



VNIVERSITAT D VALÈNCIA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

**Identificación y Caracterización de Factores
Implicados en la Biogénesis de la RNA
Polimerasa II en *Saccharomyces cerevisiae***

Natalia Gómez Navarro
Tesis Doctoral 2013



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

**Identificación y Caracterización de Factores
Implicados en la Biogénesis de la RNA Polimerasa II
en *Saccharomyces cerevisiae***

Memoria presentada por Natalia Gómez Navarro
Para optar al grado de Doctora por la Universitat de València

Director: Francisco Estruch Ros

FRANCISCO ESTRUCH ROS, Doctor en Ciencias Biológicas y Catedrático de Universidad del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de València,

INFORMA: que Natalia Gómez Navarro, Licenciada en Bioquímica por la Universitat de València, ha realizado bajo su dirección el trabajo que con el título "Identificación y Caracterización de Factores Implicados en la Biogénesis de la RNA pol II en *Saccharomyces cerevisiae*" presenta para optar al grado de Doctora por la Universitat de València.

Burjassot, Diciembre de 2013

Dr. Francisco Estruch Ros

ÍNDICE

1. Introducción

| | |
|---|-----------|
| La transcripción por la RNA pol II en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>..... | 3 |
| Estructura del promotor..... | 3 |
| Formación del complejo pre-inicio (PIC)..... | 4 |
| Factores que regulan el ensamblaje del PIC..... | 6 |
| La elongación transcripcional..... | 9 |
| La salida del promotor..... | 9 |
| La pausa de la RNA pol II..... | 10 |
| La elongación productiva..... | 11 |
| Ciclo de fosforilación del dominio C-terminal (CTD) de la RNA pol II..... | 13 |
| La regulación de la elongación transcripcional mediante las paradas de la RNA pol II..... | 16 |
| Factores que reducen las paradas de la RNA pol II durante la elongación..... | 16 |
| Mecanismos moleculares para superar la parada de la elongación transcripcional..... | 18 |
| Las RNA polimerasas eucariotas..... | 22 |
| Estructura de la RNA pol II..... | 23 |
| El ciclo de la RNA pol II: biogénesis, transporte al núcleo y degradación..... | 25 |
| El ensamblaje de la RNA pol II..... | 25 |
| Factores que participan en el ensamblaje de la RNA pol II..... | 28 |
| Importación nuclear de la RNA pol II..... | 33 |
| La degradación de la RNA pol II..... | 38 |
| Mecanismo y regulación de la degradación de Rpb1p... | 39 |
| Reversión de la poliubiquitilación de Rpb1p..... | 41 |
| Objetivos..... | 43 |

2. Materiales y Métodos

| | |
|---|-----------|
| 2.1. Materiales..... | 47 |
| Medios y aditivos..... | 47 |
| Anticuerpos..... | 47 |
| Oligonucleótidos..... | 47 |
| Plásmidos..... | 52 |
| Cepas de <i>E. Coli</i> | 55 |
| Cepas de <i>S. cerevisiae</i> | 55 |
| 2.2. Métodos..... | 65 |
| Métodos de cultivo para bacterias..... | 65 |
| Métodos de cultivo para levaduras..... | 65 |
| Métodos de manipulación de microorganismos..... | 66 |
| Métodos de manipulación y análisis de ácidos nucleicos..... | 68 |
| Métodos de manipulación y análisis de proteínas..... | 74 |
| Ensayos de actividad β -galactosidasa..... | 81 |
| Técnicas microscópicas..... | 81 |

3. Rtp1p es una proteína tipo carioferina requerida para la biogénesis de la RNA pol II

| | |
|--|-----------|
| 3.1. Resultados..... | 86 |
| Mutaciones en el gen <i>RTP1</i> suprimen la deficiencia del factor transcripcional NC2..... | 86 |
| Caracterización fenotípica del mutante <i>rtp1</i> | 88 |
| El gen <i>RTP1</i> codifica una proteína formada por repeticiones tipo HEAT..... | 90 |
| La proteína Rtp1p está distribuida por toda la célula..... | 91 |
| Rtp1p interacciona <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> con Nup100p y Nup116p.. | 93 |
| Rtp1p no interacciona <i>in vivo</i> con las GTPasas candidatas a participar en la importación de la RNA pol II..... | 96 |
| Rtp1p se requiere para la importación nuclear de la RNA pol II | 97 |
| Rtp1p interacciona con la RNA pol II..... | 100 |
| Iwr1p puede ser importada al núcleo en ausencia de Rtp1p..... | 103 |
| Efecto de la ausencia de distintas carioferinas en la localización celular de Rpb1p..... | 107 |

| | |
|--|------------|
| Rtp1p interacciona con componentes del complejo R2TP..... | 109 |
| La alteración en la localización celular de Rpb2-GFP causada por la sobre-expresión de Rpb2tp (una versión truncada de Rpb2p) es suprimida por la sobre-expresión de Rtp1p | 111 |
| Rtp1p interacciona físicamente <i>in vivo</i> con la región N-terminal de Rpb2p..... | 115 |
| 3.2. Discusión..... | 116 |

4. Distintas vías para la importación nuclear de la RNA polimerasa II

| | |
|---|------------|
| 4.1. Resultados..... | 122 |
| La localización nuclear de las subunidades grandes y pequeñas de la RNA pol II se ve afectada de forma distinta por mutaciones en <i>IWR1</i> y <i>RTP1</i> | 122 |
| La depleción de Npa3p y la presencia de benomil tienen efectos distintos en la distribución celular de las subunidades grandes y pequeñas de la RNA pol II..... | 124 |
| La inhibición de la exportina Xpo1p no afecta a la localización celular de la RNA pol II..... | 126 |
| La deleción de componentes de R2TP afecta parcialmente a la importación nuclear de las subunidades grandes de la RNA pol II | 127 |
| Efecto de la deleción de RPAP1 y RPAP2 en la localización celular de la RNA pol II..... | 129 |
| La depleción de cualquiera de las subunidades de la RNA pol II afecta a la importación nuclear de las dos subunidades mayores de la polimerasa..... | 131 |
| La estabilidad de Rpb3p no se ve afectada por condiciones que afectan al ensamblaje o a la importación nuclear de la RNA pol II..... | 133 |
| Rpb1p y Rpb2p se acumulan en el núcleo en células de <i>Δ<i>iwr1</i></i> en condiciones de crecimiento lento..... | 135 |
| 4.2. Discusión..... | 137 |

| | |
|---|------------|
| 5. Estudio de la función nuclear de Iwr1p | |
| 5.1. Resultados | 142 |
| <i>IWR1</i> interacciona genéticamente con los factores de elongación transcripcional <i>DST1</i> y <i>SPT4</i> | 142 |
| La delección de <i>IWR1</i> incrementa la densidad de RNA pol II en el extremo 3' del gen <i>YLR454</i> | 145 |
| La ausencia de Iwr1p afecta a los niveles de la proteína Rpb1p en la célula..... | 147 |
| La degradación de Rpb1p inducida por defectos en la transcripción depende de la presencia de Iwr1p..... | 150 |
| 5.2. Discusión | 153 |
| | |
| 6. Estudios transcriptómicos y proteómicos | |
| Efectos transcriptómicos de la delección de <i>IWR1</i> y <i>RTP1</i> | |
| 6.1. Resultados | 160 |
| Resultados globales del análisis transcriptómico de los mutantes $\Delta iwr1$ y $\Delta rtp1$ | 160 |
| Solapamiento en los genes con niveles de transcrito alterados entre los mutantes $\Delta iwr1$ y $\Delta rtp1$ | 163 |
| Agrupación en categorías funcionales de los genes obtenidos en los análisis transcriptómicos de los mutantes $\Delta iwr1$ y $\Delta rtp1$ | 175 |
| 6.2. Discusión | 183 |
| Estudios proteómicos para la identificación de nuevos factores implicados en la biogénesis de la RNA pol II | |
| 6.3. Resultados | 186 |
| Purificación de distintas subunidades de la RNA pol II en condiciones que dificultan el ensamblaje del holoenzima..... | 186 |
| 6.4. Discusión | 187 |
| | |
| 7. Conclusiones | 193 |
| | |
| 8. Bibliografía | 197 |

1. Introducción

La transcripción por la RNA pol II en *Saccharomyces cerevisiae*

La transcripción es el proceso de síntesis enzimática de un RNA a partir de una secuencia complementaria de DNA. En eucariotas, la transcripción de los genes que codifican proteínas la lleva a cabo la RNA polimerasa II (RNA pol II), junto con una gran cantidad de factores auxiliares que participan en el proceso actuando a diferentes niveles.

La transcripción se puede dividir en distintas etapas. En la etapa de inicio se produce la unión de la RNA pol II al promotor, formando, junto con los factores generales de transcripción (GTFs), el llamado “complejo pre-inicio” (PIC). A continuación empieza la síntesis de RNA y, eventualmente, la RNA pol II abandona el promotor para entrar en una etapa de elongación productiva que termina cuando el gen ha sido completamente transcrito. En la última etapa (terminación) tiene lugar a la liberación de la RNA pol II y su reciclaje, de modo puede iniciar un nuevo ciclo de transcripción. Acoplados a estas etapas, se desarrollan otros procesos relacionados con la maduración y el transporte del mRNA (Perales y Bentley, 2009).

Estructura del promotor

Los promotores de los genes transcritos por la RNA pol II están compuestos por diferentes sitios de unión para proteínas reguladoras específicas de gen y por un núcleo o *core* compuesto por la caja TATA y/o por un elemento iniciador (Inr) (Pugh, 2000). La caja TATA es una secuencia rica en A/T, localizada aproximadamente a unos 25 o 30 nucleótidos aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción, que es reconocida por la *TATA-binding protein* (TBP) (Smale y Kadonaga, 2003). Pero no todos los genes poseen caja TATA, en *S. cerevisiae* sólo se ha identificado en aproximadamente el 20% de los genes (Basehoar et al.,

2004). Estos genes, denominados TATA-less, poseen en su lugar una secuencia que hace la función de la caja TATA, como la secuencia GAE (*GA element*) que se encuentra a la misma distancia que la caja TATA del Inr (Seizl et al., 2011). El elemento iniciador, Inr, contiene una secuencia rica en pirimidinas rodeando al sitio de inicio de la transcripción. La localización de la caja TATA es crítica para el posicionamiento de la burbuja de transcripción y, por lo tanto, del punto en el que se inicia el proceso (Breathnach y Chambon, 1981). Pero en realidad es el Inr el que es capaz de dirigir un inicio transcripcional preciso, bien solo o bien junto con la caja TATA u otros elementos del *core* del promotor. Además de la caja TATA o GAE y del Inr, los promotores poseen otras secuencias que también se ven implicadas en el inicio de la transcripción: el elemento DPE (*downstream promoter element*), el MTE (*motif ten element*), el DCE (*downstream core element*), el BRE^u (*upstream TFIIB-recognition element*) y el BRE^d (*downstream TFIIB-recognition element*). Cualquier promotor debe tener una o más de estas secuencias, pero rara vez se han visto todas ellas en un mismo promotor. Así pues, en levadura, la combinación de estas secuencias da lugar a una gran diversidad de promotores. Todos estos elementos son secuencias características del DNA que contribuyen a un correcto ensamblaje del PIC en el lugar adecuado del promotor.

Formación del complejo pre-inicio (PIC)

Para que la RNA pol II inicie la transcripción se requiere la formación del PIC en los promotores de los genes a transcribir. Para que la maquinaria general de transcripción se ensamble sobre el *core* del promotor se necesita la participación de una serie de factores, junto con la propia RNA pol II (Thomas y Chiang, 2006). Los factores de transcripción generales (GTFs) median en el reconocimiento del promotor y junto con la RNA pol II y el promotor de DNA forman el PIC.

A partir de experimentos de reconstrucción *in vitro* se ha propuesto un modelo secuencial y ordenado para el ensamblaje del PIC. En este modelo, el ensamblaje comienza por la unión de la TBP al promotor del gen mediada por activadores transcripcionales en coordinación con la estructura local de la cromatina (Agalioti et al., 2002; Hassan et al., 2002; Lemon y Tjian, 2000; Pugh y Tjian, 1991).

Estudios más recientes proponen que la formación del PIC es dependiente de la naturaleza del promotor. En esta nueva visión del proceso, la entrada de la TBP puede estar facilitada por distintos factores (TAFs, el Mediador o SAGA) en función del tipo de promotor (Figura 1.1; Sikorski y Buratowski, 2009). Así, los genes que contienen caja TATA (muchos de ellos asociados con la respuesta a estrés y altamente regulados) utilizan el complejo SAGA para facilitar la unión de TBP a la caja TATA (Basehoar et al., 2004).

Una vez se ha producido la unión de TBP al DNA, se unen al complejo TFIIA y TFIIB, seguido por la incorporación de la RNA pol II junto con TFIIF. Tras la unión de la RNA pol II, el subcomplejo TBP-TAFs interacciona con la cola CTD de la subunidad mayor de la RNA pol II. En este punto, para permitir que la RNA pol II comience su movimiento de alejamiento del promotor, se requiere la participación de los factores TFIIE y TFIIH. TFIIE interacciona directamente con TFIIF, TFIIB, RNA pol II y con el DNA del promotor, favoreciendo el reclutamiento de TFIIH (Thomas y Chiang, 2006). La subunidad Kin28p de TFIIH provoca la fosforilación de la RNA pol II, proceso que trataremos con más detalle a continuación.

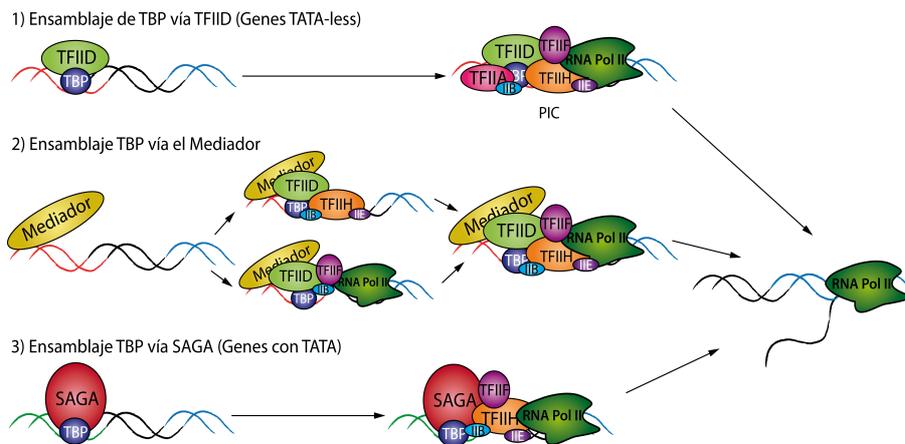


Figura 1.1. Diferentes vías de formación del PIC. Los factores y las vías de ensamblaje para formar un PIC transcripcionalmente competente pueden ser dependientes de promotor. **(1)** La entrada de TBP al promotor reclutada por el factor TFIID permite el reclutamiento de otros factores de iniciación. Esta vía en *S. cerevisiae* es más frecuente en los genes TATA-less. **(2)** El Mediador media la interacción entre activadores transcripcionales y la maquinaria basal de iniciación. En algunos promotores el Mediador puede reclutar a los factores de transcripción TFIIF y TFIIE de forma independiente de la RNA pol II. **(3)** TBP también puede ser reclutada por SAGA, preferentemente en los promotores con caja TATA. (Adaptado de Sikorski y Buratowski, 2009)

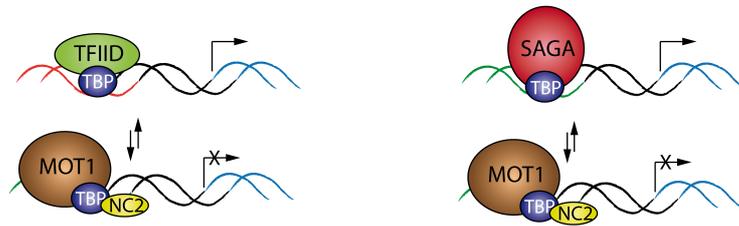
Factores que regulan el ensamblaje del PIC

Uno de los pasos clave en la regulación del inicio de la transcripción es la unión de TBP a su región diana del promotor. Existen varios factores encargados de modular el reclutamiento de la TBP o su función. La actividad de la TBP está regulada positivamente por los complejos TFIID y SAGA, complejos con funciones en el reclutamiento de la TBP y en la regulación transcripcional (Lee y Young, 2000). NC2 y Mot1p son otros dos reguladores transcripcionales con efectos directos sobre la actividad de la TBP. El represor NC2 (cofactor negativo 2), también conocido como Dr1-DRAP, está compuesto por dos subunidades, NC2 α (DRAP1) y NC2 β (Dr1),

que forman un complejo estable a través de dominios *histone fold* (Goppelt y Meisterernst, 1996; Kamada et al., 2001; Mermelstein et al., 1996). En *S. cerevisiae* existe un complejo homólogo (Bur6p/NC2 α e Ydr1p/NC2 β) necesario para el crecimiento celular (Gadbois et al., 1997; Kim et al., 1997).

NC2 se une al complejo TBP-DNA y bloquea el ensamblaje del PIC, impidiendo la asociación de TFIIA y TFIIB (Cang y Prelich, 2002; Goppelt y Meisterernst, 1996). Mot1p utiliza la energía de hidrólisis de ATP para disociar TBP del DNA (Auble et al., 1994; Chicca et al., 1998). Mot1p también es capaz de disociar TBP del DNA en presencia de NC2 (Darst et al., 2003) y NC2 estimula la interacción TBP-Mot1p (Klejman et al., 2004). De manera general, en *S. cerevisiae*, Mot1p y NC2 reprimen promotores con caja TATA y activan promotores sin caja TATA (Figura 1.2; Dasgupta et al., 2002; Huisinga y Pugh, 2007; Zanton y Pugh, 2004). En los promotores de los genes activados por estos factores se ha propuesto que la actividad ATPasa de Mot1p sería necesaria para disociar complejos TBP-promotor transcripcionalmente inactivos permitiendo la unión de TFIID o TBP libre que favorecería el ensamblaje de un complejo PIC funcional y la consiguiente transcripción (Figura 1.2; van Werven et al., 2008). Recientemente, se ha demostrado que NC2, Mot1p y TBP co-localizan, lo que indica que ambos factores pueden funcionar sobre los mismos promotores al mismo tiempo (van Werven et al., 2008). Este complejo no contiene otros GTFs ni RNA pol II, lo que se apoya la idea de que Mot1p y NC2 interaccionan con formas de TBP transcripcionalmente inactivas.

1) Papel negativo de Mot1 y NC2



2) Papel positivo de Mot1 y NC2

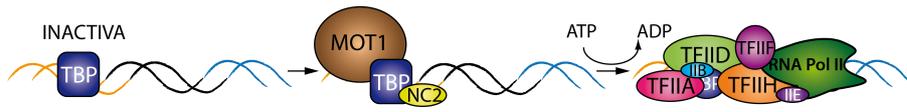


Figura 1.2: Funciones negativas y positivas de los factores Mot1p y NC2. (1) Mot1p y NC2 cooperan para restringir la acción de TBP, puesto que con su unión impiden la unión de los factores de transcripción TFIIA y TFIIB. **(2)** Mot1p y NC2 pueden eliminar la proteína TBP, cuando ésta está inactiva en el DNA, permitiendo la formación de PIC funcionales en su lugar.

Por otro lado, hay estudios que sugieren que NC2 puede afectar positivamente la transcripción de algunos genes (Chitikila et al., 2002; Geisberg et al., 2001). Se ha descubierto que NC2 permite la relocalización de la TBP a lo largo del DNA, una actividad que encaja con la estructura del complejo NC2-TBP-DNA, que parece una abrazadera que rodea al DNA (Schluesche et al., 2007). En cuanto a su función activadora de la transcripción, se ha propuesto que NC2 estabilizaría transitoriamente las interacciones débiles TBP-DNA (Cang y Prelich, 2002) o actuaría dirigiendo a la TBP al *core* de promotores catalizando su difusión a lo largo del DNA. En levadura, el componente Bur6p de NC2 se asocia preferentemente a promotores estimulados por Bur6p, sugiriéndose un papel directo en la transcripción de estos genes (Geisberg et al., 2001).

Defectos en NC2 afectan a la expresión del 17% de los genes de levadura y el papel dual de este factor en la transcripción se pone de manifiesto por el hecho de que la expresión de aproximadamente la mitad de

estos genes se incrementa en el mutante, mientras que la otra mitad se reduce (Geisberg et al., 2001).

Estudios proteómicos recientes (Arnett et al., 2008) nos muestran que la complejidad de las interacciones que implican a NC2 y Mot1p en el control de la regulación transcripcional es mucho mayor de lo que parece, por lo que futuros estudios serán necesarios para comprender el papel de estos factores reguladores.

La elongación transcripcional

La elongación transcripcional se define como un proceso en el cual la RNA pol II recorre la región codificante de un gen después de que se haya iniciado la síntesis del RNA en el promotor.

La salida del promotor

Una vez el PIC se ha formado, la apertura de unos 11 a 15 pares de bases del DNA dúplex permite la entrada de una de las hebras en el sitio activo de la polimerasa, lo que da lugar al denominado “complejo abierto” (Cramer, 2004). Una vez se ha formado el complejo abierto, se inicia la transcripción, con la entrada de dos nucleótidos trifosfato (NTPs) dictados por la secuencia de DNA, y se produce el primer enlace fosfodiéster del RNA naciente. Sin embargo, en este momento la RNA pol II todavía no es competente para la elongación productiva, antes debe pasar por una etapa conocida como salida del promotor. Durante esta etapa el PIC está parcialmente desensamblado, un conjunto de GTFs permanece en el promotor para servir de plataforma para la formación del siguiente PIC (Yudkovsky et al., 2000), y también permitir la interacción de los factores de elongación con el CTD (Sims et al., 2004). TFIIH desempeña un papel importante en la salida del promotor, en parte mediante la prevención de la detención prematura de la RNA pol II (Dvir et al., 1997; Goodrich y Tjian,

1994; Kumar et al., 1998). La subunidad quinasa dependiente de ciclina (cdk) Kin28p, de TFIIF, participa en la fosforilación del CTD de la RNA pol II, actuando concretamente sobre la serina en posición 5 de las repeticiones que incluye dicho dominio (ver más adelante Figura 1.3. y 1.4; Feaver et al., 1993). Esta fosforilación, conduce al reclutamiento de las enzimas que introducen la caperuza (*capping*) al mRNA y a la salida de la holoenzima del promotor (Thomas y Chiang, 2006).

Las primeras etapas de la transcripción están marcadas por la inestabilidad del complejo de transcripción. La RNA pol II se encuentra en un modo abortivo de elongación en el que hay una cierta tendencia a la liberación de productos de RNA cortos (Luse et al., 1987). No se logra la estabilidad del complejo de elongación hasta que los transcritos tienen una longitud de 8 a 9 nucleótidos, pero tampoco en ese momento se alcanza la elongación productiva. Hasta que el RNA naciente no alcanza los 23 nucleótidos la polimerasa tiene tendencia a sufrir un deslizamiento lateral sobre el DNA molde que deja el extremo 3' del transcrito fuera del sitio activo, produciendo la parada de la RNA pol II (Pal y Luse, 2003). Esta situación puede ser resuelta por la acción del factor de elongación TFIIS que, como veremos más adelante, es capaz de estimular la actividad endonucleolítica intrínseca de la RNA pol II, provocando el corte del RNA de forma que el extremo 3' libre queda situado en el sitio activo (Cramer, 2004).

La pausa de la RNA pol II

Justo tras su salida del promotor, la polimerasa sufre una pausa que permite tanto el ensamblaje de los factores de elongación y maduración del RNA, como de los factores implicados en la adición de la caperuza al RNA naciente. Esta pausa depende del complejo DSIF, que fue identificado en humanos por su capacidad de inhibir la elongación transcripcional cuando

las células son tratadas con el inhibidor de quinasas DRB (Figura 1.3). Se trata de un complejo, presente en todos los eucariotas, formado por las proteínas Spt4p y Spt5p (Wada et al., 1998) que interacciona físicamente con la RNA pol II (Hartzog et al., 1998). Además la subunidad Spt5p interacciona con algunos de los factores encargados de la adición de la caperuza al extremo 5' del RNA (Lindstrom et al., 2003; Pei y Shuman, 2002).

En mamíferos también se ha identificado otro complejo implicado en la pausa de la polimerasa, el complejo NELF (Narita et al., 2003), que está ausente en la levadura (Figura 1.3).

La elongación productiva

Finalmente, tras la adición de la caperuza en el extremo 5' del RNA, la RNA pol II sale de la pausa y la transcripción alcanza la fase de elongación productiva. En esta fase la síntesis del RNA se produce a una tasa constante, salvo en situaciones que comprometen la elongación y dan lugar a una pausa o bloqueo de la RNA pol II. Existe todo un séquito de factores de elongación que actúan para permitir que la elongación transcripcional sea eficiente (Krogan et al., 2002; Shilatifard et al., 2003). En esta transición es determinante el papel llevado a cabo por dos complejos con papeles distintos, pero que en caso de mutación de alguno de ellos cada uno puede sustituir al otro (Wood y Shilatifard, 2006a). Uno de ellos es el complejo CTDK formado por las subunidades Ctk1p, Ctk2p y Ctk3p encargado de fosforilar el CTD en la serina 2 (Wood y Shilatifard, 2006b). El otro, formado por la quinasa Bur1p y la ciclina Bur2p, tiene como sustrato Spt5p, una de las subunidades de DSIF, y a través de su fosforilación, elimina el efecto negativo de este complejo en la elongación transcripcional (Figura 1.3; Keogh et al., 2003).

Al complejo DSIF, formado por las subunidades Spt4p y Spt5p, además de un papel negativo sobre la elongación también se le ha asignado una función positiva en el proceso (Wada et al., 1998). Este complejo acompaña a la RNA pol II durante todo el proceso de elongación. Mutaciones en cualquiera de sus dos subunidades provocan la sensibilidad de las células a 6-Azauracilo (6-AU), una droga que compromete la elongación al disminuir la disponibilidad de nucleótidos trifosfato. La delección de *SPT4* provoca, además, un sesgo en la distribución de las polimerasas activas, produciendo una mayor acumulación de éstas en el extremo 5' de los genes (Rodríguez-Gil et al., 2010).

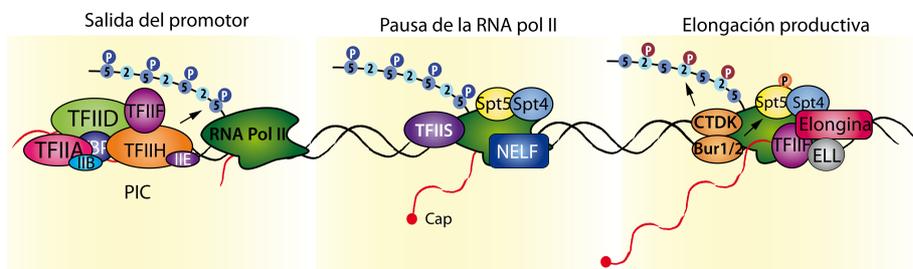


Figura 1.3: Etapas iniciales de la elongación transcripcional. La salida del promotor está caracterizada por la fosforilación de la serina 5 del dominio CTD por la quinasa TFIIH. En la pausa de la RNA pol II participan los factores Spt4p y Spt5p, y se produce la adición de la caperuza al RNA nascente. La elongación productiva se alcanza gracias a la acción de las quinasas CTDK, que fosforila la serina 2 del dominio CTD, y Bur1/2p que fosforila Spt5p. Durante la elongación productiva participan muchos otros factores como la elongina, el factor TFIIF y el factor ELL.

En la regulación de la elongación transcripcional también tienen un papel determinante los factores relacionados con la modificación de la cromatina, como HMG14 y HMG17 (Bustin et al., 1995; Ding et al., 1994), FACT (Orphanides et al., 1998), y el complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF (Imbalzano et al., 1994; Kwon et al., 1994).

Ciclo de fosforilación del dominio C-terminal (CTD) de la RNA pol II

La dinámica de fosforilación de la CTD dirige el ciclo de transcripción, jugando un papel muy importante en la transición del inicio a la elongación transcripcional, en la salida del promotor, en la elongación temprana, así como en la elongación productiva, terminación y en el procesamiento del mRNA.

La RNA pol II es un complejo multiproteico formado por doce subunidades (Rpb1p-Rpb12p), de cuya estructura y ciclo de vida trataremos en profundidad más adelante. La subunidad mayor de este complejo, Rpb1p, posee en su extremo carboxilo terminal (CTD) un número variable de repeticiones (en *S. cerevisiae* de 26-27 repeticiones en tándem) del heptapéptido Tyr₁-Ser₂-Pro₃-Thr₄-Ser₅-Pro₆-Ser₇ (YSPTSPS) conservado en todos los eucariotas (Allison et al., 1985; Corden et al., 1985). El CTD (desde el aminoácido 1535 al 1733 en levadura) forma una extensión desestructurada que está unida de manera flexible a una región adyacente al canal de salida del RNA a través de un conector de 80 residuos. Dicho dominio proporciona una plataforma sobre la que pueden interaccionar diversas proteínas involucradas en el procesamiento del RNA (Meinhart et al., 2005). Además, se trata de un buen sustrato de fosforilación, ya que cinco de los siete residuos consenso son potenciales fosfoaceptores. El grado de fosforilación del CTD se correlaciona con la actividad de la polimerasa y también afecta a las interacciones del CTD con los factores de procesamiento del RNA (Proudfoot et al., 2002). De estas fosforilaciones destacan la fosforilación de las serinas situadas en las posiciones 2 y 5 del heptapéptido. Recientemente, la fosforilación de la serina en posición 7 también se ha relacionado con el reclutamiento de factores durante la transcripción (Egloff et al., 2011).

El estado de fosforilación del CTD está ligado a las distintas fases de la actividad de la RNA pol II. Cuando ésta se une al promotor, el CTD se encuentra hipofosforilado, y con el inicio de la transcripción se produce la fosforilación de la serina 5. El nivel de fosforilación en la serina 5 se mantiene muy elevado durante la elongación de las primeras decenas de nucleótidos para, a continuación, caer rápidamente. A medida que la polimerasa avanza a lo largo del gen la fosforilación de la serina 2 va aumentando (Komarnitsky et al., 2000). Se ha visto que este ciclo de fosforilaciones del CTD es uniforme sino en todos, prácticamente en todos los genes (Bataille et al., 2012). Estudios de inmunoprecipitación de cromatina revelan que la RNA pol II fosforilada en serina 5 se localiza preferentemente en regiones cercanas al promotor mientras que no se detecta en las regiones situadas cerca del extremo 3' (Komarnitsky et al., 2000). Al mismo tiempo, la cantidad de RNA pol II fosforilada en serina 2 aumenta en la región 3' de los genes (Figura 1.4.B). Así pues, la fosforilación del CTD en serina 5 esta relacionada con inicio y elongación temprana, mientras que la fosforilación en serina 2 se asocia a la RNA pol II situada más lejos del promotor. Recientemente, la fosforilación de la tirosina en posición 1 se ha implicado en la coordinación del ciclo transcripcional. La tirosina 1 fosforilada participa en el reclutamiento del factor de elongación Spt6p a la vez que dificulta la unión al CTD de los factores de terminación Nrd1p, Pcf11p y Rtt103p (Mayer et al., 2012).

La fosforilación de estos residuos se lleva a cabo por la actuación de diversos factores con distinta relevancia durante las distintas fases del proceso de transcripción: TFIIH, el complejo CTDK, y el par Bur1/Bur2p (Wood y Shilatifard, 2006a). TFIIH se encarga de la fosforilación de la serina 5 durante el inicio de la transcripción. Y los complejos Bur1/2p y CTDK fosforilan la serina 2 del CTD durante la fase de elongación productiva. En cuanto a la desfosforilación del CTD se conocen tres fosfatasa implicadas: Fcp1p con un papel positivo durante la elongación

(Mandal et al., 2002) y en terminación, con la desfosforilación parcial de la serina 2 (Bataille et al., 2012), Ssu72p que participa en terminación y desfosforila los residuos de serina 5 y serina 7 (Bataille et al., 2012), y la recientemente descrita Rtr1p que juega un papel en la transición de la fosforilación de serina 5 a serina 2, concretamente realizando la desfosforilación de la serina 5 del CTD (Mosley et al., 2009; Figura 1.4.A).

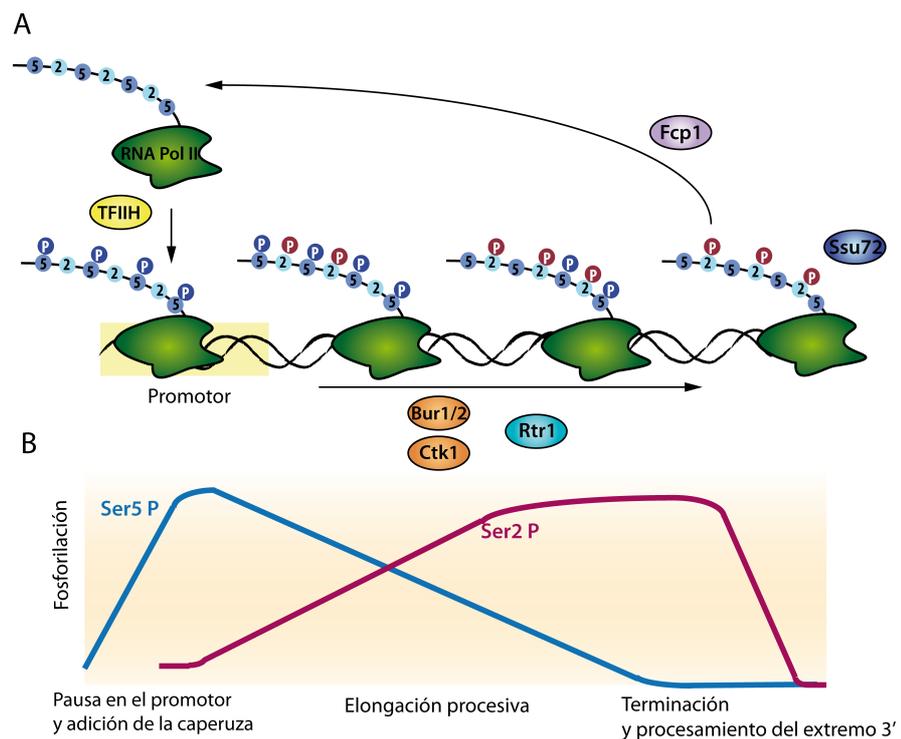


Figura 1.4. Ciclo de fosforilación del CTD de la subunidad mayor de la RNA pol II. (A) Inicialmente, en el promotor de los genes, el dominio CTD es fosforilado en la serina 5 por la quinasa Kin28p, una subunidad de TFIIF. La salida del promotor se produce gracias a la acción de las quinasas Ctk1p y Bur1p/2p y a la fosfatasa Rtr1p que se encargan de cambiar la marca en serina 5 por la fosforilación en serina 2. Finalmente las fosfatasas Ssu72p y Fcp1p están implicadas en la terminación de la transcripción y en el reciclaje de la RNA pol II. (B) En la gráfica se representan los cambios en los niveles de fosforilación de la CTD durante en ciclo de transcripción. (Adaptado de Sims et al., 2004; Svejstrup, 2012).

La regulación de la elongación transcripcional mediante las paradas de la RNA pol II

Generalmente, la regulación de la transcripción llevada a cabo por la RNA pol II se ha limitado al control de las etapas de ensamblaje del PIC y inicio de la transcripción, pero un importante número de genes regulan su transcripción en etapas posteriores (Margaritis y Holstege, 2008). Entre otros, los mecanismos implicados en elongación proporcionan una posibilidad más de regulación.

El proceso de elongación, lejos de ser un proceso continuo incluye frecuentes paradas de la RNA pol II debido a que ésta, en su recorrido a lo largo del gen, se encuentra con distintos obstáculos (alteraciones en el DNA o la propia presencia de nucleosomas) que dificultan que el proceso pueda considerarse como una etapa continua.

Experimentos *in vitro* han demostrado que el estado de parada, en el que la RNA pol II sigue activa, es un estado muy inestable, que deriva en la reanudación de la transcripción o bien en una situación de bloqueo del complejo de elongación (Gu y Reines, 1995).

Factores que reducen las paradas de la RNA pol II durante la elongación

El complejo de elongación, consistente en la RNA pol II, el DNA molde y el RNA naciente, es un complejo procesivo, pero también altamente sensible a señales intrínsecas y extrínsecas que comprometen la elongación y dan como resultado la parada de la RNA pol II. En estas situaciones se hacen necesarios una serie de factores de elongación que permiten la reactivación de las polimerasas que se encuentran en situación de parada. Estos factores se pueden dividir en dos categorías. La primera incluye aquellos factores que suprimen las pausas transitorias de la RNA pol II e incrementan la tasa de

elongación como son, las proteínas NusA y NusG en procariotas, y la elonguina, TFIIF y ELL en eucariotas (Conaway y Conaway, 1999; Conaway et al., 2000; Shilatifard, 1998; Uptain y Chamberlin, 1997). La segunda categoría incluye factores capaces de reactivar a la RNA pol II después de su parada durante la elongación como es el caso de los factores GreA y GreB en procariotas y del factor TFIIS en eucariotas. Estos factores estimulan la actividad de corte intrínseca de la RNA pol II con el objeto de rescatarla de la situación de parada (Fish y Kane, 2002).

El factor de transcripción TFIIF, además de tener un papel durante el inicio de transcripción, también posee un papel durante la elongación transcripcional estabilizando la conformación activa de la RNA pol II y reduciendo el tiempo de pausa de ésta (Bengal et al., 1991; Kephart et al., 1994; Tan et al., 1994). En cambio se desconoce el mecanismo por el que se lleva a cabo dicha función.

En mamíferos las proteínas de la familia ELL son capaces de suprimir (al menos *in vitro*) las pausas en la RNA pol II durante la elongación (Shilatifard et al., 1997). Sin embargo estas proteínas no tienen equivalente en *S. cerevisiae*.

La elonguina es un complejo formado por tres subunidades; elonguina A, B y C. La subunidad A se encarga de la estimulación de la elongación, con la ayuda de la subunidad C, mientras que la subunidad B es una chaperona que se encarga de facilitar la unión entre las subunidades A y C (Aso et al., 1995). Se ha descrito que la elonguina es capaz de disminuir la pausa de la polimerasa durante la elongación. En *S. cerevisiae* se han identificado genes con homología con las elonguinas A (Ela1p) y C (Elc1p), pero no con la B (Aso y Conrad, 1997). Sin embargo el complejo Ela1-Elc1 de levadura no es capaz de estimular la elongación transcripcional *in vitro* (Koth et al., 2000).

Por otro lado, las proteínas GreA y GreB en procariotas, y TFIIS en eucariotas, actúan sobre la RNA pol II cuando se encuentra parada durante la

elongación, estimulando su salida de esta situación. Al menos, parte de este proceso requiere que la RNA pol II hidrolice el transcrito naciente para formar así un nuevo extremo 3' y proseguir con la elongación. El modelo sugiere que, frente a un obstáculo durante la elongación, la RNA pol II sufre un retroceso sobre el molde de DNA, denominado en inglés "*backtracking*". Este movimiento resulta en la salida del sitio activo del extremo 3' del RNA naciente. En su lugar, ahora, el sitio activo lo ocupa un enlace fosfodiéster interno del RNA. Este enlace puede ser cortado por la RNA pol II y formar así un nuevo extremo 3' del RNA, posicionado correctamente en el sitio activo y que permite continuar con el proceso de elongación. La RNA pol II posee capacidad endonucleolítica intrínseca que ha de ser inducida en situaciones de bloqueo. Los factores encargados de la estimulación del proceso de corte son GreA y GreB en procariontes y TFIIIS en eucariotes (Figura 1.5; Fish y Kane, 2002). Los problemas transcripcionales debidos al retroceso de la RNA pol II son frecuentes *in vivo*, siendo la reactivación de las polimerasas bloqueadas crucial para la viabilidad celular (Sigurdsson et al., 2010).

Mecanismos moleculares para superar la parada de la elongación transcripcional

La RNA pol II no puede quedar permanentemente parada, ya que esto implicaría un bloqueo de la transcripción y obstaculizaría gravemente la replicación del ADN, provocando la inestabilidad del genoma y, finalmente, la muerte celular. Incluso en los casos en los que la parada de la RNA pol II juega un papel en la regulación de la transcripción es importante la existencia de mecanismos que permitan la reanudación de la transcripción (revisado en Gómez-Herreros et al., 2012a; Figura 1.6).

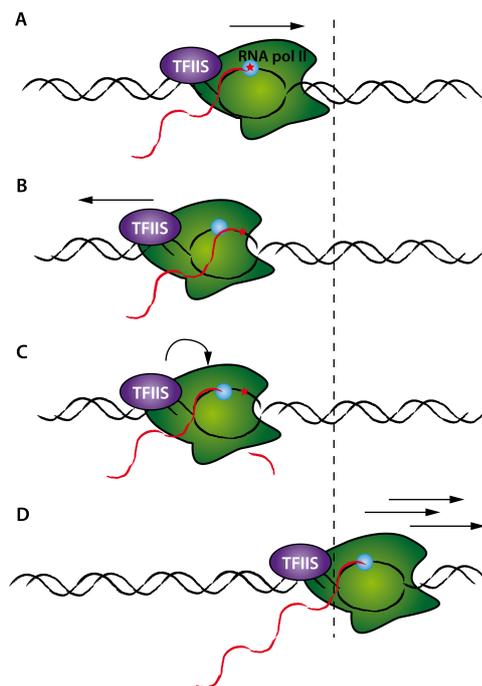


Figura 1.5: Modelo de acción del factor de corte TFIIIS sobre el complejo ternario (RNA pol II, DNA y RNA) bloqueado durante la elongación. El sitio activo de la RNA pol II se muestra como un círculo azul y el impedimento a la transcripción se representa mediante un punto rojo. **(A)** El complejo ternario se encuentra con un impedimento durante la elongación transcripcional. **(B)** El extremo 3' del RNA es desplazado del sitio activo de la RNA pol II. **(C)** El factor de transcripción TFIIIS estimula la actividad endonucleolítica de la RNA pol II y se produce el corte del RNA. **(D)** El nuevo extremo 3' del RNA generado ahora sirve como sustrato para continuar con la elongación transcripcional. (Adaptado de Fish y Kane, 2002).

La reactivación de la RNA pol II se puede producir de una manera dependiente del corte endonucleolítico de la RNA pol II, proceso que puede estar estimulado por el factor TFIIIS, o bien gracias a un mecanismo que no implica el corte del RNA y en el que la parada se supera mediante la estimulación del movimiento hacia delante de la RNA pol II. En este último

mecanismo participa el factor Ccr4-Not que, mediante su unión al RNA naciente, evita los movimientos hacia delante y hacia detrás de la RNA pol II, realineando el extremo 3' en el centro activo de la polimerasa (Kruk et al., 2011). Finalmente, y en última instancia, existe otra vía por la cual la RNA pol II es degradada y eliminada del molde de DNA. Este mecanismo se tratará con detalle más adelante en esta introducción.

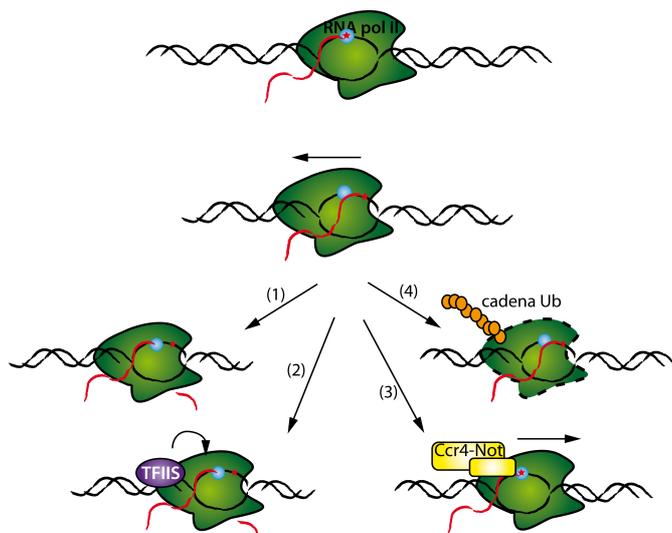


Figura 1.6: Mecanismos de reactivación de la RNA pol II. Un impedimento durante la elongación provoca la parada de la RNA pol II (arriba). Se produce el fenómeno de *backtraking* y el extremo 3' del RNA queda fuera del sitio activo de la RNA pol II (centro). Existen distintos mecanismos por los que la célula sale de esta situación. **(1)** La actividad endonucleolítica de RNA pol II produce el corte del RNA y la transcripción se puede reanudar. **(2)** Dicha actividad puede ser estimulada por el factor TFIIS. **(3)** La elongación se reanuda gracias a la actividad del factor Ccr4-Not. **(4)** La RNA pol II se marca para degradación y se degradada en el proteasoma. (Adaptado de Gómez-Herreros et al., 2012a).

El factor TFIIIS, en *S. cerevisiae* está codificado por el gen *DST1/PPR2*. La delección completa de este gen no da lugar a defectos en crecimiento, salvo cuando las células crecen a bajas temperaturas (Ghavi-Helm et al., 2008) o en presencia de drogas que disminuyen la cantidad de dNTP disponibles para la célula y que comprometen el proceso de elongación, como el 6-AU (Exinger y Lacroute, 1992).

La diana del 6-AU es la inositol monofosfato deshidrogenasa (IMPDH), que cataliza la conversión del inositol 5-monofosfato (IMP) a xantosina monofosfato (XMP), paso limitante en la síntesis *de novo* de nucleótidos de guanina (GTP). De esta manera, el efecto de esta droga se traduce en una reducción en los niveles intracelulares de GTP y UTP. En *S. cerevisiae* existen cuatro genes codificantes para la IMPDH, *IMD1* a *4*. La expresión de estos genes se ve afectada por los niveles de GTP. *IMD2* se expresa en ausencia de NTPs y está reprimido en presencia de guanina (Escobar-Henriques y Daignan-Fornier, 2001; Escobar-Henriques et al., 2001). La expresión de *IMD2* afecta la eficiencia de la elongación transcripcional, y numerosos mutantes con defectos en elongación transcripcional muestran una activación defectiva del mismo. Así la delección de *Dst1p* anula la inducción de *IMD2*, lo que genera una hipersensibilidad de estos mutantes a 6-AU (Shaw y Reines, 2000). Además, en presencia de 6-AU, la delección de *DST1* afecta a la procesividad de la RNA pol II sin afectar a su tasa de transcripción (Mason y Struhl, 2005).

También se ha establecido un papel de *Dst1p* en la expresión de los genes que codifican las proteínas estructurales del ribosoma, en condiciones de estrés transcripcional, ya que regula la cantidad de RNA pol II activa en estos genes (Gómez-Herreros et al., 2012b). Éste es un claro ejemplo de cómo la parada de la RNA pol II tiene implicaciones en la regulación de la expresión génica.

Las RNA polimerasas eucariotas

En bacterias y arqueas una única RNA polimerasa es suficiente para llevar a cabo la síntesis de todos los RNAs de la célula. En eucariotas, sin embargo, esta tarea está realizada por tres RNA polimerasas nucleares, cada una responsable de la síntesis de determinados tipos de RNA.

La RNA pol I se localiza en el nucleolo y se encarga principalmente de la transcripción de la mayoría de los rRNAs (18S y 28S). La RNA pol II actúa en el nucleoplasma y es la responsable de la síntesis de los precursores de mRNAs, algunos RNAs nucleares y nucleolares pequeños y otros RNAs no codificantes. La RNA pol III también reside en el nucleoplasma y se encarga de la transcripción del rRNA 5S, de los tRNAs y algunos RNAs de pequeño tamaño. En plantas, existen otras dos RNA polimerasas, la RNA pol IV y la RNA pol V. Ambas están relacionadas con el proceso de metilación del DNA y con la formación de la heterocromatina (Dalmay et al., 2000; Herr et al., 2005).

La estructura del *core* de la RNA polimerasa está conservada en eucariotas, procariotas y arqueas (Hirata y Murakami, 2009). La RNA polimerasa bacteriana está compuesta por cinco subunidades, que presentan homología con subunidades de las RNA polimerasas eucariotas (Vassilyev et al., 2002; Zhang et al., 1999; Tabla 1.1). Las tres polimerasas eucariotas tienen cinco subunidades comunes, (Tabla 1.1). Cinco de las subunidades del *core* están compartidas por todas las RNA polimerasas eucariotas (Rpb5p, Rpb6p, Rpb8p, Rpb10p y Rpb12p) y además las RNA pol I y III comparten dos subunidades adicionales (AC40 y 19), el resto son específicas (Tabla 1.1).

| RNA polimerasa | RNA pol I | RNA pol II | RNA pol III | RNA pol bacteriana |
|--|----------------|------------------------|----------------|--------------------|
| Subunidades del core | | | | |
| -específicas | A190 | Rpb1 | C160 | β |
| | A135 | Rpb2 | C128 | β' |
| | A12.2 | Rpb9 | C11 | |
| -parcialmente compartidas | AC40 | Rpb3 | AC40 | α |
| | AC19 | Rpb11 | AC19 | α |
| -compartidas | ABC27 | ABC27 (Rpb5) | ABC27 | |
| | ABC23 | ABC23 (Rpb6) | ABC23 | ω |
| | ABC14.5 | ABC14.5 (Rpb8) | ABC14.5 | |
| | ABC10 β | ABC10 β (Rpb10) | ABC10 β | |
| | ABC10 α | ABC10 α (Rpb12) | ABC10 α | |
| Subcomplejo Rpb4/Rpb7 | A14 | Rpb4 | C17 | |
| | A13 | Rpb7 | C25 | |
| Complejo TFIIIF o equivalente | A49 | Tfg1 | C37 | |
| | A34.5 | Tfg2 | C53 | |
| Subcomplejo específico de la RNA pol III | | | C82 | |
| | | | C34 | |
| | | | C31 | |
| Número de subunidades | 14 | 12 | 17 | 5 |
| Masa molecular (kDa) | 589 | 514 | 693 | 375 |

Tabla 1.1: Subunidades de las RNA polimerasas (Adaptado de Cramer et al., 2008).

Estructura de la RNA pol II

La RNA pol II está formada por doce subunidades, tanto en humanos como en levaduras, altamente conservadas en secuencia, arquitectura y función. Como se ha mencionado, de las doce subunidades, cinco están presentes en las tres RNA polimerasas eucariotas. Además,

cuatro presentan homología de secuencia con otras subunidades de las RNA pol I y III (Rpb1p, Rpb2p, Rpb3p y Rpb11p) y solamente las subunidades Rpb4p, Rpb7p, Rpb9p y el dominio carboxilo-terminal (CTD) de Rpb1p son exclusivos de la RNA pol II (revisado en Thomas y Chiang, 2006). Las subunidades Rpb1p y Rpb2p conforman el sitio activo de la enzima y forman una hendidura central en la estructura de la RNA pol II por la que entra el ácido nucleico (Armache et al., 2003; Bushnell y Kornberg, 2003; Cramer et al., 2000). Las diez subunidades restantes rodean a las dos subunidades mayores, de manera que proporcionan soporte estructural a la RNA pol II y regulan su actividad enzimática. Las subunidades Rpb4p y Rpb7p forman un heterodímero necesario para la formación del PIC y para el inicio de la transcripción, pero prescindible en la RNA pol II elongante (revisado en Cramer, 2004; Hahn, 2004; Hampsey, 1998; Lee y Young, 2000). Este heterodímero también participa en procesos tan diversos como la respuesta a estrés, la exportación de mRNAs y el mecanismo de reparación acoplado a la transcripción (TCR) (revisado en Sampath y Sadhale, 2005). Rpb3p parece estar implicada en el ensamblaje de la RNA pol II, mientras que las subunidades Rpb1p, Rpb2p y Rpb9p participa en el reconocimiento del sitio de inicio transcripcional (revisado en Hampsey, 1998). Rpb9p interviene en el mantenimiento de la fidelidad transcripcional a través de diferentes vías; tanto TFIIIS dependientes como independientes (Koyama et al., 2007; Nesser et al., 2006; Walmacq et al., 2009). Rpb9p desempeña, además, un papel importante en la ubiquitilación y degradación de Rpb1p en respuesta a radiación ultravioleta (Chen et al., 2007).

En la superficie de la RNA pol II se han descritos cinco dominios proteicos implicados en las múltiples uniones proteína-proteína que se establecen entre factores transcripcionales y la RNA pol II. En cada caso se ha identificado el factor o factores transcripcionales implicados en la interacción. Así, el dominio *Jaw* interacciona con el factor TFIIIS y TFIIE, el dominio *Funnel* con TFIIIS, el dominio *Dock* y el dominio *Wall* con el factor

TFIIB, y, finalmente, el dominio *Foot* con el factor transcripcional Spo14p y la enzima encargada de la adición de la caperuza al RNA naciente (García-López y Navarro, 2011).

