

Biologicas
448
T.D

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
FACULTAD DE CIÈNCIES BIOLÒGIQUES

**ESTUDIO ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LA REGIÓN 3' DEL
GEN *FBP1* DE *Saccharomyces cerevisiae***

Trabajo presentado por
Agustín Aranda Fernández
para optar al grado de
Doctor en Ciencias Biológicas

UMI Number: U603055

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U603055

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
BIBLIOTECA CIÈNCIES

Biologicas

Nº Registre 9867
DATA 15-I-97

SIGNATURA
448 TD
Nº LIBIS: 120800083

Don Marcel·lí del Olmo i Muñoz, Doctor en Ciències Biològiques y Professor Ayudante del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de València y Don José Enrique Pérez Ortín, Doctor en Ciències Biològiques y Professor Titular del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de València.

CERTIFICAN: que Don Agustín Aranda Fernández ha realizado bajo su dirección en este laboratorio el trabajo con el título de "Estudio estructural y funcional de la región 3' del gen *FBP1* de *Saccharomyces cerevisiae*".

Valencia, 23 de septiembre de 1996



Fdo: Marcel·lí del Olmo i Muñoz



Fdo: José Enrique Pérez Ortín

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	2
1.- El gen <i>FBP1</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
2.- Estructuras alternativas al DNA-B	4
3.- Maduración del extremo 3' de los mensajeros de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
3.1.- Señales de poliadenilación	10
3.2.- Maquinaria bioquímica implicada en la poliadenilación	13
4.- Terminación de la transcripción	15
5.- Objetivos	17
MATERIALES Y MÉTODOS	19
1.- Productos	20
1.1.- Reactivos	20
1.2.- Enzimas	20
1.3.- Medios de cultivo	20
1.4.- Cepas	21
1.5.- Oligonucleótidos	22
1.6.- Plásmidos y bacteriófagos	22
2.- Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos	23
2.1.- Digestiones con endonucleasas de restricción	23
2.2.- Aislamiento de DNA a partir de genes	23
2.3.- Fosforilación de oligonucleótidos	24
2.4.- Desfosforilación del DNA	24
2.5.- Ligamientos	25
2.6.- Mutagénesis dirigida	25
2.7.- Deleciones seriadas	26
2.8.- Construcción de plásmidos	26
2.9.- Marcaje radiactivo del DNA	29
3.- Preparación del material biológico	29

3.1.- Transformación de <i>E. coli</i>	29
3.2.- Aislamiento de plásmidos	30
3.3.- Digestiones con nucleasas de plásmidos superenrollados	32
3.4.- Transformación de levadura	32
3.5.- Extracción de RNA total de levadura	33
3.6.- RT-PCR	34
3.7.- Procesamiento <i>in vitro</i> de pre-RNAs	35
3.8.- Ensayos de terminación de la transcripción mediante la medición de la estabilidad de plásmidos	36
3.9.- <i>Transcription run-on</i> (TRO)	36
3.10.- Obtención de protoplastos de levadura	37
3.11.- Obtención de núcleos de levadura	37
3.12.- Digestión con nucleasas de protoplastos y núcleos de levadura	37
3.13.- Mapeo de los sitios de corte de las nucleasas	38
3.14.- <i>Footprinting in vivo</i>	39
4.- Técnicas analíticas	40
4.1.- Electroforesis de DNA en geles de agarosa	40
4.2.- Electroforesis de RNA en geles de agarosa desnaturalizantes	40
4.3.- Electroforesis de DNA y RNA en geles de poliacrilamida	41
4.4.- Transferencia de ácidos nucleicos a filtros	41
4.5.- Hibridación de DNA y RNA sobre filtros con sondas radiactivas	42
4.6.- Autorradiografía de los filtros hibridados	43
4.7.- Cuantificación de los filtros hibridados	43
4.8.- Valoración de actividades enzimáticas	43
5.- Métodos informáticos	44
5.1.- Predicción de estructuras secundarias de RNA y DNA	44
5.2.- Predicción de sitios de desestabilización del DNA inducidos por estrés superhelicoidal	45
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
1.- Estudio de la estructura <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de la secuencia d(TA) _n situada en el extremo 3' del gen <i>FBP1</i>	47
1.1.- Estudio mediante mutagénesis de la estructura adoptada <i>in vitro</i> por la secuencia d(TA) _n	50
1.1.1.- Estudio <i>in vitro</i> del efecto de las mutaciones SM, DM y D3 realizadas sobre la secuencia d(TA) _n utilizando Endonucleasa VII y nucleasa S1.	50
1.1.2.- Predicciones teóricas acerca de la influencia de	

las deleciones internas realizadas sobre la secuencia d(TA) _n en su capacidad de desapareamiento	53
1.1.3.- Estudio del efecto de las deleciones internas realizadas sobre la secuencia d(TA) _n en su capacidad de desapareamiento <i>in vitro</i>	55
1.2.- Análisis de la estructura <i>in vivo</i> de la secuencia d(TA) _n	57
1.2.1.- Efecto de la deleción en la secuencia d(TA) _n en la sensibilidad a S1 en cromatina	57
1.2.2.- <i>Footprinting in vivo</i> de la sensibilidad a S1 en cromatina	58
1.3.- Estudio computacional sobre secuencias potencialmente desapareables en genes de levadura	62
1.3.1.- Estudio de la capacidad de desapareamiento de regiones presentes en genes de levadura bien caracterizados	62
1.3.2.- Estudio sistemático del cromosoma III de levadura	63
1.4.- Efecto en la cromatina de la eliminación de la secuencia d(TA) _n	69
2.- Estudio de las secuencias implicadas en la poliadenilación y terminación de la transcripción del gen <i>FBP1</i>	74
2.1.- Estudio sobre la capacidad de producir poliadenilación bidireccional de un fragmento de 397 pb del gen <i>FBP1</i>	74
2.1.1.- Estudio de la eficiencia de la poliadenilación <i>in vivo</i> del fragmento 397 utilizando el vector pME729	76
2.1.2.- Mapeo de los sitios poli(A) mediante RT-PCR	79
2.2.- Delimitación por deleciones seriadas de la región mínima requerida para el procesamiento <i>in vivo</i>	82
2.2.1.- Deleciones por 5'	82
2.2.2.- Deleciones por 3'	84
2.2.3.- Estudio de la capacidad de poliadenilación de repeticiones invertidas	87
2.3.- Efecto de las mutaciones puntuales y deleciones internas en la secuencia d(TA) _n en la eficiencia de poliadenilación	88
2.3.1.- Mutaciones puntuales	88
2.3.2.- Deleciones internas	91
2.3.3.- Estudio de la deleción D3 y su implicación en la caída de niveles de mensajero	96
2.4.- Determinación de las secuencias implicadas en el procesamiento <i>in vitro</i> del pre-RNA de <i>FBP1</i>	100
2.4.1.- Estudios con extractos totales	101
2.4.2.- Estudios con factores de corte purificados	106

2.5.- Terminación de la transcripción en el gen <i>FBP1</i>	111
2.5.1.- Estudio de la terminación de la transcripción mediante interferencia transcripcional	112
2.5.2.- Estudio mediante <i>run-on</i> de la terminación de la transcripción	116
CONCLUSIONES	119
BIBLIOGRAFÍA	122

ABREVIATURAS

Ap	Ampicilina
Bisacrilamida	N,N'-metilen-bis-acrilamida
BSA	Seroalbúmina bovina
CFI	Factor de corte I
CFII	Factor de corte II
CPSF	Factor de especificidad de corte y poliadenilación
CstF	Factor estimulador de corte
DNA pol	DNA polimerasa
DNasa I	Desoxirribonucleasa I
D.O.	Densidad Óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Sal disódica del ácido etilén diamino tetraacético
Endo VII	Endonucleasa VII del fago T4
FBPasa	Fructosa-1,6-bisfosfatasa
kb	kilo bases
LB	Medio de Luria-Bertani
MNasa	Nucleasa de micrococo
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
ORF	Pauta Abierta de Lectura
PAB	Proteína de unión a la cola poli(A)
PAP	Poli(A) polimerasa
pb	pares de bases
PEG	Polietilenglicol
PFI	Factor de poliadenilación I
p/v	peso/volumen
RNA pol	RNA polimerasa
RNasa	Ribonucleasa
S1	Nucleasa S1 de <i>Aspergillus oryzae</i>
SH	Sitio hipersensible
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etilén diamino
TRO	<i>Transcription Run-On</i>
UV	Ultravioleta
v/v	volumen/volumen
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido
3'-UTR	Región 3' no codificante

INTRODUCCION

En los últimos tiempos la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se ha convertido en uno de los organismos mejor conocidos y más útiles para la investigación de los procesos básicos de un ser vivo, especialmente la expresión génica. La transcripción tiene un inicio y un final perfectamente diferenciados. Ambos procesos son esenciales para comprender la expresión génica, sin embargo existe un desequilibrio claro entre lo que se conoce sobre las secuencias implicadas en el inicio de la transcripción y su regulación y lo que se sabe acerca de las señales de poliadenilación/ terminación de la transcripción. Asimismo el papel de la cromatina en la regulación de la transcripción ha sido exhaustivamente caracterizado en las regiones promotoras, careciéndose de ninguna evidencia que indique una función de la cromatina en el lado opuesto de la unidad transcripcional. Por ello en este trabajo hemos realizado un estudio completo del flanco 3' del gen *FBP1* de *Saccharomyces cerevisiae*, tanto a nivel de las secuencias implicadas en el procesamiento de los mensajeros como a nivel estructural.

1.- EL GEN *FBP1* DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

El gen *FBP1* es el gen estructural de la fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa). Este enzima cataliza una reacción clave en la gluconeogénesis: la hidrólisis de la fructosa-1,6-bisfosfato a fructosa-6-fosfato. En microorganismos la fructosa bisfosfatasa es esencial para el crecimiento en fuentes de carbono diferentes de los azúcares.

Existen dos mecanismos que gobiernan esta reacción en *S. cerevisiae*. El primero de ellos es el conocido como **represión catabólica**: cuando la levadura crece en las hexosas fermentables glucosa, manosa o fructosa la síntesis de este enzima está muy disminuida; una vez agotada la glucosa la velocidad de síntesis del enzima aumenta (Funayama *et al.*, 1980). La represión catabólica es un sistema de regulación complejo que afecta a multitud de genes. Pero la glucosa además de reprimir la síntesis de enzimas sujetos a represión catabólica, inactiva irreversiblemente algunos enzimas entre los que se encuentra la FBPasa. Esta inactivación inducida por glucosa se conoce con el nombre de **inactivación catabólica** (Holzer, 1976). Según todo lo dicho existen diversos mecanismos de control para adaptar la célula a la presencia de glucosa como fuente de carbono. Como reacción inmediata la FBPasa se fosforila para reducir la actividad enzimática y posteriormente, y de forma simultánea, se degrada la mayoría del enzima por proteólisis y se reprime la transcripción del gen. La presencia de todos estos mecanismos reguladores indica muy probablemente la necesidad de un control preciso de la reacción fructosa-bisfosfatasa así como de la transcripción del gen *FBP1*.

Dicho gen ha sido clonado (Sedivy y Fraenkel, 1985) y secuenciado (Entian *et al.*, 1988). La ORF está constituida por 1044 pb, correspondientes a 348 codones que codifican para una proteína de peso molecular 38131 (Entian *et al.*, 1988).

El análisis de la secuencia del gen ha permitido detectar algunas características interesantes (Rogers *et al.*, 1988). Así, en el promotor se ha determinado mediante experimentos de delección que la caja TATA se encuentra a -120 del inicio de la traducción (Mercado y Gancedo, 1992). La comparación de la región del promotor con la de otros genes reprimidos por glucosa no revela más similitudes que quizás la presencia de una serie continua de 9 timinas en -245, que se ha considerado posiblemente implicada en la represión por glucosa (Russell *et al.*, 1983) o en la expresión constitutiva (Iyer y Struhl, 1995). Se han localizado mediante análisis por delección dos regiones activadoras, UAS₁ y UAS₂, separadas por 30 pb, y se han caracterizado los factores proteicos que las reconocen, Dap1p y Dap1p (Niederacher *et al.*, 1992). También se han localizado dos sitios de unión de la proteína reguladora Mig1p, demostrándose que uno de ellos está claramente implicado en la represión catabólica (Mercado y Gancedo 1992). Recientemente se ha observado que la desrepresión del gen es dependiente de la acción del factor transcripcional Cat8p, cuya expresión a su vez está reprimida por Mig1p y activada por la proteína quinasa Snf1p/Snf4p, implicada en la desrepresión de los genes reprimidos por glucosa (Hedges *et al.*, 1995). Se han encontrado otros dos elementos que forman complejos DNA-proteína específicos y que están implicados en la activación del gen, aunque carecen de homología con ningún consenso propio de activadores transcripcionales conocido (Vicent y Gancedo, 1995).

En nuestro laboratorio se ha caracterizado exhaustivamente la estructura de la cromatina del gen (del Olmo *et al.*, 1993). Destacan por un lado la presencia en 3' y de forma constitutiva de un sitio hipersensible a la acción de varias nucleasas, y por otro, un aumento de la sensibilidad a nucleasas en el promotor durante la inducción del gen, indicando que esa zona se hace más accesible a la acción de los activadores transcripcionales. En la región codificante los nucleosomas se encuentran posicionados.

2.- ESTRUCTURAS ALTERNATIVAS AL DNA-B

El DNA es una molécula dinámica cuya estructura local es dependiente de la secuencia y es sensible a cambios tanto en el entorno molecular como en la topología global. Este polimorfismo estructural abarca desde distorsiones leves hasta desviaciones importantes de la forma B canónica del DNA. El abanico de estructuras no-B alternativas del DNA es amplio (para una revisión ver Palecek, 1991). Los principales tipos de estructuras alternativas son:

desnaturalizaciones locales, Z-DNA, triples hélices y cruciformes (Figura 1). En condiciones fisiológicas estas estructuras están desfavorecidas termodinámicamente en comparación con la estructura B del DNA y requieren un aporte de energía y una secuencia favorable. La energía necesaria para estabilizar dichas estructuras es aportada por el superenrollamiento negativo (Lilley y Markham, 1983; Singleton *et al.*, 1982). Mientras que se sabe que los genomas procarióticos están sometidos a estrés torsional, se cree que la mayoría del DNA eucariótico no está sometido a dicho estrés, ya que el superenrollamiento inherente está acomodado en el enrollamiento del DNA alrededor de los octámeros de histonas en los nucleosomas. A pesar de ello, varios mecanismos pueden producir estrés torsional localizado o transitorio en el DNA eucariótico. El más importante es el proceso mismo de la transcripción (Liu y Wang, 1987), pero hay otros como el desplazamiento de nucleosomas, la unión de factores transcripcionales y la acetilación de histonas. Este superenrollamiento local del DNA genómico eucariótico puede producir la formación y desaparición *in vivo* de estructuras locales de DNA no-B.

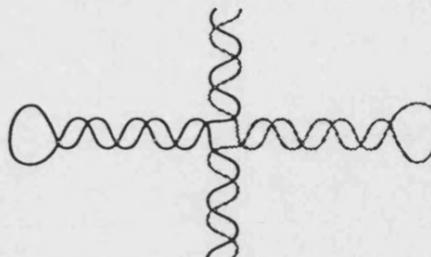
De entre todas estas estructuras no canónicas del DNA, la más extendida y de una mayor importancia es la desnaturalización local del DNA. Es la única estructura alternativa al DNA-B que no necesita de una secuencia específica (aunque están favorecidas las secuencias ricas en A+T, ya que el enlace entre ambas bases es más débil que el que se produce entre pares G-C) y que se ha de producir necesariamente durante procesos tan importantes como la replicación y la transcripción. El superenrollamiento puede inducir la formación de regiones localmente desapareadas en sitios definidos del DNA. Experimentos de digestiones de nucleasas han demostrado que dicha desnaturalización localizada del DNA se produce en regiones reguladoras específicas. Por ejemplo, en el plásmido pBR322 se encuentra confinada en dos regiones: el extremo 3' del gen de la β -lactamasa y el promotor del mismo gen (Kowalski *et al.*, 1988). El origen de replicación *oriC* de *Escherichia coli* también sufre una desnaturalización específica (Kowalski y Eddy, 1989) y la susceptibilidad a la desnaturalización inducida por superenrollamiento es necesaria para la replicación *in vivo*. También en orígenes de replicación eucarióticos, tales como las secuencias de replicación autónoma (ARS) de levadura se requiere una desnaturalización para que la replicación tenga lugar (Umek y Kowalski, 1988), siendo la capacidad de desnaturalización una característica recurrente en todas las ARS estudiadas (Natale *et al.*, 1993). Las regiones en las cuales el DNA se une a la matriz nuclear poseen una capacidad intrínseca de desnaturalización, correlacionándose ésta con la capacidad de actuar como *enhancers* de la transcripción (Bode *et al.*, 1992). Por último, en el promotor del oncogen humano *c-myc* se ha detectado *in vivo* la presencia de regiones desapareadas que son blancos para proteínas que se unen a DNA de simple cadena y que están implicadas en la regulación de la actividad del gen (Michelotti *et al.*, 1996).

CADENAS SENCILLAS



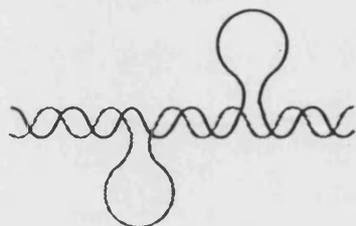
Simetría: ninguna
 Motivo: riqueza en A+T

CRUCIFORMES



Simetría: repetición invertida
 Motivo: ninguno

DESLIZAMIENTOS



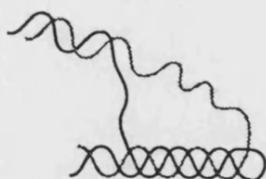
Simetría: repetición directa
 Motivo: riqueza en pirimidinas o purinas
 en la misma hebra

HÉLICE ALTERNANTE B-Z



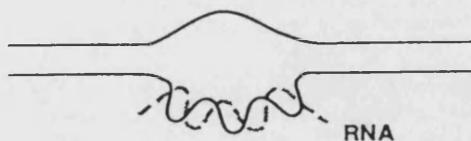
Simetría: ninguna
 Motivo: (GC)_n

TRIPLES HÉLICES



Simetría: especular
 Motivo: riqueza en pirimidinas o purinas
 en la misma hebra

LAZOS D



Simetría: ninguna
 Motivo: riqueza en A+T

Figura 1.- Estructuras de DNA alternativas a la forma B. Se indica en cada caso la simetría y el motivo de secuencia que las determina.

El desarrollo de un algoritmo que calcula la probabilidad de que una determinada secuencia sufra una transición hacia un estado desnaturalizado bajo condiciones de estrés superhelicoidal (Benham, 1992) ha permitido determinar que dichas transiciones ocurren preferentemente en regiones reguladoras (Benham, 1993). En levadura, las regiones codificantes resultan ser estables, mientras que los promotores y más intensamente las regiones terminadoras poseen una elevada capacidad de desnaturalización (Benham, 1996).

Un segmento de DNA que contenga secuencias repetidas invertidas en su secuencia puede adoptar, en principio, tres conformaciones estables diferentes. Una es la estructura doble helicoidal normal, otra es una estructura cruciforme con apareamiento interno dentro de una misma cadena entre secuencias complementarias y la última es un estado desnaturalizado que puede actuar como intermediario entre los dos primeros estados. Estudios teóricos (Benham, 1982; Vologodskii y Frank-Kamenetskii, 1982) y datos experimentales (Mizuuchi *et al.*, 1982; Lilley y Markham, 1983; Kowalski y Eddy, 1989) han demostrado que la formación de estructuras tales como cruciformes o estados desnaturalizados está energéticamente desfavorecida, por lo cual sólo puede aparecer bajo el estrés torsional del superenrollamiento negativo. Incluso en este caso la formación de cruciformes puede ser cinéticamente desfavorable en condiciones fisiológicas (Courey y Wang, 1983; Sinden *et al.*, 1983). Sin embargo, cruciformes en repeticiones invertidas ricas en A+T son cinéticamente más fáciles de formar porque la forma de dúplex B competidora es menos estable en regiones A+T que en aquellas ricas en C+G (Panatoyatos y Wells, 1981). Todos los mecanismos propuestos para la extrusión de los cruciformes (Lilley, 1989) postulan la existencia de un intermediario consistente en una región desnaturalizada, por lo cual ambos tipos de estructuras, cruciformes y regiones desapareadas pueden coexistir en palíndromos ricos en A+T.

Para detectar la presencia de estructura de DNA anómalas en plásmidos superenrollados se han utilizado nucleasas específicas de estructura. Dos de las más utilizadas son la nucleasa S1 y la endonucleasa VII del fago T4. La nucleasa S1 es una nucleasa específica de DNA de cadena sencilla que se ha utilizado mucho para detectar regiones desnaturalizadas, cortando en el lazo del cruciforme cuando este se produce (Lilley, 1980; Nickol y Felsenfeld, 1983; Pulleyblank *et al.*, 1985). La endonucleasa VII es específica de estructuras tipo cruciforme, cortando a nivel de las zonas de contacto DNA B-cruciforme (Greaves *et al.*, 1985; Pottmeyer y Kemper, 1992). Se ha utilizado con el mismo fin otras nucleasas específicas de cadena sencilla, como la nucleasa de judía (*mung bean*; Umek y Kowalski, 1987), la nucleasa Ba/31 (Lilley y Hallam, 1984) y la nucleasa P1 (Blaho *et al.*, 1988). Otra nucleasa específica de cruciformes es la endonucleasa I del fago T7 (Panatoyatos y Wells, 1981). También se ha purificado de levadura una endonucleasa capaz de resolver uniones Holliday y cruciformes (Jensch *et al.*, 1989). Se ha

clonado el gen de levadura que codifica para esta actividad, el *CCE1*, demostrándose que los mutantes *cce1* no muestran ningún defecto apreciable en el crecimiento (Kleff *et al.*, 1992). Se ha localizado a Cce1p en la mitocondria, y se postula que tenga alguna función en la replicación del genoma mitocondrial.

Otra manera de detectar estructuras anómalas de DNA es utilizar ciertos compuestos químicos que reaccionan con las bases de DNA cuando están expuestas al medio en estas inusuales estructuras. Por ejemplo, el cloro y bromoacetaldehído reconocen grupos en C y A implicados en la formación de los puentes de hidrógeno Watson-Crick, y que por lo tanto no son accesibles excepto en las estructuras de simple cadena (Kohwi y Kohwi-Shigematsu, 1988). El tetróxido de osmio reacciona principalmente con T desapareadas (Palecek *et al.*, 1990), al igual que el KMnO_4 (Borowiec *et al.*, 1987), mientras que el dietilpirocarbonato (DEPC) reacciona principalmente con purinas (Herr 1985).

Mediante digestiones con nucleasas ha sido posible detectar la existencia de horquillas *in vitro* en diferentes secuencias de DNA con palíndromes en condiciones de superenrollamiento negativo: virus ϕX174 (Lilley, 1980), plásmido ColE1 (Lilley y Hallam, 1984), plásmido pBR322 (Panayotatos y Wells, 1981; Singleton y Wells, 1982), operador *lac* (Sinden *et al.*, 1983), etc.

