite comparar la abundancia de las proteínas purificadas entre diferentes experimentos de forma relativa (Braisted *et al.*, 2008).

El análisis APEX de las cepas Sus1-TAP silvestre y *sem1Δ* reveló un cambio reproducible en la copurificación de Sus1 con las subunidades de TREX-2, SAGA y las histonas. (Figura 37). Este análisis muestra que en una preparación Sus1-TAP, los componentes Sgf11, TREX-2 e histonas son los más abundantes, mientras que en una purificación Sus1-TAP *sem1Δ*, todos los componentes de TREX-2, exceptuando Cdc31, son menos abundantes. Estos datos son consistentes con los resultados bioquímicos mostrados hasta ahora, donde se observa que Sem1 es necesario para una correcta interacción Sus1-TREX-2 (Figura 28 y 35A). También se observa un incremento en el índice APEX de algunas subunidades de SAGA.

Resultados

GEN	Índice APEX	
	Sus1-TAP	Sus1-TAP <i>sem1Δ</i>
SUS1	0,46	0,43
SGF11	0,41	0,43
SEM1	0,25	-
CDC31	0,25	0,36
HTB1	0,25	0,48
THP1	0,22	0,07
HTA1	0,21	0,42
SAC3	0,19	0,07
HHF1	0,19	0,38
SPT8	0,14	-
HHT1	0,14	0,41
SGF73	0,13	0,17
TAF6	0,09	0,10
ADA1	0,09	0,11
ADA3	0,08	0,14
TAF9	0,08	0,24
TAF10	0,08	0,18
UBP8	0,07	0,05
SPT3	0,06	0,09
ADA2	0,06	0,04
GCN5	0,05	0,02
SPT20	0,05	0,14
TAF12	0,04	0,06
SPT7	0,04	0,03
TAF5	0,03	0,07
SGF29	0,02	0,07
TRA1	0,01	0,02

SAGA	INCREMENTO
TREX-2	DISMINUCIÓN
HISTONAS	

Figura 37. **Índices APEX de las proteínas que interaccionan con Sus1 en presencia y ausencia de Sem1.** El eluido obtenido mediante la purificación TAP de Sus1 en una cepa wt y en el mutante *sem1Δ* se analizó mediante espectrometría de masas (MudPIT). Los datos obtenidos se analizaron mediante la herramienta bioinformática APEX. La tabla muestra las proteínas identificadas en el purificado de cada cepa junto con el índice APEX obtenido. La proteína cebo, Sus1, se indica en negrita. Las subunidades de SAGA se indican en rosa. Las subunidades de TREX-2 en verde y las histonas en azul. Las proteínas que muestran un incremento en la cepa mutante *sem1Δ* respecto al wt poseen un índice APEX marcado en rojo, mientras que las proteínas que disminuyen se indican en amarillo. Las proteínas sin cambio significativo se muestran en blanco.

Resultados

Con el objetivo de representar de una manera más visual los datos obtenidos a partir de la herramienta APEX, calculamos la abundancia de cada proteína relativa al índice APEX de la proteína cebo Sus1 para cada purificación (APEX de la Proteína "X"/APEX de la proteína cebo Sus1). El índice APEX relativo obtenido para cada proteína fue entonces comparado entre las dos preparaciones (ratio *sem1Δ*/silvestre), representándose en una gráfica aquellas proteínas con un cambio positivo o negativo de al menos 2.5 veces en *sem1Δ* respecto a la cepa silvestre. Como se observa en la figura 38, existe un incremento en la abundancia de algunos componentes de SAGA y de todas las histonas, mientras que se produce una reducción en los componentes de TREX-2, Sac3 y Thp1. De manera interesante también se produce una reducción inesperada en la interacción Sus1-Gcn5, cuyas implicaciones funcionales se investigan más adelante.

Resultados

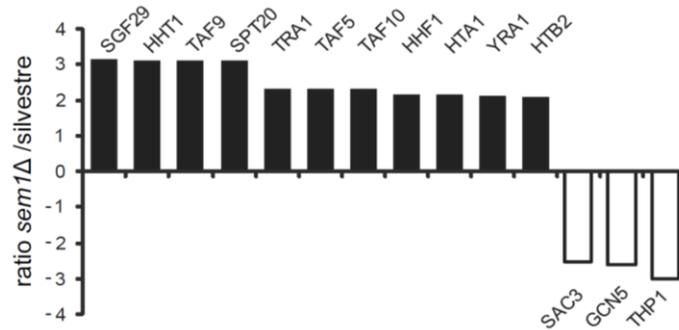


Figura 38. **Representación de los cambios significativos en las interacciones de algunas proteínas basados en los índices APEX.** El índice APEX de cada proteína se ha normalizado en cada purificado respecto a la proteína cebo Sus1. Los cambios en la abundancia de proteínas entre la cepa wt y mutante *sem1* Δ se calculan en base a la razón *sem1* Δ /wt. En la gráfica se indican aquellas proteínas cuyo incremento o disminución está por encima del valor 2.5.

A fin de verificar el incremento en la interacción Sus1-SAGA en ausencia de *SEM1*, mostrado por los datos APEX, purificamos las cepas Sgf29-TAP que expresan Sus1-PK en presencia y ausencia de Sem1. El análisis por WB, empleando anticuerpos anti-PK, corroboró que existe un incremento en la interacción Sus1-Sgf29, como cabía esperar por el dato de espectrometría de masas. Pudimos concluir por tanto que Sus1 une con mayor afinidad algunas subunidades específicas de SAGA en ausencia de *SEM1* (Figura 39).

Resultados

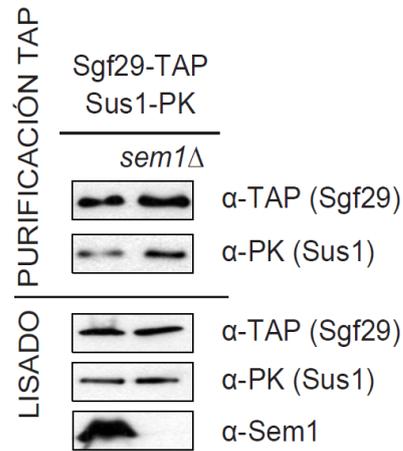


Figura 39. **Purificación TAP de Sgf29 en una cepa que expresa Sus1-PK en presencia y ausencia de Sem1.** La presencia de Sus1 y los niveles de la proteína cebo Ubp8-TAP se comprobaron en el purificado (panel superior) y en los lisados (panel inferior) mediante WB utilizando anticuerpos α -PK y α -TAP respectivamente.

Con el propósito de obtener mayor información cuantitativa acerca de las proteínas que interaccionan con Sus1 en las purificaciones Sus1-TAP y Sus1-TAP *sem1Δ*, llevamos a cabo otra aproximación proteómica, denominada iTRAQ™ (*Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification*). Esta tecnología emplea un sistema de etiquetas comercial, basada en la incorporación de isótopos de distintos pesos moleculares a las muestras (Ross *et al.*, 2004). Este marcaje, permite su posterior análisis por espectrometría de masas, lo que facilita obtener datos cuantitativos sobre la

Resultados

abundancia de las proteínas en cuatro preparaciones diferentes. Para ello, dos eluidos purificados de Sus1-TAP y dos de Sus1-TAP *sem1* Δ , fueron digeridos y etiquetados. La cuantificación obtenida desveló que la abundancia relativa de Sus1, las histonas, los componentes de SAGA, Sgf73 y Sgf11; y el componente de TREX-2, Cdc31 cambiaba significativamente en ausencia de *SEM1* (Figura 40).

GEN	<i>sem1</i> Δ /wt
<i>HHT1</i>	2.48
<i>HHF1</i>	2.29
<i>HTB1</i>	1.96
<i>HTA1</i>	1.81
<i>SGF73</i>	1.23
<i>CDC31</i>	0.82
<i>SGF11</i>	0.45
<i>SUS1</i>	0.43

Figura 40. **Análisis iTRAQ de la purificación TAP de Sus1 en una cepa wt y en el mutante *sem1* Δ .** La tabla muestra las proteínas que sufren un cambio significativo en su abundancia en la cepa *sem1* Δ respecto a la silvestre. La proteína cebo, Sus1, se indica en negrita. Las subunidades de SAGA se indican en rosa. Las subunidades de TREX-2 en verde y las histonas en azul.

En resumen, estos datos bioquímicos muestran que Sem1 no solo afecta a la unión Sus1-TREX-2, sino que también contribuye a la asociación Sus1-SAGA/SLIK, revelando pistas acerca del mecanismo molecular por el cual SAGA y TREX-2 se coordinan para dar lugar a la expresión génica.

Resultados

Sem1 participa en el proceso de la activación de la transcripción

Una de las funciones mejor estudiadas y caracterizadas del complejo SAGA es la de coactivador de la transcripción, debido a su capacidad para modificar las histonas de la cromatina. Se ha demostrado que Sus1 juega un papel esencial durante la acción de SAGA como coactivador transcripcional (Pascual-Garcia *et al.*, 2008). El hecho de que Sem1 interaccione físicamente con SAGA, siendo necesario para la correcta asociación Sus1-SAGA y también para la correcta transcripción de un número significativo de genes regulados por SAGA, nos llevó a preguntarnos si Sem1 es capaz de activar la transcripción mediada por Sus1. Para ello, empleamos la construcción pBTM-Sus1 (*SUS1* fusionado al dominio bacteriano LexA de unión a DNA), con la que se transformó las cepas CTY y CTY *sem1*Δ, que tienen integrado el gen bacteriano LacZ bajo control del operador LexA como gen reportero. La actividad β-galactosidasa generada por la transcripción del gen LacZ fue medida mediante un ensayo colorimétrico en células creciendo exponencialmente en medio mínimo y en ausencia de uracilo. El ensayo desveló que la actividad β-galactosidasa producida por LexA-Sus1 se vio drásticamente reducida en la cepa *sem1*Δ respecto a la cepa silvestre (Figura 41). Estos resultados demuestran que Sem1

Resultados

es necesario para llevar a cabo la activación transcripcional dependiente de Sus1.

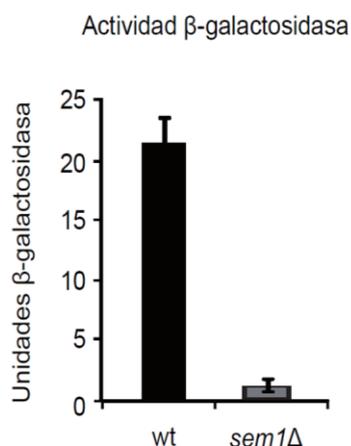


Figura 41. **Ensayo β -galactosidasa de una cepa silvestre y un mutante *sem1* Δ .** Se transformaron ambas cepas con los plásmidos pBTM-vacío y pBTM-Sus1. Las células recogidas fueron ensayadas para medir la actividad β -galactosidasa expresada en unidades Miller. Las barras de error representan el error estándar de al menos tres experimentos independientes.

Sem1 es necesario para la inducción de los genes regulados por SAGA, ARG1 y GAL1

El mecanismo de activación de los genes regulados por SAGA, como por ejemplo *GAL1* y *ARG1*, ha sido estudiado extensamente (Ricci *et al.*, 2002; Turner, 2002; Lemieux & Gaudreau, 2004; Green *et al.*, 2012). Puesto que se ha demostrado que el papel de Sus1 es esencial para la

Resultados

activación de estos genes (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2004; Pascual-García *et al.*, 2008), quisimos estudiar la influencia de Sem1 durante su inducción. Para resolver esta cuestión, medimos los niveles de mRNA de *GAL1* y *ARG1* tras 25 minutos de inducción (añadiendo galactosa o SM al medio respectivamente) en una cepa silvestre y los comparamos con los niveles de una cepa mutante *sem1* Δ . La figura 42 muestra como la inducción de estos genes está comprometida en la cepa mutante, donde los niveles de mRNA no alcanzan los niveles obtenidos en las cepas silvestres. Por lo tanto, Sem1 es necesario para la correcta inducción de los genes regulados por SAGA, *ARG1* y *GAL1*.

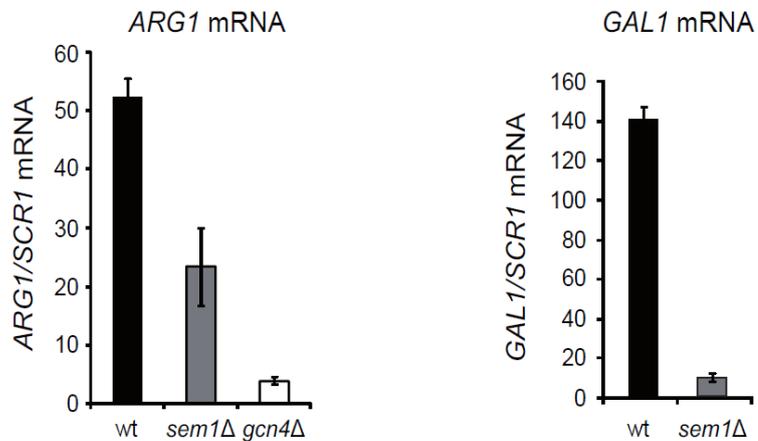


Figura 42. **Análisis de la expresión de los genes *ARG1* y *GAL1*.** La expresión de *ARG1* se analizó en las cepas wt, *sem1* Δ y *gcn4* Δ a los 25 minutos de inducción con sulfometurón (panel izquierdo). La expresión de *GAL1* se analizó en las cepas wt y *sem1* Δ a los 25 minutos de inducción con galactosa al 2% (panel derecho). Los

Resultados

niveles relativos de cada gen se determinaron mediante qPCR y se normalizaron respecto a los niveles de expresión de *SCR1*. Los valores de expresión obtenidos se han referenciado al tiempo de inducción cero de cada cepa. Las barras de error representan el error estándar de al menos tres experimentos independientes.

Con el objetivo de analizar en detalle el efecto de Sem1 sobre la inducción de *GAL1*, realizamos un seguimiento de la cinética de expresión en diferentes etapas de la inducción. Como podemos observar, la ausencia de *SEM1* influye en la correcta cinética de activación de *GAL1* a lo largo del período de inducción analizado (Figura 43).

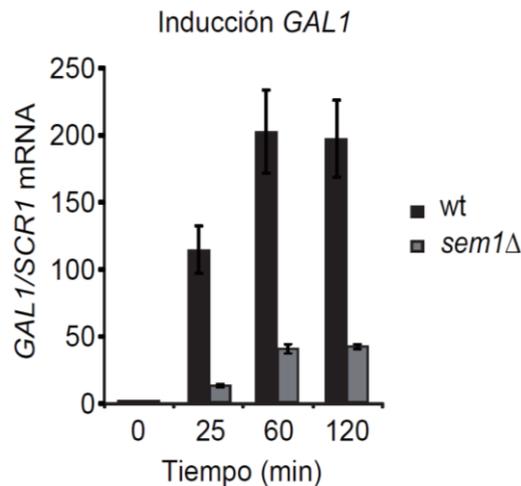


Figura 43. **Análisis de la cinética de inducción de *GAL1* en las cepas wt y *sem1Δ*.** La cinética se llevó a cabo a lo largo de 120 minutos de inducción con galactosa al 2%. Los niveles relativos de *GAL1* se normalizaron respecto a los de *SCR1*. Los valores de expresión obtenidos se han referenciado al tiempo de inducción cero de cada cepa. Las barras de error representan el error estándar de al menos tres experimentos independientes.

Resultados

El defecto que manifiesta el mutante *sem1* Δ durante la inducción de *GAL1* queda reflejado en el fenotipo que muestra al crecer en un medio sólido cuya fuente de carbono es la galactosa. Como podemos ver en este estudio de crecimiento (Figura 44A panel superior), en ausencia de *SEM1* las células presentan un fenotipo de crecimiento lento en las placas de YP + Galactosa. Este fenotipo es agravado al aumentar la temperatura de crecimiento a 37°C (Figura 44A panel inferior), lo cual concuerda con la menor expresión de los niveles de mRNA de *GAL1* observados en *sem1* Δ a esa temperatura (Figura 44B).

Resultados

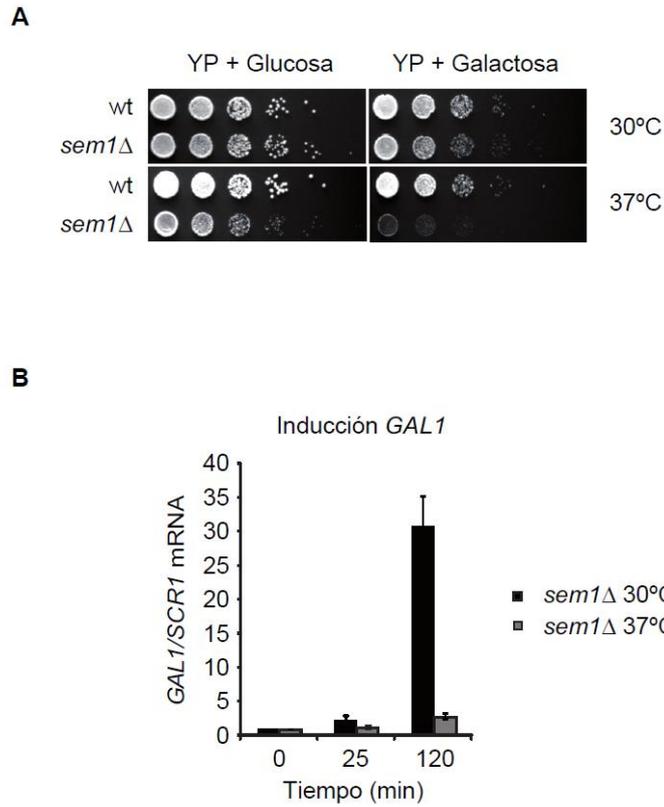


Figura 44. **Análisis del crecimiento celular de una cepa wt y *sem1*Δ. Análisis de la cinética de inducción de *GAL1* en las cepas wt y *sem1*Δ.** (A) Se crecieron las células hasta alcanzar una OD de 0.5. Se sembraron diluciones seriadas de las cepas indicadas en placas YP + Glucosa y YP + Galactosa. Se incubaron durante 48 h a 30°C y 37°C. (B) La cinética se llevó a cabo a lo largo de 120 minutos de inducción con galactosa al 2% a 30°C y 37°C. Los niveles relativos de *GAL1* se normalizaron respecto a los de *SCR1*. Los valores de expresión obtenidos se han referenciado al tiempo de inducción cero de cada cepa. Las barras de error representan el error estándar de al menos tres experimentos independientes.

Resultados

Sem1 es esencial para la integridad de SAGA en el promotor de *GAL1*

La transcripción de los genes regulados por SAGA se inicia con la señalización de los activadores y coactivadores transcripcionales como SAGA. Estos factores facilitan la unión de TBP al promotor, el cual inicia la formación del PIC, compuesto por GTFs y la RNA Pol II. De esta forma tiene lugar el mecanismo molecular por el cual se da inicio a la transcripción (Roeder, 1996; Bhaumik & Malik, 2008; Bhaumik, 2011). Como hemos demostrado, Sem1 es necesario para la activación de algunos genes regulados por SAGA. Por otro lado, hemos demostrado que Sem1 es capaz de unirse físicamente a algunas subunidades de SAGA. Estos datos sugieren que su ausencia puede afectar a las etapas iniciales de la activación transcripcional, alterando el correcto reclutamiento de SAGA al promotor.

Para abordar esta posibilidad, decidimos examinar el reclutamiento de diversas subunidades de SAGA al promotor de *GAL1*. SAGA es un macrocomplejo compuesto de diferentes módulos (Samara & Wolberger, 2011; Weake & Workman, 2012), con tal de abarcar el análisis del reclutamiento de los distintos módulos, se estudiaron subunidades pertenecientes a cuatro módulos distintos: HAT/Core (Ada2, Gcn5), SA_TAF (Taf9), SA_SPT (Spt8) y el DUB (Sus1 and Ubp8). Para ello, analizamos por ChIP la

Resultados

cromatina, inmunoprecipitando las distintas subunidades previamente marcadas con el epítipo MYC. Mediante la amplificación con oligonucleótidos específicos del promotor de *GAL1*, estudiamos el nivel de asociación en cromatina de cada factor tanto en células silvestres como en células *sem1Δ* crecidas en presencia de galactosa en el medio.

Como se observa en la figura 45A, la presencia de las subunidades del módulo HAT/Core, Ada2 y Gcn5, se ve reducida significativamente en ausencia de Sem1. Además, el ensayo de crecimiento del doble mutante *sem1Δgcn5Δ*, en placas que contienen YP + Galactosa, evidenció la existencia de una fuerte interacción genética entre *SEM1* y *GCN5* (Figura 45B). Esta interacción genética pone de manifiesto una relación funcional entre Sem1 y la enzima acetiltransferasa de histonas Gcn5, como se comentó anteriormente en este trabajo.

Resultados

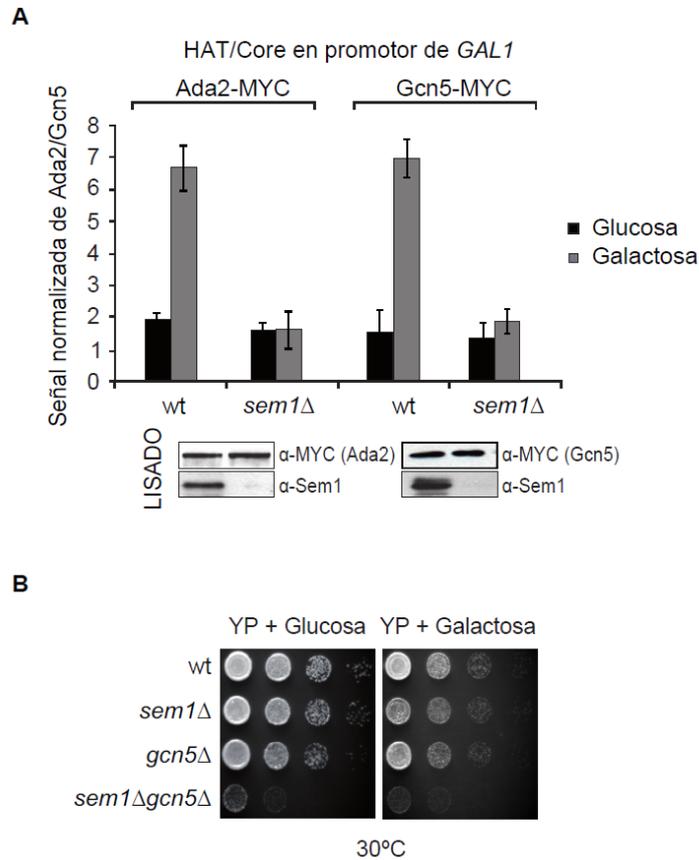


Figura 45. **Inmunoprecipitación de cromatina de las subunidades Ada2 y Gcn5 (HAT/Core).** Análisis del crecimiento celular del doble mutante *sem1*Δ*gcn5*Δ. (A) Las cepas Ada2-MYC y Gcn5-MYC wt y *sem1*Δ se indujeron durante 25 minutos con galactosa. La unión al promotor de *GAL1* se calculó como el porcentaje de inmunoprecipitado respecto al lisado. Al dato obtenido se le sustrajo el inmunoprecipitado detectado en una muestra sin anticuerpo. La detección de las proteínas cebo se llevó a cabo analizando los lisados mediante WB con anticuerpos α-MYC. Las barras de error representan el error estándar de al menos tres experimentos independientes. (B) Se crecieron las células hasta alcanzar una OD de 0.5. Se sembraron diluciones seriadas de las cepas indicadas en placas YP + Glucosa e YP + Galactosa. Se incubaron durante 48 h a 30°C.