El ciclo de la RNA pol II: biogénesis, transporte al núcleo y degradación

A pesar de que se posee un conocimiento detallado de los aspectos estructurales y funcionales de las RNA polimerasas en general, y de la RNA pol II en particular (Cramer et al., 2008), aún queda mucho por aprender sobre el "ciclo de vida" de estas máquinas celulares complejas. Los estudios sobre la biogénesis, translocación nuclear y degradación, se han abordado recientemente (Cloutier y Coulombe, 2010; Corden, 2011; Czeko et al., 2011; Wild y Cramer, 2012; Wilson et al., 2013b). En este apartado, se pretende realizar un examen exhaustivo, resumiendo el conocimiento actual sobre la biogénesis, el transporte al núcleo y la degradación de la RNA pol II.

El ensamblaje de la RNA pol II

Los datos estructurales que se disponen de la RNA pol II nos proporcionan información útil para entender su ensamblaje. Como se ha descrito anteriormente, las subunidades mayores de la RNA pol II, Rpb1p y Rpb2p, forman el sitio activo del enzima colocándose a lados opuestos de la hendidura central. Las otras subunidades más pequeñas se unen a Rpb1p (Rpb5p, Rpb6p y Rpb8p) o a Rpb2p (Rpb9p), dando lugar, respectivamente, a lo que se conoce como subcomplejo Rpb1 y subcomplejo Rpb2. El resto de subunidades forman el subcomplejo de Rpb3 (Rpb10p, Rpb11p y Rpb12p)

que interacciona con los anteriores. Estos tres subcomplejos forman el *core* de la RNA pol II al que se asocia el subcomplejo Rpb4/Rpb7 denominado tallo (“*stalk*”) (Figura 1.7).

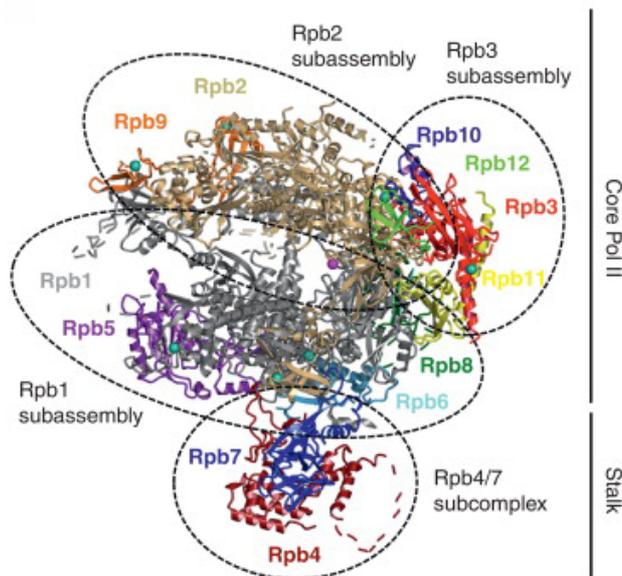


Figura 1.7: Estructura cristalina de la RNA pol II. El *core* de la RNA pol II puede ser dividido en tres subcomplejos, el subcomplejo Rpb1, el subcomplejo Rpb2 y el subcomplejo Rpb3. El tallo formado por las subunidades Rpb4p y Rpb7p sobresale del *core* (Wild y Cramer, 2012).

Ya a principio de los años setenta se realizaron los primeros estudios sobre el ensamblaje de la RNA polimerasa de *Escherichia coli* (Ishihama y Ito, 1972). El ensamblaje de la RNA polimerasa bacteriana empieza con la formación del dímero $\alpha\alpha$, que interacciona seguidamente con la subunidad β , para formar el intermediario $\alpha\alpha\beta$. Finalmente, se une la subunidad β' , probablemente previamente ensamblada a la subunidad ω (Figura 1.8.A).

Esta ruta de ensamblaje de la RNA polimerasa bacteriana se ha confirmado mediante experimentos de pulso y caza (Ishihama, 1981).

Debido a la elevada similitud estructural entre las RNA polimerasas bacterianas y las eucariotas (Cramer et al., 2001) y puesto que las subunidades Rpb1, 2, 3, 11 y 6 son homólogas a las subunidades bacterianas β' , β , α , α y ω , respectivamente (Tabla 1.1), se ha propuesto un modelo de ensamblaje de la RNA pol II análogo al existente en procariotas. Según este modelo el ensamblaje de la RNA pol II empezaría por la formación del subcomplejo de Rpb3, seguido por la unión del subcomplejo de Rpb2 y finalmente del subcomplejo de Rpb1 (Wild y Cramer, 2012; Figura 1.8.B).

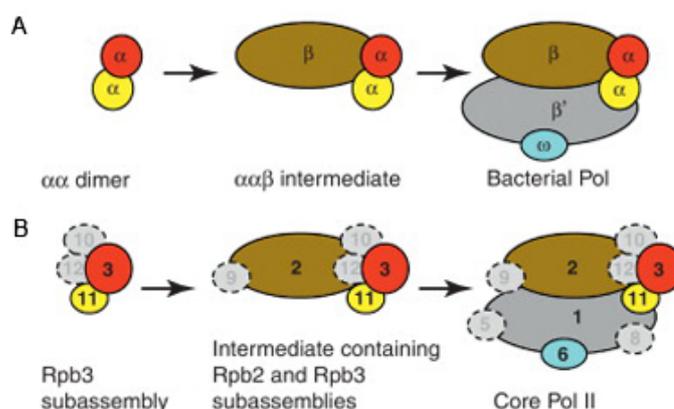


Figura 1.8: (A) Ensamblaje de la RNA polimerasa bacteriana. (B) Posible vía de ensamblaje del core de la RNA pol II. Las subunidades mostradas en línea discontinua no tienen homólogos en las RNA polimerasas bacterianas (Wild y Cramer, 2012)

Los niveles de proteína de las distintas subunidades de la RNA pol II no mantienen una proporción estequiométrica. Como se ha determinado en *Schizosaccharomyces pombe* (Kimura et al., 2001), Rpb3p es la subunidad menos abundante, y por tanto la limitante a la hora de formar el complejo.

Las dos subunidades mayores y Rpb7p se encuentran presentes en una cantidad dos veces mayor. Rpb4p once veces, Rpb9p y Rpb11p cuatro veces y las subunidades compartidas con las otras dos RNA polimerasas eucariotas (Rpb5p, 6, 8, 10 y 12) están en una cantidad de siete a quince veces mayor que Rpb3p. Además, mediante centrifugación en gradiente de glicerol se han encontrado a las subunidades más pequeñas (de Rpb4p a Rpb12p) fuera del complejo, lo que significa que pueden existir, al menos temporalmente, en forma libre en la célula (Kimura et al., 2001).

Recientemente, se han llevado a cabo estudios sobre el ensamblaje de las subunidades que integran la RNA pol II. Estos estudios han permitido identificar distintos intermediarios del proceso de ensamblaje, así como varios factores requeridos para la formación del holoenzima.

Factores que participan en el ensamblaje de la RNA pol II

En la biogénesis de las RNA polimerasas eucariotas intervienen además de las subunidades que forman la enzima madura, otras proteínas. La participación de factores auxiliares en el ensamblaje la sugiere el hecho de que la mezcla de subunidades purificadas de células humanas no da lugar a complejos (Acker et al., 1997). Además, tampoco fue posible obtener una RNA pol II funcional a partir de subunidades de origen recombinante expresadas en células de insectos (Kimura y Ishihama, 2000). La razón parece ser la necesidad de la presencia de factores adicionales que actúan como chaperonas o dirigen el proceso de ensamblaje.

Mediante la purificación de la RNA pol II por cromatografía de afinidad se han identificado varios factores que interaccionan con las RNA polimerasas eucariotas, en células humanas y de levadura (Gavin et al., 2002; Gavin et al., 2006; Krogan et al., 2006). Además, otros trabajos han identificado proteínas que interaccionan con la RNA pol II en la fracción soluble, y que podrían contener proteínas que participan en la biogénesis de

la misma (Boulon et al., 2010; Forget et al., 2010). Estos factores pueden jugar un papel en una o más fases del ciclo de vida de la RNA pol II, como el ensamblaje y/o transporte al núcleo y se indican en la Tabla 1.2.

| Factor de ensamblaje o importación de la RNA pol II (Humanos/levadura) | Datos que apoyan su papel funcional | Referencia |
|---|--|---|
| GPN1/NPA3 | Interacciona con la RNA pol II cuando ésta está parcialmente ensamblada. Su depleción o mutación provoca la acumulación citoplásmica de las subunidades de la RNA pol II | (Boulon et al., 2010); (Forget et al., 2010) (Carré y Shiekhattar, 2011) (Staresincic et al., 2011) |
| GPN2/YOR262w | Interacciona con la RNA pol II cuando ésta está parcialmente ensamblada | (Boulon et al., 2010) (Forget et al., 2010) |
| GPN3/YLR243w | Interacciona con la RNA pol II cuando ésta está parcialmente ensamblada. Su depleción o mutación provoca la acumulación citoplásmica de Rpb1 | (Boulon et al., 2010) (Forget et al., 2010) (Calera et al., 2011) |
| GrinL1a/- | Interacciona con la RNA pol II cuando ésta está parcialmente ensamblada | (Boulon et al., 2010) (Forget et al., 2010) |
| RPAP1/RBA50 | Interacciona con la RNA pol II cuando ésta está parcialmente ensamblada | (Boulon et al., 2010) (Forget et al., 2010) |
| RPAP2/RTR1 | Interacciona con la RNA pol II cuando ésta está parcialmente ensamblada | (Boulon et al., 2010) (Forget et al., 2010) |
| HSP90/HSP82 | Interacciona con la RNA pol II y I cuando éstas están parcialmente ensambladas. Su inhibición provoca una disminución de los niveles citoplasmáticos de Rpb1 en condiciones defectivas de ensamblaje | (Boulon et al., 2010) (Forget et al., 2010) (McClellan et al., 2007) |
| SCLC7A6OS/IWR1 | IWR1 proporciona la NLS para la importación nuclear de la RNA pol II. Su depleción provoca defectos en importación de la RNA pol II | (Czeko et al., 2011) |

| Factor de ensamblaje o importación de la RNA pol II (Humanos/levadura) | Datos que apoyan su papel funcional | Referencia |
|---|---|---|
| Complejo R2TP | Interacciona con la RNA pol II cuando ésta está parcialmente ensamblada. La depleción de hSpagh/Rpap3, un componente de R2TP provoca una disminución de los niveles citoplasmáticos de Rpb1 en condiciones defectivas de ensamblaje | (Boulon et al., 2010) (Forget et al., 2010) |
| Complejo CCT | Interacciona con GPN1 y con las subunidades de la RNA pol II | (Forget et al., 2010) (Dekker et al., 2008) |
| Microtúbulos | Drogas que afectan a la integridad de los microtúbulos provocan la acumulación citoplasmática de Rpb1 | (Forget et al., 2010) |

Tabla 1.2. Factores potenciales de ensamblaje o importación de la RNA pol II (Wild y Cramer, 2012).

A través de un análisis proteómico cuantitativo en células humanas, en el que se purificó la RNA pol II en condiciones que inhiben la transcripción y provocan la degradación de Rpb1p, se ha comprobado que existe un intermediario de ensamblaje, que se acumula en el citoplasma, y que está formado por las subunidades Rpb2p, Rpb3p, Rpb10p, Rpb11p y Rpb12p (Boulon et al., 2010). Interaccionando con este complejo los autores identificaron a las proteínas Gpn1p, Gpn2p, Gpn3p, Rpap1p, Rpap2p y GrinL1a (Tabla 1.2; Figura 1.9). Resultados de este trabajo sugieren que la chaperona HSP90 estabiliza la subunidad Rpb1p favoreciendo su ensamblaje con las restantes subunidades en el citoplasma. Además, se identificó un intermediario de ensamblaje formado por las subunidades Rpb1p y Rpb8p, en el que están presentes la co-chaperona de Hsp90, hSpagh (Rpap3p o Pih1p en levadura) como parte del complejo prefoldina R2TP (Figura 1.9). En levadura, el complejo R2TP fue identificado por las interacciones genéticas y físicas de sus componentes con la chaperona HSP90 (Zhao et al.,

2005). Está formado por cuatro proteínas: Rvb1p, Rvb2p, Pih1p y Tah1p, de las cuales tanto Pih1p como Tah1p interactúan con Hsp90p, mientras que Rvb1p y Rvb2p son proteínas relacionadas con la familia de las ATPasas AAA+ (Kakihara y Houry, 2012).

En esta misma línea, otro estudio realizado en células de humanos, identificó como factores de ensamblaje o importación al núcleo de la RNA pol II, al complejo R2TP y a los tres miembros de la familia GPN, Gpn1p, Gpn2p y Gpn3p (Tabla 1.2; Forget et al., 2010). A su vez, se ha descrito una interacción entre Gpn1p y el intermediario de ensamblaje de Rpb2 (Rpb2p, Rpb3p, Rpb10p, Rpb11p y Rpb12p) (Boulon et al., 2010).

En el proceso de ensamblaje de la RNA pol II en humanos también se ha implicado al factor URI, un componente del complejo tipo Prefoldina/R2TP (Forget et al., 2010; Boulon et al., 2010). En *S. cerevisiae* se ha descrito que el homólogo del factor URI, Bud27p, se encarga del correcto ensamblaje de las tres RNA polimerasas eucariotas, RNA pol I, II y III, mediando en la unión de las subunidades Rpb5p y Rpb6p en los últimos pasos de ensamblaje de la RNA pol II (Figura 1.9; Mirón-García et al., 2013).

En cuanto a la estructura de la RNA pol II también se ha descrito que la presencia del dominio *foot* de la RNA pol II es crucial para el correcto ensamblaje de ésta. Además, el correcto ensamblaje de la RNA pol II es un requisito para el funcionamiento adecuado de los distintos pasos del proceso de transcripción (Garrido-Godino et al., 2013).

Muchos de estos factores implicados en el proceso de ensamblaje de las subunidades que conforman la RNA pol II también se han visto implicados en acciones posteriores de importación al núcleo, lo que implicaría su unión al holoenzima aún cuando el complejo estuviese completamente formado.

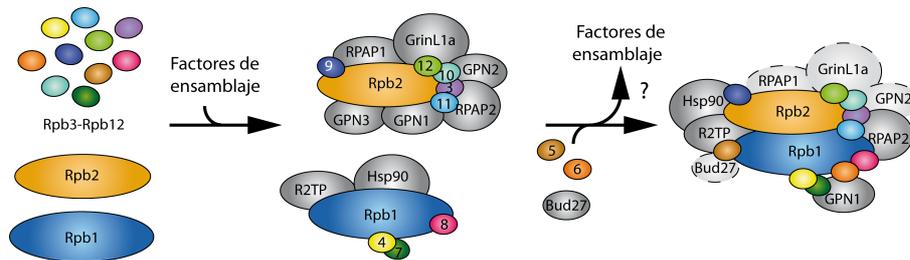


Figura 1.9: Modelo de ensamblaje de la RNA pol II. Diferentes factores de ensamblaje (mostrados en gris) participan en la formación de los dos intermediarios de ensamblaje mayoritarios, y posiblemente participan en su estabilización. A continuación los dos complejos intermediarios, uno conteniendo la subunidad mayor Rpb1p y el otro la subunidad Rpb2p junto con otras subunidades, y los factores de ensamblaje se unen para formar la RNA pol II completa. El momento en el que los factores de ensamblaje se liberan del holoenzima no está claro. Los factores de ensamblaje mostrados en línea discontinua son aquellos para los que no existen evidencias que apoyen su presencia en el complejo de la RNA pol II totalmente ensamblada.

Una cuestión sobre la que existe controversia en la bibliografía es si existe una única ruta de ensamblaje y si éste se produce en el citoplasma y/o en el núcleo. En relación a este aspecto, se ha observado que la depleción de cualquier subunidad de la RNA pol II conduce a la acumulación citoplasmática de Rpb1p, sugiriendo que Rpb1p necesita ser incorporada al complejo totalmente ensamblado antes de ser importada al núcleo (Boulon et al., 2010). La necesidad de un ensamblaje completo de la RNA pol II antes de su importación al núcleo también está en sintonía con el mecanismo de acción de la proteína Iwr1p de levadura (Czeko et al., 2011). Iwr1p se identificó como una proteína que interacciona con distintas subunidades de la RNA pol II (Krogan et al., 2006), y se une a la RNA pol II a través de la hendidura formada por unión de las subunidades Rpb1p y Rpb2p. Dado que la interacción entre los subcomplejos Rpb1 y Rpb2 constituye el último paso del ensamblaje de la polimerasa, esto implica que Iwr1p es únicamente

capaz de unirse a la RNA pol II completamente ensamblada (Czeko et al., 2011).

Por otra parte, Forget y colaboradores (2010), han identificado múltiples interacciones entre las subunidades de la RNA pol II y Gpn1p. Éstas y otras evidencias relacionan a Gpn1p con la importación de la RNA pol II al núcleo (Carré y Shiekhattar, 2011), aunque su función podría estar restringida a la importación de las subunidades mayores (Forget et al., 2010). Además, otro factor a tener en cuenta es que el tratamiento con Leptomicina B o Benomil, drogas que afectan a la importación nuclear, sólo afecta a la localización intracelular de las subunidades mayores de la RNA pol II (Forget et al., 2010). Estas últimas observaciones sugieren que las subunidades de la RNA pol II podrían ser importadas al núcleo, al menos, de dos formas distintas.

Importación nuclear de la RNA pol II

La envoltura nuclear separa en la célula eucariota el núcleo del citoplasma y a través de los complejos del poro nuclear (NPCs) presentes en la misma se produce el intercambio de moléculas entre los dos compartimentos. Los NPCs son complejos multiproteicos con una masa molecular de alrededor de 60 MDa en levadura y 125 MDa en mamíferos que restringen el paso de moléculas con tamaño superior a los 20 kDa. Si su masa molecular es mayor deben ser reconocidas como molécula a transportar (o *cargo*) por las carioferinas que median el transporte a través del NPC. Las carioferinas interactúan con las nucleoporinas, componentes estructurales del NPC, permitiendo el paso del complejo (Chook y Blobel, 2001; Mosammaparast y Pemberton, 2004; Pemberton y Paschal, 2005).

La dirección de transporte a través del NPC está determinada por la presencia en el *cargo* de una señal de importación o exportación y por el efecto, que sobre el complejo de transporte, tiene la GTPasa de pequeño

tamaño Ran. La señal de localización nuclear (NLS) dirige la proteína hacia el núcleo mientras que la señal de exportación nuclear (NES) la dirige hacia el citoplasma. Las carioferinas reconocen estas secuencias, se unen a ellas y dirigen el transporte a través del NPC. Se trata de proteínas con masa molecular similar (90-150 kDa), similar punto isoeléctrico ($pI=4.0-5.0$) y una estructura caracterizada por contener repeticiones tipo HEAT (Chook y Süel, 2011). Mientras que en levadura se han descrito 14 carioferinas distintas, en humanos esta familia está compuesta de al menos 20 miembros. La mayoría de carioferinas son o bien importinas o exportinas, de forma que su nombre refleja el sentido en el cual el *cargo* es translocado. Las importinas mejor caracterizadas son la importina- α /importina- β (Kap60/Kap95 en levadura). Representan un caso especial, ya que la importina- β no se une a su cargo directamente sino que necesita a una proteína adaptadora, la importina- α , que reconoce directamente la NLS del cargo. Crm1 (Xpo1, en levadura) es la exportina mejor caracterizada, la cual reconoce la secuencia de exportación rica en leucinas (NES) utilizada por todos los eucariotas (Fornerod et al., 1997; Stade et al., 1997).

La interacción carioferina-*cargo* está regulada por la GTPasa Ran, de forma que el gradiente de Ran-GTP marca el sentido del transporte. Dicho gradiente está caracterizado por tener una elevada concentración en el núcleo y una baja concentración en el citoplasma (Chook y Blobel, 2001; Mosammaparast y Pemberton, 2004; Pemberton y Paschal, 2005). Las importinas liberan su carga gracias a que la unión de Ran-GTP en el núcleo rompe el complejo, permitiéndose el reciclaje de la importina, que viaja de nuevo al citoplasma, donde la actividad GTPasa de Ran es estimulada por la proteína activadora de la GTPasa Ran (RanGAP) y se produce la hidrólisis del GTP a GDP y el Ran-GDP se libera de la importina. Ran-GDP entonces es importado al núcleo por el factor NTF2. Una vez en el núcleo, el GDP se intercambia por GTP gracias a la acción del factor intercambiador de nucleótidos de guanina RanGEF, que se encuentra unido a cromatina

manteniendo la elevada concentración de Ran-GTP en el núcleo. Al contrario de lo que sucede con las importinas, las exportinas necesitan Ran-GTP para unir su cargo, y en el citoplasma lo liberan gracias a la hidrólisis de GTP.

En células humanas, diferentes estudios funcionales de proteínas que interaccionan con la polimerasa han identificado varios factores cuya mutación afecta la localización de la RNA pol II (Tabla 1.2). Uno de estos factores es la GTPasa RPAP4/GPN1. La depleción de esta proteína da lugar a la acumulación citoplasmática de Rpb1p y Rpb2p, pero no del resto de subunidades (Forget et al., 2010). También el tratamiento con Leptomicina B, un inhibidor específico de la exportina Crm1, provoca la acumulación en el citoplasma de la subunidad mayor de la RNA pol II. El homólogo a *GPN1* en levadura, el gen esencial *NP43*, se ha relacionado con el proceso de translocación nuclear de la RNA pol II (Forget et al., 2010; Staresinic et al., 2011). Células mutantes en *NP43*, acumulan, en diferente grado, Rpb1p en el citoplasma. Estos mutantes son hipersensibles a benomil, un inhibidor del ensamblaje de los microtúbulos. Este dato podría indicar un papel del ensamblaje de los microtúbulos en la importación nuclear de la RNA pol II, como ha sido descrito para otras proteínas nucleares (Pouton et al., 2007).

Otra proteína que se ha relacionado con la importación de la RNA pol II en células humanas es RPAP2 (Forget et al., 2013). Esta proteína posee un dominio de retención nuclear en su región N-terminal, y otro dominio de retención citoplasmático en su región C-terminal. Se ha propuesto que RPAP2 entra en núcleo asociada a la RNA pol II y vuelve al citoplasma asociada a la GTPasa *GPN1* (Forget et al., 2013; Figura 1.10). En levadura existen dos genes que muestran homología con RPAP2, *RTR1* y *RTR2*. En dos trabajos recientes se describe que tanto RPAP2 en humanos como Rtr1p en levadura participan en la eliminación del fosfato de la serina 5 del CTD de la subunidad mayor de la RNA pol II (Egloff et al., 2012; Gibney et al., 2008). A Rtr2p no le ha sido asignada ninguna función.

Hay que señalar que no se han identificado NLSs en ninguna de las subunidades que forman el *core* de la RNA pol II. Tampoco se ha descrito ninguna NLS en el heterodímero Rpb4/Rpb7, que parece viajar entre el núcleo y el citoplasma de la célula, en un proceso ligado a la degradación del mRNA en el citoplasma (Selitrennik et al., 2006). Tampoco las proteínas GPNs poseen una señal de localización nuclear que las dirija al núcleo de las células. Por tanto, es posible que otros factores que se unen a la RNA pol II, para participar en el transporte nuclear, proporcionen esa señal de importación necesaria. Este es el caso del factor Iwr1p de levadura. La proteína Iwr1p se une a la RNA pol II, y dirige su importación nuclear gracias a su secuencia de localización nuclear bi-partita y a la acción de las carioferinas de la vía clásica Kap60/Kap95 (Czeko et al., 2011). Iwr1p se une a la hendidura formada por la unión de las subunidades Rpb1p y Rpb2p, en el último paso de ensamblaje de la RNA pol II. Se ha propuesto que la importación de la RNA pol II requeriría complejos totalmente ensamblados, constituyendo un punto de control en el que sólo las RNA pol II funcionales serían transportadas al núcleo. El reciclaje de Iwr1p se produce gracias a la exportina Crm1 que la devuelve al citoplasma mediante el reconocimiento de la NES presente en el factor (Figura 1.10). La expresión en células de levadura del homólogo de *IWRI* en humanos restablece parcialmente la localización nuclear de la RNA pol II (Czeko et al., 2011), lo que pone de manifiesto la conservación funcional en la importación nuclear de la RNA pol II a lo largo de la evolución.

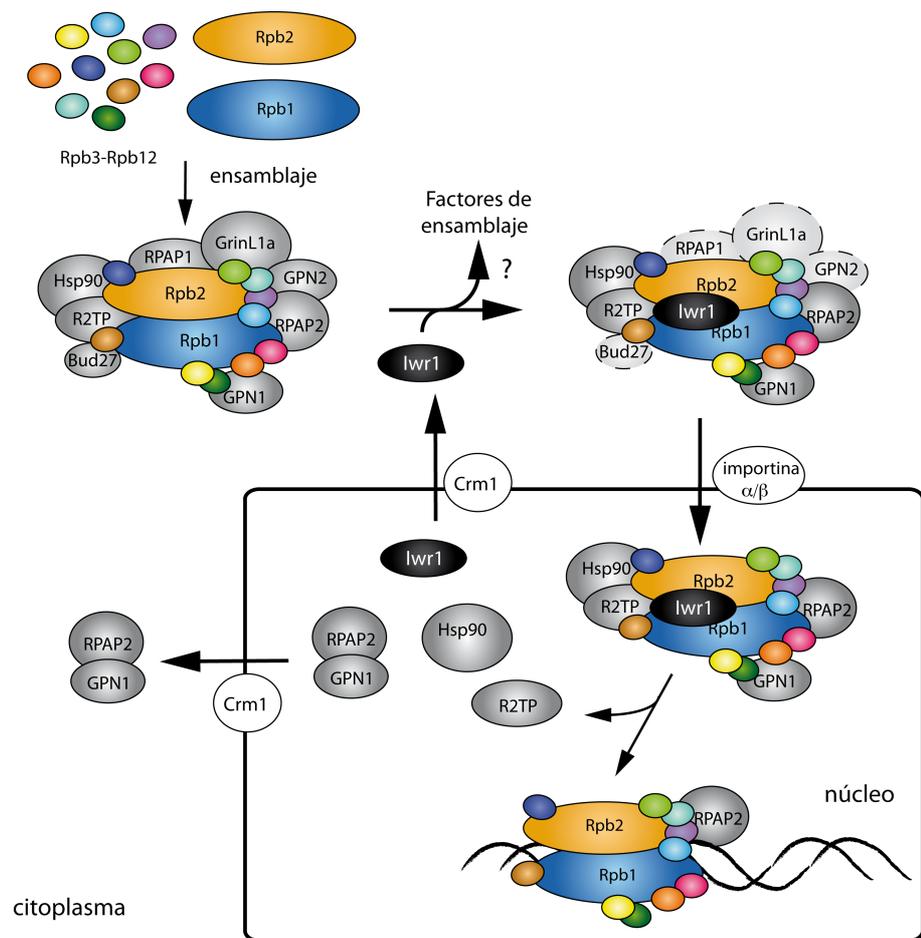


Figura 1.10: Modelo de importación nuclear de la RNA pol II. La RNA pol II completamente ensamblada, gracias a la asistencia de algunos factores de ensamblaje (mostrados en gris), es reconocida por la proteína Iwr1p en levadura, o otra proteína con función similar en otros organismos, que dirige su transporte al núcleo, probablemente junto con otros factores de ensamblaje que también asisten en el proceso de importación al núcleo. Una vez en el núcleo los factores de ensamblaje e importación son liberados del complejo, con la excepción del factor RPAP2 que puede permanecer unido a la RNA pol II debido a su posterior implicación como fosfatasa del CTD de Rpb1p. Los factores de ensamblaje y transporte libres pueden ser exportados al citoplasma mediante la exportina Crm1 y volver a participar en un nuevo ciclo de ensamblaje e importación.

La degradación de la RNA pol II

Las subunidades que forman el complejo enzimático de la RNA pol II tienen vidas medias muy distintas. Mientras Rpb1p tiene una vida media de 22 min, la vida media de Rpb9p se ha estimado en 87 min. En cuanto a las otras subunidades, Rpb6p, Rpb8p y Rpb12p son consideradas como estables (Belle et al., 2006). En términos de degradación, esas vidas medias individuales sugieren la existencia de una vía individual de degradación para cada subunidad, en lugar de la proteólisis del complejo en su conjunto. Cómo se logra y regula dicho remplazo de subunidades individuales todavía no ha sido investigado en detalle. La mayor parte de los estudios existentes hasta la fecha se centran en la degradación de la RNA pol II tras un estrés transcripcional, ya sea debido a daño en el DNA, o al tratamiento de las células con inhibidores transcripcionales como la α -amanitina, la actinomicina D o el 6-AU (Beaudenon et al., 1999; Harreman et al., 2009; Nguyen et al., 1996; Ribar et al., 2007; Somesh et al., 2005; 2007; Woudstra et al., 2002).

Durante su movimiento a lo largo del gen, la RNA pol II tiene que lidiar con una serie de obstáculos que dificultan su progresión, como son los nucleosomas, las proteínas de unión a DNA, el daño en el DNA y secuencias que intrínsecamente presentan dificultades para ser transcritas. Esto puede provocar que la RNA pol II quede temporal o permanentemente parada.

El daño en el DNA desencadena la ubicuitalización y degradación de la RNA pol II, un mecanismo de último recurso que permite que la parada de la RNA pol II no persista. Este proceso de degradación sólo se inicia cuando fallan otros recursos de la célula como la reparación por escisión de nucleótidos acoplada a transcripción (TC-NER) y la reactivación de la transcripción por el factor TFIIIS/*DSTI*, (comentada anteriormente) (Wilson

et al., 2013a). Durante este proceso alternativo la subunidad mayor de la RNA pol II, Rpb1p, se ubiquitila y degrada, lo cual resulta en el desensamblaje del complejo de la RNA pol II y permite que la lesión sea tratada por otros medios (Wilson et al., 2013a).

Mecanismo y regulación de la degradación de Rpb1p

La ubiquitilación y degradación de Rpb1p, aunque originalmente fue identificada como una respuesta al daño en el DNA (Beaudenon et al., 1999; Bregman et al., 1996) está asociada, en general, a condiciones que dan lugar a un estrés transcripcional (Hobson et al., 2012; Sigurdsson et al., 2010; Somesh et al., 2005). La degradación de Rpb1p se produce por la adición de una cadena de ubiquitinas, el desensamblaje del complejo de elongación asociado a cromatina, y degradación en el proteasoma (Wilson et al., 2013a).

Dos ubiquitin ligasas (E3) se han relacionado con la ubiquitilación de Rpb1p (Harreman et al., 2009). La primera, Rsp5p, posee un dominio catalizador HECT, se une a la región CTD de Rpb1p y ubiquitila esta subunidad como respuesta al daño en el DNA inducido por UV (Beaudenon et al., 1999). La fosforilación de la serina 5 inhibe la ubiquitilación de Rpb1p, mientras que la fosforilación de la serina 2, característica de la RNA pol II elongante, aumenta su eficiencia de ubiquitilación (Huibregtse et al., 1997; Somesh et al., 2005). Este hecho sugiere que es la RNA pol II parada durante la transcripción la que se ubiquitila preferentemente. Mecánicamente, la ubiquitina es activada por la proteína Uba1p (enzima activadora de la ubiquitina, E1), los dos sitios principales de ubiquitilación de Rpb1p (K330 y K695) son reconocidos por la proteína Ubc5p (enzima conjugadora de la ubiquitina, E2) y la transferencia de la ubiquitina se desencadena cuando las dos proteínas Ubc5p forman un complejo simultáneamente con un dímero Rsp5p unido al CTD de Rpb1p. La ubiquitilación de Rpb1p se puede reconstituir *in vitro* en levadura, con la

presencia de Uba1p, Ubc5p y Rsp5p, de forma que se producen cadenas de poliubiquitina unidas a través de la lisina 63 (Harreman et al., 2009). Resulta interesante que estas cadenas de ubiquitina unidas a través de la lisina 63 no están asociadas con degradación en el proteasoma (Ulrich y Walden, 2010; Figura 1.11). Esta modificación puede tener una función biológica en la respuesta al estrés transcripcional, pero no se detecta normalmente en la respuesta a daño al DNA *in vivo*.

Se ha descrito la presencia de Rpb1p monoubicuitilada a niveles bajos, incluso en células en las que no existe estrés transcripcional (Anindya et al., 2007; Harreman et al., 2009; Sigurdsson et al., 2010; Woudstra et al., 2002). Una explicación puede ser que esta ruta específica de degradación también tenga un papel en el remplazo de la subunidad mayor de la RNA pol II. Sin embargo, puede que la monoubicuitilación no siempre desencadene la degradación de Rpb1p, sino que puede tener un papel adicional e independiente en la actividad de la RNA pol II. Es importante destacar, que se han identificado distintos sitios de ubiquitilación de Rpb1p bajo situaciones que no comportan un estrés transcripcional (Beltrao et al., 2012; Daulny et al., 2008; Kim et al., 1994; Peng et al., 2003; Wagner et al., 2011), sugiriendo un grado de promiscuidad en la elección del sitio de ubiquitilación que ya ha sido descrito para otras proteínas (Danielsen et al., 2011).

Una segunda ubiquitin ligasa es la encargada de llevar a cabo la poliubiquitilación de Rpb1p. Se trata del complejo elongina-culina (Elc1, Ela1, Cul3, y Roc1 en levadura) que se ha demostrado promueve la poliubiquitilación de la proteína Rpb1p previamente monoubicuitilada. El complejo elongina-culina se encarga de añadir una cadena de ubiquitinas unidas a través de la lisina 48 (Harreman et al., 2009; Ribar et al., 2007; Figura 1.11). A continuación, la ATPasa dependiente de ubiquitina, Cdc48p, libera Rpb1p del complejo de la RNA pol II y la entrega al proteasoma (Verma et al., 2011; Figura 1.11).

La ubiquitilación y la degradación de Rpb1p requiere la acción de la proteína Def1p *in vivo* (Woudstra et al., 2002) e *in vitro* (Reid y Svejstrup, 2004). Def1p es procesada por el proteasoma donde pierde el dominio que promueve su localización citoplasmática produciéndose una acumulación nuclear de la proteína resultante. El producto de Def1p nuclear se une a la RNA pol II ubiquitilada gracias a su dominio de unión a ubiquitina y recluta al complejo E3 elongina-culina de manera que facilita la poliubiquitilación de Rpb1p y su degradación en el proteasoma (Wilson et al., 2013b; Figura 1.11).

Reversión de la poliubiquitilación de Rpb1p

La deubiquitilasas (DUBs) hidrolizan las cadenas de ubiquitina y antagonizan con la función de las ubiquitin ligasas (E3). En la ruta de ubiquitilación de Rpb1p en *S. cerevisiae* se han identificado dos DUBs, Ubp2p y Upb3p. Upb2p interacciona con Rsp5p y elimina las cadenas de poliubiquitina unidas por la lisina 63 (Figura 1.11). En cambio, es incapaz de hidrolizar la ubiquitina unida a Rpb1p, de modo que deja a Rpb1p monoubiquitilada (Harreman et al., 2009). Por el contrario, Ubp3p es capaz de eliminar completamente las cadenas de ubiquitina unidas a través de la lisina 48, rescatando a Rpb1p de la degradación (Kvint et al., 2008; Figura 1.11).

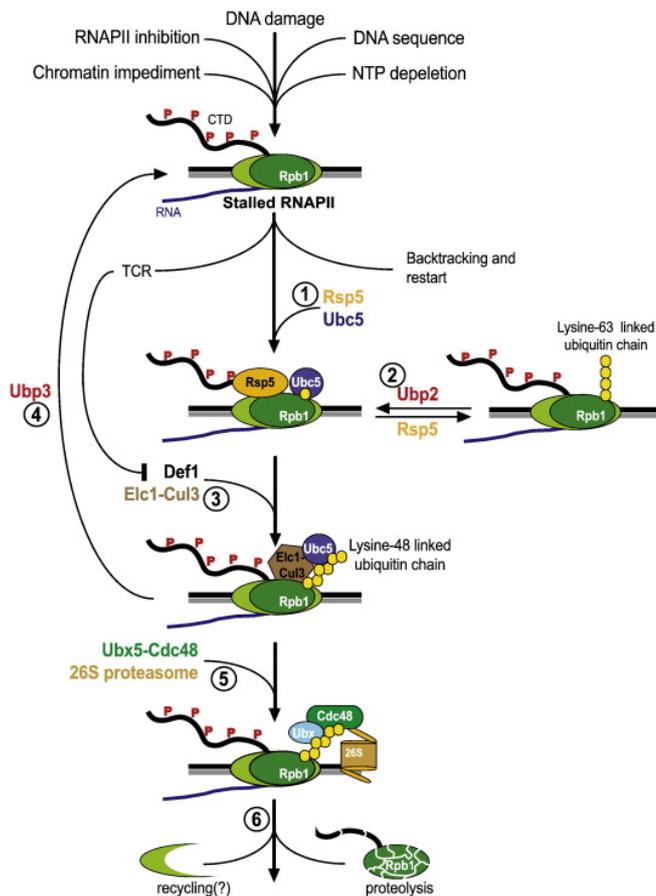


Figura 1.11: Modelo de ubiquitilación y degradación de la RNA pol II. La RNA pol II se encuentra parada debido a algún tipo de estrés transcripcional. (1) Rsp5-Ubc5 monoubicuitila la subunidad mayor de la RNA pol II, Rpb1p. (2) Dicha monoubicuitilación puede ser extendida y formar cadenas de poliubiquitina unidas por la lisina 63, que pueden ser rápidamente revertidas por la DUB Ubp2p. (3) El complejo Elc1-Cul3 y Def1p reconocen la forma monoubicuitilada de la RNA pol II y generan una cadena de poliubiquitinas unidas por la lisina 48. (4) Dicha ubiquitilación puede ser totalmente revertida por la DUB Ubp3p para prevenir la innecesaria degradación de la RNA pol II. (5) La ATPasa Cdc48-Ubx y la subunidad 26S del proteasoma son reclutados por la RNA pol II poliubicuitilada. (6) El complejo de la RNA pol II se desensambla del molde de DNA y la subunidad Rpb1p poliubicuitilada es degradada y el resto de subunidades del complejo son liberadas (Wilson et al., 2013a).

OBJETIVOS

1. La identificación y caracterización del gen *RTPI*, uno de los genes cuya mutación suprime los defectos en crecimiento causados por la ausencia de NC2.
2. El estudio detallado de la función de la proteína Rtp1p en la biogénesis de la RNA pol II.
3. La determinación de las distintas vías para la importación nuclear de la RNA pol II.
4. El estudio de la función nuclear de Iwr1p.
5. Establecer los efectos transcriptómicos de la delección de *IWR1* y *RTPI*.
6. La identificación, mediante estudios proteómicos, de nuevos factores que podrían estar implicados en la biogénesis de la RNA pol II.

2. Materiales y Métodos

2.1. Materiales

Medios y aditivos

Los medios utilizados para el crecimiento de cultivos de *E.coli* o *S. cerevisiae* se prepararon como se describe en la Tabla 2.1. En todos los casos, para obtener medios sólidos se agregó agar al 2%. Los aditivos fueron esterilizados por filtración (Tabla 2.2).

Anticuerpos

En la tabla 2.3 se indican todos los anticuerpos utilizados en este trabajo y las concentraciones a las que se han usado. En el caso del análisis por *Western blot* se indica también la dilución del anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa empleado para un posterior revelado con el reactivo *ECL Select (GE Healthcare)*.

Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados se obtuvieron de *Thermo Electron* o de *Integrated DNA technologies*. En la tabla se indican los oligonucleótidos utilizados para llevar a cabo las PCR cuantitativas en tiempo real (qRT-PCR), así como para la obtención de sondas para los análisis por *Northern blot*.

| Medio | Aplicación | Descripción |
|---------------------------|-----------------------------------|---|
| LB | Cultivo de <i>E. coli</i> | -0,5% (p/v) extracto de levadura -1% (p/v) bactotriptona -1% (p/v) NaCl |
| YP (+fuente de carbono) | Cultivo de levadura | -1% (p/v) extracto de levadura -2% (p/v) bactopectona -2% (p/v) glucosa (YPD), 2% galactosa (YPGal), 3% acetato (YPAc), 3% etanol (YPEtOH) |
| SC(-requerimiento) | Cultivo de levadura | -0,17% (p/v) base nitrogenada para levadura (YNB) -0,5% (p/v) sulfato amónico -0,2% mezcla de aminoácidos sin el aminoácido marcador de la auxotrofia (<i>FORMEDIUM</i>) -2% (p/v) glucosa o galactosa |
| Placas 5'-FOA | Crecimiento en placa de levadura | -Placas de SC-ura suplementadas con: -0,01% (p/v) uracilo -0,2% (p/v) 5-FOA |
| Medio de pre-esporulación | Esporulación de levadura en placa | -1% (p/v) KCH ₃ COO -1% (p/v) extracto de levadura -2% (p/v) peptona |
| Medio de esporulación | Esporulación de levadura en placa | -3% (p/v) KCH ₃ COO -0,02% (p/v) rafinosa -10 µg/mL adenina, arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, uracilo y valina |

Tabla 2.1. Medios de cultivo utilizados en este trabajo

| Aditivo | Descripción | Solución stock | Concentración utilizada |
|--------------------------|--|---------------------------------|--|
| IPTG (Sigma) | Inducción <i>Plac</i> | 1M en H ₂ O | 0,5 mM |
| Ampicilina (Roche) | Antibiótico | 100 mg/mL | 100 µg/mL para cultivos de <i>E. coli</i> |
| Kanamicina (Sigma) | Antibiótico | 30 mg/mL | 30 µg/mL |
| Cloranfenicol (Sigma) | Antibiótico | 50 mg/mL en EtOH | 50 µg/mL |
| Doxiciclina (Fluka) | Antibiótico | 50 mg/mL | 10 µg/mL |
| Geneticina (GIBCO) | Antibiótico | 200 mg/mL | 200 µg/mL |
| Benomil (Sigma) | Inhibidor del ensamblaje de los microtúbulos | 10 mg/mL en DMSO | 60 mg/mL en medio líquido 20 mg/mL en placa |
| Leptomicina B (Sigma) | Inhibidor Xpo1p | 5 ng/µL en metanol 70% (v/v) | 10 ng/mL |
| Cicloheximida (Sigma) | Inhibidor de la traducción | 10 mg/mL | 300 µg/mL para cultivos de levadura |

Tabla 2.2. Aditivos empleados en este trabajo

Materiales y Métodos

| Anticuerpo | Aplicación | Casa Comercial |
|--|--|---------------------------------|
| Anti-HA (3F10) monoclonal de rata conjugado con peroxidasa | WB: 1:10.000 CoIP: 8-12 µg | Roche (25 µg/mL) |
| Anti-HA (3F10) monoclonal de rata | Inmunofluorescencia: 1:50 | Roche (25 µg/mL) |
| Anti-Xpress monoclonal de ratón | WB: 1:5.000 | Life Technologies (1 mg/mL) |
| Peroxidasa anti-peroxidasa (PAP) de conejo | WB: 1:2.000 | Sigma (3-7 mg/mL) |
| Anti-TAP policlonal de conejo | WB: 1:5.000 | Thermo Scientific (0.5 mg/mL) |
| Anti-Rpb1 (8WG16) monoclonal de ratón | WB: 1:10.000 CoIP: 10 µg Inmunofluorescencia: 1:100 | Covance (2-3 mg/mL) |
| Anti-Rpb1 (H14) monoclonal de ratón | WB:1:10.000 | Covance (3-5 mg/mL) |
| Anti-Rpb3 monoclonal de ratón | WB: 1:5.000 | Abcam (1 mg/mL) |
| Anti-Cdc28 policlonal de conejo | WB: 1:2.000 | Santa Cruz Biotech. (200 µg/mL) |
| Anti-tubulina monoclonal de rata | WB:1:15.000 | AbD Serotec (1 mg/mL) |
| Anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa | WB: 1:20.000 | Promega |
| Anti-IgG de rata conjugado con peroxidasa | WB: 1:10.000 | GE Healthcare |
| Anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa | WB:1:20.000 | GE Healthcare (0.31 mg/mL) |

Tabla 2.3. Listado de anticuerpos empleados en este trabajo.

| Oligonucleótido | Secuencia 5' a 3' | Aplicación |
|------------------------|-------------------------------------|--------------------|
| IMD2 up | CATTAGAGACTACAAGACCG | Obtención de sonda |
| IMD2 down | CTAGTTGAGCAGAAGCGGTT | Obtención de sonda |
| SCR1 up | GGGATGGGATACGTTGAGAA | Obtención de sonda |
| SCR1 down | CACAATGTGCGAGTAAATCC | Obtención de sonda |
| GAL1-YLR454 -194 | CTGGGGTAATTAATCAGCGAAGCG ATG | qRT-PCR |
| GAL1-YLR454 +35 | CACTGTACAGTAGAACATTAATC GGAAAC | qRT-PCR |
| GAL1-YLR454 +1986 | CATATCATCCACCCTAGGTGCTAG GTCGG | qRT-PCR |
| GAL1-YLR454 +2199 | GAGCTGACCAGACCTAACCATAGT AGCGTG | qRT-PCR |
| GAL1-YLR454 +4069 | AGATATTACTCGTTGTTTCGTGCCCA G | qRT-PCR |
| GAL1-YLR454 +4268 | TCCCCAAACCCTAGTTTAAACAGAA GGATCT | qRT-PCR |
| GAL1-YLR454 +5904 | CGTACTGTTGAAATGGAACGAGGA CGC | qRT-PCR |
| GAL1-YLR454 +6074 | ATCGCTCCATACTCGTTGTATCAT CAGTC | qRT-PCR |
| GAL1-YLR454 +7701 | GAGGGTCACAGATCTATTACTTGC CC | qRT-PCR |

| Oligonucleótido | Secuencia 5' a 3' | Aplicación |
|------------------------------------|-----------------------------------|-------------------|
| GAL1-YLR454 +7850 | GTTGTGAGTTGCTTCAGTGGTGAA GTG | qRT-PCR |
| ORF-Free Chr1 (posición 214193) | GTTTATAGCGGGCATTATGCGTAG ATCAG | qRT-PCR |
| ORF-Free Chr1 (posición 214477) | GTCCTCTAGAATTTTCCACTCGC ACATTC | qRT-PCR |
| COX1-F | CTACAGATACAGCATTTCCAAGA | qRT-PCR |
| COX1-R | GTGCCTGAATAGATGATAATGGT | qRT-PCR |
| ACT1-F | GTATGTGTAAAGCCGGTTTTG | qRT-PCR |
| ACT1-R | CATGATACCTTGGTGTCTTGG | qRT-PCR |

Tabla 2.4. Listado de oligonucleótidos empleados en este trabajo para la obtención de sondas para Northern blot y PCR cuantitativa.

Plásmidos

La obtención de módulos de integración para la transformación de células de levadura se realizó haciendo uso de los plásmidos detallados por Longtine y colaboradores (1998). Con ellos se consiguieron mutantes de delección, cambios de promotor o etiquetado de proteínas (Longtine, 1998). En la Tabla 2.5 se detallan los plásmidos portadores de genes reporteros, los plásmidos comerciales utilizados y el resto de plásmidos utilizados para las construcciones llevadas a cabo en el curso de este trabajo.

| Plásmido | Descripción | Referencia |
|--|---|-------------------------------|
| pBUR6 | Plásmido centromérico con marcador <i>URA3</i> que expresa el gen <i>BUR6</i> | (Peiró-Chova y Estruch, 2007) |
| pIWR1(Δ NES)-GFP | Plásmido centromérico (YCplac33) con marcador <i>URA3</i> que expresa el gen <i>IWR1</i> (Δ NES) fusionado a la etiqueta GFP | (Peiró-Chova y Estruch, 2009) |
| YEp-Rpb2 | Plásmido episomal 2 μ (YEplac181) con marcador <i>LEU2</i> que expresa el gen <i>RPB2</i> | (Peiró-Chova y Estruch, 2007) |
| YEp-Rpb2t | Plásmido episomal 2 μ (YEplac181) con marcador <i>LEU2</i> que expresa el gen <i>RPB2</i> truncado | (Peiró-Chova y Estruch, 2007) |
| pGsp1-Prot A (pNOP1::PrAT-GSP1-ADH) | Vector pUN100 con marcador <i>LEU2</i> que expresa bajo el control del promotor <i>NOPI</i> el gen <i>GSP1</i> etiquetado por un fragmento de la Proteína A | (Hellmuth et al., 1998) |
| pGsp2-ProtA (pNOP1::PrAT-GSP2-ADH) | Vector pUN100 con marcador <i>LEU2</i> que expresa bajo el control del promotor <i>NOPI</i> el gen <i>GSP2</i> etiquetado por un fragmento de la Proteína A | (Hellmuth et al., 1998) |
| pIWR1 | Plásmido centromérico (pRS416) con marcador <i>URA3</i> que expresa el gen <i>IWR1</i> | EUROFAN |
| pGAL-YLR454w | Plásmido integrativo | (Mason y Struhl, 2005) |

Tabla 2.5. Listado de plásmidos utilizados en este trabajo.

Para realizar la construcción His₆-RTP1 se amplificó un fragmento de PCR que contenía el gen *RTP1* y en el que se generaron los sitios de restricción *XhoI* y *PstI* aguas arriba y aguas abajo respectivamente de la región codificadora del gen *RTP1*. El fragmento resultante se digirió con

estas enzimas y se clonó en el vector pRSETA (*Life Technologies*). Para la construcción pGST-Nup100 se incluyeron los sitios de restricción *Bgl*III y *Eco*RV en los extremos del fragmento, del nucleótido 4 al 1740 de la región codificadora del gen *NUP100*. Este fragmento se insertó entre los sitios *Bam*HI y *Sma*I del vector pGEX-3X. De forma similar se obtuvo mediante PCR un fragmento de la región codificadora del gen *NUP116*, del nucleótido 4 al 2160, con los sitios de restricción *Bgl*III y *Eco*RV y se clonó en el vector pGEX-3X para obtener la construcción pGST-Nup116. Los plásmidos utilizados para los ensayos de actividad β -galactosidasa fueron pBTM116-RTP1, pGAD-Nup100 y pGAD-Nup116. El plásmido pBTM116-RTP1 se construyó introduciendo el fragmento de restricción *Sma*I-*Pst*I del gen *RTP1* obtenido a partir del plásmido pRSETA-RTP1, en los sitios *Bam*HI (extremo rellenado con la polimerasa Klenow) y *Pst*I del vector pBTM116. El plásmido pGAD-Nup100 se construyó insertando el fragmento de restricción *Bam*HI-*Pst*I obtenido a partir del plásmido pGST-Nup100 en el vector pGAD-C1 (James et al., 1996). En el caso del plásmido pGAD-Nup116 el fragmento de restricción obtenido a partir de la digestión con los enzimas de restricción *Mfe*I-*Nsi*I se clonó en el vector pGAD-C2 (James et al., 1996).

Para construir el plásmido pRTP1-GFP el DNA genómico de una cepa de levadura portadora de la construcción *RTP1::GFP::Kan^r* se digirió con los enzimas de restricción *Sbf*I y *Kas*I y se ligó en el vector YCplac33. Los plásmidos con el inserto fueron seleccionados en placas de LB con ampicilina y kanamicina.

El plásmido YEp-Rpb2t-TAP se construyó introduciendo la etiqueta TAP en el sitio *Eco*RI de la región codificadora de *RPB2* clonado en el plásmido YEp-Rpb2t, previamente descrito (Peiró-Chova y Estruch, 2007).

El plásmido ptetO-IWR1(Δ NES)-GFP se obtuvo a partir del plásmido p*IWR1*(Δ NES)-GFP descrito previamente (Peiró-Chova y Estruch, 2009). Para ello, este plásmido se utilizó como molde para amplificar mediante PCR el fragmento IWR1(Δ NES)-GFP, insertando los sitios de

restricción *NotI* y *PstI* aguas arriba y aguas abajo, respectivamente. Dicho fragmento se insertó en los sitios *NotI-PstI* del vector pCM189 (Garí et al., 1997).

La construcción del plásmido pDEF1 se realizó mediante amplificación por PCR de la ORF del gen *DEF1* de forma que se introdujeron en los extremos del gen las dianas de corte para los enzimas de restricción *XbaI* y *NsiI*. Dicho fragmento digerido con los enzimas correspondientes se introdujo en los sitios *XbaI-PstI* del vector YCplac111.