Recientemente ha sido posible encontrar evidencias sobre la existencia de cruciformes *in vivo* en algunos casos. La primera de ellas fue obtenida por Haniford y Pulleyblank (1985) con una secuencia de 34 pb $d(\text{AT})_n-d(\text{AT})_n$ capaz de formar cruciformes en condiciones de superenrollamiento como las que existen en *E. coli in vivo*. Resultados en este sentido han sido obtenidos también en *E. coli* por Horwitz y Loeb (1988) que han observado la existencia de cruciformes en palíndromes situados en el promotor del gen *tet* de pBR322. Para los valores de densidad superhelicoidal en que el cruciforme existe la transcripción de este gen está inhibida *in vivo*, mientras que si se relaja el superenrollamiento mediante inhibición con DNA girasa aumenta la expresión del gen. Estos resultados sugieren además una posible función de los cruciformes (y no solamente de su secuencia) en la regulación de la expresión génica. Se ha comprobado también en este mismo organismo la formación de cruciformes $(dA-dT)_n$ en respuesta a situaciones de estrés (inhibición de la síntesis de proteínas, anaerobiosis y choque osmótico) (Dayn *et al.*, 1991) y al aumento del superenrollamiento negativo causado por la transcripción (Dayn *et al.*, 1992). Mediante entrecruzamiento de las cadenas de DNA *in vivo* con psoralenos y luz ultravioleta se ha demostrado que en *E. coli* se forma cruciforme en una determinada secuencia invertida en el 0.01-1% de las ocasiones (Sinden *et al.*, 1991). El porcentaje aumenta a 0.03-50% en una cepa *topA* con un elevado superenrollamiento negativo. No hay evidencia clara acerca de la presencia de cruciformes *in vivo* en eucariotas. Experimentos llevados a cabo con anticuerpos monoclonales anti-cruciforme indican que existe

un patrón no uniforme de marcado en núcleos de mamíferos detenidos en el ciclo celular entre las fases G1 y S (Ward *et al.*, 1990); este patrón desaparece al desbloquear el ciclo celular, lo que indica que pueden existir cruciformes en los núcleos de mamíferos y pueden estar implicados en la replicación, posiblemente en el inicio de la misma.

En nuestro laboratorio se ha descrito la presencia de un sitio hipersensible a la acción de varias nucleasas (DNasa I, MNasa, S1 y nucleasas endógenas) en la cromatina del extremo 3' del gen *FBP1* de *S. cerevisiae* (del Olmo *et al.*, 1993). La misma región es, además, sensible a DNasa I, MNasa, nucleasa S1 y endonucleasa VII en DNA desnudo. Observando la secuencia del gen en esa región se comprobó que coincidía con una zona natural d(TA)_n alternante que es capaz de adoptar teóricamente una estructura de tipo cruciforme. Para estudiarla se utilizaron varias nucleasas. Las pruebas realizadas con la nucleasa S1 en DNA desnudo indican que la sensibilidad a esta nucleasa depende del estado de superenrollamiento, el cual resulta imprescindible para mantener de forma estable un cruciforme. El corte de esta nucleasa se produce exactamente en el lazo que formaría el cruciforme (del Olmo y Pérez-Ortín 1993). La digestión con endonucleasa VII producía cortes en ambos extremos de la secuencia (TA)_n, lo cual es consecuente con el reconocimiento de una estructura cruciforme y el corte en la base del tallo. La distribución de topoisómeros de un plásmido con la secuencia que contenía al cruciforme también es consecuente con la extrusión del mismo *in vitro*.

3.- MADURACIÓN DEL EXTREMO 3' DE LOS MENSAJEROS DE *Saccharomyces cerevisiae*

El procesamiento de los precursores de los mRNA es un suceso esencial en la expresión génica de eucariotas. La maduración del transcrito primario generado por la RNA polimerasa II puede dividirse en varias reacciones distintas: la adición de la caperuza al extremo 5' del transcrito primario, la modificación de algunos residuos de adenosina, la escisión de los intrones y el corte del extremo 3' del transcrito primario con la posterior adición de una cola poli(A). La presencia de colas poli(A) es un fenómeno muy extendido en los mensajeros eucarióticos, encontrándose en animales (con la notable excepción de los mRNA de las histonas), plantas, levaduras y mitocondrias (Wahle y Keller 1992). La poliadenilación se ha descrito también en mensajeros de procariotas (O'Hara *et al.*, 1995; Liu y Parkinson, 1989) indicando que este es un proceso importante y universal, aunque existen diferencias en la función y la maquinaria implicada en el proceso entre eucariotas y procariotas.

La poliadenilación proporciona al mRNA propiedades de estabilidad (Bernstein *et al.*, 1989) y traducibilidad (Atwater *et al.*, 1990 y Munroe y Jacobson 1990), y no se puede descartar que esté implicada en la exportación del mensajero maduro al citoplasma. En todos estos casos los detalles bioquímicos de los distintos procesos no son muy conocidos. Se conocen varios casos de regulación de la expresión de genes animales basados en la utilización de sitios de poliadenilación alternativos (Wickens, 1990a y b). En levadura solo se conoce un caso de procesado alternativo a nivel de poliadenilación (Mayer y Dieckman 1991).

3.1.- Señales de poliadenilación

Las señal de poliadenilación de animales ha sido bien caracterizada (Proudfoot, 1991; Wahle y Keller, 1992; Wahle, 1995; Keller, 1995; Wahle y Keller 1996). Consta de dos elementos: la secuencia AAUAAA, situada típicamente unos 10-30 nucleótidos en dirección 5' respecto al punto de poliadenilación, y un segundo elemento, menos definido, consistente en una zona rica en G+U o en U, situado en dirección 3' desde el punto de poliadenilación. El punto de corte y posterior poliadenilación no está bien caracterizado, variando la distancia entre el mismo y la secuencia AAUAAA. En el 70% de los clones de cDNA analizados el final del transcrito coincide con una A (Sheets *et al.*, 1990), con lo que no se puede saber si ese nucleótido final está codificado por el genoma o no. Dicha A suele estar en el 59% de los casos precedida por una C, con lo que la secuencia consenso parece quedar establecida en CA. En determinados genes, principalmente de virus se ha determinado la participación de regiones situadas en posición 5' con respecto a las mencionadas, pero son relativamente particulares y desconocidas, estando caracterizadas solamente por una riqueza en U.

Durante largo tiempo se pensó que en levadura la adición de la cola poli(A) se producía en un extremo 3' generado directamente por la terminación de la transcripción. Sin embargo la capacidad de extractos proteicos totales de células de levadura de cortar un precursor, transcrito *in vitro* por una polimerasa heteróloga, en los mismos sitios donde se produce la adición de la cola poli(A) indica que el mecanismo de maduración de los extremos 3' de levadura es comparable al de células de mamífero (Butler y Platt, 1988; Butler *et al.*, 1990; Heidmann *et al.*, 1992).

Las señales implicadas en dicha maduración parecen menos conservadas que sus equivalentes en eucariotas superiores. Aunque aproximadamente el 50% de sus genes poseen el mencionado hexanucleótido en el extremo 3', su presencia no parece esencial para la poliadenilación, al menos en algunos casos. Así, se ha comprobado que mutaciones puntuales dentro de la zona AAUAAA o su delección completa no tienen influencia apreciable en el correcto

procesamiento del mensajero del gen *ADH2*, ni en el lugar exacto en que éste se produce (Hyman *et al.*, 1991). Por otro lado se ha observado que la señal de poliadenilación del gen de la α -globina humana no es procesado por un extracto de células de levadura capaz de madurar *in vitro* transcritos primarios (Butler *et al.*, 1990). Además un fragmento de la región 3' del gen *c-myc* humano es capaz de producir la formación del extremo 3' *in vivo* en levadura, aunque en distinto lugar, lo que indica que ninguna de las dos señales AAUAAA que están presentes en dicho gen dirige el procesamiento de los mensajeros (Irniger *et al.*, 1993). De manera similar, aunque en las regiones terminales de los genes de la levadura *Schizosaccharomyces pombe* se encuentre la secuencia AAUAAA, y sus transcritos *in vitro* sean procesados por extractos de células de mamífero, los puntos exactos de poliadenilación difieren de los encontrados en la propia levadura (Humphrey *et al.*, 1990). Además los terminadores de ambas levaduras son funcionalmente intercambiables, con lo que se demuestra que las señales implicadas en el correcto procesamiento de los mensajeros difieren de las usadas por los metazoos, explicándose la presencia de la secuencia AAUAAA por la riqueza en A y U de las regiones 3' de los mRNA de las levaduras.

El primer gen cuya secuencia de poliadenilación se estudió a fondo fue el gen *CYC1*. Se aisló un mutante (la mutación *cyc1-512*) de dicho gen en el cual una delección de 38 pb situada en la región 3' no traducida (3'-UTR) provocaba un procesamiento aberrante de los mensajeros, produciéndose mRNA más escasos y de tamaño mayor (Zaret y Sherman, 1982). Comparando la secuencia contenida en esas 38 pb con las 3'-UTR de otros genes se propuso como consenso de poliadenilación una secuencia tripartita TAG.....TA(T)GT....TTT, con longitudes variables de secuencias ricas en A o A+T entre las tres partes. Algunas de las mutaciones puntuales que afectan a la correcta formación del extremo 3' del gen *ADH2* se encuentran situadas sobre una secuencia similar TAG....TATG (Hyman *et al.*, 1991). La secuencia tripartita de Zaret y Sherman se encuentra en las dos hebras de la región terminal de los genes *ARO4*, *TRP1* y *TRP4*, regiones que dirigen eficientemente la terminación de manera bidireccional. La mutación simultánea de 5 nucleótidos en los dos primeros elementos de la señal tripartita del gen *ARO4* dificulta extraordinariamente la formación del extremo 3', aunque la inserción de un oligonucleótido sintético conteniendo la secuencia consenso en un plásmido de prueba no era suficiente para producir un procesamiento efectivo (Irniger *et al.* 1991). Secuencias relacionadas con este consenso también han sido halladas en las señales de formación del extremo 3' del trasposón Ty (Yu y Elder 1989) y en varios genes del plásmido 2 mm (Sutton y Broach 1985).

El análisis de revertientes de la mutación *cyc1-512* dio lugar a la modificación de la señal tripartita. Dos revertientes poseían la secuencia TAG....TATGTA, que se propuso como una modificación de la tripartita previamente mencionada, mientras que otras reversiones creaban las

señales TATATA o TACATA (Russo *et al.*, 1991). Curiosamente secuencias de la región 3' del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) que eran eficientemente poliadeniladas en levadura poseían la secuencia consenso TAGTATGTA, equivalente a la secuencia bipartita TAG...TATGTA de levadura (Irniger *et al.*, 1992). Mutagenénesis saturante de esta señal determinó que los tres primeros nucleótidos no eran importantes y que el hexanucleótido restante adoptaba en los mutantes funcionales una secuencia TAYRTA, siendo la de mayor capacidad poliadeniladora la secuencia TATATA.. Dichos resultados se confirmaron en el caso del gen *CYC1*, llegándose a proponer un modelo generalizado de señal de poliadenilación de *S. cerevisiae* (Russo *et al.*, 1993; Guo y Sherman, 1995). En este modelo existen: 1) un elemento de eficiencia anterior del tipo TATATA , TAG...TATGTA y TTTTATA (Henikoff y Cohen, 1984; Irniger *et al.*, 1991) que estimula la eficiencia de los elementos posicionadores; 2) elementos posicionadores del sitio de poliadenilación del tipo TTAAGAAC y otros caracterizados por ser ricos en A, siendo los más eficaces AATAAA o AAAAA, localizados en posición 3' respecto a l elemento de eficiencia y 3) el sitio mismo de poliadenilación, generalmente una pirimidina seguida de algunos residuos de A (Heidmann *et al.*, 1992). Dichas tres secuencias han resultado ser no solo necesarias sino suficientes para producir un correcto procesamiento, ya que un oligonucleótido sintético conteniéndolas es capaz de producir poliadenilación independientemente del entorno en que se introduzca (Guo y Sherman, 1996).

No obstante la situación dista de ser tan sencilla en la mayoría de genes de levadura. Muchos de ellos carecen de todas o alguna de estas secuencias consenso propuestas. Ejemplo de ello es el gen *GAL7* en cuya poliadenilación está implicada una secuencia de 26 pb conteniendo una región de dinucleótidos TA alternantes (Abe *et al.*, 1990). El gen *ADH1*, cuya señal de poliadenilación es muy eficaz, posee un elemento de eficiencia consistente en un octámero AAAAAAAAA (Heidmann *et al.*, 1994). Para reconciliar datos tan dispares algunos autores proponen que existen diferentes señales de poliadenilación (Irniger *et al.*, 1991) y que estas pueden ser redundantes, de manera que varias señales débiles den lugar a un procesamiento suficiente (Guo *et al.*, 1995).

A la vista de todos estos datos contradictorios, algunos autores proponen que no existen secuencias específicas implicadas, sino que solamente se requieren secuencias ricas en A+T (Osborne y Guarente, 1989). En este caso los terminadores de levadura se comportarían más como terminadores bacterianos *rho*-dependientes que como terminadores de eucariotas superiores. En relación con esta hipótesis, se ha comprobado que la proteína *rho* de *E. coli* es capaz de provocar la terminación de la RNA pol II de levadura *in vitro* (Wu y Platt, 1993).

También se ha postulado que la estructura secundaria del RNA puede tener un papel más determinante que la secuencia del mismo en el procesamiento (Sadhale y Platt, 1992). Esto

último explicaría el carácter bidireccional tanto en ensayos *in vivo* como en procesamientos *in vitro* de algunas señales de poliadenilación. Se ha detectado en varios terminadores la presencia de repeticiones invertidas, como por ejemplo en el terminador bidireccional situado en el promotor del gen *URA3* (Yarger *et al.*, 1986), en el terminador unidireccional del gen *ADH2* (Hyman *et al.*, 1991) y en los terminadores bidireccionales de *GAL1*, *GAL7* y *GAL10* (Sadhale y Platt, 1992). En un reciente estudio se propone que la topología del pre-mRNA puede ser importante en la formación del extremo 3' de levadura y mamíferos (Stumpf *et al.*, 1996). Se sugiere que el sitio de corte debe estar libre de apareamientos inespecíficos para ser efectivo, y que algunos de los factores de procesamiento reconocen el extremo del precursor y avanzan hasta alcanzar la señal poli(A).

La observación de que la mutación letal *prp20* provoca efectos tan variados como la alteración en la formación del extremo 3' de mensajeros, en la iniciación de la transcripción, en el transporte de mRNA y en la eliminación de intrones sugiere que todos estos fenotipos, incluida la terminación defectuosa, puedan estar relacionados con la estructura de la cromatina (Forrester *et al.*, 1992).

3.2.- Maquinaria bioquímica implicada en la poliadenilación

El corte y posterior poliadenilación del transcrito primario es realizado por una compleja maquinaria compuesta de varios factores, integrados a su vez por diferentes polipéptidos, lo cual dificulta enormemente la purificación, caracterización y asignación de función de todas las proteínas implicadas en el proceso.

En células de eucariotas superiores el problema se va clarificando y ya se han asignado funciones específicas a varios de los componentes del complejo de procesamiento (para una revisión reciente ver Wahle y Keller, 1996). La señal AAUAAA es reconocida por la subunidad de 160 kDa del factor de especificidad de corte y poliadenilación (CPSF; Jenny *et al.*, 1994), mientras que la subunidad de 64 kDa del factor estimulador de corte (CstF) reconoce el elemento localizado en 3' rico en GU o U (McDonald *et al.*, 1994). El complejo formado por ambos factores es reconocido por los dos factores de corte CFI y CFII y la poli(A)polimerasa (PAP) produciéndose el corte. Se desconoce la naturaleza y localización de la actividad endonucleasa que lleva tal proceso a cabo. Después del corte, los factores de corte y el CstF abandonan el complejo de procesamiento, y la PAP con ayuda del CPSF añade al extremo 3'-OH aproximadamente diez residuos de adenosina. La llegada a este complejo de la proteína de unión a la cola poli(A) II (PABII) provoca un aumento brusco de la procesividad de la PAP, añadiéndose una cola de unos 250 residuos de adenosina.

El conocimiento acerca de los componentes del aparato de corte y poliadenilación en *S. cerevisiae* no es tan amplio como en células de mamífero, pero la posibilidad de aplicar enfoques genéticos en el estudio de factores de poliadenilación hace que este campo este avanzando de manera acelerada. Por métodos cromatográficos se pueden separar cuatro componentes implicados en el proceso: dos factores de corte CFI y CFII (no identificables con los homónimos de mamíferos), un factor de poliadenilación PFI y la poli(A) polimerasa (Chen y Moore, 1992). El corte del pre-mRNA requiere de los dos factores de corte, mientras que la adición de la cola poli(A) es producida por CFI, PFI y PAP. Ya que CFI interviene en corte y poliadenilación se postula que debe ser el equivalente al CPSF de animales.

La poli(A) polimerasa ha sido purificada (Lingner *et al.*, 1991a) y clonada (Lingner *et al.*, 1991b). Se han clonado la PAP humana (Thuresson *et al.*, 1994) y bovina (Raabe *et al.*, 1991) y se ha encontrado una homología del 47% en los primeros dos tercios de la proteína. Todas poseen un dominio de unión al RNA del tipo ribonucleoproteína en esta región N-terminal. se sabe que los 18 primeros aminoácidos de la PAP de levadura elimina la poliadenilación específica, lo que sugiere que están implicados en la interacción con otras proteínas de la maquinaria de poliadenilación (Zhelkovsky *et al.*, 1995).

Se han identificado dos de las cuatro subunidades de CFI (Minvielle-Sebastia *et al.*, 1994). Son los productos de los genes RNA14 y RNA 15. Este ultimo posee un dominio de unión a RNA y se ha determinado que se une específicamente al mRNA, con lo cual actuaría como la subunidad de 160 kDa de CPSF, reconociendo alguna secuencia (o estructura) diana e iniciando el procesado. Cuando se elimina de extractos celulares la poli(A) polimerasa utilizando anticuerpos específicos el corte del precursor se ve afectado (Kessler *et al.*, 1995), indicando que la PAP y CFI forman un complejo, en el cual los primeros 18 aminoácidos de la PAP están implicados (Zhelkovsky *et al.*, 1995).

También se ha determinado la identidad de uno de los componentes de PFI mediante el uso del doble híbrido (Preker *et al.*, 1995). Dicha proteína, el producto del gen *FIP1*, forma *in vitro* un complejo con la PAP en una proporción 1:1. También interacciona con Rna14p, componente de CFI, por lo que se postula que Fip1p puede actuar como puente entre el CFI unido al RNA y la PAP.

Los cuatro polipéptidos de los que hemos hablado hasta ahora están codificados por genes esenciales, lo que da una idea de su importancia en el correcto procesado de los mensajeros. Se ha identificado por métodos genéticos un gen no esencial implicado en la formación del extremo 3', el gen *REF2* (Russnak *et al.*, 1995). En los extractos de procesamiento preparados de cepas *ref2* mutantes los sitios de poliadenilación fuertes no se ven afectados,

mientras que sitios subóptimos son procesados con una menor eficiencia. Se sabe que Ref2p se une al RNA, pero se desconoce su función.

Así pues, parece que los mecanismo de formación del extremo 3' de los mRNA es comparable entre eucariotas superiores e inferiores, por lo cual la levadura puede convertirse en un organismo modelo para estudiar los factores y mecanismos de procesado con enfoques genéticos. La disponibilidad de un sistema de procesamiento reconstituido facilitará investigaciones futuras entre el acoplamiento entre la formación del extremo 3', la transcripción y el *splicing*.

4. TERMINACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN

Si bien las secuencias y proteínas implicadas en el corte y posterior poliadenilación de los mensajeros producidos por la RNA polimerasa II empiezan a conocerse con cierto detalle, el acontecimiento de la terminación de la transcripción, es decir el momento en que la polimerasa deja de añadir nucleótidos para después disociarse del molde de DNA y del transcrito emergente, permanece relativamente desconocido.

En eucariotas superiores experimentos de *run-on* han demostrado que la transcripción se extiende de manera variable más allá del punto de poliadenilación, terminando en posiciones muy diferentes según los genes (entre 100 pb y 4 kb más allá del sitio de poliadenilación; para una revisión ver Proudfoot, 1989). Para que se produzca una terminación eficaz es absolutamente necesaria la presencia de una señal de poliadenilación funcional antes del sitio de terminación (Whitelaw y Proudfoot, 1986; Connelly y Manley, 1988). Para explicar este hecho se postula un modelo de terminación (Connelly y Manley, 1988; Proudfoot, 1989) en el que se sugiere que el extremo 5' sin caperuza formado durante el corte endonucleolítico del precursor es utilizado por una exonucleasa 5'-3' y una helicasa que juntas degradarían el RNA naciente, desestabilizando el complejo ternario y disociando la polimerasa del DNA molde. Un modelo alternativo (Logan *et al*, 1987) sugiere que la transcripción de la señal poli(A) hace que se disocie de la polimerasa un factor de elongación o de anti-terminación, produciendo desestabilización y posterior terminación. En ambos modelos se postula que la presencia de sitios de pausa o de frenado en posición 3' respecto a las señales de poliadenilación facilitarían una terminación más efectiva, evitando que la transcripción se extienda a una gran distancia del gen y que interfiera con la expresión de genes contiguos. Dichos sitios de pausa pueden ser de tres tipos. Estructuras secundarias de RNA pueden parar a las polimerasas, tal como ocurre en los terminadores ρ -independientes de procariotas. Tal es el caso el gen de la β^H -globina de pollo, en

el cual hay una horquilla de RNA en el terminador (Pribyl y Martinson, 1988). También estructuras anómalas del propio DNA, tales como DNA curvado pueden parar a la polimerasa , como en el gen de la histona H3.3 (Kerpolla y Kane, 1990). Por último, proteínas unidas al DNA pueden actuar como bloqueantes de la transcripción. Ejemplos de este último caso son antígeno T del virus del polioma (Skarnes *et al.*, 1988), CP-1 que se une a la caja CCAAT del promotor tardío de adenovirus (Connely y Manley, 1989) y la proteína con dedos de zinc MAZ, que se une a varios promotores y que provoca la terminación en el gen C2 humano (Ashfield *et al.*, 1993). Se ha comprobado que esta proteína provoca *in vitro* una curvatura del DNA al que se une.

En *Schizosaccharomyces pombe* la disposición de elementos es similar a eucariotas superiores: una señal de poliadenilación anterior y un sitio de pausa posterior al sitio de poliadenilación. Si se mutan los elementos que producen procesamiento de los mensajeros también se inhibe la terminación de la transcripción (Birse y Proudfoot, comunicación personal).

En la levadura *S. cerevisiae* el mecanismo de la terminación dista mucho de ser conocido. La similitud entre levadura y eucariotas superiores en cuanto a poliadenilación hace pensar que debe existir también en levadura un acoplamiento poliadenilación-terminación. Las secuencias implicadas en el procesamiento del gen *CYC1* son capaces de producir también terminación de la transcripción. Esa capacidad se ha determinado mediante diferentes aproximaciones. En un estudio de tipo topológico se supone que los cambios topológicos del plásmido dependen de la longitud de la unidad de transcripción. Por lo tanto el posicionamiento de terminadores efectivos en una unidad de transcripción tiene un reflejo inmediato en la topología del plásmido, exactamente como lo hacía el terminador del gen *CYC1* (Osborne y Guarente, 1988). Experimentos de *run-on* confirman esos resultados, indicando que las secuencias en el flanco 3' de *CYC1* además de procesamiento producen terminación efectiva (Osborne y Guarente, 1989).