Resultados

Al igual que ocurre para los componentes del HAT/Core, la presencia de las subunidades de los módulos SA_TAF (Taf9) y SA_SPT (Spt8), también se ve significativamente reducida en el promotor de *GAL1* en ausencia de Sem1 (Figura 46).

En resumen, la asociación de los módulos de SAGA: HAT/Core, SA_TAF y SA_SPT al promotor de *GAL1*, está comprometida en ausencia de Sem1.

Sin embargo, el estudio del reclutamiento de la subunidad del módulo DUB, Sus1, a la misma región de la cromatina y bajo las mismas condiciones experimentales, demostró que su presencia no está afectada por la ausencia de Sem1 (Figura 47). Por otro lado, quisimos examinar el reclutamiento de la subunidad del módulo DUB, Ubp8, pero técnicamente nos fue imposible determinar si existe un cambio significativo en su reclutamiento a la cromatina.

Resultados

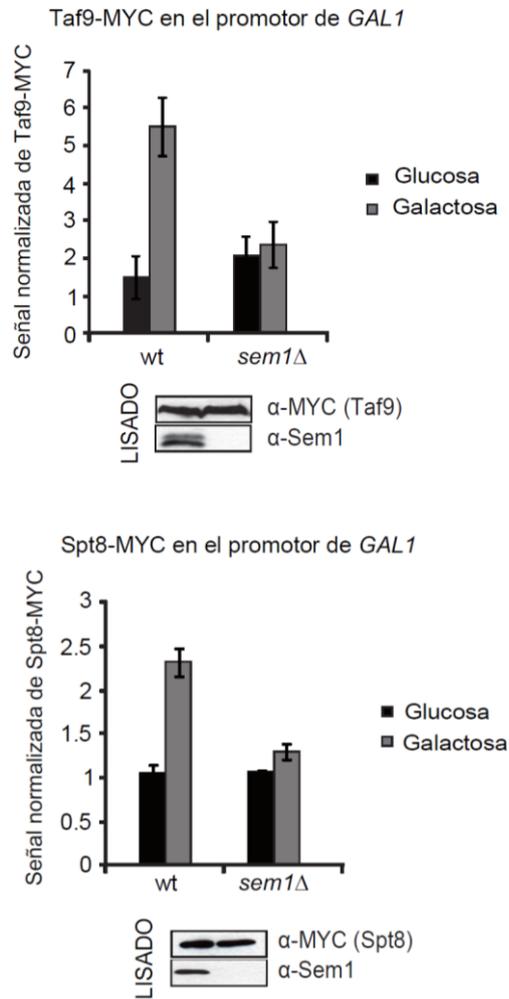


Figura 46. **Análisis de la unión de las subunidades Taf9 y Spt8 (SA_SPT) al promotor de *GAL1* en cepas wt y *sem1Δ* mediante ChIP.** Las células se indujeron durante 25 minutos con galactosa. La unión a la cromatina se detectó mediante qPCR y se calculó como el porcentaje de inmunoprecipitado respecto al lisado. Al dato obtenido se le sustrajo el inmunoprecipitado detectado en una muestra sin anticuerpo. La detección de las proteínas cebo se llevó a cabo analizando los lisados mediante WB con anticuerpos α -MYC. Las barras de error representan el error estándar de al menos tres experimentos independientes.

Resultados

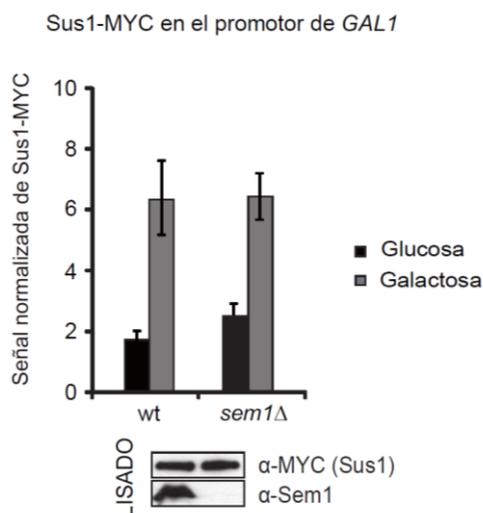


Figura 47. **Análisis de la unión de la subunidad Sus1 (DUB) al promotor de *GAL1* en cepas wt y *sem1*Δ mediante ChIP.** Las células se indujeron durante 25 minutos con galactosa. La unión a la cromatina se detectó mediante qPCR y se calculó como en figura 46. La detección de las proteínas cebo se llevó a cabo analizando los lisados mediante WB con anticuerpos α-MYC. Las barras de error representan el error estándar de al menos tres experimentos independientes.

En conclusión, los resultados de los experimentos de ChIP sugieren que Sem1 es necesario para la integridad y estabilización del complejo SAGA en el promotor de *GAL1*, afectando de forma diferencial a la asociación de los distintos componentes de SAGA a la cromatina.

Resultados

Sem1 participa en la actividad desubicitinasa dependiente de SAGA

Como hemos demostrado, el componente del DUB, Sus1, se asocia al promotor de *GAL1* en ausencia de *SEM1*, mientras que otras subunidades de SAGA ven comprometida su asociación. Se ha descrito que en el mutante *SEM1* los niveles totales de histona H2B ubiquitinada en la célula se ven incrementados (Qin *et al.*, 2009), lo que nos hizo pensar que la deficiencia en el reclutamiento de SAGA a la cromatina está alterando la correcta actividad desubicitinasa del DUB. De hecho, el defecto en la inducción de los genes *GAL1* y *ARG1* se ha correlacionado con un desequilibrio en los niveles de ubiquitinación de la histona H2B (Lee *et al.*, 2005; Shukla *et al.*, 2006; Weake & Workman, 2008), lo que explicaría el defecto observado en *sem1Δ*.

Con el objetivo de comprobar la importancia de Sem1 para la activación del DUB a nivel del promotor de *GAL1*, analizamos los niveles de histona H2B ubiquitinada *in vivo* en esta región del DNA. Para ello se llevó a cabo un doble ChIP (ChDIP), donde la histona H2B ubiquitinada es inmunoprecipitada dos veces mediante su doble etiquetado Flag-H2BUb-HA. La amplificación del promotor de *GAL1* nos permitió estudiar el nivel de reclutamiento de histona H2B ubiquitinada tanto en células silvestres como en células *sem1Δ* crecidas en presencia de galactosa en el medio. Como se

Resultados

observa en la figura 48, el mutante *sem1* Δ presenta un aumento de hasta tres veces en la ocupación de histona H2B ubiquitinada en el promotor de *GAL1* en comparación con los niveles que presentan las células silvestres. Estos resultados apoyan la importancia de Sem1 en la regulación de la actividad desubicitinasa de SAGA, a través del reclutamiento de todos los módulos del complejo SAGA.

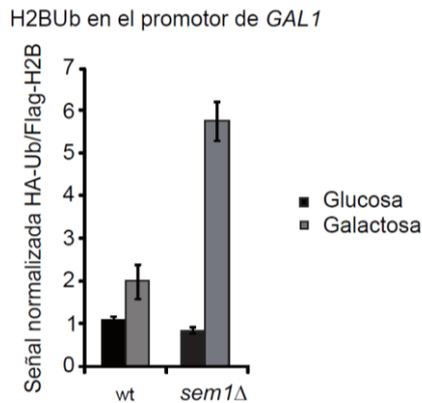


Figura 48. **Análisis de la unión de la histona H2B ubiquitinada al promotor de *GAL1* en las cepas wt, *sem1* Δ y H2BK123R, H2BK123R *sem1* Δ mediante ChDIP.** Las células se indujeron durante 90 minutos con galactosa. Se emplearon cepas transformadas con plásmidos Flag-H2B y HA-Ub. La unión a la cromatina se detectó mediante qPCR y se calculó como en la figura 46, sustrayendo el fondo detectado de las cepas H2BK123R y H2BK123R *sem1* Δ . Las barras de error representan el error estándar de al menos tres experimentos independientes.

Resultados

Los resultados obtenidos indican que Sem1 es necesario para la desubicitinación de H2B a nivel del promotor de *GAL1 in vivo*. Así mismo, quisimos estudiar la actividad DUB *in vitro* dependiente de Sem1. Para ello purificamos en primer lugar el complejo SAGA mediante la técnica TAP, inmunoprecipitando Sus1 en una cepa silvestre y otra *sem1* Δ . Por otro lado, empleamos una cepa que expresa Flag-H2B y HA-Ub para purificar la histona H2B a través del epítipo Flag. Ambos purificados fueron incubados y la actividad desubicitinasa se analizó mediante WB, empleando anticuerpos anti-HA, para detectar la cantidad histona ubiquitinada. El ensayo también fue llevado a cabo en el mutante *sgf73* Δ , que sirvió como control negativo, puesto que, Sgf73 es necesario para la actividad del módulo DUB (Helmlinger *et al.*, 2004; Kohler *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009; Samara *et al.*, 2010) (Figura 49).

Resultados

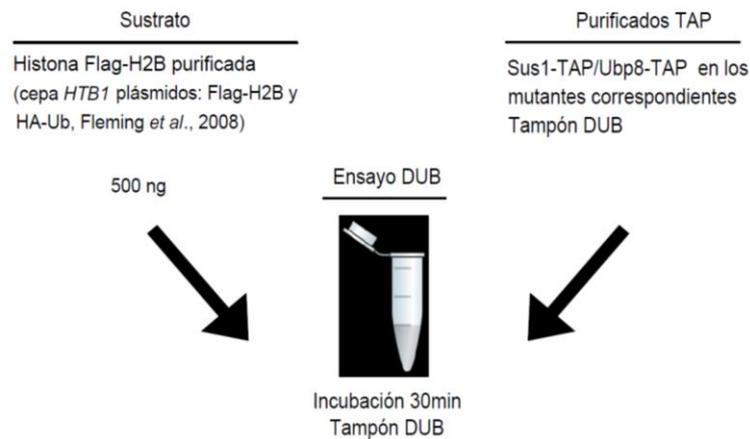


Figura 49. **Procedimiento experimental del ensayo de desubiquitinación.** La histona Flag-H2B que sirve como sustrato del ensayo se purificó con la resina M2 (Sigma A2220). El ensayo se realizó incubando 500 ng de histona purificada (H2B-Flag) con 100 μ L de eluido nativo purificado por la técnica TAP durante 30 minutos a temperatura ambiente. Como control negativo se incubó la histona H2B junto con el tampón DUB, o bien, junto con un purificado nativo procedente de la cepa Sus1-TAP *sgf73 Δ* . La reacción se detuvo por congelación en hielo seco.

Como se observa en la figura 50A, la eliminación de *SEM1* provoca una reducción de la actividad *in vitro* del módulo DUB dependiente de Sus1, de un 40%. Como se ha descrito en la introducción, el módulo DUB está formando por cuatro subunidades de las cuales Ubp8 es la que posee actividad enzimática, mientras que Sus1, Sgf11 y Sgf73 actúan como activadores/moduladores de dicha actividad (Kohler *et al.*, 2010; Samara *et al.*, 2010; Samara *et al.*, 2012). Ante los resultados obtenidos que muestran una disminución en la actividad DUB dependiente de Sus1 en ausencia de Sem1,

Resultados

nos propusimos analizar si ocurría lo mismo al purificar el DUB tomando a Ubp8 como proteína cebo. Como muestra la figura 50B, existe una reducción en la actividad DUB del 60% en el mutante *sem1* Δ con respecto a la cepa silvestre.

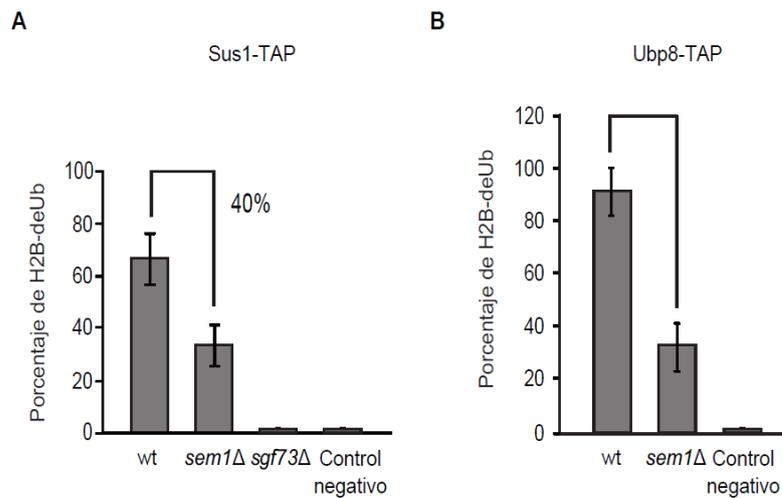


Figura 50. **Ensayo de desubicitinación *in vitro* de H2B.** (A) Se llevó a cabo la purificación TAP de Sus1 en presencia y ausencia de Sem1. Los purificados nativos se incubaron con histona H2B. La cepa Sus1-TAP *sgf73* Δ se utilizó como control negativo. (B) El ensayo de desubicitinación de H2B en las cepas Ubp8-TAP y Ubp8-TAP *sem1* Δ se llevó a cabo como en A. Como control negativo se incubó la histona H2B sin purificado TAP. Las barras de error representan el error estándar de al menos tres experimentos independientes.

En resumen, estos resultados indican que Sem1 promueve la actividad desubicitinasa *in vitro* de SAGA sobre la histona H2B. Como vimos en la figura 44A, el crecimiento de *sem1* Δ en galactosa es menor que el de la cepa silvestre.

Resultados

Estos resultados nos llevaron a pensar que el reclutamiento parcial del módulo DUB de SAGA sobre el promotor de *GAL1* interfiere en la inducción de *GAL1*. Para comprobar esta hipótesis, delecionamos *SGF73* sobre el mutante *sem1Δ*. El mutante *sgf73Δ* se caracteriza por la pérdida de asociación de Sus1 con la cromatina (Pascual-Garcia *et al.*, 2008). Seguidamente, medimos mediante qRT-PCR los niveles de expresión de *GAL1* en el doble mutante *sem1Δsgf73Δ*. Como se observa en la figura 51, el doble mutante recupera parcialmente el defecto en la inducción de *GAL1* a unos niveles similares a los del mutante *sgf73Δ*.

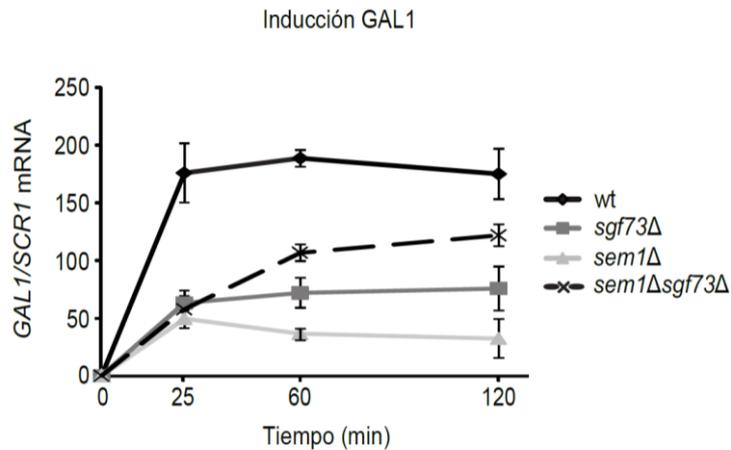


Figura 51. **Análisis de la cinética de inducción de *GAL1* en las cepas wt, *sem1Δ*, *sgf73Δ* y *sem1Δsgf73Δ*.** La cinética se llevó a cabo a lo largo de 120 minutos de inducción con galactosa al 2% a 30°C. Los niveles relativos de *GAL1* se normalizaron respecto a los de *SCR1*. Los valores de expresión obtenidos se han referenciado al tiempo de inducción cero de cada cepa. Las barras de error representan el error estándar de al menos tres experimentos independientes.

Resultados

Como hemos comprobado, *Sem1* regula la inducción de *GAL1* alterando la actividad desubicitinasa de SAGA como consecuencia de interrumpir su interacción con la cromatina. Con el fin de descartar que el efecto de *Sem1* sobre la actividad DUB de SAGA sea consecuencia de una desestructuración general de módulo DUB y de su interacción al resto del complejo SAGA, analizamos mediante LC-MS/MS el resultado de purificar mediante la técnica TAP las subunidades *Ada2* y *Ubp8* en una cepa silvestre y otra *sem1Δ*. Como se muestra en la tabla 3, el resultado de purificar el complejo SAGA en ausencia de *SEM1* no muestra diferencias significativas en su asociación con los componentes del módulo DUB comparado con la cepa silvestre.

Nombre de la proteína	ADA2-TAP		ADA2-TAP <i>sem1Δ</i>		UBP8-TAP		UBP8-TAP <i>sem1Δ</i>	
	Número de péptidos	Porcentaje de aa	Número de péptidos	Porcentaje de aa	Número de péptidos	Porcentaje de aa	Número de péptidos	Porcentaje de aa
Sus1	54	99	55	99	13	70.8	14	70.8
Ubp8	2	2.3	2	3.6	1	3.2	2	3.2
Sgf11	19	61.6	19	84.8	3	17.2	4	17.2
Sgf7/3	131	60.3	120	72.1	31	24.2	40	36.1
Taf9	53	77.1	78	90.4	22	73.9	20	59.2
Taf10	130	76.2	181	77.2	16	51.5	12	36.4
Taf6	37	23.1	36	26.4	3	11	5	11
Taf5	57	36.3	60	55	16	7.8	15	10.4
Taf12	143	69.6	125	67	24	26.9	17	23.7
Spt20/Ada5	55	29	55	31.5	8	16.1	5	7.8
Spt3	39	29.4	40	33.5	5	13.1	4	13.1
Spt7	87	28.6	87	29.5	6	4.7	8	5.6
Spt8	12	17.9	13	12.3	1	2	4	9.3
Tra1	18	3.7	18	3.6	1	0.3	1	0.3
Ada1	20	28.5	33	38.9	3	7.6	9	19.3
Ada3	481	81.9	470	89.6	14	12.3	18	17.7
Ada2	205	79.5	148	77.6	5	14.7	9	22.1
Gcn5/Ada4	102	50.1	81	50.1	3	8.9	1	2.5
Sgf29	144	71.8	167	84.9	17	30.5	23	34.7

Tabla 3. Análisis mediante espectrometría de masas de la purificación TAP de *Ada2* y *Ubp8* en una cepa silvestre y mutante *sem1Δ*. En la tabla se indica el número de péptidos

Resultados

encontrados para cada proteína identificada, así como el porcentaje de secuencia aminoacídica que estos representan respecto al total de la proteína. En naranja se resaltan las subunidades que componen el módulo DUB.

Con tal de verificar este resultado mediante WB, construimos las cepas Sus1-TAP silvestre y mutante *sem1* Δ , donde ambas expresaban Ubp8-MYC. Tras purificar Sus1-TAP, llevamos a cabo una detección mediante WB de los niveles de proteína Ubp8 copurificada en ambas cepas. Como se observa en la figura 52, no existe una disminución en la interacción Sus1-Ubp8 en ausencia de Sem1.

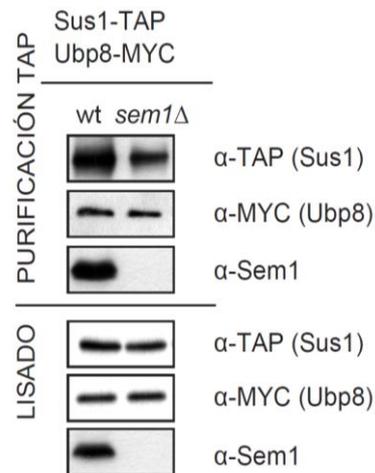


Figura 52. **Purificación TAP de Sus1 en una cepa que expresa Ubp8-MYC en presencia y ausencia de Sem1.** La presencia de Ubp8 y los niveles de la proteína cebo Sus1 se comprobaron en el purificado (panel superior) y en los lisados (panel inferior) mediante WB utilizando anticuerpos α -MYC y α -TAP respectivamente.

Resultados

Por lo tanto, el efecto de Sem1 sobre la inducción de *GAL1* no es consecuencia de una desestabilización general del módulo DUB dentro de SAGA.

TREX-2 promueve la actividad desubcunitinasa dependiente de SAGA

Los datos obtenidos hasta ahora sugieren que Sem1 puede estar involucrado en promover la actividad del módulo DUB como parte integrante de TREX-2. Es decir, la estabilidad de TREX-2 podría ser importante para crear una plataforma molecular entre los complejos SAGA-TREX-2 donde el módulo DUB sea totalmente funcional. Si tal es el caso, la delección de Thp1, el cual interacciona directamente con Sem1 dentro del complejo TREX-2 (Ellisdon *et al.*, 2012), produciría una reducción en la actividad del DUB mediada por SAGA. Para comprobar esta hipótesis, purificamos Ubp8-TAP en células silvestres y mutadas en *THP1*. Con estos purificados llevamos a cabo un ensayo *in vitro* para determinar la actividad desubcunitinasa de sendos complejos SAGA. Como se muestra en la figura 53, la ausencia de Thp1 produce una reducción significativa de la actividad DUB mediada por Ubp8 de forma similar a la observada al deleccionar el componente Sem1 (Figura 50A).

Resultados

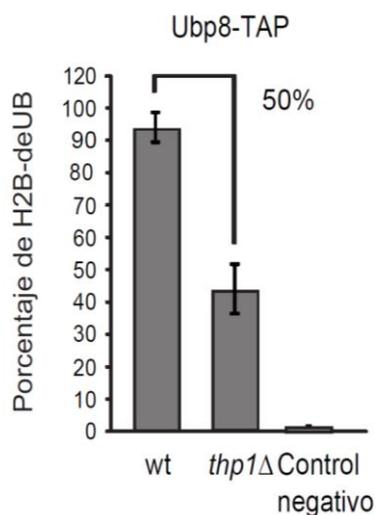


Figura 53. **Ensayo de desubicitinación *in vitro* de H2B en las cepas Ubp8-TAP y Ubp8-TAP *thp1*Δ.** Se llevó a cabo la purificación TAP de Ubp8 en presencia y ausencia de Thp1. Los purificados nativos se incubaron con la histona H2B. Como control negativo se incubó la histona H2B sin purificado TAP. Las barras de error representan el error estándar de al menos tres experimentos independientes.

Con el fin de extender la hipótesis de la posible influencia del complejo TREX-2 sobre la inducción de *GAL1*, decidimos analizar el papel del factor de TREX-2, Thp1, durante la activación de *GAL1*. Para ello, primero analizamos la cinética de la expresión de *GAL1* en ausencia de *THP1*. Como podemos ver en la figura 54, el mutante *thp1*Δ presenta

Resultados

una inducción deficiente, similar a la observada en la cepa *sem1Δ* (Figura 43).