Finalmente, el plásmido pIWR1 (*LEU2*) se construyó introduciendo el fragmento de restricción *HindIII-XbaI* del plásmido pIWR1 (*URA3*), descrito previamente, en los sitios *HindIII-XbaI* del vector YCplac111.

Cepas de *Escherichia Coli*

Se han utilizado las cepas de *E. Coli*: DH5 α (*F*, *endA1*, *hsdr17*, (*rK*, *mK*), *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *RelA1*, *80dlacZ*, Δ M15) y BL21 DE3 pLysS (*F ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ (DE3) pLysS(*cm^R*)).*

Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Todas las cepas de levadura utilizadas en este trabajo se encuentran detalladas en la Tabla 2.6.

| Cepa | Genotipo | Referencia |
|-------------------------------|--|-------------------------------|
| FY86 | <i>MATα leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200</i> | (Winston et al., 1995) |
| FY23 | <i>MATα ura3-52 trp1-Δ63 leu2Δ1</i> | (Winston et al., 1995) |
| BY4741 | <i>MATα leu2Δ0 ura3Δ0 his3Δ1 met15Δ0</i> | Open Biosystems |
| <i>P_{GAL10}-BUR6</i> | <i>MATα leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 GAL10::3HA-BUR6::kanMX6</i> | (Peiró-Chova y Estruch, 2007) |

Materiales y Métodos

| Cepa | Genotipo | Referencia |
|--|--|-------------------------------|
| <i>P_{GAL10}-YDR1</i> | <i>MATα leu2Δ1 ura3-52 GAL10::3HA-YDR1::HIS5</i> | (Peiró-Chova y Estruch, 2007) |
| <i>P_{GAL10}-BUR6 P_{GAL10}⁺-YDR1</i> | <i>MATα leu2Δ1 ura3-52 GAL10::3HA-BUR6::kanMX6 GAL10::3HA-YDR1::HIS5</i> | (Peiró-Chova y Estruch, 2007) |
| <i>P_{GAL10}-BUR6 rtp1::Tn3</i> | <i>MAT? leu2Δ1 his3? trp1? ura3-52 GAL10::3HA-BUR6::kanMX6</i> | Este trabajo |
| <i>P_{GAL10}-YDR1 rtp1::Tn3</i> | <i>MAT? leu2Δ1 his3? trp1? ura3-52 GAL10::3HA-YDR1::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>P_{GAL10}-BUR6 P_{GAL10}⁺-YDR1 rtp1::Tn3</i> | <i>MAT? leu2Δ1 his3? trp1? ura3-52 GAL10::3HA-BUR6::kanMX6 GAL10::3HA-YDR1::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>P_{tetO}-IWR1</i> | <i>MATα ura3-52 trp1-Δ63 leu2-Δ1 kanMX4-tetO7::IWR1</i> | (Peiró-Chova y Estruch, 2009) |
| <i>Δrtp1</i> | <i>MATα leu2Δ0 ura3Δ0 his3Δ1 lys2Δ0 met15Δ0 rtp1::kanMX4</i> | Este trabajo |
| <i>P_{tetO}-IWR1 Δrtp1</i> | <i>MATα leu2Δ1 ura3Δ0 his3Δ1 lys2Δ0 trp1-Δ63 rtp1::kanMX4 kanMX4-tetO7::IWR1</i> | Este trabajo |
| <i>iwr1-Δ1</i> | <i>MATα leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 iwr1-Δ1::kanMX6</i> | (Peiró-Chova y Estruch, 2009) |
| <i>iwr1-Δ2</i> | <i>MATα leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 iwr1-Δ2::kanMX6</i> | (Peiró-Chova y Estruch, 2009) |
| <i>Rtp1-GFP</i> | <i>MATα leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 RTP1-GFP::kanMX6</i> | Este trabajo |
| <i>iwr1-Δ1 Rtp1-GFP</i> | <i>MATα leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 iwr1-Δ1::kanMX6 RTP1-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>P_{GAL10}-HA-RTP1</i> | <i>MATα leu2Δ0 ura3Δ0 GAL10::3HA-RTP1::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>iwr1-Δ1 P_{GAL10}-HA-RTP1</i> | <i>MAT? leu2Δ1 trp1? ura3-52 GAL10::3HA-RTP1::HIS5 iwr1-Δ1::kanMX6</i> | Este trabajo |

| Cepa | Genotipo | Referencia |
|--------------------------|---|-------------------|
| <i>Rpb1-GFP</i> | <i>MATa leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 RPB1-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>Rpb2-GFP</i> | <i>MATa leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 RPB2-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>Rpb3-GFP</i> | <i>MATa leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 RPB3-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>Rpb7-GFP</i> | <i>MATa leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 RPB7-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>Rpb11-GFP</i> | <i>MATa leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 RPB11-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>Rpa190-GFP</i> | <i>MATa leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 RPA190-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>Rpo31-GFP</i> | <i>MATa leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 RPO31-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>Δrtp1 Rpb1-GFP</i> | <i>MATa leu2Δ0 ura3Δ0 his3Δ1 lys2Δ0 rtp1::kanMX4 RPB1-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>Δrtp1 Rpb2-GFP</i> | <i>MATa leu2Δ0 ura3Δ0 his3Δ1 lys2Δ0 rtp1::kanMX4 RPB2-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>Δrtp1 Rpb3-GFP</i> | <i>MATa leu2Δ0 ura3Δ0 his3Δ1 lys2Δ0 rtp1::kanMX4 RPB3-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>Δrtp1 Rpb7-GFP</i> | <i>MATa leu2Δ0 ura3Δ0 his3Δ1 lys2Δ0 rtp1::kanMX4 RPB7-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>Δrtp1 Rpb11-GFP</i> | <i>MATa leu2Δ0 ura3Δ0 his3Δ1 lys2Δ0 rtp1::kanMX4 RPB11-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>Δrtp1 Rpa190-GFP</i> | <i>MATa leu2Δ0 ura3Δ0 his3Δ1 lys2Δ0 rtp1::kanMX4 RPA190-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>Δrtp1 Rpo31-GFP</i> | <i>MATa leu2Δ0 ura3Δ0 his3Δ1 rtp1::kanMX4 RPO31-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>Δiwr1-Δ1 Rpb1-GFP</i> | <i>MATa leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 iwr1-Δ1::kanMX6 RPB1-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>Δiwr1-Δ1 Rpb2-GFP</i> | <i>MATa leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 iwr1-Δ1::kanMX6 RPB2-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |

Materiales y Métodos

| Cepa | Genotipo | Referencia |
|---|---|-------------------|
| <i>Δiwr1-Δ1 Rpb3-GFP</i> | <i>MATa leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 iwr1-Δ1::kanMX6</i> <i>RPB3-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>Δiwr1-Δ2 Rpb3-GFP</i> | <i>MATa leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 iwr1-Δ2::kanMX6</i> <i>RPB3-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>Δiwr1-Δ1</i> <i>Rpb11-GFP</i> | <i>MATa leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 iwr1-Δ1::kanMX6</i> <i>RPB3-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>P_{GAL10}-KAP60</i> <i>Iwr1(ΔNES)-GFP</i> | <i>MATa leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 GAL10::3HA-</i> <i>KAP60::kanMX6 [pIWR1(ΔNES)-GFP]</i> | Este trabajo |
| <i>P_{GAL10}-KAP60</i> <i>Rpb1-GFP</i> | <i>MATa leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 GAL10::3HA-</i> <i>KAP60::kanMX6 RPB1-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>P_{GAL10}-KAP95</i> <i>Iwr1(ΔNES)-GFP</i> | <i>MATa leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 GAL10::3HA-</i> <i>KAP95::kanMX6 [pIWR1(ΔNES)-GFP]</i> | Este trabajo |
| <i>P_{GAL10}-KAP95</i> <i>Rpb1-GFP</i> | <i>MATa leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 GAL10::3HA-</i> <i>KAP95::kanMX6 RPB1-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>P_{GAL10}-RTP1</i> <i>Iwr1(ΔNES)-GFP</i> | <i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3? GAL10::3HA-</i> <i>RTP1::HIS5 [pIWR1(ΔNES)-GFP]</i> | Este trabajo |
| <i>P_{GAL10}-RTP1</i> <i>Rpb1-GFP</i> | <i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3? GAL10::3HA-</i> <i>RTP1::HIS5 RPB1-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>P_{GAL10}-RTP1</i> <i>Rpb2-GFP</i> | <i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3? GAL10::3HA-</i> <i>RTP1::HIS5 RPB2-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>Tbp1-GFP</i> | <i>MATa leu2Δ0 ura3Δ0 his3Δ1 TBP1-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>Artp1 Tbp1-GFP</i> | <i>MATa leu2Δ0 ura3Δ0 his3Δ1 rtp1::kanMX TBP1-</i> <i>GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>Akap108 Rpb1-GFP</i> | <i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3-52</i> <i>kap108::kanMX4 RPB1-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>Akap114 Rpb1-GFP</i> | <i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3-52</i> <i>kap114::kanMX4 RPB1-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |

| Cepa | Genotipo | Referencia |
|---|--|--------------|
| <i>Δkap120 Rpb1-GFP</i> | <i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3-52 kap120::kanMX4 RPB1-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>Δkap122 Rpb1-GFP</i> | <i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3-52 kap122::kanMX4 RPB1-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>Δkap123 Rpb1-GFP</i> | <i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3-52 kap123::kanMX4 RPB1-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>P_{tetO}-PSE1 Rpb1-GFP</i> | <i>MATa ade2-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ura3-52 can1-100 kanMX4-tetO7::PSE1 RPB1-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>Rvb2-HA</i> | <i>MATa ura3-52 trp1-Δ63 leu2-Δ1 RVB2- 3HA::kanMX6</i> | Este trabajo |
| <i>Rvb2-HA Rtp1-TAP</i> | <i>MATa ura3-52 trp1-Δ63 leu2-Δ1 RVB2- 3HA::kanMX6 RTP1-3HA::kanMX6</i> | Este trabajo |
| <i>Pih1-HA</i> | <i>MATa ura3-52 trp1-Δ63 leu2-Δ1 PIH1- 3HA::kanMX6</i> | Este trabajo |
| <i>Pih1-HA Rtp1-TAP</i> | <i>MATa ura3-52 trp1-Δ63 leu2-Δ1 PIH1- 3HA::kanMX6 RTP1-3HA::kanMX6</i> | Este trabajo |
| <i>Tah1-HA</i> | <i>MATa ura3-52 trp1-Δ63 leu2-Δ1 TAH1- 3HA::kanMX6</i> | Este trabajo |
| <i>Tah1-HA Rtp1-TAP</i> | <i>MATa ura3-52 trp1-Δ63 leu2-Δ1 TAH1- 3HA::kanMX6 RTP1-3HA::kanMX6</i> | Este trabajo |
| <i>P_{tetO}-RPB1 Rpb2-GFP</i> | <i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 URA3::CMV-tTA kanR-teto7-TATA::RPB1 RPB2-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>P_{tetO}-RPB1 Rpb3-GFP</i> | <i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 URA3::CMV-tTA kanR-teto7-TATA::RPB1 RPB3-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>P_{tetO}-RPB2 Rpb1-GFP</i> | <i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 URA3::CMV-tTA kanR-teto7-TATA::RPB2 RPB1-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>P_{tetO}-RPB2 Rpb3-GFP</i> | <i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 URA3::CMV-tTA kanR-teto7-TATA::RPB2 RPB3-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |

Materiales y Métodos

| Cepa | Genotipo | Referencia |
|---|---|-------------------|
| <i>P_{tetO}-RPB7</i> <i>Rpb1-GFP</i> | <i>MATa leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 kanMX4::tetO7-</i> <i>RPB7 RPB1-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>P_{tetO}-RPB7</i> <i>Rpb3-GFP</i> | <i>MATa leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 kanMX4::tetO7-</i> <i>RPB7 RPB3-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>P_{tetO}-RPB8</i> <i>Rpb1-GFP</i> | <i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 URA3::CMV-tTA</i> <i>kanR-teto7-TATA::RPB8 RPB1-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>P_{tetO}-RPB8</i> <i>Rpb3-GFP</i> | <i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 URA3::CMV-tTA</i> <i>kanR-teto7-TATA::RPB8 RPB3-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>P_{tetO}-RVB2</i> <i>Rpb1-GFP</i> | <i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 URA3::CMV-tTA</i> <i>kanR-teto7-TATA::RVB2 RPB1-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>P_{tetO}-RVB2</i> <i>Rpb2-GFP</i> | <i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 URA3::CMV-tTA</i> <i>kanR-teto7-TATA::RVB2 RPB2-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>P_{tetO}-RVB2</i> <i>Rpb3-GFP</i> | <i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 URA3::CMV-tTA</i> <i>kanR-teto7-TATA::RVB2 RPB3-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>Δpih1 Rpb1GFP</i> | <i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 ura3Δ0</i> <i>pih1::kanMX4 RPB1-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>Δpih1 Rpb2GFP</i> | <i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 ura3Δ0</i> <i>pih1::kanMX4 RPB2-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>Δpih1 Rpb3GFP</i> | <i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 ura3Δ0</i> <i>pih1::kanMX4 RPB3-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>Δtah1 Rpb1GFP</i> | <i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 ura3Δ0</i> <i>tah1::kanMX4 RPB1-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>Δtah1 Rpb2GFP</i> | <i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 ura3Δ0</i> <i>tah1::kanMX4 RPB2-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>Δtah1 Rpb3GFP</i> | <i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 ura3Δ0</i> <i>tah1::kanMX4 RPB3-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |

| Cepa | Genotipo | Referencia |
|--|--|-------------------------------|
| <i>Δrtp1</i> <i>Iwr1(ΔNES)-GFP</i> | <i>MATa leu2Δ0 ura3Δ0 his3Δ1 lys2Δ0 met15Δ0</i> <i>rtp1::kanMX4 [pIWR1(ΔNES)-GFP]</i> | Este trabajo |
| <i>Rtp1TAP Rpb2HA</i> | <i>MATa leu2Δ1 ura3-52 trp1? his3? RTP1-</i> <i>TAP::KanMX6 RPB2-3HA::kanMX6</i> | Este trabajo |
| <i>P_{GAL10}-RTP1</i> | <i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3? GAL10::3HA-</i> <i>RTP1::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>Rtp1-TAP</i> | <i>MATa leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 RTP1-</i> <i>TAP::KanMX6</i> | Este trabajo |
| <i>Iwr1-HA</i> | <i>MATa ura3-52 trp1-Δ63 leu2Δ1 IWR1-</i> <i>3HA::kanMX6</i> | (Peiró-Chova y Estruch, 2009) |
| <i>Iwr1-HA Rtp1-TAP</i> | <i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 IWR1-</i> <i>3HA::kanMX6 RTP1-3HA::kanMX6</i> | Este trabajo |
| <i>LexA-Rtp1</i> | <i>MATa leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 trp1-Δ63 [pSH18-</i> <i>34] [pGAD.C1] [pLexA-Rtp1]</i> | Este trabajo |
| <i>LexA-Rtp1</i> <i>pGAD-Nup100</i> | <i>MATa leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 trp1-Δ63 [pSH18-</i> <i>34] [pGAD.C1-Nup100] [pLexA-Rtp1]</i> | Este trabajo |
| <i>LexA-Rtp1</i> <i>pGAD-Nup116</i> | <i>MATa leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 trp1-Δ63 [pSH18-</i> <i>34] [pGAD.C1-Nup116] [pLexA-Rtp1]</i> | Este trabajo |
| <i>Pih1-HA Rpb1-GFP</i> | <i>MATa ura3-52 trp1-Δ63 leu2-Δ1 PIH1-</i> <i>3HA::kanMX6 RPB1-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>Pih1-HA Rpb2-GFP</i> | <i>MATa ura3-52 trp1-Δ63 leu2-Δ1 PIH1-</i> <i>3HA::kanMX6 RPB2-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>Pih1-HA Rpb3-GFP</i> | <i>MATa ura3-52 trp1-Δ63 leu2-Δ1 PIH1-</i> <i>3HA::kanMX6 RPB3-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>Tah1-HA Rpb1-GFP</i> | <i>MATa ura3-52 trp1-Δ63 leu2-Δ1 TAH1-</i> <i>3HA::kanMX6 RPB1-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>Tah1-HA Rpb2-GFP</i> | <i>MATa ura3-52 trp1-Δ63 leu2-Δ1 TAH1-</i> <i>3HA::kanMX6 RPB2-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |

Materiales y Métodos

| Cepa | Genotipo | Referencia |
|---------------------------------------|---|--------------|
| <i>Tah1-HA Rpb3-GFP</i> | <i>MATa ura3-52 trp1-Δ63 leu2-Δ1 TAH1-3HA::kanMX6 RPB3-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>P_{tetO}-RVB2 Rpb1-GFP</i> | <i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 URA3::CMV-tTA kanR-teto7-TATA::RVB2 RPB1-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>P_{tetO}-RVB2 Rpb2-GFP</i> | <i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 URA3::CMV-tTA kanR-teto7-TATA::RVB2 RPB2-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>P_{tetO}-RVB2 Rpb3-GFP</i> | <i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 URA3::CMV-tTA kanR-teto7-TATA::RVB2 RPB3-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>P_{tetO}-RPB1 Rpb2-GFP</i> | <i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 URA3::CMV-tTA kanR-teto7-TATA::RPB1 RPB2-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>P_{tetO}-RPB1 Rpb3-GFP</i> | <i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 URA3::CMV-tTA kanR-teto7-TATA::RPB1 RPB3-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>P_{tetO}-RPB2 Rpb1-GFP</i> | <i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 URA3::CMV-tTA kanR-teto7-TATA::RPB2 RPB1-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>P_{tetO}-RPB2 Rpb3-GFP</i> | <i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 URA3::CMV-tTA kanR-teto7-TATA::RPB2 RPB3-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>P_{tetO}-RPB7 Rpb1-GFP</i> | <i>MATa leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 kanMX4::tetO7-RPB7 RPB1-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>P_{tetO}-RPB7 Rpb3-GFP</i> | <i>MATa leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 kanMX4::tetO7-RPB7 RPB3-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>P_{tetO}-RPB8 Rpb1-GFP</i> | <i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 URA3::CMV-tTA kanR-teto7-TATA::RPB8 RPB1-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>P_{tetO}-RPB8 Rpb3-GFP</i> | <i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 URA3::CMV-tTA kanR-teto7-TATA::RPB8 RPB3-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>Artr1 Rpb1-GFP</i> | <i>MATa leu2Δ0 ura3Δ0 his3Δ0 met15Δ0 rtr1::kanMX4 RPB1-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |

| Cepa | Genotipo | Referencia |
|--|--|-----------------|
| <i>Artr1 Rpb2-GFP</i> | <i>MATa leu2Δ0 ura3Δ0 his3Δ1 lys2Δ0 rtr1::kanMX4</i> <i>RPB2-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>Artr1 Rpb3-GFP</i> | <i>MATa leu2Δ0 ura3Δ0 his3Δ1 lys2Δ0 rtr1::kanMX4</i> <i>RPB3-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>P_{tetO}-RBA50</i> <i>Rpb1-GFP</i> | <i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 URA3::CMV-tTA</i> <i>kanR-teto7-TATA::RBA50 RPB1-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>P_{tetO}-RBA50</i> <i>Rpb2-GFP</i> | <i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 URA3::CMV-tTA</i> <i>kanR-teto7-TATA::RBA50 RPB2-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>P_{tetO}-RBA50</i> <i>Rpb3-GFP</i> | <i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 URA3::CMV-tTA</i> <i>kanR-teto7-TATA::RBA50 RPB3-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>XPO1 (LMBS)</i> <i>Rpb1-GFP</i> | <i>MATa leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 trp1Δ63</i> <i>CRMIT539C RPB1-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>XPO1 (LMBS)</i> <i>Rpb3-GFP</i> | <i>MATa leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 trp1Δ63</i> <i>CRMIT539C RPB3-GFP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>Adst1</i> | <i>MATa leu2Δ0 ura3Δ0 his3Δ1 lys2Δ0 met15Δ0</i> <i>dst1::kanMX4</i> | Euroscarf |
| <i>Aspt4</i> | <i>MATa leu2Δ0 ura3Δ0 his3Δ1 lys2Δ0 met15Δ0</i> <i>spt4::kanMX4</i> | Euroscarf |
| <i>Δdef</i> | <i>MATa leu2Δ0 ura3Δ0 his3Δ0 met15Δ0</i> <i>def1::kanMX4</i> | Euroscarf |
| <i>P_{tetO}-RSP5</i> | <i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 URA3::CMV-tTA</i> <i>kanR-teto7-TATA::RSP5</i> | Open Biosystems |
| <i>Δubp3</i> | <i>MATa leu2Δ0 ura3Δ0 his3Δ1 lys2Δ0 met15Δ0</i> <i>ubp3::kanMX4</i> | Euroscarf |
| <i>Δbre5</i> | <i>MATa leu2Δ0 ura3Δ0 his3Δ1 lys2Δ0 met15Δ0</i> <i>bre5::kanMX4</i> | Euroscarf |

Materiales y Métodos

| Cepa | Genotipo | Referencia |
|---------------------------------------|---|-------------------|
| <i>Δiwr1 Δdst1</i> | <i>MAT? leu2Δ0 ura3Δ0 trp1Δ63 lys2Δ0 met15Δ0 iwr1::kanMX6 dst1::kanMX4</i> | Este trabajo |
| <i>Δiwr1 Δspt4</i> | <i>MAT? leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 iwr1::kanMX6 spt4::kanMX4</i> | Este trabajo |
| <i>Δiwr1 Δdef1</i> | <i>MAT? leu2Δ0 ura3Δ0 his3Δ1 met1? iwr1::kanMX6 def1::kanMX4</i> | Este trabajo |
| <i>P_{tetO-RSP5} Δiwr1</i> | <i>MAT? his3-Δ1 leu2-Δ0 met? URA3::CMV-tTA kanR- teto7-TATA::RSP5 iwr1::kanMX6</i> | Este trabajo |
| <i>Δiwr1 Δubp3</i> | <i>MAT? leu2Δ0 ura3Δ0 his3Δ1 trp1Δ63 lys2Δ0 met15Δ0 iwr1::kanMX6 ubp3::kanMX4</i> | Este trabajo |
| <i>Δiwr1 Δbre5</i> | <i>MAT? leu2Δ0 ura3Δ0 trp1Δ63 lys2Δ0 met15Δ0 iwr1::kanMX6 bre5::kanMX4</i> | Este trabajo |
| <i>P_{tetO-RPB1} Rpb2-TAP</i> | <i>MATα his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 URA3::CMV-tTA kanR-teto7-TATA::RPB1 RPB2-TAP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>P_{tetO-RPB2} Rpb1-TAP</i> | <i>MATα his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 URA3::CMV-tTA kanR-teto7-TATA::RPB2 RPB1-TAP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>P_{tetO-RPB3} Rpb1-TAP</i> | <i>MATα leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 kanR-teto7- TATA::RPB3 RPB1-TAP::HIS5</i> | Este trabajo |
| <i>P_{tetO-RPB3} Rpb2-TAP</i> | <i>MATα leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 kanR-teto7- TATA::RPB3 RPB2-TAP::HIS5</i> | Este trabajo |

Tabla 2.6. Listado de las cepas utilizadas en este trabajo.

2.1. Métodos

Métodos de cultivo para bacterias

Los cultivos de *E. coli* se realizaron en medio LB suplementado con ampicilina (LBA) a 37 °C con agitación. En los casos necesarios también se realizaron cultivos de *E. coli* en medio LBA con cloranfenicol o bien con kanamicina. La composición de los medios y las concentraciones de los aditivos están detalladas en las Tablas 2.1 y 2.2.

Métodos de cultivo para levaduras

Para los cultivos de células de levadura sin selección de marcadores se utilizó medio rico YPD o YPGal, incubando a 30 °C con agitación. Para el crecimiento en placa se utilizaron estos mismos medios con 2% (p/v) de agar incubando también a 30 °C. En el caso de cepas con auxotrofías complementadas por plásmidos o por módulos de integración fueron cultivadas en medio mínimo SC sin el requerimiento de selección. Las placas o medios de cultivo, usados en el apagado del promotor regulable *P_{tetO}*, se prepararon añadiendo doxiciclina al medio. Para la selección de células con el marcador de selección *KanMX*, que confiere resistencia a kanamicina y derivados, se suplementaron los medios de cultivo con geneticina. La composición de los medios y las concentraciones de los aditivos están detalladas en las Tablas 2.1 y 2.2.

Todos los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a 1 atmósfera de sobre-presión (121 °C). Las disoluciones de aminoácidos, antibióticos y otras drogas empleadas se esterilizaron por filtración (filtros *PALL Acrodisc* de 32 mm de diámetro con 2 µm de poro, de *Life Sciences*).

Métodos de manipulación de microorganismos

Transformación de la cepa DH5 α de *Escherichia coli*

La transformación bacteriana se llevo a cabo por electroporación de una alícuota de células competentes DH5 α descongeladas en hielo a las que se añadieron entre 1 y 20 ng de DNA plasmídico. Todo ello se depositó en una cubeta de electroporación estéril (*Eppendorf*, 1mm de ancho de ranura) y se sometió a un choque eléctrico de 1.8 kV durante 2 segundos empleando un electroporador *E. coli Pulser* de *Bio-Rad*. Las células se recogieron de la cubeta con 1 mL de medio LB y se incubaron durante 1 hora a 37 °C para su recuperación. Finalmente se sembró 1/10 parte de las células recuperadas en una placa de LBA y se incubó a 37 °C durante 24 horas.

Transformación de la cepa BL21 de *Escherichia coli*

Se mezclaron 50 μ L de células competentes con 10-100 ng de DNA plasmídico y se mantuvo en hielo durante 30 minutos. Posteriormente se realizó el choque térmico durante 90 segundos a 42 °C. Se enfriaron las células durante 5 minutos en hielo y se recuperaron en 1 mL de medio LB a 37 °C durante 1 hora en agitación. Finalmente, las células fueron sembradas en placas selectivas de LBA y se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

Transformación de levadura

Las cepas de *S. cerevisiae* se transformaron siguiendo el protocolo de incubación con acetato de litio (Gietz et al., 1995). A partir de cultivos de una noche en YPD las células se diluyeron en este mismo medio de cultivo hasta una absorbancia a 600 nm de 0,2-0,3. Después de 2,5-3 generaciones se recogieron aproximadamente $2 \cdot 10^8$ células por centrifugación y se lavaron dos veces con agua destilada estéril y una vez con LiAc 0,1 M. Seguidamente se resuspendieron en 50 μ L de LiAc 0,1 M y se incubaron

durante 15 minutos a 30°C. Después se añadieron 5 µL de DNA de esperma de salmón disuelto en TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8,0) a una concentración de 2 mg/mL previamente desnaturalizado y entre 0,1-1 µg de DNA plasmídico o 1-5 µg de DNA producto de PCR en el caso de módulos de integración. A la mezcla se añadieron 240 µL de una solución de polietilenglicol (peso molecular medio 3350, *Sigma*) 50% (p/v), 30 µL LiAc (1 M) y 30 µL de H₂O. El tubo se agitó de forma vigorosa, se incubó a 30°C 30 minutos y seguidamente se realizó un choque térmico a 42°C durante 20 minutos. En el caso de las transformaciones con plásmidos que complementan auxotrofías de la cepa, tras el choque térmico la mezcla de transformación se plaqueó en medio mínimo selectivo. En el caso de las transformaciones en las que la selección se basaba en la resistencia a antibióticos, las células fueron recuperadas en medio YPD líquido durante 5 horas en agitación a 30°C antes de realizar la siembra en placas con antibiótico.

Deleción de genes, etiquetado de proteínas y sustitución de promotores

Para realizar las manipulaciones a nivel genómico se utilizaron módulos de integración obtenidos por PCR. Estos módulos de integración contienen un gen marcador flanqueado por secuencias de DNA homólogas a las secuencias del gen que se pretende manipular. Para la deleción de genes no esenciales y el etiquetado de proteínas con los epítomos HA o GFP se emplearon los plásmidos descritos por Longtine *et al.* (1998).

La sustitución de promotores se realizó empleando una estrategia similar. Para la sustitución por el promotor P_{GAL} se utilizaron los plásmidos descritos por Longtine *et al.* (1998). Para la sustitución por el promotor P_{tetO} se utilizó el plásmido pCM225 (Bellí *et al.*, 1998).

Obtención de diploides y disección de tetradas

Algunas cepas de este trabajo fueron obtenidas mediante la esporulación y posterior disección de tétradas. Para ello, se conjugaron cepas haploides en placa seleccionando los diploides mediante sus auxotrofias o por separación manual. Para inducir la esporulación de los diploides se incubaron en placas de pre-esporulación durante 24 horas a 30 °C, para a continuación ser transferidas a medio de esporulación, donde se incubaron a temperatura ambiente durante 5 días. A continuación, se digirieron las ascas con zimoliasa 100T a 125 µg/mL en una disolución de sorbitol 0,12 M y fosfato potásico 0,01 M a pH 6,5 durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células se depositaron en placas y se procedió a la disección utilizando un micromanipulador *Singer Instruments MSM System*.

Métodos de manipulación y análisis de ácidos nucleicos

Aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli*

Para la obtención de DNA plasmídico a pequeña escala se utilizó el sistema comercial *GeneJET Plasmid Miniprep kit* de *Fermentas* siguiendo las instrucciones del fabricante.

Aislamiento de DNA genómico de levadura

La obtención de DNA genómico se llevó a cabo a partir de cultivos de 10 mL crecidos durante toda la noche a 30 °C. Las células se recogieron por centrifugación y se lavaron con agua estéril. El sedimento se resuspendió con 200 µL de tampón de lisis (triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM), 200 µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y 200 µL de perlas de vidrio. La mezcla se agitó durante 10 minutos en vórtex a 4 °C. Seguidamente se añadieron 200 µL de

tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM a pH 8,0) y se centrifugó durante 5 minutos a 12.000 rpm a 4 °C. Se recuperó la fase acuosa en un nuevo tubo y se añadieron dos volúmenes de etanol 96% (v/v) frío. Se dejó a -20 °C durante al menos 20 minutos para que precipitara el DNA y éste se recogió por centrifugación a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante por aspiración y se lavó con etanol 70% frío (v/v). El DNA se disolvió en agua estéril y se guardó a -20 °C hasta su utilización.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µL en el caso de PCRs preparativas o de 25 µL en el caso de PCRs de comprobación. Para 50 µL de reacción se emplearon: 1 µL de DNA molde obtenido mediante miniprep comercial (*Fermentas*), 22,75 µL de agua estéril, 0,25 µL de Taq polimerasa (*Go Taq Polimerase, Promega*), 10 µL de tampón 5x de la Taq polimerasa (*Promega*), 5 µL de MgCl₂ 25 mM, 5 µL de cada cebador 10 mM y 1 µL de una mezcla de los 4 dNTPs a 10 mM. Las condiciones de reacción fueron 1 ciclo de 3 minutos a 95 °C, 30 ciclos compuestos de 1 minuto a 95 °C, 30 segundos a la temperatura óptima de hibridación de cada par de oligos y un tiempo variable de elongación (1 minuto por 1Kb) a 72 °C, y finalmente 1 ciclo de 10 minutos a 72 °C.

PCR en tiempo real

Los análisis de ChIP se llevaron a cabo mediante PCR en tiempo real en el termociclador de *Bio-Rad (DNA Engine Peltier Thermal Cycler)* utilizando el kit *SYBR Premix Ex Taq* de *Takara*. El diseño de oligonucleótidos (Tabla 2.4), la mezcla de reacción y las condiciones de

amplificación se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las reacciones se realizaron por triplicado y para el procesamiento de datos se empleó el método $\Delta\Delta C_t$ (Schmittgen y Livak, 2008). Para el procesamiento de datos de los análisis de Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP) se compararon los resultados del amplificado de la muestra inmunoprecipitada con el del extracto sin fraccionar (*whole cell extract*) y se utilizó como normalizador el valor de amplificación de una región intergénica.

También se utilizaron ensayos de PCR en tiempo real para cuantificar la cantidad de DNA mitocondrial de las células. En este caso se utilizó DNA genómico como molde de amplificación y se utilizó el gen *ACT1* como gen normalizador.

Otras técnicas de DNA recombinante. Digestiones y ligaciones

Las digestiones de DNA genómico o plasmídico con endonucleasas de restricción se realizaron siguiendo las recomendaciones del fabricante (*Roche, Takara o New England Biolabs*).

Las reacciones de ligación se realizaron a temperatura ambiente durante 3-4 horas o a 16 °C durante 12-16 horas utilizando proporciones 1:3 de vector:inserto y la mezcla de reacción recomendada por la casa comercial de la DNA ligasa del fago T4 (*Roche*).

Separación de ácidos nucleicos por electroforesis

La separación de fragmentos de DNA se realizó en geles de agarosa de concentración variable (0,8%-2% (p/v)), dependiendo del tamaño de los fragmentos de DNA en tampón TBE (Tris 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM, EDTA 1,25 mM), que también fue utilizado como tampón de electroforesis. Los geles se prepararon añadiendo 3 μ L de bromuro de etidio 10 mg/mL a cada 100 mL de gel. Las muestras se mezclaron con la cantidad de tampón

de carga 6X (azul de bromofenol 0,25% (p/v), xilen cianol 0,25% (p/v), glicerol 30% (v/v)) necesaria para dejarlo en las muestras a 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.

La integridad del RNA obtenido mediante extracción y su concentración (previamente determinada por absorbancia a 260 nm) fue comprobada mediante la visualización de 1 µg de RNA total en gel de agarosa al 1% (p/v) en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM pH 8,0). Estas electroforesis se llevaron a cabo durante 10-15 min a voltaje constante (10 V/cm).

Aislamiento de RNA

Para la extracción de RNA total de levadura se recogieron las células por centrifugación, se lavaron dos veces con agua estéril fría y el sedimento celular se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C hasta su procesamiento posterior. Las células se descongelaron en hielo y se resuspendieron en 500 µL de tampón LETS (LiCl 0,1 M, EDTA 0,01 M, Tris-HCl 0,01 M, SDS 0,2% (p/v), pH 7,4). Se añadieron 500 µL de fenol (pH 4,3):alcohol isoamílico (5:1) y 300 µL de perlas de vidrio. Las células se rompieron por agitación en el aparato *Fast-Prep FP120* (Savant Instruments Inc. Farmingdale, NY) durante dos periodos de 30 segundos a velocidad 5,5 entre los cuales las células mantuvieron 1 minuto en hielo. Para separar las fases se centrifugó durante 15 minutos a 12.000 rpm y 4 °C. Se recogió el sobrenadante y se le añadió un volumen de una mezcla de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (125:24:1), centrifugando 10 minutos a 12.000 rpm. Seguidamente se realizó una nueva extracción con un volumen de una mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (4:1) en las mismas condiciones de centrifugación. Posteriormente el RNA se precipitó con un volumen de

LiCl 5 M y se dejó a -80 °C durante un mínimo de 3 horas. Se recogió por centrifugación durante 15 minutos a 12000 rpm y 4 °C, y se realizaron dos lavados de 200 µL con EtOH 70% (v/v). El RNA se resuspendió en H₂O estéril libre de RNasa y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

Análisis por Northern blot

Para los análisis por *Northern blot* se utilizaron 5 µg de RNA y las muestras se prepararon mezclando el RNA con 5 µL de formamida desionizada al 100%, 2 µL de formaldehído 37% (v/v), 1,5 µL de tampón MOPS 10X (MOPS 200 mM, NaOAc 50 mM, EDTA 10 mM, pH 7,0) y agua libre de RNasa hasta 12 µL. Una vez preparadas, las muestras se incubaron a 65 °C durante 10 minutos y seguidamente se dejaron en baño de hielo 2 minutos. Se añadió a cada muestra 2 µL del tampón de carga 6X (azul de bromofenol 0,25% (p/v), xilen cianol 0,25% (p/v), glicerol 30% (v/v)) que contenía 0.1 mg/mL de bromuro de etidio (*Merck*) y se cargó el volumen total de la muestra en el gel MOPS de electroforesis (agarosa al 1% (p/v), 20 mL de formaldehído al 37%, 10 mL de tampón MOPS 10X y 70 mL de agua). El tampón de electroforesis es MOPS 1X y la electroforesis se realizó a voltaje constante de 80 V durante aproximadamente 2 horas.

El RNA se transfirió a una membrana de nylon *N-Hybond* (*GE Healthcare*) utilizando como disolución de transferencia SSC 6X (SSC; NaCl 0,15 M, citrato sódico 0,015 M, pH 7,0). La transferencia se realizó durante la noche y el RNA se fijó a la membrana de nylon irradiando luz UV con el entrecruzador *BLX-312 Vilber Lourmat*.

Los oligonucleótidos utilizados para la obtención de sondas se detallan en la Tabla 2.4. Para el marcaje de sondas con el isótopo [α -³²P] dCTP ([α -³²P] dCTP; 3000 Ci/mmol, *Perkin Elmer*), aproximadamente 25 ng de DNA se desnaturalizaron a 95 °C durante 5 minutos. Para un volumen

final de 20 μL , se añadieron al DNA 4 μL del reactivo *High Prime (Roche)* y 2,5 μL de [α - ^{32}P] dCTP y se incubó la mezcla durante 10 minutos a 37 °C. La reacción se paró añadiendo 2 μL de EDTA a pH 8,0 y 50 μL de agua desionizada. La sonda se purificó utilizando una columna MicroSpin S-300 HR (*GE Healthcare*).

Las membranas se pre-hibridaron a 65 °C durante 1 hora y 30 minutos en tampón fosfato sódico 0,5 M a pH 7,2, EDTA 1 mM y SDS al 7%. La hibridación se realizó durante toda la noche a 65 °C con la misma disolución a la que se adicionó la sonda previamente desnaturalizada. Tras la hibridación, se realizaron 2 lavados de las membranas con solución de lavado (SSC 0,5X y SDS 0,1% (p/v)), uno rápido a temperatura ambiente y otro de 10 minutos a 65 °C. Los filtros de nylon sellados se colocaron en un *Hypercassette (GE Healthcare)* y se expusieron a una película fotográfica (*Fuji Medical X-Ray Film 100NIF Super RX*) o a una pantalla IP *Phosphorimager (Fujifilm Imaging Plate, BAS-IP MS 2025)* durante el tiempo apropiado. El análisis de la pantalla IP para la cuantificación de la radiactividad se llevó a cabo con un sistema de autorradiografía *Phosphorimager FLA3000 (Fujifilm)*. El análisis de la imagen se llevó a cabo con el programa *Image Gauge 4.0 (Fujifilm)*.

Análisis transcripcional a nivel genómico. Chips de DNA

La obtención del RNA utilizado en el análisis se realizó como se ha descrito anteriormente. El marcaje, hibridación y análisis del mismo fue llevado a cabo por el personal de la Unidad de Análisis Multigénico del Instituto de Investigación Sanitaria, INCLIVA. El protocolo utilizado fue el facilitado por el fabricante para la realización de los *Genechip yeastgenome 2.0 array* de *Affimetrix*.

Métodos de manipulación y análisis de proteínas

Obtención de extractos proteicos y cuantificación de proteínas

Para la obtención de extractos proteicos, se recogieron por centrifugación 3 unidades de absorbancia a 600 nm de células y se lavaron con agua estéril. El sedimento de células se resuspendió en 100 μ L de agua estéril fría y 100 μ L de NaOH 0,2 M. La mezcla se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se recogieron las células mediante centrifugación (1 minuto a 12.000 rpm). El sedimento se resuspendió en tampón de carga (60 mM Tris-HCl a pH 7,5, SDS 2% (p/v), glicerol 10% (v/v), azul de bromofenol 0,01% (p/v) y DTT 0,05 mM) y se incubó 5 minutos a 95 °C. El lisado se centrifugó durante 10 minutos a 3000 rpm para eliminar los restos celulares y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. La cuantificación de proteína total en los extractos se realizó por el método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando el reactivo comercializado por *Bio-Rad*, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Análisis por *Western blot*

La separación de proteínas por electroforesis se realizó utilizando geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE). La electroforesis se llevó a cabo a amperaje constante de 15-25 mA/gel durante 100-150 minutos en tampón de electroforesis (Tris base 0,3% (p/v), glicina 1,4% (p/v) y SDS 0,1% (p/v)) y, posteriormente, las proteínas se transfirieron por electrotransferencia, a 100 V durante 45 minutos a 4 °C, a membranas de nitrocelulosa (*Protran*, *Whatmann*). El tampón de electrotransferencia fue el mismo que se utilizó en la electroforesis al que se añadió metanol 20% (v/v). Las proteínas transferidas se tiñeron con una solución de *Ponceau* 1% (p/v) en ácido acético 1% (v/v) durante 1 minuto, lavando posteriormente con ácido acético 1% (v/v). El colorante se eliminó lavando la membrana con TBS (0,02 M de Tris-HCl a pH 7,6 y 0,8% (p/v) de NaCl) con el porcentaje

de Tween-20 adecuado (0,01%-0,1% (v/v)). La membrana se bloqueó con TBS-Tween suplementado con 5% (p/v) de agente bloqueante (*Skim Milk Powder, Oxoid*) durante 1h en agitación y temperatura ambiente. El anticuerpo primario se diluyó en la solución de TBS-Tween con agente bloqueante y se incubó con la membrana durante toda una noche en agitación a 4 °C. Los anticuerpos empleados y las concentraciones de trabajo se detallan en la Tabla 2.3. A continuación la membrana se lavó tres veces durante 15 minutos con TBS-Tween, y se incubó durante 1h con el anticuerpo secundario correspondiente. Se realizaron tres lavados adicionales durante 15 minutos con TBS-Tween y la detección quimioluminescente se realizó mediante el sistema *ECL Select (GE Healthcare)* siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando el *Luminescent Image Analyzer, ImageQuant LAS4000 mini, de GE Healthcare*.

Coinmunoprecipitación

Para proteínas etiquetadas con TAP se partió de 100 mL de un cultivo en YPD crecido hasta una OD₆₀₀ de 1. Las células se resuspendieron en 300 µL de tampón de lisis (HEPES-KOH 20 mM a pH 7,5, NaCl 150 mM, Triton X-100 0,1% (v/v), MgCl₂ 5 mM, glicerol 10% (v/v) e inhibidor de proteasas, *Complete de Roche*) y se lisaron agitando vigorosamente en presencia de perlas de vidrio. El extracto se clarificó y se incubó con 250 µL de suspensión de resina *IgG-Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare)* durante 90 min a 4 °C. La resina se sometió a 3 lavados con tampón de lisis y se procedió a la elución incubando con 100 µL de SDS 1% (v/v) durante 15 min a 65 °C. 1/5 parte del eluido se utilizó para el análisis de las proteínas inmunoprecipitadas por *Western blot*.

Para proteínas etiquetadas con HA se partió de 100 mL de células de un cultivo en YPD crecido hasta una OD₆₀₀ de 1. Las células se

resuspendieron en 100 μ L de tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM a pH 8, NaCl 250 mM, Triton X-100 0,1% (v/v), EDTA 5 mM, PMSF 1 mM e inhibidor de proteasas, *Complete de Roche*) y se lisaron agitando vigorosamente en presencia de perlas de vidrio. El extracto se clarificó y se incubó con 10 μ g de anticuerpo anti-HA (3F10), previamente unido a perlas magnéticas *Dynabeads Protein G (Invitrogen)* durante 20 min a temperatura ambiente. A continuación, la perlas magnéticas se lavaron 3 veces con tampón fosfato (NaCl 150 mM, Na_2HPO_4 40 mM, NaH_2PO_4 10 mM, pH 7,4) con Tween 0,02% (v/v), y se eluyó la fracción retenida incubando las perlas con 15 μ L de tampón de elución (Tris-HCl 50 mM a pH 8, EDTA 10 mM, y SDS 0,1% (v/v)) durante 5 min a temperatura ambiente. El eluido se recuperó por centrifugación y se utilizó su totalidad para visualización por *Western blot*.

Inmunoprecipitación de cromatina

Se utilizaron células procedentes 100 mL de cultivo en medio YPD, que se crecieron hasta una OD_{600} de 0,5-0,7. Las células se entrecruzaron *in vivo* con formaldehído 1% (v/v), durante 15 minutos a temperatura ambiente. El entrecruzamiento se detuvo por la adición de glicina a una concentración final de 125 mM, con una incubación adicional de 5 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 μ L de tampón de lisis (HEPES-KOH 50 mM a pH 7,5, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 al 1% (v/v), desoxicolato sódico 0,1% (p/v), PMSF 1 mM, benzamidina 1 mM e inhibidor de proteasas *Complete (Roche)*) y 300 μ L de perlas de vidrio. La lisis se llevó a cabo durante 30 minutos a 4 °C en un vórtex modelo Genie-2 (*Scientific Industries*) a máxima potencia. Tras eliminar las perlas de vidrio, la cromatina se fragmentó (tamaño medio entre 400 y 800 pb) por sonicación (5 pulsos de 30 segundos a la máxima potencia con un sonicador *BioRuptor*

Diagenode) y se centrifugó a 12.000 rpm durante 20 minutos. El extracto se incubó a 4 °C en agitación rotatoria durante 2-3 horas con el anticuerpo previamente unido a las perlas magnéticas Dynabeads Pan Mouse IgG (*Invitrogen*). A continuación, las perlas magnéticas se lavaron 2 veces con tampón de lisis, dos veces con tampón de lisis suplementado con NaCl 500 mM, dos veces con tampón de lavado (Tris-HCl 10 mM a pH 8,0, LiCl 250 mM, NP-40 0,5% (v/v), desoxicolato sódico 0,5% (p/v) y EDTA 1mM) y una vez con tampón TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1mM). La elución se realizó con tampón de elución (Tris-HCl 50 mM a pH 8,0, EDTA 10 mM y SDS 10% (p/v)) calentando a 65 °C durante 10 minutos. El entrecruzamiento se revirtió mediante una incubación a 65 °C durante la noche. El eluido se digirió durante 90 minutos a 37 °C con 0,33 mg/mL de proteinasa K y se purificó el DNA utilizando el *PCR Purification Kit (Roche)*.

Purificación de proteínas mediante Tandem Affinity Purification (TAP)

Las proteínas se etiquetaron en C-terminal con una etiqueta de afinidad constituida la proteína A (con afinidad por IgG) seguida de un sitio de corte para la proteasa TEV y, finalmente, la proteína de unión a la calmodulina (CBP).

En estos experimentos se siguió básicamente el protocolo descrito en dos trabajos previos (Schmitt et al., 1999; Puig et al., 2001). El ensayo se realizó con 15 g de células portadoras de la proteína de interés etiquetada. Los cultivos se crecieron en medio YPD hasta una OD₆₀₀ de 2 - 3. Las células se recogieron mediante centrifugación durante 20 min a 6.000 rpm a 4 °C. A continuación se hizo un lavado con agua fría y el sedimento se congeló en nitrógeno líquido y se conservó a -80 °C hasta su lisis posterior. Las células descongeladas se resuspendieron en tampón de lisis (10 mM

Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 20% (v/v) glicerol, 0,1% NP-40 (v/v), 1 mM PMSF, 1 mM DTT y inhibidor de proteasas *Complete* de *Roche*) y se lisaron agitando vigorosamente en presencia de perlas de vidrio. Se eliminaron las perlas junto con los restos celulares y se clarificó el sobrenadante centrifugando 1 hora a 12.000 rpm a 4 °C. El extracto obtenido se incubó con 250 µL de suspensión de resina *IgG-Sepharose 6 Fast Flow* (*GE Healthcare*) durante 1 hora a 4 °C en agitación rotatoria. La *IgG-Sepharosa* se sedimentó por centrifugación durante 3 minutos a 2.500 rpm y se suspendió en un volumen de 200 µL de tampón de lisis, que se transfirió a una columna de 1 mL, *Mobicol Classic* de *MoBiTec*, donde se hizo un lavado con 10 mL de tampón de digestión (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 20% (v/v) glicerol, 0,1% NP-40 (v/v) y 1mM DTT) conectando dicha columna a una jeringa de 10 mL. La resina de *IgG-Sepharosa* lavada se suspendió en 150 µL de tampón de digestión, a los que se añadieron 10 µL de proteasa TEV (0.5 mg/mL) y se incubó durante 2 horas a 16 °C en agitación rotatoria. Tras centrifugar, se recuperó el eluido y se incubó con 300 µL de Calmodulina-Agarosa (*Calmodulin Affinity Resin* de *Stratagene*) en presencia de 2 mM CaCl₂ durante 1 hora a 4 °C en agitación rotatoria. Tras la incubación la resina fue lavada con 5 mL de tampón de lisis suplementado con 2 mM de CaCl₂. La elución 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 eluido fue precipitado en presencia de 10% de TCA durante toda la noche a 4 °C.

El precipitado se utilizó para la identificación de las proteínas presentes en la mezcla por espectrometría de masas, o bien para detectar la presencia de proteínas específicas mediante *Western blot*.

Identificación de proteínas por espectrometría de masas

El análisis de las proteínas por espectrometría de masas tipo MALDI TOF/TOF – *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of flight* – fue llevado a cabo por el personal de la Unidad de Proteómica de la Universidad de València que está integrado y sigue los estándares de Proteored España.

Ensayos de “pull down”

Se utilizaron 500 mL de cultivo de las cepas BL21 de *E. coli* portadoras de las proteínas de fusión con GST (Nup100-GST, Nup116-GST y GST como control). Los cultivos en crecimiento exponencial se indujeron con IPTG 0,5 mM durante 12 h a 16 °C en agitación. Las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 10 mL de tampón fosfato (NaCl 150 mM, Na₂HPO₄ 40 mM, NaH₂PO₄ 10 mM, a pH 7,4) suplementado con inhibidor de proteasas (*Complete de Roche*) y se lisaron por sonicación. Se añadió Tritón X-100 a una concentración final de 1% (v/v) y las proteínas se solubilizaron durante 30 minutos en agitación a 4 °C. El extracto se clarificó por centrifugación y se incubó con 500 µL de suspensión de resina Glutación Sepharosa (*GE, Healthcare*), previamente equilibrada con tampón fosfato, durante 30 minutos en agitación a 4 °C. Para eliminar las proteínas no retenidas a la resina se realizaron 3 lavados con éste tampón. Finalmente, la resina se resuspendió en 500 µL de tampón fosfato con inhibidor de proteasas y se guardó a 4 °C para su uso posterior.

De forma paralela, se realizó la purificación de la proteína de fusión con una cola de histidinas (His₆-Rtp1). Un cultivo de 500 mL de la cepa de *E. coli* BL21 portadora de la proteína de fusión His₆-Rtp1 en fase

exponencial se indujo con IPTG 0,5 mM durante 5 h a 37 °C para conseguir la expresión de la proteína de fusión. Las células inducidas se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 10 mL de tampón de lisis (HEPES-KOH 20 mM a pH 6,8, KOAc 150 mM, Mg(OAc)₂ 2 mM, DTT 2 mM y coctel inhibidor de proteasas). Se realizó la lisis por sonicación y se añadió Triton X-100 hasta 1% para solubilizar las proteínas durante 30 minutos en agitación a 4 °C. Para clarificar el extracto se centrifugó durante 30 minutos a 12.000 rpm. El sobrenadante se incubó con 200 µL de suspensión de resina Ni-Sefarosa (*GE, Heathcare*) durante 1 h a temperatura ambiente. Para eliminar las proteínas no retenidas a la resina se realizaron 2 lavados con tampón TBS-SDS (Tris-HCl 20 mM a pH 7,6, NaCl 0,8% (p/v) y SDS 0,5% (p/v)) y un lavado con éste mismo tampón suplementado con imidazol 20 mM. La elución de la proteína de fusión se realizó incubando durante 5 minutos a temperatura ambiente con 125 µL de este mismo tampón suplementado con imidazol 200 mM.

Para analizar la interacción entre las proteínas de fusión con GST y la proteína de fusión con la cola de histidinas se utilizaron 40 µL de resina unida a la proteína de fusión con GST correspondiente. Se procedió a lavar la resina con el tampón de unión (HEPES-KOH 20 mM a pH 6,8, KOAc 150 mM, Mg(OAc)₂ 2 mM, DTT 2 mM y coctel inhibidor de proteasas) y se dejaron en un volumen final de 40 µL, a los que se añadieron 5 µL de proteína His-Rtp1 purificada y se incubó durante 1 h a 4 °C. Posteriormente, se lavó 6 veces la resina con el tampón de unión y se añadieron 13 µL de tampón de carga 5x (300 mM Tris-HCl a pH 7,5, SDS 10% (p/v), Glicerol 50% (v/v), azul de bromofenol 0,05% (p/v) y DTT 0,25 mM) incubando 5 minutos a 95 °C. Las proteínas presentes en el sobrenante se analizaron en un gel de SDS-PAGE.