Otro enfoque alternativo son los experimentos en los cuales se dirige la transcripción de un promotor regulable hacia un elemento necesario para la segregación o replicación de un plásmido centromérico, ya sea el centrómero (Snyder *et al.*, 1988) o la secuencia ARS que actúa como origen de replicación (Russo y Sherman, 1989). En ambos casos se provoca inestabilidad del plásmido, ya que la transcripción interfiere con la función de dichos elementos. Si se sitúa entre el promotor y la secuencia CEN o ARS un fragmento de DNA que actúa como terminador de la transcripción, el plásmido se estabiliza. Con este tipo de ensayo se ha demostrado que dos fragmentos de 200 y 300 pb correspondientes a regiones 3' de los genes *CAT1* y *CAT2* producen terminación eficaz (Snyder *et al.*, 1988). Una secuencia de 250 pb de bases del gen *CYC1* produce también terminación, lo que sugiere que la misma se produce muy cerca del sitio de poliadenilación, a no más de 100 pb del mismo (Russo y Sherman, 1989). Además, la

deleción de 38 pb que imposibilita el procesamiento *in vivo* e *in vitro* del mRNA inhibe la terminación también, con lo cual queda claro que las señales que forman el extremo 3' del mensajero son necesarias para una correcta terminación, como en eucariotas superiores (Russo y Sherman, 1989; Russo, 1995).

Otra evidencia de que la terminación se produce muy cercana al sitio poli(A) es el hecho de que los terminadores de levadura, en contraste con los de eucariotas superiores son eficientes cuando son situados en un intrón (Hyman *et al.*, 1991; Irniger *et al.*, 1991). Dada la mayor eficiencia del proceso de "splicing" frente al del procesado del extremo 3', este hecho sugiere una terminación de la transcripción efectiva dentro de los segmentos introducidos en el intrón. La activación de un promotor críptico del intrón del gen de la actina que solo es efectivo cuando se bloquea la transcripción a través de él, es vista como una prueba adicional (Irniger *et al.*, 1991).

No se conoce ningún determinante a nivel de secuencia o estructura que esté involucrado en la pausa de la RNA polimerasa posterior a la señal de poliadenilación en la levadura *S. cerevisiae*. No obstante realizando experimentos de transcripción *in vitro* utilizando extractos nucleares que contienen todos los requerimientos necesarios para producir una transcripción correcta a partir de promotores de levadura se ha detectado que el transcrito primario de los genes *ADH2* y *GAL7* termina de manera definida a poca distancia de la señal de poliadenilación lo que sugiere la existencia de un sitio fuerte de terminación o pausa posterior al sitio poli(A) (Hyman y Moore 1993). Mutaciones que afectan al procesamiento no afectan a la pausa de la polimerasa, indicando que debe existir un sitio de pausa fuerte en los genes de levadura, el cual en coordinación con la señal de la poliadenilación da lugar a la terminación de la transcripción. En experimentos *in vitro* diferentes también se observó parada en ausencia de procesamiento (Wu y Platt, 1993). Considerando el denso empaquetamiento del genoma de levadura es de esperar que en este organismo los mecanismos de terminación sean especialmente eficaces, para evitar los perniciosos efectos de la interferencia transcripcional entre diferentes genes. Eso, unido a la facilidad para realizar análisis de tipo genético convierten a la levadura en un organismo atractivo para estudiar este todavía desconocido proceso.

5.- OBJETIVOS

El flanco 3' del gen *FBP1* posee una serie de señales y estructuras coincidentes en un limitado espacio lo que hace muy atractivo su estudio estructural y funcional.

Por una parte existe una estructura de la cromatina muy claramente delimitada: una región libre de nucleosomas rodeada de nucleosomas posicionados. En este trabajo estudiaremos la naturaleza de ese sitio hipersensible y del posicionador de nucleosomas. En dicha región de DNA existe una secuencia $(TA)_n$ que en plásmidos superenrollados puede adoptar una estructura no-B DNA de tipo cruciforme o región desapareada. Trataremos de determinar la estructura *in vivo* de esta estructura y su implicación en la estructura de la cromatina.

Como se ha explicado anteriormente, el tema de las señales implicadas en el procesamiento de los extremos 3' de levadura dista mucho de estar completamente aclarado. El flanco 3' del gen *FBP1* resulta atractivo para un estudio sobre este tema ya que además de poseer la secuencia tripartita postulada por Zaret y Sherman y una serie de 11 A similar a la señal de poliadenilación del gen *ADH1*, posee un elevado contenido en A+T, con una zona de TA alternadas, lo que puede actuar como una reiteración del elemento de eficiencia TATATA. Se intentará caracterizar la señal de poliadenilación de este gen y las secuencias implicadas en la terminación de la transcripción.

Por último se estudiará la posible relación entre la estructura a nivel de DNA y RNA de la secuencia $(TA)_n$ y los procesos de poliadenilación y terminación de la transcripción.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- PRODUCTOS

1.1.- Reactivos

La acrilamida, bisacrilamida, SDS, bromuro de etidio, fenol y urea fueron adquiridas de la casa Merck. La agarosa tipo I y el DTT fueron comprados a Sigma, mientras que la agarosa de bajo punto de fusión lo fue a BRL. De Boehringer Mannheim provinieron la ampicilina, el Tris, el X-Gal, el IPTG, la BSA (libre de nucleasas), la oligo-dT celulosa y los trifosfatos de nucleósidos. Los nucleótidos radiactivos dATP($\alpha^{32}\text{P}$), UTP($\alpha^{32}\text{P}$) dATP($\gamma^{32}\text{P}$), y dATP($\alpha^{35}\text{S}$) fueron comprados a Amersham, al igual que el filtro de nylon Hybond-N y el kit de marcaje de sondas de DNA "Rediprime". El kit de purificación de DNA de geles de agarosa "Geneclean II" proviene de Bio101. SequenaseTM Version 2.0 DNA Sequencing Kit es fabricado por USB. El kit de deleciones fue proporcionado por Pharmacia. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Pharmacia, Boehringer o GenoSys. El marcador de pesos moleculares pBR322/*MspI* fue de New England Biolabs, el "100 bp ladder" de Pharmacia y el λ -*HindIII* de Boehringer. El patrón de RNA se adquirió de Gibco BRL. La pepstatina A, la leupeptina hemisulfato y el PMSF fueron comprados a Fluka.

1.2.- Enzimas

Los enzimas de restricción se obtuvieron de Boehringer, Promega y Amersham, y se utilizaron con los tampones suministrados por dichas casas comerciales y siguiendo las instrucciones de uso para cada uno de los enzimas. La DNA ligasa del fago T4, la nucleasa de micrococo (MNasa), la *Taq* polimerasa, la proteinasa K, la RNasa A, el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I y la RNA polimerasa del fago T7 fueron compradas a Boehringer Mannheim. La RNA polimerasa del fago T3 es de Stratagene. La fosfatasa alcalina, la transcriptasa reversa y el RNasin son de Promega. La polinucleótido quinasa y la nucleasa S1 fueron suministradas por Amersham. Zymoliasa 20T proviene de Miles Pharmaceuticals. La endonucleasa VII del fago T4 fue un regalo del Dr. B. Kemper y de Avitech Diagnostics, Malvern, Pennsylvania, USA.

1.3.- Medios de cultivo

Para cultivar *E.coli* se utilizó LB (Luria-Bertani): triptona 1% (p/v), NaCl 1% (p/v) y extracto de levadura 0.5% (p/v). Cuando se requería crecer las bacterias en presencia de ampicilina se añadió antibiótico a una concentración final de 50 $\mu\text{g/ml}$. La ampicilina se disolvió en agua a una concentración de 50 mg/ml se esterilizó por filtración y se guardó congelada, añadiéndose al medio de cultivo justo antes de ser inoculado. Para obtener

células competentes se utilizó el medio MTB: triptona 2% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v), KCl 0.075% (p/v). Se autoclavó y añadió MgSO₄ 1M pH 7.6 para obtener una concentración final de 0.67 mM. En la electroporación se utilizó el medio SOC: triptona 2% (p/v), extracto de levadura 0.5 % (p/v), NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM y glucosa 20 mM.

Los medios de cultivo de levadura utilizados son los descritos en Sherman et al., 1995. Como medio completo se utilizó el YPD : extracto de levadura 1% (p/v), peptona 2% (p/v), glucosa 2% (p/v). Como medio selectivo se utilizó el SD: Yeast Nitrogen Base w/o amino acids 0.67% (p/v) y glucosa 2% (p/v). Este medio se suplementaba con los requerimientos necesarios a una concentración de 20 µg/ml para adenina, histidina, triptófano y uracilo y de 30 µg/ml para la lisina y la leucina. La fuente de carbono se cambió cuando la ocasión así lo requería de glucosa 2% (p/v) a galactosa 2% (p/v) o glicerol 3% (p/v).

Los medios sólidos se preparaban adicionando agar hasta el 2% (p/v) en los medios de levadura y 1.5 % (p/v) en los medios de *E. coli*.

La temperatura de cultivo fue de 30°C para *S. cerevisiae* y de 37°C para *E. coli* y en ambos casos se utilizó agitación orbital con los medios líquidos.

1.4.- Cepas

CEPA	GENOTIPO	PROCEDENCIA
<i>Escherichia coli</i> DH5α	<i>recA⁻ hsdR^F lacZM15</i>	R. Lucchini
<i>Escherichia coli</i> TG1	<i>supE hsdΔ5 thi Δ(lac-proAB)</i> <i>F'(traD36 proAB⁺ lacI^f lacZΔM1)</i>	T.J. Gibson
<i>S. cerevisiae</i> CJM88	<i>α, ura3</i>	J.M. Gancedo
<i>S. cerevisiae</i> RG1-5d	<i>a, fbp1-2::LEU2 ura3</i>	J.M. Gancedo
<i>S. cerevisiae</i> SEY2101	<i>a, ade2 leu2 ura3 gal7</i>	S.Emr.
<i>S. cerevisiae</i> W303-1a	<i>a, leu2 trp1 can1 ura3 ade2 his3</i>	R. Rothstein
<i>S. cerevisiae</i> BJ2168	<i>a/α, leu2/+ trp1/trp1 ura3-52/+</i> <i>prb1-1122/prb1-1122 pep4-3/pep4-3</i> <i>prc1407/prc1-407 +/his1</i>	E. Jones
<i>S.cerevisiae</i> 1097/930	<i>a/α, leu2/+ trp1/trp1 prb1-1122/prb1-1122</i> <i>pep4-3/pep4-3 prc 1-407/prc1-407 his1/+.</i>	C.L. Moore
<i>S.cerevisiae</i> YNN318	<i>a/α, ura3-52/ura3-52lys2-801/lys2-801</i> <i>ade2-101/ade2-101 his3Δ200/ his3Δ200 trp1Δ/trp1Δ</i>	M. Snyder

1.5.- Oligonucleótidos

NOMBRE	SECUENCIA (5' a 3')	USO
SM	dATTTATATTTATATATGTG	Mutagénesis
DM	dATATTTAAATATGTGTATGTATGTGTACCG	Mutagénesis
D1/2	dCTGTATATGTCCTATATATGTGTATGTGTATG	Mutagénesis
D3	dCTGTATATGTCCTTGTGTATGTATG	Mutagénesis
C1	dTCGATATATATATATATATATTTATATATATATAT	Clonación
C2	dTCGAATATATATATATAAATATATATATATATA	Clonación
POLYA1	dCGGTGCGACTGCAGAAGC(T) ₁₇	RT-PCR
POLYA2	dCGGTGCGACTGCAGAAGCTT	RT-PCR
ACT	dCTAGCGCTTGCACCATCCC	RT-PCR
FBPA	dGGGGGAAAAGCGGTCAAC	RT-PCR
FBPB	dCTCCATCCCATTCCATTGCTAC	Footprinting
Universal(-20)	dGTAAAACGACGGCCAGT	Secuenciación

1.6.- Plásmidos y bacteriófagos

Los plásmidos y fagos descritos a continuación fueron utilizados como elementos de partida para realizar las construcciones descritas en el apartado 2.8.

PLASMIDO	MARCADORES ORIGENES DE REPLICACION	PROCEDENCIA
pUC18	Ap ^R ColE1	Pharmacia
pFBP391	Ap ^R ColE1	M. del Olmo
pT7T3 18U /19U	Ap ^R ColE1	Pharmacia
pGAL7-1	Ap ^R ColE1	C.L. Moore
YEp24	Ap ^R , Tc ^R , URA3 ColE1, 2 μm	S. Ferrer
pJM1	Ap ^R , Tc ^R , URA3, FBP1 ColE1, 2 μm	J.M. Gancedo
pRS316	Ap ^R , URA3 ColE1, ARSH4	P. Hieter
pME729	Ap ^R , URA3 ColE1, 2 μm	G. Braus
pHZ18Δ2SMA	Ap ^R , URA3 ColE1, 2 μm	C.L. Moore
pNN363	Ap ^R , URA3 ColE1, ARS1	M. Snyder
M13mp18/19	M13	Boehringer M.

2.- TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

2.1.- Digestiones con endonucleasas de restricción

Para la digestión de muestras de DNA con endonucleasas de restricción se utilizaron las condiciones recomendadas por los suministradores (Boehringer-Mannheim, Promega y Amersham).

Las digestiones se realizaron en tubos eppendorf a 37°C durante al menos dos horas, cuando la reacción se realizaba con fines preparativos, o durante 90 minutos, si era con fines analíticos. La concentración de DNA en la mezcla final fue inferior a 1 mg/ml. Dado que la muestras de DNA generalmente estaban disueltas en tampón TE que puede inhibir la reacción por su contenido en EDTA, la concentración de tampón en la mezcla final quedó diluida, al menos, cinco veces. Asimismo la presencia de glicerol en concentraciones superiores al 5% inhibe parcialmente la actividad endonucleasa de restricción (Maniatis *et al.*, 1982) por lo que las endonucleasas, que se sirven en un medio estabilizante con glicerol al 50%, se diluyeron diez veces, al menos, en la mezcla final. Como medida de precaución, para asegurar que la reacción de digestión fuera completa, se utilizaron al menos el doble de unidades de actividad enzimática de las necesarias, considerando suficiente una unidad por microgramo de DNA.

Cuando la restricción se llevó a cabo para el análisis rápido de plásmidos en gel de agarosa, la restricción se paró añadiendo la cantidad apropiada de disolvente de muestras concentrado seis veces. En los demás casos de electroforesis en agarosa y siempre en las electroforesis de poliacrilamida la reacción se paró mediante precipitación con etanol y posteriormente las muestras se disolvieron en la cantidad apropiada de disolvente de muestras de electroforesis.

2.2.- Aislamiento de DNA a partir de geles

Los fragmentos de DNA se aislaron de agarosa utilizando el kit GENECLEAN II. A la banda escindida del gel de agarosa se le añadieron 3 volúmenes de una solución de NaI 6M en el caso de que el gel preparativo fuera de TAE, y 4.5 volúmenes si contuviera TBE (en este caso se añadieron también 0.5 volúmenes de una solución llamada "TBE Modifier"). Se calentó la agarosa a 45°C hasta fundirla totalmente. Seguidamente se añadieron 5 ml de la matriz de sílice "Glassmilk", se agitó en vórtex y se incubó durante 5 min en hielo, agitándola periódicamente para evitar que la matriz sedimentara. Se centrifugó a 12000 rpm durante 5 s y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 0.5 ml de la solución "New Wash" con el fin de eliminar cualquier contaminante unido a la matriz. Se volvió a centrifugar,

y se repitió el lavado dos veces más. Después del último lavado se eliminó por aspiración cualquier resto de sobrenadante y se resuspendió la matriz en un pequeño volumen (5-10 μ l) de agua o TE. Se incubó a 45°C durante dos minutos con el fin de eluir el DNA, se centrifugó 30 s a 12000 rpm y se tomó el sobrenadante. Con el fin de recuperar la mayor cantidad de DNA el último procedimiento se repitió otra vez y se juntaron las dos alícuotas. Los rendimientos fueron del orden del 80%.

Alternativamente, algunos fragmentos grandes se aislaron a partir de agarosa de bajo punto de fusión según el método descrito por Burns y Beacham (1983). La electroforesis se realizó en TBE en las condiciones descritas en el punto 3.3, salvo que se utilizó agarosa de bajo punto de fusión ultrapura al 1%. Las bandas se localizaron mediante tinción con bromuro de etidio, se recortaron y se introdujeron en tubo eppendorf de 1.5 ml. Tras añadir 5 volúmenes de TE+NaCl 0.1M se calentaron los tubos a 60°C unos minutos para fundir la agarosa. El DNA se extrajo con un volumen de fenol (ver apartado 2.3 para la composición del fenol). Las dos fases se mezclaron por agitación en vórtex y se separaron por centrifugación. La fase acuosa se extrajo otra vez con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y una vez con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se precipitó con etanol. Los rendimientos obtenidos oscilaron alrededor del 20%.

2.3.- Fosforilación de oligonucleótidos

Se empleó el método descrito por Zoller y Smith (1983). Se añadieron a 220 pmol de oligonucleótido 3 μ l de Tris 1 M pH 8.0, 1.5 μ l de $MgCl_2$ 0.2 M, 1.5 μ l de DTT 0.1 M, 13 μ l de ATP 1 mM y agua hasta completar un volumen final de 30 μ l. Se mezcló todo bien, se añadieron 4.5 u de polinucleótido quinasa del fago T4 y se incubó seguidamente a 37°C durante 1 hora. La reacción se detuvo incubando 10 min a 65°C. Los oligos así fosforilados se guardaron congelados.

Alternativamente, para marcar oligonucleótidos radiactivamente se incubaban 10 ng de oligo en presencia de 10 u de quinasa y de 5 μ l de ($\gamma^{32}P$)ATP en el mismo tampón y en un volumen de 10 μ l. Los oligos se precipitaron con ayuda de 10 μ g de tRNA.

2.4.- Desfosforilación del DNA

Se mezclaron en un tubo eppendorf el DNA a desfosforilar, 5 μ l de tampón CIP 10x, 1 unidad de CIP (fosfatasa alcalina de timo de ternera) y agua hasta 49 μ l. Para desfosforilar extremos romos o 3' sobresalientes se incubó 15 min a 37°C, 15 min a 56°C, se añadió una unidad más de enzima, se repitieron las dos incubaciones y para inactivar la fosfatasa se añadió 40 μ l de agua, 5 μ l de SDS 10% y 10 μ l STE 10x (Tris-HCl pH 8.0 100 mM, NaCl 1M,

EDTA 10 mM) y se incubó a 68°C 15 min. Se extrajo dos veces con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), v/v/v) y una vez con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1, v/v). Se precipitó con etanol.

2.5.- Ligamientos

El vector y el fragmento de DNA a clonar se purificaron mediante electroforesis en agarosa, según se ha descrito. Se utilizó un exceso de inserto de 3 a 10 veces respecto a la cantidad de vector. Las mezclas de ligamiento se prepararon con cantidades adecuadas de los DNAs a ligar en presencia de MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, ATP 1 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7.5. El volumen total de la reacción fue, como máximo, de 20 µl y se usó una unidad de DNA ligasa del fago T4 para ligamiento de extremos cohesivos y 5 unidades para ligamiento de extremos romos. La reacción se llevó a cabo durante 4-5 horas a temperatura ambiente o bien toda la noche a 14°C y la mezcla se guardó a 4°C hasta el momento de su utilización, o se precipitó con etanol si iba a ser utilizada en electroporación.

2.6.- Mutagénesis dirigida

El método elegido para llevar a cabo dicha mutagénesis fue el desarrollado por Inouye e Inouye (1987) para realizar mutagénesis sobre plásmido de doble cadena. La clave del proceso es formar un heterodúplex entre fragmentos de restricción distintos de un mismo plásmido, de manera que la zona a mutagenizar quede en forma de simple cadena y sea accesible para el oligonucleótido que porta la secuencia mutante. Se requiere la presencia de dos sitios de restricción únicos situados a ambos lados de la región que se desea alterar y la de un sitio único en el gen de resistencia a la ampicilina. Ambos fragmentos, el plásmido al que le falta la zona a mutar (fragmento II) y el que posee el corte en el gen de la β-lactamasa (fragmento I) fueron purificados de gel de agarosa y cuantificados en gel y el fragmento I fue además desfosforilado. Para formar los heterodúplex se mezclaron en un tubo en este orden: agua hasta dar un volumen final de 34.8 µl, fragmento I 0.3 µg, fragmento II 0.26 µg, tampón polimerasa-ligasa 5X (500 mM NaCl, 32.5 mM Tris-HCl pH 7.5, 40 mM MgCl₂ y 5 mM β-mercaptoetanol) 12 µl y el oligonucleótido fosforilado 3.75 µl (7 pmol).

Se guardaron 11.6 µl de la mezcla y se hervió el resto 3 minutos. Se incubó después 30 minutos a 30°C, luego se pasó a una nevera de 4°C y se dejó 30 minutos y se pasó a hielo diez minutos. Se aplicaron 11.6 µl de esta mezcla junto a los anteriormente separados en un gel 0.7 % TAE (ver más abajo). La aparición de bandas superiores, indicó la formación de heterodúplex. Se le añadió a los 11.6 µl restantes 4 µl de una solución 2.5 mM en cada uno de los cuatro dNTPs, 2 µl ATP 10mM, 2 unidades de Klenow, 1 unidad de T4 DNA ligasa y agua hasta 20 µl y se incubó toda la noche a 12.5°C. Se transformó *E. coli* directamente con

dicha mezcla. La mutagénesis se comprobó mediante restricción cuando fue posible y mediante secuenciación en todos los casos.

2.7.- Deleciones seriadas

Se siguió el método de la exonucleasa III/nucleasa S1 (Henikoff, 1984), siguiendo las especificaciones del fabricante del kit (Pharmacia). La exonucleasa III elimina los nucleótidos 5' de los extremos romos o 5' protuberantes, siendo los extremos 3' protuberantes. Así pues si un plásmido se digiere con dos endonucleasas de restricción, una que genera extremos 3' sobresalientes y otra que los genera romos o 5' sobresalientes y se incubaba con exonucleasa III, ésta solo digiere el plásmido por uno de los extremos. Se digirieron 2.5 µg de plásmido en un volumen final de 25 µl con las enzimas de restricción apropiadas y se calentó a 70°C para inactivarlas. Se mezcló 20 µl del DNA (2 µg de DNA) con 20 µl del tampón ExoIII 2x (132 mM Tris-HCl pH 8.0, MgCl₂ 13 mM; la adición de NaCl puede ralentizar la acción de la exonucleasa), se atemperó a 37°C 3 min y se cogió una alícuota de 2 µl como tiempo 0. Se añadió 1 µl de exonucleasa III (180 u) y se fueron sacando a diferentes tiempos alícuotas de 2 µl y se mezclaron con 3 µl de una mezcla de nucleasa S1 (2.3 u) con tampón S1 (ver sección 3.3) mantenidos en hielo. Una vez extraídos todos los tiempos, se incubaron todos los tubos a temperatura ambiente 30 min. Esta incubación con S1 transforma todos los extremos en romos. Se detiene la reacción con 1 µl de la mezcla de parada (Tris 0.3M, EDTA 50 mM pH 8.0) y se visualizan 2 µl en gel para observar si la reacción ha sido satisfactoria. Se ligaron los 3 µl restantes de la forma habitual, pero en presencia de 5% PEG 8000 durante 2 horas a temperatura ambiente. Se transformó con esta mezcla *E.coli*, se analizaron por restricción los plásmidos más interesantes y se secuenciaron.