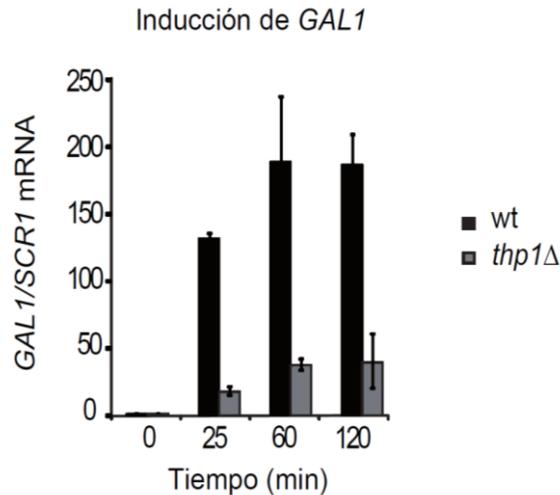


Figura 54. **Análisis de la cinética de inducción de *GAL1* en las cepas *wt* y *thp1Δ*.** La cinética se llevó a cabo a lo largo de 120 minutos de inducción con galactosa al 2%. Los niveles relativos de *GAL1* se normalizaron respecto a los de *SCR1*. Los valores de expresión obtenidos se han referenciado al tiempo de inducción cero de cada cepa. Las barras de error representan el error estándar de al menos tres experimentos independientes.

En segundo lugar, analizamos la presencia de distintas subunidades de SAGA en el promotor de *GAL1* mediante ChIP, tanto en cepas silvestres como mutantes *thp1Δ*. Como muestra la figura 55A y 55B, la unión al promotor de *GAL1* de las subunidades Ada2 y Taf9 bajo condiciones de inducción y en ausencia de *THP1*, disminuye significativamente respecto a la cepa silvestre. Por otro lado, al analizar la presencia de

Resultados

Sus1 bajo las mismas condiciones vemos que su unión a la cromatina también se ve comprometida. Este resultado es diferente al que se observa en el mutante *sem1Δ*, donde la unión de Sus1 está comprometida (Figura 55C y 55D).

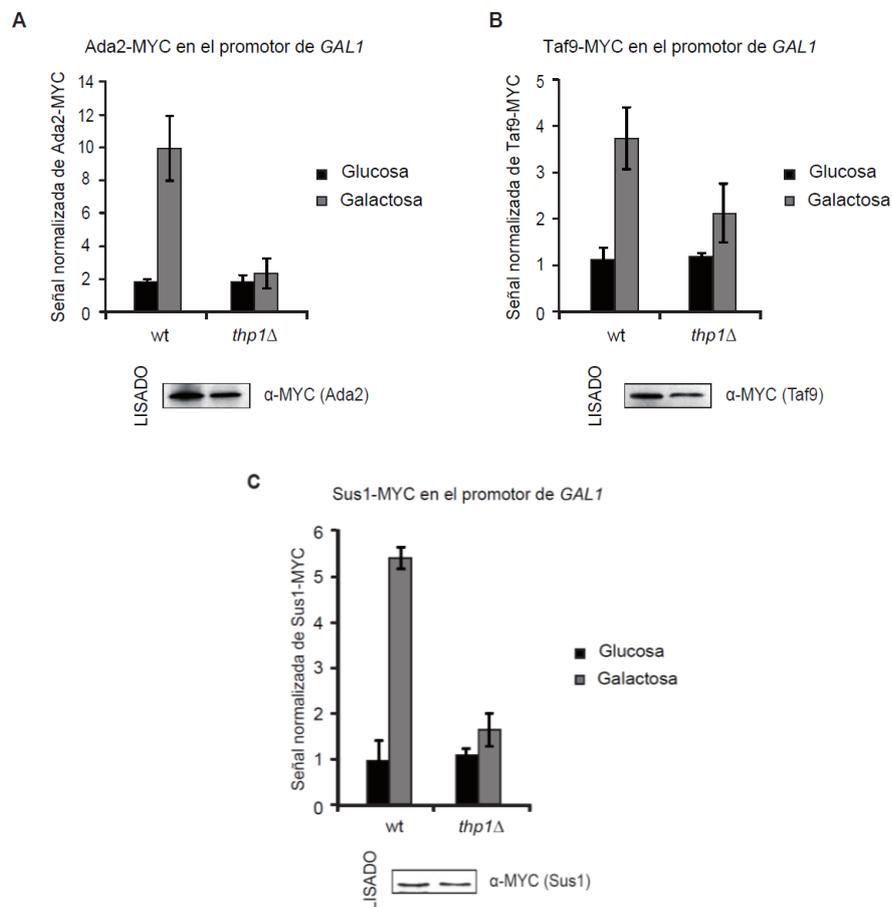


Figura 55. Análisis de la unión de las subunidades Ada2 (HAT/Core) (A), Taf9 (SA_SPT) (B), Sus1 (DUB) (C) al promotor de *GAL1* en las cepas wt y *thp1Δ* mediante ChIP. En todos los casos, las células se indujeron durante 25 minutos con galactosa. La unión a la cromatina se detectó mediante qPCR y se calculó como el

Resultados

porcentaje de inmunoprecipitado respecto al lisado. Al dato obtenido se le sustrajo el inmunoprecipitado detectado en una muestra sin anticuerpo. La detección de las proteínas cebo se llevó a cabo analizando los lisados mediante WB con anticuerpos α -MYC. Las barras de error representan el error estándar de al menos tres experimentos independientes.

En conclusión, la subunidad de TREX-2, Thp1, es necesaria para la correcta expresión de *GAL1* y el correcto reclutamiento de SAGA a su promotor. Estos datos apoyan el modelo propuesto, en el que la estabilidad de TREX-2 puede ser importante para reforzar la coordinación entre los complejos SAGA-TREX-2, alcanzándose así la activación completa del módulo DUB y la activación transcripcional del gen *GAL1*.

DISCUSIÓN

Asf1 interacciona física y genéticamente con Sus1

Asf1, a través de su función como chaperona de histonas, participa activamente en aquellos procesos celulares que requieren una adaptación en el estado de compactación de la cromatina, como son el mantenimiento del silenciamiento, la reparación del DNA y la transcripción (Mousson *et al.*, 2007). Se ha descrito que en ausencia de Asf1 hay un incremento en la unión de histona H3 a los genes transcripcionalmente activos en detrimento de la unión de la RNA Pol II (Schwabish & Struhl, 2006). Además, Asf1 interacciona físicamente con la RNA Pol II a través de Bdf1 (Chimura *et al.*, 2002) y se recluta al promotor del gen regulado por SAGA, *GAL1* (Schwabish & Struhl, 2006). Asf1 también es necesaria para estabilizar el complejo SAGA en los genes *HO* y *PHO5* (Schwabish & Struhl, 2006; Adkins *et al.*, 2007; Takahata *et al.*, 2009). Estos datos evidencian la participación de Asf1 durante la expresión génica.

Los datos presentados en este trabajo apoyan el papel de Asf1 durante la transcripción. Asf1 interacciona genética y físicamente con la subunidad de SAGA, Sus1 (Figuras 11 y 12). Aunque existen datos que demuestran una interacción física entre las subunidades del coactivador TFIID, Taf1 y Taf7, y Asf1 (Chimura *et al.*, 2002), hasta el momento no se ha descrito una interacción física con el coactivador SAGA. Por

Discusión

otra parte, Asf1 interacciona físicamente con Set2 (Campos *et al.*, 2010). Como vimos en la introducción, Set2 se recluta a la forma elongante de la RNA Pol II tras la desubicitinación de H2B a través del módulo DUB de SAGA (Krogan *et al.*, 2003). Set2 metila a la lisina 36 de la histona H3, lo que activa al complejo desacetilasa Rpd3 (Keogh *et al.*, 2005; Govind *et al.*, 2010). Por otro lado, la metilación de H3K36 impide que Asf1 reensamble histonas H3 acetiladas sobre la cromatina tras el paso de la RNA Pol II (Butler & Dent, 2012; Venkatesh *et al.*, 2012). Este mecanismo por el cual las histonas de los genes recién transcritos son metiladas y desacetiladas permite reestablecer la cromatina tras el paso de la RNA Pol II, controlando la expresión de transcritos críticos (Carrozza *et al.*, 2005; Butler & Dent, 2012; Smolle & Workman, 2013). Recientemente se ha demostrado que los transcritos críticos son necesarios para la expresión de los genes regulados por SAGA, *ARG1* y *GAL1* (Crisucci & Arndt, 2012; Geisler *et al.*, 2012). Una posibilidad sería que Asf1 participe en la regulación de estos genes a este nivel.

Los datos aportados por esta tesis junto con los antecedentes mencionados, sugieren que Asf1 junto con Sus1 ejercen una acción coordinada durante la activación génica así como durante el restablecimiento de la cromatina. Asf1 cooperaría desensamblando nucleosomas al inicio de la transcripción, facilitando la asociación de Sus1 y SAGA al promotor de los genes, lo que favorecería la formación del PIC

Discusión

y la consiguiente expresión génica a través de la RNA Pol II. Tras el paso de la polimerasa, Asf1 junto con la actividad desubicitinasa del módulo DUB de SAGA facilitaría el restablecimiento de la cromatina a un estado no inducido en el que la transcripción críptica se vería obstaculizada (Figura 56).

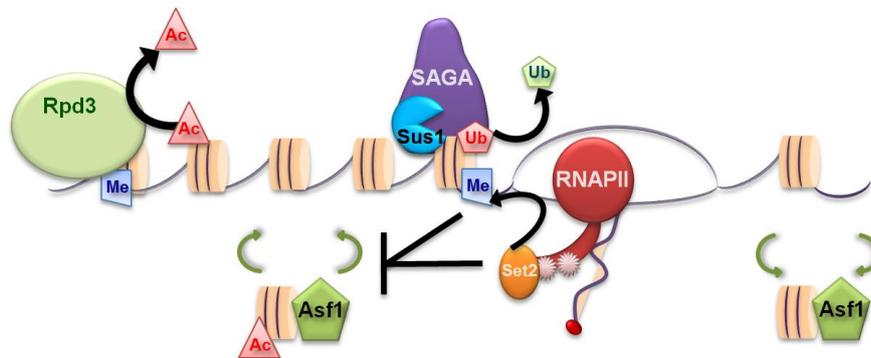


Figura 56. **Regulación transcripcional a través de Sus1 y Asf1.** Asf1 desensambla nucleosomas por delante de la polimerasa, relajando la cromatina y facilitando el paso de la RNA Pol II. Set2 interacciona con la forma elongante de la RNA Pol II y metila el residuo K36 de la histona H3 tras el paso de la polimerasa. Rpd3 interacciona con la metilación de H3K36 y desacetila las histonas, lo que reduce la expresión de transcritos crípticos. Set2 y la metilación de H3K36 bloquean el intercambio de histonas preacetiladas mediante Asf1 suprimiendo mediante otro mecanismo la transcripción críptica.

Por otro lado, hemos demostrado que Asf1 influye en etapas posteriores de la expresión génica. La ausencia de Asf1 provoca un acúmulo de mRNAs en el núcleo, por lo que

Discusión

es un factor necesario para exportar de forma eficiente los mRNAs del núcleo al citoplasma (Figura 13). Aunque el papel de Asf1 ha sido ampliamente estudiado a nivel de organización de la cromatina (Mousson *et al.*, 2007), hasta ahora no ha sido relacionado con otras etapas de la transcripción que impliquen otros complejos como TREX-2. La interacción física observada entre Asf1 y la subunidad de TREX-2, Sus1, sugiere una relación funcional de Asf1 en el proceso de exportación de mRNAs. Queda por determinar si el defecto de exportación observado en *asf1* Δ se debe a su papel conjunto con Sus1 durante la transcripción, dando lugar a mRNAs competentes capaces de ser exportados, o bien implica la participación del complejo TREX-2. Para responder a esta cuestión, son necesarios nuevos experimentos que permitan disociar la doble funcionalidad de Sus1.

Nup60 es necesario para la expresión de Sus1 y su asociación con TREX-2

El complejo de poro nuclear permite el intercambio de moléculas entre el núcleo y el citoplasma (Rout *et al.*, 2000). Durante la expresión génica el NPC interviene en la etapa de exportación de los mRNAs, conduciéndolos al citoplasma (Dieppois & Stutz, 2010). Se ha demostrado que además de su papel en la exportación, el NPC participa activamente en la expresión génica interviniendo en las primeras etapas de la

Discusión

transcripción (Dieppoiss & Stutz, 2010; Strambio-De-Castillia *et al.*, 2010; Egecioglu & Brickner, 2011). La nucleoporina Nup60 interacciona físicamente con TREX-2, Ubp8 y el exportador Mex67 y es necesaria para anclar los mRNAs transcripcionalmente activos al NPC (Lutzmann *et al.*, 2005; Oeffinger *et al.*, 2007; Ahmed *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011; Powrie *et al.*, 2011). Estos datos ponen de manifiesto que la coordinación y estabilización entre los complejos TREX-2-SAGA-NPC es esencial durante la expresión génica, colaborando entre sí para localizar cotranscripcionalmente los genes activos en las inmediaciones del poro para facilitar de esta forma su exportación.

Nuestros resultados apoyan la idea de que estas tres maquinarias son dependientes entre sí. Hemos demostrado que en ausencia de Nup60, la unión de Sus1 a TREX-2 se ve significativamente reducida. Por otro lado, la unión de Sus1 a SAGA también se ve afectada, puesto que no se identificó la proteína Spt8 (Figura 14). Aunque faltaría determinar la importancia biológica de estos datos, se confirma la existencia de una coordinación entre las tres maquinarias. La localización *in vivo* de Sus1 mediante microscopía de fluorescencia corrobora los datos bioquímicos obtenidos, ya que, en ausencia de Nup60 detectamos una deslocalización de Sus1 hacia el interior del núcleo (Figura 15). La pérdida de localización en las inmediaciones del poro pone de manifiesto

Discusión

la importancia de Nup60 en la interacción entre Sus1 y TREX-2.

Se ha demostrado que Nup60 es necesaria para establecer un punto de control en las inmediaciones del NPC, de modo que sólo los mRNAs correctamente procesados puedan ser exportados (Powrie *et al.*, 2011). Por otro lado, Nup60 participa en el proceso de corte y empalme de intrones en levadura, aunque se desconoce el mecanismo molecular por el cual participa en este proceso (Galy *et al.*, 2004). Por lo tanto, Nup60 participa activamente en la regulación del correcto procesamiento de los mRNAs. El gen *SUS1* posee una estructura genómica característica y conservada evolutivamente (Cuenca-Bono *et al.*, 2011). Contiene dos intrones cuyas señales de corte y empalme no están conservadas (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2004; Hossain *et al.*, 2009; Pascual-García & Rodríguez-Navarro, 2009). Los datos presentados en este trabajo apoyan el papel de Nup60 durante la regulación del procesamiento de los transcritos de Sus1. En ausencia de Nup60 se observa una acumulación de transcritos sin procesar que contienen ambos intrones de Sus1 (Figura 17). Este resultado se pone de manifiesto con la observación de especies peptídicas de movilidad electroforética menor en un gel desnaturante, las cuales reaccionan frente a anticuerpos de Sus1 (Figura 16). Cabe la posibilidad de que los transcritos sin procesar de Sus1 den lugar a especies peptídicas de menor tamaño con funciones celulares aún por

Discusión

determinar. Esta posibilidad ya ha sido observada anteriormente (Cuenca-Bono *et al.*, 2011; Hossain *et al.*, 2011).

Los datos aportados por esta tesis junto con los antecedentes mencionados, sugieren que Nup60 es un componente necesario dentro del NPC que participa en la coordinación de la estructura SAGA-TREX-2-NPC, necesaria para la correcta expresión de los genes. Por otro lado, Nup60 es capaz de regular la transcripción génica de *Sus1* a través del proceso de corte y empalme necesario para su procesamiento. Hasta el momento, se desconoce el mecanismo molecular por el cual participa en este proceso.

Sus1 participa junto con la maquinaria de regulación de telómeros en el control de los mismos

Los telómeros son estructuras genómicas altamente organizadas, la pérdida de regulación de su longitud o silenciamiento producen inestabilidad genómica y muerte celular (Wellinger & Zakian, 2012). El control celular de los telómeros se asocia a las inmediaciones del NPC, donde quedan anclados y estabilizados topológicamente (Taddei & Gasser, 2012). Se ha descrito que las subunidades de SAGA, Ada2 y Gcn5 participan en el mantenimiento del silenciamiento telomérico (Oki *et al.*, 2004; Jacobson & Pillus, 2009), así

Discusión

como el homólogo de *Sus1* en *D. melanogaster* (Kurshakova *et al.*, 2007; Erokhin *et al.*, 2010). Recientemente se ha descrito un nuevo mecanismo de regulación de la longitud telomérica, que implica la transcripción subtelomérica de unos lncRNAs denominados TERRA (Luke & Lingner, 2009; Feuerhahn *et al.*, 2010). TERRA inhibe la acción de la telomerasa a través de la formación de híbridos RNA-DNA con el DNA telomérico (Feuerhahn *et al.*, 2010). Se ha demostrado que la RNA Pol II es la responsable de la transcripción de TERRA (Luke *et al.*, 2008), lo que abre la posibilidad a que su regulación la lleve a cabo la misma maquinaria que regula los RNAs codificantes.

Los datos aportados en esta tesis indican que el componente de SAGA y TREX-2, *Sus1*, contribuye a la regulación de la biogénesis de los telómeros. Hemos demostrado que *Sus1* interacciona genéticamente con un amplio grupo de proteínas implicadas en el metabolismo de los telómeros (Figura 18). Además, *Sus1* interacciona físicamente con Mlp2, Rif1, Yku80 y Upf2 (Figuras 21 y 22). Estas proteínas regulan la longitud de los telómeros mediante distintos mecanismos (Boulton & Jackson, 1998; Hediger *et al.*, 2002; Askree *et al.*, 2004; Smogorzewska & de Lange, 2004). Por otro lado, hemos demostrado que el mutante *sus1* Δ presenta telómeros alargados (Figura 23). Además, al eliminar *SUS1* en mutantes que presentan telómeros acortados

Discusión

(*sem1Δ*, *esc2Δ* y *rsc2Δ*) observamos una prevalencia del fenotipo visto en el mutante sencillo *sus1Δ* (Figura 24).

Nuestros datos sugieren que Sus1 está implicado en el metabolismo de los telómeros. La participación de Sus1 en la regulación y mantenimiento de los telómeros puede darse mediante mecanismos distintos. De acuerdo con el papel de Sus1 durante la transcripción a través de SAGA, podría ocurrir que Sus1 estuviera implicado en la transcripción de TERRA. De esta forma, Sus1 regularía indirectamente la longitud de los telómeros. Se ha observado que en el mutante de la exonucleasa *rat1-1* los niveles elevados de TERRA producen telómeros acortados (Luke *et al.*, 2008). Si Sus1 a través de SAGA estuviera implicado en la transcripción de los telómeros cabría esperar que en el mutante *sus1Δ* los niveles de TERRA se vieran reducidos, lo que explicaría el alargamiento de telómeros que observamos. El fenotipo de *sus1Δ* apoyaría esta idea, pero quedaría por determinar si efectivamente SAGA está implicado en la transcripción de TERRA y si la mutación de *SUS1* produce una disminución en sus niveles celulares. Otra posibilidad es que Sus1 afecte al metabolismo de los telómeros a través del efecto barrera que ejerce en las inmediaciones de la envoltura nuclear (Kurshakova *et al.*, 2007; Erokhin *et al.*, 2010), estabilizando las agrupaciones teloméricas y manteniendo su silenciamiento. El anclaje de los telómeros a la envoltura nuclear es esencial para mantener su

Discusión

silenciamiento (Galy *et al.*, 2000; Taddei *et al.*, 2009), algunas de las proteínas responsables de este anclaje son Yku80 y Mlp2 (Galy *et al.*, 2000). En este trabajo hemos demostrado que existe una interacción física entre Sus1 y estas proteínas, lo que sugiere una coordinación entre ellas durante el anclaje y silenciamiento de los telómeros en las inmediaciones de la envoltura nuclear. Por otro lado, se ha descrito que el posicionamiento de los telómeros en la periferia nuclear puede afectar a la actividad de la telomerasa (Hediger *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2011). Por lo tanto, Sus1 podría estar implicado en el metabolismo de los telómeros a través de su papel como elemento barrera y su interacción física con la maquinaria de regulación de telómeros. Por último, hemos demostrado que existe una asociación física entre Sus1 y el componente de la maquinaria NMD, Upf2. Este resultado abre la posibilidad de que Sus1 esté implicado en el mecanismo por el cual esta maquinaria regula la transcripción de TERRA (Feuerhahn *et al.*, 2010) y por consiguiente la longitud de los telómeros.

Sem1 interacciona físicamente con Sus1 y es necesaria para la estabilidad y función de TREX-2

Sem1 es una proteína versátil que interacciona con diferentes complejos involucrados en procesos celulares distintos, incluyendo la degradación de proteínas mediante el

Discusión

proteasoma (Pick *et al.*, 2009). Se ha especulado con que Sem1 podría ejercer de molécula estabilizadora en aquellos complejos donde interacciona (Pick *et al.*, 2009). Nuestros resultados han demostrado que Sem1 interacciona físicamente con Sus1 (Figura 26) y es necesario para la estabilidad de TREX-2.

Durante el desarrollo de esta tesis distintos trabajos han confirmado el papel de Sem1 dentro de TREX-2 (Mannen *et al.*, 2008; Wilmes *et al.*, 2008; Faza *et al.*, 2009). Recientemente se ha resuelto un fragmento de la estructura cristalizada de TREX-2 (Ellisdon *et al.*, 2012), la cual revela que dos moléculas de Sus1 se unen a Sac3, mientras que Sem1 interacciona directamente con Thp1 (Jani *et al.*, 2009; Wilmes & Guthrie, 2009; Ellisdon *et al.*, 2012; Valkov *et al.*, 2012). De acuerdo con estos datos, nuestros resultados bioquímicos indican que la interacción Sus1-Sem1 es dependiente tanto de Sac3 como de Thp1 (Figura 27). Sin embargo, la ausencia de Sem1 provoca una reducción de la interacción de Sus1 con TREX-2 *in vivo* (Figura 28), lo que sugiere una dinámica de interacciones entre los componentes de TREX-2 más compleja de la que se deduce a partir del análisis estructural (Figura 57). Por otro lado, hemos comprobado que Sem1 altera de manera significativa la estabilidad de los complejos nativos que contienen Sus1, además los componentes de TREX-2, Sem1, Thp1 y Sac3,

Discusión

son esenciales para mantener la conformación nativa de estos complejos (Figuras 29 y 30).

Los resultados aportados en esta tesis junto con los datos publicados recientemente indican que Sem1 es esencial en la estabilidad e integridad del complejo TREX-2. De acuerdo con los datos cristalográficos (Ellisdon *et al.*, 2012), se ha visto que en ausencia de Sem1, Thp1 se deslocaliza del entorno del NPC a diferencia de Sac3, el cual mantiene su localización (Faza *et al.*, 2009). Sac3 es necesario para el correcto reclutamiento de Sus1 al NPC (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2004), por lo que cabría esperar que la distribución de Sus1 en *sem1* Δ fuera semejante a la de Sac3. Como revelan nuestros resultados, la localización de Sus1 no se ve afectada en ausencia de Sem1 (Figura 31). Este resultado era de esperar, ya que la ausencia de Sem1 no altera la localización de Sac3 y éste es el responsable de anclar a Sus1 en las inmediaciones del poro (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2004). En base a estos resultados bioquímicos, nos preguntamos si el papel de Sem1 como componente estabilizador del complejo de exportación TREX-2 se ve reflejado funcionalmente. Nuestros datos demuestran que Sem1 participa en la exportación general de los mRNAs, incrementando el defecto de exportación producido en ausencia de Sus1 (Figura 32). Por lo tanto, Sem1 contribuye junto con Sus1 en la exportación de los mRNAs.