Ensayos de actividad β -galactosidasa

Se recogieron por centrifugación las células equivalentes a 3 unidades de absorbancia a 600 nm y se lavaron con 1 mL de tampón Z (Na_2HPO_4 60 mM, NaH_2PO_4 40 mM, KCl 10 mM, MgSO_4 1 mM y β -mercaptoetanol 40 mM). Las células se resuspendieron en 1,2 mL de este tampón y 200 μL se utilizaron para medir la absorbancia a 600 nm. El resto de las células se permeabilizaron añadiendo 3 gotas de cloroformo y 2 gotas de SDS al 0,1% (p/v), agitándose la mezcla en vórtex durante 10 segundos. Tras incubar las células durante 5 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 200 μL de 4 mg/mL ONPG (o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido) preparado en tampón Z. La reacción se detuvo tras la aparición de coloración, añadiendo 500 μL de Na_2CO_3 1M, se centrifugó para eliminar los restos celulares y se midió la OD_{420} .

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

$$\text{Actividad } \beta\text{-galactosidasa} = [\text{OD}_{420}/(\text{OD}_{600} \times \text{V} \times \text{t})] \times 1000$$

En la que:

OD_{600} es la OD a 600 nm de las células ensayadas.

V es el volumen de células ensayado, en mL (en nuestro caso 1 mL).

t es el tiempo de reacción, en minutos.

OD_{420} es la OD correspondiente a al producto de la reacción.

Técnicas microscópicas

Las muestras se visualizaron con un microscopio de fluorescencia *Axioskop 2 de Zeiss Inc.* Las imágenes se tomaron con una cámara digital *AxioCam MRm (Zeiss Inc)*, y se cuantificaron con el software *AxioVision v4.7 (Zeiss Inc)*.

Inmunofluorescencia indirecta

Las células procedentes de 1 mL de cultivo a una OD₆₀₀ de 0,5 se fijaron con 1 mL de tampón A (100 mM fosfato potásico pH 6,4, MgCl₂ 0,5 mM y 3,7% formaldehído) durante 2h a 30 °C y se lavaron con tampón B (100 mM fosfato potásico pH 6,4, MgCl₂ 0,5 mM y sorbitol 1,2 M). A continuación, las células se incubaron con el tampón B, con β-mercaptoetanol 0,1% y zimoliasa 20-T 200µg/mL durante 20 minutos. Posteriormente, las células se lavaron con tampón B y se resuspendieron en un volumen de 100 µL de éste tampón. Muestras de 5-10 µL de éstas células se depositaron en portaobjetos multipocillo donde se bloquearon con tampón fosfato con BSA 1% (p/v) y incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes durante toda la noche a 4 °C. Las concentraciones usadas se encuentran en la tabla 2.3. Los lavados tras la incubación con los anticuerpos se realizaron de igual modo con tampón fosfato con BSA 1%. La incubación con el anticuerpo secundario se realizó con el anticuerpo correspondiente (anti-ratón o anti-rata) conjugado con Alexa 546 (*Molecular Probes*) a una dilución 1:500 durante 1h a 4 °C. Los núcleos se tiñeron con 4,6-diamidino-2-fenilindol, (DAPI, *Sigma*) 0,1 µg/mL, incubando 2 minutos tras los lavados de los anticuerpos. Finalmente los pocillos se cubrieron con glicerol 50% y se colocó y selló el cubreobjetos. Las imágenes se tomaron como se describe anteriormente.

Localización *in vivo* de proteínas marcadas con GFP

Las proteínas fusionadas con GFP se visualizaron en células vivas crecidas en el medio correspondiente para cada caso. Alícuotas de 1,2 µL de los cultivos se colocaron sobre los portaobjetos y se visualizaron al microscopio de fluorescencia.

Tinción *in vivo* de núcleos

La tinción de núcleos *in vivo* se realizó utilizando células fijadas durante 15 minutos a temperatura ambiente con paraformaldehído 15% (v/v), añadiendo directamente el paraformaldehído sobre el medio de cultivo. Posteriormente las células lavaron con tampón fosfato y se tiñeron con una solución de tampón fosfato 7,5 µg/mL de DAPI (*Sigma*), en el caso de los mutantes *Δiwr1* y *Δrtp1*, y 2,5 µg/mL en el caso de la cepa silvestre.

Análisis del ratio núcleo/citoplasma

Para la cuantificación del ratio núcleo/citoplasma de las fusiones con GFP se utilizó el software *AxioVision v4.7 (Zeiss Inc)*. El citoplasma y el núcleo se marcaron de forma manual. La intensidad se cuantificó y normalizó por el área seleccionada, obteniendo la intensidad media de cada uno de los compartimentos. Estos valores fueron normalizados teniendo en cuenta la intensidad media del fondo. Para cada célula analizada se calculó la ratio entre la intensidad media del núcleo y la del citoplasma y se obtuvo el valor medio de, al menos, 50 células por cepa.

3. Rtp1p es una proteína tipo carioferina requerida para la biogénesis de la RNA pol II

Con el objetivo de identificar interacciones genéticas que contribuyan a la caracterización funcional de NC2, nuestro grupo realizó un rastreo genético en busca de mutaciones supresoras del requerimiento de NC2 para el crecimiento celular. Entre los alelos supresores identificados se encontró el gen *YMR185w* que hemos renombrado *RTP1* (**R**equired for nuclear **t**ransport of RNA **p**ol II). Dicho gen será el objeto de estudio en esta parte del trabajo.

3.1 Resultados

Mutaciones en el gen *RTP1* suprimen la deficiencia del factor transcripcional NC2

Para identificar mutaciones supresoras del requerimiento del factor de transcripción NC2, se utilizó una cepa de levadura en la que los genes codificadores de los dos componentes de NC2 (*BUR6* e *YDR1*) se encuentran bajo el control del promotor *GAL10*. Esta cepa se transformó con una genoteca de DNA genómico mutagenizado por inserción del transposón *mTn3-lacZ/LEU2* (Burns et al., 1994). Las mutaciones supresoras se seleccionaron por su capacidad de permitir el crecimiento en medio con glucosa como fuente de carbono a temperatura ambiente. Entre otros, se identificaron 3 supresores cuyo sitio de inserción del transposón se localizó en puntos distintos de la ORF del gen *RTP1* (en las posiciones 511, 923 y 1173 desde el ATG). Las posiciones de inserción sugirieron que el efecto supresor era consecuencia de una pérdida completa de la función de Rtp1p, puesto que la inserción en la posición 511 da lugar a un fragmento N-terminal de 170 aminoácidos de los 982 totales de Rtp1p. La bibliografía existente sobre si el mutante nulo *rtp1* es viable o inviable es contradictoria (Watanabe et al., 2009; Giaever et al., 2002). Así pues, analizamos la viabilidad del mutante nulo *rtp1* mediante la esporulación del heterocigoto diploide. Como se muestra en la Figura 3.1.A las cuatro esporas son viables, aunque los segregantes que portan la delección completa del gen *RTP1* presentan un grave defecto en crecimiento. Por último, comprobamos que, como cabía esperar, la mutación de *RTP1* era capaz de suprimir tanto la depleción de los dos componentes de NC2 como la de cualquiera de ellos (Figura 3.1.B).

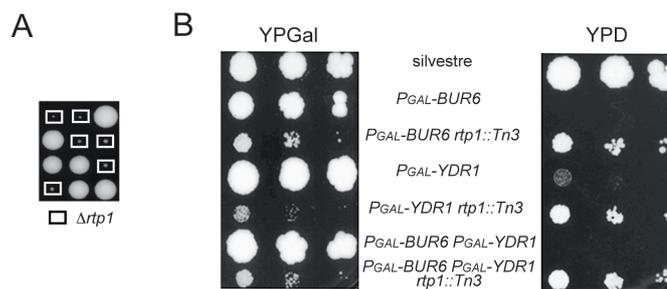


Figura 3.1. *RTP1* es un gen no esencial cuya delección suprime la depleción de los componentes de NC2 Bur6p e Ydr1p. (A) El heterocigoto diploide fue esporulado y los segregantes fueron incubados en una placa de YPD durante 8 días a 25°C. Los segregantes portadores de la delección *rtp1::kan^R* están indicados con rectángulos. (B) La mutación *rtp1* se combinó con los alelos *P_{GAL10}-BUR6* y/o *P_{GAL10}-YDR1*. Se sembraron diluciones seriadas de los mutantes y del silvestre (FY86) en placas de YPGal o YPD y se incubaron durante 8 días.

También nos preguntamos si la delección del gen *RTP1* era capaz de suprimir la ausencia de NC2. Para ello delecionamos el gen de uno de sus componentes (*BUR6*) y mantuvimos la cepa viable por la presencia de un plásmido con el gen *BUR6* silvestre (*pURA3/CEN/BUR6*). Cuando en esta cepa se introdujo la delección *Δrtp1* la cepa resultante fue capaz de crecer en placas de 5'-FOA, lo que es indicativo de que la delección de *RTP1* es capaz de compensar el requerimiento, de otra forma esencial, del componente Bur6p de NC2.

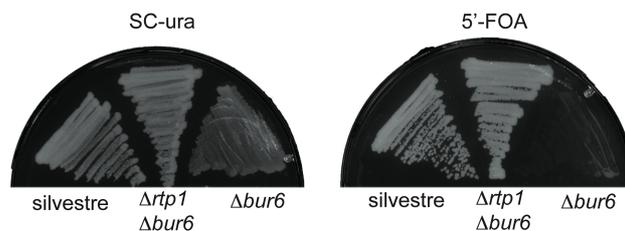


Figura 3.2. La delección de *RTP1* es capaz de suprimir la ausencia de la subunidad de NC2, Bur6p. Las cepas *bur6*, *rtp1bur6* y silvestre que contenían además el gen *BUR6* en un plásmido centromérico con marcador de selección *URA3* (*pBUR6/URA3*) se sembraron en placas con 5'-FOA y se incubaron 5 días a 30°C.

En nuestra búsqueda de supresores de la función de NC2, además *RTP1*, se identificaron diferentes componentes del complejo pre-inicio de la transcripción y el gen *IWR1*, en aquel momento poco caracterizado (Peiró-Chova y Estruch, 2009). Para determinar la posible existencia de una interacción genética entre *IWR1* y *RTP1* se construyó la cepa con la delección del gen *RTP1* y con el gen *IWR1* bajo el control del promotor reprimible *tetO*. Como se observa en la Figura 3.3, la cepa con la doble mutación no fue capaz de crecer tras la adicción de doxiciclina al medio, sugiriendo una posible relación funcional entre ambos genes.

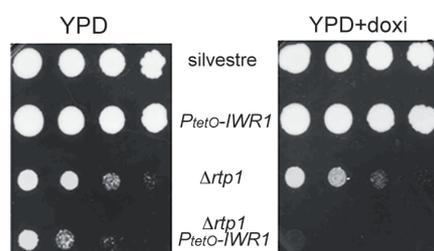


Figura 3.3. Interacción genética entre *RTP1* e *IWR1*. Las cepas silvestre (FY86) y mutantes fueron sembradas haciendo diluciones seriadas en placas de YPD o YPD suplementado con 10 mg/L de doxiciclina y se incubaron durante 6 días a 30°C.

Caracterización fenotípica del mutante *rtp1*

Como se ha comentado, *RTP1* no es un gen esencial. Sin embargo, su delección tiene un importante efecto negativo sobre el crecimiento, al menos en medio completo con glucosa como fuente de carbono (Figura 3.1.A). Con objeto de determinar el requerimiento de Rtp1p en otros medios, se analizó el crecimiento del mutante $\Delta rtp1$ en medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono, tanto fermentables como no fermentables, así como en medio sintético (SC). Como se observa en la Figura 3.4.A los defectos de

crecimiento del mutante $\Delta rtp1$ se observan tanto en medio rico como sintético y tanto en fuentes de carbono fermentables como no fermentables. También se analizó el efecto de la temperatura sobre el crecimiento, observando una exacerbación de los defectos de crecimiento mostrados por el mutante $rtp1$ a medida que aumenta la temperatura del cultivo (Figura 3.4.B).

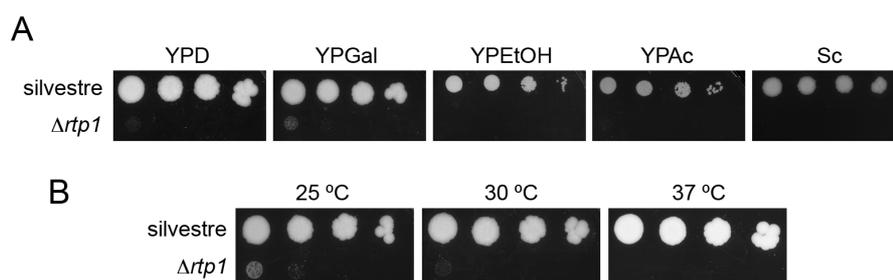


Figura 3.4. Defectos en el crecimiento del mutante $\Delta rtp1$. (A) Se sembraron células del mutante $\Delta rtp1$ y de la cepa isogénica silvestre (FY86) en los medios de crecimiento indicados y se incubaron a 30°C durante 3 días. (B) Se sembraron células del mutante $\Delta rtp1$ y de la cepa isogénica silvestre (FY86) en placas de YPD a las temperaturas indicadas.

Finalmente, la observación microscópica de la cepa mutante puso de manifiesto un tamaño celular notablemente superior al de la cepa silvestre (Figura 3.5.A). Para una caracterización más completa se llevó a cabo el estudio del tamaño celular de mutante nulo $rtp1$. El volumen celular promedio (medido en células crecidas exponencialmente en medio YPD) fue mayor en el mutante (105 fL) que en la cepa silvestre (46 fL). Además, como se observa en la Figura 3.5.B las células de la cepa mutante muestran una gran heterogeneidad en cuanto a tamaño.

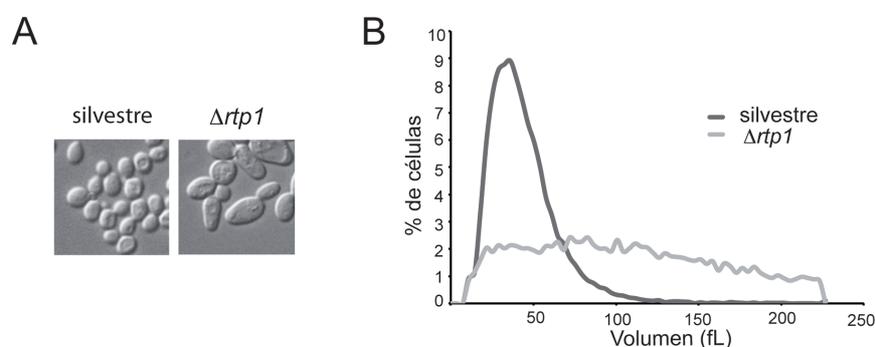


Figura 3.5. Morfología de las células del mutante $\Delta rtp1$. (A) Se cultivaron células de la cepa silvestre (FY86) y del mutante $\Delta rtp1$ en YPD hasta fase exponencial y se obtuvieron imágenes DIC en un microscopio de fluorescencia. (B) Análisis del tamaño celular del mutante nulo *rtp1*. Las cepas silvestre (FY86) y mutante $\Delta rtp1$ se crecieron hasta fase exponencial usando YPD como medio de cultivo. Los resultados son la media móvil de 3 cultivos independientes de cada cepa.

El gen *RTP1* codifica una proteína formada por repeticiones tipo HEAT

En colaboración con el Doctor Julio Polaina del Departamento de Biotecnología, IATA, Valencia, se llevó a cabo el análisis estructural de la proteína Rtp1p. Dos de los modelos obtenidos con el servidor I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) tuvieron valores de C-score de -1,30 y -1,31 los cuales están por encima del -1,5 tomado como valor límite de confianza (Roy et al., 2010). Las estructuras proteicas tomadas como molde para construir estos modelos fueron la importina β humana (PDB ID:1QGK) (Cingolani et al., 1999) y la transportina 1 (PDB ID:2Z5K) (Imasaki et al., 2007). Se encontraron un gran número de

estructuras correspondientes a proteínas humanas y de levadura con una homología estructural a Rtp1p significativa mediante I-TASSER y PSIPRED. Una característica común de todas estas proteínas fue una arquitectura basada en repeticiones tipo HEAT, típica de proteínas de la familia de las β carioferinas (Conti et al., 2006; Cook y Conti, 2010). La Figura 3.6. muestra el modelo de Rtp1p basado en la importina β .

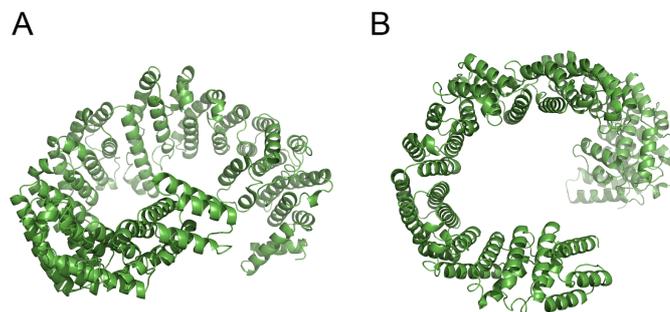


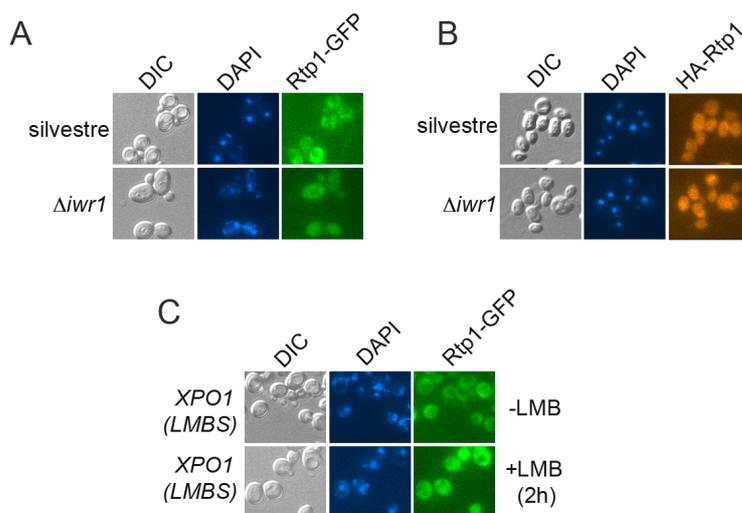
Figura 3.6. Modelo estructural de la proteína de *S. cerevisiae* Rtp1p basado en la importina β humana. (A) Vista lateral; (B) Vista superior.

La proteína Rtp1p está distribuida por toda la célula

La relación genética entre *RTP1* y el factor de importación de la RNA pol II, *IWR1*, así como el resultado de modelización estructural de la proteína Rtp1p, nos llevó a estudiar cual era su localización celular. Para ello analizamos la distribución de Rtp1p *in vivo* utilizando la fusión Rtp1-GFP (Figura 3.7.A) y por inmunofluorescencia con una fusión HA-Rtp1 en la que el gen *RTP1* se expresó bajo el control del promotor *GAL10* (Figura 3.7.B). En ambos casos se observó una distribución de Rtp1p por toda la célula, sin un aparente enriquecimiento o exclusión nuclear.

Por otra parte, y puesto que la proteína Iwr1p se mueve entre el núcleo y el citoplasma de manera dependiente de la exportina Xpo1p (Peiró-Chova y Estruch, 2009), se estudió la posibilidad de que la proteína Rtp1p presentara este mismo comportamiento. Para ello, se examinó la localización celular de Rtp1p-GFP en una cepa mutante *XPO1T539C*. En esta cepa, la adición de leptomicina B (LMB) inhibe el transporte mediado por Xpo1p (Neville y Rosbash, 1999). La distribución celular de la proteína Rtp1p no se vio afectada por la adición de LMB al medio, incluso a tiempos largos de incubación (Figura 3.7.C).

Dada la relación genética entre *IWR1* y *RTP1* también comprobamos si la depleción de *IWR1* afectaba de algún modo a la localización celular de Rtp1p. Como se observa en la Figura 3.7.A y B no se detectó ningún cambio significativo en la distribución celular de Rtp1p en el mutante $\Delta iwr1$ respecto al observado en la cepa silvestre.



Rtp1p interacciona *in vivo* e *in vitro* con Nup100p y Nup116p

En *S. cerevisiae* existen 14 miembros conocidos de la familia de las β carioferinas. Además de una arquitectura característica con repeticiones tipo HEAT, estas proteínas comparten similares pesos moleculares (90-150 kDa) y puntos isoeléctricos (pI= 4,0-5,0) (Chook y Süel, 2011). Rtp1p tiene un peso molecular de 113 kDa y un punto isoeléctrico de 4,91 (Saccharomyces Genome Database). Las proteínas de la familia de las β carioferinas se unen débilmente a las repeticiones ricas en fenilalanina-glicina (FG) de las nucleoporinas que forman parte de los complejos del poro nuclear (NPC), y dirigen la entrada del cargo a través del NPC (Chook y Süel, 2011).

La predicción estructural de Rtp1p comentada previamente, hace a esta proteína una buena candidata para interactuar con los dominios de las nucleoporinas constituidos por repeticiones FG. Con el objetivo de determinar la posible interacción *in vivo* realizamos experimentos de doble híbrido. Para ello, fusionamos la proteína Rtp1p con el dominio de unión a

Figura 3.7. Localización celular de Rtp1p. (A) Células del mutante *Δiwr1* y de una cepa silvestre que expresaban la proteína Rtp1-GFP se crecieron en YPD a 30°C hasta fase exponencial y la proteína de fusión así como la localización de los núcleos, teñidos con DAPI, se visualizaron en el microscopio de fluorescencia. (B) Localización inmunofluorescente de HA-Rtp1p. Células del mutante *Δiwr1* y del silvestre que expresaban la construcción P_{GAL10} -RTP1, donde el promotor de RTP1 ha sido sustituido por el promotor GAL10 que incluye tres copias del epítipo HA, fueron procesadas para inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo 3F10 y el anticuerpo secundario de cabra conjugado con Cy3 y teñidas con DAPI para la detección del DNA. (C) Células de la cepa CCY001 mutante *XPO1* sensible a LMB (LMBS) que expresaban la proteína de fusión Rtp1-GFP se crecieron en YPD a 30°C hasta fase exponencial. Las células entonces se incubaron durante 2h en presencia (+LMB) y ausencia (-LMB) de 10 ng/mL de LMB. Las células, Rtp1-GFP y los núcleos se observaron como se describe en el panel A.

DNA LexA (LexA-Rtp1) y las regiones que contienen las repeticiones GLFG de Nup100p y Nup116p con el dominio de activación transcripcional Gal4p (GAD-Nup100 y GAD-Nup116 respectivamente). La transformación simultánea con LexA-Rtp1 y GAD-Nup100, o GAD-Nup116 tuvo efectos negativos en el crecimiento celular (resultado no mostrado). No obstante, se observó una interacción débil pero significativa entre Rtp1p y las nucleoporinas *in vivo* midiendo la inducción un gen reportero *lacZ* cuyo promotor incluye sitios de unión LexA (Figura 3.8.B). Para determinar si la interacción detectada por doble híbrido entre Rtp1p y las nucleoporinas era una interacción directa o indirecta, realizamos ensayos de unión con proteínas recombinantes purificadas. Para ello, la pauta abierta de lectura (ORF) de *RTP1* se insertó en el plásmido pRSET-A. La proteína Rtp1p expresada a partir de este plásmido incluye en posición N-terminal una cola de poli-histidina y el epítipo Xpress para detección inmunológica. Los niveles de expresión de esta proteína de fusión no fueron suficientes para su detección mediante una tinción con Coomassie, sin embargo se pudo detectar por *Western blot* utilizando el anticuerpo anti-Xpress (Figura 3.8.A). Rtp1p se purificó como la proteína de fusión His₆-Rtp1p mediante una cromatografía de afinidad con columnas de Ni-agarosa con una posterior elución con imidazol. La fracción purificada contuvo la proteína de longitud completa (113 KDa) y fragmentos más pequeños, probablemente correspondientes a productos proteolíticos (ver input en Figura 3.8.C). Las regiones GLFG de las nucleoporinas se obtuvieron como proteínas de fusión a GST (GST-Nup100p y GST-Nup116p) y se inmovilizaron en una resina de glutatión-sepharosa. A continuación, se incubó His₆-Rtp1p con las proteínas de fusión inmovilizadas GST-Nup100p, GST-Nup116p y GST como control. La fracción unida se eluyó y se analizó por *Western blot* con un anticuerpo que reconoce el epítipo Xpress. His₆-Rtp1p no se une a GST (Figura 3.8.C). Por el contrario, la proteína Rtp1p de longitud completa, pero no los fragmentos de menor tamaño, se detectó en la fracción retenida cuando se

utilizaron GST-Nup100p y GST-Nup116p (Figura 3.8.C), sugiriendo así una asociación directa entre Rtp1p y las regiones GLFG de estas nucleoporinas.

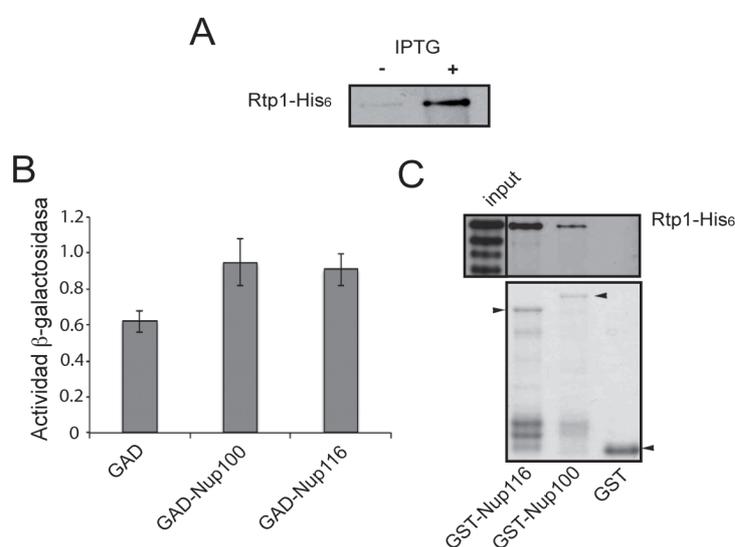


Figura 3.8. Interacciones *in vivo* (doble híbrido) e *in vitro* (pull-down) entre Rtp1p y las regiones GLFG de las nucleoporinas Nup100 y Nup116. (A) Células de *E. coli* BL21 transformadas con el plásmido pRSET-RTP1 se cultivaron a 37°C hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,5 en LB (- IPTG) y entonces fueron inducidas mediante la adición de IPTG 1 mM durante 5 horas a 37°C (+ IPTG). Extractos de proteínas correspondientes a un mismo número de células se aplicaron a geles de SDS-poliacrilamida al 8 %. Rtp1p-His₆ se detectó por *Western blot* usando el anticuerpo anti-Xpress. (B) Actividad β-galactosidasa resultante de las interacciones doble híbrido entre Rtp1-GBD y Nup100p-GAD o Nup116p-GAD. Los ensayos se realizaron por triplicado con levaduras transformadas conteniendo los respectivos plásmidos junto con pSH18-34. Los resultados obtenidos con pGAD-NUP100 y pGAD-NUP116 fueron significativamente distintos a los obtenidos con pGAD, como se determinó mediante el test t-student con dos colas para grupos de distinta varianza (P<0,01). (C) Las proteínas de fusión GST-(GLFG)-Nup100, GST-(GLFG)-Nup116 y el control GST se expresaron en *E. coli* y se inmovilizaron en una resina de glutatión-sepharosa. Las flechas indican las bandas correspondientes a las proteínas Nup100p y Nup116p completas. La proteína recombinante Rtp1p-His₆ purificada se añadió a la fracción retenida. Un 4 % de la proteína total (input) y las fracciones eluidas fueron resueltas en un gel de SDS-poliacrilamida del 8 % y detectadas por *Western blot* utilizando el anticuerpo anti-Xpress.

Rtp1p no interacciona *in vivo* con las GTPasas candidatas a participar en la importación de la RNA pol II

Otra de las características de las proteínas de la familia de las β -carioferinas es su unión a la GTPasa de pequeño tamaño RanGTP, preferentemente a través de su región N-terminal (Chook y Süel, 2011). Rtp1p no fue identificada en una búsqueda por homología basada en el alineamiento de la región N-terminal conservada entre las proteínas de la familia de las β -carioferinas (Görlich et al., 1997). Además no fuimos capaces de detectar la interacción de Rtp1p con las dos proteínas Ran GTPasas descritas en levadura, Gsp1p y Gsp2p (Lau et al., 2000). Como se observa en la Figura 3.9.A, cuando Rtp1p etiquetada con HA fue sobre-expresada (colocando al gen *RTP1* bajo el control del promotor *GAL10*) y se analizó por inmunoprecipitación su interacción con Gsp1p y Gsp2p, no se detectó la presencia de Rtp1p en la fracción retenida.

Tras la identificación de la GTPasa RPAP4/GPN1/Npa3p (conservada en eucariotas) como un factor de importación nuclear de la RNA pol II se han sugerido nuevas vías para el transporte al núcleo de la RNA polimerasa II que podrían implicar a esta GTPasa (Carré y Shiekhattar, 2011; Forget et al., 2010; Staresincic et al., 2011). Sin embargo, en un experimento similar al realizado con Gsp1p y Gsp2p, descrito con anterioridad, tampoco fuimos capaces de detectar una interacción física entre Rtp1p y Npa3p (Figura 3.9.B).

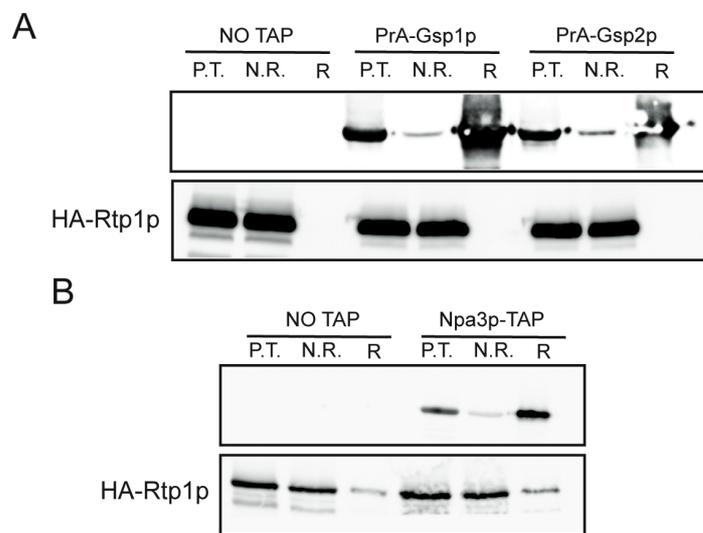


Figura 3.9. Rtp1p no interacciona con las GTPasas Ran y Npa3p de *S. cerevisiae*. Se llevaron a cabo ensayos de co-inmunoprecipitación con cepas de levadura donde las proteínas Gsp1p, Gsp2p se encontraban etiquetadas con la Proteína A (PrA) (A) o Npa3p etiquetada con TAP (B) y con una cepa no etiquetada como control. Todas las cepas portaban una versión de *RTP1* donde el promotor silvestre de dicho gen fue sustituido por el promotor *GAL10*, incluyendo tres copias del epítipo HA. Las proteínas etiquetadas con TAP fueron inmunoprecipitadas utilizando IgG-sepharosa. Las proteínas en el extracto fueron detectadas por *Western blot* utilizando el anticuerpo anti-PAP (Sigma) para las proteínas etiquetadas con TAP y el anticuerpo anti-HA 3F10 (GE Healthcare) para HA-Rtp1. Se muestran fracciones de proteína total (P.T.), proteínas no retenidas (N.R.) y retenidas (R).

Rtp1p se requiere para la importación nuclear de la RNA pol II

La predicción de estructura de Rtp1p y su interacción con las nucleoporinas sugiere un papel de esta proteína en transporte núcleo-citoplasma. Además, otro gen, *IWR1*, identificado en nuestra búsqueda de supresores del defecto causado por la ausencia de NC2 y relacionado

genéticamente y fenotípicamente con *RTP1* codifica una proteína implicada en la importación nuclear de la RNA pol II (Czeko et al., 2011). Estos resultados determinaron que analizáramos el efecto de la mutación $\Delta rtp1$ en la localización celular de la RNA pol II. En primer lugar, se analizó la localización subcelular de la subunidad mayor de la RNA pol II, Rpb1p, introduciendo en la cepa silvestre y en el mutante $\Delta rtp1$ la etiqueta GFP en el extremo C-terminal de la proteína Rpb1p. Como se observa en la Figura 3.10.A, Rpb1-GFP se localizó principalmente en el núcleo de las células silvestres, en cambio su localización fue citoplasmática en el mutante con la delección del gen *RTP1*. Este resultado se confirmó mediante inmunolocalización *in situ* de Rpb1p usando el anticuerpo específico 8WG16 que interacciona con las repeticiones CTD de esta subunidad (Figura 3.10.B). Considerando el efecto de la mutación del gen *RTP1* en la localización de la RNA pol II, este gen fue renombrado *RTP1*, de “**R**equired for nuclear **T**ransport of RNA **p**ol **I**I”.

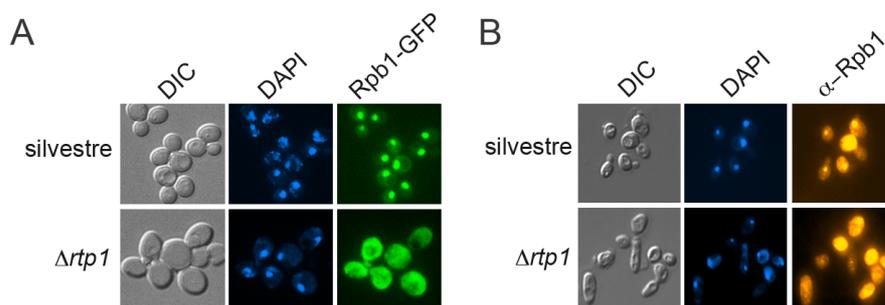


Figura 3.10. Localización celular de Rpb1p en $\Delta rtp1$. (A) Células del mutante $\Delta rtp1$ y de una cepa silvestre que expresaban la proteína Rpb1p-GFP se crecieron en YPD a 30°C hasta fase exponencial y las proteínas de fusión y los núcleos teñidos con DAPI se visualizaron en el microscopio de fluorescencia. (B) Localización inmunofluorescente de Rpb1p. Células del mutante $\Delta rtp1$ y del silvestre fueron procesadas para inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo monoclonal de ratón 8W16G y el anticuerpo secundario de cabra conjugado con Cy3 y teñidas con DAPI para la detección del DNA.

Con fin de establecer si la mutación *rtp1* también estaba implicada en la importación nuclear de otras subunidades de la RNA pol II, se estudió la localización de Rpb2p, Rpb3p, Rpb7p y Rpb11p en el mutante *Artp1*. Para ello se construyeron las cepas de levadura portadoras de esas proteínas etiquetadas con GFP y se analizó su localización celular por microscopía de fluorescencia. De igual modo que ocurre con Rpb1p, la delección de *RTP1* produjo la pérdida completa de la localización nuclear de Rpb2p, pero las subunidades pequeñas (Rpb3p, Rpb7p y Rpb11p) muestran una cierta acumulación nuclear (Figura 3.11).

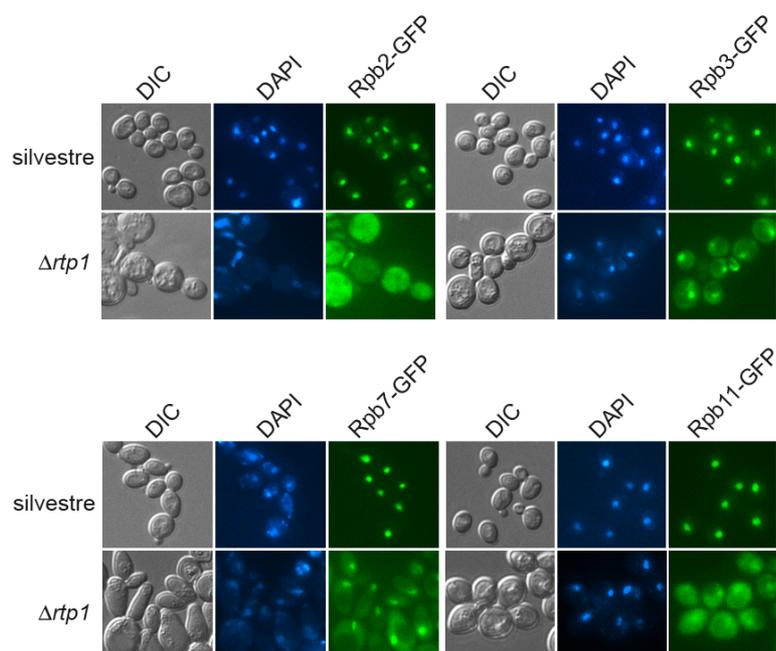


Figura 3.11. Localización subcelular de distintas subunidades de la RNA pol II. Células del mutante *Artp1* y de una cepa silvestre que expresaban las proteínas indicadas etiquetadas con GFP se crecieron en YPD a 30°C hasta fase exponencial y las proteínas de fusión se visualizaron en el microscopio de fluorescencia. Se localizaron los núcleos utilizando la tinción con DAPI.

Para determinar si Rtp1p está implicada en la importación nuclear de la RNA pol I y la RNA pol III, se construyeron las cepas portadoras de las proteínas de fusión con la etiqueta GFP de las subunidades mayores de estas polimerasas (Rpa190p, para RNA pol I y Rpo31p, para la RNA pol III). Como se observa en la Figura 3.12 la localización subcelular de estas subunidades no se encuentra afectada en el mutante $\Delta rtp1$.

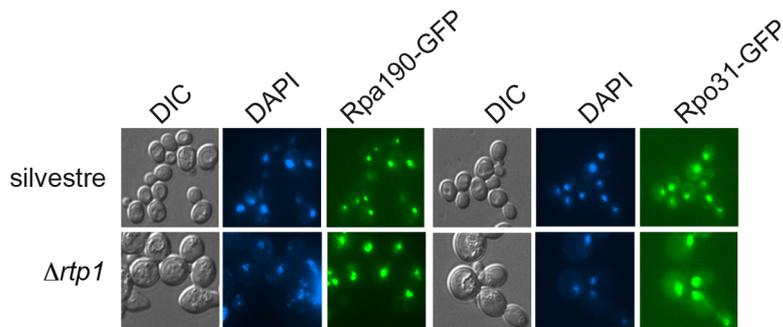


Figura 3.12. Localización celular de las subunidades mayores de la RNA pol I y III en $\Delta rtp1$. Células del mutante $\Delta rtp1$ y de una cepa silvestre que expresaban la proteína Rpa190p-GFP (RNA pol I) o Rpo31p-GFP (RNA pol III) se crecieron en YPD a 30°C hasta fase exponencial y las proteínas de fusión se visualizaron en el microscopio de fluorescencia. La posición de los núcleos se detectó mediante tinción con DAPI.

Rtp1p interacciona con la RNA pol II

Los resultados descritos indican que Rtp1p se requiere para la correcta localización celular de la RNA pol II, implicando a Rtp1p en el transporte de la RNA pol II al núcleo. Con objeto de determinar si esta función implica una interacción física entre Rtp1p y la RNA pol II se analizó, mediante co-inmunoprecipitación, la interacción entre Rtp1p y diferentes subunidades de la enzima. Durante el ensamblaje de la RNA pol II se ha descrito la existencia de diferentes subcomplejos (Wild y Cramer,

2012), iniciándose el proceso con una interacción entre los complejos que contienen Rpb2p y Rpb3p, para formar un intermediario que interacciona a continuación con el subcomplejo que contiene Rpb1p (Boulon et al., 2010; Wild y Cramer, 2012). Por ello se procedió a analizar la interacción de Rtp1p con las subunidades de la RNA pol II, Rpb1p, Rpb2p y Rpb3p, características de los diferentes subcomplejos. Para ello construimos una cepa de levadura con una versión de Rpb2p etiquetada con HA y Rtp1p etiquetada con TAP. El análisis del complejo de Rtp1p-TAP, purificado por cromatografía en tándem y corte proteolítico con la proteasa TEV, indicó la presencia de HA-Rpb2p (Figura 3.13.A). La subunidad Rpb3p, también se detectó en la fracción retenida, aunque en menor proporción que Rpb2p-HA (Figura 3.13.A). Ninguna de estas proteínas fue recuperada en una cepa con Rpb2p-HA pero sin Rtp1-TAP, usada como control. Sin embargo, no se observó la presencia de Rpb1p en la fracción retenida (Figura 3.13.A). No obstante, una interacción entre Rtp1p y Rpb1p pudo detectarse cuando Rtp1p etiquetada con HA se sobre-expresó utilizando el promotor fuerte *GAL10* (Figura 3.13.B). El hecho de que la interacción entre Rtp1p y Rpb1p se observe únicamente en condiciones de sobre-expresión de la primera proteína podría deberse a que su interacción durante el ensamblaje de la polimerasa es transitoria y no puede ser observada con niveles silvestres de ambas proteínas. Nos planteamos la posibilidad de incrementar los niveles citoplásmicos de la RNA pol II bloqueando su transporte al núcleo mediante la delección de *IWR1* y analizar en la cepa mutante la interacción entre Rtp1p y Rpb1p (Czeko et al., 2011). Como se observa en la Figura 3.13.C, la purificación TAP de Rtp1p en el mutante $\Delta iwr1$ permitió, con niveles silvestres de la proteína Rtp1p, la detección de Rpb1p en el complejo inmunoprecipitado. Por tanto, podemos concluir que Rtp1p interacciona con distintas subunidades de la RNA pol II, aunque de forma no estequiométrica.

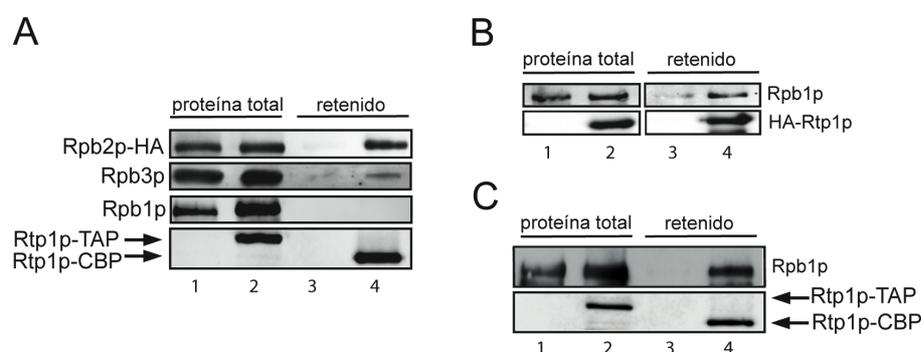


Figura 3.13. Interacciones de Rtp1p con subunidades de la RNA pol II. (A) Se llevaron a cabo ensayos de purificación en tándem con una cepa de levadura con la proteína Rtp1p etiquetada con TAP (carreras 2 y 4) y con una cepa no etiquetada como control (carreras 1 y 3). Ambas cepas incluían una versión de Rpb2p etiquetada en C-terminal con tres copias del epítipo HA. Se inmunoprecipitó Rtp1p-TAP utilizando IgG-sepharosa y se eluyó mediante digestión con la proteasa TEV. La proteína de fusión resultante de la digestión, Rtp1p-CBP, se purificó por cromatografía de calmodulina-agarosa. Las proteínas del extracto (proteínas totales –carreras 1 y 2- o proteínas asociadas con Rtp1p, retenido –carreras 3 y 4-) se analizaron mediante *Western blot* y anti-TAP (*Thermo*) para Rtp1p-TAP, anti-HA 3F10 (*GE Healthcare*) para Rpb2p-HA, anticuerpo 8WG16 (*Covance*) para Rpb1p, o anticuerpo anti-Rpb3p (*NeoClone*) para Rpb3p. (B) La cepa $P_{GAL10}\text{-}RTP1$, donde el promotor silvestre de *RTP1* se sustituyó por el promotor *GAL10* junto con 3 copias del epítipo HA (carreras 2 y 4) y una cepa no etiquetada como control (carreras 1 y 3) se crecieron en YPGal hasta fase exponencial temprana. La proteína HA-Rtp1p se inmunoprecipitó utilizando anti-HA agarosa (*GE Healthcare*). Las proteínas del extracto (proteínas totales –carreras 1 y 2- o proteínas asociadas con Rtp1p, retenido –carreras 3 y 4-) se analizaron mediante *Western blot* y anti-HA 3F10 (*GE Healthcare*) para HA-Rtp1p o anticuerpo 8WG16 (*Covance*) para Rpb1p. (C) Células del mutante $\Delta iwr1$ con niveles endógenos de Rtp1p etiquetada con la etiqueta TAP y células $\Delta iwr1$ con dicha proteína sin etiquetar fueron usadas en ensayos de purificación en tándem como se explica en el panel A.

Iwr1p puede ser importada al núcleo en ausencia de Rtp1p

Basándose en la presencia de una secuencia de localización nuclear (NLS) bipartita en Iwr1p y en su interacción *in vitro* con la carioferina Kap60p, Czeko *et al.* (2011) propusieron que Iwr1p dirige la importación al núcleo de la RNA pol II mediada por las carioferinas Kap60p y Kap95p. Confirmamos ese resultado usando cepas donde los genes *KAP60* y *KAP95* se expresan bajo el control del promotor *GAL10* y portan una versión de Iwr1p etiquetada con GFP y con una delección de su señal de exportación nuclear (NES) [Iwr1(Δ NES)-GFP]. Aunque esta proteína muestra un bajo nivel de expresión, es posible detectar una señal fluorescente nuclear en una cepa silvestre (Peiró-Chova y Estruch, 2009). Para incrementar los niveles de esta proteína y hacer posible la detección de los cambios en su localización celular se procedió a su sobre-expresión mediante el promotor fuerte *P_{tetO}*. La proteína Iwr1(Δ NES)-GFP muestra una localización nuclear en una cepa silvestre y en las cepas *P_{GAL10}-KAP60* y *P_{GAL10}-KAP95* crecidas en galactosa (resultados no mostrados; Figura 3.14.A). Como era esperable, se observó una acumulación citoplasmática de esta proteína tras 5 horas de incubación en un medio con glucosa como fuente de carbono tanto en la cepa *P_{GAL10}-KAP60* como en la cepa *P_{GAL10}-KAP95*. Después de 7 horas la fluorescencia se detectó por toda la célula (Figura 3.14.A). En concordancia con el modelo de Czeko *et al.* (2011), la depleción de Kap60p y Kap95p dio lugar a la acumulación citoplasmática de la proteína de fusión Rpb1p-GFP, visible tras 9 horas de incubación en glucosa, aunque la pérdida total de señal nuclear requirió tiempos más largos (Figura 3.14.B).

Para analizar el papel de Rtp1p en la localización de Iwr1p, se construyó una cepa en la que *RTP1* se expresó bajo el control del promotor *GAL10*. Como se esperaba, el crecimiento de esta cepa en medios con glucosa se vio afectado negativamente, aunque en menor medida que en el mutante nulo *rtp1* (Figura 3.15). En concordancia con el requerimiento de

Rtp1p para la importación nuclear de la RNA pol II, la disminución de los niveles de Rtp1p provocó una acumulación citoplasmática de la proteína de fusión Rpb1-GFP (Figura 3.14.B). Sin embargo, al contrario de lo que sucede en los mutantes *kap60* y *kap95* la localización citoplasmática de Rpb1-GFP no fue acompañada de la acumulación de Iwr1(Δ NES)-GFP en el citoplasma. Incluso tras 24 horas de incubación en un medio con glucosa Iwr1(Δ NES)-GFP mostró una localización nuclear en el mutante *P_{GAL10}-RTP1* (Figura 3.14.A). Se comprobó que la localización nuclear de esta proteína no era consecuencia de la expresión residual del promotor *P_{GAL10}-RTP1* en glucosa puesto que en el mutante nulo Δ *rtp1* Iwr1p también se detectó en el núcleo (Figura 3.14.C), sugiriendo que Iwr1p puede ser transportada al núcleo en ausencia de Rtp1p. Así pues, el defecto en el transporte de la RNA pol II que observamos en el mutante Δ *rtp1* no se debe al defecto en la importación de Iwr1p.

Como se observa en la figura 3.16 tampoco se encontró que Rtp1p fuese necesaria para la importación de la proteína de unión a la caja TATA, Tbp1p, que está mediado por Kap114p (Pemberton et al., 1999).

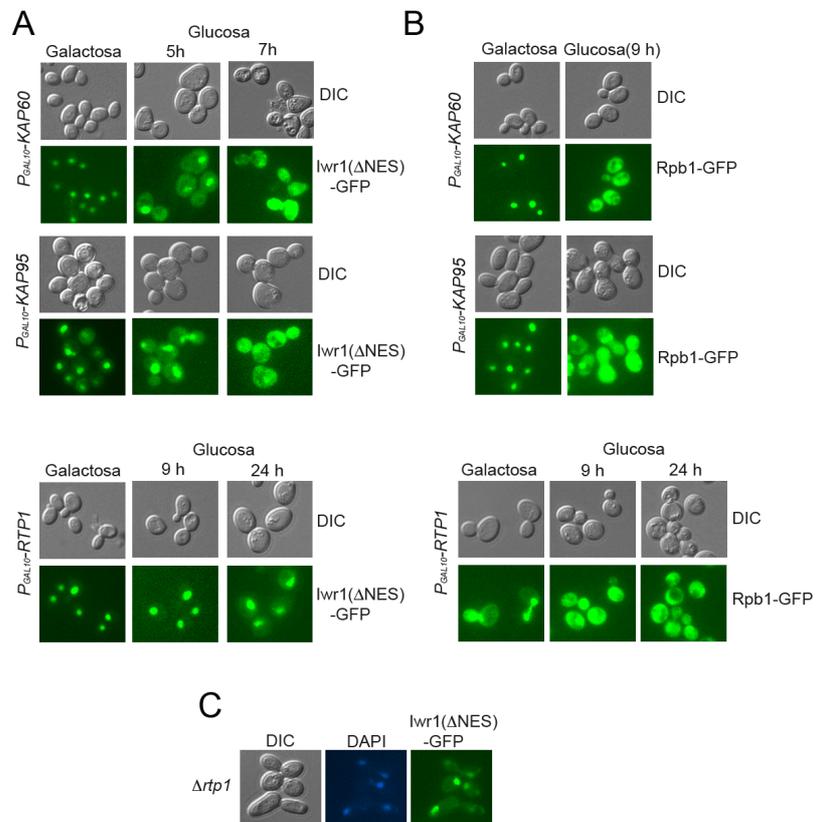


Figura 3.14. Localización subcelular de Iwr1p(ΔNES) (A) y Rpb1p (B) en células donde se han deplecionado Rtp1p (P_{GAL10} -RTP1), Kap60p (P_{GAL10} -KAP60) o Kap95p (P_{GAL10} -KAP95). Iwr1p(ΔNES), expresada bajo el promotor P_{tetO} , y Rpb1p fusionadas con GFP se expresaron en cepas donde el promotor de RTP1, KAP60 o KAP95 se sustituyó por el promotor regulable GAL10. Las células se crecieron en YPGal (galactosa) hasta fase exponencial temprana y entonces se transfirieron a medio YPD (glucosa) y a los tiempos indicados las células se observaron al microscopio de fluorescencia. (C) Localización celular de Iwr1p(ΔNES) en el mutante $\Delta rtp1$. Células del mutante $\Delta rtp1$ y del silvestre se transformaron con el plásmido p_{tetO}-IWR1-ΔNES-GFP y se crecieron en YPD 30°C hasta fase exponencial temprana, entonces se observaron al microscopio de fluorescencia. Se utilizó una tinción con DAPI para observar la posición de los núcleos.

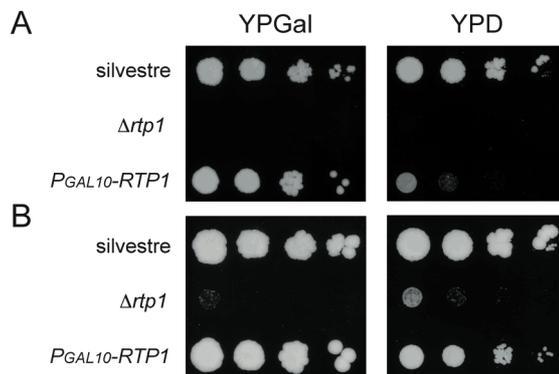


Figura 3.15. Fenotipo de crecimiento causado por la depleción de *RTP1*. Células del silvestre, del mutante $\Delta rtp1$ y del mutante portador del alelo $P_{GAL10-RTP1}$ se sembraron en YPGal e YPD a 30 °C durante 5 días (A) y 7 días (B).