2.8.- Construcción de plásmidos

El fragmento de 2083 pb conteniendo todo el gen *FBP1* se obtuvo como fragmento *SmaI-XbaI* proveniente del plásmido pJM1, que fue un regalo de la Dra. J.M. Gancedo. Dicho fragmento se clonó entre los sitios equivalentes del plásmido pUC18, dando lugar al plásmido pFBP2083, y en el plásmido centromérico de levadura pRS316 (Sikorski y Hieter 1989) dando lugar al pRS2083.

El plásmido previamente descrito pFBP391, que contiene el fragmento de 391 pb *Sau3A* que incluye la parte 3' del gen clonado en el sitio *BamHI* del sitio de clonación múltiple del pUC18 (del Olmo y Pérez-Ortín, 1993), fue el sustrato sobre el cual se realizaron deleciones seriadas por ambos extremos del fragmento *Sau3A-Sau3A* de *FBP1*. Para generar las deleciones por 5' se utilizaron los sitios de restricción *SacI* y *SmaI* del sitio de clonación múltiple de pUC18. En las deleciones por 3' se utilizaron los sitios *PstI* y *XbaI*. Las

deleciones resultantes se determinaron por secuenciación, y a los plásmidos derivados se les denominó pFBP seguido de la longitud del fragmento de *FBP1* remanente.

Los plásmidos pFBP2083, pFBP391 y pFBP144 (resultante de las deleciones seriadas) se usaron como sustratos de la mutagénesis dirigida.

En el caso de pFBP391 y pFBP144 las enzimas utilizadas para obtener el fragmento II fueron *EcoRI* e *HindIII* y en pFBP2083 fueron las propias *SmaI* y *XbaI*. Para obtener el fragmento I se utilizó en ambos *Asp700*.

Los oligonucleótidos empleados en la mutagénesis dirigida fueron: SM para la mutación sencilla, DM para la mutación doble, D1/2 para la deleción interna de 10 pb (D1) y la deleción de 22 pb (D2) y por último D3 para la deleción de 28 pb (D3) que abarca la secuencia del gen *FBP1* entre las posiciones 1124 y 1151, considerando 1 el inicio de traducción. Los productos fueron primero analizados por restricción (detectando una disminución de tamaño en las deleciones y la aparición de un nuevo sitio de restricción *DraI* en el DM) y posteriormente por el método de los dideoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977) siguiendo las indicaciones del kit de Sequenase de USB.

Los productos de la mutagénesis de pFBP2083 fueron subclonados como fragmentos *SmaI-XbaI* entre los sitios *SmaI* y *NheI* (compatible con *XbaI*) del vector multicopia de levadura YEp24, dando lugar a los plásmidos YEp2083 (tipo salvaje), YEp2083SM (mutación sencilla) y YEp2083D3 (deleción de 28 pb). El fragmento *SmaI-XbaI* conteniendo la deleción D3 se clonó entre los sitios equivalentes del sitio de clonación múltiple del plásmido centromérico pRS316 dando lugar al pRS2083D3.

En los ensayos de poliadenilación se utilizó el vector pME729 (Irniger *et al.*, 1992). Los fragmentos a estudiar se introducían romos en el sitio de corte único *XhoI*, hecho a su vez romo mediante rellenado con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I y desfosforilado con fosfatasa alcalina. El fragmento 397 original y sus derivados (tanto mutaciones puntuales como deleciones internas) se sacaron ya romos del sitio de clonación múltiple de pFBP391 y derivados mediante digestión con los enzimas *SmaI* e *HindII*. El resto de los fragmentos se aislaron digiriendo con *EcoRI-HindIII* los derivados de pFBP391 y rellenándolos con Klenow. Los plásmidos resultantes se llamaron pVPA con un número que indicaba la longitud de la secuencia perteneciente al gen *FBP1* introducida en dicho vector.

Para introducir la secuencia de TA alternante en pME729 se diseñaron dos oligos C1 y C2. Dichos oligo, al hibridar entre sí dan una porción de doble cadena equivalente a la región de interés, flanqueada por tres bases desapareadas compatibles con el sitio de restricción *XhoI*, por lo que se puede clonar directamente en pME729. La hibridación se realizó disolviendo 1 µg de cada uno de los oligos ya fosforilados en NaCl 0.4 M, Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 1mM en un volumen total de 10 µl. Se calentaron a 95°C durante cinco minutos, luego a 65°C diez minutos y se dejaron enfriar lentamente hasta temperatura ambiente.

El fago M13mp18IR62 fue un obsequio del Dr. Börries Kemper (Jensch *et al.*, 1989). Este fago contiene una repetición invertida perfecta de 62 pb. Este fragmento se extrajo como un fragmento *EcoRI* y como tal se clonó en el sitio *EcoRI* de pUC18. Posteriormente se sacó de dicho plásmido como fragmento *EcoRI*, se rellenó con Klenow y se ligó con pME729 dando lugar a pVPA62.

También se usó para algunos ensayos de poliadenilación el vector pHZ18 Δ 2SMA (Hyman *et al.*, 1991). En este plásmido los fragmentos se introducen en un sitio *SmaI*, previamente desfosforilado. Se clonaron en este vector los fragmentos *SmaI-HindIII* de pFBP391 y pFBP391D3.

Para los ensayos de procesamiento *in vitro* se utilizaron construcciones en los vectores pT7T318U/19U (Pharmacia). Los fragmentos de interés de los derivados de pFBP391 se extrajeron usando los enzimas de restricción *EcoRI* e *HindIII*, clonándose en los mismos sitios de los vectores pT7T318U/19. Los plásmidos así obtenidos pasaron a denominarse pIVP añadiendo el tamaño del fragmento de *FBP1* clonado en ellos.

En los ensayos de terminación de la transcripción se partió del plásmido pNN363 (Snyder *et al.*, 1988). Los fragmentos 397 y 397D3 se sacaron como fragmentos *Scal-XbaI* de pFBP391 y pFBP391D3 respectivamente y se clonaron en los sitios equivalentes del plásmido pNN363. El resto de las secuencias de interés se obtuvieron de los respectivos derivados de pFBP391 utilizando los sitios del sitio de clonación múltiple *EcoRI* e *HindIII*, se transformaron en romos con Klenow y se ligaron al pNN363 digerido con *BamHI*, rellenado con Klenow y desfosforilado. Los plásmidos derivados se denominaron pTER añadiendo el número de pares de bases presentes de *FBP1*.

La manipulación de fagos se llevó a cabo tal y como se describe en Sambrook *et al.* (1989). El fragmento denominado 196 fue extraído del plásmido pFBP391 mediante una restricción *SmaI-DraI*, lo que da lugar a un fragmento como con 196 pb de *FBP1* y algunos nucleótidos en su extremo 5'. Se ligó con el fago de doble cadena M13mp18 digerido con *SmaI*, obteniéndose los fagos M196-, cuando el fago de cadena sencilla resultante es complementario a los transcritos que se produzcan en la misma dirección en que se transcribe *FBP1*. El fago M196+ posee la secuencia complementaria al anteriormente mencionado, hibridando con los mensajeros antisentido, que se transcriban en orientación contraria a *FBP1*. El fragmento *DraI-DraI* de 142 pb también se clonó en el sitio *SmaI* de M13mp18 dando lugar a los fagos M142- y M142+, siguiendo la nomenclatura antes mencionada. Por último, el fragmento *DraI-XbaI* de 165 pb procedente de pFBP2083 fue clonado en M13mp18 entre los sitios de restricción *SmaI-XbaI* para dar M165+, y de la misma manera en M13mp19 para dar M165-. La orientación de los fragmentos se comprobó mediante restricción, y cuando esto no fue posible, mediante secuenciación.

2.9.- Marcaje radiactivo de DNA

Se utilizó el método del cebador al azar ("random primed") ya que permite obtener una elevada radiactividad específica. Se siguieron las indicaciones del fabricante del kit. En primer lugar se pasó la cantidad deseada de la sonda (entre 10 y 50 ng) a marcar a un tubo eppendorf de 0.5 ml y se completó con agua hasta un volumen final de 48 μ l. Seguidamente se desnaturalizó la sonda hirviéndola durante 5 min y se transfirió inmediatamente a un tubo conteniendo todos los requerimientos para el marcaje liofilizados excepto el nucleótido radiactivo. Se resuspendió el líofilo agitando suavemente, se centrifugó brevemente para recoger las gotas dispersas, se le añadió 2 μ l de 32 P-CTP, se mezcló e incubó 10 minutos a 37°C. Se paró la reacción añadiendo 5 μ l EDTA 200 mM. La sonda marcada se guardó congelada a -20°C hasta el momento de su utilización.

3.- PREPARACION DEL MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.- Transformación de *E. coli*

Se utilizó el método descrito por Hanahan (1983). Con una colonia de la cepa seleccionada, aislada mediante cultivo en placa de LB durante una noche a 37°C, se inoculó un precultivo de 10 ml de MTB y se dejó crecer a dicha temperatura hasta alcanzar una DO_{600} de 0.3. Entonces se inocularon 5 ml del mismo en 100 ml de MTB fresco. Se cultivaron las células a 37°C hasta que la DO_{600} del medio de cultivo fue de aproximadamente 0.5. Se enfrió el matraz sobre hielo, se pasó el medio a tubos estériles y se centrifugó en frío a 2500 rpm durante 5 min. Las células se resuspendieron en 30 ml de tampón TfBI (RbCl 100 mM, MnCl₂ 50 mM, acetato potásico 30 mM, CaCl₂ 10 mM, glicerol 15% (v/v) pH 5.8 ajustado con ácido acético 0.2 M). Se volvieron a recoger en las condiciones antes indicadas. Las células se resuspendieron en 4 ml de tampón TfBII (MOPS 10 mM, RbCl 10 mM, CaCl₂ 75 mM, glicerol 15% (v/v) pH 7.0 ajustado con NaOH) y se separaron en alícuotas de 100 μ l. Las células ya competentes se congelaron a -80°C (en este estado pueden conservarse durante meses sin que pierdan su estado de competencia).

En el momento de realizar una transformación, se descongeló una de esas alícuotas sobre hielo durante 10 min. Se añadió el DNA plasmídico (normalmente una mezcla de ligamiento) y se volvió a incubar en hielo durante 20 min. Se provocó entonces un choque térmico incubando a 42°C durante 90 s (o a 37°C durante 120 s) y pasando nuevamente a hielo durante 2 min. Se añadieron 0.8 ml de medio LB y se incubó 1 h a 37°C.

A continuación se sembraron placas de LB sólido, suplementado con los antibióticos adecuados para la selección, con 200 μ l del medio líquido mediante un asa de Digralsky. Las

placas se incubaron a 37°C durante una noche y se seleccionaron algunas colonias transformantes al azar para la verificación de la transformación. Paralelamente se llevaron a cabo controles de viabilidad y de reversión. Para conocer el número de viables se sembraron placas de LB sólido sin antibióticos y para conocer el número de revertientes se sembraron placas de LB sólido más antibióticos con células no transformadas. Ambos controles fueron habitualmente satisfactorios obteniéndose una viabilidad del orden de 10⁷ células/ml y ausencia de revertientes.

Alternativamente se usó el método de transformación mediante electroporación. Para ello se inoculó 1 l de LB con 10 ml de un cultivo de la cepa DH5a crecido durante toda la noche y se dejó incubando a 37°C con agitación hasta una DO₆₀₀ de 0.5-0.6. Se enfrió el cultivo en hielo durante 15 min y se transfirió a botes de centrifuga previamente enfriados. Se recogieron las células centrifugando 10 min a 4000x g. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 20 ml de agua enfriada en hielo. Se lavaron las células con 100 ml de agua, se centrifugaron en las mismas condiciones, se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 20 ml de glicerol al 10%. Se centrifugó la suspensión 10 min a 4000x g y se resuspendió el precipitado en 2-3 ml de glicerol al 10%. Se repartieron las células en alícuotas de 40 µl y se guardaron congeladas a -80°C.

Para realizar la transformación se descongeló en hielo un vial de competentes y se añadió la mezcla de ligación (el volumen del DNA a emplear ha de ser siempre menor o igual a la décima parte del volumen de células a transformar, en nuestro caso fue de 4 µl, precipitando el DNA a utilizar si es necesario). Se pasó la mezcla a una cubeta de electroporación previamente enfriada en hielo durante 5 min. Las condiciones de electroporación fueron 1.8 kV, 25 mF y 200 W. Inmediatamente se añadió 1ml de medio SOC, se mezcló bien y se pasó la suspensión a un tubo eppendorf de 1.5 ml. Se incubó una hora a 37°C y se extendió en placas de LB con ampicilina.

3.2.- Aislamiento de plásmidos

Se usaron dos procedimientos alternativos, el primero para el aislamiento en pequeña escala con fines analíticos, y el segundo para el aislamiento de plásmidos en gran escala con fines preparativos.

Para el aislamiento rápido de plásmidos en pequeña escala se siguió el procedimiento descrito en Sambrook *et al.* (1989). Se sembraron tubos estériles con 4 ml de medio de cultivo LB suplementado con ampicilina. Los cultivos se incubaron a 37°C con agitación durante la noche. Al día siguiente se recogieron 1.5 ml de células en un tubo eppendorf por centrifugación a 12000 rpm 2 min y se resuspendieron en 0.1 ml de disolución de lisozima (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 8). Se adicionaron 0.2 ml de

disolución NaOH-SDS (NaOH 0.2 N, SDS 1% (p/v)) por tubo y se agitaron por inversión hasta que la disolución quedó traslúcida, dejándolos en hielo. Posteriormente se adicionaron 0.15 ml de acetato potásico 5 M pH 4.8 por tubo, se agitaron con vórtex y se mantuvieron 3-5 min sobre hielo. El precipitado resultante se eliminó por centrifugación a 12000xg 5 min. El sobrenadante se pasó a otro tubo eppendorf de 1.5 ml, donde se precipitó el DNA plasmídico con 1 ml de etanol absoluto a temperatura ambiente. Se dejó reposar 2 min a temperatura ambiente, se recogió por centrifugación 5 min a 12000 rpm y se lavó con 500 µl de etanol 70% frío. Se dejó secar al aire 10 min y se resuspendió el DNA en 20 µl de TE conteniendo RNasa a una concentración de 20 µg/ml.

Cuando se quiso obtener plásmido a pequeña escala pero con suficiente pureza como para secuenciar se utilizó el kit Wizard Minipreps de Promega según las indicaciones del fabricante.

Para el aislamiento preparativo de plásmidos con predominio de forma superenrollada, con la finalidad de utilizarlos para digestiones con nucleasa S1 y endonucleasa VII de T4, se utilizaron alternativamente el kit de purificación Quiagen Plasmid Midi Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante y la purificación en gradiente de cloruro de cesio siguiendo el método descrito por Ausubel *et al.* (1987). Se realizó un precultivo de la cepa de *E. coli* apropiada en medio LB suplementado con los antibióticos oportunos durante la noche. Al día siguiente se inocularon 2.5 ml de este precultivo en un matraz de 1 l con 500 ml del mismo medio y se incubó a 37°C con agitación durante 12-16 h. Al cabo de este tiempo se recogieron las células por centrifugación a 1500xg 10 min en botes estériles de 250 ml y se resuspendieron en 10 ml de disolución de lisozima. Se incubaron en esta disolución 5 min a temperatura ambiente y se añadieron 20 ml de la disolución de NaOH-SDS. Después de mezclar bien las disoluciones se incubaron 10 min a 0°C. A continuación se añadieron 15 ml de acetato potásico 5 M pH 4.8 y se incubó 10 min a 0°C. El precipitado se eliminó por centrifugación a 30000xg 30 min. El sobrenadante filtró a través de muselina y se precipitó con un volumen de isopropanol a temperatura ambiente. El precipitado se recogió y lavó como se ha descrito anteriormente. El sedimento seco se disolvió en 4 ml de tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM). Para preparar los gradientes se mezclaron 4.4 g de CsCl y 0.4 ml de bromuro de etidio 10 mg/ml con los 4 ml del plásmido. Se añadió esta solución a dos tubos de ultracentrífuga de 5 ml, se acabaron de llenar con la mezcla de CsCl y bromuro de etidio y se sellaron. Los tubos se centrifugaron a 77000 rpm durante 16 horas a 15°C. A continuación se insertó una aguja en la parte superior del tubo para romper el vacío y se succionó la banda correspondiente a DNA plasmídico con una jeringuilla. Se añadió un volumen de n-butanol a la fracción extraída del gradiente, se mezclaron bien ambas fases y se separaron por centrifugación a 5000x g 5 minutos. Se tomó la fase orgánica superior que contenía el bromuro de etidio y se repitió el mismo procedimiento hasta que quedó incolora. El DNA se precipitó añadiendo dos volúmenes de TE y seis volúmenes de etanol. Se recogió

el plásmido por centrifugación durante 5 minutos a 10000x g, se resuspendió en 0.5 ml de acetato sódico 0.3 M y se volvió a precipitar con un volumen de etanol. Se volvió a recoger y se disolvió en TE.

Los plásmidos obtenidos por estos métodos se analizaron rutinariamente en electroforesis en agarosa y por restricción.

3.3.- Digestiones con nucleasas de plásmidos superenrollados

Para digerir los plásmidos superenrollados con nucleasa S1 se añadió al DNA 0.2-1 u de nucleasa S1/ μ g de DNA, 5 μ l de tampón de digestión de la nucleasa S1 10x (NaCl 300 mM, acetato sódico 300 mM, ZnSO₄ 30 mM pH 4.8), completándose hasta un volumen final de 50 μ l con agua. Análogamente en las digestiones con la endonucleasa VII del fago T4 se emplearon 100-300 u de enzima/ μ g de DNA, 5 μ l de tampón de digestión 10x de la endonucleasa VII (Tris-HCl 500 mM, MgCl₂ 100 mM, β -mercaptoetanol 100 mM, BSA 2.5 mg/ml), añadiendo agua hasta el volumen final de 50 μ l. Las muestras tratadas con la nucleasa S1 se incubaron a 37°C durante 5-30 min, mientras que las de la endonucleasa VII se incubaron una hora a temperatura ambiente. En ambos casos la reacción se paró añadiendo EDTA a una concentración final 10 mM y sumergiendo las muestras en baño de hielo.

Las muestras se fenolizaron y precipitaron. Para precipitar el DNA se añadió a las muestras acetato sódico hasta una concentración final de 0.3 M y se precipitaron con dos volúmenes de etanol ó 0.6 volúmenes de isopropanol a -20°C durante al menos media hora. Los precipitados se recogieron por centrifugación a 12000xg 15 min, se lavaron con etanol 70% (v/v) y se secaron a vacío. Una vez secos se disolvieron en tampón TE.

3.4.- Transformación de levadura

Para la transformación de *S. cerevisiae* se siguió el método descrito por Ito *et al.* (1983) con algunas modificaciones.

Un matraz de 500 ml con 200 ml de YPD se inoculó con 1 ml de un precultivo en fase estacionaria de crecimiento de la cepa a transformar y se incubó a 28°C, con agitación hasta una DO₆₀₀ de aproximadamente 1 (1-2 x 10⁷ células/ml). Se recogieron las células de 10 ml de cultivo centrifugando a 2500 rpm 5 min en un tubo estéril y se lavaron una vez con 20 ml de agua destilada estéril y una vez con 20 ml de tampón TE-acetato de litio (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1mM, acetato de litio 0.1 M). Tras los lavados, las células se resuspendieron en 0.1 ml del mismo tampón y se añadieron 5 μ l de DNA de esperma de salmón sonicado (10 mg/ml), el plásmido de interés disuelto en un volumen de TE inferior a 10 μ l y 0.6 ml de tampón TE-acetato de litio+PEG 4000 40% (p/v) y se incubó 40 min a 30°C. Se provocó

entonces un choque térmico, pasando las células a un baño a 42°C durante 15 min, tras lo cual se recogieron a 2500 rpm 5 min. Finalmente se resuspendieron en 0.8 ml de agua destilada estéril y se sembraron alícuotas de 0.2 ml mediante asa Digralsky sobre placas de SD sólido con los requerimientos adecuados según la cepa y el plásmido utilizados en cada caso.

Las placas se incubaron a 28°C durante 3 a 5 días hasta la aparición de transformantes. Se hicieron controles de viabilidad y de reversión con una muestra paralela de células no transformadas y ambos fueron, habitualmente, satisfactorios.

3.5.- Extracción de RNA total de levadura

Para la extracción de RNA total de levadura se siguió el procedimiento descrito por Sherman *et al.* (1986). Todo el material de vidrio y plástico utilizado para la extracción y almacenamiento del RNA se esterilizó en autoclave a 130°C durante 1 h.

Un matraz de 500 ml con 200 ml del medio de cultivo adecuado se inoculó con 1 ml de un precultivo estacionario de la cepa escogida y se incubó a 28°C con agitación hasta una densidad de $2-4 \times 10^7$ células/ml. El cultivo se pasó a botes de centrifuga previamente enfriados sobre hielo y se centrifugó a 5000 rpm 5 min para recoger las células. Estas se resuspendieron en 2.5 ml de tampón LETS (LiCl 0.1 M, EDTA 10 mM, SDS 0.2% (p/v), Tris-HCl 10 mM pH 7.4) frío y se pasaron a un tubo Corex de 30 ml que contenía 11 g de perlas de vidrio de 0.4 mm de diámetro y 3 ml de fenol saturado en tampón LETS. Para romper las células, se agitó en vórtex durante 6 periodos de 30 s alternados con periodos de 30 s en hielo y posteriormente se centrifugó a 8000 rpm 5 min para separar las fases. La fase acuosa se pasó a un nuevo tubo Corex de 30 ml y se extrajo dos veces con 5 ml de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1, v/v/v) y una vez con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1, v/v). Finalmente, la fase acuosa se precipitó con un volumen de LiCl 5 M durante, al menos, 3 h a -20°C.

Alternativamente se realizaron extracciones de RNA a pequeña escala en eppendorf utilizando el mismo procedimiento, pero reduciendo diez veces el volumen de cultivo y de soluciones.

Para la purificación de mensajeros poliadenilados se utilizó una columna de oligo dT celulosa que se preparó disolviendo 0.25 g de oligo dT celulosa en agua y dejándola reposar durante una hora. Seguidamente se decantó el agua no absorbida por la celulosa con el fin de eliminar las posibles partículas en suspensión. Se empaquetó la resina en una punta de pipeta de 10 ml obturada con lana de vidrio. Se lavó la columna con 10 ml de agua y se dejó incubando con una disolución de proteinasa K 50 mg/ml durante una hora. Posteriormente se efectuaron los siguientes lavados: 10 ml de agua, 10 ml de NaOH 0.1 M, 10 ml de EDTA 5

mM pH 8.0 y 10 ml de tampón de carga 1x (el tampón de carga 2x está compuesto de NaPO₄, 80 mM pH 7.7, NaCl 1M, EDTA 2 mM pH 8.0).

Para preparar la muestra se disolvió el RNA total a inyectar en un volumen de 1 ml de agua y se calentó a 65°C durante 5 min. Se enfrió la muestra y se le añadió un volumen de tampón de carga 2x+SDS 0.1%. Se aplicó el RNA en la columna, y la solución eluída se volvió a calentar a 65°C y se volvió a aplicar en la columna. Se volvió a calentar y a aplicar la muestra eluída. Se lavó la columna con 5 ml de tampón de carga 1x. Los mensajeros poliadenilados se eluyeron lavando la columna tres veces con 1 ml de agua. Las tres fracciones resultantes de los lavados con agua se juntaron y se precipitaron a -80°C. A la hora de analizar los mRNA por electroforesis se recogieron las fracciones poli(A)⁺, se resuspendieron en 100 µl de agua y se valoraron midiendo la absorbancia a 260 nm, al igual que las muestras de mRNA totales.