Discusión

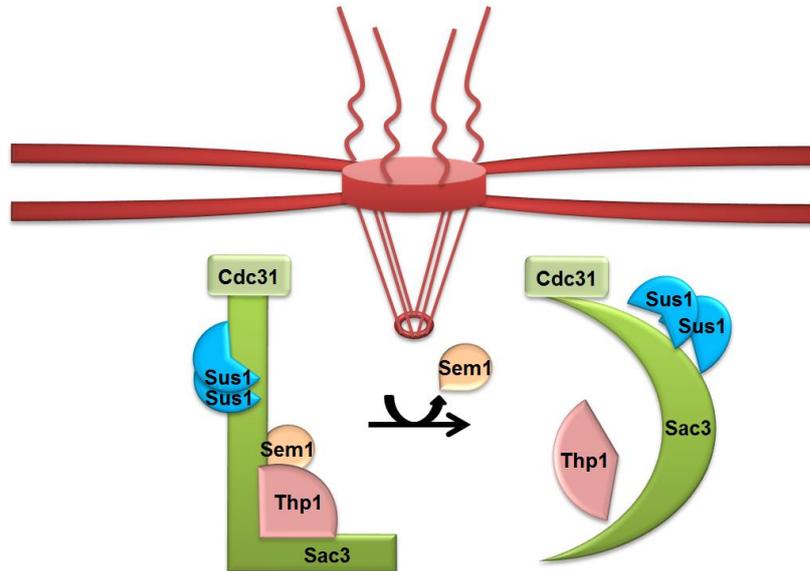


Figura 57. **Modelo de la dinámica de interacciones entre los componentes de TREX-2.** Sem1 ensambla el complejo TREX-2 mediante la estabilización de la interacción entre las proteínas Sac3 y Thp1. La ausencia de Sem1 provoca una desestructuración de Thp1 que produce un cambio conformacional en la estructura de Sac3. Este cambio impide a su vez la correcta interacción de Sus1 a TREX-2. El cambio conformacional que sufre Sac3 no afecta a su unión al NPC, ni a la localización perinuclear de Sus1.

Sem1 participa durante la transcripción génica a través de Sus1 y SAGA

A pesar de que la estructura y función de Sem1 en el contexto de TREX-2 han sido estudiadas, su posible papel a lo largo de la transcripción aún no ha sido investigado. Los complejos TREX-2 y SAGA están relacionados funcionalmente

Discusión

a través de la proteína Sus1, la cual forma parte de ambas maquinarias, coordinando así los procesos de exportación y transcripción de los mRNAs (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2004). Además, se han descrito interacciones físicas entre los componentes de ambos complejos, lo que apoya todavía más su coordinación (Fischer *et al.*, 2002; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2004; Kohler *et al.*, 2008). De acuerdo con estos datos, hemos comprobado que el factor Sem1 interacciona físicamente con las subunidades de SAGA, Ada2 y Ubp8 (Figura 34). Los perfiles transcripcionales de los mutantes de las subunidades de SAGA y TREX-2 mostrados en este trabajo apoyan el papel coordinador de Sus1 entre los dos complejos (Figura 33). Además, los datos demuestran que el perfil transcripcional de *SEM1* presenta mayor correlación con el de *SUS1* que con cualquier otro factor de TREX-2 (Figura 33). Sorprendentemente, también se observa cierta correlación entre el componente de SAGA *ADA2* y *SEM1*. Por otro lado, existe un enriquecimiento de genes regulados por SAGA en el conjunto de genes afectados en el mutante *SEM1* (Tabla 2).

Por lo tanto, nuestros datos revelan que Sem1 no solo participa en la estabilidad e integridad de TREX-2, sino que apoyan un posible papel de Sem1 durante la transcripción a través de Sus1 y SAGA. De acuerdo con esto, hemos demostrado que Sem1 también contribuye a la asociación entre Sus1 y SAGA/SLIK (Figura 35). Nuestros análisis APEX y iTRAQ indican que en ausencia de Sem1, Sus1 se asocia

Discusión

preferentemente a SAGA y a las histonas, mientras que hay una reducción en los componentes de TREX-2 (Figuras 38 y 40).

SLIK es un complejo acetiltransferasa de histonas estructuralmente muy similar a SAGA (Lee *et al.*, 2009). Las características estructurales que diferencian a SLIK del complejo SAGA son la ausencia de la proteína Spt8 y la presencia de una forma truncada en C-terminal de Spt7 (Pray-Grant *et al.*, 2002). La similitud estructural entre ambos complejos hace difícil la diferenciación y caracterización funcional de cada uno de ellos de forma independiente. Hasta el momento se desconoce la funcionalidad de SLIK y sus posibles implicaciones durante el proceso de la transcripción. El único proceso en el que se ha descrito su participación es en la ruta de respuesta retrógrada de levadura, implicada en los cambios de expresión génica durante una disfunción mitocondrial (Pray-Grant *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004). El estudio detallado de las proteínas que interactúan físicamente con Sus1 a partir del análisis de espectrometría de masas de nuestro purificado TAP, reveló que en ausencia de Sem1 no fue posible identificar péptidos correspondientes a Spt8 (Figura 35B). Además, el análisis de los péptidos de Spt7 identificados revela que ninguno de los observados en los distintos análisis realizados correspondían con la región C-terminal de esta proteína, ausente en el complejo SLIK (Figura 36). Estos datos sugieren que Sus1 podría asociarse

Discusión

preferentemente al complejo SLIK en ausencia de Sem1. De ser así, Sem1 sería importante en la regulación de los genes controlados por SAGA, como hemos comprobado en esta tesis, pero también estaría participando en la regulación de aquellos genes relacionados con el metabolismo mitocondrial. Estudios futuros acerca de la formación del complejo SLIK, así como sus funciones *in vivo* son necesarios para elucidar su papel en la transcripción y la importancia que Sem1 pueda tener.

El papel de Sem1 durante la activación transcripcional fue corroborado mediante un ensayo enzimático β -galactosidasa, el cual reveló que la activación transcripcional es dependiente de Sem1 (Figura 41). Además, hemos demostrado que la inducción de los genes regulados por SAGA, *ARG1* y *GAL1*, disminuye en ausencia de *SEM1* (Figura 42). Se ha visto que la inducción de estos genes implica la unión de Sus1 a sus promotores (Pascual-García *et al.*, 2008). Nuestros experimentos muestran que Sem1 es necesario para la unión de las subunidades de SAGA, Ada2, Gcn5, Spt8 y Taf9, al promotor de *GAL1* (Figuras 45A, 46 y 47 panel inferior). Sin embargo, la unión de Sus1 es independiente de Sem1 (Figura 47 panel superior). Se ha descrito que el equilibrio de los niveles de ubiquitinación de la histona H2B es esencial en el control de la transcripción de *GAL1* (Henry *et al.*, 2003). Nuestros resultados indican que los niveles de histona ubiquitinada H2B en el promotor de *GAL1*

Discusión

en ausencia de Sem1 están incrementados respecto a la cepa salvaje (Figura 48). Por lo tanto, el defecto de expresión en el mutante *sem1* Δ podría estar producido por la falta de actividad DUB debido a una deficiencia en el ensamblaje de SAGA sobre el promotor de *GAL1*. La actividad desubicitinasa *in vitro* que muestran los purificados TAP de Ubp8 y Sus1 en ausencia de Sem1 también disminuye significativamente respecto a las cepas salvajes correspondientes. Por lo tanto, la ausencia de Sem1 altera la actividad desubicitinasa mediada por SAGA.

En vista de estos resultados nos preguntamos si el defecto de reclutamiento podría estar producido por una desestabilización general del complejo SAGA en ausencia de Sem1. Para responder a esta cuestión, purificamos las subunidades de SAGA, Ada2 y Ubp8, en ausencia de Sem1. Los eluidos contienen todas las proteínas que conforman el complejo SAGA (Tabla 3). Por lo tanto, Sem1 no afecta a la estabilidad e integridad de SAGA en la célula, sino que produce un defecto en su reclutamiento al promotor de *GAL1* bajo condiciones de activación transcripcional. Cabe resaltar que la regulación transcripcional del gen *GAL1* implica un control minucioso de su localización nuclear. La activación de *GAL1* supone un acercamiento del *loci* al NPC a través de las interacciones SAGA-TREX-2 (Cabal *et al.*, 2006; Dieppois *et al.*, 2006; Luthra *et al.*, 2007; Kohler *et al.*, 2008; Vodala *et al.*, 2008; Tan-Wong *et al.*, 2009). La coordinación entre los

Discusión

complejos SAGA-TREX-2 es un requisito indispensable para la correcta activación transcripcional y acercamiento al poro de *GAL1*. Esto podría explicar el defecto en el reclutamiento de SAGA a *GAL1* en ausencia de Sem1, donde la estabilidad de TREX-2 está comprometida. Nuestros datos apoyan este modelo, ya que hemos observado que otro componente de TREX-2, Thp1, produce un efecto similar a Sem1 sobre la transcripción de *GAL1*. Thp1 interacciona directamente con Sem1 como parte de TREX-2 (Ellisdon *et al.*, 2012) y es necesario, al igual que este, para llevar a cabo la transcripción de *GAL1* (Figura 54), para reclutar componentes de SAGA al promotor de *GAL1* (Figura 55) y para la correcta actividad desubicitinasa *in vitro* del módulo DUB (Figura 53).

Multitud de trabajos han aportado grandes avances que apoyan la idea de una expresión génica coordinada desde sus etapas iniciales hasta las últimas fases a través de la interacción de distintas maquinarias moleculares. Nuestros resultados apoyan la existencia de una coordinación funcional entre los procesos de transcripción y exportación a través de los complejos SAGA y TREX-2. Estos resultados ponen de manifiesto una interdependencia entre la estabilización de TREX-2, el reclutamiento de SAGA al promotor de *GAL1* y la activación del módulo DUB. Queda por determinar cuál es el mecanismo molecular por el cual cada complejo contribuye a

Discusión

dicha coordinación y cómo esta coordinación se engloba dentro del contexto celular donde otros muchos mecanismos entran en juego (Figura 58).

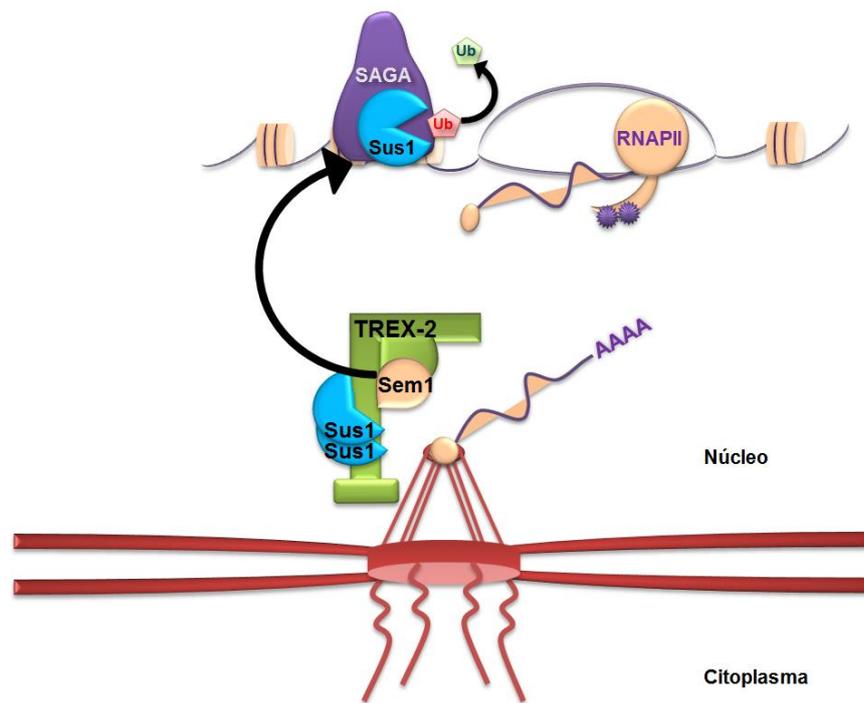


Figura 58. **Regulación transcripcional a través de Sem1.** Sem1 estabiliza la integridad del complejo TREX-2 garantizando el reclutamiento del complejo SAGA al promotor de *GAL1*. La coordinación entre TREX-2 y SAGA a través de Sem1 promueve la actividad DUB que desencadenará el consiguiente inicio de la transcripción.

CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo se resumen en:

1. Asf1 interacciona genética y físicamente con Sus1, siendo necesaria para la exportación de los mRNAs.
2. Nup60 es importante para la asociación de Sus1 con TREX-2 y SAGA, siendo necesaria para la localización nuclear de Sus1.
3. Nup60 está implicado en el proceso de corte y empalme de los intrones de Sus1. En el mutante *NUP60* se observan especies peptídicas de Sus1 de movilidad electroforética mayor a la proteína completa.
4. Sus1 interacciona genética y físicamente con componentes de la maquinaria de biogénesis de telómeros. El mutante *sus1Δ* presenta un fenotipo de telómeros alargados, siendo dominante con respecto al fenotipo mostrado por los mutantes *rsc2Δ*, *esc2Δ* y *sem1Δ*.
5. Sem1 interacciona físicamente con Sus1 y es importante para la interacción de Sus1 con TREX-2 y SAGA/SLIK. Además, Sem1 es parte estructural de TREX-2 y es necesario en el mantenimiento de su estabilidad nativa.
6. Sem1 interacciona físicamente con las subunidades de SAGA, Ada2 y Ubp8.

Conclusiones

7. Sem1 está implicado en la expresión de los genes regulados por SAGA, *ARG1* y *GAL1*, y es esencial para reclutar íntegramente el complejo SAGA al promotor de *GAL1*.
8. Los componentes de TREX-2, Sem1 y Thp1, se requieren para la correcta actividad desubicitinasa dependiente de SAGA.
9. El componente de TREX-2, Thp1, es necesario para la inducción del gen *GAL1* y para el correcto reclutamiento de SAGA a su promotor.

BIBLIOGRAFÍA

Abruzzi, K. C., Belostotsky, D. A., Chekanova, J. A., Dower, K. and Rosbash, M. (2006). 3'-end formation signals modulate the association of genes with the nuclear periphery as well as mRNP dot formation. *The EMBO journal* **25**(18), 4253-4262.

Adamietz, P. and Rudolph, A. (1984). ADP-ribosylation of nuclear proteins in vivo. Identification of histone H2B as a major acceptor for mono- and poly(ADP-ribose) in dimethyl sulfate-treated hepatoma AH 7974 cells. *The Journal of biological chemistry* **259**(11), 6841-6846.

Addinall, S. G., Downey, M., Yu, M., Zubko, M. K., Dewar, J., Leake, A., Hallinan, J., Shaw, O., James, K., Wilkinson, D. J., Wipat, A., Durocher, D. and Lydall, D. (2008). A genomewide suppressor and enhancer analysis of *cdc13-1* reveals varied cellular processes influencing telomere capping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **180**(4), 2251-2266.

Adkins, M. W. and Tyler, J. K. (2004). The histone chaperone Asf1p mediates global chromatin disassembly in vivo. *The Journal of biological chemistry* **279**(50), 52069-52074.

Adkins, M. W. and Tyler, J. K. (2006). Transcriptional activators are dispensable for transcription in the absence of Spt6-mediated chromatin reassembly of promoter regions. *Mol Cell* **21**(3), 405-416.

Adkins, M. W., Williams, S. K., Linger, J. and Tyler, J. K. (2007). Chromatin disassembly from the PHO5 promoter is essential for the recruitment of the general transcription machinery and coactivators. *Molecular and cellular biology* **27**(18), 6372-6382.

Aggarwal, K., Choe, L. H. and Lee, K. H. (2006). Shotgun proteomics using the iTRAQ isobaric tags. *Briefings in functional genomics & proteomics* **5**(2), 112-120.

Aguilera, A. (2005). Cotranscriptional mRNP assembly: from the DNA to the nuclear pore. *Current opinion in cell biology* **17**(3), 242-250.

Ahmed, S., Brickner, D. G., Light, W. H., Cajigas, I., McDonough, M., Froysheter, A. B., Volpe, T. and Brickner, J. H. (2010). DNA zip codes control an ancient mechanism for gene targeting to the nuclear periphery. *Nature cell biology* **12**(2), 111-118.

Akhtar, A. and Gasser, S. M. (2007). The nuclear envelope and transcriptional control. *Nature reviews. Genetics* **8**(7), 507-517.

Alber, F., Dokudovskaya, S., Veenhoff, L. M., Zhang, W., Kipper, J., Devos, D., Suprpto, A., Karni-Schmidt, O., Williams, R., Chait, B. T., Rout, M. P. and Sali, A. (2007). Determining the

Bibliografía

architectures of macromolecular assemblies. *Nature* **450**(7170), 683-694.

Alber, F., Dokudovskaya, S., Veenhoff, L. M., Zhang, W., Kipper, J., Devos, D., Suprpto, A., Karni-Schmidt, O., Williams, R., Chait, B. T., Sali, A. and Rout, M. P. (2007). The molecular architecture of the nuclear pore complex. *Nature* **450**(7170), 695-701.

Allard, S., Utley, R. T., Savard, J., Clarke, A., Grant, P., Brandl, C. J., Pillus, L., Workman, J. L. and Cote, J. (1999). NuA4, an essential transcription adaptor/histone H4 acetyltransferase complex containing Esa1p and the ATM-related cofactor Tra1p. *The EMBO journal* **18**(18), 5108-5119.

Allfrey, V. G., Faulkner, R. and Mirsky, A. E. (1964). Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **51**, 786-794.

Allfrey, V. G., Littau, V. C. and Mirsky, A. E. (1964). Methods for the Purification of Thymus Nuclei and Their Application to Studies of Nuclear Protein Synthesis. *The Journal of cell biology* **21**, 213-231.

Allfrey, V. G. and Mirsky, A. E. (1964). Structural Modifications of Histones and their Possible Role in the Regulation of RNA Synthesis. *Science* **144**(3618), 559.

Amar, N., Messenguy, F., El Bakkoury, M. and Dubois, E. (2000). ArgRII, a component of the ArgR-Mcm1 complex involved in the control of arginine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, is the sensor of arginine. *Molecular and cellular biology* **20**(6), 2087-2097.

Ambroziak, J. and Henry, S. A. (1994). INO2 and INO4 gene products, positive regulators of phospholipid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*, form a complex that binds to the INO1 promoter. *The Journal of biological chemistry* **269**(21), 15344-15349.

Ansari, A. and Hampsey, M. (2005). A role for the CPF 3'-end processing machinery in RNAP II-dependent gene looping. *Genes & development* **19**(24), 2969-2978.

Askree, S. H., Yehuda, T., Smolikov, S., Gurevich, R., Hawk, J., Coker, C., Krauskopf, A., Kupiec, M. and McEachern, M. J. (2004). A genome-wide screen for *Saccharomyces cerevisiae* deletion mutants that affect telomere length. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(23), 8658-8663.

Bibliografía

Auld, K. L., Brown, C. R., Casolari, J. M., Komili, S. and Silver, P. A. (2006). Genomic association of the proteasome demonstrates overlapping gene regulatory activity with transcription factor substrates. *Molecular cell* **21**(6), 861-871.

Azzalin, C. M., Reichenbach, P., Khoriauli, L., Giulotto, E. and Lingner, J. (2007). Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science* **318**(5851), 798-801.

Bachhawat, N., Ouyang, Q. and Henry, S. A. (1995). Functional characterization of an inositol-sensitive upstream activation sequence in yeast. A cis-regulatory element responsible for inositol-choline mediated regulation of phospholipid biosynthesis. *The Journal of biological chemistry* **270**(42), 25087-25095.

Baker, K. E. and Parker, R. (2004). Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression. *Current opinion in cell biology* **16**(3), 293-299.

Balasubramanian, R., Pray-Grant, M. G., Selleck, W., Grant, P. A. and Tan, S. (2002). Role of the Ada2 and Ada3 transcriptional coactivators in histone acetylation. *The Journal of biological chemistry* **277**(10), 7989-7995.

Baryshnikova, A., Costanzo, M., Kim, Y., Ding, H., Koh, J., Toufighi, K., Youn, J. Y., Ou, J., San Luis, B. J., Bandyopadhyay, S., Hibbs, M., Hess, D., Gingras, A. C., Bader, G. D., Troyanskaya, O. G., Brown, G. W., Andrews, B., Boone, C. and Myers, C. L. (2010). Quantitative analysis of fitness and genetic interactions in yeast on a genome scale. *Nature methods* **7**(12), 1017-1024.

Baudin, A., Ozier-Kalogeropoulos, O., Denouel, A., Lacroute, F. and Cullin, C. (1993). A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **21**(14), 3329-3330.

Bechet, J., Greenson, M. and Wiame, J. M. (1970). Mutations affecting the repressibility of arginine biosynthetic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *European journal of biochemistry / FEBS* **12**(1), 31-39.

Belotserkovskaya, R., Oh, S., Bondarenko, V. A., Orphanides, G., Studitsky, V. M. and Reinberg, D. (2003). FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. *Science* **301**(5636), 1090-1093.

Belotserkovskaya, R., Sterner, D. E., Deng, M., Sayre, M. H., Lieberman, P. M. and Berger, S. L. (2000). Inhibition of TATA-

Bibliografía

binding protein function by SAGA subunits Spt3 and Spt8 at Gcn4-activated promoters. *Molecular and cellular biology* **20**(2), 634-647.

Bentley, D. L. (2005). Rules of engagement: co-transcriptional recruitment of pre-mRNA processing factors. *Current opinion in cell biology* **17**(3), 251-256.

Berger, S. L. (2002). Histone modifications in transcriptional regulation. *Current opinion in genetics & development* **12**(2), 142-148.

Berger, S. L. (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* **447**(7143), 407-412.

Berger, S. L., Cress, W. D., Cress, A., Triezenberg, S. J. and Guarente, L. (1990). Selective inhibition of activated but not basal transcription by the acidic activation domain of VP16: evidence for transcriptional adaptors. *Cell* **61**(7), 1199-1208.

Bermejo, R., Capra, T., Jossen, R., Colosio, A., Frattini, C., Carotenuto, W., Cocito, A., Doksani, Y., Klein, H., Gomez-Gonzalez, B., Aguilera, A., Katou, Y., Shirahige, K. and Foiani, M. (2011). The replication checkpoint protects fork stability by releasing transcribed genes from nuclear pores. *Cell* **146**(2), 233-246.

Bernstein, B. E., Humphrey, E. L., Erlich, R. L., Schneider, R., Bouman, P., Liu, J. S., Kouzarides, T. and Schreiber, S. L. (2002). Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(13), 8695-8700.