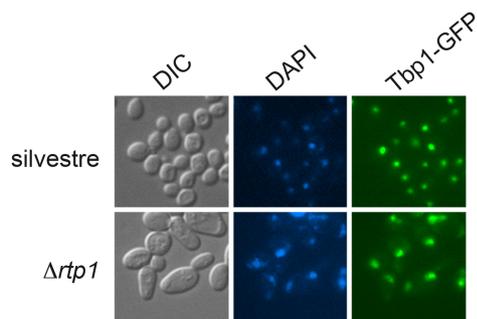


Figura 3.16. Localización subcelular de Tbp1p en el mutante $\Delta rtp1$. Células del silvestre y del mutante $\Delta rtp1$ que expresan la proteína de fusión Tpb1p-GFP se cultivaron en YPD a 30°C y se observaron en el microscopio de fluorescencia en fase exponencial temprana. La posición de los núcleos se detectó mediante tinción con DAPI.

Efecto de la ausencia de distintas carioferinas en la localización celular de Rpb1p

En *Saccharomyces cerevisiae* existe una larga lista de proteínas, carioferinas, implicadas en el transporte de moléculas a través del complejo del poro nuclear (NPC). Como se ha mostrado anteriormente, nuestros estudios y los de otros (Czeko et al., 2011) han relacionado a Kap60p y Kap95p en la importación de la RNA pol II mediada por Iwr1p. Así pues, con el fin de conocer si otra(s) de las carioferinas descritas en levadura están implicadas en la importación nuclear de la RNA pol II, analizamos el efecto de la delección de la mayor parte de ellas en la localización de la subunidad mayor de la polimerasa, Rpb1-GFP. En todos los mutantes ensayados ($\Delta kap108$, $\Delta kap114$, $\Delta kap120$, $\Delta kap122$, $\Delta kap123$ y P_{tetO} -*PSE1* en presencia de doxiciclina) la localización de Rpb1p no se vio afectada (Figura 3.17).

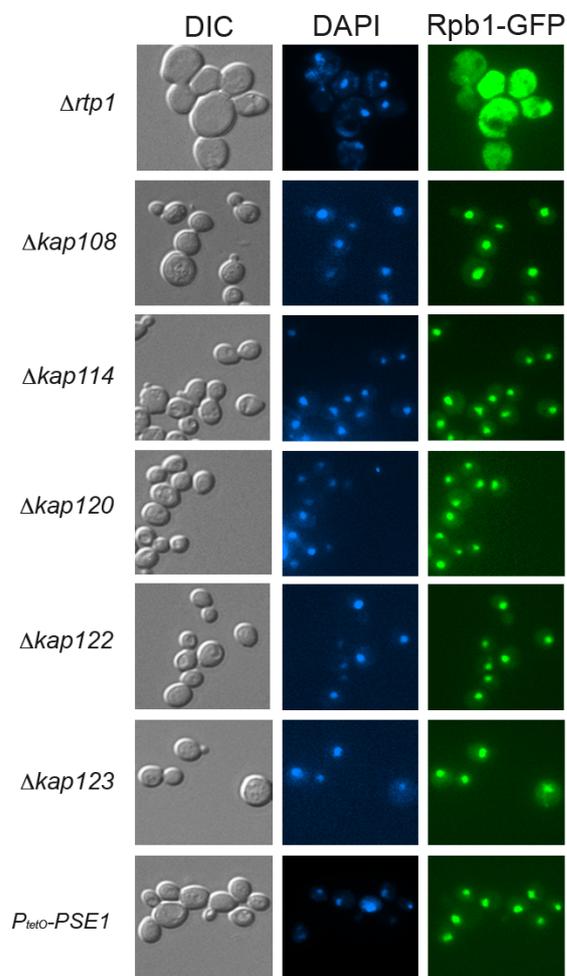


Figura 3.17. Localización subcelular de Rpb1p en los mutantes en β -carioferinas. La proteína Rpb1p fusionada con la etiqueta GFP se expresó en el mutante *Δrtp1* y distintos mutantes de β -carioferinas y se cultivaron en YPD a 30°C hasta fase exponencial temprana. En el caso del mutante *P_{tetO}-PSE1*, las células se incubaron durante 8 horas en YPD con doxiciclina 10 mg/L previamente a la observación. Las células fueron visualizadas en un microscopio de fluorescencia y los núcleos se observaron por tinción con DAPI.

Rtp1p interacciona con componentes del complejo R2TP

Para profundizar en la caracterización de la proteína Rtp1p procedimos a identificar, mediante purificación de afinidad y espectrometría de masas (AP-MS), proteínas que se unían a ella. Se realizó una purificación de Rtp1p-TAP y el eluido de la fracción retenida en la columna de la resina con calmodulina (*Agilent Technologies*) fue analizado por tecnología multidimensional de identificación de proteínas (MudPIT). Nuestro análisis (Tabla 3.1) confirmó la interacción entre Rtp1p y Rpb2p, previamente detectada por co-inmunoprecipitación (Figura 3.13.A) y reveló la interacción de Rtp1p con tres de las cuatro subunidades de R2TP (Rvb1p, Rvb2p y Pih1p). La mayor parte de estas interacciones fueron corroboradas por co-inmunoprecipitación (Figura 3.18.A y B). Sin embargo, no fuimos capaces de detectar la interacción de Rtp1p con la proteína Tah1p, el cuarto componente del complejo (Figura 3.18.C), tampoco detectada en nuestro análisis MudPIT. El complejo R2TP ha sido implicado en distintos procesos celulares, incluyendo el ensamblaje de la RNA pol II (Kakihara y Houry, 2012), por lo que la interacción observada entre Rtp1p y componentes del complejo R2TP refuerza el papel de esta proteína en la biogénesis de la RNA pol II sugerido anteriormente.

| Proteína Co-purificada | Descripción | Número de péptidos | % Cobertura |
|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|--------------------|
| Rtp1p | Proteína no caracterizada YMR185w | 26 | 30.5 |
| Rpb2p | Subunidad de la RNA polimerasa II | 4 | 5 |
| Rvb1p | Proteína RuvB-like 1 | 4 | 13 |
| Rvb2p | Proteína RuvB-like 2 | 3 | 7 |
| Pih1p | Proteína que interacciona con Hsp90 | 1 | 3.5 |

Tabla 3.1. Proteínas identificadas en la purificación de Rtp1p-TAP.

En células humanas se ha sugerido la participación del complejo R2TP en la unión de Rpb1p con subcomplejos intermediarios durante el ensamblaje de la RNA pol II (Boulon et al., 2010; Wild y Cramer, 2012). Con el objetivo de comprobar si una situación similar se da en levadura, se realizó un ensayo de co-inmunoprecipitación de Rpb1p con un componente de R2TP, Rvb2p. Como se observa en la Figura 3.19 este ensayo reveló la existencia de una interacción *in vivo* entre Rpb1p y la proteína Rvb2p.

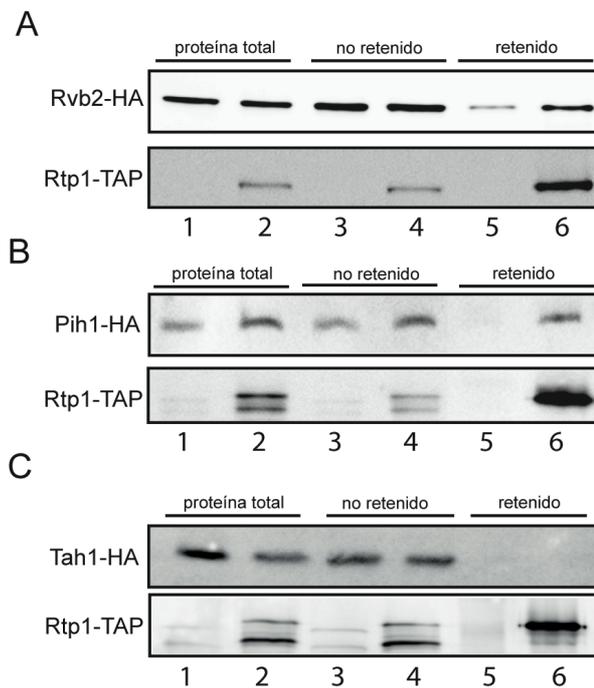


Figura 3.18. Interacción entre Rtp1p y componentes del complejo R2TP. Se llevaron a cabo ensayos de co-inmunoprecipitación con cepas de levadura con la proteína Rtp1p etiquetada con TAP (carreras 2, 4 y 6) y la cepa control sin etiquetar (carreras 1, 3 y 5). Ambas cepas expresaban una versión de Rvb2p (A), Pih1p (B) o Tah1p (C) etiquetada en C-terminal con 3 copias del epítipo HA. Rtp1-TAP fue inmunoprecipitada utilizando IgG-sepharosa. Las proteínas en el extracto fueron determinadas por *Western blot* utilizando el anticuerpo anti-PAP (*Sigma*) para Rtp1-TAP y el anticuerpo anti-HA 3F10 (*GE Healthcare*) para las proteínas etiquetadas con HA.

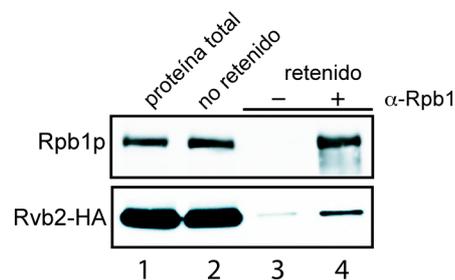


Figura 3.19. Interacción de Rvb2p con Rpb1p. Se inmunoprecipitó Rpb1p utilizando el anticuerpo específico anti-Rpb1p, 8WG16 en una cepa que contenía una versión de Rvb2p etiquetada en C-terminal con tres copias del epítipo HA. Las proteínas fueron detectadas con los anticuerpos 8WG16 (Rpb1p) y anti-HA 3F10 (Rvb2p). Como control se inyectó la fracción retenida de la inmunoprecipitación realizada sin añadir anticuerpo 8WG16 (carrera 3).

La alteración en la localización celular de Rpb2-GFP causada por la sobre-expresión de Rpb2tp (una versión truncada de Rpb2p) es suprimida por la sobre-expresión de Rtp1p

La interacción de Rtp1p con componentes del complejo R2TP y con subunidades de la RNA pol II de forma no estequiométrica es consistente con un papel de Rtp1p durante la biogénesis de la RNA pol II. La interacción prominente de Rtp1p con Rpb2p, y en menor medida con Rpb3p, está de acuerdo con un papel de Rtp1p facilitando la interacción de Rpb2p con el subcomplejo de ensamblaje que incluye Rpb3p. Este papel también es consistente con el hecho de que la sobre-expresión del gen *RPB2* alivia el requerimiento de Rtp1p para el crecimiento celular (Figura 3.20). La relación de Rpb2p con Rtp1p, que cabe recordar fue identificado como un supresor del represor transcripcional NC2, trajo a nuestra memoria un resultado previamente publicado por nuestro grupo en el que se determinó que la sobre-expresión de una versión truncada de la subunidad Rpb2p (que denominamos Rpb2tp) era también capaz de suprimir los defectos causados

por la depleción de NC2 (Peiró-Chova y Estruch, 2007). Nos preguntamos, por lo tanto, si la sobre-expresión de Rpb2tp, podría afectar la localización de la RNA pol II. La Figura 3.21 muestra que la presencia de un plásmido en multicopia que contiene el alelo truncado *rpb2t* (YEp-Rpb2t) incrementa la señal citosólica de Rpb2-GFP y también de Rpb1-GFP. El efecto de la versión truncada de la subunidad Rpb2p en la localización de la RNA pol II podría deberse a que su sobre-expresión dificulta la biogénesis de la RNA pol II, mediante el secuestro de la proteína Rtp1p. Para confirmar dicha hipótesis, analizamos si el efecto de la sobre-expresión de Rpb2tp en la localización de la RNA pol II podía ser revertido por la sobre-expresión de Rtp1p. Como predecía nuestra hipótesis, la sobre-expresión de *RTP1* bajo el control del promotor del gen *GAL10* rescata el defecto en la localización nuclear de la RNA pol II en células portadoras del plásmido YEp-Rpb2t (Figura 3.22).

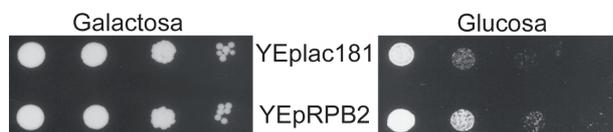


Figura 3.20. Supresión de los defectos de crecimiento del mutante *rtp1* por la sobre-expresión de *RPB2*. Diluciones seriadas de las cepas portadoras del alelo *P_{GAL10}-RTP1* y transformadas con los plásmidos indicados se sembraron en YPGal (Galactosa) o YPD (Glucosa) y se incubaron durante 3 días a 30°C.

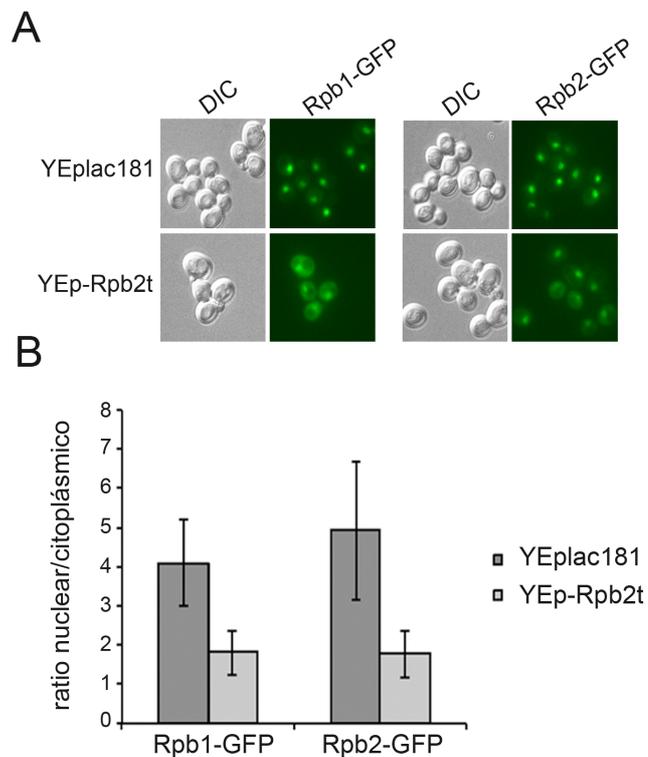


Figura 3.21. Localización de Rpb1p y Rpb2p en células que expresan Rpb2tp. (A) Células procedentes de cultivos en fase exponencial de una cepa silvestre (FY86) que expresa Rpb1-GFP o Rpb2-GFP y transformada con el plásmido YEp-Rpb2t o el vector vacío YEplac181 se observaron al microscopio de fluorescencia. Se muestran las imágenes GFP y DIC. (B) La distribución relativa de las proteínas de fusión entre el núcleo y el citoplasma se determinó calculando la relación entre la intensidad fluorescente media de áreas nucleares y citosólicas de la célula ($n > 30$ células) utilizando al menos 3 cultivos independientes.

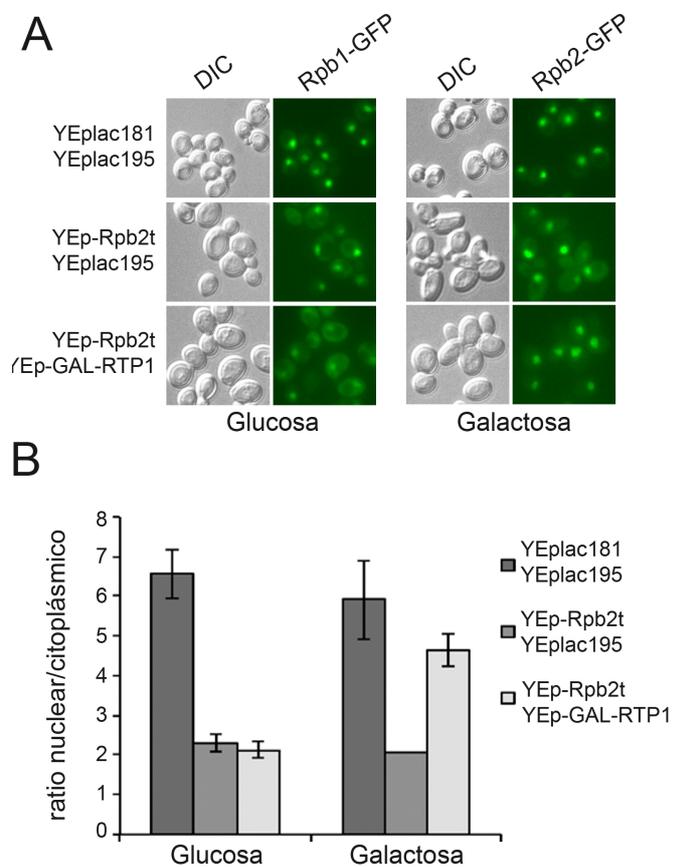


Figura 3.22. Supresión de los defectos en la localización de Rpb2p, debidos a la sobre-expresión de Rpb2tp, mediante la sobre-expresión de Rtp1p. (A) Células procedentes de cultivos en fase exponencial de una cepa silvestre (FY86) que expresa Rpb2-GFP transformada con los plásmidos indicados se observaron al microscopio de fluorescencia. Se presentan las imágenes GFP y DIC. **(B)** La distribución relativa de las proteínas de fusión entre el núcleo y el citoplasma se determinó como se detalla en la Figura 3.21.B.

Rtp1p interacciona físicamente *in vivo* con la región N-terminal de Rpb2p

El defecto en la importación nuclear de la RNA pol II provocado por la sobre-expresión de *rpb2t* se suprime por la sobre-expresión de *RTP1*, lo que sugiere que la proteína Rtp1p es capaz de interactuar con Rpb2tp, que incluye los 379 residuos N-terminales de la subunidad Rpb2p (Peiró-Chova y Estruch, 2007). Para comprobar esta posible interacción se llevó a cabo un ensayo de co-inmunoprecipitación con una cepa que expresa la proteína Rtp1p etiquetada con HA y Rpb2tp etiquetada con TAP. HA-Rtp1p fue recuperada en la fracción retenida cuando se utilizó una cepa portadora de la fusión Rpb2t-TAP, pero no cuando se utilizó una cepa que contenía la proteína Rpb2tp no etiquetada (Figura 3.23). Rpb3p no se detectó en el complejo inmunoprecipitado con Rpb2t-TAP (Figura 3.23), lo que indica que la interacción entre Rtp1p y Rpb2p puede darse sin la unión previa del intermediario de ensamblaje que contiene Rpb3p.

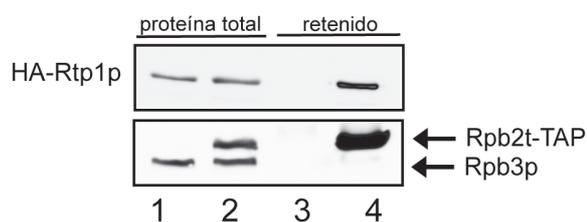


Figura 3.23. Interacción de Rtp1p y Rpb2tp. Se llevaron a cabo ensayos de co-inmunoprecipitación con cepas de levadura donde la proteína truncada Rpb2tp se encontraba etiquetada con TAP (carreras 2 y 4), y con una cepa no etiquetada como control (carreras 1 y 3). Ambas cepas portaban una versión de *RTP1* donde el promotor silvestre de dicho gen fue sustituido por el promotor *GAL10*, incluyendo 3 copias del epítipo HA. Las proteínas etiquetadas con TAP fueron inmunoprecipitadas utilizando IgG-sepharosa. Las proteínas Rpb3p y Rpb2t-TAP fueron detectadas por *Western blot* utilizando el anticuerpo anti-Rpb3 (*NeoClone*) y HA-Rtp1 con el anticuerpo anti-HA 3F10 (*GE Healthcare*).

3.2 Discusión

En este capítulo se ha caracterizado la proteína Rtp1p, identificándola como un nuevo componente de la maquinaria de biogénesis de la RNA pol II. Rtp1p está fenotípicamente relacionada con Iwr1p, una proteína cuya depleción provoca defectos en la importación de la RNA pol II (Czeko et al., 2011). Las mutaciones de *IWR1* y de *RTP1* fueron identificadas en un rastreo genético realizado por nuestro grupo como supresoras de los defectos de crecimiento provocados por la depleción del represor transcripcional NC2 (Peiró-Chova y Estruch, 2007). En nuestra búsqueda de supresores también se identificaron mutantes en componentes de la maquinaria transcripcional básica, que incluían distintas subunidades del Mediador, el factor transcripcional TFIID, y subunidades de la RNA pol II (Peiró-Chova y Estruch, 2007). Por tanto, una de las principales conclusiones obtenidas de los resultados de nuestro rastreo genético es que los defectos en NC2 se pueden compensar por distintas vías que supongan una reducción en la función de la RNA pol II, incluyendo una disminución de la cantidad de la RNA pol II que se encuentra en el núcleo consecuencia de una importación nuclear defectuosa.

Aunque las consecuencias fenotípicas de la delección de *IWR1* y *RTP1* son similares, nuestros datos sugieren que la función de Rtp1p en el transporte nuclear es independiente de la vía clásica de importación llevada a cabo por Kap60p y Kap95p, ya que Iwr1p puede ser importada al núcleo en ausencia de Rtp1p (Figura 3.14). Además Iwr1p y Rtp1p muestran distintos patrones de interacción con las subunidades de la RNA pol II. Las interacciones entre Iwr1p y prácticamente todas las subunidades de la RNA pol II, se han detectado mediante estudios globales de interacción de complejos proteicos en levadura por espectrometría de masas (Gavin et al., 2006; Krogan et al., 2006). Además, Czeko y colaboradores (2011) han descrito que Iwr1p se une al centro activo de la RNA pol II, que está

formado por la asociación de los dos subcomplejos Rpb1 y Rpb2, en la última etapa de ensamblaje del holoenzima (Czeko et al., 2011). En cambio, nuestro análisis por MudPIT de las proteínas que interactúan con Rtp1p desveló la interacción con Rpb2p pero no con otras subunidades de la RNA pol II (Tabla 3.1). Dicha interacción se confirmó por co-inmunoprecipitación, ensayo que también permitió detectar una interacción, aunque más débil, con Rpb3p (Figura 3.13.A). Interpretamos el fenotipo del mutante *rtp1* y su patrón de interacciones con las subunidades de la RNA pol II como indicativo de la función de Rtp1p en el ensamblaje de la RNA pol II (Figura 3.24). Así, la ausencia de Rtp1p bloquearía el correcto ensamblaje de la RNA pol II, y en consecuencia se produciría una acumulación citoplasmática de las subunidades de la RNA pol II (Figura 3.10 y 3.11). El proceso de ensamblaje de la RNA pol II propuesto por Wild y Cramer implica la formación de un intermediario de ensamblaje que contiene los subcomplejos Rpb2 y Rpb3, seguida de la unión del subcomplejo Rpb1 (Wild y Cramer, 2012). Nuestros datos indican que Rtp1p interactúa con Rpb2p. Esta interacción se produce a través de la región N-terminal de Rpb2, como se muestra en la interacción de Rtp1p con la versión truncada de Rpb2p, Rpb2tp (Figura 3.23). Por otro lado, la ausencia de Rpb3p en el complejo Rtp1p-Rpb2tp sugiere que la interacción de Rtp1p con Rpb2p sucede antes del acoplamiento del subcomplejo Rpb2 con el subcomplejo Rpb3. Así, proponemos que Rtp1p trabaja a modo de chaperona de Rpb2p, facilitando la interacción de Rpb2p con el subcomplejo Rpb3. Si la proteína Rtp1p se disocia del intermediario de ensamblaje que contiene Rpb2p y Rpb3p o permanece asociada a lo largo del proceso de importación nuclear de la RNA pol II es una cuestión más controvertida. Nosotros no hemos sido capaces de detectar una interacción entre Rtp1p y Rpb1p cuando estas proteínas se expresan en los niveles silvestres (Figura 3.13.A). Esto podría implicar que Rtp1p se disocia de Rpb2p después del acoplamiento del subcomplejo Rpb3 o que la interacción de Rtp1p con el subcomplejo Rpb1

es demasiado transitoria para ser detectada. Por otra parte, otros resultados presentados en esta memoria apoyan la interacción de Rtp1p y RNA pol II durante todo el proceso de ensamblaje. Así, se detectó una interacción entre Rtp1p y Rpb1p cuando Rtp1p se sobre-expresó (Figura 3.13.B), o cuando se bloqueó el transporte nuclear de la RNA pol II mediante la delección de *IWR1* (Figura 3.13.C).

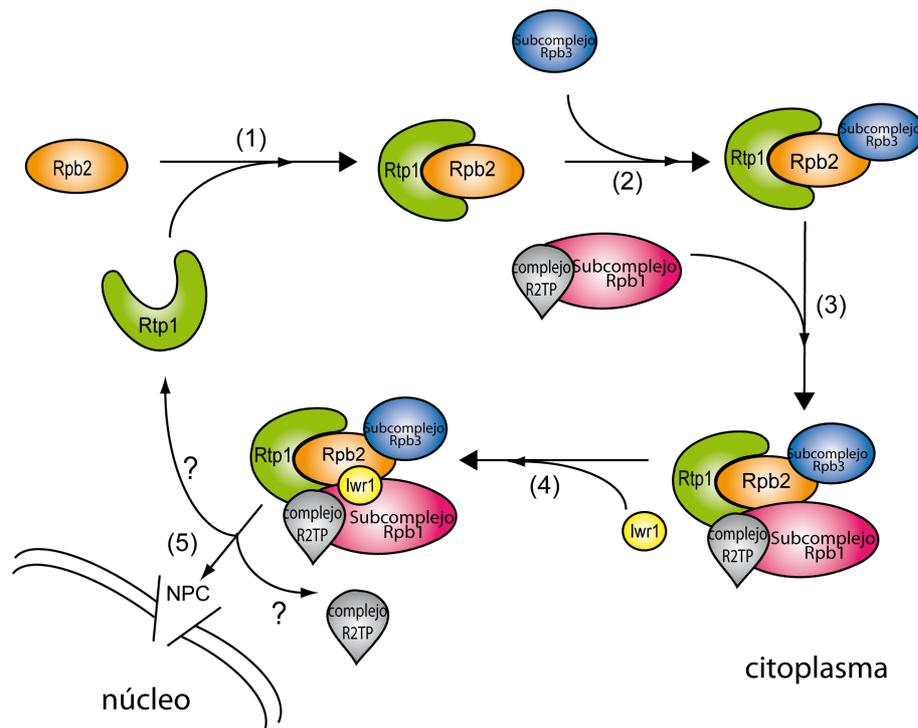


Figura 3.24. Modelo de la participación de Rtp1p en el ensamblaje de la RNA pol II. Rtp1p interacciona con la región N-terminal de Rpb2p (paso 1) y facilita la interacción entre Rpb2p y el subcomplejo Rpb3 (paso 2). Posteriormente, los dos complejos intermedios de ensamblaje, conteniendo aún factores de ensamblaje como Rtp1p o R2TP, se unen para formar la RNA pol II completamente ensamblada (paso 3). Entonces Iwr1p se une a la hendidura del centro activo de la RNA pol II (paso 4) y dirige su importación al núcleo a través del NPC. No está claro si Rtp1p se libera de la RNA pol II en el citoplasma o permanece en el complejo participando en el transporte de la RNA pol II al núcleo.

La presencia de Rtp1p en el holoenzima totalmente ensamblado también está apoyada por la interacción de Rtp1p con componentes del complejo R2TP (Tabla 3.1 y Figura 3.18). En células humanas se han llevado a cabo análisis de intermediarios de ensamblaje de la RNA pol II, y se ha propuesto que el complejo R2TP participa en el reclutamiento de Hsp90p al subcomplejo Rpb1 para promover la unión Rpb1p con el subcomplejo Rpb2-Rpb3 (Boulon et al., 2010; Wild y Cramer, 2012). Nuestros datos también indican la interacción de R2TP y Rpb1p (Figura 3.19). El hecho de que Rtp1p interaccione con componentes de R2TP podría ser indicativo de la función de ambos factores de ensamblaje del subcomplejo formado por Rpb1 y los subcomplejos Rpb2 y Rpb3. En levadura, el complejo R2TP se ha identificado como una co-chaperona de Hsp90p que se compone de cuatro proteínas: Rvb1p, Rvb2p, Pih1p y Tah1p (Zhao et al., 2005). En nuestro análisis se identificaron interacciones entre Rtp1p y Rvb1p, Rvb2p, y Pih1p (Tabla 3.1 y Figura 3.18), pero no se detectó interacción entre Rtp1p y Tah1p. En el complejo R2TP, Pih1p se une directamente a el complejo Rvb1p-Rvb2p, mientras que la interacción de Tah1p se produce a través de Pih1p (Zhao et al., 2008). El fallo en la detección de Tah1p en el complejo Rtp1p podría deberse a problemas experimentales, pero también podría indicar que en levadura es el complejo formado por Rvb1-Rvb2 y Pih1p el que interacciona interacciona con Rtp1p.

Uno de los puntos que no hemos sido capaces de resolver en este trabajo es si, tras el ensamblaje citoplasmático de la RNA pol II, Rtp1p se separa del holoenzima o permanece asociada a la enzima completamente ensamblada, participando en su transporte a través del complejo del poro nuclear (NPC) (Figura 3.24). El análisis estructural de Rtp1p reveló que se trata de una proteína compuesta por repeticiones tipo HEAT (Figura 3.6), una arquitectura propia de las carioferinas. De hecho, Rtp1p es capaz de interactuar *in vivo* e *in vitro* con las regiones ricas en FG de las nucleoporinas (Figura 3.8). Basándonos en estas evidencias es tentador

especular que Rtp1p podría actuar como un facilitador adicional, junto con Kap60p y Kap95p, en la importación nuclear de la RNA pol II. Sin embargo, no se han detectado interacciones entre Rtp1p y la proteínas Ran de levadura (Gsp1p o Gsp2p) o con Npa3p, una GTPasa recientemente implicada en la importación nuclear de la RNA pol II en células de mamíferos (Carré y Shiekhattar, 2011; Forget et al., 2010; Staresincic et al., 2011) y de levadura (Minaker et al., 2013) (Figura 3.9). Por lo tanto, el posible papel de Rtp1p en la importación nuclear diferiría del mostrado las carioferinas descritas hasta la fecha. Además, a diferencia de Iwr1p, Rtp1p no se mueve entre el núcleo y el citoplasma de una forma dependiente de Xpo1p, sino que se encuentra localizada por toda la célula (Figura 3.7). En resumen, los datos presentados en este capítulo, proponen a la proteína Rtp1p como factor de ensamblaje de la RNA pol II, mediando en la unión de la subunidad Rpb2p y el subcomplejo Rpb3 y sugieren un posible papel como facilitador en el transporte de la holoenzima a través del NPC.

4. Distintas vías para la importación nuclear de la RNA polimerasa II

Estudios recientes proponen que la RNA pol II debe ensamblarse en el citoplasma para posteriormente ser importada al núcleo (Boulon et al., 2010; Czeko et al., 2011). En cambio, otro trabajo muestra diferencias en la importación entre subunidades grandes y pequeñas de la RNA pol II (Forget et al., 2010). En este capítulo se estudia si existen diferencias en la importación al núcleo entre las subunidades grandes (Rpb1p y Rpb2p) y pequeñas (tomando, principalmente, como ejemplo la subunidad Rpb3p). Para ello se ha analizado la distribución de las diferentes subunidades cuando la importación y/o el ensamblaje de la RNA pol II se ve comprometido por mutaciones o drogas que interfieren en dichos procesos.

4.1 Resultados

La localización nuclear de las subunidades grandes y pequeñas de la RNA pol II se ve afectada de forma distinta por mutaciones en *IWR1* y *RTP1*

En el capítulo anterior se analizó, por microscopía de fluorescencia, la distribución celular de distintas subunidades de la RNA pol II en el mutante *Δrtp1*. Las subunidades grandes (Rpb1p y Rpb2p) están totalmente deslocalizadas en la cepa con la delección de *RTP1* (Figuras 3.11 y 4.1.A). En cambio, las subunidades pequeñas (Rpb3p, Rpb7p y Rpb11p) se acumulan parcialmente en el núcleo de estas células (Figura 4.1.A). Una situación similar se observó cuando se analizó la localización subcelular las subunidades de la RNA pol II en el mutante *Δiwr1-1* (Figura 4.1.B). La localización nuclear parcial de Rpb3p, también se observó en el mutante *Δiwr1-2* en el que la delección de la región codificadora del *IWR1* es completa (Figura 4.1.B).

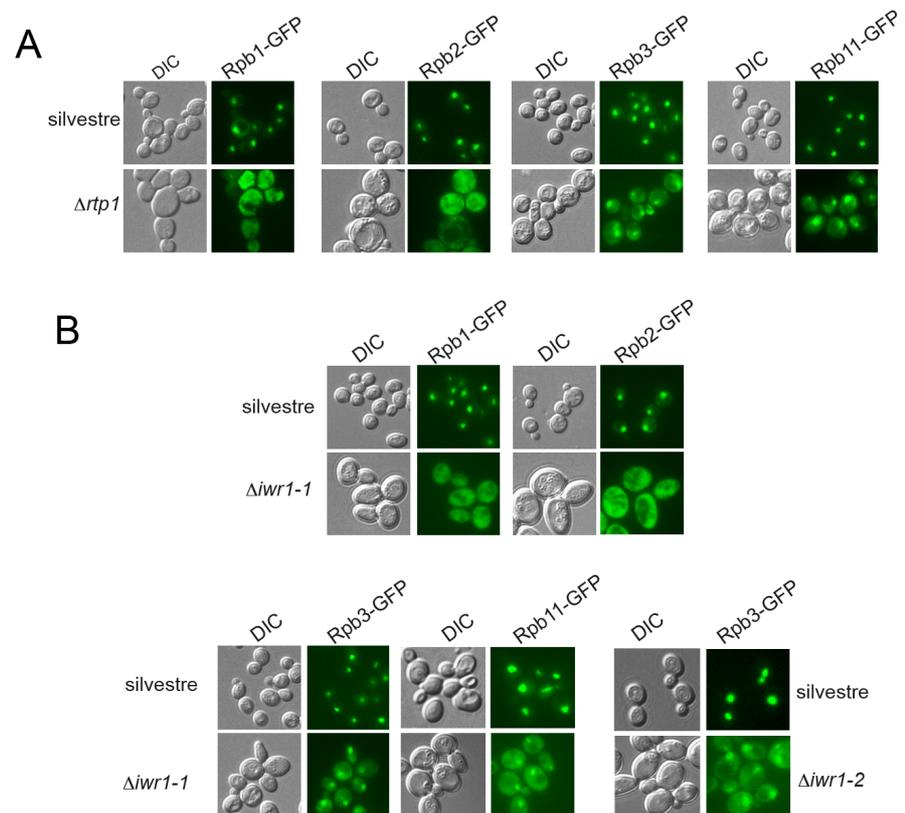


Figura 4.1. Localización celular de la RNA pol II en los mutantes $\Delta iwr1$ y $\Delta rtp1$. Células de una cepa silvestre y del mutante $\Delta rtp1$ (A) o del mutante $\Delta iwr1-1$ (deleción parcial) y $\Delta iwr1-2$ (deleción completa) (B) que expresaban las proteínas de fusión indicadas (Rpb1p-GFP, Rpb2p-GFP, Rpb3p-GFP o Rpb11-GFP) se crecieron en YPD a 30°C hasta fase exponencial y las proteínas de fusión se visualizaron en el microscopio de fluorescencia.

La depleción de Npa3p y la presencia de benomil tienen efectos distintos en la distribución celular de las subunidades grandes y pequeñas de la RNA pol II

Se ha descrito que mutaciones o cambios en los niveles de la GTPasa RPAP4/GPN1 (Npa3p en levadura) alteran la localización celular de la RNA pol II en células humanas (Forget et al., 2010) y de levadura (Staresinic et al., 2011). Considerando estos antecedentes se analizó el papel de Npa3p en la localización de subunidades grandes y pequeñas de la RNA pol II en levadura. Dado que *NPA3* es un gen esencial en *S. cerevisiae*, se sustituyó su promotor por el promotor reprimible *tetO* y se analizó la distribución celular de Rpb1-GFP y Rpb3-GFP en YPD y en YPD suplementado con doxiciclina. En la Figura 4.2.A se observa que la expresión de *NPA3* bajo el control del promotor *tetO* afecta la distribución celular de Rpb1-GFP incluso en ausencia de doxiciclina, aunque la adición de ésta incrementa la deslocalización de Rpb1p. En cambio, no se observó ningún efecto en la localización de Rpb3-GFP por la depleción de Npa3p (Figura 4.2.A)

Los microtúbulos también se han implicado en la importación de la RNA pol II. Tanto en células humanas como de levadura, el tratamiento con benomil, una droga que inhibe el ensamblaje de los microtúbulos, afecta a la localización de Rpb1p (Forget et al., 2010). En células humanas también se ha descrito una deslocalización de Rpb2p pero no de las subunidades pequeñas (Forget et al., 2010). Para comprobar si la misma situación se produce en células de levadura analizamos la localización de Rpb1p, Rpb2p, Rpb3p, y Rpb11p en presencia de benomil. Como se observa en la Figura 4.2.B el benomil, a la concentración utilizada, provoca una acumulación citoplasmática parcial de las subunidades grandes Rpb1p y Rpb2p pero no tiene ningún efecto en Rpb3p y Rpb11p. Otra conexión entre los microtúbulos y el transporte de la RNA pol II se encontró al analizar la

sensibilidad al benomil del mutante $\Delta iwr1$. Como se observa en la Figura 4.3 el mutante $\Delta iwr1$ muestra una hipersensibilidad a esta droga.

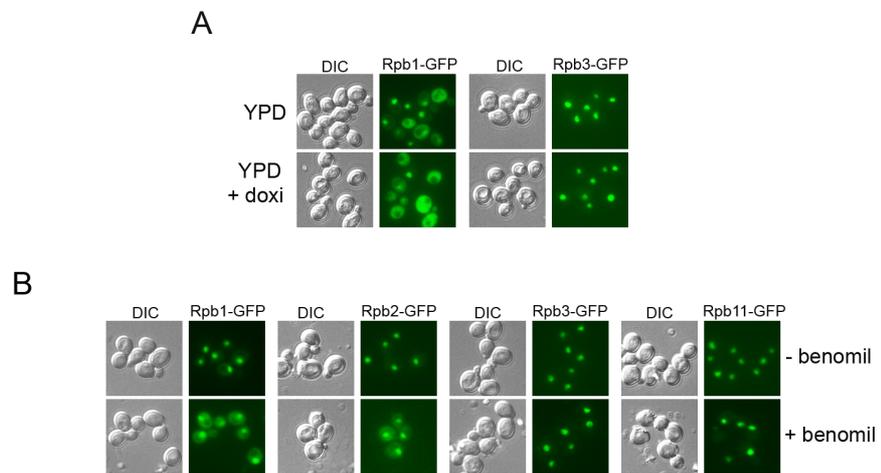


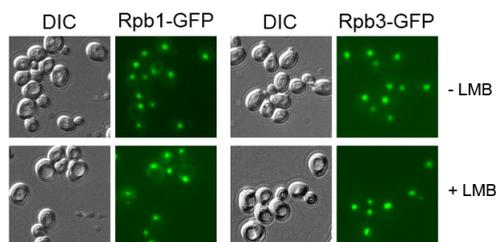
Figura 4.2. Localización de la RNA pol II en mutantes $npa3$ y en presencia de benomil. (A) Las subunidades de la RNA pol II indicadas fusionadas a GFP se expresaron una cepa donde el promotor de *NPA3* se substituyó por el promotor *tetO*. Las células se cultivaron en YPD a 30°C hasta fase exponencial temprana y entonces se transfirieron a YPD con o sin doxiciclina 10 mg/L y se incubaron durante 8 horas a 30°C. (B) Células de una cepa silvestre en fase exponencial de crecimiento con las subunidades indicadas fusionadas a GFP se incubaron en YPD durante 3h en presencia o ausencia de benomil 60 mg/L. Las proteínas de fusión se observaron en el microscopio de fluorescencia.



Figura 4.3. Sensibilidad a benomil del mutante $\Delta iwr1$. Diluciones seriadas de las cepas silvestre y $\Delta iwr1$ se sembraron en placas de YPD y YPD con 20 mg/L de benomil.

La inhibición de la exportina Xpo1p no afecta a la localización celular de la RNA pol II

En células humanas el tratamiento con leptomicina B (LMB), un inhibidor específico de la exportina CRM1 (Xpo1p en levadura), induce la acumulación de Rpb1p en el citoplasma (Forget et al., 2010). Se ha propuesto que Xpo1p podría tener un papel en la localización de la RNA pol II en levadura (Czeko et al., 2011), dado que Iwr1p contiene una NES y se mueve entre el núcleo y el citoplasma de una manera dependiente de esta exportina (Peiró-Chova y Estruch, 2009). En la levadura *S. cerevisiae* la LMB no tiene ningún efecto en la función de Xpo1p, pero cambios sencillos de aminoácidos hacen a esta proteína sensible a la presencia de LMB (Neville y Rosbash, 1999). Así pues, utilizando estas cepas en las que Xpo1p es sensible a LMB hemos estudiado la localización de las subunidades de la RNA pol II, Rpb1p y Rpb3p. El tratamiento con LMB se realizó en condiciones que afectaron al transporte dependiente de Xpo1p de otras proteínas como Dbp5p (resultados no mostrados). En estas condiciones no se observó ningún efecto de la LMB en la localización de las subunidades de la RNA pol II (Figura 4.4).



La delección de componentes de R2TP afecta parcialmente a la importación nuclear de las subunidades grandes de la RNA pol II

El complejo R2TP se ha relacionado con distintos procesos celulares, entre los que se incluye el ensamblaje de la RNA pol II en células humanas (Boulon et al., 2010; Forget et al., 2010; Kakihara y Houry, 2012). En levadura, en este trabajo se han identificado interacciones físicas entre Rtp1p y varios componentes del complejo R2TP (Tabla 3.1).

Para profundizar en el estudio de la implicación de los componentes de R2TP en la importación nuclear de la RNA pol II en levadura, se analizó la localización subcelular de las dos subunidades mayores de la polimerasa, Rpb1p y Rpb2p, y de la subunidad pequeña Rpb3p fusionando estas proteínas con GFP en cepas mutantes para alguna subunidad del complejo R2TP (Rvb1p, Rvb2p, Pih1p y Tah1p). En la Figura 4.5 se muestra como la depleción de Rvb2p y la delección de *PIHI* incrementan los niveles citoplasmáticos de Rpb1p-GFP y Rpb2p-GFP. En cambio no se observa ningún efecto en la localización de la subunidad pequeña Rpb3p. En el caso de el mutante *Atah1* no se observó alteración en la distribución de ninguna de las subunidades de la RNA pol II analizadas (resultados no mostrados).

Figura 4.4. Localización de la RNA pol II en mutantes *xpo1*. Células de la cepa *XPO1T539C* mutante *XPO1* sensible a LMB (LMBS) que expresaban las proteínas de fusión Rpb1-GFP o Rpb3-GFP se crecieron en YPD a 30°C hasta fase exponencial. Las células entonces se incubaron durante 2h en presencia (+LMB) y ausencia (-LMB) de 10 ng/mL de LMB. Las células y las proteínas de fusión se observaron al microscopio de fluorescencia.

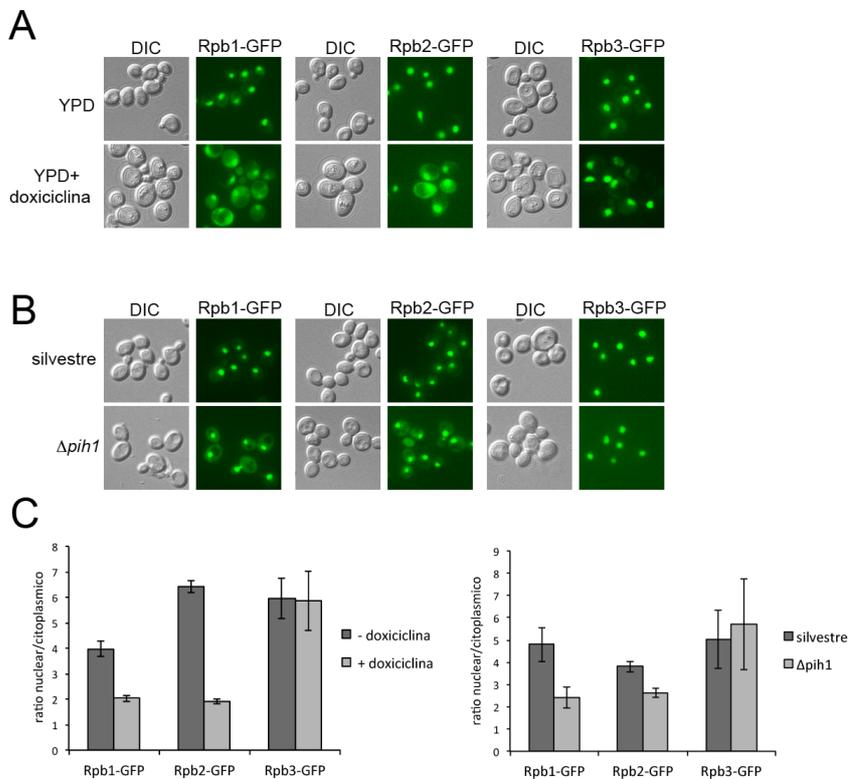


Figura 4.5. Localización de la RNA pol II en mutantes del complejo R2TP. (A) Las subunidades indicadas fusionadas a GFP se expresaron en una cepa donde el promotor del gen *RVB2* se sustituyó por el promotor *tetO*. Las células se cultivaron en YPD a 30°C hasta fase exponencial temprana y entonces se transfirieron a YPD con o sin doxiciclina 10 mg/L y se incubaron durante 8 horas a 30°C. **(B)** Las subunidades de la RNA pol II indicadas fusionadas a GFP se expresaron en una cepa silvestre y en la cepa mutante *Δpih1*. Células procedentes de cultivos exponenciales de estas cepas fueron observadas al microscopio de fluorescencia. Se muestran imágenes GFP y DIC. **(C)** La distribución relativa de las proteínas de fusión entre el núcleo y el citoplasma se determinó calculando la relación entre la intensidad fluorescente media de áreas nucleares y citosólicas de la célula (n>30 células) utilizando al menos 3 cultivos independientes.

Efecto de la delección de RPAP1 y RPAP2 en la localización celular de la RNA pol II

Tanto RPAP1 como RPAP2 (Rba50p y Rtr1p, respectivamente, en levadura) son proteínas candidatas a participar durante la biogénesis de la RNA pol II. Estas proteínas fueron identificadas como factores asociados a la RNA pol II (Jeronimo et al., 2007) y ambas interaccionan con la RNA pol II en la fracción soluble de extractos de células de humanos (Forget et al., 2010).

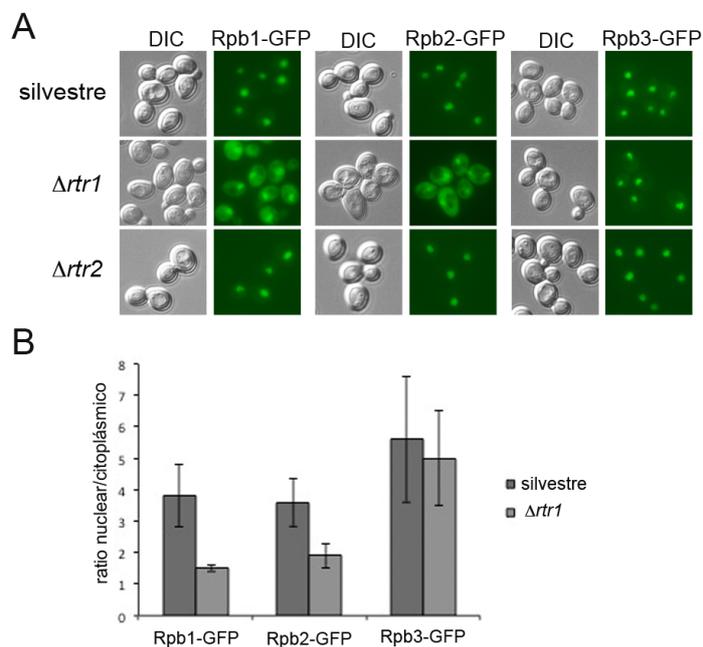
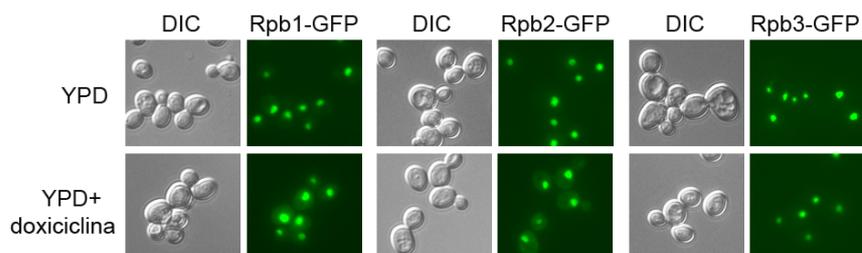


Figura 4.6. Localización nuclear de la RNA pol II en mutantes $\Delta tr1$ y $\Delta tr2$. (A) Células de cultivos en fase exponencial de las cepas silvestre y de los mutantes $\Delta tr1$ y $\Delta tr2$ con las proteínas de fusión indicadas se observaron al microscopio de fluorescencia. Se muestran los paneles de las imágenes DIC y la señal correspondiente a GFP. (B) La distribución relativa de Rpb1p, Rpb2p y Rpb3p entre el núcleo y el citoplasma se determinó calculando la relación entre la intensidad fluorescente mediana de áreas nucleares y citosólicas de la célula ($n > 30$ células).

Recientemente la proteína RPAP2 se ha implicado directamente en la importación nuclear de la RNA pol II humana (Forget et al., 2013). En *S. cerevisiae* *RTR1* tiene un gen parálogo, *RTR2* con el cual podría estar funcionalmente relacionado (Gibney et al., 2008). Puesto que ni *RTR1* ni *RTR2* son genes esenciales analizamos la localización células de las subunidades Rpb1p, Rpb2p y Rpb3p en los mutantes nulos $\Delta rtr1$ y $\Delta rtr2$. En la Figura 4.6 se muestra como la delección de *RTR1* afecta a la localización celular de Rpb1p y Rpb2p pero no de Rpb3p. No se observó ningún efecto en la localización de estas subunidades por la delección de *RTR2*.

En levadura la proteína Rba50p está codificada por un gen esencial. Para analizar si la ausencia de Rba50p tenía algún efecto en la localización nuclear de la RNA pol II se construyeron cepas en las que se expresaron diferentes subunidades de la RNA pol II fusionadas a GFP y donde *RBA50* se puso bajo el control del promotor *tetO*, reprimible por doxiciclina. Al contrario de lo esperado, la presencia de doxiciclina no afectó a la capacidad de crecimiento de la levadura, indicando que la célula en estas condiciones aún conserva una cantidad suficiente de Rba50p para realizar su función esencial. En estas condiciones observamos una ligera alteración en la localización nuclear de las subunidades grandes, Rpb1p y Rpb2p, cuando la cepa *P_{tetO}-RBA50* se creció en presencia de doxiciclina mientras que no se observó alteración en la localización de Rpb3p (Figura 4.7).



La depleción de cualquiera de las subunidades de la RNA pol II afecta a la importación nuclear de las dos subunidades mayores de la polimerasa

La depleción de cualquier subunidad de la RNA pol II en células humanas provoca la acumulación de Rpb1p en el citoplasma, sugiriendo un ensamblaje citoplasmático del todo el complejo previo a su entrada en el núcleo (Boulon et al., 2010). Para comprobar si esta misma situación se producía en levadura, construimos cepas donde el promotor de distintas subunidades de la RNA pol II fue sustituido por el promotor reprimible P_{tetO} . El crecimiento de estas cepas se vio inhibido por la presencia de doxiciclina en el medio (resultados no mostrados). La depleción de cualquiera de las subunidades mayores Rpb1p y Rpb2p provoca la deslocalización de la otra, expresada como fusión con GFP (Figura 4.8). Para comprobar si sucedía lo mismo cuando eran las subunidades pequeñas las deplecionadas, se analizó la localización de Rpb1-GFP tras la depleción de Rpb3p, Rpb7p, y Rpb8p. Como se observa en la Figura 4.8, la depleción de cualquiera de estas subunidades produce una acumulación en el citoplasma de la subunidad mayor de la RNA polimerasa. Sin embargo, estas depleciones sólo afectan parcialmente a la localización de la subunidad pequeña Rpb3p (Figura 4.8).