3.6.- RT-PCR

Los extremos 3' de los transcritos de interés se determinaron secuenciando fragmentos generados por retrotranscripción seguida de PCR (RT-PCR) tal como describe Frohman (1989). Se trata de retrotranscribir el mRNA utilizando un oligo d(T)_n, y ampliar posteriormente estos cDNAs con un oligo específico del gen de interés y un oligo adaptador que reconoce parte del oligo con el que se ha hecho la retrotranscripción. 10 µg de RNA total fueron diluidos en 16.5 µl de agua, calentados 3 min a 65°C y enfriados sobre hielo. Se añadió a continuación 2 µl del tampón de retrotranscripción 10x (Promega), 0.5 µg del oligo dT_n (es este caso fue POLYA1), 10 u de transcriptasa reversa (Promega) y agua hasta 20 µl. Se incubó a 42°C 1 hora, luego a 52°C 30 min y se paró la reacción diluyendo la mezcla en 1 ml de TE.

Para la reacción del PCR se mezclaron 5 µl del cDNA resultante de la retrotranscripción, 5 µl del tampón 10x (Boehringer), 4 µl de una mezcla de dNTPs a una concentración de 2.5 mM en cada uno de ellos, 1 µl de cada uno de los oligos a 25 pmol/ µl (el oligo adaptador fue POLYA2 y el oligo específico, que en los transcritos producidos por los plásmidos de la serie pVPA se llamaba ACT e hibridaba con secuencias del gen de la actina, mientras que el oligo específico usado con el gen *FBP1* completo fue el denominado FBPA, que hibridaba con la región codificante de dicho gen) y agua hasta 45.5 µl. Se calentó 5 min a 95°C, se enfrió a 72°C, se añadió 0.5 u de Taq polimerasa, se recubrió con aceite mineral, se incubó 5 min a 55°C y se extendió 40 min a 72°C. El programa usado fue de 40 ciclos de: 95°C 40 segundos, 55°C 1 min y 72°C 3 min. Al final se extendió 15 min a 72°C.

Para clonar los fragmentos de PCR el vector pUC18 fue digerido con *Sma*I, que genera extremos romos, y fue incubado con 2.5 u de Taq en presencia de 1mM de dTTP en un volumen final de 100 µl durante 2 horas a 72°C para generar una adición de T en los

extremos del sitio de restricción para compensar los residuos de adenina añadidos por la Taq. Dichas construcciones se secuenciaron con el cebador universal.

3.7.- Procesamiento *in vitro* de pre-RNAs

Los extractos celulares de procesamiento se prepararon de acuerdo con el procedimiento descrito por Chen y Moore (1992) con algunas modificaciones. Se crecieron cultivos de 2 litros de YPD con la cepa BJ2168 hasta una DO_{600} de 1. Las células se recogieron y resuspendieron en 60 ml de tampón A (sorbitol 1M, Tris-HCl pH 7.8 50 mM, $MgCl_2$ 10 mM, DTT 30 mM) se agitaron a 80 rpm a 30°C durante 60 min y se enfriaron 15 min en hielo. Se recogieron y se resuspendieron en 4 ml de tampón B (Hepes-KOH pH 7.0 10 mM, $MgCl_2$ 1.5 mM, KCl 10 mM, DTT 0.5 mM, PMSF 1mM, pepstatina A 2 μ M, leupeptina 0.6 μ M). Se añadieron siete ml de perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro y se agitó durante cuatro pulsos de 30 s con intervalos de 1 min en hielo entre ellos. Se centrifugó la mezcla durante 2 min a 1000 rpm y se añadió 60 μ l de una mezcla de inhibidores de proteasas (170 μ l de PMSF 10 mg/ml, 1 μ l de pepstatina A 1 mg/ml y 3 μ l de leupeptina a 1 mg/ml). La concentración de KCl se ajustó a 0.2 M y se agitaron con rotación los tubos durante 60 min a 4°C. Se centrifugó 30 min a 15000g, se recogió el sobrenadante y se clarificó por ultracentrifugación 50000 rpm en un rotor SW50.1 (Beckman) durante una hora. Se añadió lentamente sulfato amónico al sobrenadante para dar una saturación final del 40%. Después de incubar con agitación 30 min, se recogió el precipitado por centrifugación a 12000 g 30 min a 4°C. Se resuspendió el precipitado en 100 μ l de tampón C (Hepes-KOH pH 7.9, EDTA 0.2 mM, DTT 0.5 mM, glicerol 20%, PMSF 1 mM, Pepstatina 2 μ M, leupeptina 0.6 μ M) y se dializó frente a un litro de tampón C a 4°C durante dos horas cambiando el tampón cada hora. Se dividió el extracto en alícuotas pequeñas y se congeló con nitrógeno líquido, guardándose a -70°C.

Los factores de corte purificados fueron un obsequio de Marco Kessler y Claire Moore y se obtuvieron tal y como se describe en Chen y Moore (1992), pero con mejoras aún no publicadas (M. Kessler, comunicación personal).

Los ensayos de procesamiento se realizaron tal y como se describe en Chen y Moore (1992) con las modificaciones sugeridas en Kessler *et al.* (1995). Para la obtención del RNA precursor marcado radiactivamente se digirieron los plásmidos de la serie pIVP con el enzima de restricción de interés, se precipitaron y se redisolviaron a una concentración 1 μ g/ μ l. En un volumen final de 20 μ l se mezclaron: 4 μ l de tampón de transcripción 5x, 1 μ l de una mezcla de ribonucleótidos ACG 10 mM en cada uno, 2.4 μ l UTP 0.5 mM, 1 μ l de caperuza (GpppG) 10 mM, 5 μ l 32 P-UTP, 1 μ l DTT 200 mM, 1 μ l DNA 1 μ g/ μ l, 1 μ l RNasin, 1 μ l T3 polimerasa (10 u) o 2 μ l T7 polimerasa (20 u) y agua hasta 20 μ l. Se incubó a 37°C 1-2 horas, se añadió 180 μ l de TE, 40 μ l acetato amónico 6M y 25 μ g de tRNA.. Se extrajo con cloroformo y se precipitó

con 2 volúmenes y medio de etanol absoluto. Se recogió y resuspendió en 25 μ l de Tris-HCl pH 7.0. Se contó la radiactividad de 1 μ l con un contador de centelleo Wallac 1409.

Las reacciones de procesamiento se llevaron a cabo mezclando: 2 μ l de tampón de Platt 5X (acetato de magnesio 5 mM, acetato potásico 55 mM y PEG 8000 10%), 1 μ l de una mezcla ATP 20 mM y creatina fosfato 200 mM, 3 μ l de extracto celular, 200000 cpm del pre-mRNA y agua hasta 10 μ l. Se incubó 20 min a 30°C. Se añadió 2 μ l de la solución de parada (EDTA 130 mM, proteinasa K 2 mg/ml, SDS 2.5%) y se incubó a 30°C 10 min. Se aumentó el volumen hasta 30 μ l con agua, se extrajo con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y se inyectó en gel desnaturante del 5% una vigésima parte.

Las reacciones de corte con factores purificados se realizaron de la misma manera añadiendo 2 μ l de cada uno de los factores purificados.

3.8.- Ensayos de terminación de la transcripción mediante la medición de la estabilidad de plásmidos

Se determinó la terminación de la transcripción como una magnitud proporcional a la estabilidad de los plásmidos derivados de pNN363 utilizando el método de las medias colonias (Snyder *et al.*, 1988). La cepa diploide YNN318 transformada con los plásmidos de la serie pTER se creció en placas de medio selectivo conteniendo glicerol. A continuación se inocularon a medio mínimo líquido no selectivo, es decir con todos los requerimientos, incluido uracilo, conteniendo glucosa o galactosa y se crecieron durante 16 horas a 30°C. El cultivo crecido en glucosa es el control en el cual el promotor de *GAL10* no se expresa. Se plaquearon varios cientos de células en placas de medio mínimo no selectivo con glucosa o galactosa y conteniendo adenina 5 μ g/ml. Se contó el porcentaje de colonias mitad rosas, mitad rojas (segregación 1:0) en relación con el número de células que poseían originalmente una copia de plásmido (rosas). Las colonias mitad blancas, mitad rojas no se recuentaron, ya que representan segregaciones 2:0.

3.9- *Transcription Run-On* (TRO)

El procedimiento usado está basado en el previamente descrito en *S. pombe* (Maundrell, 1990), con las modificaciones realizadas por Birse y Proudfoot (comunicación personal). La cepa SEY2101/pVPA397F se creció en medio selectivo y se recogieron 20 ml de un cultivo a una DO_{600} de 0.2. Se lavaron las células con 5 ml de tampón TMN (Tris-HCl 10 mM pH 7.4, $MgCl_2$ 5 mM, NaCl 100 mM) frío, y se resuspendieron en 0.9 ml de agua fría y se añadió 50 μ l de una disolución de N-lauril sarcosina sulfato al 10% para permeabilizar las células. Se dejaron en hielo 20 min. Se recogieron las células y se resuspendieron en 60 μ l de tampón de transcripción 2.5X (Tris-HCl 50 mM pH 7.7, KCl 500 mM, $MgCl_2$ 80 mM), se

añadieron 7.5 µl de una disolución de los tres rNTP ACG a una concentración de 10 mM cada uno, 3 µl de DTT 100 mM y se ajustó a 150 µl con agua. Se añadió 6 µCi de (α -³²P)rUTP y se dejó proseguir la transcripción a 30°C durante 3 min. Se paró la reacción con 1 ml de TMN frío, se lavaron las células en ese tampón y se extrajo RNA total, tal y como se describe en el apartado 3.5.

3.10.- Obtención de protoplastos de levadura

La obtención de protoplastos a partir de células de levadura se realizó mediante el preparado enzimático Zimoliasa 20T siguiendo el método de Lohr y Ide (1979). Las células se recogieron por centrifugación y se lavaron dos veces con H₂O fría y una vez con medio de pretratamiento: Tris-HCl 0.1 M, EDTA 5 mM, β -mercaptoetanol 75 mM, pH 8.0. Posteriormente se resuspendieron en 10 volúmenes de este mismo medio y se incubaron 30 minutos a 4°C. Al cabo de este tiempo las células se recogieron por centrifugación y se lavaron una vez con medio de incubación: sorbitol 1.1 M, fosfato sódico 24 mM, pH 6.5. Una vez lavadas se resuspendieron en este mismo medio a una concentración de 0.2 g de células/ml y se adicionaron 2.5 mg de zimoliasa 20T por gramo de células, incubándose a 37°C durante 30-60 min con agitación suave, hasta que la DO₆₀₀ en SDS 1% (p/v) descendió a un 1% del valor inicial. La formación de protoplastos se siguió también mediante observación microscópica.

3.11- Obtención de núcleos de levadura

Se siguió el método descrito por Funk *et al.* (1989). Los protoplastos se lavaron dos veces con el medio de incubación y se resuspendieron con ayuda de un homogeneizador Potter-Elvehjem en 5 volúmenes de medio de lisis: MOPS 20 mM pH 6.8, Espermina 0.84 mM, Espermidina 2.16 mM, KCl 20 mM, EDTA 10 mM, EGTA 2 mM, PMSF 1 mM y Triton X-100 0.2% (v/v). A continuación se llevó a cabo una centrifugación de 10 min a 120xg. El sobrenadante se transfirió con cuidado a un nuevo tubo y se centrifugó a 3000xg 10 min para sedimentar la fracción nuclear cruda.

3.12- Digestión con nucleasas de protoplastos y núcleos de levadura

Para las digestiones con nucleasa de micrococo se siguió el protocolo de protoplastos permeabilizados con NP-40 (Kent *et al.*, 1993).

Los protoplastos se lavaron con medio de incubación y se resuspendieron en tampón A (sorbitol 1M, NaCl 50 mM, Tris-HCl pH 7.4 10 mM, Mg Cl₂ 5 mM, CaCl₂ 1 mM, β -mercaptoetanol 1mM, espermidina 0.5 mM). Se prepararon alícuotas de 100 µl conteniendo

10^8 células y se mezclaron con 100 μ l de tampón A frío conteniendo 0.15% (p/v) del detergente Nonidet P-40 y la nucleasa. Se utilizaron 30-300 unidades de MNasa/ml. Se agitó con cuidado y se incubó durante 5 min a 37°C.

Las digestiones con nucleasa S1 se llevaron a cabo sobre extractos nucleares. Los núcleos se resuspendieron en tampón de S1 (NaCl 30 mM, acetato sódico 30 mM y ZnSO₄ 3 mM pH 4.8), haciendo alícuotas de 1 ml por tasa de digestión. Se digirieron con 1-2 unidades de S1/ μ g de DNA durante 30 min a 37°C (del Olmo *et al.*, 1993).

Tras la digestión con nucleasas se paró la reacción con EDTA a una concentración final de 10 mM, dejando las muestras en hielo. Finalizadas todas las incubaciones se añadió a las muestras SDS hasta alcanzar el 1% (p/v) y proteinasa K hasta una concentración final de 100 mg/ml, y se digirieron durante una hora a 37°C. A continuación se extrajeron con un volumen de fenol varias veces hasta que no se observó material en la interfase, una vez con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1, v/v/v) y una vez con cloroformo alcohol isoamílico (24:1, v/v).

Para precipitar con etanol en DNA se añadió a las muestras acetato sódico hasta una concentración final de 0.3 M y se precipitaron con dos volúmenes de etanol ó 0.6 volúmenes de isopropanol a -20°C durante al menos media hora. Los precipitados se recogieron por centrifugación a 12000xg 15 min, se lavaron con etanol 70% (v/v) y se secaron a vacío. Una vez secos se disolvieron en tampón TE+RNAsa A (20 μ g/ml) y se incubó a 37°C una hora. El DNA se precipitó después con etanol de la forma ya descrita.

3.13- Mapeo de los sitios de corte de las nucleasas

Para detectar los puntos de corte de las nucleasas a baja resolución se utilizó el método del marcaje terminal indirecto (Wu, 1980).

Una vez digerida la cromatina con diferentes concentraciones de nucleasa, generalmente a tasas de digestión muy bajas, se purificó el DNA y se sometió a restricción con un enzima adecuado. Las muestras se analizaron en una electroforesis en la que también se incluyeron patrones de tamaño conocido. Una vez completada la electroforesis el DNA se transfirió a un filtro y se hibridó con la sonda apropiada. En este método, la sonda utilizada es pequeña en relación al fragmento de restricción a estudiar y está situada en un extremo.

Utilizando este sistema se pueden producir dos tipos de resultados. Si el fragmento de restricción es degradado uniformemente por la nucleasa, es decir, no existe ningún punto de corte preferente dentro del fragmento, aparecerá una mancha continua desde la banda que corresponde al fragmento hacia abajo. Pero si existe algún punto de corte preferente (sitio o zona hipersensible) aparecerá una banda discreta, de mayor o menor anchura dependiendo de la anchura de la zona hipersensible. Como la sonda sólo es capaz de hibridar con las secuencias situadas en el extremo del fragmento de restricción, de las dos bandas posibles

producidas por un corte preferente dentro del fragmento sólo una, la situada del lado de la sonda, será detectable (siempre que el corte quede fuera de la región cubierta por la sonda). El tamaño de esta banda se puede calcular utilizando patrones de tamaño conocidos incluidos en el mismo gel. Puesto que se conoce uno de los puntos de corte que han dado lugar a la banda, el producido por el enzima de restricción, y el tamaño del fragmento, se puede calcular la situación del segundo punto de corte, el producido por la nucleasa.

En este método pueden producirse dos tipos de artefactos. El primero se debe a la especificidad de secuencia de la nucleasa. En el caso de que una nucleasa digiriera el DNA en la cromatina en función de su secuencia y no de su accesibilidad en la cromatina, los resultados obtenidos no darían información sobre la estructura de la cromatina. Se puede eliminar este artefacto utilizando controles de DNA desnudo digerido con la nucleasa para descartar aquellas bandas que pudieran deberse a la especificidad de secuencia de la enzima.

El segundo artefacto puede aparecer si la digestión es demasiado extensa. En este caso se producen fragmentos por dos puntos de corte simultáneos de la nucleasa. Si uno de estos puntos está situado dentro de la zona que hibrida con la sonda, dará lugar a una banda en la autorradiografía que, por no proceder de un corte con el enzima de restricción, no da información útil sobre la posición de los puntos de corte. Este artefacto puede evitarse si se utilizan sondas de 100-300 pares de bases (para que resulte improbable la producción de un corte de la nucleasa dentro de la zona de la sonda), si se hacen digestiones muy suaves (para que estadísticamente solo se produzca un punto de corte de doble cadena por molécula) o si se emplean varias sondas y puntos de corte de restricción (para que los resultados obtenidos sean corroborables entre sí). En este trabajo se han tomado las tres precauciones simultáneamente.

El DNA obtenido de las cepas transformadas con los derivados de YEp24 se digirieron con *SaI* si se pretendía mapear desde 3', utilizando una sonda *SaI-BamHI* perteneciente a secuencias del vector. Cuando el mapeo era desde 5', la digestión se realizó con *HpaI* y la sonda a emplear fue *HpaI-BamHI*.

3.14- Footprinting in vivo

Para la determinación de los puntos de corte a alta resolución se llevaron a cabo experimentos de footprinting siguiendo el protocolo de Axelrod y Majors (1989). Una fracción del DNA digerido con S1 conteniendo entre 100-500 ng de plásmido se combinó con 0.3 pmoles del oligo marcado en 5' con ^{32}P (unas 10^6 cpm), 2.5 μl de tampón de *Taq* 10x (Boehringer Mannheim) y agua hasta 24 μl . El oligo utilizado fue FBPB, situado 68 pb en posición 3' respecto al final de la zona de TA. Se desnaturalizó el DNA calentando 5 min a 95°C , y se hibridó con el oligo enfriando 20 min a 48°C . Se realizó la extensión 5 min a 70°C

después de añadir 1.2 μ l de dNTPs 5 mM y 5 μ l de tampón de Taq 1x conteniendo 1 unidad de Taq polimerasa. Se precipitó la muestra con etanol.

4.- TÉCNICAS ANALÍTICAS

4.1.- Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Se utilizó el método de electroforesis en gel de agarosa sumergido descrito en Maniatis *et al.* (1982). Se utilizaron geles de diferentes concentraciones de agarosa (entre el 0.7 y el 2% (p/v)) en tampón TBE 0.5x: Tris 0.0445 M, ácido bórico 0.0445 M, EDTA 1 mM, pH 8.3. Las electroforesis se realizaron en el mismo tampón a 4°C y 5 V/cm. Las electroforesis con fines preparativos se realizaron de manera análoga pero utilizando como tampón el TAE 1x: Tris 0.04 M, ácido acético 0.04 M, EDTA 1 mM, pH 8.0. Como disolvente de las muestras se utilizó el mismo tampón suplementado con 5% (v/v) de glicerol o Ficoll, 0.05% (p/v) de azul de bromofenol y 0.05% (p/v) de xilencianol.

Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (1 mg/ml en TBE) durante 30 min y se destiñeron en TBE durante otros 30 min. Alternativamente se añadió a la agarosa fundida una cantidad equivalente de bromuro de etidio con el fin de evitar estos pasos de tinción y desteñido. Una vez desteñidos, los geles se fotografiaron utilizando un transiluminador ultravioleta a 312 nm y una cámara Polaroid MP4, cargada con negativos Agfapan 100 profesional de 9x12 cm, a través de un filtro ultravioleta convencional y un filtro Kodak Wratten nº 22.

4.2.- Electroforesis de RNA en geles de agarosa desnaturalizantes

Las electroforesis de RNA se realizaron en geles de agarosa con formaldehído según se describe en Maniatis *et al.* (1982). Todos los útiles y reactivos utilizados se trataron con las mismas precauciones utilizadas en la extracción del RNA. Se pesó la cantidad suficiente de agarosa como para obtener concentraciones finales del 1.8-2% y se fundió con la cantidad necesaria de agua estéril. Seguidamente se añadieron los volúmenes adecuados de tampón de electroforesis 5x (MOPS 0.1 M pH 7.5, acetato sódico 40 mM, EDTA 5 mM pH 8.0) y de formaldehído para lograr concentraciones finales de 1x y 2.2 M, respectivamente.

Las muestras se prepararon mezclando el RNA disuelto en agua estéril (hasta 20 mg de RNA en un volumen de 4.5 μ l) con 2 μ l de tampón de electroforesis 5x, 3.5 μ l de formaldehído y 10 μ l de formamida desionizada. Se incubaron a 55°C durante 15 min y se añadieron 2 ml de disolvente de muestras estéril (glicerol 50% (v/v), EDTA 1 mM, azul de bromofenol 0.4% (p/v), xilencianol 0.4% (p/v)). La preparación de las muestras se realizó

siempre inmediatamente antes de la electroforesis, que se desarrolló en tampón de electroforesis 1x, a 4°C y a 5 V/cm durante 6-8 h, con una preelectroforesis previa de 5 min.

Tras la electroforesis, los geles se tñieron con bromuro de etidio 1 mg/ml en tampón de electroforesis 1x y se destñieron con agua, con agitación y durante, al menos, 1h.

4.3.- Electroforesis de DNA y RNA en geles de poliacrilamida

Se siguió el método de electroforesis vertical descrito en Maniatis *et al.* (1982). Para las muestras de RNA correspondientes al procesamiento *in vitro* se utilizaron geles de 21x18x0.15 cm conteniendo el 5% (p/v) de poliacrilamida (acrilamida/bisacrilamida, 29:1) y urea 8 M en tampón TBE.

Las electroforesis de secuenciación se llevaron a cabo en geles de 40x35x0.004 cm (o en gradiente de 0.002 a 0.004 cm) con acrilamida 6 ó 7.5% (p/v) y urea 8 M en tampón TBE. Tras una preelectroforesis a 1000 V durante 30-60 min, la electroforesis se llevó a cabo a 1200-1500 V durante aproximadamente 4 horas. Una vez acabada, los geles que contenían $\alpha^{32}\text{P}$, se transfirieron a papel Whatman n°3, se cubrieron con papel de plástico protector y se secaron a vacío. Los geles con $\alpha^{35}\text{S}$ se incubaron 20 min en acético 10%, metanol 10% (v/v en agua), se transfirieron a papel y se secaron. En ambos casos, sobre el gel ya seco se colocó una película de rayos X (Hyperfilm-mp de Amersham) que se expuso durante el tiempo necesario a temperatura ambiente o a -80°C. Las placas de vidrio empleadas en estas electroforesis fueron siliconizadas previamente con "solución repelente" (diclorodimetilsilano 2% (v/v) en cloroformo). Todas las muestras se calentaron a 75°-80°C durante 2 min antes de aplicarse en el gel de secuencia.

4.4.- Transferencia de ácidos nucleicos a filtros

Se utilizó el método descrito por Southern (1975) para la transferencia de DNA de geles de agarosa a filtros de nylon con las modificaciones recomendadas por la casa comercial que suministró el papel de nylon (Amersham, 1985). Una vez teñido y fotografiado el gel de agarosa, si éste era desnaturizante conteniendo formaldehído se transfirió directamente. Cuando se trató de un gel nativo de DNA se desnaturizó el DNA con anterioridad a la transferencia. En primer lugar se incubó 15 min en HCl 0.25 M. Posteriormente se le dió dos lavados de 15 min en solución desnaturizante (NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M), para luego mantenerlo 30 min en solución de neutralización (Tris-HCl pH 7.2 0.5 M, NaCl 1.5 M, EDTA 1 mM).