Bhaumik, S. R. (2011). Distinct regulatory mechanisms of eukaryotic transcriptional activation by SAGA and TFIID. *Biochimica et biophysica acta* **1809**(2), 97-108.

Bhaumik, S. R. and Green, M. R. (2002). Differential requirement of SAGA components for recruitment of TATA-box-binding protein to promoters in vivo. *Molecular and cellular biology* **22**(21), 7365-7371.

Bhaumik, S. R. and Malik, S. (2008). Diverse regulatory mechanisms of eukaryotic transcriptional activation by the proteasome complex. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **43**(6), 419-433.

Bian, C., Xu, C., Ruan, J., Lee, K. K., Burke, T. L., Tempel, W., Barsyte, D., Li, J., Wu, M., Zhou, B. O., Fleharty, B. E., Paulson, A., Allali-Hassani, A., Zhou, J. Q., Mer, G., Grant, P. A., Workman, J. L., Zang, J. and Min, J. (2011). Sgf29 binds histone H3K4me2/3 and is required for SAGA complex recruitment and histone H3 acetylation. *The EMBO journal* **30**(14), 2829-2842.

Bibliografía

Blobel, G. (1985). Gene gating: a hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**(24), 8527-8529.

Bon, E., Casaregola, S., Blandin, G., Llorente, B., Neueglise, C., Munsterkotter, M., Guldener, U., Mewes, H. W., Van Helden, J., Dujon, B. and Gaillardin, C. (2003). Molecular evolution of eukaryotic genomes: hemiascomycetous yeast spliceosomal introns. *Nucleic acids research* **31**(4), 1121-1135.

Bostelman, L. J., Keller, A. M., Albrecht, A. M., Arat, A. and Thompson, J. S. (2007). Methylation of histone H3 lysine-79 by Dot1p plays multiple roles in the response to UV damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA repair* **6**(3), 383-395.

Boulton, S. J. and Jackson, S. P. (1996). Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* Ku80 homologue: roles in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance. *Nucleic acids research* **24**(23), 4639-4648.

Boulton, S. J. and Jackson, S. P. (1998). Components of the Ku-dependent non-homologous end-joining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing. *The EMBO journal* **17**(6), 1819-1828.

Braisted, J. C., Kuntumalla, S., Vogel, C., Marcotte, E. M., Rodrigues, A. R., Wang, R., Huang, S. T., Ferlanti, E. S., Saeed, A. I., Fleischmann, R. D., Peterson, S. N. and Pieper, R. (2008). The APEX Quantitative Proteomics Tool: generating protein quantitation estimates from LC-MS/MS proteomics results. *BMC bioinformatics* **9**, 529.

Brasset, E. and Vaury, C. (2005). Insulators are fundamental components of the eukaryotic genomes. *Heredity* **94**(6), 571-576.

Braun, S. and Madhani, H. D. (2012). Shaping the landscape: mechanistic consequences of ubiquitin modification of chromatin. *EMBO reports* **13**(7), 619-630.

Brickner, D. G., Ahmed, S., Meldi, L., Thompson, A., Light, W., Young, M., Hickman, T. L., Chu, F., Fabre, E. and Brickner, J. H. (2012). Transcription factor binding to a DNA zip code controls interchromosomal clustering at the nuclear periphery. *Developmental cell* **22**(6), 1234-1246.

Brickner, D. G., Cajigas, I., Fondufe-Mittendorf, Y., Ahmed, S., Lee, P. C., Widom, J. and Brickner, J. H. (2007). H2A.Z-mediated localization of genes at the nuclear periphery confers epigenetic memory of previous transcriptional state. *PLoS biology* **5**(4), e81.

Bibliografía

Brickner, J. H. and Walter, P. (2004). Gene recruitment of the activated INO1 locus to the nuclear membrane. *PLoS Biol* **2**(11), e342.

Briggs, S. D., Xiao, T., Sun, Z. W., Caldwell, J. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Allis, C. D. and Strahl, B. D. (2002). Gene silencing: trans-histone regulatory pathway in chromatin. *Nature* **418**(6897), 498.

Brown, C. E., Howe, L., Sousa, K., Alley, S. C., Carrozza, M. J., Tan, S. and Workman, J. L. (2001). Recruitment of HAT complexes by direct activator interactions with the ATM-related Tra1 subunit. *Science* **292**(5525), 2333-2337.

Brown, C. R. and Silver, P. A. (2007). Transcriptional regulation at the nuclear pore complex. *Current opinion in genetics & development* **17**(2), 100-106.

Brown, J. M., Green, J., das Neves, R. P., Wallace, H. A., Smith, A. J., Hughes, J., Gray, N., Taylor, S., Wood, W. G., Higgs, D. R., Iborra, F. J. and Buckle, V. J. (2008). Association between active genes occurs at nuclear speckles and is modulated by chromatin environment. *The Journal of cell biology* **182**(6), 1083-1097.

Brown, J. M., Leach, J., Reittie, J. E., Atzberger, A., Lee-Prudhoe, J., Wood, W. G., Higgs, D. R., Iborra, F. J. and Buckle, V. J. (2006). Coregulated human globin genes are frequently in spatial proximity when active. *The Journal of cell biology* **172**(2), 177-187.

Brownell, J. E. and Allis, C. D. (1996). Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Current opinion in genetics & development* **6**(2), 176-184.

Buratowski, S. (2005). Connections between mRNA 3' end processing and transcription termination. *Current opinion in cell biology* **17**(3), 257-261.

Buratowski, S. and Moazed, D. (2005). Gene regulation: expression and silencing coupled. *Nature* **435**(7046), 1174-1175.

Burgess-Beusse, B., Farrell, C., Gaszner, M., Litt, M., Mutskov, V., Recillas-Targa, F., Simpson, M., West, A. and Felsenfeld, G. (2002). The insulation of genes from external enhancers and silencing chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99** Suppl 4, 16433-16437.

Bibliografía

Butler, J. S. and Dent, S. Y. (2012). Chromatin 'resetting' during transcription elongation: a central role for methylated H3K36. *Nature structural & molecular biology* **19**(9), 863-864.

Cabal, G. G., Genovesio, A., Rodriguez-Navarro, S., Zimmer, C., Gadal, O., Lesne, A., Buc, H., Feuerbach-Fournier, F., Olivo-Marin, J. C., Hurt, E. C. and Nehrbass, U. (2006). SAGA interacting factors confine sub-diffusion of transcribed genes to the nuclear envelope. *Nature* **441**(7094), 770-773.

Campos, E. I., Fillingham, J., Li, G., Zheng, H., Voigt, P., Kuo, W. H., Seepany, H., Gao, Z., Day, L. A., Greenblatt, J. F. and Reinberg, D. (2010). The program for processing newly synthesized histones H3.1 and H4. *Nature structural & molecular biology* **17**(11), 1343-1351.

Capelson, M. and Corces, V. G. (2004). Boundary elements and nuclear organization. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **96**(8), 617-629.

Capelson, M., Doucet, C. and Hetzer, M. W. (2010). Nuclear pore complexes: guardians of the nuclear genome. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **75**, 585-597.

Capelson, M. and Hetzer, M. W. (2009). The role of nuclear pores in gene regulation, development and disease. *EMBO reports* **10**(7), 697-705.

Carey, M., Li, B. and Workman, J. L. (2006). RSC exploits histone acetylation to abrogate the nucleosomal block to RNA polymerase II elongation. *Mol Cell* **24**(3), 481-487.

Carrozza, M. J., Li, B., Florens, L., Suganuma, T., Swanson, S. K., Lee, K. K., Shia, W. J., Anderson, S., Yates, J., Washburn, M. P. and Workman, J. L. (2005). Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription. *Cell* **123**(4), 581-592.

Casolari, J. M., Brown, C. R., Drubin, D. A., Rando, O. J. and Silver, P. A. (2005). Developmentally induced changes in transcriptional program alter spatial organization across chromosomes. *Genes Dev* **19**(10), 1188-1198.

Casolari, J. M., Brown, C. R., Komili, S., West, J., Hieronymus, H. and Silver, P. A. (2004). Genome-wide localization of the nuclear transport machinery couples transcriptional status and nuclear organization. *Cell* **117**(4), 427-439.

Cavalli, G. and Thoma, F. (1993). Chromatin transitions during activation and repression of galactose-regulated genes in yeast. *The EMBO journal* **12**(12), 4603-4613.

Bibliografía

Cervantes, R. B. and Lundblad, V. (2002). Mechanisms of chromosome-end protection. *Current opinion in cell biology* **14**(3), 351-356.

Clarke, A. S., Lowell, J. E., Jacobson, S. J. and Pillus, L. (1999). Esa1p is an essential histone acetyltransferase required for cell cycle progression. *Molecular and cellular biology* **19**(4), 2515-2526.

Cole, C. N. and Scarcelli, J. J. (2006). Transport of messenger RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Current opinion in cell biology* **18**(3), 299-306.

Costanzo, M., Baryshnikova, A., Bellay, J., Kim, Y., Spear, E. D., Sevier, C. S., Ding, H., Koh, J. L., Toufighi, K., Mostafavi, S., Prinz, J., St Onge, R. P., VanderSluis, B., Makhnevych, T., Vizeacoumar, F. J., Alizadeh, S., Bahr, S., Brost, R. L., Chen, Y., Cokol, M., Deshpande, R., Li, Z., Lin, Z. Y., Liang, W., Marback, M., Paw, J., San Luis, B. J., Shuteriqi, E., Tong, A. H., van Dyk, N., Wallace, I. M., Whitney, J. A., Weirauch, M. T., Zhong, G., Zhu, H., Houry, W. A., Brudno, M., Ragibizadeh, S., Papp, B., Pal, C., Roth, F. P., Giaever, G., Nislow, C., Troyanskaya, O. G., Bussey, H., Bader, G. D., Gingras, A. C., Morris, Q. D., Kim, P. M., Kaiser, C. A., Myers, C. L., Andrews, B. J. and Boone, C. (2010). The genetic landscape of a cell. *Science* **327**(5964), 425-431.

Coux, O. (2002). The 26S proteasome. *Progress in molecular and subcellular biology* **29**, 85-107.

Crabeel, M., de Rijcke, M., Seneca, S., Heimberg, H., Pfeiffer, I. and Matisova, A. (1995). Further definition of the sequence and position requirements of the arginine control element that mediates repression and induction by arginine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **11**(14), 1367-1380.

Crabeel, M., Lavallo, R. and Glansdorff, N. (1990). Arginine-specific repression in *Saccharomyces cerevisiae*: kinetic data on ARG1 and ARG3 mRNA transcription and stability support a transcriptional control mechanism. *Molecular and cellular biology* **10**(3), 1226-1233.

Crisucci, E. M. and Arndt, K. M. (2012). Paf1 restricts Gcn4 occupancy and antisense transcription at the ARG1 promoter. *Molecular and cellular biology* **32**(6), 1150-1163.

Cronshaw, J. M., Krutchinsky, A. N., Zhang, W., Chait, B. T. and Matunis, M. J. (2002). Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J Cell Biol* **158**(5), 915-927.

Bibliografía

Cuenca-Bono, B., Garcia-Molinero, V., Pascual-Garcia, P., Dopazo, H., Llopis, A., Vilardell, J. and Rodriguez-Navarro, S. (2011). SUS1 introns are required for efficient mRNA nuclear export in yeast. *Nucleic acids research* **39**(19), 8599-8611.

Cuenca-Bono, B., Garcia-Molinero, V., Pascual-Garcia, P., Garcia-Oliver, E., Llopis, A. and Rodriguez-Navarro, S. (2010). A novel link between Sus1 and the cytoplasmic mRNA decay machinery suggests a broad role in mRNA metabolism. *BMC cell biology* **11**, 19.

Cuthbert, G. L., Daujat, S., Snowden, A. W., Erdjument-Bromage, H., Hagiwara, T., Yamada, M., Schneider, R., Gregory, P. D., Tempst, P., Bannister, A. J. and Kouzarides, T. (2004). Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* **118**(5), 545-553.

Chan, A., Boule, J. B. and Zakian, V. A. (2008). Two pathways recruit telomerase to *Saccharomyces cerevisiae* telomeres. *PLoS genetics* **4**(10), e1000236.

Chandrasekharan, M. B., Huang, F. and Sun, Z. W. (2009). Ubiquitination of histone H2B regulates chromatin dynamics by enhancing nucleosome stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**(39), 16686-16691.

Chandy, M., Gutierrez, J. L., Prochasson, P. and Workman, J. L. (2006). SWI/SNF displaces SAGA-acetylated nucleosomes. *Eukaryot Cell* **5**(10), 1738-1747.

Chavez, S. and Aguilera, A. (1997). The yeast HPR1 gene has a functional role in transcriptional elongation that uncovers a novel source of genome instability. *Genes Dev* **11**(24), 3459-3470.

Chawla, R. and Azzalin, C. M. (2008). The telomeric transcriptome and SMG proteins at the crossroads. *Cytogenetic and genome research* **122**(3-4), 194-201.

Chekanova, J. A., Abruzzi, K. C., Rosbash, M. and Belostotsky, D. A. (2008). Sus1, Sac3, and Thp1 mediate post-transcriptional tethering of active genes to the nuclear rim as well as to non-nascent mRNP. *RNA* **14**(1), 66-77.

Chimura, T., Kuzuhara, T. and Horikoshi, M. (2002). Identification and characterization of CIA/ASF1 as an interactor of bromodomains associated with TFIID. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(14), 9334-9339.

Choi, J. K., Grimes, D. E., Rowe, K. M. and Howe, L. J. (2008). Acetylation of Rsc4p by Gcn5p is essential in the absence of

Bibliografía

histone H3 acetylation. *Molecular and cellular biology* **28**(23), 6967-6972.

Dahlseid, J. N., Lew-Smith, J., Lelivelt, M. J., Enomoto, S., Ford, A., Desruisseaux, M., McClellan, M., Lue, N., Culbertson, M. R. and Berman, J. (2003). mRNAs encoding telomerase components and regulators are controlled by UPF genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic cell* **2**(1), 134-142.

Daniel, J. A. and Grant, P. A. (2007). Multi-tasking on chromatin with the SAGA coactivator complexes. *Mutation research* **618**(1-2), 135-148.

Daniel, J. A., Torok, M. S., Sun, Z. W., Schieltz, D., Allis, C. D., Yates, J. R., 3rd and Grant, P. A. (2004). Deubiquitination of histone H2B by a yeast acetyltransferase complex regulates transcription. *J Biol Chem* **279**(3), 1867-1871.

Davie, J. K., Edmondson, D. G., Coco, C. B. and Dent, S. Y. (2003). Tup1-Ssn6 interacts with multiple class I histone deacetylases in vivo. *The Journal of biological chemistry* **278**(50), 50158-50162.

Delforge, J., Messenguy, F. and Wiame, J. M. (1975). The regulation of arginine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. The specificity of argR- mutations and the general control of amino-acid biosynthesis. *European journal of biochemistry / FEBS* **57**(1), 231-239.

Dembla-Rajpal, N., Seipelt, R., Wang, Q. and Rymond, B. C. (2004). Proteasome inhibition alters the transcription of multiple yeast genes. *Biochimica et biophysica acta* **1680**(1), 34-45.

Dieppois, G., Iglesias, N. and Stutz, F. (2006). Cotranscriptional recruitment to the mRNA export receptor Mex67p contributes to nuclear pore anchoring of activated genes. *Molecular and cellular biology* **26**(21), 7858-7870.

Dieppois, G. and Stutz, F. (2010). Connecting the transcription site to the nuclear pore: a multi-tether process that regulates gene expression. *Journal of cell science* **123**(Pt 12), 1989-1999.

Dover, J., Schneider, J., Tawiah-Boateng, M. A., Wood, A., Dean, K., Johnston, M. and Shilatifard, A. (2002). Methylation of histone H3 by COMPASS requires ubiquitination of histone H2B by Rad6. *The Journal of biological chemistry* **277**(32), 28368-28371.

Doyon, Y. and Cote, J. (2004). The highly conserved and multifunctional NuA4 HAT complex. *Current opinion in genetics & development* **14**(2), 147-154.

Bibliografía

Drouin, S., Laramee, L., Jacques, P. E., Forest, A., Bergeron, M. and Robert, F. (2010). DSIF and RNA polymerase II CTD phosphorylation coordinate the recruitment of Rpd3S to actively transcribed genes. *PLoS genetics* **6**(10), e1001173.

Du, H. N. and Briggs, S. D. (2010). A nucleosome surface formed by histone H4, H2A, and H3 residues is needed for proper histone H3 Lys36 methylation, histone acetylation, and repression of cryptic transcription. *The Journal of biological chemistry* **285**(15), 11704-11713.

Du, H. N., Fingerman, I. M. and Briggs, S. D. (2008). Histone H3 K36 methylation is mediated by a trans-histone methylation pathway involving an interaction between Set2 and histone H4. *Genes & development* **22**(20), 2786-2798.

Dubois, E., Bercy, J. and Messenguy, F. (1987). Characterization of two genes, ARGRI and ARGRIII required for specific regulation of arginine metabolism in yeast. *Molecular & general genetics : MGG* **207**(1), 142-148.

Dubrana, K., Perrod, S. and Gasser, S. M. (2001). Turning telomeres off and on. *Current opinion in cell biology* **13**(3), 281-289.

Dynlacht, B. D., Hoey, T. and Tjian, R. (1991). Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation. *Cell* **66**(3), 563-576.

Egecioglu, D. and Brickner, J. H. (2011). Gene positioning and expression. *Current opinion in cell biology* **23**(3), 338-345.

Egloff, S., Dienstbier, M. and Murphy, S. (2012). Updating the RNA polymerase CTD code: adding gene-specific layers. *Trends in genetics : TIG* **28**(7), 333-341.

Ehrentraut, S., Hassler, M., Oppikofer, M., Kueng, S., Weber, J. M., Mueller, J. W., Gasser, S. M., Ladurner, A. G. and Ehrenhofer-Murray, A. E. (2011). Structural basis for the role of the Sir3 AAA+ domain in silencing: interaction with Sir4 and unmethylated histone H3K79. *Genes & development* **25**(17), 1835-1846.

El Bakkoury, M., Dubois, E. and Messenguy, F. (2000). Recruitment of the yeast MADS-box proteins, ArgRI and Mcm1 by the pleiotropic factor ArgRIII is required for their stability. *Molecular microbiology* **35**(1), 15-31.

Ellisdon, A. M., Dimitrova, L., Hurt, E. and Stewart, M. (2012). Structural basis for the assembly and nucleic acid binding of the TREX-2 transcription-export complex. *Nature structural & molecular biology* **19**(3), 328-336.

Bibliografía

Ellisdon, A. M. and Stewart, M. (2012). Structural biology of the PCI-protein fold. *Bioarchitecture* **2**(4).

Emili, A., Schieltz, D. M., Yates, J. R., 3rd and Hartwell, L. H. (2001). Dynamic interaction of DNA damage checkpoint protein Rad53 with chromatin assembly factor Asf1. *Molecular cell* **7**(1), 13-20.

Emre, N. C., Ingvarsdottir, K., Wyce, A., Wood, A., Krogan, N. J., Henry, K. W., Li, K., Marmorstein, R., Greenblatt, J. F., Shilatifard, A. and Berger, S. L. (2005). Maintenance of low histone ubiquitylation by Ubp10 correlates with telomere-proximal Sir2 association and gene silencing. *Molecular cell* **17**(4), 585-594.

Enenkel, C., Lehmann, A. and Kloetzel, P. M. (1999). GFP-labelling of 26S proteasomes in living yeast: insight into proteasomal functions at the nuclear envelope/rough ER. *Molecular biology reports* **26**(1-2), 131-135.

Enomoto, S., Glowczewski, L., Lew-Smith, J. and Berman, J. G. (2004). Telomere cap components influence the rate of senescence in telomerase-deficient yeast cells. *Molecular and cellular biology* **24**(2), 837-845.

Eriksson, P. R., Ganguli, D., Nagarajavel, V. and Clark, D. J. (2012). Regulation of histone gene expression in budding yeast. *Genetics* **191**(1), 7-20.

Erokhin, M., Parshikov, A., Georgiev, P. and Chetverina, D. (2010). E(y)2/Sus1 is required for blocking PRE silencing by the Wari insulator in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* **119**(3), 243-253.

Estruch, F. and Cole, C. N. (2003). An early function during transcription for the yeast mRNA export factor Dbp5p/Rat8p suggested by its genetic and physical interactions with transcription factor IIH components. *Mol Biol Cell* **14**(4), 1664-1676.

Faza, M. B., Kemmler, S., Jimeno, S., Gonzalez-Aguilera, C., Aguilera, A., Hurt, E. and Panse, V. G. (2009). Sem1 is a functional component of the nuclear pore complex-associated messenger RNA export machinery. *The Journal of cell biology* **184**(6), 833-846.

Faza, M. B., Kemmler, S. and Panse, V. G. (2010). Sem1: a versatile "molecular glue"? *Nucleus* **1**(1), 12-17.

Fedor, M. J. and Kornberg, R. D. (1989). Upstream activation sequence-dependent alteration of chromatin structure and transcription activation of the yeast GAL1-GAL10 genes. *Molecular and cellular biology* **9**(4), 1721-1732.

Bibliografía

Felsenfeld, G. (2003). Quantitative approaches to problems of eukaryotic gene expression. *Biophysical chemistry* **100**(1-3), 607-613.

Feng, Q., Wang, H., Ng, H. H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Struhl, K. and Zhang, Y. (2002). Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. *Current biology : CB* **12**(12), 1052-1058.

Ferdous, A., Sikder, D., Gillette, T., Nalley, K., Kodadek, T. and Johnston, S. A. (2007). The role of the proteasomal ATPases and activator monoubiquitylation in regulating Gal4 binding to promoters. *Genes & development* **21**(1), 112-123.

Ferreira, H. C., Luke, B., Schober, H., Kalck, V., Lingner, J. and Gasser, S. M. (2011). The PIAS homologue Siz2 regulates perinuclear telomere position and telomerase activity in budding yeast. *Nature cell biology* **13**(7), 867-874.

Feuerbach, F., Galy, V., Trelles-Sticken, E., Fromont-Racine, M., Jacquier, A., Gilson, E., Olivo-Marin, J. C., Scherthan, H. and Nehrbass, U. (2002). Nuclear architecture and spatial positioning help establish transcriptional states of telomeres in yeast. *Nature cell biology* **4**(3), 214-221.

Feuerhahn, S., Iglesias, N., Panza, A., Porro, A. and Lingner, J. (2010). TERRA biogenesis, turnover and implications for function. *FEBS letters* **584**(17), 3812-3818.

Fierz, B., Chatterjee, C., McGinty, R. K., Bar-Dagan, M., Raleigh, D. P. and Muir, T. W. (2011). Histone H2B ubiquitylation disrupts local and higher-order chromatin compaction. *Nature chemical biology* **7**(2), 113-119.

Fischer, T., Rodriguez-Navarro, S., Pereira, G., Racz, A., Schiebel, E. and Hurt, E. (2004). Yeast centrin Cdc31 is linked to the nuclear mRNA export machinery. *Nature cell biology* **6**(9), 840-848.