Figura 4.7. Efectos en la localización de la RNA pol II en células donde se ha deplecionado Rba50p. Las subunidades indicadas fusionadas a GFP se expresaron una cepa donde el promotor de Rba50p se sustituyó por el promotor $tetO$. Las células se cultivaron en YPD a 30°C hasta fase exponencial temprana y entonces se transfirieron a YPD con o sin doxiciclina 10 mg/L y se incubaron durante 8 horas a 30°C. Se muestran las imágenes DIC y las correspondientes a GFP tomadas en el microscopio de fluorescencia.

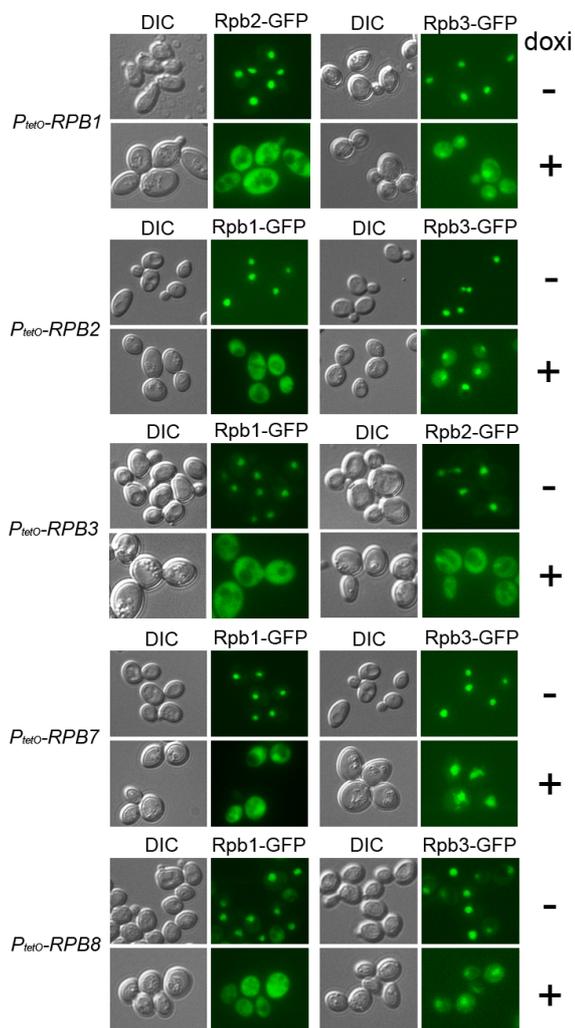


Figura 4.8. Efecto en la localización celular de diferentes subunidades la RNA pol II causadas por la depleción de otras subunidades del holoenzima. Se expresaron las subunidades indicadas etiquetadas con GFP en cepas donde el promotor de los genes que codifican para distintas subunidades de la RNA pol II fue sustituido por el promotor *tetO*. Las células se crecieron en YPD a 30 °C hasta fase exponencial temprana y entonces se transfirieron a YPD con o sin doxiciclina 10 mg/L donde se incubaron durante 8 horas. Las proteínas de fusión se visualizaron en el microscopio de fluorescencia.

La estabilidad de Rpb3p no se ve afectada por condiciones que afectan al ensamblaje o a la importación nuclear de la RNA pol II

En esta parte del trabajo se presentan resultados en los que se muestra una distribución celular distinta de las subunidades grandes (Rpb1p y Rpb2p) y algunas subunidades pequeñas (Rpb3p, Rpb7p o Rpb11p) de la RNA pol II, bajo condiciones en las que o bien el ensamblaje o bien la importación nuclear de la polimerasa está afectada. Los resultados obtenidos pueden ser indicativos de la participación de mecanismos diferentes en la importación nuclear de ambos tipos de subunidades, pero también podrían ser compatibles con un mecanismo común para el transporte de todas las subunidades de la RNA pol II combinado con una rápida degradación de las subunidades pequeñas no ensambladas en el citoplasma. Por esta razón, se comparó la estabilidad de la proteína Rpb3p en una cepa silvestre y en una mutante *Δiwr1*. Los niveles totales de Rpb3p fueron similares en una cepa silvestre y en una cepa mutante *Δiwr1* (ver tiempos 0 en la Figura 4.9.A). Además, cuando se llevó a cabo el apagado traduccional por la adición de cicloheximida a cultivos en fase exponencial de dichas cepas, no se observó la rápida degradación de Rpb3p en el mutante *Δiwr1* que podría dar cuenta de los resultados obtenidos (Figura 4.9.A). También se analizaron los niveles de Rpb3p en condiciones en las que se deplecionaron diferentes subunidades de la RNA pol II, condiciones en las que se altera la distribución celular de la RNA pol II (Figura 4.8). Utilizando las cepas *P_{tetO}-RPB1*, *P_{tetO}-RPB2* y *P_{tetO}-RPB8*, crecidas en presencia y ausencia de doxiciclina, se comparó la cantidad de proteína Rpb3p por *Western blot*. La figura 4.9.B muestra que la depleción de ninguna de las subunidades ensayadas por la adición de doxiciclina produce una alteración significativa de los niveles de Rpb3p.

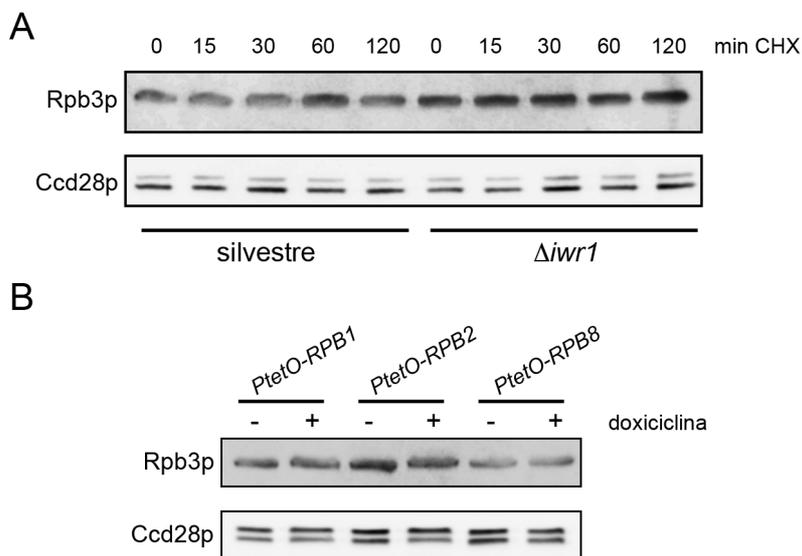


Figura 4.9. Análisis de la estabilidad de Rpb3p en condiciones que dificultan el ensamblaje y/o la importación al núcleo de la RNA pol II. (A) Cultivos en fase exponencial de una cepa silvestre y una cepa $\Delta iwr1$ se incubaron con cicloheximida a una concentración final de 50 mg/L. La cantidad de proteína Rpb3p se determinó a los tiempos indicados mediante *Western blot* con el anticuerpo anti-Rpb3 (*NeoClone*). Como control de carga se presentan los niveles de proteína Cdc28p, se utilizó el anticuerpo anti-Cdc28 (*SantaCruz Biotechnology*). **(B)** Se obtuvieron extractos proteicos totales de las cepas donde el promotor de los genes *RPB1*, *RPB2* o *RPB8* se sustituyeron por el promotor *tetO*, tanto en fase exponencial de crecimiento en YPD como transferidas durante 8 horas a YPD con doxiciclina 10 mg/L. La cantidad de proteína Rpb3p se determinó mediante *Western blot* con el anticuerpo anti-Rpb3 (*NeoClone*). Como control de carga se presentan los niveles de proteína Cdc28p, se utilizó el anticuerpo anti-Cdc28 (*SantaCruz Biotechnology*).

Rpb1p y Rpb2p se acumulan en el núcleo en el mutante *Δiwr1* en condiciones de crecimiento lento

Durante los análisis de la localización celular de las subunidades de la RNA pol II, se observó que células post-diaúxicas del mutante *Δiwr1* mostraban una acumulación nuclear de las subunidades Rpb1p y Rpb2p mayor que éstas células en fase exponencial de crecimiento. Por ese motivo estudiamos la localización celular de Rpb1-GFP en el mutante *Δiwr1* a distintos tiempos a lo largo de la curva de crecimiento celular, y observamos una acumulación nuclear de Rpb1p que se incrementa a medida que las células salen de la fase exponencial para entrar en la fase post-diaúxica (Figura 4.10.A). La fase post-diaúxica se caracteriza por un crecimiento celular lento. Estas condiciones de crecimiento lento también se pueden obtener usando bajas temperaturas o fuentes de carbono no fermentables. Para comprobar si la acumulación nuclear de las subunidades grandes está asociada a un crecimiento lento del cultivo, analizamos la distribución celular de Rpb1-GFP y Rpb2-GFP en el mutante *Δiwr1* crecido en acetato como fuente de carbono, así como en células crecidas en YPD a temperatura reducida (16 °C). Como se observa en la Figura 4.10.B, a una misma densidad óptica ($OD_{600}=0.2$), la cantidad de Rpb1-GFP o Rpb2-GFP localizada en el núcleo en el mutante *Δiwr1* fue mayor en células crecidas en una fuente de carbono no fermentable como el acetato que cuando las células se crecieron en glucosa. De la misma forma las células crecidas a 16 °C muestran una mayor acumulación nuclear de Rpb1p y Rpb2p que las células del mismo mutante crecidas en YPD a 30 °C (Figura 4.10.B).

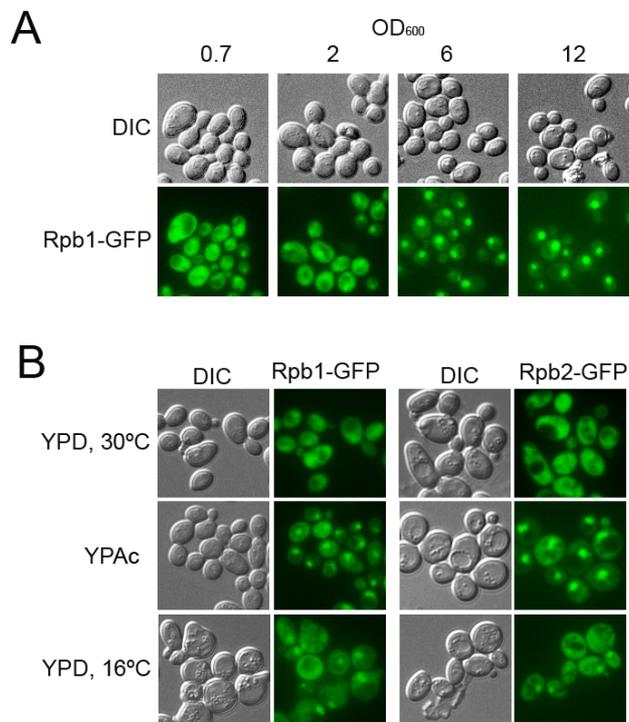


Figura 4.10. Localización de la RNA pol II en condiciones de crecimiento lento. **(A)** Células de una cepa *Δiwr1* que expresan la proteína de fusión Rpb1-GFP se visualizaron al microscopio de fluorescencia a las OD₆₀₀ indicadas. **(B)** Células del mutante *Δiwr1* que expresan la proteína de fusión Rpb1-GFP o Rpb2-GFP se crecieron en distintas condiciones, a 30 °C, con acetato como fuente de carbono y a 16 °C. La localización de las subunidades indicadas se observó en el microscopio de fluorescencia.

4.2 Discusión

El modelo actual de importación nuclear de la RNA pol II propone el ensamblaje citoplasmático del holoenzima previo a su importación al núcleo (Boulon et al., 2010; Corden, 2011; Wild y Cramer, 2012). Experimentalmente, dicho modelo está apoyado en el hecho de que la depleción de cualquier subunidad de la RNA pol II en células humanas provoca la acumulación citoplasmática de la subunidad mayor Rpb1p (Boulon et al., 2010). Además, en levaduras, la unión de la proteína Iwr1p a la RNA pol II requiere el ensamblaje previo de las diferentes subunidades que la integran y, una vez unida, Iwr1p utiliza su señal de localización nuclear (NLS) para dirigir la importación de la RNA pol II (Czeko et al., 2011). Sin embargo, dado que *IWR1* no es un gen esencial, debe existir una ruta alternativa independiente de Iwr1p para la importación de la RNA pol II al núcleo. Además, también hay resultados que sugieren la existencia de distintos mecanismos de importación que afectarían diferencialmente a las subunidades mayores (Rpb1p y Rpb2p) y menores de la RNA pol II (Forget et al., 2010).

En este capítulo hemos analizado el efecto de mutaciones en funciones que se han implicado o podrían estar implicadas en la localización de la RNA pol II. También se ha analizado el efecto de la adición de drogas inhibitoras de procesos que se han relacionado con la biogénesis de la RNA pol II. Nuestros resultados revelan un efecto diferencial sobre la distribución celular de las subunidades grandes y pequeñas. Así, tanto la delección de *RTP1* como de *IWR1* provoca la acumulación citoplasmática de las subunidades grandes, Rpb1p y Rpb2p, pero sólo tienen un efecto parcial en la localización de las subunidades pequeñas Rpb3p, Rpb7p y Rpb11p (Figura 4.1). También, mutaciones en los componentes del complejo R2TP, de la GTPasa Npa3p y de la CTD fosfatasa Rtr1p sólo alteran la distribución de Rpb1p y Rpb2p pero no tienen efecto en la localización de Rpb3p.

Además, hemos determinado que, de igual forma que ocurre en células humanas, la depleción de distintas subunidades de la RNA pol II causa la acumulación citoplasmática de Rpb1p (y también de Rpb2p) (Figura 4.8). Sin embargo, cuando analizamos la depleción de distintas subunidades de la RNA pol II en la localización de la subunidad pequeña Rpb3p es posible observar una acumulación nuclear parcial de la misma (Figura 4.8).

Como señalan Czeko y colaboradores (2011) estas observaciones, que indican un comportamiento distinto de las subunidades grandes y pequeñas de la RNA pol II, son compatibles con un ensamblaje de la RNA pol II en el citoplasma combinada con la rápida degradación de las subunidades pequeñas no ensambladas en el citoplasma. No obstante, los niveles de la proteína Rpb3p no se encuentran alterados en los mutantes *Δiwr1* y *Δrtp1* (Czeko et al., 2011) (Figura 4.8, y resultados no mostrados). Una explicación alternativa a estas observaciones es que las subunidades pequeñas de la RNA pol II son importadas, no sólo como parte del holoenzima totalmente ensamblado, sino también a través de otros mecanismos. En células humanas Forget y colaboradores (2010) han propuesto dos mecanismos para la importación nuclear de la RNA pol II. En uno de ellos, necesario para la importación de las subunidades grandes Rpb1p y Rpb2p, está implicada la proteína RPAP4/GPN1 (Npa3p en levadura) y requiere el ensamblaje de los microtúbulos. En el otro, necesario para la importación de las subunidades pequeñas, son dispensables tanto la proteína RPAP4/GPN1 como los microtúbulos (Forget et al., 2010). Una consecuencia de este modelo es que, en células humanas, el ensamblaje de la RNA pol II podría ocurrir en el núcleo.

En levadura nuestros resultados y los de Czeko y colaboradores (2011) sugieren que las diferentes subunidades de la RNA pol II entran al núcleo como parte del complejo completamente pre-ensamblado en el citoplasma. Pero, obviamente, tanto las subunidades grandes como las pequeñas también deben de ser importadas al núcleo mediante mecanismos

independientes de Iwr1p, dado que el gen que codifica esta proteína no es esencial para la célula. Asumiendo que la entrada en el núcleo de la holoenzima RNA pol II pre-ensamblada en el citoplasma es dependiente de Iwr1p, proponemos la existencia de rutas de importación para las subunidades individuales o sub-complejos de las mismas, cuyo ensamblaje final tendría lugar en el núcleo. Estas rutas serían poco eficientes para la entrada de las subunidades grandes Rpb1p y Rpb2p, pero permitirían una acumulación nuclear parcial de las subunidades pequeñas (Figura 4.1). El hecho de que la depleción de Npa3p o de componentes del complejo R2TP, la ausencia de Rtr1p o la inhibición de la polimerización de los microtúbulos afecte diferencialmente a la distribución de las subunidades grandes y pequeñas puede interpretarse como indicativo de su participación en el ensamblaje del holoenzima en el citoplasma, pero también con su implicación en el transporte de las subunidades mayores de la polimerasa. En concordancia con la primera posibilidad, en un trabajo reciente Minaker y colaboradores (2013) han sugerido que Npa3p (y sus parálogos Gpn2p y Gpn3p) actúan aguas arriba de Iwr1p en el proceso de biogénesis de la RNA pol II (Minaker et al., 2013). Esto explicaría porqué los defectos en Npa3p afectan en mayor medida a aquellas subunidades que son importadas al núcleo principalmente como parte de la RNA pol II completamente ensamblada.

La existencia de distintos mecanismos para la importación nuclear y/o el ensamblaje de las subunidades RNA pol II podría tener implicaciones reguladoras. La biogénesis de la RNA pol II podría estar ajustada de forma que los niveles de RNA pol II disponibles en la célula estén de acuerdo a los requerimientos transcripcionales del momento, regulando la actividad de los factores de ensamblaje y transporte de la RNA pol II. Así, el requerimiento de Iwr1p (y quizás otros factores necesarios para el ensamblaje e importación del enzima ensamblado) podría ser mayor en condiciones que implicasen una alta actividad transcripcional. En condiciones de crecimiento lento, como son las fuentes de carbono no fermentables o la baja

5. Estudio de la función nuclear de Iwr1p

Como se ha mencionado, Iwr1p se identificó como una proteína que interacciona con distintas subunidades de la RNA pol II (Krogan et al., 2006) y que resulta necesaria para el transporte de ésta, una vez su ensamblaje ha tenido lugar en el citoplasma (Czeko et al., 2011). Además de con la RNA pol II, también se han descrito interacciones entre Iwr1p y los factores de elongación transcripcional Dst1p y Spt5p (Krogan et al., 2006), que actúan en una etapa del ciclo de transcripción en la que, según el modelo de Czeko y col., Iwr1p habría dejado de interactuar con la RNA pol II. En nuestro trabajo hemos descrito una serie de interacciones genéticas entre *IWR1* y genes implicados en la elongación transcripcional y en la estabilidad de la RNA pol II.

En este capítulo se presentan y discuten una serie de resultados que sugieren una función “nuclear” de la proteína Iwr1p, adicional a su papel en la importación de la RNA pol II.

5.1. Resultados

IWR1* interacciona genéticamente con los factores de elongación transcripcional *DST1* y *SPT4

La proteína Iwr1p fue identificada en un estudio global de interacciones de proteínas de levadura como una proteína que interacciona con la RNA pol II (Gavin et al., 2006; Krogan et al., 2006). En estos estudios también se identificaron interacciones entre Iwr1p y los factores de elongación Spt4p y Spt5p (Gavin et al., 2006) y Dst1p y Spt5p (Krogan et al., 2006). Para analizar la posible función de Iwr1p en la elongación transcripcional estudiamos la sensibilidad del mutante $\Delta iwr1$ y de los dobles mutantes $\Delta iwr1\Delta dst1$ y $\Delta iwr1\Delta spt4$ a 6-azauracilo (6-AU), un inhibidor de la elongación transcripcional que reduce dramáticamente los niveles de GTP y UTP disponibles en la célula (Figura 5.1.A). Se hizo uso del mutante $\Delta spt4$ puesto que Spt4p forma un complejo con Spt5p, el homólogo en *S. cerevisiae* del complejo DSIF, y que, a diferencia de *SPT5*, no es un gen esencial, lo que permite el uso de mutantes nulos (Wada et al., 1998; Yamaguchi et al., 1999). El mutante $\Delta iwr1$ presenta un crecimiento ligeramente menor al de la cepa silvestre en cualquier medio (Figura 5.1.A y resultados no mostrados), que no resulta significativamente afectado por la presencia de 6-AU. La ausencia de defectos en elongación del mutante $\Delta iwr1$ está de acuerdo con resultados previos a este trabajo donde se analizó mediante ensayos GLAM (Morillo-Huesca et al., 2006) la eficiencia en la biosíntesis de mRNA en función de la longitud del gen, y se obtuvo un índice GLAM para el mutante $\Delta iwr1$ similar al de la cepa silvestre (resultados no mostrados). Como se esperaba, los mutantes $\Delta dst1$ y $\Delta spt4$ presentaron graves defectos de crecimiento en presencia de 6-AU. De forma

inesperada se encontró que la delección del gen *IWR1* tenía un efecto supresor parcial del defecto en crecimiento en presencia de 6-AU mostrado por los mutantes $\Delta dst1$ y $\Delta spt4$. La supresión de la hipersensibilidad a 6-AU de estos mutantes por la delección de *IWR1* se confirmó transformando los dobles mutantes con un plásmido centromérico portador del gen silvestre *IWR1* y comprobando la recuperación de dicha hipersensibilidad (Figura 5.1.A). Además, la sensibilidad de los mutantes sencillos $\Delta dst1$ y $\Delta spt4$ se vio incrementada cuando se transformaron con el plásmido portador del gen silvestre *IWR1*. Cabe destacar que la expresión del plásmido centromérico p*IWR1* también tiene efectos negativos en el crecimiento de una cepa silvestre en presencia de 6-AU (Figura 5.1.B).

Una de las causas que determinan la sensibilidad a 6-AU es la incapacidad para inducir el gen *IMD2*, que codifica la IMP deshidrogenasa, una enzima limitante en la ruta de síntesis del GTP. Para determinar si la supresión de la sensibilidad a 6-AU del mutante $\Delta dst1$ por la delección del gen *IWR1* era consecuencia de la restauración de la capacidad de inducción del gen *IMD2*, se analizó por *Northern blot* la inducción de dicho gen en presencia de 6-AU. En la Figura 5.2 se muestra como la inducción del gen *IMD2* en presencia de 6-AU se encuentra retasada en el tiempo en el mutante $\Delta iwr1$, y no existe inducción en el mutante $\Delta dst1$ ni en el doble mutante $\Delta dst1 \Delta iwr1$, indicando que la supresión de la sensibilidad a 6-AU no se debe a un efecto positivo en la inducción del gen *IMD2* por la delección del gen *IWR1*.

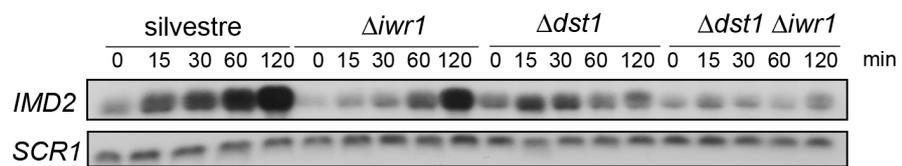


Figura 5.2. Inducción defectuosa de *IMD2* en el mutante de elongación $\Delta dst1$ y el doble mutante $\Delta dst1 \Delta iwr1$. Se cultivaron células de la cepa silvestre (FY86), de las cepas mutantes $\Delta iwr1$ y $\Delta dst1$ y el doble mutante $\Delta iwr1 \Delta dst1$ hasta fase de crecimiento exponencial en medio sintético completo sin uracilo (SC-ura) en presencia de 6-azaurazilo 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante los tiempos indicados. Se obtuvo el RNA total y se analizó por *Northern blot* la expresión del gen *IMD2*. El transcrito de la RNA pol III, *SCR1*, se uso como control de carga.

La delección de *IWR1* incrementa la densidad de RNA pol II en el extremo 3' del gen *YLR454*

Mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIp) realizados en el gen de 8 kb *YLR454*, cuya pauta abierta de lectura se encuentra bajo el control del promotor fuerte *GALI*, se ha descrito que la presencia de 6-AU causa una disminución progresiva en la densidad de la RNA pol II asociada a cromatina a medida que nos alejamos del promotor del gen, efecto se ve severamente incrementado en el mutante $\Delta dst1$ (Mason y Struhl, 2005). Se hizo uso de este ensayo para determinar la distribución de la RNA pol II en distintas posiciones (cada 2 kb) dentro de la región codificadora del gen $P_{GALI}\text{-}YLR454$ en una cepa silvestre, los mutantes sencillos $\Delta dst1$ y $\Delta iwr1$ y el doble mutante $\Delta dst1 \Delta iwr1$ tanto en ausencia como en presencia de 6-AU (Figura 5.3). Como ya se ha mencionado, la adición de 6-AU provoca una disminución progresiva de la cantidad de la RNA pol II asociada a cromatina a medida que nos alejamos del promotor, tanto en la cepa silvestre como, especialmente, en el mutante $\Delta dst1$, donde la cantidad de RNA pol II se reduce severamente, incluso, a distancias de tan sólo 2 kb desde promotor. Resultó interesante comprobar que, a diferencia

de lo que ocurre en la cepa silvestre, la presencia de 6-AU no causa una reducción de la densidad de la RNA pol II a lo largo del gen *YLR454* en el mutante $\Delta iwr1$. Además, la pérdida de densidad de la RNA pol II en posiciones más alejadas al promotor son significativamente menores en el doble mutante $\Delta dst1 \Delta iwr1$ que en el mutante sencillo $\Delta dst1$. Estos resultados, sugieren que la ausencia de Iwr1p tiene efectos negativos en la disociación de la RNA pol II de la cromatina, sobretodo en situaciones que dificultan la elongación de la transcripción.

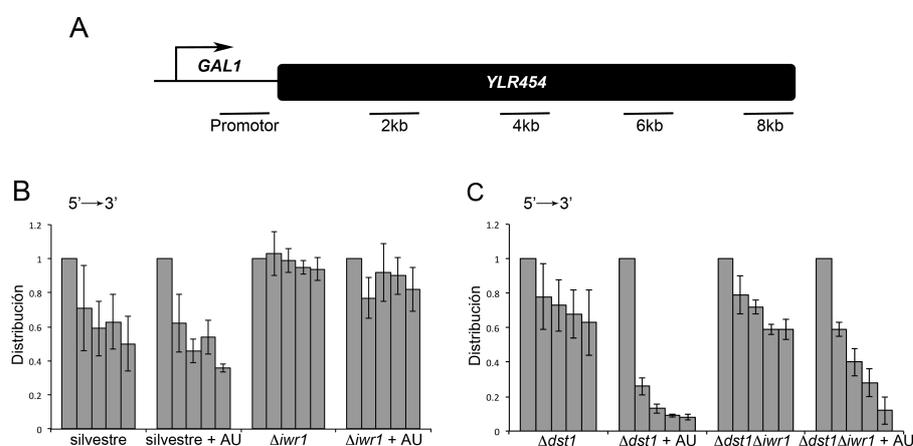


Figura 5.3. Análisis de la procesividad de la RNA pol II en cepas mutantes $\Delta iwr1$, $\Delta dst1$ y doble mutante $\Delta dst1 \Delta iwr1$. (A) Diagrama del gen P_{GAL1} -*YLR454*. Se representan las regiones amplificadas por los pares de oligonucleótidos usados para el ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIp) correspondientes al promotor, y a las regiones codificantes en las posiciones indicadas aguas abajo del promotor. (B) y (C) Ocupación relativa al promotor de la RNA pol II en cada una de las posiciones representadas en el diagrama. Se llevaron a cabo ensayos de ChIp utilizando el anticuerpo 8WG16 (Covance) en células portadoras del gen P_{GAL1} -*YLR454* crecidas hasta fase exponencial en medio mínimo sin uracilo con galactosa como fuente de carbono. El tratamiento con 6-AU se realizó durante 30 min a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Posteriormente se determinó la cantidad de inmunoprecipitado (IP) mediante PCR cuantitativa. La ocupación relativa en cada posición se determinó por la ratio del IP relativa al *input* (región de interés) dividida por la ratio del IP control relativa al *input* control (región intergénica). Se presentan las medias y desviaciones estándar de tres experimentos independientes.

La ausencia de Iwr1p afecta a los niveles de la proteína Rpb1p en la célula

Una de las consecuencias fenotípicas de la ausencia de Iwr1p es un incremento en la cantidad total de la subunidad mayor de la RNA pol II, Rpb1p, en la célula, pero no así de las otras subunidades de la enzima (Figura 5.4; Czeko et al., 2011 y resultados no mostrados).

La degradación de Rpb1p en respuesta a daños en el DNA por irradiación con luz ultravioleta y otras agresiones ha sido documentada en multitud de trabajos (Ratner et al., 1998; Anindya et al., 2007; Beaudenon et al., 1999; Bregman et al., 1996; Hobson et al., 2012; Luo et al., 2001; Sigurdsson et al., 2010; Somesh et al., 2005).

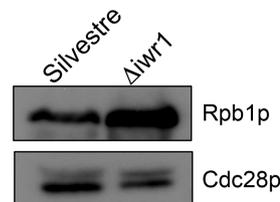


Figura 5.4. Análisis de los niveles de proteína Rpb1p en el mutante $\Delta iwr1$. Se obtuvieron extractos proteicos totales a partir de la misma cantidad de células de una cepa silvestre y una mutante $\Delta iwr1$. Los niveles de proteína Rpb1p se determinaron mediante *Western blot* haciendo uso del anticuerpo anti-Rpb1 8WG16 (Covance). Como control de carga se muestran los niveles de proteína Cdc28p, se utilizó el anticuerpo anti-Cdc28 (SantaCruz Biotechnology).

Por lo tanto, y puesto que ha sido descrito que Iwr1p dirige la importación al núcleo de la RNA pol II, el incremento en la cantidad de la subunidad Rpb1p observada en el mutante $\Delta iwr1$ podría ser consecuencia de que la degradación de dicha subunidad se lleva a cabo preferentemente en el núcleo y que la deslocalización de Rpb1p en el mutante $\Delta iwr1$ aumentara la

estabilidad de ésta. No obstante, también podría indicar una participación de Iwr1p en la degradación de Rpb1p. Por ello analizamos la posible existencia de interacciones genéticas entre *IWR1* y genes que han sido previamente implicados en la degradación de Rpb1p.

En la levadura *S. cerevisiae*, la proteína Def1p es necesaria para la ubiquitilación y proteólisis de la RNA pol II en respuesta a lesiones en el DNA (Woudstra et al., 2002). El proceso de degradación de la RNA pol II se desencadena con la ubiquitilación de la subunidad grande, Rpb1p, en el que está implicada la ubiquitin-ligasa Rsp5p (Beaudenon et al., 1999) y el complejo ubiquitin-proteasa Bre5p/Ubp3p encargado de revertir el proceso (Cohen et al., 2003). Todo ello, nos llevó a investigar las relaciones genéticas de *IWR1* con estas proteínas: Def1p, Rsp5p, Ubp3p y Bre5p; implicadas en la ruta de degradación de la RNA pol II. Para ello, se realizaron estudios de crecimiento en placa de los mutantes sencillos y los dobles mutantes. En primer lugar, estudiamos las interacciones genéticas de *IWR1* con *DEF1*. En este caso, los dobles mutantes fueron inviables (Figura 5.5.A). En el caso de *RSP5*, puesto que se trata de un gen esencial, analizamos las interacciones genéticas utilizando la cepa donde el promotor de *RSP5* ha sido sustituido por el promotor regulable *tetO*. Como se muestra en la Figura 5.5.B la cepa *P_{tetO}-RSP5* es capaz de crecer, a la concentración de doxiciclina utilizada, cuando Iwr1p está presente, pero no en el mutante *Δiwr1*. Las interacciones genéticas entre *IWR1* y *UBP3* y *BRE5* se muestran en la Figura 5.5.C. Tanto en el caso de *UBP3*, como en el de *BRE5*, se observó un crecimiento menor de las cepas dobles mutantes respecto a los mutantes sencillos.

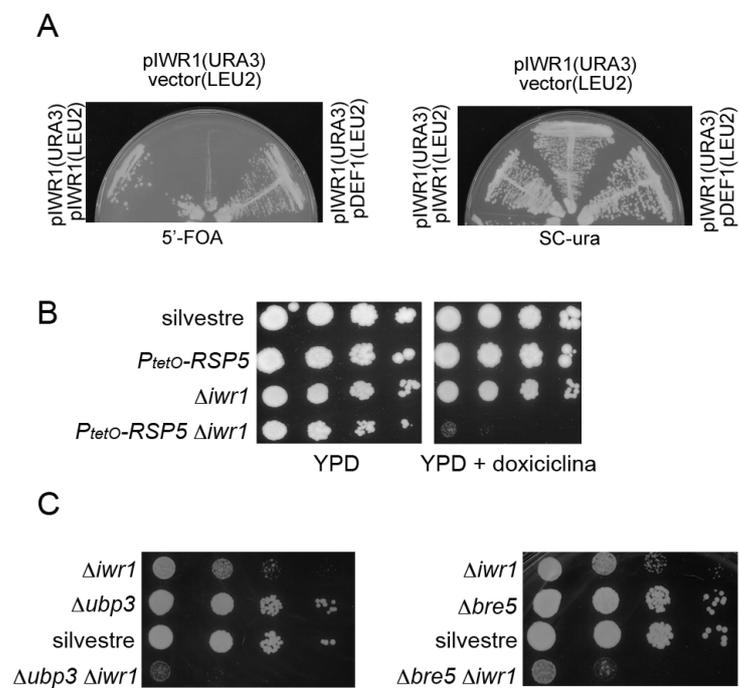


Figura 5.5. Interacciones genéticas entre *IWR1* y genes de la ruta de degradación de la RNA pol II. (A) Letalidad sintética entre *IWR1* y *DEF1*. Las cepas dobles mutantes $\Delta def1 \Delta iwr1$ que contenían la versión silvestre de *IWR1* en un plásmido centromérico con el marcador de selección *URA3*, fueron transformadas con un vector centromérico vacío con el marcador *LEU2*, y con el mismo plásmido que contenía la versión silvestre del gen *IWR1* o *DEF1*. Los transformantes fueron sembrados en placas de SC-ura o en placas con 5'-FOA y se incubaron 4 días a 30 °C. (B) Diluciones seriadas de las cepas silvestre, $\Delta iwr1$, $P_{tetO-RSP5}$ y $P_{tetO-RSP5} \Delta iwr1$ se sembraron en placas de YPD sin y con doxiciclina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubaron durante 4 días a 30 °C. (C) Se sembraron, partiendo de una misma cantidad de células, diluciones seriadas de las cepas: silvestre, $\Delta iwr1$, $\Delta ubp3$, $\Delta bre5$ y los dobles mutantes $\Delta ubp3 \Delta iwr1$ y $\Delta bre5 \Delta iwr1$ en placas de YPD durante 4 días a 30 °C.

La degradación de Rpb1p inducida por defectos en la transcripción depende de la presencia de Iwr1p

Para determinar la implicación del gen *IWR1* en la degradación de Rpb1p en condiciones que impiden la elongación transcripcional se cuantificó mediante *Western blot* la cantidad de Rpb1p en una cepa silvestre y en el mutante $\Delta iwr1$ a distintos tiempos después de la irradiación con UV (Figura 5.6). Se obtuvieron resultados diferentes en ambas cepas, siendo la caída de los niveles de Rpb1p menor y la recuperación de los niveles de Rpb1p más rápida en el mutante $\Delta iwr1$ que en la cepa silvestre.

Tanto el hecho de la existencia de relaciones genéticas entre *IWR1* y genes implicados en rutas de degradación de la RNA pol II, como la distinta cinética de degradación de la subunidad Rpb1p en el mutante $\Delta iwr1$ nos llevó a plantearnos la posible participación de Iwr1p en la ubiquitilación y degradación en el proteasoma de Rpb1p inducida por luz UV.

Para determinar si la interacción física entre Iwr1p y la RNA pol II aumenta de forma dependiente al daño en el DNA, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación entre Iwr1p (etiquetada con TAP) y Rpb1p a distintos tiempos tras la irradiación con luz UV. Se analizó tanto la interacción con la RNA pol II (utilizando el anticuerpo 8WG16) como con la polimerasa en elongación (utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente la subunidad Rpb1p fosforilada en la serina 5 del dominio carboxilo terminal).

Como se muestra en la Figura 5.7 la cantidad de Rpb1p inmunoprecipitada tras el tratamiento con luz UV se incrementó de forma moderada por el tratamiento con luz UV. En cambio, este incremento fue superior cuando se analizó la fracción de Rpb1p fosforilada en la Ser5. Estos resultados sugieren la existencia de una interacción de Iwr1p con la RNA pol II tras su unión a la cromatina y que ésta interacción se incrementa por un

estrés transcripcional como la irradiación con luz UV, que aumentaría la cantidad de enzimas bloqueadas durante la elongación.

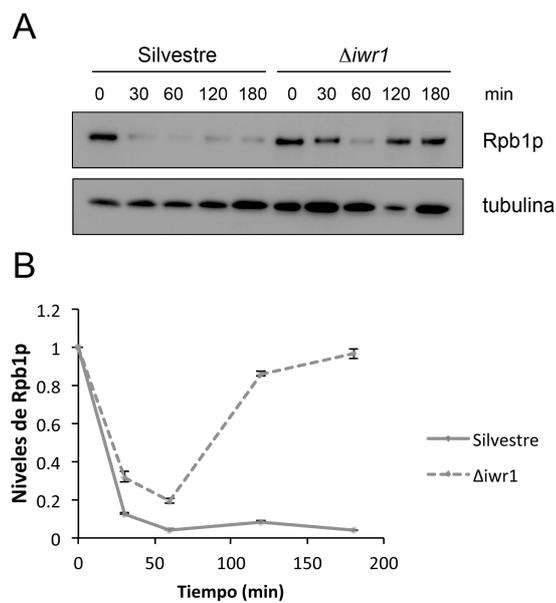


Figura 5.6. Cinética de degradación de Rpb1p en una cepa silvestre y una $\Delta iwr1$ tras la irradiación con luz UV. (A) Cultivos de una cepa silvestre y una mutante $\Delta iwr1$ en fase exponencial de crecimiento fueron irradiados con luz UV (30J/m^2). Los niveles proteicos de Rpb1p se determinaron a los tiempos (min) indicados tras la irradiación por *Western blot* con el anticuerpo anti-Rpb1, 8WG16 (*Covance*). Como control de carga se presentan los niveles de tubulina (anti-tubulina, *Abd*). (B) La gráfica muestra la cantidad relativa de proteína a cada tiempo respecto a la cantidad de proteína inicial a tiempo 0. Las medias y desviaciones se obtuvieron a partir de tres cuantificaciones independientes.

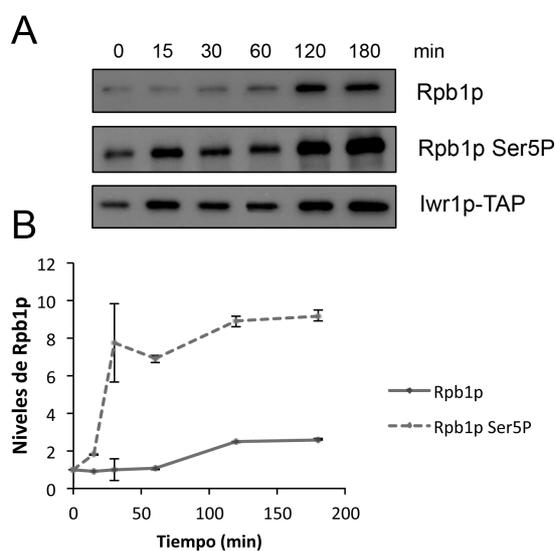


Figura 5.7. Interacción entre *Iwr1p* y *Rpb1p* en condiciones de estrés transcripcional (A) Células de una cepa silvestre se crecieron hasta fase exponencial temprana cuando se irradiaron con luz UV (30 J/m^2). Se tomaron células a los tiempos indicados tras la irradiación y se inmunoprecipitó la proteína *Iwr1p*-TAP haciendo uso de IgG-Sepharosa. La fracción inmunoprecipitada se analizó por *Western blot* con el anticuerpo, anti-*Rpb1* 8WG16 (*Covance*) y anti-*Rpb1* Ser5P H14 (*SantaCruz Biotechnology*). Como control de carga se muestra la cantidad de proteína *Iwr1p* inmunoprecipitada con el anticuerpo anti-PAP (*Sigma*) **(B)** La gráfica muestra la cantidad relativa de proteína a cada tiempo respecto a la cantidad de proteína inicial a tiempo 0. Las medias y desviaciones se obtuvieron a partir de tres experimentos independientes.

5.2. Discusión

La proteína Iwr1p participa en la importación nuclear de la RNA pol II (Czeko et al., 2011). Para ello, se une a la RNA pol II en el citoplasma, y con su NLS dirige el transporte de la enzima a través del NPC. Una vez en el núcleo y antes de la unión de la RNA pol II al DNA se libera del complejo y podría ser exportada al citoplasma para participar en sucesivas rondas de transporte (Czeko et al., 2011).

No obstante, diferentes datos experimentales sugieren que Iwr1p podría desempeñar funciones adicionales relacionadas con la transcripción. Estudios proteómicos de complejos en levadura han identificado interacciones entre Iwr1p y los factores de elongación Dst1p, Spt4p y Spt5p (Gavin et al., 2006; Krogan et al., 2006), y en este trabajo hemos descrito interacciones genéticas entre *IWR1* y los mutantes *Δdst1* y *Δspt4* que podrían ser indicativas de un papel de Iwr1p durante la elongación transcripcional, facilitando la liberación de las polimerasas bloqueadas en la cromatina. Esta función “nuclear” de la proteína Iwr1p es consecuente con la incompatibilidad de la unión de Iwr1p a la polimerasa y la unión de ésta al DNA descrita por Czeko y col. (Czeko et al., 2011).

El proceso de elongación transcripcional, lejos de ser un proceso continuo, incluye frecuentes pausas y paradas de la RNA pol II. Existen distintos mecanismos que trabajan para evitar que esta situación comprometa la viabilidad de las células. Así pues, en primera instancia actúan una serie de mecanismos que permiten la restauración de la elongación reactivando la actividad de la RNA pol II. Sólo en el caso en el que esto no sea posible se produce la ubiquitilación y la degradación de la subunidad Rpb1p de la RNA pol II. La degradación preferente de Rpb1p en el núcleo podría explicar el incremento en la cantidad esta subunidad observada en el mutante *Δiwr1* (Figura 5.4; Czeko et al., 2011), en el que se produce una acumulación de Rpb1p en el citoplasma. En cambio, este incremento no se observa en otras

subunidades como Rpb2p y Rpb3p, que también se acumulan en el citoplasma en el mutante $\Delta iwr1$. Por lo tanto, la acumulación de Rpb1p observada en el mutante $\Delta iwr1$ podría ser consecuencia de una implicación directa de Iwr1p en los procesos que afectan a la degradación de Rpb1p provocada por las pausas y paradas que, inevitablemente, ocurren durante la elongación transcripcional. Dicha participación está apoyada por el efecto negativo que la ausencia de Iwr1p tiene sobre la disociación de la cromatina de la RNA pol II, especialmente en situaciones de estrés transcripcional (Figura 5.2). Dado que la unión de Iwr1p a la RNA pol II implica la incapacidad de la polimerasa para unirse al DNA, Iwr1p podría actuar durante la elongación transcripcional facilitando la salida de la cromatina de las polimerasa atascadas, salida que sería necesaria para su degradación o reciclaje (Figura 5.8). Este papel explicaría las interacciones genéticas encontradas entre *IWR1* y los genes que han sido previamente implicados en la degradación de Rpb1p (Figura 5.5). En este escenario, la supresión parcial de las mutaciones $\Delta dst1$ y $\Delta spt4$ en presencia de 6-AU por la ausencia de Iwr1p (Figura 5.1) se podrían explicar por la estabilización de las RNA pol II paradas que tendría lugar en el mutante $\Delta iwr1$, lo que permitiría que la actividad endonucleasa intrínseca de la RNA pol II pudiera revertir los motivos de la parada y continuar la elongación transcripcional.

Establecer, de forma fehaciente, el papel de Iwr1p en el desmantelamiento de los complejos que se originan durante la transcripción como consecuencia de las paradas de la RNA pol II requerirá, no obstante, estudios moleculares adicionales.

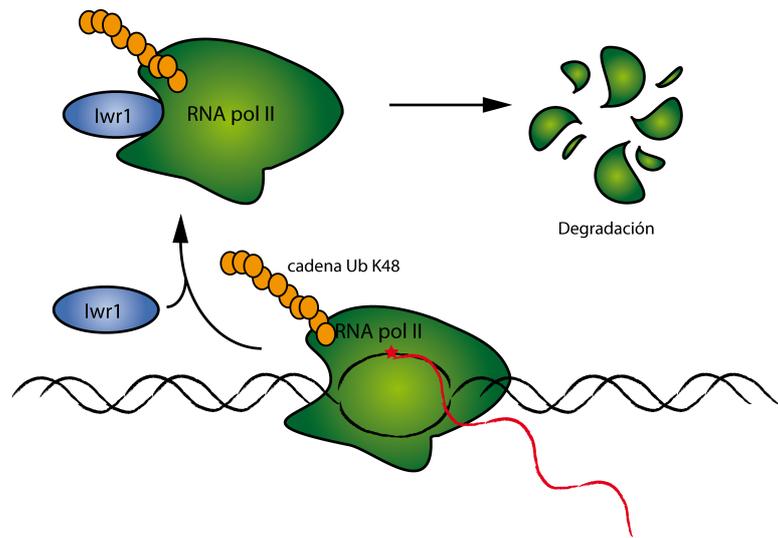


Figura 5.8. Modelo de liberación de la RNA pol II mediante la unión de Iwr1p.

6. Estudios transcriptómicos y proteómicos

Efectos transcriptómicos de la delección de *IWR1* y *RTP1*

Para profundizar en la caracterización funcional del gen *RTP1* se analizaron los efectos transcripcionales que suponen la ausencia del mismo. Además, dado que nuestros resultados apuntan a que la proteína Rtp1p es necesaria para la correcta localización nuclear de la RNA pol II, se compararon los efectos causados por la ausencia de Rtp1p en los niveles de transcritos con los provocados por la delección de Iwr1p, otro factor necesario para la importación de la RNA pol II. Nuestro objetivo es determinar si existe un perfil transcriptómico común en aquellos mutantes en los que cabe esperar una reducción en la cantidad nuclear de la RNA pol II, independientemente de si las funciones mutadas actúan en el ensamblaje o en la importación de la enzima.

6.1. Resultados

Resultados globales del análisis transcriptómico de los mutantes

Δiwr1* y *Δrtp1

Los análisis transcriptómicos, a nivel genómico, se llevaron a cabo en la cepa silvestre FY86 y su derivado isogénico *Δiwr1* mientras que la cepa *Δrtp1* se comparó con su isogénica silvestre BY4741. Estos estudios se llevaron a cabo en el Servicio Análisis Multigénico de la Unidad Central de Investigación (Universitat de València). Se utilizaron en cada caso tres cultivos de células en fase exponencial de crecimiento temprana y se compararon los niveles de transcrito en la cepa mutantes con la cepa silvestre. Un total de 372 genes mostraron un cambio de al menos dos veces en su nivel de expresión en el mutante *Δiwr1* respecto a la cepa silvestre. De todos estos genes, la expresión de 155 de ellos fue mayor en la cepa mutante, mientras que 217 presentaron el comportamiento contrario (Tabla A.D.I, Anexo digital). En el caso de *Δrtp1*, los transcritos de 571 genes mostraron variaciones superiores a dos veces entre las dos cepas. De estos, 215 mostraron niveles superiores en la cepa mutante mientras que los niveles de 356 transcritos estaban reducidos respecto a la cepa silvestre (Tabla A.D.II, Anexo digital).

El análisis de la descripción funcional de los genes expresados diferencialmente (*Saccharomyces Genome Database*) reveló, entre aquellos que están sobre-expresados en las cepas mutantes, la existencia de un importante número de genes que codifican proteínas mitocondriales. Así, 63 de los 157 genes cuya expresión aumenta en el mutante *Δiwr1* corresponden a genes de proteínas mitocondriales, mientras que en la cepa *Δrtp1* pertenecen a esta categoría 31 de los 186 que muestran niveles de transcrito superiores en el mutante.

Con el objeto de comprobar si la sobre-expresión de los genes de proteínas mitocondriales en los mutantes va acompañada de un incremento en el número de mitocondrias se visualizó el DNA mitocondrial tiñendo con DAPI células fijadas, previamente digeridas con zimoliasa (Figura 6.1). La tinción con DAPI de células no fijadas del mutante *Δiwr1* fue parcial y poco reproducible, mientras que fue imposible obtener tinciones de calidad para el mutante *Δrtp1* en cualquiera de las condiciones ensayadas (resultados no mostrados). Como se observa en la Figura 6.1, el citoplasma de las células del mutante *Δiwr1* presenta unas estructuras teñidas con DAPI, que podrían corresponder al DNA mitocondrial. Estas estructuras son mucho menos abundantes en la cepa silvestre, crecida en las mismas condiciones. En esta línea, también se realizó (mediante PCR en tiempo real) una cuantificación del DNA correspondiente al gen mitocondrial *COX1*, en relación al gen nuclear *ACT1*, tanto en la cepa mutante *Δiwr1* como en la cepa silvestre. Se encontró que la presencia del gen mitocondrial es $1,82 \pm 0,35$ veces mayor en el mutante *Δiwr1*, lo que apoya la existencia de una mayor cantidad de DNA mitocondrial, y posiblemente también de mitocondrias, en la cepa mutante.

Una importante proporción de los genes codificadores de proteínas mitocondriales que están sobre-expresados en los mutantes corresponden a proteínas implicadas en el proceso de fosforilación oxidativa. El grupo de genes que sufren un incremento en los niveles de expresión en el mutante *Δiwr1* incluye a la todos de componentes del complejo ubiquinol-citocromo c reductasa (*RIP1*, *CYT1*, *COR1*, *QCR2*, *QCR6*, *QCR7*, *QCR8*, *QCR9* y *QCR10*) y todos excepto *QCR8* en el caso del mutante *Δrtp1*. Además, se incrementan los niveles de transcrito de todos los genes de la ATP sintasa en *Δiwr1* y de *ATP3* en *Δrtp1*. También se sobre-expresan todos los genes nucleares de la citocromo c oxidasa en *Δiwr1* y los genes *COX4*, *COX7*, *COX13*, y *COX6* en *Δrtp1*. Por el contrario, *COX19* está reprimido tanto en *Δiwr1* como en *Δrtp1* (Tablas A.D.I y II, Anexo digital).

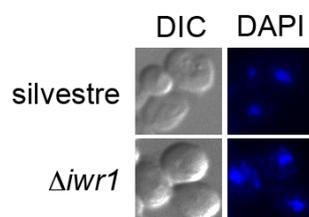


Figura 6.1. Tinción de DNA en el mutante $\Delta iwr1$. Células de una cepa silvestre y mutante $\Delta iwr1$ en fase exponencial de crecimiento fueron procesadas para inmunofluorescencia con la pertinente digestión con zimoliasa y teñidas con DAPI para la detección del DNA.

Otro grupo de genes que aparecen sobre-expresados en las cepas mutantes codifican proteínas implicadas en la utilización de fuentes de carbono no fermentables y otras funciones relacionadas con respiración celular. La sobre-expresión de estos genes podría ser consecuencia de la sobre-expresión de *ADR1* (4,4 veces en $\Delta iwr1$ y 7,7 veces en $\Delta rtp1$). El gen *ADR1* codifica un factor de transcripción requerido para la expresión del gen reprimido por glucosa *ADH2*, proteínas peroxisomales, y genes necesarios para la utilización del etanol, el glicerol y los ácidos grasos (Young et al., 2003). Aunque en menor medida, el gen *HAP4* también está sobre-expresado en el mutante $\Delta rtp1$ (2,7 veces; Tabla A.D.II, Anexo digital). *HAP4* codifica una subunidad del complejo Hap2p/3p/4p/5p un regulador transcripcional de los genes de respiración celular (Forsburg y Guarente, 1989).

Los genes sobre-expresados en las cepas mutantes relacionados con el metabolismo de aminoácidos incluyen el gen *GAP1*, una aminoácido

permeasa, el gen *PTR2*, implicado en el transporte de di- y tri-péptidos, y *PUT1*, necesario para la utilización de prolina. La prolina es la fuente de nitrógeno más abundante presente en las uvas, el medio natural de la levadura (Huang y Brandriss, 2000).

Otro tipo de genes que se encuentran en niveles mayores en las cepas mutantes son los de respuesta a estrés. Los genes *SIP18* y *GRE1* están sobre-expresados en *Artp1* y *GRE1* también en *Δiwr1*, son genes que codifican hidrofílicas, proteínas esenciales en el proceso de desecación-rehidratación. El gen *SPG4*, cuyos niveles de expresión aumentan en ambos mutantes, codifica una proteína necesaria para la supervivencia de la célula durante fase estacionaria.