Para la transferencia se depositó el gel sobre una hoja de papel Whatman n° 3 de la misma anchura que la cubeta de transferencia aunque más larga, formando así dos mechas laterales de papel para absorber tampón desde dos cubetas situadas a los lados. Sobre la

superficie del gel se depositó una hoja de papel para transferencia de su mismo tamaño, haciendo coincidir el borde superior del papel con los pocillos del gel. Sobre el papel de transferencia se colocó una hoja de papel Whatman nº 3 del mismo tamaño que el gel humedecida en tampón y 10 cm de toallas secas que se comprimieron sobre el gel mediante un peso de 1-1.5 kg. La transferencia se realizó durante 12-16 h a temperatura ambiente. El tampón utilizado fue SSC 6x (SSC 1x= NaCl 0.15 mM, citrato sódico 15 mM, pH 7). Una vez realizada la transferencia se comprobó la desaparición del DNA del gel mediante tinción con bromuro de etidio. Los filtros de nylon se secaron entre papeles de filtro. Posteriormente se irradiaron con luz ultravioleta con un Stratalinker (BioRad) para fijar los ácidos nucleicos a la membrana y se guardaron en bolsas de plástico selladas y a 4°C hasta el momento de su uso.

Para realizar el *slot blot* utilizado en los ensayos de *run-on* se utilizó el dispositivo que para tal uso proporciona Bio-Rad. Los fagos de simple cadena se unieron a la membrana de nylon tal y como describen Osborne y Guarente (1989). Cinco µg de cada fago de simple cadena se resuspendieron en 400 µl de TE y se desnaturalizaron con 40 µl de NaOH 3M. Se incubaron las muestras 30 min a 65°C y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Se añadieron entonces 400 µl de acetato amónico 2 M pH 7.0. Los fagos así desnaturalizados se aplicaron sobre la membrana de nylon en presencia de vacío y se fijaron de la forma habitual.

4.5.- Hibridación de RNA y DNA sobre filtros con sondas radiactivas

Se utilizaron condiciones similares a las descritas por Amersham (1985). Los filtros de nylon Hybond-N se incubaron a 42°C con una solución de prehibridación consistente en SSPE 5x, Denhardt 5x, SDS 0.5% y DNA de esperma de salmón sonicado 200 mg/ml (SSPE 20x: NaCl 3.6 M, fosfato sódico 0.2 M, EDTA 0.02 M pH 7.7; Denhardt 100x: BSA 2% (p/v), Ficoll 2% (p/v) y PVP 2% (p/v)) durante un mínimo de 30 min para los filtros conteniendo DNA y de 2 h para Iso filtros conteniendo RNA. Posteriormente se incubaron con la solución de hibridación dentro de tubos de vidrio y en una estufa de hibridación durante 16-20 h a la misma temperatura. La solución de hibridación se componía de SSPE 5x, formamida desionizada 50% (v/v), SDS 0.5%, Denhardt 5x, sulfato de dextrano 10% (p/v) y DNA 200 mg/ml.

La concentración de la sonda en esta solución osciló entre 50-100 ng/ml y 1-8x10⁶ cpm/ml. Una vez hibridados los filtros se lavaron dos veces durante 10 min con SSPE 2x, SDS 0.1% (p/v) a temperatura ambiente y una vez durante 15 min con SSPE 1x, SDS 0.1% (p/v) a 65°C. Todos estos lavados se hicieron con agitación. Finalmente los filtros se secaron al aire.

Para eliminar la sonda, con el propósito de reutilizar el filtro, se utilizaron lavados con SDS al 0.1% (p/v) y llevando a ebullición durante 30-60 min. A continuación se dejaron secar

y la eliminación de la sonda se comprobó con un contador Geiger. Los filtros lavados se rehibridaron sin pérdida aparente de la capacidad de hibridación. Asimismo las sondas se hibridaron con diferentes filtros, guardándose a -20°C entre una hibridación y la siguiente. Se observó una reducción progresiva de la capacidad de hibridación de las sondas por lo que las reutilizaciones se limitaron a 3-5 generalmente.

En el caso del *slot blot* se prehibridó el filtro 3 horas a 50°C en una solución de hibridación compuesta de: formamida 50%, sales de hibridación 1x (NaPO_4 50 mM pH 6.4, NaCl 800 mM, EDTA 1mM pH 8.0), SDS 0.1%, Denhardt 2.5x, ssDNA 1 mg/ml. El RNA que se utilizó como sonda se hidrolizó parcialmente añadiendo NaOH 40 mM e incubando en hielo 5 min y se neutralizó añadiendo una cantidad equivalente de HCl 500 mM. Se añadieron 5×10^5 cpm de sonda y tRNA 100 $\mu\text{g/ml}$ a la solución de hibridación y se hibridó toda la noche a 50°C . El filtro se lavó durante cinco periodos de 15 min a 60°C con una solución de SDS 0.05%, NaCl 25 mM, NaPO_4 10 mM pH 6.5.

4.6.- Autorradiografía de los filtros hibridados

Se utilizaron películas Kodak X-Omat S y BioMax, Hyperfilm de Amersham. Los cassettes fueron Kodak X-Omatic, provistos de dos pantallas intensificadoras Kodak X-Omatic regular o BioMax. Las autorradiografías se desarrollaron a temperatura ambiente o a -80°C en la oscuridad durante tiempos variables (entre 2 y 100 h), dependiendo de la radiactividad.

Las placas fotográficas se revelaron con revelador Kodak D-19 durante 5 min a 20°C o en una máquina de revelado automático Agfa modelo Curix 60.

4.7.- Cuantificación de los filtros hibridados

Se llevó a cabo mediante la medición directa de la radiactividad del filtro con un sistema de autorradiografía electrónica Instantimager (Packard).

Alternativamente se densitometraron los autorradiografías con un densitómetro Laser Ultrascan 2202 (LKB) provisto de un integrados Hewlett-Packard 3390A.

4.8.- Valoración de actividades enzimáticas

La obtención de extractos para las medidas de actividad FBPasa se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Funayama *et al.*, (1980). Las cepas RG15d/pRS2083 y /pRS2083D3 se crecieron en un medio conteniendo glucosa al 2% hasta que alcanzaron los 7 mg/ml. Las células se transfirieron entonces a medio conteniendo etanol al 2% y se crecieron al menos 6 h más para conseguir la desrepresión del gen *FBP1*. Las células se recogieron

por centrifugación a 3000xg 5 min y se lavaron dos veces con el mismo volumen de agua destilada. A 100 mg de células se añadieron entonces 0.5 ml de tampón imidazol 20 mM pH 7 y 1 g de perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro y se agitaron fuertemente al vórtex durante cuatro períodos de un minuto, con un intervalo de un minuto entre ellos, en el que se mantuvo el tubo en hielo. Se retiraron las bolas y los restos de células mediante centrifugación a 3000xg 10 min y el sobrenadante se utilizó como extracto para las valoraciones enzimáticas.

Las medidas de actividad enzimática se llevaron a cabo siguiendo el método descrito por Gancedo y Gancedo (1971). La mezcla de reacción contenía: tampón imidazol 50 mM pH 7, KCl 0.1 M, MgCl₂ 10 mM, EDTA 1 mM, NADP 0.2 mM, fructosa-1,6-bisfosfato 0.2 mM, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 0.8 U, fosfoglucosa-isomerasa 0.8 U y el extracto.

La reacción se iniciaba por la adición de fructosa-1,6-bisfosfato y se seguía la producción de NADPH por aumento de la D.O. a 340 nm.

Una unidad de enzima se define como la cantidad que cataliza la conversión de un mmol de sustrato por minuto. La actividad específica FBPassa se expresa en mU/mg de proteína.

Las medidas de la actividad β -galactosidasa se realizaron según el protocolo descrito en Ausubel *et al.* (1987). Se partió de un cultivo de 5 ml en fase exponencial. Las células se centrifugaron y resuspendieron en 5 ml de tampón Z (Na₂HPO₄ 60 mM, NaH₂PO₄ 40 mM, KCl 10 mM, MgSO₄ 1 mM β -mercaptoetanol 50 mM pH 7.0) y se determinó la DO₆₀₀. A 900 μ l de tampón Z se añadió 100 μ l de células y se permeabilizaron con una gota de 0.1 % SDS y dos gotas de cloroformo. La mezcla se agitó y se atemperó 15 min a 30°C. Se añadió entonces 0.2 ml de ONPG 4 mg/ml. Se agitó con vortex y se incubó a 30°C. Cuando apareció color amarillo se paró la reacción con 0.5 ml de Na₂CO₃ y se anotó el tiempo y se midió la aparición de color a DO₄₂₀. Con todos estos datos se determinó la actividad β -galactosidasa en unidades arbitrarias. Se realizaron experimentos independientes con dos o tres aislados y se calculó la media.

5.- MÉTODOS INFORMATICOS

5.1.- Predicción de estructuras secundarias de RNA y DNA

El cálculo de posibles estructuras secundarias en los mensajeros y de su energía se realizó utilizando el programa MFOLD, basado en el algoritmo ideado por Zuker (1989). El citado algoritmo es de los denominados recursivos o repetitivos. En ellos se distinguen dos etapas. En la primera, el llamado algoritmo de relleno ("fill"), se computa y almacena las energías mínimas de plegamiento para todos los fragmentos de la secuencia, empezando con todos los pentanucleótidos y continuando hasta fragmentos mayores de una forma repetitiva. El segundo algoritmo, denominado de búsqueda retroactiva ("traceback"), calcula

la estructura de menor energía buscando en la matriz de energías acumuladas. Zuker alteró el algoritmo de forma que las secuencias lineales fueran tratadas como secuencias circulares para formar matrices energéticas triangulares ("energy dot plots") con las cuales se pueden calcular las estructuras subóptimas, además de las óptimas, en un rango dado de energías. El programa MFOLD fue modificado por GCG v.7 (Genetics Computer Group) para utilizar las nuevas energías calculadas por Zuker (Jaeger *et al.*, 1989). El programa MFOLD se corrió en un entorno VAX 3300 utilizando un valor de 28°C como temperatura de apareamiento sin ninguna restricción adicional.

Las estructuras secundarias de las horquillas de DNA correspondientes al cruciforme sin mutar y mutado se calcularon con el programa HAIRPIN v. 2.31 incluido en el PCGENE v.3.0. Este programa utiliza el método y los valores numéricos descritos por Tinoco *et al.* (1973).

5.2.- Predicción de sitios de desestabilización del DNA inducidos por estrés superhelicoidal

La desestabilización sufrida por cada uno de los pares de bases de una secuencia determinada sometida a superenrollamiento se determinó utilizando la aproximación de mecánica estadística desarrollada por el Dr. Craig Benham (1990, 1992, 1993). Estos métodos calculan la probabilidad de separación de cada base en una molécula superenrollada, lo que se llama perfil de desestabilización. Una energía libre está asociada a cada estado de apareamiento entre bases del DNA, con lo que también se puede obtener un perfil de la energía necesaria para deaparear una secuencia concreta de DNA sometida a estrés torsional. Todos los cálculos mostrados han sido realizados por el propio Dr. Benham en el marco de una colaboración destinada a estudiar la relación entre secuencias desestabilizadas y regiones reguladoras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.- ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE LA SECUENCIA d(TA)_n SITUADA EN EL EXTREMO 3' DEL GEN *FBP1*

El estudio de la cromatina en la región 3' del gen *FBP1* de *Saccharomyces cerevisiae* permitió localizar un sitio hipersensible (SH) a MNasa, DNasa I, nucleasas endógenas y nucleasa S1 tanto en cromatina como en DNA desnudo en posición 1130, siendo 1 la posición de la A del triplete de inicio de traducción (del Olmo *et al.*, 1993). A ambos lados del SH se encontraron nucleosomas posicionados, lo cual sugirió que este sitio hipersensible podría actuar como elemento posicionador de nucleosomas.

El análisis de la secuencia de la región correspondiente al sitio hipersensible señaló la existencia de varias secuencias consenso, como dos regiones consenso para ARS (secuencias de replicación autónoma; van Houten y Newlon, 1990), un consenso de SAR (sitios de unión a matriz nuclear; Amati y Gasser, 1988) y uno de unión de la topoisomerasa II descrito en *Drosophila melanogaster* (Sander y Hsieh, 1985) tal y como muestra la Figura 2 (del Olmo, 1991).

En dicha región conviven varios consensos propios de señales de poliadenilación en levadura (Figura 2). Una de ellas es la secuencia tripartita TAG...TATGT...TTT propuesta por Zaret y Sherman y presente en varios genes (Zaret y Sherman, 1982) y la reducción de la misma a un hexanucleótido TATGTA (Russo *et al.*, 1991). Existe una versión reducida de la misma (TAG..TATG) en la orientación inversa. Por otra parte, una repetición de ocho adeninas, similar a la sucesión presente en *FBP1*, actúa como elemento de eficiencia en la poliadenilación del gen *ADH1* (Heidmann *et al.*, 1994). Por último, existe una región TA alternante casi perfecta de 28 pb entre las posiciones 1124 y 1151 y se ha establecido que la repetición de dinucleótidos TA ha resultado ser parte de la señal de poliadenilación de varios genes, como el *GAL7* (Abe *et al.*, 1991), proponiéndose que el hexanucleótido TATATA puede actuar como un elemento de eficiencia en la poliadenilación (Irniger *et al.*, 1992; Russo *et al.*, 1993, Guo y Sherman, 1995).

La región d(TA)_n ya mencionada es a su vez una repetición invertida casi perfecta, con solo un dinucleótido TT en mitad de una sucesión de pares TA. Dichas repeticiones invertidas con capaces de adoptar teóricamente una estructura tipo cruciforme, y así se determinó utilizando el programa HAIRPIN de PCGENE, el cual indicó la presencia de dos horquillas alternantes posibles en el DNA (Figura 3). La presencia de dicho cruciforme en plásmido superenrollado fue demostrada utilizando las nucleasa específicas de estructura S1 y endonucleasa VII del fago T4 (del Olmo y Pérez-Ortín, 1993).

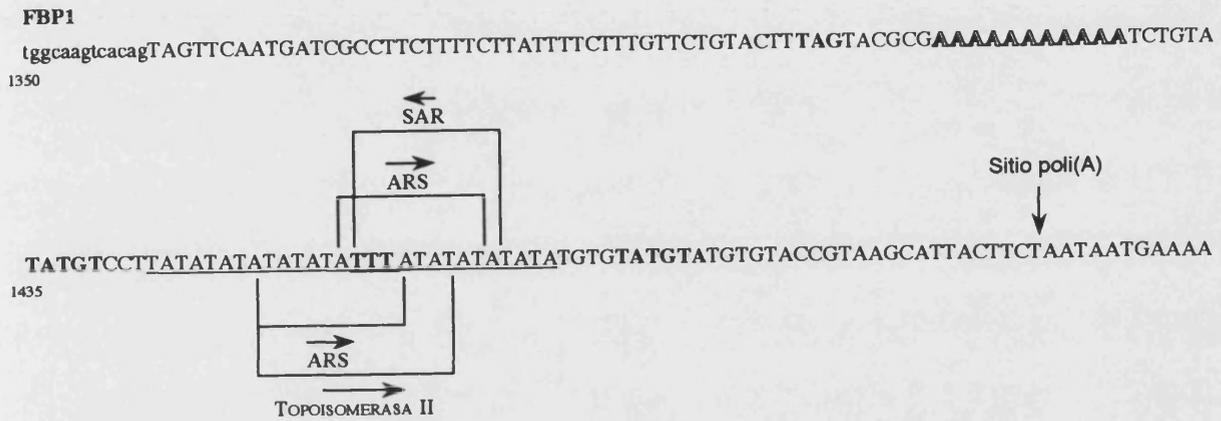


Figura 2.- Secuencia de la región 3' del gen *FBP1*. La numeración considera 1 el inicio de traducción. La región codificante está escrita en minúsculas. Se indican las secuencias que abarcan los consensos de ARS, SAR y sitio de unión de la topoisomerasa II. La repetición d(TA)_n capaz de adoptar un cruciforme está subrayada. El consenso de poliadenilación propuesto por Zaret y Sherman TAG...TATGT..TTT, y el hexanucleótido TATGTA derivado de él se encuentran resaltados en negrita. La secuencia (A)₁₁ está escrita con caracteres huecos. El sitio poli(A) mayoritario se indica por una flecha.

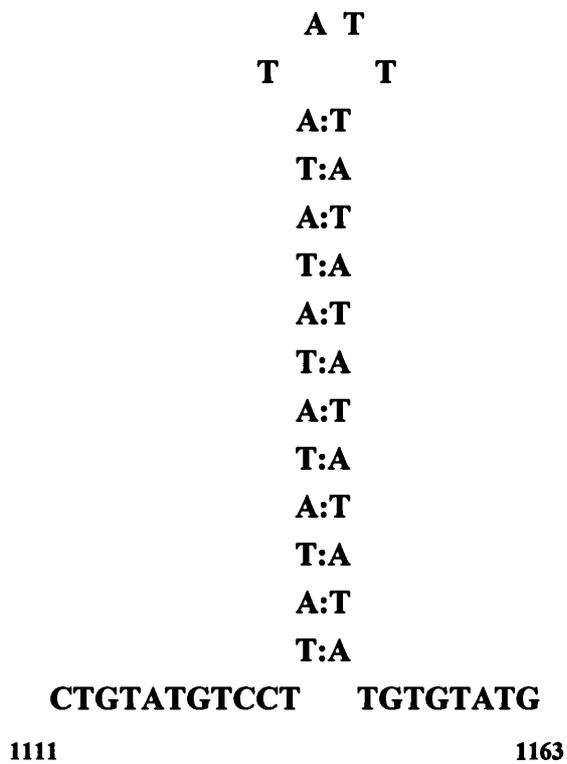


Figura 3.- Horquilla de DNA más estable formada en el flanco 3' del gen FBP1 tal y como predice el programa HAIRPIN. La numeración es la misma que en la Figura 2.

1.1.- Estudio mediante mutagénesis de la estructura adoptada *in vitro* por la secuencia d(TA)_n

Para explorar las posibles estructuras secundarias que pueda adoptar la secuencia alternante d(TA)_n *in vivo* se diseñaron una serie de experimentos para determinar la sensibilidad a nucleasas de derivados mutados de esta secuencia. Las enzimas elegidas fueron la nucleasa S1, que corta cualquier estructura secundaria con presencia de cadena sencilla de DNA, y la endo VII, que reconoce y corta solo estructuras de tipo cruciforme (Pottmeyer y Kemper, 1992). Las mutaciones puntuales y deleciones internas elegidas se muestran en la Figura 4. Las mutaciones simple (SM) y doble (DM) fueron seleccionadas usando al programa PCGENE como mutaciones que dificultan termodinámicamente la formación del cruciforme sin alterar el contenido total en TA. La mutación SM introduce una T en lugar de la A situada en 1145. La DM cambia además la T en 1148 por una A. En las deleciones internas se redujo el número de repeticiones TA desde las 13 originales a 9 (D1), a 3 (D2) y por último se ha eliminado todos los pares TA (D3). Dichas mutaciones se llevaron a cabo sobre el plásmido pFBP391 (del Olmo y Pérez-Ortín, 1993), que contiene un fragmento de restricción de 391 pb del extremo 3' del gen incluyendo la secuencia d(TA)_n, y en el plásmido pFBP2083, que contiene una secuencia de 2083 pb con el gen completo.

1.1.1.- Estudio *in vitro* del efecto de las mutaciones SM, DM y D3 realizadas sobre la secuencia d(TA)_n utilizando Endonuclasa VII y nucleasa S1

Para determinar el efecto *in vitro* de las mutaciones puntuales en la estructura secundaria de esta región se utilizó el plásmido pFBP2083 y derivados. Los plásmidos superenrollados fueron preincubados a 37°C durante 15 min y posteriormente se mantuvieron en hielo para estabilizar cualquier potencial cruciforme. Para detectar los sitios de corte de las nucleasas, las muestras fueron digeridas con el enzima de restricción de sitio de corte único en estos plásmidos AaflI. Esto produjo una banda de 4770 pb de tamaño correspondiente a la longitud total del plásmido en las moléculas de plásmido donde no hubo corte de las nucleasas S1 o de EndoVII. Cuando la nucleasa utilizada cortó en la secuencia d(TA)_n se produjeron dos bandas de 870 y 3900 pb tras la digestión con AaflI. Este último fue el comportamiento que mostró el plásmido de tipo salvaje tanto al ser digerido con Endo VII como con S1 (Figura 5). Por lo tanto en esas condiciones y ese plásmido el cruciforme estaba presente en un porcentaje significativo de las moléculas. En los mutantes sencillo (SM) y doble (DM) la sensibilidad a Endo VII disminuyó a menos del 10% respecto al del tipo salvaje, lo que refleja que ambas mutaciones interfieren en la estructura cruciforme como era teóricamente esperable. La no aparición de bandas de corte alternativas indica que no existen cruciformes alternativos situados en otras zonas del plásmido.

En las digestiones con S1 el patrón de corte fue diferente. En los mutantes SM y DM

1111 1163

WT CTGTATATGTCCT**TATATATATATATATTTATATATATATAT**TGTGTATGTATG

SM CTGTATATGTCCT**TATATATATATATATTTATAT**t**TATATAT**TGTGTATGTATG

DM CTGTATATGTCCT**TATATATATATATATTTATAT**tTA**ATAT**TGTGTATGTATG

D1 CTGTATATGTCCT**TATATATATATATA**-----**TATAT**TGTGTATGTATG

D2 CTGTATATGTCCT**TATATA**-----TGTGTATGTATG

D3 CTGTATATGTCCT-----TGTGTATGTATG

Figura 4.- Secuencia de *FBPI* entre las posiciones 1111 y 1163. En negrita se indica la repetición invertida capaz de formar un cruciforme. Las mutaciones puntuales SM y DM se indican con minúsculas y subrayado. Las deleciones internas (D1-D3) se representan por guiones.