Fischer, T., Strasser, K., Racz, A., Rodriguez-Navarro, S., Oppizzi, M., Ihrig, P., Lechner, J. and Hurt, E. (2002). The mRNA export machinery requires the novel Sac3p-Thp1p complex to dock at the nucleoplasmic entrance of the nuclear pores. *The EMBO journal* **21**(21), 5843-5852.

Fisher, T. S. and Zakian, V. A. (2005). Ku: a multifunctional protein involved in telomere maintenance. *DNA repair* **4**(11), 1215-1226.

Fleming, A. B., Kao, C. F., Hillyer, C., Pikaart, M. and Osley, M. A. (2008). H2B ubiquitylation plays a role in nucleosome dynamics during transcription elongation. *Mol Cell* **31**(1), 57-66.

Bibliografía

Fleming, J. A., Lightcap, E. S., Sadis, S., Thoroddsen, V., Bulawa, C. E. and Blackman, R. K. (2002). Complementary whole-genome technologies reveal the cellular response to proteasome inhibition by PS-341. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(3), 1461-1466.

Fuchs, S. M., Laribee, R. N. and Strahl, B. D. (2009). Protein modifications in transcription elongation. *Biochimica et biophysica acta* **1789**(1), 26-36.

Funakoshi, M., Li, X., Velichutina, I., Hochstrasser, M. and Kobayashi, H. (2004). Sem1, the yeast ortholog of a human BRCA2-binding protein, is a component of the proteasome regulatory particle that enhances proteasome stability. *Journal of cell science* **117**(Pt 26), 6447-6454.

Galy, V., Gadal, O., Fromont-Racine, M., Romano, A., Jacquier, A. and Nehrbass, U. (2004). Nuclear retention of unspliced mRNAs in yeast is mediated by perinuclear Mlp1. *Cell* **116**(1), 63-73.

Galy, V., Olivo-Marin, J. C., Scherthan, H., Doye, V., Rascalou, N. and Nehrbass, U. (2000). Nuclear pore complexes in the organization of silent telomeric chromatin. *Nature* **403**(6765), 108-112.

Gallardo, M., Luna, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Aguilera, A. (2003). Nab2p and the Thp1p-Sac3p complex functionally interact at the interface between transcription and mRNA metabolism. *The Journal of biological chemistry* **278**(26), 24225-24232.

Garcia-Oliver, E., Garcia-Molinero, V. and Rodriguez-Navarro, S. (2012). mRNA export and gene expression: The SAGA-TREX-2 connection. *Biochimica et biophysica acta* **1819**(6), 555-565.

Gardner, R. G., Nelson, Z. W. and Gottschling, D. E. (2005). Ubp10/Dot4p regulates the persistence of ubiquitinated histone H2B: distinct roles in telomeric silencing and general chromatin. *Molecular and cellular biology* **25**(14), 6123-6139.

Gatbonton, T., Imbesi, M., Nelson, M., Akey, J. M., Ruderfer, D. M., Kruglyak, L., Simon, J. A. and Bedalov, A. (2006). Telomere length as a quantitative trait: genome-wide survey and genetic mapping of telomere length-control genes in yeast. *PLoS genetics* **2**(3), e35.

Geisler, S., Lojek, L., Khalil, A. M., Baker, K. E. and Collier, J. (2012). Decapping of long noncoding RNAs regulates inducible genes. *Molecular cell* **45**(3), 279-291.

Bibliografía

Georgakopoulos, T., Gounalaki, N. and Thireos, G. (1995). Genetic evidence for the interaction of the yeast transcriptional co-activator proteins GCN5 and ADA2. *Molecular & general genetics : MGG* **246**(6), 723-728.

Gerasimova, T. I., Byrd, K. and Corces, V. G. (2000). A chromatin insulator determines the nuclear localization of DNA. *Molecular cell* **6**(5), 1025-1035.

Giannattasio, M., Lazzaro, F., Plevani, P. and Muzi-Falconi, M. (2005). The DNA damage checkpoint response requires histone H2B ubiquitination by Rad6-Bre1 and H3 methylation by Dot1. *The Journal of biological chemistry* **280**(11), 9879-9886.

Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, A. R. and Woods, R. A. (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* **11**(4), 355-360.

Gietz, R. D. and Sugino, A. (1988). New yeast-Escherichia coli shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **74**(2), 527-534.

Gillette, T. G., Gonzalez, F., Delahodde, A., Johnston, S. A. and Kodadek, T. (2004). Physical and functional association of RNA polymerase II and the proteasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(16), 5904-5909.

Ginsburg, D. S., Govind, C. K. and Hinnebusch, A. G. (2009). NuA4 lysine acetyltransferase Esa1 is targeted to coding regions and stimulates transcription elongation with Gcn5. *Molecular and cellular biology* **29**(24), 6473-6487.

Glickman, M. H., Rubin, D. M., Fu, H., Larsen, C. N., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Vierstra, R., Baumeister, W., Fried, V. and Finley, D. (1999). Functional analysis of the proteasome regulatory particle. *Molecular biology reports* **26**(1-2), 21-28.

Gonzalez-Aguilera, C., Tous, C., Gomez-Gonzalez, B., Huertas, P., Luna, R. and Aguilera, A. (2008). The THP1-SAC3-SUS1-CDC31 complex works in transcription elongation-mRNA export preventing RNA-mediated genome instability. *Molecular biology of the cell* **19**(10), 4310-4318.

Govind, C. K., Qiu, H., Ginsburg, D. S., Ruan, C., Hofmeyer, K., Hu, C., Swaminathan, V., Workman, J. L., Li, B. and Hinnebusch, A. G. (2010). Phosphorylated Pol II CTD recruits multiple HDACs, including Rpd3C(S), for methylation-dependent deacetylation of ORF nucleosomes. *Molecular cell* **39**(2), 234-246.

Bibliografía

Govind, C. K., Yoon, S., Qiu, H., Govind, S. and Hinnebusch, A. G. (2005). Simultaneous recruitment of coactivators by Gcn4p stimulates multiple steps of transcription in vivo. *Molecular and cellular biology* **25**(13), 5626-5638.

Govind, C. K., Zhang, F., Qiu, H., Hofmeyer, K. and Hinnebusch, A. G. (2007). Gcn5 promotes acetylation, eviction, and methylation of nucleosomes in transcribed coding regions. *Molecular cell* **25**(1), 31-42.

Grant, P. A., Duggan, L., Cote, J., Roberts, S. M., Brownell, J. E., Candau, R., Ohba, R., Owen-Hughes, T., Allis, C. D., Winston, F., Berger, S. L. and Workman, J. L. (1997). Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes & development* **11**(13), 1640-1650.

Grant, P. A., Schieltz, D., Pray-Grant, M. G., Steger, D. J., Reese, J. C., Yates, J. R., 3rd and Workman, J. L. (1998). A subset of TAF(II)s are integral components of the SAGA complex required for nucleosome acetylation and transcriptional stimulation. *Cell* **94**(1), 45-53.

Gravel, S., Larrivee, M., Labrecque, P. and Wellinger, R. J. (1998). Yeast Ku as a regulator of chromosomal DNA end structure. *Science* **280**(5364), 741-744.

Green, D. M., Johnson, C. P., Hagan, H. and Corbett, A. H. (2003). The C-terminal domain of myosin-like protein 1 (Mlp1p) is a docking site for heterogeneous nuclear ribonucleoproteins that are required for mRNA export. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(3), 1010-1015.

Green, E. M., Antczak, A. J., Bailey, A. O., Franco, A. A., Wu, K. J., Yates, J. R., 3rd and Kaufman, P. D. (2005). Replication-independent histone deposition by the HIR complex and Asf1. *Current biology : CB* **15**(22), 2044-2049.

Green, E. M., Jiang, Y., Joyner, R. and Weis, K. (2012). A negative feedback loop at the nuclear periphery regulates GAL gene expression. *Molecular biology of the cell* **23**(7), 1367-1375.

Gunjan, A. and Verreault, A. (2003). A Rad53 kinase-dependent surveillance mechanism that regulates histone protein levels in *S. cerevisiae*. *Cell* **115**(5), 537-549.

Hampsey, M., Singh, B. N., Ansari, A., Laine, J. P. and Krishnamurthy, S. (2011). Control of eukaryotic gene expression: gene loops and transcriptional memory. *Advances in enzyme regulation* **51**(1), 118-125.

Bibliografía

Han, M. and Grunstein, M. (1988). Nucleosome loss activates yeast downstream promoters in vivo. *Cell* **55**(6), 1137-1145.

Hansen, J. C. (2002). Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **31**, 361-392.

Hediger, F., Berthiau, A. S., van Houwe, G., Gilson, E. and Gasser, S. M. (2006). Subtelomeric factors antagonize telomere anchoring and Tel1-independent telomere length regulation. *The EMBO journal* **25**(4), 857-867.

Hediger, F., Dubrana, K. and Gasser, S. M. (2002). Myosin-like proteins 1 and 2 are not required for silencing or telomere anchoring, but act in the Tel1 pathway of telomere length control. *Journal of structural biology* **140**(1-3), 79-91.

Hediger, F. and Gasser, S. M. (2002). Nuclear organization and silencing: putting things in their place. *Nature cell biology* **4**(3), E53-55.

Helmlinger, D., Hardy, S., Sasorith, S., Klein, F., Robert, F., Weber, C., Miguet, L., Potier, N., Van-Dorsselaer, A., Wurtz, J. M., Mandel, J. L., Tora, L. and Devys, D. (2004). Ataxin-7 is a subunit of GCN5 histone acetyltransferase-containing complexes. *Human molecular genetics* **13**(12), 1257-1265.

Helmlinger, D., Marguerat, S., Villen, J., Gygi, S. P., Bahler, J. and Winston, F. (2008). The *S. pombe* SAGA complex controls the switch from proliferation to sexual differentiation through the opposing roles of its subunits Gcn5 and Spt8. *Genes & development* **22**(22), 3184-3195.

Henry, K. W., Wyce, A., Lo, W. S., Duggan, L. J., Emre, N. C., Kao, C. F., Pillus, L., Shilatfard, A., Osley, M. A. and Berger, S. L. (2003). Transcriptional activation via sequential histone H2B ubiquitylation and deubiquitylation, mediated by SAGA-associated Ubp8. *Genes Dev* **17**(21), 2648-2663.

Hinnebusch, A. G. (1986). Multiple levels of gene regulation in the control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **5**(2), 57-62.

Hodge, C. A., Colot, H. V., Stafford, P. and Cole, C. N. (1999). Rat8p/Dbp5p is a shuttling transport factor that interacts with Rat7p/Nup159p and Gle1p and suppresses the mRNA export defect of xpo1-1 cells. *Embo J* **18**(20), 5778-5788.

Bibliografía

Hossain, M. A., Claggett, J. M., Nguyen, T. and Johnson, T. L. (2009). The cap binding complex influences H2B ubiquitination by facilitating splicing of the SUS1 pre-mRNA. *RNA* **15**(8), 1515-1527.

Hossain, M. A., Rodriguez, C. M. and Johnson, T. L. (2011). Key features of the two-intron *Saccharomyces cerevisiae* gene SUS1 contribute to its alternative splicing. *Nucleic acids research* **39**(19), 8612-8627.

Houseley, J., Rubbi, L., Grunstein, M., Tollervey, D. and Vogelauer, M. (2008). A ncRNA modulates histone modification and mRNA induction in the yeast GAL gene cluster. *Molecular cell* **32**(5), 685-695.

Hu, F., Alcasabas, A. A. and Elledge, S. J. (2001). Asf1 links Rad53 to control of chromatin assembly. *Genes & development* **15**(9), 1061-1066.

Huisinga, K. L. and Pugh, B. F. (2004). A genome-wide housekeeping role for TFIID and a highly regulated stress-related role for SAGA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular cell* **13**(4), 573-585.

Hwang, W. W., Venkatasubrahmanyam, S., Ianculescu, A. G., Tong, A., Boone, C. and Madhani, H. D. (2003). A conserved RING finger protein required for histone H2B monoubiquitination and cell size control. *Mol Cell* **11**(1), 261-266.

Hymes, J., Fleischhauer, K. and Wolf, B. (1995). Biotinylation of biotinidase following incubation with biocytin. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **233**(1-2), 39-45.

Iglesias, N., Redon, S., Pfeiffer, V., Dees, M., Lingner, J. and Luke, B. (2011). Subtelomeric repetitive elements determine TERRA regulation by Rap1/Rif and Rap1/Sir complexes in yeast. *EMBO reports* **12**(6), 587-593.

Ingvarsdottir, K., Krogan, N. J., Emre, N. C., Wyce, A., Thompson, N. J., Emili, A., Hughes, T. R., Greenblatt, J. F. and Berger, S. L. (2005). H2B ubiquitin protease Ubp8 and Sgf11 constitute a discrete functional module within the *Saccharomyces cerevisiae* SAGA complex. *Molecular and cellular biology* **25**(3), 1162-1172.

Ishii, K., Arib, G., Lin, C., Van Houwe, G. and Laemmli, U. K. (2002). Chromatin boundaries in budding yeast: the nuclear pore connection. *Cell* **109**(5), 551-562.

Bibliografía

Isken, O. and Maquat, L. E. (2007). Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. *Genes & development* **21**(15), 1833-1856.

Jacobson, S. and Pillus, L. (2009). The SAGA subunit Ada2 functions in transcriptional silencing. *Molecular and cellular biology* **29**(22), 6033-6045.

Jani, D., Lutz, S., Marshall, N. J., Fischer, T., Kohler, A., Ellisdon, A. M., Hurt, E. and Stewart, M. (2009). Sus1, Cdc31, and the Sac3 CID region form a conserved interaction platform that promotes nuclear pore association and mRNA export. *Molecular cell* **33**(6), 727-737.

Jani, D., Lutz, S., Marshall, N. J., Fischer, T., Köhler, A., Ellisdon, A. M., Hurt, E. and Stewart, M. (2009). Sus1, Cdc31, and the Sac3 CID region form a conserved interaction platform that promotes nuclear pore association and mRNA export. *Molecular Cell* **33**(6), 727-737.

Jenuwein, T. and Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science* **293**(5532), 1074-1080.

Johnston, M. (1987). A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological reviews* **51**(4), 458-476.

Joshi, A. A. and Struhl, K. (2005). Eaf3 chromodomain interaction with methylated H3-K36 links histone deacetylation to Pol II elongation. *Molecular cell* **20**(6), 971-978.

Juneau, K., Palm, C., Miranda, M. and Davis, R. W. (2007). High-density yeast-tiling array reveals previously undiscovered introns and extensive regulation of meiotic splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**(5), 1522-1527.

Kastenmayer, J. P., Ni, L., Chu, A., Kitchen, L. E., Au, W. C., Yang, H., Carter, C. D., Wheeler, D., Davis, R. W., Boeke, J. D., Snyder, M. A. and Basrai, M. A. (2006). Functional genomics of genes with small open reading frames (sORFs) in *S. cerevisiae*. *Genome Res* **16**(3), 365-373.

Keogh, M. C., Kurdistani, S. K., Morris, S. A., Ahn, S. H., Podolny, V., Collins, S. R., Schuldiner, M., Chin, K., Punna, T., Thompson, N. J., Boone, C., Emili, A., Weissman, J. S., Hughes, T. R., Strahl, B. D., Grunstein, M., Greenblatt, J. F., Buratowski, S. and Krogan, N. J. (2005). Cotranscriptional set2 methylation of histone H3 lysine 36 recruits a repressive Rpd3 complex. *Cell* **123**(4), 593-605.

Bibliografía

Kervestin, S. and Jacobson, A. (2012). NMD: a multifaceted response to premature translational termination. *Nature reviews. Molecular cell biology* **13**(11), 700-712.

Kim, J. H., Saraf, A., Florens, L., Washburn, M. and Workman, J. L. (2010). Gcn5 regulates the dissociation of SWI/SNF from chromatin by acetylation of Swi2/Snf2. *Genes & development* **24**(24), 2766-2771.

Kim, S., Ohkuni, K., Couplan, E. and Jazwinski, S. M. (2004). The histone acetyltransferase GCN5 modulates the retrograde response and genome stability determining yeast longevity. *Biogerontology* **5**(5), 305-316.

Kimura, A., Umehara, T. and Horikoshi, M. (2002). Chromosomal gradient of histone acetylation established by Sas2p and Sir2p functions as a shield against gene silencing. *Nature genetics* **32**(3), 370-377.

Kleff, S., Andrulis, E. D., Anderson, C. W. and Sternglanz, R. (1995). Identification of a gene encoding a yeast histone H4 acetyltransferase. *The Journal of biological chemistry* **270**(42), 24674-24677.

Koh, J. L., Ding, H., Costanzo, M., Baryshnikova, A., Toufighi, K., Bader, G. D., Myers, C. L., Andrews, B. J. and Boone, C. (2010). DRYGIN: a database of quantitative genetic interaction networks in yeast. *Nucleic acids research* **38**(Database issue), D502-507.

Kohler, A. and Hurt, E. (2007). Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**(10), 761-773.

Kohler, A. and Hurt, E. (2010). Gene regulation by nucleoporins and links to cancer. *Molecular cell* **38**(1), 6-15.

Kohler, A., Pascual-Garcia, P., Llopis, A., Zapater, M., Posas, F., Hurt, E. and Rodriguez-Navarro, S. (2006). The mRNA export factor Sus1 is involved in Spt/Ada/Gcn5 acetyltransferase-mediated H2B deubiquitinylation through its interaction with Ubp8 and Sgf11. *Molecular biology of the cell* **17**(10), 4228-4236.

Kohler, A., Schneider, M., Cabal, G. G., Nehrbass, U. and Hurt, E. (2008). Yeast Ataxin-7 links histone deubiquitination with gene gating and mRNA export. *Nature cell biology* **10**(6), 707-715.

Kohler, A., Zimmerman, E., Schneider, M., Hurt, E. and Zheng, N. (2010). Structural basis for assembly and activation of the heterotetrameric SAGA histone H2B deubiquitinase module. *Cell* **141**(4), 606-617.

Bibliografía

Kornberg, R. D. (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* **184**(4139), 868-871.

Koutelou, E., Hirsch, C. L. and Dent, S. Y. (2010). Multiple faces of the SAGA complex. *Current opinion in cell biology* **22**(3), 374-382.

Koyama, H., Itoh, M., Miyahara, K. and Tsuchiya, E. (2002). Abundance of the RSC nucleosome-remodeling complex is important for the cells to tolerate DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **531**(2), 215-221.

Krebs, J. E. (2007). Moving marks: dynamic histone modifications in yeast. *Molecular bioSystems* **3**(9), 590-597.

Krebs, J. E., Kuo, M. H., Allis, C. D. and Peterson, C. L. (1999). Cell cycle-regulated histone acetylation required for expression of the yeast HO gene. *Genes & development* **13**(11), 1412-1421.

Krogan, N. J., Dover, J., Wood, A., Schneider, J., Heidt, J., Boateng, M. A., Dean, K., Ryan, O. W., Golshani, A., Johnston, M., Greenblatt, J. F. and Shilatifard, A. (2003). The Paf1 complex is required for histone H3 methylation by COMPASS and Dot1p: linking transcriptional elongation to histone methylation. *Molecular cell* **11**(3), 721-729.

Krogan, N. J., Kim, M., Ahn, S. H., Zhong, G., Kobor, M. S., Cagney, G., Emili, A., Shilatifard, A., Buratowski, S. and Greenblatt, J. F. (2002). RNA polymerase II elongation factors of *Saccharomyces cerevisiae*: a targeted proteomics approach. *Mol Cell Biol* **22**(20), 6979-6992.

Krogan, N. J., Kim, M., Tong, A., Golshani, A., Cagney, G., Canadien, V., Richards, D. P., Beattie, B. K., Emili, A., Boone, C., Shilatifard, A., Buratowski, S. and Greenblatt, J. (2003). Methylation of histone H3 by Set2 in *Saccharomyces cerevisiae* is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* **23**(12), 4207-4218.

Kuntumalla, S., Braisted, J. C., Huang, S. T., Parmar, P. P., Clark, D. J., Alami, H., Zhang, Q., Donohue-Rolfe, A., Tzipori, S., Fleischmann, R. D., Peterson, S. N. and Pieper, R. (2009). Comparison of two label-free global quantitation methods, APEX and 2D gel electrophoresis, applied to the *Shigella dysenteriae* proteome. *Proteome science* **7**, 22.

Kuo, M. H., Brownell, J. E., Sobel, R. E., Ranalli, T. A., Cook, R. G., Edmondson, D. G., Roth, S. Y. and Allis, C. D. (1996). Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines. *Nature* **383**(6597), 269-272.

Bibliografía

Kurshakova, M., Maksimenko, O., Golovnin, A., Pulina, M., Georgieva, S., Georgiev, P. and Krasnov, A. (2007). Evolutionarily conserved E(y)2/Sus1 protein is essential for the barrier activity of Su(Hw)-dependent insulators in *Drosophila*. *Molecular cell* **27**(2), 332-338.

Kurshakova, M. M., Krasnov, A. N., Kopytova, D. V., Shidlovskii, Y. V., Nikolenko, J. V., Nabirochkina, E. N., Spehner, D., Schultz, P., Tora, L. and Georgieva, S. G. (2007). SAGA and a novel *Drosophila* export complex anchor efficient transcription and mRNA export to NPC. *The EMBO journal* **26**(24), 4956-4965.

Kwak, J., Workman, J. L. and Lee, D. (2011). The proteasome and its regulatory roles in gene expression. *Biochimica et biophysica acta* **1809**(2), 88-96.

Laine, J. P., Singh, B. N., Krishnamurthy, S. and Hampsey, M. (2009). A physiological role for gene loops in yeast. *Genes & development* **23**(22), 2604-2609.

Lanctot, C., Cheutin, T., Cremer, M., Cavalli, G. and Cremer, T. (2007). Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nature reviews. Genetics* **8**(2), 104-115.

Larabee, R. N., Krogan, N. J., Xiao, T., Shibata, Y., Hughes, T. R., Greenblatt, J. F. and Strahl, B. D. (2005). BUR kinase selectively regulates H3 K4 trimethylation and H2B ubiquitylation through recruitment of the PAF elongation complex. *Current biology : CB* **15**(16), 1487-1493.

Larschan, E. and Winston, F. (2001). The *S. cerevisiae* SAGA complex functions in vivo as a coactivator for transcriptional activation by Gal4. *Genes & development* **15**(15), 1946-1956.

Larsen, C. N. and Finley, D. (1997). Protein translocation channels in the proteasome and other proteases. *Cell* **91**(4), 431-434.

Le, S., Davis, C., Konopka, J. B. and Sternglanz, R. (1997). Two new S-phase-specific genes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**(11), 1029-1042.

Lee, J. S., Shukla, A., Schneider, J., Swanson, S. K., Washburn, M. P., Florens, L., Bhaumik, S. R. and Shilatifard, A. (2007). Histone crosstalk between H2B monoubiquitination and H3 methylation mediated by COMPASS. *Cell* **131**(6), 1084-1096.

Lee, K. K., Florens, L., Swanson, S. K., Washburn, M. P. and Workman, J. L. (2005). The deubiquitylation activity of Ubp8 is dependent upon Sgf11 and its association with the SAGA complex. *Molecular and cellular biology* **25**(3), 1173-1182.