Solapamiento en los genes con niveles de transcrito alterados entre los mutantes *Δiwr1* y *Artp1*

En las Tablas 6.1 y 6.2 se presenta una relación de los 50 genes con mayor nivel de sobre-expresión (respecto a la cepa silvestre) en los mutantes *Δiwr1* y *Artp1*, respectivamente. De los 50 genes que aparecen en la lista correspondiente al mutante *Δiwr1*, 24 aparecen también entre los 50 genes más sobre-expresados en el mutante *Artp1*. También encontramos solapamiento entre los 50 genes que muestran una reducción mayor en los niveles de transcrito en las cepas mutantes (Tablas 6.3 y 6.4). En este caso encontramos que 17 de los genes están presentes en las dos listas.

| Gen | Descripción | Factor de cambio |
|------------|---|-------------------------|
| HSP12 | Plasma membrane protein involved in maintaining membrane organization | 14.679 |
| INH1 | Protein that inhibits ATP hydrolysis by the F1F0-ATP synthase | 12.732 |
| SER3 | 3-phosphoglycerate dehydrogenase, catalyzes the first step in serine and glycine biosynthesis | 11.564 |
| HXT6//HXT7 | High-affinity glucose transporter of the major facilitator superfamily | 9.710 |
| GSC2 | Catalytic subunit of 1,3-beta-glucan synthase | 9.426 |
| ARG1 | Arginosuccinate synthetase | 8.723 |
| DDR2 | Multistress response protein, expression is activated by a variety of xenobiotic agents | 8.493 |
| NCE103 | Carbonic anhydrase; metalloenzyme that catalyzes CO2 hydration to bicarbonate | 8.383 |
| GAP1 | General amino acid permease | 7.438 |
| HPF1 | Haze-protective mannoprotein that reduces the particle size of aggregated proteins | 7.336 |
| PET10 | Protein of unknown function that co-purifies with lipid particles | 7.207 |
| HSP26 | Small heat shock protein (sHSP) with chaperone activity | 5.868 |
| QCR2 | Subunit 2 of the ubiquinol cytochrome-c reductase complex | 5.358 |
| RIP1 | Ubiquinol-cytochrome-c reductase | 5.232 |
| GLC3 | Glycogen branching enzyme, involved in glycogen accumulation | 4.815 |
| CYT1 | Cytochrome c1, component of the mitochondrial respiratory chain | 4.779 |
| RPM2 | Protein subunit of mitochondrial RNase P, has roles in nuclear transcription | 4.696 |
| QCR9 | Subunit 9 of the ubiquinol cytochrome-c reductase complex | 4.527 |
| PTR2 | Integral membrane peptide transporter, mediates transport of di- and tri-peptides | 4.515 |
| ADR1 | Carbon source-responsive zinc-finger transcription factor | 4.428 |
| GAS2 | 1,3-beta-glucanosyltransferase, involved with Gas4p in spore wall assembly | 4.397 |
| ARG3 | Ornithine carbamoyltransferase | 4.378 |

| Gen | Descripción | Factor de cambio |
|------------|--|-------------------------|
| PUT1 | Proline oxidase, nuclear-encoded mitochondrial protein | 4.366 |
| QCR10 | Subunit of the ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase complex | 4.331 |
| SNZ1 | Protein involved in vitamin B6 biosynthesis | 4.213 |
| UPS2 | Mitochondrial protein involved in phospholipid metabolism | 4.212 |
| YGR109W-A | unknown | 4.198 |
| PDH1 | Mitochondrial protein that participates in respiration, induced by diauxic shift | 4.172 |
| COR1 | Core subunit of the ubiquinol-cytochrome c reductase complex (bc1 complex) | 4.151 |
| BOP2 | Protein of unknown function | 3.932 |
| YBR230W-A | unknown | 3.927 |
| ECM13 | Non-essential protein of unknown function; induced by treatment with 8-methoxypsoralen | 3.921 |
| GUT2 | Mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase | 3.903 |
| THI7 | Plasma membrane transporter responsible for the uptake of thiamine | 3.877 |
| AQY2 | Water channel that mediates the transport of water across cell membranes | 3.835 |
| MEF2 | Mitochondrial elongation factor involved in translational elongation | 3.828 |
| UBI4 | Ubiquitin, becomes conjugated to proteins, marking them for selective degradation | 3.773 |
| ATP3 | Gamma subunit of the F1 sector of mitochondrial F1F0 ATP synthase | 3.728 |
| ARO9 | Aromatic aminotransferase II, catalyzes the first step of tryptophan, phenylalanine biosynthesis | 3.672 |
| MSN4 | Transcriptional activator related to Msn2p; activated in stress conditions | 3.611 |
| NCA3 | Protein that functions with Nca2p | 3.532 |
| YLL053C | unknown | 3.518 |
| SDH1 | Flavoprotein subunit of succinate dehydrogenase | 3.289 |
| PIR3 | O-glycosylated covalently-bound cell wall protein required for cell wall stability | 3.268 |

| Gen | Descripción | Factor de cambio |
|-------|---|------------------|
| QCR7 | Subunit 7 of the ubiquinol cytochrome-c reductase complex | 3.179 |
| ATP17 | Subunit f of the F0 sector of mitochondrial F1F0 ATP synthase | 3.174 |
| CLD1 | Mitochondrial cardiolipin-specific phospholipase | 3.138 |
| SDH2 | Iron-sulfur protein subunit of succinate dehydrogenase | 3.103 |
| ALD4 | Mitochondrial aldehyde dehydrogenase | 3.069 |
| TIP1 | Major cell wall mannoprotein with possible lipase activity | 3.043 |

Tabla 6.1. Genes cuya expresión se ve incrementada en la cepa mutante $\Delta iwr1$. Se muestran los 50 genes que presentan un mayor incremento en su nivel de expresión en la cepa mutante $\Delta iwr1$ comparado con la expresión de estos genes en la cepa silvestre. El factor de cambio (o *fold change*) que se muestra es el promedio de tres experimentos independientes. Se muestran en naranja los genes que también se encuentran sobre-expresados en la cepa $\Delta rtp1$.

| Gen | Descripción | Factor de cambio |
|-------|---|------------------|
| SPG4 | Protein required for survival at high temperature during stationary phase | 35.519 |
| HSP12 | Plasma membrane localized protein that protects membranes from desiccation | 13.559 |
| SAG1 | Alpha-agglutinin of alpha-cells, binds to Aga1p during agglutination | 13.475 |
| SER3 | 3-phosphoglycerate dehydrogenase, catalyzes the first step in serine and glycine biosynthesis | 9.093 |
| SIP18 | Phospholipid-binding protein; expression is induced by osmotic stress | 8.717 |
| ADR1 | Carbon source-responsive zinc-finger transcription factor | 7.722 |
| NCA3 | Protein that functions with Nca2p | 7.605 |
| GAS2 | 1,3-beta-glucanosyltransferase, involved with Gas4p in spore wall assembly | 7.529 |
| SSP2 | Sporulation specific protein that localizes to the spore wall | 7.441 |

| Gen | Descripción | Factor de cambio |
|---------------|--|-------------------------|
| GAP1 | General amino acid permease | 6.975 |
| ARG3 | Ornithine carbamoyltransferase | 6.692 |
| ARO10 | Phenylpyruvate decarboxylase | 6.433 |
| BOP2 | Protein of unknown function | 6.137 |
| INH1 | Protein that inhibits ATP hydrolysis by the F1F0-ATP synthase | 6.136 |
| FLO1 | Lectin-like protein involved in flocculation, cell wall protein | 5.940 |
| YLR042C | unknown | 5.891 |
| CTT1 | Cytosolic catalase T, has a role in protection from oxidative damage by hydrogen | 5.678 |
| FMP16 | Putative protein of unknown function | 5.667 |
| ALD3 | Cytoplasmic aldehyde dehydrogenase, involved in beta-alanine synthesis | 5.627 |
| HSP26 | Small heat shock protein (sHSP) with chaperone activity | 5.276 |
| YOR072W-B | unknown | 5.067 |
| YLR040C | unknown | 5.037 |
| HXT6 /// HXT7 | High-affinity glucose transporter of the major facilitator superfamily | 4.970 |
| YBR230W-A | unknown | 4.805 |
| YDR042C | unknown | 4.659 |
| DDR2 | Multistress response protein | 4.600 |
| YLR312C | unknown | 4.595 |
| FMP45 | Integral membrane protein localized to mitochondria | 4.593 |
| SSA3 | ATPase involved in protein folding and the response to stress | 4.566 |
| RTN2 | Protein of unknown function; has similarity to mammalian reticulon proteins | 4.470 |
| YLL066W-B | unknown | 4.421 |
| GUT2 | Mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase | 4.289 |
| ARG1 | Arginosuccinate synthetase | 4.259 |

| Gen | Descripción | Factor de cambio |
|-----------|--|------------------|
| YNL194C | unknown | 4.249 |
| PTR2 | Integral membrane peptide transporter | 4.224 |
| PET10 | Protein of unknown function that co-purifies with lipid particles | 4.197 |
| YMR118C | unknown | 4.068 |
| CYT1 | Cytochrome c1, component of the mitochondrial respiratory chain | 4.054 |
| MEF2 | Mitochondrial elongation factor involved in translational elongation | 3.988 |
| PUT1 | Proline oxidase, nuclear-encoded mitochondrial protein | 3.985 |
| ADH2 | Glucose-repressible alcohol dehydrogenase II | 3.945 |
| PGU1 | Endo-polygalacturonase | 3.930 |
| THI7 | Plasma membrane transporter responsible for the uptake of thiamine | 3.920 |
| NCE103 | Carbonic anhydrase | 3.873 |
| GRE1 | Hydrophilin of unknown function | 3.841 |
| YOL038C-A | unknown | 3.740 |
| ARO9 | Aromatic aminotransferase II | 3.670 |
| YLR466C-B | unknown | 3.668 |
| QCR10 | Subunit of the ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase complex | 3.631 |
| HOS2 | Histone deacetylase required for gene activation | 3.629 |

Tabla 6.2. Genes cuya expresión se ve incrementada en la cepa mutante *Artp1*. Se muestran los 50 genes que presentan un mayor incremento en su nivel de expresión en la cepa mutante *Artp1* comparado con la expresión de estos genes en la cepa silvestre. El factor de cambio (o *fold change*) que se muestra es el promedio de tres experimentos independientes. Se muestran en naranja los genes que también se encuentran sobre-expresados en la cepa *Δiwr1*.

| Gen | Descripción | Factor de cambio |
|----------------|--|-------------------------|
| YNL217W | unknown | -3.241 |
| TPO4 | Polyamine transport protein, recognizes spermine, putrescine, and spermidine | -3.308 |
| YBL029W | unknown | -3.373 |
| YPR172W | unknown | -3.376 |
| GPD1 | NAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase, key enzyme of glycerol synthesis | -3.393 |
| TIR3 | Cell wall mannoprotein of the Srp1p/Tip1p family of serine-alanine-rich proteins | -3.417 |
| MET22 | Bisphosphate-3'-nucleotidase, involved in salt tolerance and methionine biogenesis | -3.476 |
| URA4 | Dihydroorotase, catalyzes the third enzymatic step in the de novo biosynthesis of pyrimines | -3.490 |
| CIS1 | Autophagy-specific protein required for autophagosome formation | -3.593 |
| RHR2 | Constitutively expressed isoform of D L-glycerol-3-phosphatase | -3.683 |
| ATF2 | Alcohol acetyltransferase, may play a role in steroid detoxification | -3.707 |
| STE3 | Receptor for a factor pheromone, couples to MAP kinase cascade to mediate pheromone response | -3.735 |
| PRM9 | Pheromone-regulated protein with 3 predicted transmembrane segments and an FF sequence | -3.750 |
| YMR230W-A | unknown | -3.777 |
| PAU1 /// PAU14 | Member of the seripauperin multigene family encoded mainly in subtelomeric regions | -3.905 |
| AAC3 | Mitochondrial inner membrane ADP/ATP translocator | -3.941 |
| ATX1 | Cytosolic copper metallochaperone | -3.996 |
| AAH1 | Adenine deaminase (adenine aminohydrolase), converts adenine to hypoxanthine | -4.001 |
| SOR1 /// SOR2 | Sorbitol dehydrogenase; expression is induced in the presence of sorbitol or xylose | -4.081 |
| HOT13 | Zinc-binding mitochondrial intermembrane space (IMS) | -4.105 |
| DCG1 | Protein of unknown function, expression is sensitive to nitrogen catabolite repression | -4.247 |

| Gen | Descripción | Factor de cambio |
|----------------|--|-------------------------|
| REV7 | Accessory subunit of DNA polymerase zeta | -4.266 |
| TDH1 | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, involved in glycolysis and gluconeogenesis | -4.344 |
| URA1 | Dihydroorotate dehydrogenase, catalyzes the fourth enzymatic step in the de novo biosynthesis | -4.369 |
| ADH5 | Alcohol dehydrogenase isoenzyme V; involved in ethanol production | -4.545 |
| PNS1 | Protein of unknown function; has similarity to Torpedo californica tCTL1p | -4.621 |
| TNA1 | High affinity nicotinic acid plasma membrane permease | -4.792 |
| NRT1 | High-affinity nicotinamide riboside transporter | -4.930 |
| YDL241W | unknown | -5.008 |
| RKI1 | Ribose-5-phosphate ketol-isomerase | -5.477 |
| IZH4 | Membrane protein involved in zinc ion homeostasis | -5.544 |
| ANB1 | Translation elongation factor eIF-5A | -5.588 |
| FMP48 | Putative protein of unknown function | -5.600 |
| BNA4 | Kynurenine 3-mono oxygenase, required for the de novo biosynthesis of NAD from tryptophan | -5.697 |
| BNA1 | 3-hydroxyanthranilic acid dioxygenase, required for the de novo biosynthesis of NAD | -6.021 |
| CHA1 | Catabolic L-serine (L-threonine) deaminase, catalyzes the degradation of both L-serine and threonine | -6.072 |
| FDC1 | Putative phenylacrylic acid decarboxylase | -6.255 |
| TIR1 | Cell wall mannoprotein of the Srp1p/Tip1p family of serine-alanine-rich proteins | -6.264 |
| BNA7 | Formylkynurenine formamidase, involved in the de novo biosynthesis of NAD from tryptophan | -6.577 |
| PAU18 /// PAU6 | Protein of unknown function | -7.300 |
| YOL014W | unknown | -7.358 |
| YRO2 | Protein of unknown function with similarity to archaeal rhodopsins | -7.421 |

| Gen | Descripción | Factor de cambio |
|--------------------|--|------------------|
| FRE4 | Ferric reductase | -8.709 |
| HXT1 | Low-affinity glucose transporter of the major facilitator superfamily | -8.744 |
| IWR1 | RNA polymerase II transport factor, conserved from yeast to humans | -9.616 |
| PHM6 | Protein of unknown function, expression is regulated by phosphate levels | -9.780 |
| FET4 | Low-affinity Fe(II) transporter of the plasma membrane | -10.500 |
| BNA5 | Kynureninase, required for the de novo biosynthesis of NAD from tryptophan | -13.766 |
| PHO5 | Repressible acid phosphatase (1 of 3) | -19.592 |
| PHO11 /// PHO12 | One of three repressible acid phosphatases | -46.981 |

Tabla 6.3. Genes cuya expresión se ve disminuida en la cepa mutante $\Delta iwr1$. Se muestran los 50 genes que presentan una mayor disminución en su nivel de expresión en la cepa mutante $\Delta iwr1$ comparado con la expresión de estos genes en la cepa silvestre. El factor de cambio (o *fold change*) que se muestra es el promedio de tres experimentos independientes. Se muestran en verde los genes que también presentan niveles reducidos de expresión en la cepa $\Delta rtp1$.

| Gen | Descripción | Factor de cambio |
|---------|---|------------------|
| YKR075C | unknown | -5.675 |
| YBL101W | unknown | -5.678 |
| GRE2 | 3-methylbutanal reductase and NADPH-dependent methylglyoxal reductase | -5.703 |
| SPO1 | Meiosis-specific prospore protein; required for meiotic spindle pole body duplication | -5.743 |
| MIG2 | Protein containing zinc fingers, involved in repression, along with Mig1p, of SUC2 | -5.751 |
| BAG7 | Rho GTPase activating protein (RhoGAP), stimulates the intrinsic GTPase activity | -5.765 |
| GTO3 | Omega class glutathione transferase; putative cytosolic localization | -5.823 |
| SPL2 | Protein with similarity to cyclin-dependent kinase inhibitors | -5.845 |

| Gen | Descripción | Factor de cambio |
|------------|---|-------------------------|
| FET4 | Low-affinity Fe(II) transporter of the plasma membrane | -6.085 |
| FRE4 | Ferric reductase | -6.180 |
| YIL014C-A | unknown | -6.276 |
| YER067W | unknown | -6.292 |
| YER187W | unknown | -6.478 |
| CWP1 | Cell wall mannoprotein | -6.560 |
| HES1 | Protein implicated in the regulation of ergosterol biosynthesis | -6.563 |
| YMR291W | unknown | -6.686 |
| PRM7 | Pheromone-regulated protein, predicted to have one transmembrane segment | -6.929 |
| YDL038C | unknown | -7.461 |
| YHL044W | unknown | -7.573 |
| YIR042C | unknown | -7.628 |
| BNA7 | Formylkynurenine formamidase, involved in the de novo biosynthesis of NAD | -7.756 |
| YGR035C | unknown | -7.858 |
| TDH1 | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, isozyme 1 | -7.950 |
| BDH2 | Putative medium-chain alcohol dehydrogenase with similarity to BDH1 | -8.348 |
| ARN2 | Transporter, member of the ARN family of transporters | -8.654 |
| CIS1 | Autophagy-specific protein required for autophagosome formation | -8.664 |
| PHO5 | Repressible acid phosphatase (1 of 3) | -9.786 |
| YDL241W | unknown | -9.794 |
| AAC3 | Mitochondrial inner membrane ADP/ATP translocator | -9.985 |
| CHA1 | Catabolic L-serine (L-threonine) deaminase | -10.301 |
| STE6 | Plasma membrane ATP-binding cassette (ABC) transporter | -10.969 |

| Gen | Descripción | Factor de cambio |
|-----------------|---|------------------|
| DAN1 | Cell wall mannoprotein with similarity to Tir1p, Tir2p, Tir3p, and Tir4p | -12.577 |
| YOL014W | unknown | -12.592 |
| FMP23 | Putative protein of unknown function | -12.918 |
| IMD2 | Inosine monophosphate dehydrogenase, catalyzes the first step of GMP biosynthesis | -13.173 |
| TIR3 | Cell wall mannoprotein of the Srp1p/Tip1p family of serine-alanine-rich proteins | -13.541 |
| IMD1 /// IMD2 | Nonfunctional protein with homology to IMP dehydrogenase | -13.571 |
| AGA2 | Adhesion subunit of a-agglutinin of a-cells | -15.313 |
| ADH5 | Alcohol dehydrogenase isoenzyme V; involved in ethanol production | -15.524 |
| PHM6 | Protein of unknown function, expression is regulated by phosphate levels | -17.787 |
| PHO11 /// PHO12 | One of three repressible acid phosphatases | -23.595 |
| HXT1 | Low-affinity glucose transporter of the major facilitator superfamily | -24.317 |
| RSB1 | Suppressor of sphingoid long chain base (LCB) sensitivity | -25.608 |
| ANB1 | Translation elongation factor eIF-5A | -27.214 |
| BAR1 | Aspartyl protease secreted into the periplasmic space of mating type a cells | -27.363 |
| TIR1 | Cell wall mannoprotein of the Srp1p/Tip1p family of serine-alanine-rich proteins | -27.656 |
| STE2 | Receptor for alpha-factor pheromone; seven transmembrane-domain GPCR that intera | -34.049 |
| YMR158W | unknown | -35.558 |
| YLR346C | unknown | -40.356 |
| FIT1 | Mannoprotein that is incorporated into the cell wall via a glycosylphosphatidyli | -44.824 |

Tabla 6.4. Genes cuya expresión se ve disminuida en la cepa mutante *Artp1*. Se muestran los 50 genes que presentan una mayor disminución en su nivel de expresión en la cepa mutante *Artp1* comparado con la expresión de estos genes en la cepa silvestre. El factor de cambio (o *fold change*) que se muestra es el promedio de tres experimentos independientes. Se muestran en verde los genes que también presentan niveles reducidos de expresión en la cepa *Diwr1*.

Extendiendo el análisis de solapamiento a todos los genes que presentan una variación superior a 2 en los niveles de expresión de los mutantes respecto a la cepa silvestres, se obtuvieron los diagramas de Venn que se muestran en la Figura 6.2. La significancia estadística del solapamiento entre los dos grupos de genes se puede determinar gracias al “*p-value*”. Obtenemos un “*p-value*” de $2,4 \cdot 10^{-110}$ cuando consideramos el solapamiento de todos los genes que presentan un factor de cambio superior a 2 en los mutantes respecto a la cepa silvestre. El solapamiento de los genes que tienen una sobre-expresión mayor a 2 veces presenta un “*p-value*” de $7,4 \cdot 10^{-70}$ y el del solapamiento de los genes que se encuentran infra-expresados más de 2 veces es de $8,7 \cdot 10^{-97}$.

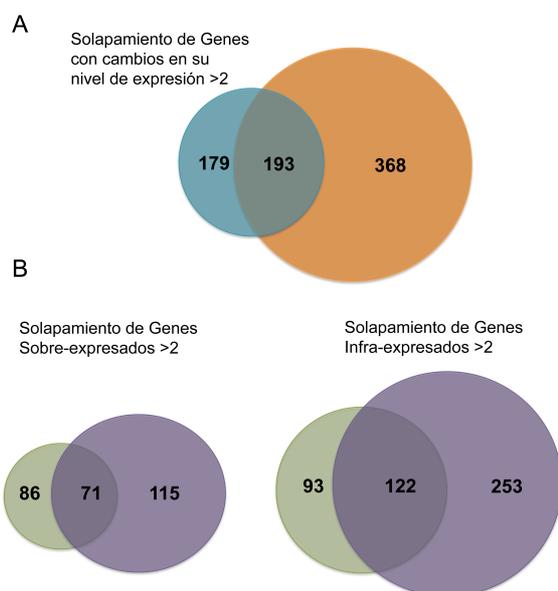


Figura 6.2. Diagramas de Venn que ilustran el solapamiento entre los efectos transcripcionales debidos a la delección de *IWR1* y de *RTPI*. (A) Se representan en un círculo azul los genes que presentan un cambio superior a 2 en los niveles de expresión en el mutante $\Delta iwr1$ y en naranja en el mutante $\Delta rtp1$. **(B)** Se representan en círculos en verde los genes que presentan un cambio superior a 2 en los niveles de expresión en el mutante $\Delta iwr1$ y en morado en el mutante $\Delta rtp1$.

Agrupación en categorías funcionales de los genes obtenidos en los análisis transcriptómicos de los mutantes *Δiwr1* y *Δrtp1*

Los estudios transcriptómicos descritos a lo largo de éste apartado sugieren que la delección de los genes *IWR1* y *RTP1* comparten alteraciones similares en un importante número de transcritos. Para analizar los efectos transcriptómicos de una forma sistemática, se analizó la distribución en categorías funcionales (obtenidas mediante la herramienta “*Function Associate*”) de los genes cuyos niveles de expresión se ven alterados en los mutantes *Δiwr1* y *Δrtp1*. A pesar de que la clasificación en procesos biológicos generales llevado a cabo por Czeko y col. (2011) no muestra diferencias significativas entre los genes diferencialmente expresados en el mutante *Δiwr1* y el conjunto del genoma, cuando consideramos categorías funcionales más específicas se observan distintos grupos funcionales que aparecen diferencialmente representadas en el conjunto de genes cuyos niveles de expresión están alterados en las cepas mutantes (Czeko et al., 2011; Peiró-Chova y Estruch, 2009). La Tabla 6.5 muestra las categorías significativas (con “*p-values*” entre $12,6 \cdot 10^{-14}$ y $1,4 \cdot 10^{-10}$) obtenidas al analizar los genes sobre-expresados en el mutante *Δiwr1*, todas ellas relacionadas con la respiración celular y el metabolismo de aminoácidos. En el caso de los genes cuyos niveles se ven disminuidos en el mutante *Δiwr1* (Tabla 6.6) las categorías funcionales más significativas están relacionadas con procesos biosintéticos de bases nitrogenadas, con el transporte de metales y la pared celular. También se realizó este mismo estudio de categorías funcionales con los genes cuyos niveles de expresión varían en el mutante *Δrtp1*. En el caso de los genes cuya expresión aumenta en el mutante *Δrtp1* (Tabla 6.7) al igual que ocurre en el mutante *Δiwr1* las categorías funcionales más representadas están relacionadas con la respiración celular. También aparecen como categorías significativas las relacionadas con el metabolismo de aminoácidos así como las implicadas en

procesos morfogénéticos. Por último, realizamos la clasificación funcional de los genes cuyos niveles se ven reducidos en el mutante *Artp1* (Tabla 6.8). Al igual que ocurre en el mutante *Δiwr1*, encontramos genes cuyos productos están implicados en el metabolismo y el transporte del hierro, procesos metabólicos del NAD, y de pared celular.

| N | X | p-value | Categoría | Genes |
|----------|----------|----------------|---|--|
| 9 | 10 | 2.55E-14 | mitochondrial respiratory chain complex III | <i>QCR2, RIP1, CYT1, QCR9, QCR10, COR1, QCR7, QCR8, QCR6</i> |
| 13 | 17 | 1.58E-18 | ATP synthesis coupled proton transport | <i>ATP3, ATP17, ATP5, ATP14, ATP7, ATP16, ATP2, ATP19, ATP4, ATP18, ATP15, ATP20, ATP1</i> |
| 4 | 6 | 5.07E-06 | succinate dehydrogenase complex | <i>SDH1, SDH2, SDH4, SDH3</i> |
| 8 | 14 | 2.95E-10 | cytochrome-c oxidase activity | <i>COX7, COX4, COX13, COX6, COX8, COX5α, COX12, COX9</i> |
| 22 | 63 | 1.94E-20 | electron transport chain | <i>QCR2, RIP1, CYT1, QCR9, QCR10, COR1, SDH1, QCR7, SDH2, COX7, COX4, COX6, QCR8, CYC1, SDH4, COX8, QCR6, SDH3, COX5α, YGR207C, COX9, NDI1</i> |
| 6 | 17 | 1.98E-06 | arginine metabolic process | <i>ARG1, ARG3, CPA2, DUR1,2, ARG5,6, CAR2</i> |

| N | X | p-value | Categoría | Genes |
|----------|----------|----------------|-----------------------------|--|
| 16 | 70 | 6.47E-12 | cellular respiration | <i>PET10, QCR2, RIP1, QCR9, QCR10, COR1, SDH1, QCR7, SDH2, COX4, COX13, QCR8, SDH4, PET9, QCR6, SDH3</i> |
| 12 | 61 | 1.96E-08 | aerobic respiration | <i>PET10, QCR2, RIP1, QCR9, QCR10, COR1, QCR7, COX4, COX13, QCR8, PET9, QCR6</i> |
| 34 | 408 | 1.39E-10 | oxidation-reduction process | <i>SER3, PET10, QCR2, RIP1, GLC3, CYT1, QCR9, PUT1, QCR10, COR1, GUT2, SDH1, QCR7, SDH2, ALD4, LYS1, COX7, COX4, COX13, PYC1, COX6, QCR8, CYC1, SDH4, ARG5,6, COX8, REG1, PET9, QCR6, SDH3, COX5α, YGR207C, COX9, NDI1</i> |

Tabla 6.5. Distribución en categorías funcionales de aquellos genes con niveles de expresión superiores en el mutante *$\Delta iwr1$* respecto a la cepa silvestre, con un factor de cambio superior a 2. La clasificación se realizó utilizando la herramienta “Function Associate” (<http://llama.mshri.on.ca/funcassociate/>). N representa en número de genes de cada categoría que aparece en nuestro experimento y X es el número total de genes de esa categoría

| N | X | p-value | Categoría | Genes |
|----|-----|----------|---|--|
| 5 | 8 | 2.72E-06 | purine nucleoside biosynthetic process | <i>SAM1, HPT1, APT1, SAM2, ERC1</i> |
| 5 | 10 | 1.15E-05 | pyridoxine biosynthetic process | <i>SNO2, SNO3, SNZ2, SNZ3, RK11</i> |
| 6 | 13 | 2.55E-06 | NAD biosynthetic process | <i>BNA6, NMA1, BNA4, BNA1, BNA7, BNA5</i> |
| 8 | 26 | 1.95E-06 | NAD metabolic process | <i>BNA6, NMA1, GPD1, ADH5, BNA4, BNA1, BNA7, BNA5</i> |
| 15 | 77 | 5.34E-08 | oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor | <i>IMD3, GRE2, TSC10, ILV5, MDH2, YGL039W, ERG26, YDR541C, YPR127W, LEU2, MAE1, GPD1, SOR1, SOR2, ADH5</i> |
| 12 | 80 | 2.05E-05 | metal ion transport | <i>FIT1, COX19, CTR3, QDR2, ARN2, ZRT2, ENB1, CTR1, ZRT1, ATX1, FRE4, FET4</i> |
| 14 | 104 | 1.50E-05 | cell wall | <i>KNH1, FIT1, EGT2, SUN4, CRR1, PRY3, DSE2, YLR040C, SPI1, CWP1, TIR3, TDH1, TIR1, PHO5</i> |

Tabla 6.6. Distribución en categorías funcionales de aquellos genes con niveles de expresión inferiores en el mutante *Δiwr1* respecto a la cepa silvestre, con un factor de cambio superior a 2. La clasificación se realizó utilizando la herramienta “Function Associate” (<http://llama.mshri.on.ca/funcassociate/>).

N representa en número de genes de cada categoría que aparece en nuestro experimento; y X es el número total de genes de esa categoría.

| N | X | p-value | Categoría | Genes |
|----------|----------|----------------|---|--|
| 3 | 3 | 3.91E-05 | 1,3-beta-D-glucan synthase activity | <i>GSC2, FKS1, FKS3</i> |
| 8 | 10 | 6.83E-11 | mitochondrial respiratory chain complex III | <i>CYT1, QCR10, QCR2, QCR7, QCR9, COR1, RIP1, QCR6</i> |
| 4 | 5 | 6.40E-06 | oxidoreductase activity, acting on diphenols and related substances as donors, cytochrome as acceptor | <i>QCR7, QCR9, RIP1, QCR6</i> |
| 8 | 11 | 2.43E-10 | mitochondrial electron transport, ubiquinol to cytochrome c | <i>CYT1, QCR10, QCR2, CYC1, QCR7, QCR9, RIP1, QCR6</i> |
| 4 | 6 | 1.87E-05 | succinate dehydrogenase complex | <i>YMR118C, SDH1, SDH2, SDH3</i> |
| 14 | 31 | 3.00E-13 | respiratory electron transport chain | <i>CYT1, QCR10, QCR2, CYC1, QCR7, QCR9, SDH1, COX4, COX7, RIP1, SDH2, COX6, QCR6, SDH3</i> |
| 6 | 16 | 8.82E-06 | regulation of cell shape | <i>GIC2, SPH1, GSC2, FKS1, FKS3, HBT1</i> |
| 6 | 20 | 3.81E-05 | regulation of cell morphogenesis | <i>GIC2, SPH1, GSC2, FKS1, FKS3, HBT1</i> |
| 18 | 63 | 1.28E-12 | electron transport chain | <i>YMR118C, CYT1, QCR10, QCR2, CYC1, QCR7, QCR9, SDH1, COX4, COR1, COX7, RIP1, SDH2, MET10, COX6, QCR6, FRE7, SDH3</i> |
| 13 | 70 | 4.99E-07 | cellular respiration | <i>PET10, QCR10, QCR9, QCR7, QCR2, SDH1, COX4, COR1, COX13, RIP1, SDH2, QCR6, SDH3</i> |

Estudios transcriptómicos y proteómicos

| N | X | p-value | Categoría | Genes |
|----------|----------|----------------|---|--|
| 10 | 61 | 3.39E-05 | anchored to membrane | <i>SAG1, GAS2, FLO1, YLR042C, YLR040C, PLB3, MUC1, TIP1, FLO1, FLO5, FLO9</i> |
| 16 | 111 | 8.83E-07 | energy derivation by oxidation of organic compounds | <i>PET10, ADH2, QCR10, QCR2, GPH1, QCR7, QCR9, SDH1, COX4, COR1, GDB1, COX13, RIP1, SDH2, QCR6, SDH3</i> |
| 13 | 95 | 1.72E-05 | extracellular region | <i>SAG1, FLO1, YLR042C, YLR040C, PGU1, PLB3, MUC1, SPR1, PIR3, CTS2, TIP1, FLO1, FLO5, FLO9</i> |
| 14 | 104 | 9.87E-06 | cell wall | <i>SAG1, SSP2, FLO1, YLR042C, YLR040C, MUC1, SPR1, PIR3, TIP1, ZPS1, FLO5, FLO9, FIG1, ATH1</i> |
| 14 | 104 | 9.87E-06 | external encapsulating structure | <i>SAG1, SSP2, FLO1, YLR042C, YLR040C, MUC1, SPR1, PIR3, TIP1, ZPS1, FLO5, FLO9, FIG1, ATH1</i> |
| 19 | 143 | 2.99E-07 | mitochondrial membrane part | <i>GUT2, CYT1, QCR10, QCR2, QCR7, QCR9, SDH1, COX4, COR1, COX7, COX13, RIP1, ATP3, SDH2, MIM1, UPS2, COX6, QCR6, SDH3</i> |
| 24 | 184 | 1.08E-08 | generation of precursor metabolites and energy | <i>PET10, YMR118C, CYT1, ADH2, QCR10, QCR2, CYC1, GPH1, QCR7, QCR9, SDH1, COX4, COR1, GBD1, COX7, COX13, RIP1, SDH2, MET10, COX6, QCR6, FRE7, SDH3, HXK1</i> |

| N | X | p-value | Categoría | Genes |
|----|-----|----------|------------------------------------|--|
| 29 | 318 | 9.15E-07 | transmembrane transporter activity | GAP1, HXT6, HXT7, THI7, ESBP6, SUL1, FLR1, QCR7, PUT4, QCR9, DUR3, COX4, ALP1, COX7, COX13, RIP1, ADY2, JEN1, AQY2, ATP3, MALL11, TOK1, SAM3, CRC1, HKT5, YKR194W, COX6, YFL054C, QCR6 |

Tabla 6.7. Distribución en categorías funcionales de aquellos genes con niveles de expresión superiores en el mutante *Artp1* respecto a la cepa silvestre, con un factor de cambio superior a 2. La clasificación se realizó utilizando la herramienta “Function Associate” (<http://llama.mshri.on.ca/funcassociate/>).

N representa en número de genes de cada categoría que aparece en nuestro experimento y X es el número total de genes de esa categoría

| N | X | p-value | Categoría | Genes |
|---|----|----------|---|--|
| 6 | 13 | 4.11E-05 | ceramide metabolic process | YDC1, YPC1, IPT1, LAC1, SCS7, SUR1 |
| 8 | 23 | 2.45E-05 | iron ion transport | FTH1, FIT2, FIT3, ENB1, FET4, FRE4, ARN2, FIT1 |
| 9 | 27 | 1.12E-05 | transition metal ion transmembrane transporter activity | PHO84, CTR1, FTH1, CCC2, ZRT1, ATX2, ENB1, FET4, ARN2 |
| 9 | 29 | 2.15E-05 | intrinsic to plasma membrane | PHO84, TNA1, YPS3, ZRT1, QDR2, YLR194C, PNS1, FET4, STE2 |

| N | X | p-value | Categoría | Genes |
|----------|----------|----------------|---|--|
| 8 | 26 | 6.70E-05 | NAD metabolic process | <i>GPD2, NMA1, BNA4, BNA1, BNA5, GPD1, BNA7, ADH5</i> |
| 14 | 49 | 3.40E-07 | iron ion homeostasis | <i>FTH1, CCC2, FIT2, FIT3, ATX1, GGC1, YLR126C, ENB1, TIS11, GMC1, FET4, FRE4, ARN2, FIT1</i> |
| 17 | 61 | 2.77E-08 | anchored to membrane | <i>FLO9, FIT2, YPS1, YPS3, FIT3, YLR194C, SPI1, EGT2, UTR2, TIR4, DSE2, PRY3, CWP1, DAN1, TIR3, TIR1, FIT1</i> |
| 13 | 48 | 1.77E-06 | transition metal ion transport | <i>PHO84, CTR1, FTH1, CCC2, FIT2, FIT3, ATX1, ZRT1, ENB1, FET4, FRE4, ARN2, FIT1</i> |
| 11 | 46 | 4.03E-05 | hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds | <i>YDC1, CRR1, YPC1, SKN1, YIR007W, SUN4, IMA4, SCW11, EGT2, UTR2, DES2</i> |
| 18 | 77 | 2.08E-07 | oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor | <i>GPD2, BDH1, IMD3, IMD2, IDH1, ILV5, ADH7, ERG26, YPL088W, XYL2, SOR1, SOR2, ARI1, YGL039W, GPD1, GRE2, BDH2, ADH5</i> |
| 24 | 104 | 2.45E-09 | cell wall | <i>YJL160C, FLO9, FIT2, CRR1, YPS1, FIT3, SUN4, SCW11, YLR194C, SPI1, EGT2, UTR2, KNH1, TIR4, DSE2, PRY3, CWP1, TDH1, PHO5, DAN1, TIR3, AGA2, TIR1, FIT1</i> |

Tabla 6.8. Distribución en categorías funcionales de aquellos genes con niveles de expresión superiores en el mutante *Δrtp1* respecto a la cepa silvestre, con un factor de cambio superior a 2. La clasificación se realizó utilizando la herramienta “Function Associate” (<http://llama.mshri.on.ca/funcassociate/>).

N representa en número de genes de cada categoría que aparece en nuestro experimento y **X** es el número total de genes de esa categoría.

6.2. Discusión

Nuestro trabajo y el de otros autores han implicado a las proteínas codificadas por los genes *IWR1* y *RTP1* en el ensamblaje y/o transporte al núcleo de la RNA pol II. Tanto los mutantes $\Delta iwr1$ como $\Delta rtp1$ muestran defectos en la localización subcelular de las diferentes subunidades de la RNA pol II sin que exista alteración (salvo en el caso de Rpb1p) de las cantidades de dichas subunidades en la célula. Así pues, es lógico pensar que en ambos mutantes se produce una reducción en los niveles nucleares de la RNA pol II. Por ello, nos pareció interesante analizar, a través del estudio de sus transcriptomas si existían genes que resultaran diferencialmente afectados por una reducción en la cantidad de la RNA pol II.

Una reducción en los niveles de RNA pol II (y de otras muchas proteínas) podría también ocurrir en condiciones nutricionalmente desfavorables que acompañan frecuentemente a las levaduras en su entorno natural. En estas condiciones la célula debe adaptar su metabolismo para aumentar su capacidad de supervivencia. El análisis de los 50 transcritos cuyas cantidades se encuentran más incrementadas (Tablas 6.2 y 6.4) revela una serie de genes comunes cuya función está relacionada con la supervivencia y la utilización de nutrientes. Así encontramos los genes de respuesta a estrés (*HSP12*, *HSP26* y *DDR2*) y genes relacionados con la utilización de fuentes de carbono y respiración (*INH1*, *HXT6/HXT7*, *NCE103*, *PET10*, *CYT1*, *ADR1*, *QCR10*, *GUT2* y *NCA3*). Resulta sugerente que en los mutantes $\Delta iwr1$ y $\Delta rtp1$ esté sobre-expresado el transportador de glucosa de alta afinidad *HXT6/HXT7* (9,7 y 5 veces respectivamente) mientras que está reprimido el transportador de baja afinidad *HXT1* (-9,6 y -24,3 veces respectivamente). Encontramos también genes implicados en la utilización de fuentes de nitrógeno como *SER3*, *ARG1*, *GAP1*, *PTR2*, *ARG3*, *PUT1* y *ARO9*. Como se ha mencionado, al considerar la totalidad de

transcritos sobre-representados en ambos mutantes las categorías funcionales más significativas son las relacionadas con la respiración (Tablas 6.6 y 6.7)

Así pues, la reducción en los niveles de RNA pol II da lugar a la expresión preferente de una serie de genes que facilitan el transporte y utilización de fuentes de carbono y nitrógeno, así como la activación de las funciones de protección frente al estrés. Estas funciones podrían contribuir a la supervivencia celular en condiciones desfavorables.

En cuanto a los genes reprimidos en ambos mutantes merece destacar a los que codifican enzimas y transportadores implicados en la biosíntesis de NAD. En relación a este punto hay que resaltar que la mutación en diferentes genes de la ruta biosintética de NAD da lugar a un incremento de la longevidad de la levadura en cultivos estacionarios (lo que se conoce en inglés como “*chronological life span*”) (Anderson et al., 2002; Matecic et al., 2010), por lo que la represión observada en los genes biosintéticos de la familia BNA y en los transportadores *TNA1* y *NRT1* podrían contribuir a la supervivencia de la levadura.

En resumen, los patrones de expresión génica de los mutantes *Δiwr1* y *Δrtp1* sugieren que el nivel de RNA pol II en el núcleo podría actuar a modo de sensor, redireccionando la transcripción para permitir a la célula responder a los cambios externos. La existencia de mecanismos moleculares específicos que permiten la expresión y represión preferente de determinados genes en condiciones que reducen la cantidad de RNA pol II en el núcleo es una posibilidad sugerente que merece ser investigada.

Estudios proteómicos para la identificación de nuevos factores implicados en la biogénesis de la RNA pol II

De acuerdo a nuestras observaciones, la depleción de cualquier subunidad de la RNA pol II provoca la acumulación citoplasmática de las subunidades grandes de la RNA pol II y, en menor medida, de las subunidades pequeñas (Figura 4.8). Interpretamos estos resultados como la consecuencia de un ensamblaje citoplasmático deficiente del holoenzima, que impediría la unión de Iwr1p y la entrada de la RNA pol II al núcleo (ver apartado 4). Por tanto, las deficiencias en el ensamblaje causadas por la depleción de una de las subunidades nos permite disponer de un procedimiento relativamente sencillo para incrementar la concentración de los complejos intermediarios que aparecen durante el ensamblaje, e identificar así aquellas proteínas que, sin estar presentes en el holoenzima maduro, podrían tener una función durante el ensamblaje del mismo.

6.3. Resultados

Purificación de distintas subunidades de la RNA pol II en condiciones que dificultan el ensamblaje del holoenzima

Con el objetivo de identificar factores que participan en ensamblaje de la RNA pol II se construyeron cepas de levadura en las que una de las subunidades mayores (Rpb1p o Rpb2p) se fusionó en su extremo C-terminal con la etiqueta TAP, a la vez que otra de las subunidades se colocó bajo el control del promotor P_{tetO} . En estas cepas se realizó la purificación de los complejos en los que participa la subunidad etiquetada con TAP en condiciones normales y en condiciones en las que, por la adición de doxiciclina, se provocó la depleción de una de las subunidades de la RNA pol II interfiriendo en el ensamblaje de la misma. Las cepas construidas fueron:

RPB1-TAP, P_{tetO}-RPB2

RPB1-TAP, P_{tetO}-RPB3

RPB2-TAP, P_{tetO}-RPB1

RPB2-TAP, P_{tetO}-RPB3

Los eluidos de la columna de calmodulina obtenidos a partir de células tratadas y sin tratar con doxiciclina fueron analizados por tecnología multidimensional de identificación de proteínas (MudPIT). El resultado obtenido en el análisis se muestra en las Tablas A.D.VII del Anexo digital.

Se calcularon la relaciones de la fracción que cada una de las proteínas representa respecto al total en presencia y en ausencia de doxiciclina. Las proteínas que aparecen preferentemente cuando el ensamblaje se produce normalmente (ausencia de doxiciclina; condiciones permisivas) se presentan en la Tabla 6.9. Las proteínas que aparecen preferentemente en los complejos obtenidos en condiciones de ensamblaje

deficiente (en presencia de doxiciclina; condiciones no permisivas) se muestran en la Tabla 6.10. En ambos casos se han agrupado las proteínas en diferentes categorías funcionales que se indican con distintos colores.

6.4. Discusión

Con el objetivo de identificar factores que interaccionan de forma transitoria con la RNA pol II y que podrían actuar como factores de ensamblaje durante la biogénesis de la misma, se realizaron distintas purificaciones de la RNA pol II, en condiciones normales (permisivas) y en condiciones en las que comprometimos dicho proceso mediante la depleción de una de las subunidades del holoenzima (no permisivas). Nuestro razonamiento es que la depleción provoca una acumulación de intermediarios de ensamblaje en el citoplasma y que en los complejos purificados en estas condiciones, los posibles factores de ensamblaje estaría diferencialmente sobre-representados. Nuestros análisis se han centrado en las subunidades grandes de la RNA pol II cuya localización se ve especialmente afectada por la depleción de cualquiera de las subunidades (Figura 4.8).

Los resultados obtenidos en las purificaciones control (Tabla 6.9), como era esperable, muestran una sobre-representación de todas las subunidades de la RNA pol II. También aparecen en una alta proporción los componentes del factor transcripcional general TFIIF (Tfg1p, Tfg2p y Taf14p (Tfg3p)). Este factor se une a la polimerasa antes de su unión al DNA (Henry et al., 1992). Nuestros resultados indican que esta unión se produce sobre la RNA pol II ensamblada. Encontramos también entre las proteínas más abundantes a Spt4p y Spt5p. Estas proteínas forman un complejo que desempeña diferentes funciones relacionadas con la RNA pol II (Hartzog et al., 1998). La proteína Iwr1p sólo se ha detectado en las purificaciones de la polimerasa obtenidas en condiciones silvestres (Tabla

6.9), lo que está de acuerdo con su entrada en el complejo de la RNA pol II tras el ensamblaje de la misma (Czeko et al., 2011). Por último cabe mencionar la presencia de las proteínas Rvb1p y Rvb2p, componentes del complejo R2TP. Estas proteínas se han relacionado con el ensamblaje de la RNA pol II (Boulon et al., 2010; Forget et al., 2010; Gómez Navarro et al., 2013). Su presencia preferente en las purificaciones obtenidas en condiciones permisivas, sugiere que estas proteínas están presentes en la polimerasa ensamblada, como también sugieren otros resultados que se discuten en el apartado 3.2.

Las proteínas sobre-representadas en condiciones restrictivas para el ensamblaje se muestran en la Tabla 6.10. Aunque su participación en la biogénesis de la RNA pol II requerirá posteriores estudios, encontramos una serie de proteínas cuya identidad permite, aunque sea a nivel especulativo, establecer interesantes conexiones entre las mismas y el proceso de ensamblaje.

Así encontramos sobre-representadas una serie de chaperonas que podrían actuar como tales, específicamente en el proceso de ensamblaje. Las proteínas que aparecen en primer lugar son Ssz1p y Zuo1p. Estas proteínas forman parte del RAC (ribosome-associated complex) junto con Ssb1p o Ssb2p, que se une al ribosoma y a la cadena polipeptídica naciente (Gautschi et al., 2002; Rakwalska y Rospert, 2004). Su abundancia en las purificaciones de Rpb1p y Rpb2p obtenidas en condiciones no permisivas podría ser indicativa de su participación en el proceso de ensamblaje de la RNA pol II. De forma análoga encontramos un enriquecimiento en componentes de complejo T, una chaperona que participa en el plegamiento y ensamblaje de diferentes proteínas en el citosol (Gutsche et al., 1999). Dentro de esta categoría, podríamos incluir a Spt16p, componente de la chaperona de histonas FACT (Formosa et al., 2001).

Cabe destacar la presencia, entre las proteínas sobre-expresadas, de Npa3p y de las carioferinas Kap123p y Cse1p. Npa3p es una GTPasa que se

ha implicado en la biogénesis de la RNA pol II (Staresincic et al., 2011) y que actuaría con anterioridad a Iwr1p durante el proceso de ensamblaje (Minaker et al., 2013). Por lo tanto, su presencia preferente en los extractos obtenidos al tratar a las células con doxiciclina suponen un aval a la estrategia utilizada. En cuanto a las carioferinas identificadas, su presencia podría indicar su participación en el transporte de subunidades y/o subcomplejos al núcleo independiente de Iwr1p, transporte sugerido por los resultados que se presentan en el apartado 4.