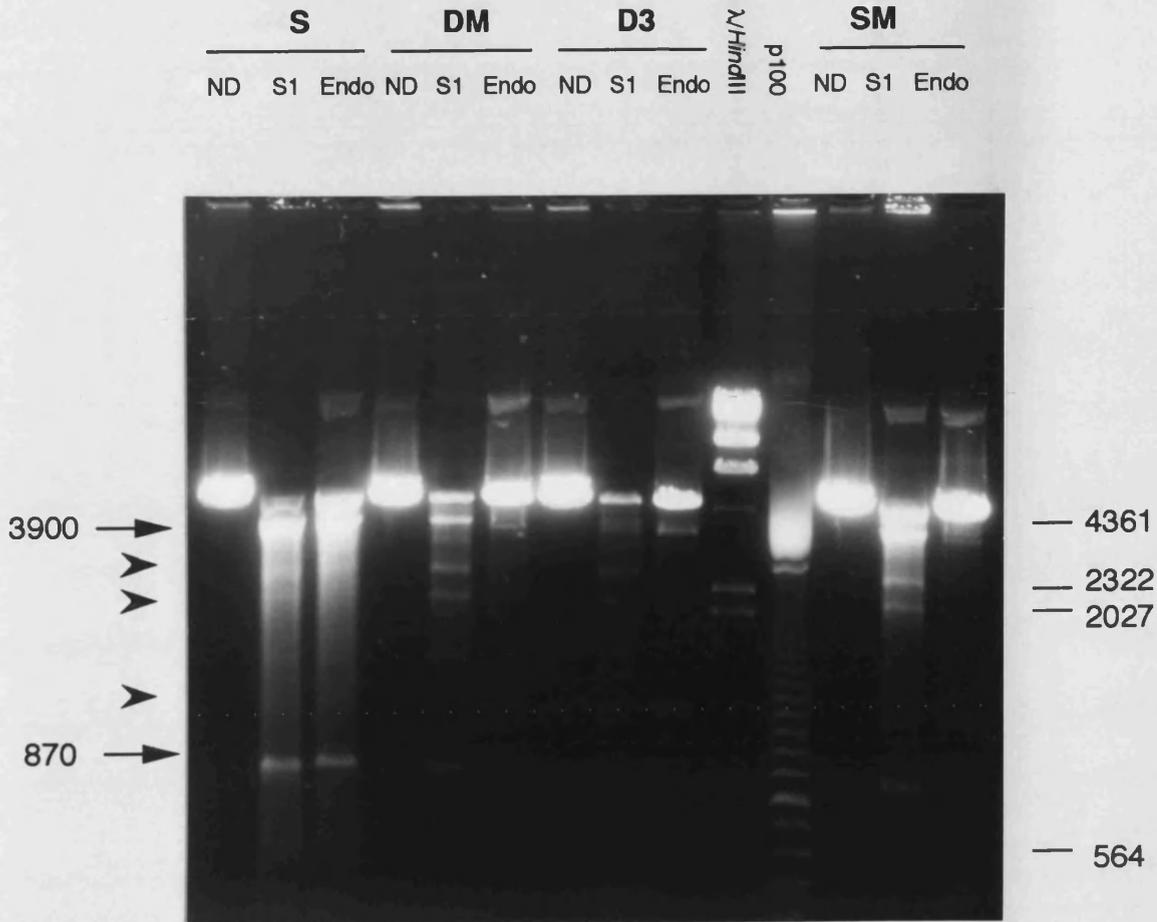


Figura 5.- Sensibilidad de plásmidos conteniendo modificaciones en la secuencia de *FBP1* a Endo VII y S1. Los plásmidos de la serie pFBP2083 conteniendo las secuencias S (salvaje), DM, D3 y SM se muestran sin digerir (ND) y digeridos con S1 o Endo VII. Después de precipitadas, todas las muestras se digirieron con la endonucleasa de restricción *AatII* antes de aplicarse en un gel de agarosa del 1% (p/v). λ /*HindIII* y la escalera de múltiplos de 100 pb (p100) también se muestran. En todos los casos se utilizaron 0.5 unidades de S1 y 200 unidades de Endo VII por μ g de DNA. Las incubaciones se realizaron a 37°C, 5 min en el caso de S1 y 30 min en el caso de Endo VII. Las flechas marcan las posiciones y tamaños (en pb) de las bandas resultantes de la digestión en la secuencia capaz de adoptar una estructura cruciforme. Las cabezas de flecha indican algunos de los sitios secundarios sensibles a las nucleasas usadas. Los tamaños de las bandas más significativas del patrón de tamaño λ /*HindIII* también se indican a la derecha.

persistía una sensibilidad clara en la zona de $d(TA)_n$, lo que indicó que existía alguna otra estructura de DNA no B distinta al cruciforme en esa zona cuando las modificaciones de secuencia impedían la extrusión de éste. La aparición de bandas adicionales indicó que dicha estructura no era tan efectiva como la original a la hora de absorber la tensión superhelicoidal del plásmido. La delección de los 28 pb de que consta la repetición de TA (D3) hizo a esta zona insensible a la acción de ambas nucleasas, apareciendo en las digestiones con S1 sitios competidores que estaban enmascarados por la estructura predominante formada por el $d(TA)_n$. Por lo tanto se puede afirmar que dicha secuencia es la responsable de la formación de la/s estructura/s no B del DNA y de la sensibilidad a nucleasas de esa zona.

1.1.2.- Predicciones teóricas acerca de la influencia de las delecciones internas realizadas sobre la secuencia $d(TA)_n$ en su capacidad de desapareamiento

Siendo esta una región muy rica en A+T (75%) incluso por encima del 70% típico para un terminador del levadura (Dujon *et al.*, 1994), cabría la posibilidad de que la estructura de DNA alternativa sensible a S1 fuera una desnaturalización local de la doble hélice del DNA sometido a superenrollamiento negativo, ya que el apareamiento entre pares TA es más débil que el equivalente entre pares GC, por poseer un puente de hidrógeno menos (dos frente a tres). Para determinar si esta secuencia es potencialmente desapareable, fue analizada con un programa de ordenador (Benham, 1993) que utiliza un algoritmo que predice sitios desestabilizables. Dicho algoritmo produce dos tipos de perfiles a lo largo de una secuencia dada: un perfil de probabilidades $p(X)$ de que ocurra la apertura de la doble hélice en cada par de bases y un perfil que indica la energía libre $G(X)$ en kcal/mol necesaria para separar un determinado par de bases.

Se analizó la secuencia completa del plásmido pFBP391 y de sus derivados D1, D2 y D3, que presentaban cada vez menos contenido en pares TA. A una densidad superhelicoidal de $\sigma = -0.057$, que entra dentro del rango de los valores presentes *in vivo*, tres regiones del plásmido pFBP391 estaban desestabilizadas según el perfil de energías libres (Figura 6a, muestra S). La más predominante coincidió con la secuencia del flanco 3' de *FBP1*. De hecho según el perfil de probabilidades era el único sitio que se predijo que estaba desapareado en la secuencia salvaje (Figura 6b, S). Las delecciones sucesivas de pares TA (de 13 pares en el tipo salvaje, a 9 en D1, 3 en D2 y 0 en D3), cambiaron el perfil de energías de desestabilización a favor de los otros dos sitios competidores, especialmente del que estaba situado cerca del terminador del gen de resistencia a ampicilina. Este es el único sitio que se predijo que estaba desnaturalizado en D2 y D3. Este sitio secundario coincide con un sitio sensible a nucleasas previamente detectado tanto *in vitro* (Battistoni *et al.*, 1988; Kowalski *et al.*, 1988) como *in vivo* en levadura (Estruch *et al.*, 1989). En la delección D1 ambos picos coexistían en el perfil de probabilidades (Figura 6b, D1), mientras que el tercer sitio de desestabilización del plásmido, situado en el promotor del gen de la resistencia a la ampicilina, nunca fue el predominante y se predijo que nunca estaría desapareado en las condiciones de densidad superhelicoidal

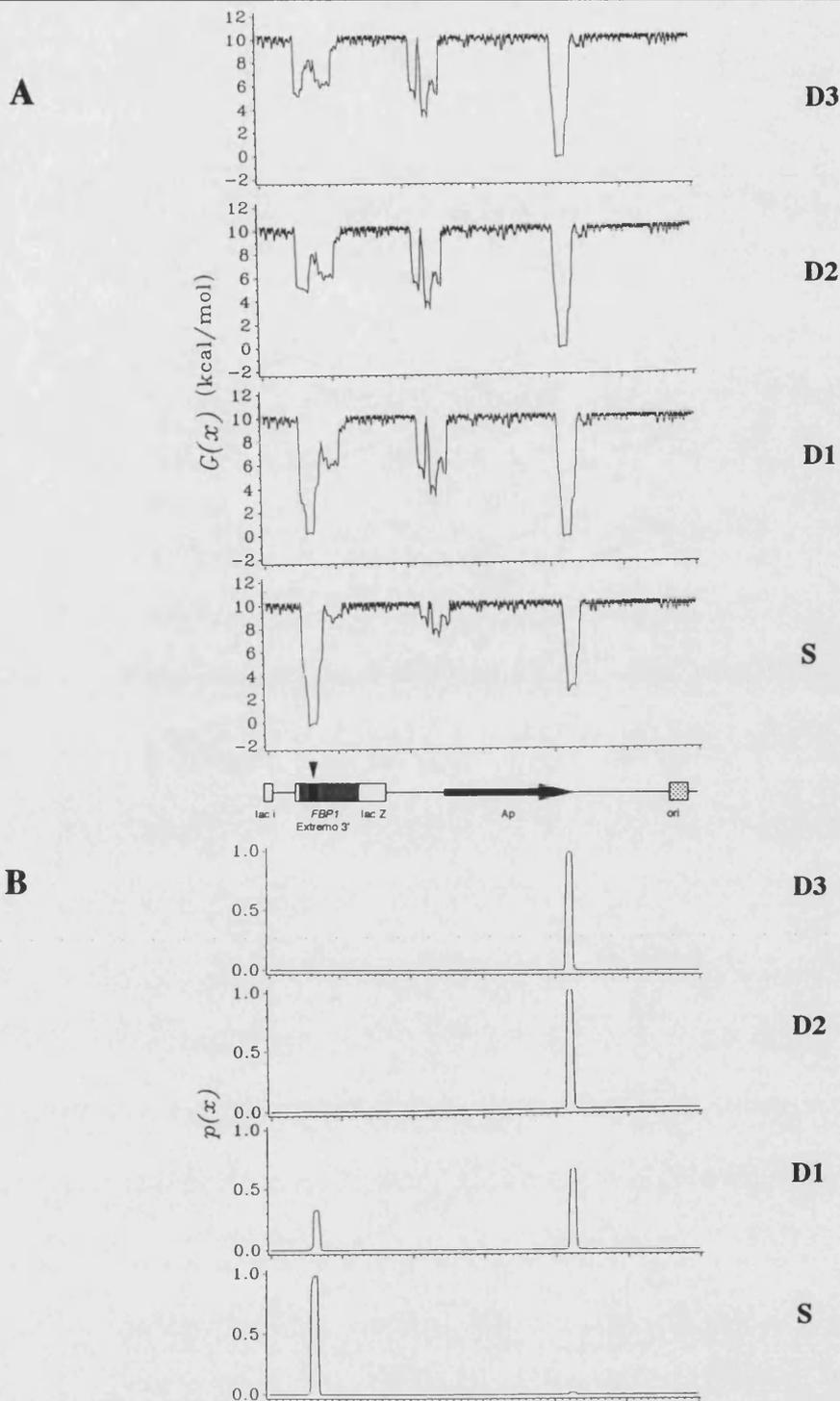


Figura 6.- Estudio teórico del comportamiento de desnaturalización de las sucesivas deleciones internas de la secuencia de *FBPI*. En A se representa la energía de desestabilización $G(x)$ frente a la secuencia completa de los plásmidos derivados de pFBP391. En B se representa la probabilidad de estar desnaturalizado $p(x)$. Los cálculos se realizaron usando un programa previamente desarrollado (Benham, 1993) utilizando una diferencia de número de enlace de -17 (equivalente a $\sigma = -0.057$ para un plásmido de 3080 pb). Se muestra un mapa funcional del plásmido pFBP391 a fin de localizar los sitios de desestabilización. Una cabeza de flecha indica la repetición $d(TA)_n$.

analizadas. Dicho tercer sitio ha sido detectado mediante digestiones con nucleasa *mung bean* en pBR322 cuando el sitio sensible del terminador de la β -lactamasa era eliminado (Kowalski *et al.*, 1988).

1.1.3.- Estudio del efecto de las deleciones internas realizadas sobre la secuencia d(TA)_n en su capacidad de desapareamiento *in vitro*

Estos resultados teóricos fueron corroborados por nuestros resultados experimentales utilizando dichos plásmidos y la nucleasa S1, puesto que esta nucleasa reconoce regiones de DNA desapareadas (Figura 7). La endonucleasa VII no es informativa en este caso puesto que sólo permite la detección de estructuras tipo cruciforme y la longitud de repetición invertida remanente en estas deleciones hace que la capacidad de formación de cruciformes sea insignificante. Sólo la deleción D1 mostró una ligerísima sensibilidad a esta nucleasa (datos no mostrados). En este caso el enzima de restricción de corte único utilizado fue *Asp700*, que produjo en plásmido salvaje el doblete esperado de 1230 y 1850 pb correspondiente al corte en la región de TA alternante (carrera S1+A). No existieron bandas alternativas, así que se confirmaba en perfil de probabilidades de desapareamiento que indicaba que dicha zona era la única con una probabilidad real de desestabilizarse bajo esa densidad superhelicoidal. Cuando la región d(TA)_n se eliminó en el plásmido pFBP391D3 dicho doblete desapareció y apareció el doblete alternativo correspondiente al corte en el terminador del gen de la resistencia a ampicilina predicho teóricamente. En las deleciones intermedias D1 y D2, tal y como se predijo en el perfil de energías de desestabilización, dicha región se iba haciendo más reacia a desaparecer. En la deleción D1 que conserva 9 pares TA la probabilidad teórica de desapareamiento era compartida entre el sitio del flanco 3' de *FBP1* y el terminador del gen de la β -lactamasa, y la sensibilidad a S1 se repartía entre ambos sitios. Dicha correlación entre probabilidad teórica y tasa de digestión experimental no se dio en el caso de la deleción D2 donde permanecen solo tres pares TA; en este caso la probabilidad teórica era nula, pero la sensibilidad a S1 era comparable a la que se produjo en el sitio competidor, aunque ligeramente menor a la que se produjo en D1. Eso nos lleva a pensar que dicho hexanucleótido TATATA puede actuar como elemento nucleador de una desestabilización más amplia. Se ha determinado que una riqueza alta en A+T no es suficiente para causar desapareamiento de una zona y que existen determinantes de secuencia que rigen este proceso. La mutación de tres adeninas (a C o G) en la secuencia ATATAT de la región estimuladora de la transcripción del gen IgH resulta en una reducción de su sensibilidad a cloroacetaldehído (Kohwi-Shigematsu y Kohwi 1990). Se ha propuesto que dicha secuencia ATATAT (presente todavía en la deleción D2) está doblada, pudiendo actuar como nucleante del desapareamiento. Del mismo modo la secuencia AATATATTT actúa como nucleante *in vitro* de la desestabilización de las secuencias de unión a matriz nuclear (Bode *et al.*, 1992).

Los resultados teóricos y experimentales determinaron que la secuencia d(TA)_n era capaz de formar una estructura desestabilizada en plásmido superenrollado, y que dicha

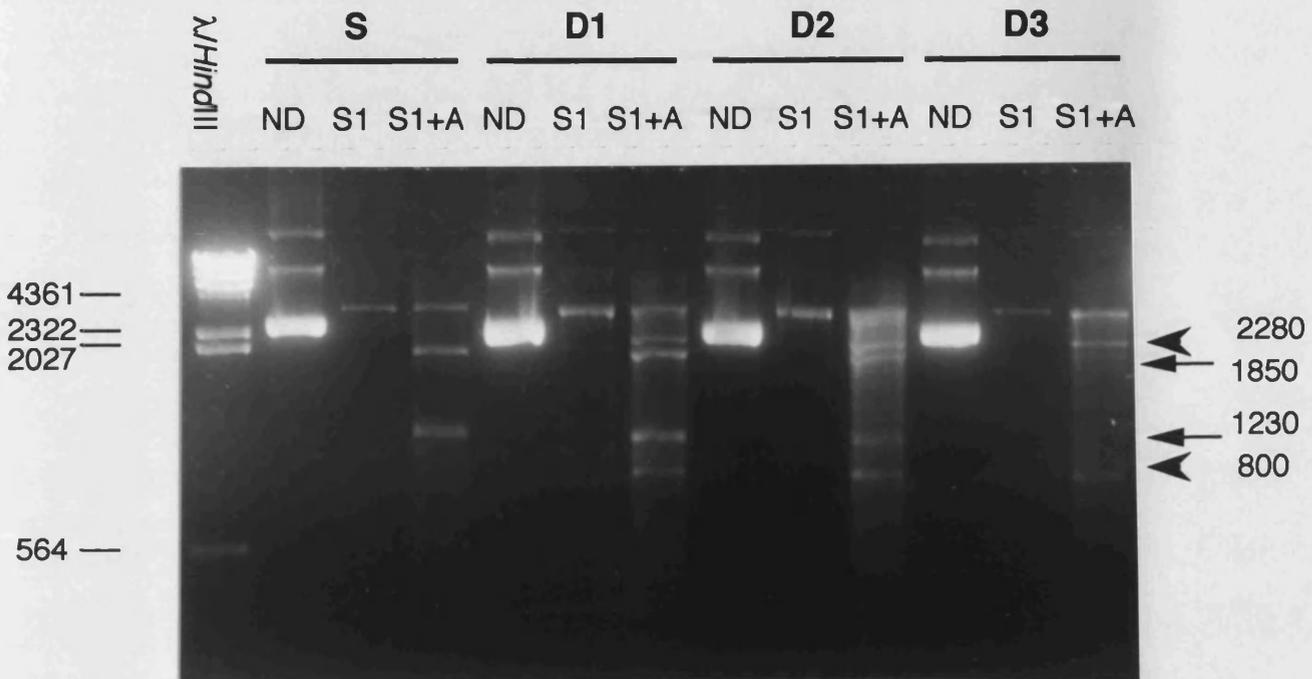


Figura 7.- Estudio experimental del comportamiento de desnaturalización de las sucesivas deleciones internas de la secuencia de *FBP1*. Los plásmidos derivados de pFBP391 conteniendo las secuencias S (salvaje), D1, D2 y D3 se digirieron con nucleasa S1 tal y como en la Figura 5, sin (S1) o con (S1+A) digestión posterior con *Asp700*. Muestras sin digerir (ND) se incluyeron como control. Las bandas de baja migración corresponden a formas circulares y poliméricas de los plásmidos. Todas las muestras se analizaron en un gel de agarosa al 1%. Los símbolos son los mismos que en la Figura 5.

estructura no B del DNA era dependiente del número de pares TA de la secuencia. Cuando estos disminuían, dicha estructura no era capaz de acomodar toda la tensión superhelicoidal y aparecían sitios de corte alternativos en otras partes del plásmido, situados principalmente en el terminador del gen de resistencia a la ampicilina. Se ha demostrado que dicho sitio sensible a nucleasas está desapareado de una manera continuada y estable, no se encuentra "respirando" (Kowalski et al., 1988). Dicho sitio en el plásmido pBR322 es dominante sobre el sitio sensible a nucleasas situado en el promotor del mismo gen, de manera que este último sólo es detectable si se elimina el sitio más fuerte. Esta jerarquía ocurre porque el desapareamiento estable de múltiples sitios en la misma molécula de DNA superenrollado es interdependiente (Benham 1981). Teóricamente, el desapareamiento estable en el sitio energéticamente desfavorable reduce la energía libre disponible para el resto de los sitios presentes en la molécula de DNA, reduciendo la probabilidad de desapareamiento en los mismo. De este modo, considerando que el sitio situado en el terminador del gen de la β -lactamasa está establemente desapareado y es jerárquicamente inferior al sitio situado en la región 3' de FBP1, podemos afirmar que la repetición $(TA)_n$ adopta una estructura desapareada que se mantiene de manera estable, y que no está simplemente "respirando". Nuestro siguiente paso fue determinar la estructura *in vivo* de dicha secuencia.

1.2.- Análisis de la estructura *in vivo* de la secuencia $d(TA)_n$

1.2.1.- Efecto de la delección de la secuencia $d(TA)_n$ en la sensibilidad a S1 en cromatina

Hay dos circunstancias que dificultan el estudio *in vivo* de esta región. En primer lugar, la estructura del DNA no está determinada única y exclusivamente por la secuencia y el grado de superenrollamiento; también influye la unión de proteínas y el propio proceso de transcripción. En segundo lugar, existen problemas metodológicos que dificultaron el uso de Endo VII *in vivo*. Los experimentos *in vitro* con Endo VII fueron realizados en las condiciones descritas en la sección Materiales y Métodos, tal y como sugirió B. Kemper (comunicación personal), a fin de obtener la máxima actividad de esta enzima tan específica. Estas condiciones también favorecen la actividad de diversas nucleasas endógenas no identificadas (datos no mostrados), haciendo imposible determinar que cortes en la región de estudio eran atribuibles a Endo VII y cuales a las nucleasas endógenas. Por lo tanto solo utilizamos en los estudios *in vivo* la nucleasa S1 como enzima específica de estructura. El problema de la nucleasa S1 a la hora de determinar estructuras presentes en la célula viva es el hecho de que las condiciones en que dicha nucleasa es activa (pH 4.8, $ZnSO_4$ 30 mM y NaCl 300 mM) distan de las fisiológicas, sobre todo a nivel de pH. Se ha determinado que la apertura *in vitro* de regiones ricas en A+T está suprimida por concentraciones mayores de 30 mM de NaCl (Bowater et al., 1994). No obstante, la S1 es la nucleasa específica de secuencia más usada para determinar estructuras anómalas del DNA es cromatina, así que la caracterización de uno de estos SH resulta muy interesante.

De todas las mutaciones probadas *in vitro*, solo la delección completa de la repetición de TA (D3) fue utilizada, ya que los estudios *in vitro* indicaron que era la única en la que desaparecía por completo la sensibilidad a la nucleasa S1.

En los estudios de cromatina se utilizó la cepa CJM88 transformada con los plásmidos multicopia derivados de YEp24 llamados YEp2083 y YEp2083D3, que contienen el fragmento de 2083 pb utilizado en algunas de las digestiones *in vitro* y que abarca el gen *FBP1* completo. Se usaron versiones plasmídicas del gen para incrementar el número de copias con el fin de amplificar la detección de los sitios de corte de S1. Experimentos previos mostraron que la sensibilidad a S1 en cepas que contenían únicamente la copia genómica del gen se dio en la misma posición que se obtuvo en los plásmidos (datos no mostrados), aunque la detección fue más difícil.

Los sitios de corte fueron detectados utilizando el método del marcaje terminal indirecto (Wu 1980). Se utilizó una sonda de 300 pb *SalI-BamHI* correspondiente a una zona del vector de origen procariótico (el gen de resistencia a la tetraciclina), lo que permitió mapear únicamente la copia del gen situada en el plásmido, ya bien fuera salvaje o mutada. El DNA extraído tras las digestiones con nucleasa S1 se digirió con *SalI*, que corta a una distancia de unos 800 pb en 3' del sitio hipersensible. En todos los casos los cultivos de partida se realizaron bajo condiciones en las cuales el gen está reprimido (glucosa 2%) ya que resultados previos mostraron que la sensibilidad a S1 era constitutiva, independiente del nivel de expresión del gen (del Olmo *et al.*, 1993).

Se encontró sensibilidad a S1 en la posición 1130 en la cepa conteniendo la versión salvaje del gen (Figura 8, carreras 2 y 3). Esta posición coincidía con el sitio hipersensible a MNasa flanqueado por nucleosomas posicionados (carreras 8 y 10), lo que indica que la estructura de la cromatina de los núcleos utilizados era la correcta. Dicho SH estaba totalmente ausente en la versión mutada D3 (carreras 5 y 6). Eso significa que existe una estructura de DNA anómala en la cromatina de esta región, y que dicha estructura requiere necesariamente de la presencia de la secuencia $d(TA)_n$. La sensibilidad a MNasa se analizó posteriormente para estimar el posicionamiento de nucleosomas (ver más abajo).

1.2.2.- Footprinting in vivo de la sensibilidad a S1 en cromatina

Para determinar que tipo de estructura anómala adopta la secuencia $d(TA)_n$ en cromatina se realizó un *footprinting in vivo* de las digestiones con S1. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 9. Utilizando la secuencia del mutante sencillo SM, se determinó que en el gen de tipo salvaje la S1 corta en el flanco 3' de la mayoría de las timinas de la secuencia de 28 pb (carrera 2).