Bibliografía

Lee, K. K., Sardu, M. E., Swanson, S. K., Gilmore, J. M., Torok, M., Grant, P. A., Florens, L., Workman, J. L. and Washburn, M. P. (2011). Combinatorial depletion analysis to assemble the network architecture of the SAGA and ADA chromatin remodeling complexes. *Molecular systems biology* **7**, 503.

Lee, K. K., Swanson, S. K., Florens, L., Washburn, M. P. and Workman, J. L. (2009). Yeast Sgf73/Ataxin-7 serves to anchor the deubiquitination module into both SAGA and Slik(SALSA) HAT complexes. *Epigenetics & chromatin* **2**(1), 2.

Lee, K. K. and Workman, J. L. (2007). Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**(4), 284-295.

Lee, S. K., Fletcher, A. G., Zhang, L., Chen, X., Fischbeck, J. A. and Stargell, L. A. (2010). Activation of a poised RNAPII-dependent promoter requires both SAGA and mediator. *Genetics* **184**(3), 659-672.

Lee, T. I., Causton, H. C., Holstege, F. C., Shen, W. C., Hannett, N., Jennings, E. G., Winston, F., Green, M. R. and Young, R. A. (2000). Redundant roles for the TFIID and SAGA complexes in global transcription. *Nature* **405**(6787), 701-704.

Lee, T. I., Rinaldi, N. J., Robert, F., Odom, D. T., Bar-Joseph, Z., Gerber, G. K., Hannett, N. M., Harbison, C. T., Thompson, C. M., Simon, I., Zeitlinger, J., Jennings, E. G., Murray, H. L., Gordon, D. B., Ren, B., Wyrick, J. J., Tagne, J. B., Volkert, T. L., Fraenkel, E., Gifford, D. K. and Young, R. A. (2002). Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **298**(5594), 799-804.

Lemieux, K. and Gaudreau, L. (2004). Targeting of Swi/Snf to the yeast GAL1 UAS G requires the Mediator, TAF IIs, and RNA polymerase II. *The EMBO journal* **23**(20), 4040-4050.

Li, B., Carey, M. and Workman, J. L. (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell* **128**(4), 707-719.

Li, B. and Greene, M. I. (2007). FOXP3 actively represses transcription by recruiting the HAT/HDAC complex. *Cell Cycle* **6**(12), 1432-1436.

Liebich, H. M., Gesele, E., Wirth, C., Woll, J., Jobst, K. and Lakatos, A. (1993). Non-enzymatic glycation of histones. *Biological mass spectrometry* **22**(2), 121-123.

Light, W. H., Brickner, D. G., Brand, V. R. and Brickner, J. H. (2010). Interaction of a DNA zip code with the nuclear pore complex promotes H2A.Z incorporation and INO1 transcriptional memory. *Molecular cell* **40**(1), 112-125.

Bibliografía

Lin, Y. Y., Lu, J. Y., Zhang, J., Walter, W., Dang, W., Wan, J., Tao, S. C., Qian, J., Zhao, Y., Boeke, J. D., Berger, S. L. and Zhu, H. (2009). Protein acetylation microarray reveals that NuA4 controls key metabolic target regulating gluconeogenesis. *Cell* **136**(6), 1073-1084.

Liu, L., Zhang, J., Bates, S., Li, J. J., Peehl, D. M., Rhim, J. S. and Pfeifer, G. P. (2005). A methylation profile of in vitro immortalized human cell lines. *International journal of oncology* **26**(1), 275-285.

Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**(4), 402-408.

Lohr, D. (1984). Organization of the GAL1-GAL10 intergenic control region chromatin. *Nucleic acids research* **12**(22), 8457-8474.

Lohr, D. (1993). Chromatin structure and regulation of the eukaryotic regulatory gene GAL80. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**(22), 10628-10632.

Lohr, D. (1997). Nucleosome transactions on the promoters of the yeast GAL and PHO genes. *The Journal of biological chemistry* **272**(43), 26795-26798.

Lohr, D., Venkov, P. and Zlatanova, J. (1995). Transcriptional regulation in the yeast GAL gene family: a complex genetic network. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **9**(9), 777-787.

Longtine, M. S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P. and Pringle, J. R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**(10), 953-961.

Louis, E. J. and Vershinin, A. V. (2005). Chromosome ends: different sequences may provide conserved functions. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **27**(7), 685-697.

Lowell, J. E. and Pillus, L. (1998). Telomere tales: chromatin, telomerase and telomere function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **54**(1), 32-49.

Lu, Q., Tang, X., Tian, G., Wang, F., Liu, K., Nguyen, V., Kohalmi, S. E., Keller, W. A., Tsang, E. W., Harada, J. J., Rothstein, S. J. and Cui, Y. (2010). Arabidopsis homolog of the yeast TREX-2 mRNA export complex: components and anchoring

Bibliografía

nucleoporin. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **61**(2), 259-270.

Luke, B. and Lingner, J. (2009). TERRA: telomeric repeat-containing RNA. *The EMBO journal* **28**(17), 2503-2510.

Luke, B., Panza, A., Redon, S., Iglesias, N., Li, Z. and Lingner, J. (2008). The Rat1p 5' to 3' exonuclease degrades telomeric repeat-containing RNA and promotes telomere elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular cell* **32**(4), 465-477.

Luna, R., Gaillard, H., Gonzalez-Aguilera, C. and Aguilera, A. (2008). Biogenesis of mRNPs: integrating different processes in the eukaryotic nucleus. *Chromosoma* **117**(4), 319-331.

Lund, M. K. and Guthrie, C. (2005). The DEAD-box protein Dbp5p is required to dissociate Mex67p from exported mRNPs at the nuclear rim. *Mol Cell* **20**(4), 645-651.

Luthra, R., Kerr, S. C., Harreman, M. T., Apponi, L. H., Fasken, M. B., Ramineni, S., Chaurasia, S., Valentini, S. R. and Corbett, A. H. (2007). Actively transcribed GAL genes can be physically linked to the nuclear pore by the SAGA chromatin modifying complex. *The Journal of biological chemistry* **282**(5), 3042-3049.

Lutzmann, M., Kunze, R., Stangl, K., Stelter, P., Toth, K. F., Bottcher, B. and Hurt, E. (2005). Reconstitution of Nup157 and Nup145N into the Nup84 complex. *The Journal of biological chemistry* **280**(18), 18442-18451.

Lycan, D. E., Osley, M. A. and Hereford, L. M. (1987). Role of transcriptional and posttranscriptional regulation in expression of histone genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **7**(2), 614-621.

Malik, S., Shukla, A., Sen, P. and Bhaumik, S. R. (2009). The 19 s proteasome subcomplex establishes a specific protein interaction network at the promoter for stimulated transcriptional initiation in vivo. *The Journal of biological chemistry* **284**(51), 35714-35724.

Mannen, T., Andoh, T. and Tani, T. (2008). Dss1 associating with the proteasome functions in selective nuclear mRNA export in yeast. *Biochemical and biophysical research communications* **365**(4), 664-671.

Martinez, E., Palhan, V. B., Tjernberg, A., Lyman, E. S., Gamper, A. M., Kundu, T. K., Chait, B. T. and Roeder, R. G. (2001). Human STAGA complex is a chromatin-acetylating transcription coactivator that interacts with pre-mRNA splicing and

Bibliografía

DNA damage-binding factors in vivo. *Molecular and cellular biology* **21**(20), 6782-6795.

Marvin, M. E., Becker, M. M., Noel, P., Hardy, S., Bertuch, A. A. and Louis, E. J. (2009). The association of yKu with subtelomeric core X sequences prevents recombination involving telomeric sequences. *Genetics* **183**(2), 453-467, 451SI-413SI.

Mason, P. B. and Struhl, K. (2003). The FACT complex travels with elongating RNA polymerase II and is important for the fidelity of transcriptional initiation in vivo. *Mol Cell Biol* **23**(22), 8323-8333.

Meaburn, K. J. and Misteli, T. (2007). Cell biology: chromosome territories. *Nature* **445**(7126), 379-781.

Mekhail, K. and Moazed, D. (2010). The nuclear envelope in genome organization, expression and stability. *Nature reviews. Molecular cell biology* **11**(5), 317-328.

Mellor, J. (2005). The dynamics of chromatin remodeling at promoters. *Molecular cell* **19**(2), 147-157.

Millar, C. B. and Grunstein, M. (2006). Genome-wide patterns of histone modifications in yeast. *Nature reviews. Molecular cell biology* **7**(9), 657-666.

Miller, T., Krogan, N. J., Dover, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Johnston, M., Greenblatt, J. F. and Shilatifard, A. (2001). COMPASS: a complex of proteins associated with a trithorax-related SET domain protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(23), 12902-12907.

Mizzen, C. A., Yang, X. J., Kokubo, T., Brownell, J. E., Bannister, A. J., Owen-Hughes, T., Workman, J., Wang, L., Berger, S. L., Kouzarides, T., Nakatani, Y. and Allis, C. D. (1996). The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* **87**(7), 1261-1270.

Mousson, F., Ochsenbein, F. and Mann, C. (2007). The histone chaperone Asf1 at the crossroads of chromatin and DNA checkpoint pathways. *Chromosoma* **116**(2), 79-93.

Mozdy, A. D., Podell, E. R. and Cech, T. R. (2008). Multiple yeast genes, including Paf1 complex genes, affect telomere length via telomerase RNA abundance. *Molecular and cellular biology* **28**(12), 4152-4161.

Nagai, S., Davoodi, N. and Gasser, S. M. (2011). Nuclear organization in genome stability: SUMO connections. *Cell research* **21**(3), 474-485.

Bibliografía

Nagai, S., Dubrana, K., Tsai-Pflugfelder, M., Davidson, M. B., Roberts, T. M., Brown, G. W., Varela, E., Hediger, F., Gasser, S. M. and Krogan, N. J. (2008). Functional targeting of DNA damage to a nuclear pore-associated SUMO-dependent ubiquitin ligase. *Science* **322**(5901), 597-602.

Nagalakshmi, U., Wang, Z., Waern, K., Shou, C., Raha, D., Gerstein, M. and Snyder, M. (2008). The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science* **320**(5881), 1344-1349.

Nagy, P. L., Griesenbeck, J., Kornberg, R. D. and Cleary, M. L. (2002). A trithorax-group complex purified from *Saccharomyces cerevisiae* is required for methylation of histone H3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(1), 90-94.

Nakanishi, S., Lee, J. S., Gardner, K. E., Gardner, J. M., Takahashi, Y. H., Chandrasekharan, M. B., Sun, Z. W., Osley, M. A., Strahl, B. D., Jaspersen, S. L. and Shilatifard, A. (2009). Histone H2BK123 monoubiquitination is the critical determinant for H3K4 and H3K79 trimethylation by COMPASS and Dot1. *The Journal of cell biology* **186**(3), 371-377.

Narlikar, G. J., Fan, H. Y. and Kingston, R. E. (2002). Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* **108**(4), 475-487.

Nathan, D., Ingvarsdottir, K., Sterner, D. E., Bylebyl, G. R., Dokmanovic, M., Dorsey, J. A., Whelan, K. A., Krsmanovic, M., Lane, W. S., Meluh, P. B., Johnson, E. S. and Berger, S. L. (2006). Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications. *Genes & development* **20**(8), 966-976.

Nathan, D., Sterner, D. E. and Berger, S. L. (2003). Histone modifications: Now summoning sumoylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(23), 13118-13120.

Ng, H. H., Robert, F., Young, R. A. and Struhl, K. (2003). Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Molecular cell* **11**(3), 709-719.

Ng, H. H., Xu, R. M., Zhang, Y. and Struhl, K. (2002). Ubiquitination of histone H2B by Rad6 is required for efficient Dot1-mediated methylation of histone H3 lysine 79. *The Journal of biological chemistry* **277**(38), 34655-34657.

Bibliografía

- Noma, K., Cam, H. P., Maraia, R. J. and Grewal, S. I.** (2006). A role for TFIIIC transcription factor complex in genome organization. *Cell* **125**(5), 859-872.
- Nugent, C. I. and Lundblad, V.** (1998). The telomerase reverse transcriptase: components and regulation. *Genes & development* **12**(8), 1073-1085.
- O'Sullivan, J. M., Tan-Wong, S. M., Morillon, A., Lee, B., Coles, J., Mellor, J. and Proudfoot, N. J.** (2004). Gene loops juxtapose promoters and terminators in yeast. *Nature genetics* **36**(9), 1014-1018.
- Oeffinger, M., Wei, K. E., Rogers, R., DeGrasse, J. A., Chait, B. T., Aitchison, J. D. and Rout, M. P.** (2007). Comprehensive analysis of diverse ribonucleoprotein complexes. *Nature methods* **4**(11), 951-956.
- Okamoto, M., Valenzuela, L., Chiba, T., Ito, T. and Kamakaka, R. T.** (2004). Barrier proteins remodel and modify chromatin to restrict silenced domains. *Molecular and cellular biology* **24**(5), 1956-1967.
- Onishi, M., Liou, G. G., Buchberger, J. R., Walz, T. and Moazed, D.** (2007). Role of the conserved Sir3-BAH domain in nucleosome binding and silent chromatin assembly. *Molecular cell* **28**(6), 1015-1028.
- Osley, M. A.** (1991). The regulation of histone synthesis in the cell cycle. *Annual review of biochemistry* **60**, 827-861.
- Osley, M. A.** (2004). H2B ubiquitylation: the end is in sight. *Biochimica et biophysica acta* **1677**(1-3), 74-78.
- Osley, M. A.** (2006). Regulation of histone H2A and H2B ubiquitylation. *Brief Funct Genomic Proteomic* **5**(3), 179-189.
- Palancade, B., Zuccolo, M., Loeillet, S., Nicolas, A. and Doye, V.** (2005). Pml39, a novel protein of the nuclear periphery required for nuclear retention of improper messenger ribonucleoproteins. *Mol Biol Cell* **16**(11), 5258-5268.
- Parenteau, J., Durand, M., Veronneau, S., Lacombe, A. A., Morin, G., Guerin, V., Cecez, B., Gervais-Bird, J., Koh, C. S., Brunelle, D., Wellinger, R. J., Chabot, B. and Abou Elela, S.** (2008). Deletion of many yeast introns reveals a minority of genes that require splicing for function. *Molecular biology of the cell* **19**(5), 1932-1941.
- Parthun, M. R., Widom, J. and Gottschling, D. E.** (1996). The major cytoplasmic histone acetyltransferase in yeast: links to chromatin replication and histone metabolism. *Cell* **87**(1), 85-94.
- Pascual-Garcia, P., Govind, C. K., Queralt, E., Cuenca-Bono, B., Llopis, A., Chavez, S., Hinnebusch, A. G. and**

Bibliografía

Rodriguez-Navarro, S. (2008). Sus1 is recruited to coding regions and functions during transcription elongation in association with SAGA and TREX2. *Genes & development* **22**(20), 2811-2822.

Pascual-Garcia, P. and Rodriguez-Navarro, S. (2009). A tale of coupling, Sus1 function in transcription and mRNA export. *RNA biology* **6**(2), 141-144.

Pavri, R., Zhu, B., Li, G., Trojer, P., Mandal, S., Shilatifard, A. and Reinberg, D. (2006). Histone H2B monoubiquitination functions cooperatively with FACT to regulate elongation by RNA polymerase II. *Cell* **125**(4), 703-717.

Penn, M. D., Galgoci, B. and Greer, H. (1983). Identification of AAS genes and their regulatory role in general control of amino acid biosynthesis in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**(9), 2704-2708.

Perkins, K. J., Lusic, M., Mitar, I., Giacca, M. and Proudfoot, N. J. (2008). Transcription-dependent gene looping of the HIV-1 provirus is dictated by recognition of pre-mRNA processing signals. *Molecular cell* **29**(1), 56-68.

Peterson, C. L. and Laniel, M. A. (2004). Histones and histone modifications. *Curr Biol* **14**(14), R546-551.

Pick, E., Hofmann, K. and Glickman, M. H. (2009). PCI complexes: Beyond the proteasome, CSN, and eIF3 Troika. *Molecular cell* **35**(3), 260-264.

Pokholok, D. K., Harbison, C. T., Levine, S., Cole, M., Hannett, N. M., Lee, T. I., Bell, G. W., Walker, K., Rolfe, P. A., Herbolsheimer, E., Zeitlinger, J., Lewitter, F., Gifford, D. K. and Young, R. A. (2005). Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell* **122**(4), 517-527.

Polo, S. E. and Almouzni, G. (2005). Histone metabolic pathways and chromatin assembly factors as proliferation markers. *Cancer letters* **220**(1), 1-9.

Polotnianka, R. M., Li, J. and Lustig, A. J. (1998). The yeast Ku heterodimer is essential for protection of the telomere against nucleolytic and recombinational activities. *Current biology : CB* **8**(14), 831-834.

Porter, S. E., Greenwell, P. W., Ritchie, K. B. and Petes, T. D. (1996). The DNA-binding protein Hdf1p (a putative Ku homologue) is required for maintaining normal telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic acids research* **24**(4), 582-585.

Powrie, E. A., Zenklusen, D. and Singer, R. H. (2011). A nucleoporin, Nup60p, affects the nuclear and cytoplasmic localization of ASH1 mRNA in *S. cerevisiae*. *RNA* **17**(1), 134-144.

Bibliografía

Pray-Grant, M. G., Schieltz, D., McMahon, S. J., Wood, J. M., Kennedy, E. L., Cook, R. G., Workman, J. L., Yates, J. R., 3rd and Grant, P. A. (2002). The novel SLIK histone acetyltransferase complex functions in the yeast retrograde response pathway. *Molecular and cellular biology* **22**(24), 8774-8786.

Proudfoot, N. J., Furger, A. and Dye, M. J. (2002). Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* **108**(4), 501-512.

Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M. and Seraphin, B. (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* **24**(3), 218-229.

Qin, S., Wang, Q., Ray, A., Wani, G., Zhao, Q., Bhaumik, S. R. and Wani, A. A. (2009). Sem1p and Ubp6p orchestrate telomeric silencing by modulating histone H2B ubiquitination and H3 acetylation. *Nucleic acids research* **37**(6), 1843-1853.

Qiu, H., Hu, C., Yoon, S., Natarajan, K., Swanson, M. J. and Hinnebusch, A. G. (2004). An array of coactivators is required for optimal recruitment of TATA binding protein and RNA polymerase II by promoter-bound Gcn4p. *Molecular and cellular biology* **24**(10), 4104-4117.

Qiu, H. F., Dubois, E., Broen, P. and Messenguy, F. (1990). Functional analysis of ARGRI and ARGRIII regulatory proteins involved in the regulation of arginine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & general genetics : MGG* **222**(2-3), 192-200.

Rando, O. J. and Winston, F. (2012). Chromatin and transcription in yeast. *Genetics* **190**(2), 351-387.

Ransom, M., Dennehey, B. K. and Tyler, J. K. (2010). Chaperoning histones during DNA replication and repair. *Cell* **140**(2), 183-195.

Rao, B., Shibata, Y., Strahl, B. D. and Lieb, J. D. (2005). Dimethylation of histone H3 at lysine 36 demarcates regulatory and nonregulatory chromatin genome-wide. *Molecular and cellular biology* **25**(21), 9447-9459.

Reed, R. and Hurt, E. (2002). A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing. *Cell* **108**(4), 523-531.

Reifsnyder, C., Lowell, J., Clarke, A. and Pillus, L. (1996). Yeast SAS silencing genes and human genes associated with AML and HIV-1 Tat interactions are homologous with acetyltransferases. *Nature genetics* **14**(1), 42-49.

Bibliografía

Rexach, M. and Blobel, G. (1995). Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins. *Cell* **83**(5), 683-692.

Rhee, H. S. and Pugh, B. F. (2011). Comprehensive genome-wide protein-DNA interactions detected at single-nucleotide resolution. *Cell* **147**(6), 1408-1419.

Ricci, A. R., Genereaux, J. and Brandl, C. J. (2002). Components of the SAGA histone acetyltransferase complex are required for repressed transcription of ARG1 in rich medium. *Molecular and cellular biology* **22**(12), 4033-4042.

Rice, J. C. and Allis, C. D. (2001). Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Current opinion in cell biology* **13**(3), 263-273.

Robert, F., Pokholok, D. K., Hannett, N. M., Rinaldi, N. J., Chandy, M., Rolfe, A., Workman, J. L., Gifford, D. K. and Young, R. A. (2004). Global position and recruitment of HATs and HDACs in the yeast genome. *Molecular cell* **16**(2), 199-209.

Roberts, S. M. and Winston, F. (1997). Essential functional interactions of SAGA, a *Saccharomyces cerevisiae* complex of Spt, Ada, and Gcn5 proteins, with the Snf/Swi and Srb/mediator complexes. *Genetics* **147**(2), 451-465.

Robyr, D., Suka, Y., Xenarios, I., Kurdistani, S. K., Wang, A., Suka, N. and Grunstein, M. (2002). Microarray deacetylation maps determine genome-wide functions for yeast histone deacetylases. *Cell* **109**(4), 437-446.

Rodriguez-Navarro, S. (2009). Insights into SAGA function during gene expression. *EMBO reports* **10**(8), 843-850.

Rodriguez-Navarro, S., Fischer, T., Luo, M. J., Antunez, O., Brettschneider, S., Lechner, J., Perez-Ortin, J. E., Reed, R. and Hurt, E. (2004). Sus1, a functional component of the SAGA histone acetylase complex and the nuclear pore-associated mRNA export machinery. *Cell* **116**(1), 75-86.

Roeder, R. G. (1996). Nuclear RNA polymerases: role of general initiation factors and cofactors in eukaryotic transcription. *Methods in enzymology* **273**, 165-171.

Roeder, R. G. (2005). Transcriptional regulation and the role of diverse coactivators in animal cells. *FEBS letters* **579**(4), 909-915.

Roguev, A., Schaft, D., Shevchenko, A., Pijnappel, W. W., Wilm, M., Aasland, R. and Stewart, A. F. (2001). The *Saccharomyces cerevisiae* Set1 complex includes an Ash2 homologue and methylates histone 3 lysine 4. *The EMBO journal* **20**(24), 7137-7148.

Bibliografía

Rondon, A. G., Jimeno, S. and Aguilera, A. (2010). The interface between transcription and mRNP export: from THO to THSC/TREX-2. *Biochimica et biophysica acta* **1799**(8), 533-538.

Rosonina, E., Kaneko, S. and Manley, J. L. (2006). Terminating the transcript: breaking up is hard to do. *Genes & development* **20**(9), 1050-1056.

Ross, P. L., Huang, Y. N., Marchese, J. N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., Purkayastha, S., Juhasz, P., Martin, S., Bartlet-Jones, M., He, F., Jacobson, A. and Pappin, D. J. (2004). Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **3**(12), 1154-1169.

Rout, M. P., Aitchison, J. D., Suprpto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y. and Chait, B. T. (2000). The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J Cell Biol* **148**(4), 635-651.

Samara, N. L., Datta, A. B., Berndsen, C. E., Zhang, X., Yao, T., Cohen, R. E. and Wolberger, C. (2010). Structural insights into the assembly and function of the SAGA deubiquitinating module. *Science* **328**(5981), 1025-1029.

Samara, N. L., Ringel, A. E. and Wolberger, C. (2012). A role for intersubunit interactions in maintaining SAGA deubiquitinating module structure and activity. *Structure* **20**(8), 1414-1424.