Por último, otra clase de proteínas que encontramos sobre-representadas entre las purificadas con Rpb1p y Rpb2p en condiciones no permisivas está relacionada con la biosíntesis de aminoacil-tRNAs. En primer lugar hay que citar a Arc1p, una proteína que une tRNAs y aminoacil-tRNA sintetasas para facilitar la aminoacetilación de tRNAs (Deinert et al., 2001; Galani et al., 2001; Simos et al., 1998; 1996). Aunque se ha descrito una interacción preferente de Arc1p con la metionil- y la glutamil-tRNA sintetasas (Simos et al., 1996), en nuestro caso encontramos sobre-representadas la glutamil-tRNA sintasa y la alanil-tRNA sintasa (Tabla 6.10). Otra proteína que aparece relacionada con la biosíntesis de aminoacil-tRNAs es Apa1p. El gen *APAI* codifica una Ap4A (diadenosina 5',5'''-P1,P4-tetrafosfato) fosforilasa encargada de catabolizar el Ap4A que se sintetiza durante la biosíntesis de aminoacil-tRNAs (Plateau et al., 1989). En conjunto, la presencia de estas proteínas podría ser indicativa de la interacción de subcomplejos que aparecen durante la formación de la RNA pol II con proteínas implicadas en el metabolismo de aminoacil-tRNAs. El posible papel de estas interacciones en el acoplamiento de las funciones de la RNA pol II y la RNA pol III es una posibilidad que merece, sin duda, ser estudiada.

| Proteína Co-purificada | Descripción | Rpb2-TAP promedio | tetO-Rpb1 doxiciclina | Rpb2-TAP doxiciclina | tetO-Rpb3 doxiciclina | Rpb2-TAP promedio | Rpb1-TAP promedio | tetO-Rpb2 doxiciclina | tetO-Rpb3 doxiciclina | Rpb1-TAP doxiciclina | tetO-Rpb3 doxiciclina |
|---------------------------|---|----------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|----------------------|----------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Rpb1p | RNA polymerase II subunit | 69.9 | 20.4 | 52.8 | 70.8 | 59.2 | 59.2 | 106.6 | 70.8 | 106.6 | 70.8 |
| Tfg1p | Transcription initiation factor IIF subunit alpha | 150.0 | 8.8 | 46.2 | 24.0 | 36.9 | 36.9 | 16.4 | 24.0 | 16.4 | 24.0 |
| Rpb2p | RNA polymerase II subunit | 50.7 | 32.0 | 50.7 | 36.0 | 40.7 | 40.7 | 15.2 | 36.0 | 15.2 | 36.0 |
| Tfg2p | Transcription initiation factor IIF subunit beta | 50.7 | 8.1 | 26.6 | 20.6 | 21.1 | 21.1 | 7.0 | 20.6 | 7.0 | 20.6 |
| Rpb4p | RNA polymerase II subunit | 8.5 | | 0.7 | 18.3 | 13.4 | 13.4 | 15.2 | 18.3 | 15.2 | 18.3 |
| Rpb6p | RNA polymerases I, II, and III subunit | 23.8 | 8.4 | 11.4 | 12.6 | 12.3 | 12.3 | 12.9 | 12.6 | 12.9 | 12.6 |
| Spt5p | Transcription elongation factor | 9.0 | | 1.4 | 4.0 | 7.4 | 7.4 | 3.5 | 4.0 | 3.5 | 4.0 |
| Rpb3p | RNA polymerase II subunit | 17.0 | 18.3 | 18.3 | 25.1 | 14.0 | 14.0 | 8.2 | 25.1 | 8.2 | 25.1 |
| Rpb9p | RNA polymerase II subunit | 11.4 | 3.9 | 6.2 | 4.6 | 5.5 | 5.5 | 3.5 | 4.6 | 3.5 | 4.6 |
| Rpb11p | RNA polymerase II subunit | 7.1 | 5.3 | 8.3 | 5.1 | 6.1 | 6.1 | | 5.1 | | 5.1 |
| Rpb5p | RNA polymerases I, II, and III subunit | 6.7 | 3.5 | 5.2 | 5.7 | 5.6 | 5.6 | 1.2 | 5.7 | 1.2 | 5.7 |
| Rpb12p | RNA polymerases I, II, and III subunit | 6.8 | 2.1 | 3.1 | 6.3 | 3.9 | 3.9 | 3.5 | 6.3 | 3.5 | 6.3 |
| Rpb10p | RNA polymerases I, II, and III subunit | 8.7 | 6.0 | 3.8 | 10.9 | 4.4 | 4.4 | 4.7 | 10.9 | 4.7 | 10.9 |
| Iwr1p | RNA polymerase II nuclear localization protein | 4.8 | | | | 2.8 | 2.8 | | | | |
| Spt4p | Transcription elongation factor | 1.1 | | | | 2.2 | 2.2 | | | | |
| Rpb7p | RNA polymerase II subunit | 6.0 | | | | 2.2 | 2.2 | | | | |
| Taf14p | Transcription initiation factor TFIID subunit 14 | 4.3 | | 0.7 | | 1.8 | 1.8 | | | | |
| Ssd1p | Translational repressor | 1.2 | | | | 1.3 | 1.3 | | | | |
| Rvb1p | RuvB-like protein 1 | 2.0 | | | | 3.0 | 3.0 | | | | 2.9 |
| Rpb8p | RNA polymerases I, II, and III subunit | 4.4 | | 2.4 | 3.4 | 2.8 | 2.8 | | 3.4 | | 3.4 |
| Def1p | RNA polymerase II degradation factor | 1.3 | | | | 1.1 | 1.1 | | | | |
| Rvb2p | RuvB-like protein 2 | 2.0 | | | | 1.0 | 1.0 | | | | |

Tabla 6.9. Proteínas más abundantes en las purificaciones en condiciones permisivas. Se muestra el número de péptidos normalizado frente al número de péptidos total de la muestra para cada proteína. En el caso de las purificaciones Rpb2-TAP y Rpb1-TAP se muestra el promedio de dos experimentos independientes. Podemos clasificar las proteínas sobre-representadas en condiciones silvestres en: proteínas que forman la RNA pol II (naranja), factores transcripcionales (azul), y la proteína Iwr1p (verde).

| Proteína Co-purificada | Descripción | tetO-Rpb1 Rpb2-TAP doxiciclina | tetO-Rpb3 Rpb2-TAP doxiciclina | Rpb2-TAP promedio | tetO-Rpb2 Rpb1-TAP doxiciclina | tetO-Rpb3 Rpb1-TAP doxiciclina | Rpb1-TAP promedio |
|---------------------------|--|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------|
| Ssz1p | Ribosome-associated complex subunit | 20.4 | 15.9 | 1.4 | 2.3 | 3.4 | 1.7 |
| Zuo1p | Zuotin | 14.8 | 15.2 | 0.8 | | 1.1 | 0.9 |
| Ala1p | Alanine-tRNA ligase | 10.5 | 7.9 | 1.0 | | | 2.2 |
| Kap123p | Importin subunit beta-4 | 10.2 | 7.9 | 5.0 | 1.2 | 3.4 | 2.9 |
| Spt16p | FACT complex subunit | 6.0 | 3.4 | 2.0 | | | 1.7 |
| Ola1p | Uncharacterized GTP-binding protein | 6.0 | 4.1 | 1.7 | | 5.1 | 2.0 |
| Gus1p | Glutamate-tRNA ligase | 4.6 | 4.5 | 1.0 | 1.2 | 2.9 | 1.2 |
| Arc1p | GU4 nucleic-binding protein 1 | 5.3 | 5.9 | | 2.3 | 3.4 | 0.6 |
| Num1p | Nuclear migration protein | 5.3 | 4.1 | 1.5 | | | 1.5 |
| Get3p | ATPase GET3 | 3.5 | 1.7 | 0.6 | | | 0.8 |
| Cct2p | T-complex protein 1 subunit beta | 3.2 | 1.0 | 1.8 | | 0.6 | 2.2 |
| Apa1p | AP4A phosphorylase | 2.8 | 1.7 | 1.5 | | | 1.5 |
| Tma19p | Translationally-controlled tumor protein | 2.1 | 2.1 | 0.3 | | | 0.5 |
| Gvp36p | BAR domain-containing protein | 2.1 | 1.4 | 0.6 | 2.3 | 4.6 | 0.8 |
| Rio2p | Serine/threonine-protein kinase | 1.8 | 1.4 | 0.4 | | 1.7 | 0.2 |
| Guk1p | Guanylate kinase | 1.8 | 1.0 | | | | |
| Npa3p | GTPase NPA3 | 1.4 | 1.7 | 0.7 | | | 0.7 |
| Ycr051Wp | Ankyrin repeat-containing protein | 1.1 | 0.7 | | | | |
| Cse1p | Importin alpha re-exporter | 0.4 | | 0.1 | | | 0.9 |
| Cct7p | T-complex protein 1 subunit eta | 0.4 | 0.3 | 1.2 | | | 1.1 |
| Cca1p | CCA tRNA nucleotidyltransferase | 0.4 | | | | | |

Tabla 6.10. Proteínas más abundantes en las purificaciones en condiciones no permisivas. Se muestra el número de péptidos normalizado frente al número de péptidos total de la muestra para cada proteína. En el caso de las purificaciones Rpb2-TAP y Rpb1-TAP se muestra el promedio de dos experimentos independientes. Podemos clasificar las proteínas sobre-representadas en estas condiciones en: proteínas chaperonas (rojo), componentes del complejo T con función chaperona (púrpura), proteínas que participan en el proceso de traducción (verde), y carioferinas (azul),

7. CONCLUSIONES

1. Los defectos en el crecimiento causados por la pérdida de la función del represor transcripcional NC2 pueden ser compensados mediante la reducción de la actividad de la RNA polimerasa II durante el inicio de transcripción.
Las mutaciones que dan lugar a supresión incluyen a los factores transcripcionales generales, la propia RNA polimerasa II o los factores auxiliares necesarios para el ensamblaje y el transporte al núcleo de una holoenzima funcional, entre los que se incluyen las proteínas Rtp1p e Iwr1p, protagonistas de este trabajo.
2. El gen *RTPI* codifica una proteína formada por repeticiones HEAT con homología estructural con las carioferinas y su mutación provoca defectos en la localización celular de la RNA polimerasa II.
3. La proteína Rtp1p interacciona con la región N-terminal de la subunidad de la RNA polimerasa II Rpb2p y podría actuar como chaperona, facilitando la interacción entre Rpb2p y el subcomplejo de ensamblaje que incluye Rpb3p.
4. La interacción entre Rtp1p y la RNA pol II podría mantenerse durante todo el proceso de ensamblaje como indican las interacciones detectadas entre Rtp1p y R2TP y entre Rtp1p y Rpb1p, estas últimas en condiciones que dan lugar a la acumulación de la polimerasa en el citoplasma.
5. La interacción de Rtp1p con componentes del Complejo del Poro Nuclear y su estructura característica de carioferina apoyan

que, tras su función en el ensamblaje de la RNA pol II, Rtp1p podría participar en el transporte al núcleo de la misma.

6. La localización celular de las subunidades grandes y pequeñas de la RNA pol II de levadura resulta afectada de forma distinta por mutaciones o compuestos que alteran el ensamblaje y/o la importación de la enzima.
7. Este comportamiento diferencial sugiere la existencia de mecanismos de transporte al núcleo, independientes de Iwr1p, que permiten una importación nuclear efectiva de las subunidades pequeñas y, en menor medida, de las subunidades grandes.
8. Las interacciones físicas y genéticas entre Iwr1p y los factores de elongación Dst1p y Spt4p sugieren una función de Iwr1p adicional a la que desempeña en el transporte del holoenzima al núcleo y relacionada con la elongación transcripcional.
9. La función nuclear de Iwr1p podría estar relacionada con la liberación la RNA pol II detenida en la cromatina durante la elongación transcripcional.
10. Los efectos transcripcionales causados por la ausencia de Rtp1p e Iwr1p indican que un nivel reducido de RNA polimerasa II en el núcleo da lugar a una transcripción preferente de genes implicados en la respiración y en la utilización de aminoácidos, a la vez que se reprimen los genes implicados en la síntesis de NAD. Este patrón de expresión podría actuar como mecanismo

de resistencia para incrementar la supervivencia de la célula en condiciones nutricionales adversas.

11. Los análisis proteómicos en condiciones de ensamblaje defectuoso de la RNA pol II han permitido identificar, de manera preliminar, una serie de factores que podrían participar en el ensamblaje o en el acoplamiento del ensamblaje de la RNA pol II con otros procesos celulares.

8. BIBLIOGRAFÍA

Acker, J., de Graaff, M., Cheynel, I., Khazak, V., Kédinger, C., and Vigneron, M. (1997). Interactions between the human RNA polymerase II subunits. *J. Biol. Chem.* *272*, 16815–16821.

Agalioti, T., Chen, G., and Thanos, D. (2002). Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. *Cell* *111*, 381–392.

Allison, L.A., Moyle, M., Shales, M., and Ingles, C.J. (1985). Extensive homology among the largest subunits of eukaryotic and prokaryotic RNA polymerases. *Cell* *42*, 599–610.

Anderson, R.M., Bitterman, K.J., Wood, J.G., Medvedik, O., Cohen, H., Lin, S.S., Manchester, J.K., Gordon, J.I., and Sinclair, D.A. (2002). Manipulation of a nuclear NAD⁺ salvage pathway delays aging without altering steady-state NAD⁺ levels. *J. Biol. Chem.* *277*, 18881–18890.

Anindya, R., Aygün, O., and Svejstrup, J.Q. (2007). Damage-induced ubiquitylation of human RNA polymerase II by the ubiquitin ligase Nedd4, but not Cockayne syndrome proteins or BRCA1. *Molecular Cell* *28*, 386–397.

Armache, K.-J., Kettenberger, H., and Cramer, P. (2003). Architecture of initiation-competent 12-subunit RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 6964–6968.

Arnett, D.R., Jennings, J.L., Tabb, D.L., Link, A.J., and Weil, P.A. (2008). A proteomics analysis of yeast Mot1p protein-protein associations: insights into mechanism. *Mol. Cell Proteomics* *7*, 2090–2106.

Aso, T., and Conrad, M.N. (1997). Molecular cloning of DNAs encoding the regulatory subunits of elongin from *Saccharomyces cerevisiae* and *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *241*, 334–340.

Aso, T., Lane, W.S., Conaway, J.W., and Conaway, R.C. (1995). Elongin (SIII): a multisubunit regulator of elongation by RNA polymerase II. *Science* *269*, 1439–1443.

Auble, D.T., Hansen, K.E., Mueller, C.G., Lane, W.S., Thorner, J., and Hahn, S. (1994). Mot1, a global repressor of RNA polymerase II transcription, inhibits TBP binding to DNA by an ATP-dependent mechanism. *Genes & Development* *8*, 1920–

1934.

Basehoar, A.D., Zanton, S.J., and Pugh, B.F. (2004). Identification and distinct regulation of yeast TATA box-containing genes. *Cell* *116*, 699–709.

Bataille, A.R., Jeronimo, C., Jacques, P.-É., Laramée, L., Fortin, M.-È., Forest, A., Bergeron, M., Hanes, S.D., and Robert, F. (2012). A universal RNA polymerase II CTD cycle is orchestrated by complex interplays between kinase, phosphatase, and isomerase enzymes along genes. *Molecular Cell* *45*, 158–170.

Beaudenon, S.L., Huacani, M.R., Wang, G., McDonnell, D.P., and Huibregtse, J.M. (1999). Rsp5 ubiquitin-protein ligase mediates DNA damage-induced degradation of the large subunit of RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* *19*, 6972–6979.

Belle, A., Tanay, A., Bitincka, L., Shamir, R., and O'Shea, E.K. (2006). Quantification of protein half-lives in the budding yeast proteome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* *103*, 13004–13009.

Bellí, G., Garí, E., Aldea, M., and Herrero, E. (1998). Functional analysis of yeast essential genes using a promoter-substitution cassette and the tetracycline-regulatable dual expression system. *Yeast* *14*, 1127–1138.

Beltrao, P., Albanèse, V., Kenner, L.R., Swaney, D.L., Burlingame, A., Villén, J., Lim, W.A., Fraser, J.S., Frydman, J., and Krogan, N.J. (2012). Systematic functional prioritization of protein posttranslational modifications. *Cell* *150*, 413–425.

Bengal, E., Flores, O., Krauskopf, A., Reinberg, D., and Aloni, Y. (1991). Role of the mammalian transcription factors IIF, IIS, and IIX during elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell Biol.* *11*, 1195–1206.

Boulon, S., Pradet-Balade, B., Verheggen, C., Molle, D., Boireau, S., Georgieva, M., Azzag, K., Robert, M.-C., Ahmad, Y., Neel, H., et al. (2010). HSP90 and Its R2TP/Prefoldin-like Cochaperone Are Involved in the Cytoplasmic Assembly of RNA Polymerase II. *Molecular Cell* *39*, 912–924.

Breathnach, R., and Chambon, P. (1981). Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu. Rev. Biochem.* *50*, 349–383.

Bregman, D.B., Halaban, R., van Gool, A.J., Henning, K.A., Friedberg, E.C., and Warren, S.L. (1996). UV-induced ubiquitination of RNA polymerase II: a novel modification deficient in Cockayne syndrome cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* *93*, 11586–11590.

- Burns, N., Grimwade, B., Ross-Macdonald, P.B., Choi, E.Y., Finberg, K., Roeder, G.S., and Snyder, M. (1994). Large-scale analysis of gene expression, protein localization, and gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Development* 8, 1087–1105.
- Bushnell, D.A., and Kornberg, R.D. (2003). Complete, 12-subunit RNA polymerase II at 4.1-Å resolution: implications for the initiation of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 6969–6973.
- Bustin, M., Trieschmann, L., and Postnikov, Y.V. (1995). The HMG-14/-17 chromosomal protein family: architectural elements that enhance transcription from chromatin templates. *Semin. Cell Biol.* 6, 247–255.
- Calera, M.R., Zamora-Ramos, C., Araiza-Villanueva, M.G., Moreno-Aguilar, C.A., Peña-Gómez, S.G., Castellanos-Terán, F., Robledo-Rivera, A.Y., and Sánchez-Olea, R. (2011). Parcs/Gpn3 is required for the nuclear accumulation of RNA polymerase II. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 1708–1716.
- Cang, Y., and Prelich, G. (2002). Direct stimulation of transcription by negative cofactor 2 (NC2) through TATA-binding protein (TBP). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 12727–12732.
- Carré, C., and Shiekhatar, R. (2011). Human GTPases associate with RNA polymerase II to mediate its nuclear import. *Mol. Cell. Biol.* 31, 3953–3962.
- Chen, X., Ruggiero, C., and Li, S. (2007). Yeast Rpb9 plays an important role in ubiquitylation and degradation of Rpb1 in response to UV-induced DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* 27, 4617–4625.
- Chicca, J.J., Auble, D.T., and Pugh, B.F. (1998). Cloning and biochemical characterization of TAF-172, a human homolog of yeast Mot1. *Mol. Cell. Biol.* 18, 1701–1710.
- Chitikila, C., Huisinga, K.L., Irvin, J.D., Basehoar, A.D., and Pugh, B.F. (2002). Interplay of TBP inhibitors in global transcriptional control. *Molecular Cell* 10, 871–882.
- Chook, Y.M., and Blobel, G. (2001). Karyopherins and nuclear import. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11, 703–715.
- Chook, Y.M., and Süel, K.E. (2011). Nuclear import by karyopherin-βs: recognition and inhibition. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 1593–1606.

Cingolani, G., Petosa, C., Weis, K., and Müller, C.W. (1999). Structure of importin-beta bound to the IBB domain of importin-alpha. *Nature* 399, 221–229.

Cloutier, P., and Coulombe, B. (2010). New insights into the biogenesis of nuclear RNA polymerases? *Biochem. Cell Biol.* 88, 211–221.

Cohen, M., Stutz, F., Belgareh, N., Haguenaer-Tsapis, R., and Dargemont, C. (2003). Ubp3 requires a cofactor, Bre5, to specifically de-ubiquitinate the COPII protein, Sec23. *Nat. Cell Biol.* 5, 661–667.

Conaway, J.W., and Conaway, R.C. (1999). Transcription elongation and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 301–319.

Conaway, J.W., Shilatifard, A., Dvir, A., and Conaway, R.C. (2000). Control of elongation by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* 25, 375–380.

Conti, E., Müller, C.W., and Stewart, M. (2006). Karyopherin flexibility in nucleocytoplasmic transport. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16, 237–244.

Cook, A.G., and Conti, E. (2010). Nuclear export complexes in the frame. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 20, 247–252.

Corden, J.L., Cadena, D.L., Ahearn, J.M., and Dahmus, M.E. (1985). A unique structure at the carboxyl terminus of the largest subunit of eukaryotic RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 7934–7938.

Corden, J. (2011). Going nuclear: transcribers in transit. *Molecular Cell* 42, 143–145.

Cramer, P., Armache, K.-J., Baumli, S., Benkert, S., Brueckner, F., Buchen, C., Damsma, G.E., Dengl, S., Geiger, S.R., Jasiak, A.J., et al. (2008). Structure of eukaryotic RNA polymerases. *Annu Rev Biophys* 37, 337–352.

Cramer, P., Bushnell, D.A., and Kornberg, R.D. (2001). Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science* 292, 1863–1876.

Cramer, P., Bushnell, D.A., Fu, J., Gnatt, A.L., Maier-Davis, B., Thompson, N.E., Burgess, R.R., Edwards, A.M., David, P.R., and Kornberg, R.D. (2000). Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science* 288, 640–649.

Cramer, P. (2004). RNA polymerase II structure: from core to functional complexes.

Curr. Opin. Genet. Dev. *14*, 218–226.

Czeko, E., Seizl, M., Augsberger, C., Mielke, T., and Cramer, P. (2011). Iwr1 directs RNA polymerase II nuclear import. *Molecular Cell* *42*, 261–266.

Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S., and Baulcombe, D.C. (2000). An RNA-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* *101*, 543–553.

Danielsen, J.M.R., Sylvestersen, K.B., Bekker-Jensen, S., Szklarczyk, D., Poulsen, J.W., Horn, H., Jensen, L.J., Mailand, N., and Nielsen, M.L. (2011). Mass spectrometric analysis of lysine ubiquitylation reveals promiscuity at site level. *Mol. Cell Proteomics* *10*, M110.003590.

Darst, R.P., Dasgupta, A., Zhu, C., Hsu, J.-Y., Vroom, A., Muldrow, T., and Auble, D.T. (2003). Mot1 regulates the DNA binding activity of free TATA-binding protein in an ATP-dependent manner. *J. Biol. Chem.* *278*, 13216–13226.

Dasgupta, A., Darst, R.P., Martin, K.J., Afshari, C.A., and Auble, D.T. (2002). Mot1 activates and represses transcription by direct, ATPase-dependent mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 2666–2671.

Daulny, A., Geng, F., Muratani, M., Geisinger, J.M., Salghetti, S.E., and Tansey, W.P. (2008). Modulation of RNA polymerase II subunit composition by ubiquitylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 19649–19654.

Deinert, K., Fasiolo, F., Hurt, E.C., and Simos, G. (2001). Arc1p organizes the yeast aminoacyl-tRNA synthetase complex and stabilizes its interaction with the cognate tRNAs. *J. Biol. Chem.* *276*, 6000–6008.

Dekker, C., Stirling, P.C., McCormack, E.A., Filmore, H., Paul, A., Brost, R.L., Costanzo, M., Boone, C., Leroux, M.R., and Willison, K.R. (2008). The interaction network of the chaperonin CCT. *Embo J.* *27*, 1827–1839.

Ding, H.F., Rimsky, S., Batson, S.C., Bustin, M., and Hansen, U. (1994). Stimulation of RNA polymerase II elongation by chromosomal protein HMG-14. *Science* *265*, 796–799.

Dvir, A., Tan, S., Conaway, J.W., and Conaway, R.C. (1997). Promoter escape by RNA polymerase II. Formation of an escape-competent transcriptional intermediate is a prerequisite for exit of polymerase from the promoter. *J. Biol. Chem.* *272*, 28175–28178.

Egloff, S., Zaborowska, J., Laitem, C., Kiss, T., and Murphy, S. (2012). Ser7 phosphorylation of the CTD recruits the RPAP2 Ser5 phosphatase to snRNA genes. *Molecular Cell* 45, 111–122.

Escobar-Henriques, M., and Daignan-Fornier, B. (2001). Transcriptional regulation of the yeast gmp synthesis pathway by its end products. *J. Biol. Chem.* 276, 1523–1530.

Escobar-Henriques, M., Balguerie, A., Monribot, C., Boucherie, H., and Daignan-Fornier, B. (2001). Proteome analysis and morphological studies reveal multiple effects of the immunosuppressive drug mycophenolic acid specifically resulting from guanylic nucleotide depletion. *J. Biol. Chem.* 276, 46237–46242.

Estruch, F., Peiró-Chova, L., Gómez Navarro, N., Durbán, J., Hodge, C., Del Olmo, M., and Cole, C.N. (2009). A genetic screen in *Saccharomyces cerevisiae* identifies new genes that interact with mex67-5, a temperature-sensitive allele of the gene encoding the mRNA export receptor. *Mol. Genet. Genomics* 281, 125–134.

Exinger, F., and Lacroute, F. (1992). 6-Azauracil inhibition of GTP biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 22, 9–11.

Feaver, W.J., Svejstrup, J.Q., Bardwell, L., Bardwell, A.J., Buratowski, S., Gulyas, K.D., Donahue, T.F., Friedberg, E.C., and Kornberg, R.D. (1993). Dual roles of a multiprotein complex from *S. cerevisiae* in transcription and DNA repair. *Cell* 75, 1379–1387.

Fish, R.N., and Kane, C.M. (2002). Promoting elongation with transcript cleavage stimulatory factors. *Biochim. Biophys. Acta* 1577, 287–307.

Forget, D., Lacombe, A.-A., Cloutier, P., Al-Khoury, R., Bouchard, A., Lavallée-Adam, M., Faubert, D., Jeronimo, C., Blanchette, M., and Coulombe, B. (2010). The protein interaction network of the human transcription machinery reveals a role for the conserved GTPase RPAP4/GPN1 and microtubule assembly in nuclear import and biogenesis of RNA polymerase II. *Mol. Cell Proteomics* 9, 2827–2839.

Forget, D., Lacombe, A.-A., Cloutier, P., Lavallée-Adam, M., Blanchette, M., and Coulombe, B. (2013). Nuclear import of RNA polymerase II is coupled with nucleocytoplasmic shuttling of the RNA polymerase II-associated protein 2. *Nucleic Acids Res.*

Formosa, T., Eriksson, P., Wittmeyer, J., Ginn, J., Yu, Y., and Stillman, D.J. (2001). Spt16-Pob3 and the HMG protein Nhp6 combine to form the nucleosome-binding factor SPN. *Embo J.* 20, 3506–3517.

Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M., and Mattaj, I.W. (1997). CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* *90*, 1051–1060.

Forsburg, S.L., and Guarente, L. (1989). Identification and characterization of HAP4: a third component of the CCAAT-bound HAP2/HAP3 heteromer. *Genes & Development* *3*, 1166–1178.

Gadbois, E.L., Chao, D.M., Reese, J.C., Green, M.R., and Young, R.A. (1997). Functional antagonism between RNA polymerase II holoenzyme and global negative regulator NC2 in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *94*, 3145–3150.

Galani, K., Grosshans, H., Deinert, K., Hurt, E.C., and Simos, G. (2001). The intracellular location of two aminoacyl-tRNA synthetases depends on complex formation with Arc1p. *Embo J.* *20*, 6889–6898.

García-López, M.C., and Navarro, F. (2011). RNA polymerase II conserved protein domains as platforms for protein-protein interactions. *Transcription* *2*, 193–197.

Gari, E., Piedrafita, L., Aldea, M., and Herrero, E. (1997). A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *13*, 837–848.

Garrido-Godino, A.I., García-López, M.C., and Navarro, F. (2013). Correct assembly of RNA polymerase II depends on the foot domain and is required for multiple steps of transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *33*, 3611–3626.

Gautschi, M., Mun, A., Ross, S., and Rospert, S. (2002). A functional chaperone triad on the yeast ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 4209–4214.

Gavin, A.-C., Aloy, P., Grandi, P., Krause, R., Böesche, M., Marzioch, M., Rau, C., Jensen, L.J., Bastuck, S., Dümpelfeld, B., et al. (2006). Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature* *440*, 631–636.

Gavin, A.-C., Böesche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J.M., Michon, A.-M., Cruciat, C.-M., et al. (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* *415*, 141–147.

Geisberg, J.V., Holstege, F.C., Young, R.A., and Struhl, K. (2001). Yeast NC2 associates with the RNA polymerase II preinitiation complex and selectively affects transcription in vivo. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 2736–2742.

Ghavi-Helm, Y., Michaut, M., Acker, J., Aude, J.-C., Thuriaux, P., Werner, M., and Soutourina, J. (2008). Genome-wide location analysis reveals a role of TFIIS in RNA polymerase III transcription. *Genes & Development* 22, 1934–1947.

Giaever, G., Chu, A.M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Véronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., André, B., et al. (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 418, 387–391.

Gibney, P.A., Fries, T., Bailer, S.M., and Morano, K.A. (2008). Rtr1 is the *Saccharomyces cerevisiae* homolog of a novel family of RNA polymerase II-binding proteins. *Eukaryotic Cell* 7, 938–948.

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, 355–360.

Goodrich, J.A., and Tjian, R. (1994). Transcription factors IIE and IIH and ATP hydrolysis direct promoter clearance by RNA polymerase II. *Cell* 77, 145–156.

Goppelt, A., and Meisterernst, M. (1996). Characterization of the basal inhibitor of class II transcription NC2 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 24, 4450–4455.

Gómez Navarro, N., Peiró-Chova, L., Rodríguez-Navarro, S., Polaina, J., and Estruch, F. (2013). Rtp1p Is a Karyopherin-Like Protein Required for RNA Polymerase II Biogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 33, 1756–1767.

Gómez-Herreros, F., de Miguel-Jiménez, L., Millán-Zambrano, G., Peñate, X., Delgado-Ramos, L., Muñoz-Centeno, M.C., and Chávez, S. (2012a). One step back before moving forward: regulation of transcription elongation by arrest and backtracking. *FEBS Letters* 586, 2820–2825.

Gómez-Herreros, F., de Miguel-Jiménez, L., Morillo-Huesca, M., Delgado-Ramos, L., Muñoz-Centeno, M.C., and Chávez, S. (2012b). TFIIS is required for the balanced expression of the genes encoding ribosomal components under transcriptional stress. *Nucleic Acids Res.* 40, 6508–6519.

Görlich, D., Dabrowski, M., Bischoff, F.R., Kutay, U., Bork, P., Hartmann, E., Prehn, S., and Izaurralde, E. (1997). A novel class of RanGTP binding proteins. *J. Cell Biol.* 138, 65–80.

Gu, W., and Reines, D. (1995). Identification of a decay in transcription potential that results in elongation factor dependence of RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.*

270, 11238–11244.

Gutsche, I., Essen, L.O., and Baumeister, W. (1999). Group II chaperonins: new TRiC(k)s and turns of a protein folding machine. *J. Mol. Biol.* 293, 295–312.

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

Hampsey, M. (1998). Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 465–503.

Harreman, M., Taschner, M., Sigurdsson, S., Anindya, R., Reid, J., Somesh, B., Kong, S.E., Banks, C.A.S., Conaway, R.C., Conaway, J.W., et al. (2009). Distinct ubiquitin ligases act sequentially for RNA polymerase II polyubiquitylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 20705–20710.

Hartzog, G.A., Wada, T., Handa, H., and Winston, F. (1998). Evidence that Spt4, Spt5, and Spt6 control transcription elongation by RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Development* 12, 357–369.

Hassan, A.H., Prochasson, P., Neely, K.E., Galasinski, S.C., Chandy, M., Carrozza, M.J., and Workman, J.L. (2002). Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. *Cell* 111, 369–379.

Hellmuth, K., Lau, D.M., Bischoff, F.R., Künzler, M., Hurt, E., and Simos, G. (1998). Yeast Los1p has properties of an exportin-like nucleocytoplasmic transport factor for tRNA. *Mol. Cell. Biol.* 18, 6374–6386.

Henry, N.L., Sayre, M.H., and Kornberg, R.D. (1992). Purification and characterization of yeast RNA polymerase II general initiation factor g. *J. Biol. Chem.* 267, 23388–23392.

Herr, A.J., Jensen, M.B., Dalmay, T., and Baulcombe, D.C. (2005). RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. *Science* 308, 118–120.

Hirata, A., and Murakami, K.S. (2009). Archaeal RNA polymerase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 19, 724–731.

Hobson, D.J., Wei, W., Steinmetz, L.M., and Svejstrup, J.Q. (2012). RNA polymerase II collision interrupts convergent transcription. *Molecular Cell* 48, 365–374.

Huang, H.L., and Brandriss, M.C. (2000). The regulator of the yeast proline utilization pathway is differentially phosphorylated in response to the quality of the nitrogen source. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 892–899.

Huibregtse, J.M., Yang, J.C., and Beaudenon, S.L. (1997). The large subunit of RNA polymerase II is a substrate of the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *94*, 3656–3661.

Huisinga, K.L., and Pugh, B.F. (2007). A TATA binding protein regulatory network that governs transcription complex assembly. *Genome Biol.* *8*, R46.

Imasaki, T., Shimizu, T., Hashimoto, H., Hidaka, Y., Kose, S., Imamoto, N., Yamada, M., and Sato, M. (2007). Structural basis for substrate recognition and dissociation by human transportin 1. *Molecular Cell* *28*, 57–67.

Imbalzano, A.N., Kwon, H., Green, M.R., and Kingston, R.E. (1994). Facilitated binding of TATA-binding protein to nucleosomal DNA. *Nature* *370*, 481–485.

Ishihama, A. (1981). Subunit of assembly of Escherichia coli RNA polymerase. *Adv. Biophys.* *14*, 1–35.

Ishihama, A., and Ito, K. (1972). Subunits of RNA polymerase in function and structure. II. Reconstitution of Escherichia coli RNA polymerase from isolated subunits. *J. Mol. Biol.* *72*, 111–123.

James, P., Halladay, J., and Craig, E.A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* *144*, 1425–1436.

Jeronimo, C., Forget, D., Bouchard, A., Li, Q., Chua, G., Poitras, C., Thérien, C., Bergeron, D., Bourassa, S., Greenblatt, J., et al. (2007). Systematic Analysis of the Protein Interaction Network for the Human Transcription Machinery Reveals the Identity of the 7SK Capping Enzyme. *Molecular Cell* *27*, 13–13.

Kakihara, Y., and Houry, W.A. (2012). The R2TP complex: discovery and functions. *Biochim. Biophys. Acta* *1823*, 101–107.

Kamada, K., Shu, F., Chen, H., Malik, S., Stelzer, G., Roeder, R.G., Meisterernst, M., and Burley, S.K. (2001). Crystal structure of negative cofactor 2 recognizing the TBP-DNA transcription complex. *Cell* *106*, 71–81.

Keogh, M.-C., Podolny, V., and Buratowski, S. (2003). Bur1 kinase is required for efficient transcription elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 7005–

7018.

Kephart, D.D., Wang, B.Q., Burton, Z.F., and Price, D.H. (1994). Functional analysis of *Drosophila* factor 5 (TFIIF), a general transcription factor. *J. Biol. Chem.* *269*, 13536–13543.

Kim, S., Na, J.G., Hampsey, M., and Reinberg, D. (1997). The Dr1/DRAP1 heterodimer is a global repressor of transcription in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* *94*, 820–825.

Kim, Y.J., Björklund, S., Li, Y., Sayre, M.H., and Kornberg, R.D. (1994). A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell* *77*, 599–608.

Kimura, M., and Ishihama, A. (2000). Involvement of multiple subunit-subunit contacts in the assembly of RNA polymerase II. *Nucleic Acids Res.* *28*, 952–959.

Kimura, M., Sakurai, H., and Ishihama, A. (2001). Intracellular contents and assembly states of all 12 subunits of the RNA polymerase II in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur. J. Biochem.* *268*, 612–619.

Klejman, M.P., Pereira, L.A., van Zeeburg, H.J.T., Gilfillan, S., Meisterernst, M., and Timmers, H.T.M. (2004). NC2 α interacts with BTAF1 and stimulates its ATP-dependent association with TATA-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 10072–10082.

Komarnitsky, P., Cho, E.J., and Buratowski, S. (2000). Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes & Development* *14*, 2452–2460.

Koth, C.M., Botuyan, M.V., Moreland, R.J., Jansma, D.B., Conaway, J.W., Conaway, R.C., Chazin, W.J., Friesen, J.D., Arrowsmith, C.H., and Edwards, A.M. (2000). Elongin from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *275*, 11174–11180.

Koyama, H., Ito, T., Nakanishi, T., and Sekimizu, K. (2007). Stimulation of RNA polymerase II transcript cleavage activity contributes to maintain transcriptional fidelity in yeast. *Genes Cells* *12*, 547–559.

Krogan, N.J., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., Guo, X., Ignatchenko, A., Li, J., Pu, S., Datta, N., Tikuisis, A.P., et al. (2006). Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* *440*, 637–643.

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*, 6979–6992.
- Kruk, J.A., Dutta, A., Fu, J., Gilmour, D.S., and Reese, J.C. (2011). The multifunctional Ccr4-Not complex directly promotes transcription elongation. *Genes & Development* *25*, 581–593.
- Kumar, K.P., Akoulitchev, S., and Reinberg, D. (1998). Promoter-proximal stalling results from the inability to recruit transcription factor IIIH to the transcription complex and is a regulated event. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* *95*, 9767–9772.
- Kvint, K., Uhler, J.P., Taschner, M.J., Sigurdsson, S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Svejstrup, J.Q. (2008). Reversal of RNA polymerase II ubiquitylation by the ubiquitin protease Ubp3. *Molecular Cell* *30*, 498–506.
- Kwon, H., Imbalzano, A.N., Khavari, P.A., Kingston, R.E., and Green, M.R. (1994). Nucleosome disruption and enhancement of activator binding by a human SW1/SNF complex. *Nature* *370*, 477–481.
- Lau, D., Künzler, M., Braunwarth, A., Hellmuth, K., Podtelejnikov, A., Mann, M., and Hurt, E. (2000). Purification of protein A-tagged yeast ran reveals association with a novel karyopherin beta family member, Pdr6p. *J. Biol. Chem.* *275*, 467–471.
- Lee, T.I., and Young, R.A. (2000). Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu. Rev. Genet.* *34*, 77–137.
- Lemon, B., and Tjian, R. (2000). Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes & Development* *14*, 2551–2569.
- Lindstrom, D.L., Squazzo, S.L., Muster, N., Burckin, T.A., Wachter, K.C., Emigh, C.A., McCleery, J.A., Yates, J.R., and Hartzog, G.A. (2003). Dual roles for Spt5 in pre-mRNA processing and transcription elongation revealed by identification of Spt5-associated proteins. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 1368–1378.
- Longtine, M.I.D.S.W.B.P.A.P. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. 1–9.
- Luo, Z., Zheng, J., Lu, Y., and Bregman, D.B. (2001). Ultraviolet radiation alters the phosphorylation of RNA polymerase II large subunit and accelerates its proteasome-dependent degradation. *Mutat. Res.* *486*, 259–274.

- Luse, D.S., Kochel, T., Kuempel, E.D., Coppola, J.A., and Cai, H. (1987). Transcription initiation by RNA polymerase II in vitro. At least two nucleotides must be added to form a stable ternary complex. *J. Biol. Chem.* *262*, 289–297.
- Mandal, S.S., Cho, H., Kim, S., Cabane, K., and Reinberg, D. (2002). FCP1, a phosphatase specific for the heptapeptide repeat of the largest subunit of RNA polymerase II, stimulates transcription elongation. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 7543–7552.
- Margaritis, T., and Holstege, F.C.P. (2008). Poised RNA polymerase II gives pause for thought. *Cell* *133*, 581–584.
- Mason, P.B., and Struhl, K. (2005). Distinction and Relationship between Elongation Rate and Processivity of RNA Polymerase II In Vivo. *Molecular Cell* *17*, 831–840.
- Matecic, M., Smith, D.L., Pan, X., Maqani, N., Bekiranov, S., Boeke, J.D., and Smith, J.S. (2010). A microarray-based genetic screen for yeast chronological aging factors. *PLoS Genet* *6*, e1000921.
- Mayer, A., Heidemann, M., Lidschreiber, M., Schrieck, A., Sun, M., Hintermair, C., Kremmer, E., Eick, D., and Cramer, P. (2012). CTD tyrosine phosphorylation impairs termination factor recruitment to RNA polymerase II. *Science* *336*, 1723–1725.
- McClellan, A.J., Xia, Y., Deutschbauer, A.M., Davis, R.W., Gerstein, M., and Frydman, J. (2007). Diverse cellular functions of the Hsp90 molecular chaperone uncovered using systems approaches. *Cell* *131*, 121–135.
- Meinhart, A., Kamenski, T., Hoepfner, S., Baumli, S., and Cramer, P. (2005). A structural perspective of CTD function. *Genes & Development* *19*, 1401–1415.
- Mermelstein, F., Yeung, K., Cao, J., Inostroza, J.A., Erdjument-Bromage, H., Eagelson, K., Landsman, D., Levitt, P., Tempst, P., and Reinberg, D. (1996). Requirement of a corepressor for Dr1-mediated repression of transcription. *Genes & Development* *10*, 1033–1048.
- Minaker, S.W., Filiatrault, M.C., Ben-Aroya, S., Hieter, P., and Stirling, P.C. (2013). Biogenesis of RNA polymerases II and III requires the conserved GPN small GTPases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *193*, 853–864.
- Mirón-García, M.C., Garrido-Godino, A.I., García-Molinero, V., Hernández-Torres, F., Rodríguez-Navarro, S., and Navarro, F. (2013). The prefoldin bud27 mediates the assembly of the eukaryotic RNA polymerases in an rpb5-dependent manner.

PLoS Genet 9, e1003297.

Morillo-Huesca, M., Vanti, M., and Chávez, S. (2006). A simple in vivo assay for measuring the efficiency of gene length-dependent processes in yeast mRNA biogenesis. *Febs J.* 273, 756–769.

Mosammaparast, N., and Pemberton, L.F. (2004). Karyopherins: from nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators. *Trends Cell Biol.* 14, 547–556.

Mosley, A.L., Pattenden, S.G., Carey, M., Venkatesh, S., Gilmore, J.M., Florens, L., Workman, J.L., and Washburn, M.P. (2009). Rtr1 is a CTD phosphatase that regulates RNA polymerase II during the transition from serine 5 to serine 2 phosphorylation. *Molecular Cell* 34, 168–178.

Narita, T., Yamaguchi, Y., Yano, K., Sugimoto, S., Chanarat, S., Wada, T., Kim, D.-K., Hasegawa, J., Omori, M., Inukai, N., et al. (2003). Human transcription elongation factor NELF: identification of novel subunits and reconstitution of the functionally active complex. *Mol. Cell. Biol.* 23, 1863–1873.

Nesser, N.K., Peterson, D.O., and Hawley, D.K. (2006). RNA polymerase II subunit Rpb9 is important for transcriptional fidelity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 3268–3273.

Neville, M., and Rosbash, M. (1999). The NES-Crm1p export pathway is not a major mRNA export route in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J.* 18, 3746–3756.

Nguyen, V.T., Giannoni, F., Dubois, M.F., Seo, S.J., Vigneron, M., Kédinger, C., and Bensaude, O. (1996). In vivo degradation of RNA polymerase II largest subunit triggered by alpha-amanitin. *Nucleic Acids Res.* 24, 2924–2929.

Orphanides, G., LeRoy, G., Chang, C.H., Luse, D.S., and Reinberg, D. (1998). FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes. *Cell* 92, 105–116.

Pal, M., and Luse, D.S. (2003). The initiation-elongation transition: lateral mobility of RNA in RNA polymerase II complexes is greatly reduced at +8/+9 and absent by +23. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 5700–5705.

Pei, Y., and Shuman, S. (2002). Interactions between fission yeast mRNA capping enzymes and elongation factor Spt5. *J. Biol. Chem.* 277, 19639–19648.

Peiró-Chova, L., and Estruch, F. (2007). Specific defects in different transcription complexes compensate for the requirement of the negative cofactor 2 repressor in

Saccharomyces cerevisiae. *Genetics* 176, 125–138.

Peiró-Chova, L., and Estruch, F. (2009). The yeast RNA polymerase II-associated factor Iwr1p is involved in the basal and regulated transcription of specific genes. *J. Biol. Chem.* 284, 28958–28967.

Pemberton, L.F., Rosenblum, J.S., and Blobel, G. (1999). Nuclear import of the TATA-binding protein: mediation by the karyopherin Kap114p and a possible mechanism for intranuclear targeting. *J. Cell Biol.* 145, 1407–1417.

Pemberton, L.F., and Paschal, B.M. (2005). Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic* 6, 187–198.

Peng, J., Schwartz, D., Elias, J.E., Thoreen, C.C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D., and Gygi, S.P. (2003). A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat. Biotechnol.* 21, 921–926.

Perales, R., and Bentley, D. (2009). “Cotranscriptionality”: the transcription elongation complex as a nexus for nuclear transactions. *Molecular Cell* 36, 178–191.

Plateau, P., Fromant, M., Schmitter, J.M., Buhler, J.M., and Blanquet, S. (1989). Isolation, characterization, and inactivation of the APA1 gene encoding yeast diadenosine 5',5''-P₁,P₄-tetraphosphate phosphorylase. *J. Bacteriol.* 171, 6437–6445.

Pouton, C.W., Wagstaff, K.M., Roth, D.M., Moseley, G.W., and Jans, D.A. (2007). Targeted delivery to the nucleus. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 698–717.

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

Pugh, B.F. (2000). Control of gene expression through regulation of the TATA-binding protein. *Gene* 255, 1–14.

Pugh, B.F., and Tjian, R. (1991). Transcription from a TATA-less promoter requires a multisubunit TFIID complex. *Genes & Development* 5, 1935–1945.

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

Rakwalska, M., and Rospert, S. (2004). The ribosome-bound chaperones RAC and Ssb1/2p are required for accurate translation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.*

Cell. Biol. 24, 9186–9197.

Ratner, J.N., Balasubramanian, B., Corden, J., Warren, S.L., and Bregman, D.B. (1998). Ultraviolet radiation-induced ubiquitination and proteasomal degradation of the large subunit of RNA polymerase II. Implications for transcription-coupled DNA repair. *J. Biol. Chem.* 273, 5184–5189.

Reid, J., and Svejstrup, J.Q. (2004). DNA damage-induced Def1-RNA polymerase II interaction and Def1 requirement for polymerase ubiquitylation in vitro. *J. Biol. Chem.* 279, 29875–29878.

Ribar, B., Prakash, L., and Prakash, S. (2007). ELA1 and CUL3 are required along with ELC1 for RNA polymerase II polyubiquitylation and degradation in DNA-damaged yeast cells. *Mol. Cell. Biol.* 27, 3211–3216.

Rodríguez-Gil, A., García-Martínez, J., Pelechano, V., Muñoz-Centeno, M. de L.C., Geli, V., Pérez-Ortín, J.E., and Chávez, S. (2010). The distribution of active RNA polymerase II along the transcribed region is gene-specific and controlled by elongation factors. *Nucleic Acids Res.* 38, 4651–4664.

Roy, A., Kucukural, A., and Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* 5, 725–738.

Sampath, V., and Sathale, P. (2005). Rpb4 and Rpb7: a sub-complex integral to multi-subunit RNA polymerases performs a multitude of functions. *IUBMB Life* 57, 93–102.

Schluesche, P., Stelzer, G., Piaia, E., Lamb, D.C., and Meisterernst, M. (2007). NC2 mobilizes TBP on core promoter TATA boxes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 1196–1201.

Schmitt, C., Kobbe, von, C., Bachi, A., Panté, N., Rodrigues, J.P., Boscheron, C., Rigaut, G., Wilm, M., Séraphin, B., Carmo-Fonseca, M., et al. (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. *Embo J.* 18, 4332–4347.

Schmittgen, T.D., and Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3, 1101–1108.

Seizl, M., Hartmann, H., Hoeg, F., Kurth, F., Martin, D.E., Söding, J., and Cramer, P. (2011). A conserved GA element in TATA-less RNA polymerase II promoters. *PLoS ONE* 6, e27595.

Selitrennik, M., Duek, L., Lotan, R., and Choder, M. (2006). Nucleocytoplasmic shuttling of the Rpb4p and Rpb7p subunits of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase II by two pathways. *Eukaryotic Cell* 5, 2092–2103.

Shaw, R.J., and Reines, D. (2000). *Saccharomyces cerevisiae* transcription elongation mutants are defective in PUR5 induction in response to nucleotide depletion. *Mol. Cell. Biol.* 20, 7427–7437.

Shilatifard, A. (1998). Factors regulating the transcriptional elongation activity of RNA polymerase II. *Faseb J.* 12, 1437–1446.

Shilatifard, A., Duan, D.R., Haque, D., Florence, C., Schubach, W.H., Conaway, J.W., and Conaway, R.C. (1997). ELL2, a new member of an ELL family of RNA polymerase II elongation factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 3639–3643.

Shilatifard, A., Conaway, R.C., and Conaway, J.W. (2003). The RNA polymerase II elongation complex. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 693–715.

Sigurdsson, S., Dirac-Svejstrup, A.B., and Svejstrup, J.Q. (2010). Evidence that transcript cleavage is essential for RNA polymerase II transcription and cell viability. *Molecular Cell* 38, 202–210.

Sikorski, T.W., and Buratowski, S. (2009). The basal initiation machinery: beyond the general transcription factors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 344–351.

Simos, G., Sauer, A., Fasiolo, F., and Hurt, E.C. (1998). A conserved domain within Arc1p delivers tRNA to aminoacyl-tRNA synthetases. *Molecular Cell* 1, 235–242.

Simos, G., Segref, A., Fasiolo, F., Hellmuth, K., Shevchenko, A., Mann, M., and Hurt, E.C. (1996). The yeast protein Arc1p binds to tRNA and functions as a cofactor for the methionyl- and glutamyl-tRNA synthetases. *Embo J.* 15, 5437–5448.

Sims, R.J., Belotserkovskaya, R., and Reinberg, D. (2004). Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it. *Genes & Development* 18, 2437–2468.

Smale, S.T., and Kadonaga, J.T. (2003). The RNA polymerase II core promoter. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 449–479.

Somesh, B.P., Reid, J., Liu, W.-F., Søgaard, T.M.M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Svejstrup, J.Q. (2005). Multiple Mechanisms Confining RNA Polymerase II Ubiquitylation to Polymerases Undergoing Transcriptional Arrest. *Cell* 121, 913–923.

Somesh, B.P., Sigurdsson, S., Saeki, H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Svejstrup, J.Q. (2007). Communication between distant sites in RNA polymerase II through ubiquitylation factors and the polymerase CTD. *Cell* *129*, 57–68.

Stade, K., Ford, C.S., Guthrie, C., and Weis, K. (1997). Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* *90*, 1041–1050.

Staresinic, L., Walker, J., Dirac-Svejstrup, A.B., Mitter, R., and Svejstrup, J.Q. (2011). GTP-dependent binding and nuclear transport of RNA polymerase II by Npa3 protein. *J. Biol. Chem.* *286*, 35553–35561.

Svejstrup, J.Q. (2012). Transcription: another mark in the tail. *Embo J.* *31*, 2753–2754.

Tan, S., Aso, T., Conaway, R.C., and Conaway, J.W. (1994). Roles for both the RAP30 and RAP74 subunits of transcription factor IIF in transcription initiation and elongation by RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* *269*, 25684–25691.

Thomas, M.C., and Chiang, C.-M. (2006). The general transcription machinery and general cofactors. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *41*, 105–178.

Ulrich, H.D., and Walden, H. (2010). Ubiquitin signalling in DNA replication and repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 479–489.

Uptain, S.M., and Chamberlin, M.J. (1997). Escherichia coli RNA polymerase terminates transcription efficiently at rho-independent terminators on single-stranded DNA templates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *94*, 13548–13553.

van Werven, F.J., van Bakel, H., van Teeffelen, H.A.A.M., Altelaar, A.F.M., Koerkamp, M.G., Heck, A.J.R., Holstege, F.C.P., and Timmers, H.T.M. (2008). Cooperative action of NC2 and Mot1p to regulate TATA-binding protein function across the genome. *Genes & Development* *22*, 2359–2369.

Vassilyev, D.G., Sekine, S.-I., Laptenko, O., Lee, J., Vassilyeva, M.N., Borukhov, S., and Yokoyama, S. (2002). Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution. *Nature* *417*, 712–719.

Verma, R., Oania, R., Fang, R., Smith, G.T., and Deshaies, R.J. (2011). Cdc48/p97 mediates UV-dependent turnover of RNA Pol II. *Molecular Cell* *41*, 82–92.

Wada, T., Takagi, T., Yamaguchi, Y., Ferdous, A., Imai, T., Hirose, S., Sugimoto, S., Yano, K., Hartzog, G.A., Winston, F., et al. (1998). DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of

human Spt4 and Spt5 homologs. *Genes & Development* 12, 343–356.

Wagner, S.A., Beli, P., Weinert, B.T., Nielsen, M.L., Cox, J., Mann, M., and Choudhary, C. (2011). A proteome-wide, quantitative survey of in vivo ubiquitylation sites reveals widespread regulatory roles. *Mol. Cell Proteomics* 10, M111.013284.

Walmacq, C., Kireeva, M.L., Irvin, J., Nedialkov, Y., Lubkowska, L., Malagon, F., Strathern, J.N., and Kashlev, M. (2009). Rpb9 subunit controls transcription fidelity by delaying NTP sequestration in RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* 284, 19601–19612.

Watanabe, M., Watanabe, D., Nogami, S., Morishita, S., and Ohya, Y. (2009). Comprehensive and quantitative analysis of yeast deletion mutants defective in apical and isotropic bud growth. *Curr. Genet.* 55, 365–380.

Wild, T.T., and Cramer, P.P. (2012). Biogenesis of multisubunit RNA polymerases. *Trends Biochem Sci* 37, 99–105.

Wilson, M.D., Harreman, M., and Svejstrup, J.Q. (2013a). Ubiquitylation and degradation of elongating RNA polymerase II: The last resort. *Biochim. Biophys. Acta* 1829, 151–157.

Wilson, M.D., Harreman, M., Taschner, M., Reid, J., Walker, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Svejstrup, J.Q. (2013b). Proteasome-mediated processing of def1, a critical step in the cellular response to transcription stress. *Cell* 154, 983–995.

Winston, F., Dollard, C., and Ricupero-Hovasse, S.L. (1995). Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C. *Yeast* 11, 53–55.

Wood, A., and Shilatifard, A. (2006a). Bur1/Bur2 and the Ctk complex in yeast: the split personality of mammalian P-TEFb. *Cell Cycle* 5, 1066–1068.

Wood, A., and Shilatifard, A. (2006b). Transcriptional blackjack with p21. *Genes & Development* 20, 643–647.

Woudstra, E.C., Gilbert, C., Fellows, J., Jansen, L., Brouwer, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Svejstrup, J.Q. (2002). A Rad26-Def1 complex coordinates repair and RNA pol II proteolysis in response to DNA damage. *Nature* 415, 929–933.

Yamaguchi, Y., Wada, T., Watanabe, D., Takagi, T., Hasegawa, J., and Handa, H. (1999). Structure and function of the human transcription elongation factor DSIF. *J. Biol. Chem.* *274*, 8085–8092.

Young, E.T., Dombek, K.M., Tachibana, C., and Ideker, T. (2003). Multiple pathways are co-regulated by the protein kinase Snf1 and the transcription factors Adr1 and Cat8. *J. Biol. Chem.* *278*, 26146–26158.

Yudkovsky, N., Ranish, J.A., and Hahn, S. (2000). A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator. *Nature* *408*, 225–229.

Zanton, S.J., and Pugh, B.F. (2004). Changes in genomewide occupancy of core transcriptional regulators during heat stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* *101*, 16843–16848.

Zhang, G., Campbell, E.A., Minakhin, L., Richter, C., Severinov, K., and Darst, S.A. (1999). Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell* *98*, 811–824.

Zhao, R., Davey, M., Hsu, Y.-C., Kaplanek, P., Tong, A., Parsons, A.B., Krogan, N., Cagney, G., Mai, D., Greenblatt, J., et al. (2005). Navigating the chaperone network: an integrative map of physical and genetic interactions mediated by the hsp90 chaperone. *Cell* *120*, 715–727.

Zhao, R., Kakihara, Y., Gribun, A., Huen, J., Yang, G., Khanna, M., Costanzo, M., Brost, R.L., Boone, C., Hughes, T.R., et al. (2008). Molecular chaperone Hsp90 stabilizes Pih1/Nop17 to maintain R2TP complex activity that regulates snoRNA accumulation. *J. Cell Biol.* *180*, 563–578.