Samara, N. L. and Wolberger, C. (2011). A new chapter in the transcription SAGA. *Current opinion in structural biology* **21**(6), 767-774.

Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001). Molecular cloning : a laboratory manual. *Cold Spring Harbor, N.Y.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sandell, L. L., Gottschling, D. E. and Zakian, V. A. (1994). Transcription of a yeast telomere alleviates telomere position effect without affecting chromosome stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**(25), 12061-12065.

Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A. J., Sherriff, J., Bernstein, B. E., Emre, N. C., Schreiber, S. L., Mellor, J. and Kouzarides, T. (2002). Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* **419**(6905), 407-411.

Bibliografía

Saunders, A., Core, L. J. and Lis, J. T. (2006). Breaking barriers to transcription elongation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(8), 557-567.

Saunders, A., Werner, J., Andrulis, E. D., Nakayama, T., Hirose, S., Reinberg, D. and Lis, J. T. (2003). Tracking FACT and the RNA polymerase II elongation complex through chromatin in vivo. *Science* **301**(5636), 1094-1096.

Schaft, D., Roguev, A., Kotovic, K. M., Shevchenko, A., Sarov, M., Neugebauer, K. M. and Stewart, A. F. (2003). The histone 3 lysine 36 methyltransferase, SET2, is involved in transcriptional elongation. *Nucleic acids research* **31**(10), 2475-2482.

Schmid, M., Arib, G., Laemmli, C., Nishikawa, J., Durussel, T. and Laemmli, U. K. (2006). Nup-PI: the nucleopore-promoter interaction of genes in yeast. *Molecular cell* **21**(3), 379-391.

Schmid, M. and Jensen, T. H. (2008). Quality control of mRNP in the nucleus. *Chromosoma* **117**(5), 419-429.

Schmitt, C., von Kobbe, C., Bachi, A., Pante, N., Rodrigues, J. P., Boscheron, C., Rigaut, G., Wilm, M., Seraphin, B., Carmo-Fonseca, M. and Izaurralde, E. (1999). Dbp5, a DEAD-box protein required for mRNA export, is recruited to the cytoplasmic fibrils of nuclear pore complex via a conserved interaction with CAN/Nup159p. *The EMBO journal* **18**(15), 4332-4347.

Schoenfelder, S., Sexton, T., Chakalova, L., Cope, N. F., Horton, A., Andrews, S., Kurukuti, S., Mitchell, J. A., Umlauf, D., Dimitrova, D. S., Eskiw, C. H., Luo, Y., Wei, C. L., Ruan, Y., Bieker, J. J. and Fraser, P. (2010). Preferential associations between co-regulated genes reveal a transcriptional interactome in erythroid cells. *Nature genetics* **42**(1), 53-61.

Schulze, J. M., Hentrich, T., Nakanishi, S., Gupta, A., Emberly, E., Shilatfard, A. and Kobor, M. S. (2011). Splitting the task: Ubp8 and Ubp10 deubiquitinate different cellular pools of H2BK123. *Genes & development* **25**(21), 2242-2247.

Schwabish, M. A. and Struhl, K. (2006). Asf1 mediates histone eviction and deposition during elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell* **22**(3), 415-422.

Schwank, S., Ebbert, R., Rautenstrauss, K., Schweizer, E. and Schuller, H. J. (1995). Yeast transcriptional activator INO2 interacts as an Ino2p/Ino4p basic helix-loop-helix heteromeric complex with the inositol/choline-responsive element necessary for expression of phospholipid biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic acids research* **23**(2), 230-237.

Bibliografía

Sexton, T., Schober, H., Fraser, P. and Gasser, S. M. (2007). Gene regulation through nuclear organization. *Nature structural & molecular biology* **14**(11), 1049-1055.

Shandilya, J. and Roberts, S. G. (2012). The transcription cycle in eukaryotes: From productive initiation to RNA polymerase II recycling. *Biochimica et biophysica acta* **1819**(5), 391-400.

Sharma, V. M., Tomar, R. S., Dempsey, A. E. and Reese, J. C. (2007). Histone deacetylases RPD3 and HOS2 regulate the transcriptional activation of DNA damage-inducible genes. *Molecular and cellular biology* **27**(8), 3199-3210.

Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J. R., Cole, P. A. and Casero, R. A. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* **119**(7), 941-953.

Shiio, Y. and Eisenman, R. N. (2003). Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(23), 13225-13230.

Shukla, A. and Bhaumik, S. R. (2007). H2B-K123 ubiquitination stimulates RNAPII elongation independent of H3-K4 methylation. *Biochemical and biophysical research communications* **359**(2), 214-220.

Shukla, A., Stanojevic, N., Duan, Z., Sen, P. and Bhaumik, S. R. (2006). Ubp8p, a histone deubiquitinase whose association with SAGA is mediated by Sgf11p, differentially regulates lysine 4 methylation of histone H3 in vivo. *Molecular and cellular biology* **26**(9), 3339-3352.

Shukla, A., Stanojevic, N., Duan, Z., Shadle, T. and Bhaumik, S. R. (2006). Functional analysis of H2B-Lys-123 ubiquitination in regulation of H3-Lys-4 methylation and recruitment of RNA polymerase II at the coding sequences of several active genes in vivo. *The Journal of biological chemistry* **281**(28), 19045-19054.

Sikder, D., Johnston, S. A. and Kodadek, T. (2006). Widespread, but non-identical, association of proteasomal 19 and 20 S proteins with yeast chromatin. *The Journal of biological chemistry* **281**(37), 27346-27355.

Sikorski, R. S. and Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**(1), 19-27.

Bibliografía

Sims, R. J., 3rd, Mandal, S. S. and Reinberg, D. (2004). Recent highlights of RNA-polymerase-II-mediated transcription. *Current opinion in cell biology* **16**(3), 263-271.

Singer, M. S., Kahana, A., Wolf, A. J., Meisinger, L. L., Peterson, S. E., Goggin, C., Mahowald, M. and Gottschling, D. E. (1998). Identification of high-copy disruptors of telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **150**(2), 613-632.

Singer, R. A. and Johnston, G. C. (2004). The FACT chromatin modulator: genetic and structure/function relationships. *Biochem Cell Biol* **82**(4), 419-427.

Singh, B. N. and Hampsey, M. (2007). A transcription-independent role for TFIIB in gene looping. *Molecular cell* **27**(5), 806-816.

Smith, E. and Shilatifard, A. (2010). The chromatin signaling pathway: diverse mechanisms of recruitment of histone-modifying enzymes and varied biological outcomes. *Molecular cell* **40**(5), 689-701.

Smith, J. S., Brachmann, C. B., Pillus, L. and Boeke, J. D. (1998). Distribution of a limited Sir2 protein pool regulates the strength of yeast rDNA silencing and is modulated by Sir4p. *Genetics* **149**(3), 1205-1219.

Smogorzewska, A. and de Lange, T. (2004). Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annual review of biochemistry* **73**, 177-208.

Smolle, M. and Workman, J. L. (2013). Transcription-associated histone modifications and cryptic transcription. *Biochimica et biophysica acta* **1829**(1), 84-97.

Snay-Hodge, C. A., Colot, H. V., Goldstein, A. L. and Cole, C. N. (1998). Dbp5p/Rat8p is a yeast nuclear pore-associated DEAD-box protein essential for RNA export. *Embo J* **17**(9), 2663-2676.

Sone, T., Saeki, Y., Toh-e, A. and Yokosawa, H. (2004). Sem1p is a novel subunit of the 26 S proteasome from *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* **279**(27), 28807-28816.

Sterner, D. E., Grant, P. A., Roberts, S. M., Duggan, L. J., Belotserkovskaya, R., Pacella, L. A., Winston, F., Workman, J. L. and Berger, S. L. (1999). Functional organization of the yeast SAGA complex: distinct components involved in structural integrity, nucleosome acetylation, and TATA-binding protein interaction. *Molecular and cellular biology* **19**(1), 86-98.

Bibliografía

Strahl, B. D., Grant, P. A., Briggs, S. D., Sun, Z. W., Bone, J. R., Caldwell, J. A., Mollah, S., Cook, R. G., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. and Allis, C. D. (2002). Set2 is a nucleosomal histone H3-selective methyltransferase that mediates transcriptional repression. *Molecular and cellular biology* **22**(5), 1298-1306.

Strambio-De-Castillia, C., Niepel, M. and Rout, M. P. (2010). The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. *Nature reviews. Molecular cell biology* **11**(7), 490-501.

Strasser, K., Bassler, J. and Hurt, E. (2000). Binding of the Mex67p/Mtr2p heterodimer to FXFG, GLFG, and FG repeat nucleoporins is essential for nuclear mRNA export. *J Cell Biol* **150**(4), 695-706.

Struhl, K. and Moqtaderi, Z. (1998). The TAFs in the HAT. *Cell* **94**(1), 1-4.

Suganuma, T. and Workman, J. L. (2008). Crosstalk among Histone Modifications. *Cell* **135**(4), 604-607.

Suka, N., Luo, K. and Grunstein, M. (2002). Sir2p and Sas2p opposingly regulate acetylation of yeast histone H4 lysine16 and spreading of heterochromatin. *Nature genetics* **32**(3), 378-383.

Sulahian, R., Sikder, D., Johnston, S. A. and Kodadek, T. (2006). The proteasomal ATPase complex is required for stress-induced transcription in yeast. *Nucleic acids research* **34**(5), 1351-1357.

Sun, Z. W. and Allis, C. D. (2002). Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* **418**(6893), 104-108.

Suntharalingam, M., Alcazar-Roman, A. R. and Wenthe, S. R. (2004). Nuclear export of the yeast mRNA-binding protein Nab2 is linked to a direct interaction with Gfd1 and to Gle1 function. *J Biol Chem* **279**(34), 35384-35391.

Swanson, M. J., Qiu, H., Sumibcay, L., Krueger, A., Kim, S. J., Natarajan, K., Yoon, S. and Hinnebusch, A. G. (2003). A multiplicity of coactivators is required by Gcn4p at individual promoters in vivo. *Molecular and cellular biology* **23**(8), 2800-2820.

Taatjes, D. J. (2010). The human Mediator complex: a versatile, genome-wide regulator of transcription. *Trends in biochemical sciences* **35**(6), 315-322.

Taddei, A. (2007). Active genes at the nuclear pore complex. *Current opinion in cell biology* **19**(3), 305-310.

Taddei, A. and Gasser, S. M. (2012). Structure and function in the budding yeast nucleus. *Genetics* **192**(1), 107-129.

Bibliografía

Taddei, A., Van Houwe, G., Hediger, F., Kalck, V., Cubizolles, F., Schober, H. and Gasser, S. M. (2006). Nuclear pore association confers optimal expression levels for an inducible yeast gene. *Nature* **441**(7094), 774-778.

Taddei, A., Van Houwe, G., Nagai, S., Erb, I., van Nimwegen, E. and Gasser, S. M. (2009). The functional importance of telomere clustering: global changes in gene expression result from SIR factor dispersion. *Genome research* **19**(4), 611-625.

Taggart, A. K. and Zakian, V. A. (2003). Telomerase: what are the Est proteins doing? *Current opinion in cell biology* **15**(3), 275-280.

Takahata, S., Yu, Y. and Stillman, D. J. (2009). FACT and Asf1 regulate nucleosome dynamics and coactivator binding at the HO promoter. *Molecular cell* **34**(4), 405-415.

Tan-Wong, S. M., Wijayatilake, H. D. and Proudfoot, N. J. (2009). Gene loops function to maintain transcriptional memory through interaction with the nuclear pore complex. *Genes & development* **23**(22), 2610-2624.

Tan-Wong, S. M., Wijayatilake, H. D. and Proudfoot, N. J. (2009). Gene loops function to maintain transcriptional memory through interaction with the nuclear pore complex. *Genes & Development* **23**(22), 2610-2624.

Tanny, J. C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Allis, C. D. (2007). Ubiquitylation of histone H2B controls RNA polymerase II transcription elongation independently of histone H3 methylation. *Genes & development* **21**(7), 835-847.

Thakurta, A. G., Gopal, G., Yoon, J. H., Kozak, L. and Dhar, R. (2005). Homolog of BRCA2-interacting Dss1p and Uap56p link Mlo3p and Rae1p for mRNA export in fission yeast. *The EMBO journal* **24**(14), 2512-2523.

Therizols, P., Fairhead, C., Cabal, G. G., Genovesio, A., Olivo-Marin, J. C., Dujon, B. and Fabre, E. (2006). Telomere tethering at the nuclear periphery is essential for efficient DNA double strand break repair in subtelomeric region. *The Journal of cell biology* **172**(2), 189-199.

Thiagalingam, S., Cheng, K. H., Lee, H. J., Mineva, N., Thiagalingam, A. and Ponte, J. F. (2003). Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. *Annals of the New York Academy of Sciences* **983**, 84-100.

Tous, C., Rondon, A. G., Garcia-Rubio, M., Gonzalez-Aguilera, C., Luna, R. and Aguilera, A. (2011). A novel assay

Bibliografía

identifies transcript elongation roles for the Nup84 complex and RNA processing factors. *The EMBO journal* **30**(10), 1953-1964.

Travis, G. H., Colavito-Shepanski, M. and Grunstein, M. (1984). Extensive purification and characterization of chromatin-bound histone acetyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* **259**(23), 14406-14412.

Turner, B. M. (2002). Cellular memory and the histone code. *Cell* **111**(3), 285-291.

Ungar, L., Yosef, N., Sela, Y., Sharan, R., Ruppin, E. and Kupiec, M. (2009). A genome-wide screen for essential yeast genes that affect telomere length maintenance. *Nucleic acids research* **37**(12), 3840-3849.

Valkov, E., Dean, J. C., Jani, D., Kuhlmann, S. I. and Stewart, M. (2012). Structural basis for the assembly and disassembly of mRNA nuclear export complexes. *Biochim Biophys Acta* **1819**(6), 578-592.

van Bakel, H. and Holstege, F. C. (2004). In control: systematic assessment of microarray performance. *EMBO reports* **5**(10), 964-969.

van Leeuwen, F., Gafken, P. R. and Gottschling, D. E. (2002). Dot1p modulates silencing in yeast by methylation of the nucleosome core. *Cell* **109**(6), 745-756.

VanDemark, A. P., Kasten, M. M., Ferris, E., Heroux, A., Hill, C. P. and Cairns, B. R. (2007). Autoregulation of the rsc4 tandem bromodomain by gcn5 acetylation. *Molecular cell* **27**(5), 817-828.

Varsally, W. and Brogna, S. (2012). UPF1 involvement in nuclear functions. *Biochemical Society transactions* **40**(4), 778-783.

Venkatesh, S., Smolle, M., Li, H., Gogol, M. M., Saint, M., Kumar, S., Natarajan, K. and Workman, J. L. (2012). Set2 methylation of histone H3 lysine 36 suppresses histone exchange on transcribed genes. *Nature* **489**(7416), 452-455.

Venters, B. J., Wachi, S., Mavrigh, T. N., Andersen, B. E., Jena, P., Sinnamon, A. J., Jain, P., Rolleri, N. S., Jiang, C., Hemeryck-Walsh, C. and Pugh, B. F. (2011). A comprehensive genomic binding map of gene and chromatin regulatory proteins in *Saccharomyces*. *Molecular cell* **41**(4), 480-492.

Verger, A., Perdomo, J. and Crossley, M. (2003). Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO reports* **4**(2), 137-142.

Villa, T., Rougemaille, M. and Libri, D. (2008). Nuclear quality control of RNA polymerase II ribonucleoproteins in yeast:

Bibliografía

tilting the balance to shape the transcriptome. *Biochimica et biophysica acta* **1779**(9), 524-531.

Vinciguerra, P., Iglesias, N., Camblong, J., Zenklusen, D. and Stutz, F. (2005). Perinuclear Mlp proteins downregulate gene expression in response to a defect in mRNA export. *Embo J* **24**(4), 813-823.

Vitaliano-Prunier, A., Babour, A., Herissant, L., Apponi, L., Margaritis, T., Holstege, F. C., Corbett, A. H., Gwizdek, C. and Dargemont, C. (2012). H2B ubiquitylation controls the formation of export-competent mRNP. *Molecular cell* **45**(1), 132-139.

Vitaliano-Prunier, A., Menant, A., Hobeika, M., Geli, V., Gwizdek, C. and Dargemont, C. (2008). Ubiquitylation of the COMPASS component Swd2 links H2B ubiquitylation to H3K4 trimethylation. *Nature cell biology* **10**(11), 1365-1371.

Vodala, S., Abruzzi, K. C. and Rosbash, M. (2008). The nuclear exosome and adenylation regulate posttranscriptional tethering of yeast GAL genes to the nuclear periphery. *Mol Cell* **31**(1), 104-113.

Voges, D., Zwickl, P. and Baumeister, W. (1999). The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annual review of biochemistry* **68**, 1015-1068.

Warner, M. H., Roinick, K. L. and Arndt, K. M. (2007). Rtf1 is a multifunctional component of the Paf1 complex that regulates gene expression by directing cotranscriptional histone modification. *Molecular and cellular biology* **27**(17), 6103-6115.

Weake, V. M., Lee, K. K., Guelman, S., Lin, C. H., Seidel, C., Abmayr, S. M. and Workman, J. L. (2008). SAGA-mediated H2B deubiquitination controls the development of neuronal connectivity in the Drosophila visual system. *The EMBO journal* **27**(2), 394-405.

Weake, V. M. and Workman, J. L. (2008). Histone ubiquitination: triggering gene activity. *Molecular cell* **29**(6), 653-663.

Weake, V. M. and Workman, J. L. (2012). SAGA function in tissue-specific gene expression. *Trends in cell biology* **22**(4), 177-184.

Weirich, C. S., Erzberger, J. P., Berger, J. M. and Weis, K. (2004). The N-terminal domain of Nup159 forms a beta-propeller that functions in mRNA export by tethering the helicase Dbp5 to the nuclear pore. *Mol Cell* **16**(5), 749-760.

Wellinger, R. J. and Zakian, V. A. (2012). Everything you ever wanted to know about *Saccharomyces cerevisiae* telomeres: beginning to end. *Genetics* **191**(4), 1073-1105.

Bibliografía

Widom, J. (1998). Structure, dynamics, and function of chromatin in vitro. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **27**, 285-327.

Wilmes, G. M., Bergkessel, M., Bandyopadhyay, S., Shales, M., Braberg, H., Cagney, G., Collins, S. R., Whitworth, G. B., Kress, T. L., Weissman, J. S., Ideker, T., Guthrie, C. and Krogan, N. J. (2008). A genetic interaction map of RNA-processing factors reveals links between Sem1/Dss1-containing complexes and mRNA export and splicing. *Molecular cell* **32**(5), 735-746.

Wilmes, G. M. and Guthrie, C. (2009). Getting to the gate: crystallization of a Sac3(CID):Sus1:Cdc31 complex. *Molecular cell* **33**(6), 671-672.

Williams, S. K. and Tyler, J. K. (2007). Transcriptional regulation by chromatin disassembly and reassembly. *Current opinion in genetics & development* **17**(2), 88-93.

Wondrak, G. T., Cervantes-Laurean, D., Jacobson, E. L. and Jacobson, M. K. (2000). Histone carbonylation in vivo and in vitro. *The Biochemical journal* **351 Pt 3**, 769-777.

Wood, A., Krogan, N. J., Dover, J., Schneider, J., Heidt, J., Boateng, M. A., Dean, K., Golshani, A., Zhang, Y., Greenblatt, J. F., Johnston, M. and Shilatifard, A. (2003). Bre1, an E3 ubiquitin ligase required for recruitment and substrate selection of Rad6 at a promoter. *Mol Cell* **11**(1), 267-274.

Wood, A., Schneider, J., Dover, J., Johnston, M. and Shilatifard, A. (2003). The Paf1 complex is essential for histone monoubiquitination by the Rad6-Bre1 complex, which signals for histone methylation by COMPASS and Dot1p. *The Journal of biological chemistry* **278**(37), 34739-34742.

Wood, A., Schneider, J., Dover, J., Johnston, M. and Shilatifard, A. (2005). The Bur1/Bur2 complex is required for histone H2B monoubiquitination by Rad6/Bre1 and histone methylation by COMPASS. *Molecular cell* **20**(4), 589-599.

Wu, P. Y., Ruhlmann, C., Winston, F. and Schultz, P. (2004). Molecular architecture of the *S. cerevisiae* SAGA complex. *Molecular cell* **15**(2), 199-208.

Wyce, A., Xiao, T., Whelan, K. A., Kosman, C., Walter, W., Eick, D., Hughes, T. R., Krogan, N. J., Strahl, B. D. and Berger, S. L. (2007). H2B ubiquitylation acts as a barrier to Ctk1 nucleosomal recruitment prior to removal by Ubp8 within a SAGA-related complex. *Molecular cell* **27**(2), 275-288.

Xiao, T., Hall, H., Kizer, K. O., Shibata, Y., Hall, M. C., Borchers, C. H. and Strahl, B. D. (2003). Phosphorylation of RNA

Bibliografía

polymerase II CTD regulates H3 methylation in yeast. *Genes & development* **17**(5), 654-663.

Xiao, T., Kao, C. F., Krogan, N. J., Sun, Z. W., Greenblatt, J. F., Osley, M. A. and Strahl, B. D. (2005). Histone H2B ubiquitylation is associated with elongating RNA polymerase II. *Molecular and cellular biology* **25**(2), 637-651.

Xin, H., Takahata, S., Blanksma, M., McCullough, L., Stillman, D. J. and Formosa, T. (2009). yFACT induces global accessibility of nucleosomal DNA without H2A-H2B displacement. *Molecular cell* **35**(3), 365-376.

Xu, M. and Cook, P. R. (2008). The role of specialized transcription factories in chromosome pairing. *Biochimica et biophysica acta* **1783**(11), 2155-2160.

Xu, Q., Li, M., Adams, J. and Cai, H. N. (2004). Nuclear location of a chromatin insulator in *Drosophila melanogaster*. *Journal of cell science* **117**(Pt 7), 1025-1032.

Youdell, M. L., Kizer, K. O., Kisseleva-Romanova, E., Fuchs, S. M., Duro, E., Strahl, B. D. and Mellor, J. (2008). Roles for Ctk1 and Spt6 in regulating the different methylation states of histone H3 lysine 36. *Mol Cell Biol* **28**(16), 4915-4926.

Yu, Y., Eriksson, P., Bhoite, L. T. and Stillman, D. J. (2003). Regulation of TATA-binding protein binding by the SAGA complex and the Nhp6 high-mobility group protein. *Molecular and cellular biology* **23**(6), 1910-1921.

Zabaronick, S. R. and Tyler, J. K. (2005). The histone chaperone anti-silencing function 1 is a global regulator of transcription independent of passage through S phase. *Molecular and cellular biology* **25**(2), 652-660.

Zakian, V. A. (1996). Structure, function, and replication of *Saccharomyces cerevisiae* telomeres. *Annual review of genetics* **30**, 141-172.

Zhang, Y. (2003). Transcriptional regulation by histone ubiquitination and deubiquitination. *Genes & development* **17**(22), 2733-2740.

Zhang, Z., Hesselberth, J. R. and Fields, S. (2007). Genome-wide identification of spliced introns using a tiling microarray. *Genome research* **17**(4), 503-509.