El patrón de sensibilidad a S1 a nivel de nucleótido nos permitió distinguir entre varias posibilidades. Un cruciforme hubiera mostrado cortes centrados en el lazo del cruciforme, en el centro de la repetición invertida (Lilley, 1980; Nickol y Felsenfeld, 1983; Pulleyblank *et al.*, 1985; Greaves *et al.*, 1985), en lugar de esta distribución amplia, más propia de una zona desapareada. McClellan y Lilley (1987) determinaron que *in vitro*, una secuencia $d(AT)_{34}$ puede

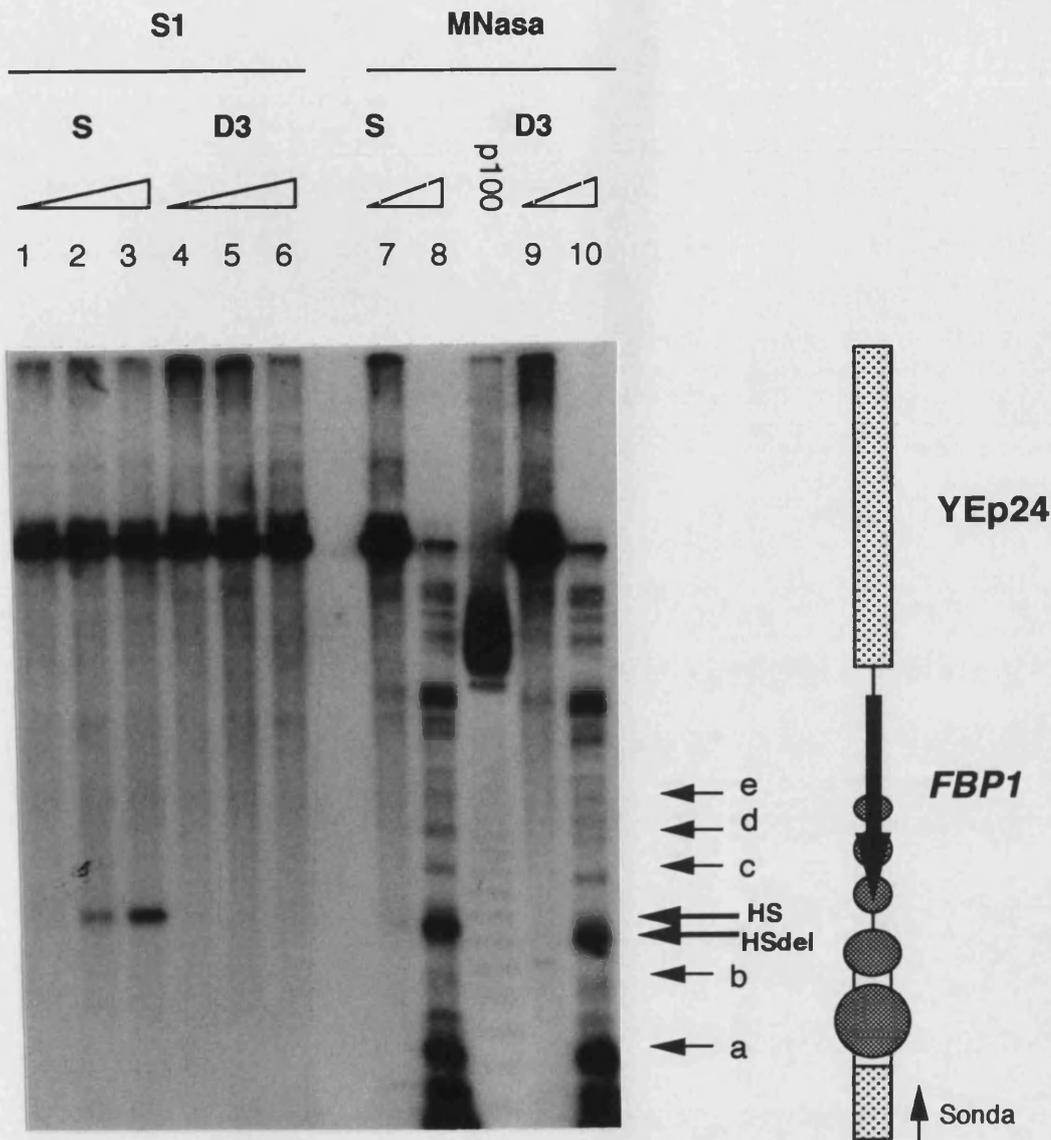


Figura 8.- Sensibilidad de la región 3' de *FBP1* a la nucleasa S1 en cromatina. Núcleos aislados de las cepa CJM88/YEp2083 (carreras 1, 2, 3) y de la cepa CJM88/YEp2083D3 (carreras 4, 5, 6) se digirieron con nucleasa S1. Las cantidades de enzima fueron 0 (carreras 1 y 4), 1 (carreras 2 y 5) y 2 (carreras 3 y 6) unidades/ μ g DNA. Las mismas cepas se digirieron con 0 (carreras 7 y 9) y 100 unidades (carreras 8 y 10) de MNasa/ μ g DNA. Las bandas se detectaron mediante el método del marcaje terminal indirecto, después de digerir las muestras con la endonucleasa de restricción *SalI* y utilizar la sonda *SalI-BamHI* correspondiente a secuencias del vector YEp24. Se utilizó un gel de agarosa del 1%. La posición del sitio hipersensible en las muestras salvajes (SH) y en las muestras D3 (SHdel), además de las bandas características de cromatina (denominadas a, b, c, d, e) se indican mediante flechas. Un esquema del plásmido y de los nucleosomas posicionados se muestra a la derecha.

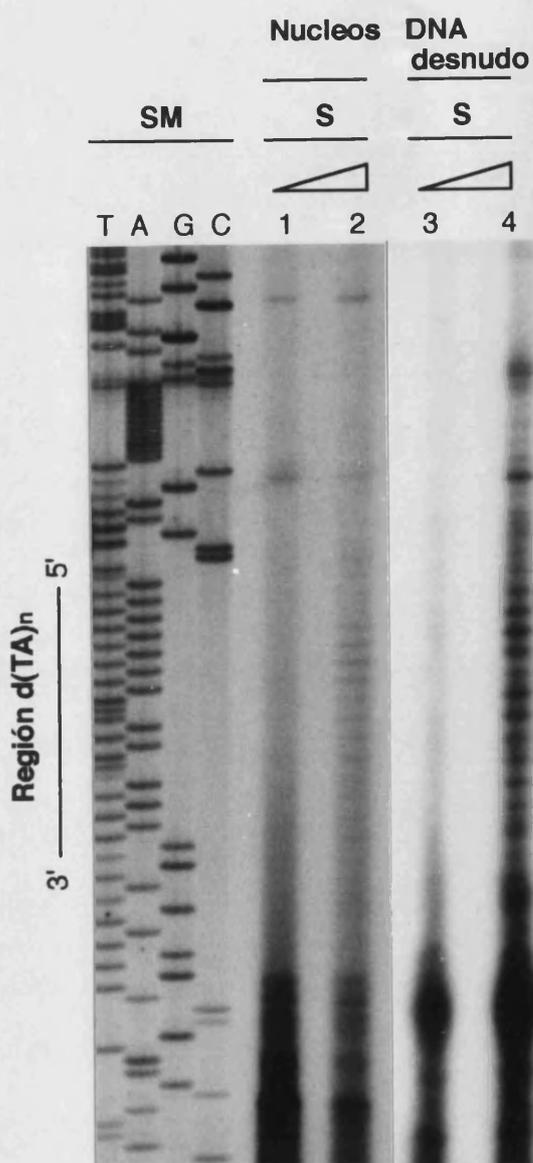


Figura 9.- Mapeo del sitio de corte de la nucleasa S1 en cromatina mediante *footprinting in vivo*. Las carreras TAGC muestran la secuencia del mutante sencillo (SM) para localizar la repetición d(TA)_n. Las muestras provienen de la cepa YEp2083, se digirieron tal y como se describe en carrera 2 de la Figura 8, y se mapearon tal y como se describe en Materiales y Métodos y se aplicaron en un gel de secuenciación de un 6% de acrilamida conteniendo urea 8 M. La carrera 1 muestra una muestra de la cepa CJM88/YEp2083 no digerida con nucleasa S1 pero tratada de la misma manera que la muestra digerida (carrera 2). Plásmido superenrollado se analizó también sin digestión (carrera 3) y después de digestión con 0.1 unidades de S1/ μ g de DNA durante 30 min a 37°C (carrera 4).

adoptar una reactividad central (patrón "C") consistente con la extrusión del cruciforme en condiciones de alta fuerza iónica y baja temperatura, mientras que adopta reactividad uniforme (patrón "U") al bajar fuerza iónica y subir temperatura. Los puntos de corte de S1 en la región $(TA)_n$ de *FBP1 in vivo* estaban confinados en la zona del lazo en experimentos *in vitro* previos realizados en condiciones en las que se favorece la formación del cruciforme, es decir cuando la digestión fue llevada a cabo a 4°C después de estabilizar las moléculas que contienen cruciforme (ver Figura 6 en del Olmo y Pérez-Ortín, 1993). No podemos descartar la posibilidad de que una pequeña fracción de moléculas tengan una estructura cruciforme mientras que el resto de las moléculas adopta un desapareamiento más amplio. El hecho de que los cortes no sean homogéneos a lo largo de la región $d(TA)_n$ y de que la nucleasa S1 carece de sensibilidad de secuencia parece indicar que cada una de las hebras de la burbuja de desapareamiento adopta algún tipo de estructura que hace más accesibles a la nucleasa unos enlaces que otros. Otras regiones TA alternantes muestran una estructura de DNA anómala en la cual el dinucleótido TA es la unidad repetitiva, de manera que cuando reacciona en plásmido superenrollado con tetróxido de osmio y con MNasa se produce una digestión a lo largo de la repetición TA, pero en nucleótidos alternos (McClelland *et al.*, 1986). En otros experimentos similares, las nucleasas DNasal y *mung bean* muestran un patrón similar, mientras que la S1 da un patrón homogéneo de corte, a diferencia de lo que ocurre en nuestro caso (Suggs y Warner, 1986). Por lo tanto la repetición de dinucleótidos TA otorga al DNA una estructura alternativa, que se propaga al dinucleótido TT en mitad de la repetición invertida y que provoca que enlaces fosfodiéster alternos sean más accesibles a la nucleasa S1.

A 37°C la sensibilidad *in vitro* del plásmido YEp2083 (el mismo que se utilizó en los experimentos *in vivo*) mostró un patrón similar al observado *in vivo* (compárese las carreras 2 y 4 de la Figura 9). Debe tenerse en mente que los análisis *in vivo* deben hacerse en el rango de las temperaturas de crecimiento de la levadura, ya que el "congelamiento por temperatura" de los cruciformes no reflejaría el estado fisiológico real de la célula. Según todos estos datos y por similitud con los datos obtenidos *in vitro*, podemos concluir que la secuencia $d(TA)_n$ adopta *in vivo* una estructura desnaturalizada preferentemente. Dicha estructura esta también presente en plásmidos superenrollados, lo que puede indicar que su formación no requiere la intervención de factores proteicos, aunque sí necesita de un aporte energético en forma de superenrollamiento negativo. El hecho de que dicha estructura esté presente *in vivo* indica que la densidad superhelicoidal de esta región situada entre nucleosomas posicionados es suficiente para llevar a cabo esta transición energéticamente desfavorable de una doble hélice a una estructura desapareada. A una conclusión similar llegaron Larsen y Weintraub (1982) en su análisis del gen de la β -globina de pollo. Se ha propuesto la necesidad de factores adicionales como la mediación de helicasas u otras proteínas para abrir la doble hélice de DNA en regiones ricas en A+T en condiciones fisiológicas de sal y temperatura (Bowater *et al.*, 1994).

Ya que la estructura desnaturalizada parece ser predominante sobre la estructura cruciforme (en el caso de que esta última exista) en la secuencia salvaje, no tenía sentido

realizar estudios de este tipo sobre los mutantes puntuales SM y DM diseñados para alterar el cruciforme sin cambiar la riqueza en A+T.

¿Que significado funcional puede tener una región desapareada? Como ya dijimos anteriormente, dicha secuencia rica en A+T, además de su capacidad para adoptar una estructura cruciforme en determinadas circunstancias, posee secuencias consenso de ARS, SAR y topoisomerasa II. Siendo como es la capacidad de desnaturalización una característica común a todas las ARS estudiadas (Natale *et al.*, 1983), era sugerente pensar que dicha secuencia pudiese actuar como origen de replicación en plásmido. Se intentó confirmar la función de ARS de dicha secuencia introduciendo un fragmento de DNA que contenía ambos consensos ARS en un plásmido no replicativo y transformando levadura, pero no se obtuvo ningún resultado positivo (del Olmo, 1991). Sin embargo no podemos descartar, sin embargo, que bajo ciertas condiciones esa secuencia pudiera actuar como origen de replicación del cromosoma en que se sitúa. Otras secuencias consenso de ARS sin capacidad de replicación autónoma se disponen en las regiones 3' de otros genes, si bien su significado funcional, si existe, se desconoce (Pérez-Ortín, observaciones no publicadas).

No se analizaron las propiedades como SAR o como sitio de unión a topoisomerasa II de esa secuencia. No obstante es importante reseñar que en relación a las secuencias SAR (también llamadas MAR), Amati y Gasser (1988) encontraron en levadura una relación clara entre elementos ARS y secuencias SAR, poseyendo una misma secuencia la capacidad de unirse a matriz nuclear y de funcionar como origen de replicación en plásmido. Se ha propuesto que la unión a la matriz nuclear protege a las secuencias ARS de la interferencia de la transcripción (Snyder *et al.*, 1988). Ese aspecto relacionado con la terminación de la transcripción se tratará con mas profundidad más adelante. Las secuencias SAR también son fácilmente desapareables (Bode *et al.*, 1992) y se ha determinado que las laminas, proteínas constituyentes de la matriz nuclear, se unen a regiones de DNA de cadena sencilla (Ludérus *et al.*, 1994). Curiosamente la secuencia AATATATTT, que es prácticamente idéntica a la secuencia central de la región de TA alternante de *FBP1*, actúa como sitio de nucleación para el desapareamiento *in vitro* (Bode *et al.*, 1992). Respecto al consenso de unión de topoisomerasa II, es interesante destacar el hecho de que la topoisomerasa II de *D. melanogaster* es parte integrante de la matriz nuclear y es capaz de cortar selectivamente en la base de una horquilla de DNA (Froelich *et al.*, 1994), lo que en este caso en que existe un potencial cruciforme resulta muy sugerente..

1.3.- Estudio computacional sobre secuencias potencialmente desapareables presentes en genes de levadura

1.3.1.- Estudio de la capacidad teórica de desapareamiento de regiones presentes genes de levadura bien caracterizados

Como ya se ha visto el algoritmo desarrollado por el Dr. Craig Benham fue capaz de predecir la existencia de una región desapareada en el flanco 3' de *FBP1* en plásmidos superenrollados y predijo que la disminución del número de pares TA de la zona provocaría la reducción de esa zona desestabilizada. La correlación entre los datos obtenidos *in vivo* e *in vitro* con lo esperado teóricamente nos llevó a colaborar con el Dr. Benham en la búsqueda de otras regiones potencialmente desapareables en diferentes genes de levadura.

Como ejemplo de estos análisis, en la Figura 10 se muestran los perfiles de desestabilización de una región de 4 kb del cromosoma XII centrada en el gen *FBP1*. Se encontró que la zona 3' del gen presentaba una tendencia muy marcada a desaparecer a densidad superhelicoidal fisiológica, siendo la única región con probabilidad real de desestabilizarse (perfil de probabilidad). En el perfil de energía libre se vio que el pico en 3' de *FBP1* era el más intenso. Dicho pico entraba dentro del promotor de la potencial ORF YLR376c que se sitúa en la misma dirección que *FBP1*. Dicha ORF, que carece de similitud con nada conocido hasta la fecha, poseía otro pico en su extremo 3', compartido con otra ORF convergente, la YCL375w, y presentó un pico de menores dimensiones situado dentro de su región codificante. En el extremo derecho del gráfico se observa que el gen *SEC61* (YLR378c) posee otro pico en su extremo 3'.

Se buscaron zonas desapareables en regiones 3' de genes que poseyeran algún sitio hipersensible en la cromatina de su región terminal. Los resultados se muestran en la Tabla I. Se observó correlación entre regiones hipersensibles en cromatina y zonas potencialmente desapareables. Como en *FBP1* dicha región desapareable se sitúa dentro de la región 3' no traducible (3'-UTR) del mensajero y como se vio que contenía secuencias implicadas en la formación del extremo 3' del mRNA (ver más adelante) se analizaron las secuencias de varios genes en los que se conocía la secuencia poli(A) y/o el sitio de poliadenilación. En la gran mayoría de los casos (excepto *ADH2*, que presenta una señal de poliadenilación débil) existía un pico dentro del 3'-UTR del mRNA y coincidente con la señal de poliadenilación.

El análisis de varios genes conocidos (Benham 1996) o de secuencias de tomadas al azar del cromosoma III (Figura 11) llevó a la observación de que existía un patrón común en los perfiles compuesto de tres componentes. El más destacado era la presencia en casi todas las secuencias analizadas de una fuerte desestabilización en el extremo 3' de los genes. El segundo fue la ausencia de desestabilización en la secuencia que contiene la región codificante. Por último las regiones 5' presentaron desestabilización, pero en menor porcentaje que las regiones 3'.

1.3.2.- Estudio sistemático del cromosoma III de levadura

Para evitar cualquier sesgo a la hora de elegir futuros genes a analizar, se emprendió el análisis sistemático de la secuencia completa del cromosoma III de *S.cerevisiae*, el primer cromosoma en ser completamente secuenciado y el mejor conocido de esta levadura. Los resultados globales se muestran en la Tabla II. Se consideró una longitud promedio para un terminador de 200 pb y para un promotor de 400 pb (los valores estadísticos obtenidos de

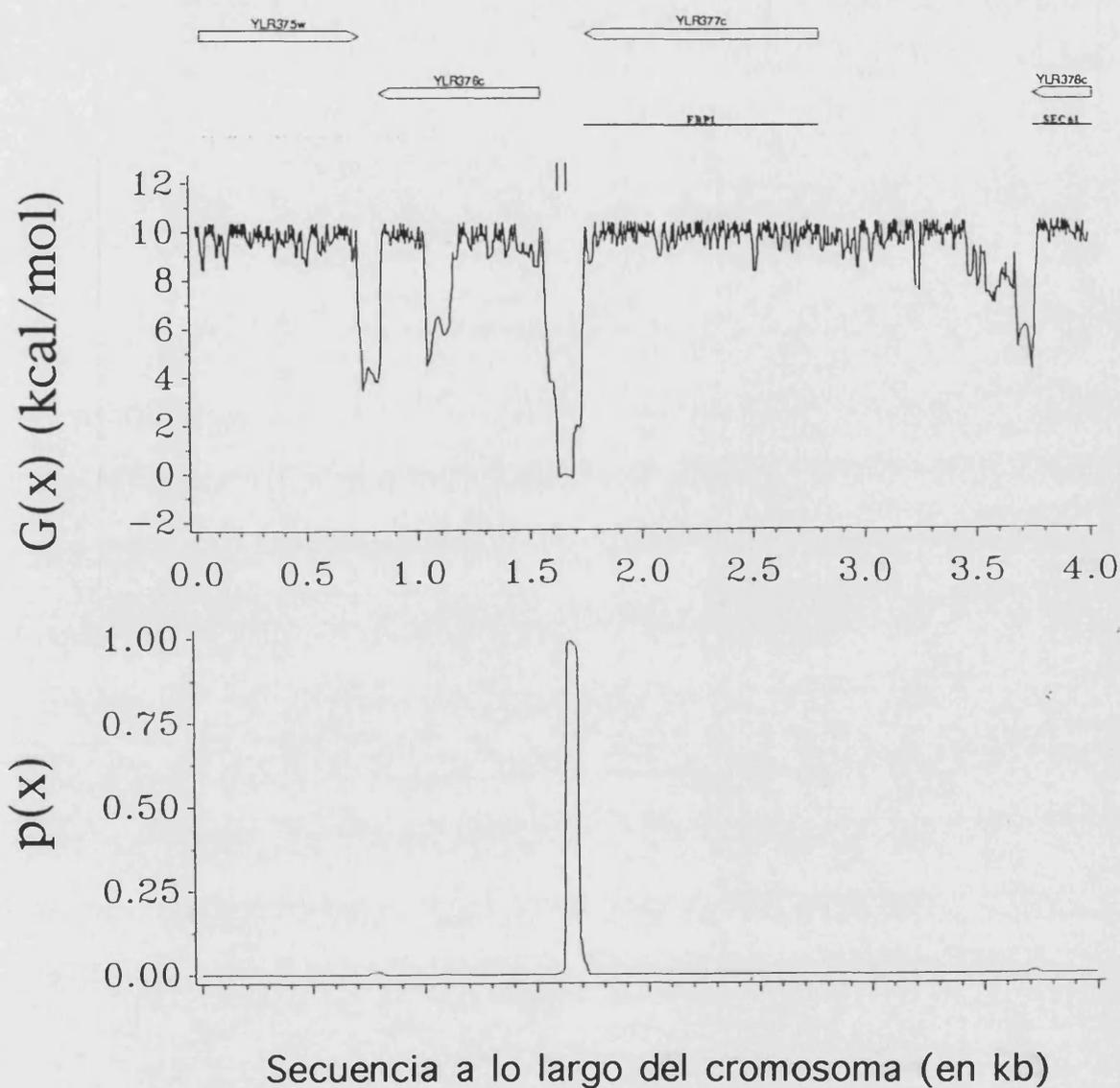


Figura 10.- Perfiles de energía libre $G(x)$ y probabilidad de desestabilización $p(x)$ de un fragmento de 4 kb del cromosoma XII centrado en el gen *FBPI*. En la parte superior se indica mediante flechas las ORF presentes en esta zona con sus nombres sistemáticos. Los genes de función conocida se indican mediante líneas horizontales. La región hipersensible a S1 está marcada con dos líneas verticales. La diferencia de número de enlace utilizada fue de -22, lo que significa una $\sigma = -0.055$.

TABLA I: RELACIÓN ENTRE SITIOS DE DESESTABILIZACIÓN, EXTREMOS 3' DE MENSAJEROS Y SITIOS HIPERSENSIBLES

Gen	Sitios de desestabilización ¹	Sitios hipersensibles ²	Codon de parada	Extremo 3' del mRNA	Señal poli(A) ⁵	Comentarios
<i>ADH2</i>	sitios muy pequeños en 3'	no determinado	2248	2367	zona amplia	sin correlación
<i>GAL7</i>	a)2063, b)2162, c)2252	probablemente ninguno	2041	2123	2100	a (y b?) dentro de 3'-UTR
<i>ADH1</i>	1827-1843	no determinado	1797	1887	1840	sitio desest. = señal poli(A)
<i>FBP1</i>	1443-1466	1460	1365		1460	sitio desest. = señal poli(A) = SH
<i>PHO5</i> ³	e)2195. Otros sitios menores (a-d, f)	1)172 2)2162	1945	2005	1995	d dentro de 3'-ÚTR
<i>PHO3</i> ³	g)3793-3825	3)3800	3795	no determinado	no determinado	sitio desest. = SH, y probablemente dentro de 3'-UTR
<i>TRP1</i>	a)786 b)875	1)737 2)797	777	900	800	a = 2 = señal poli(A) b coincide con consenso ARS1
<i>TRP3</i>	a)2595 b)2809	no determinado	2509	no determinado	no determinado	a probablemente dentro de 3'-UTR
<i>URA3</i>	a)1029 b)1086 c)1143	1)1075 2)1122	1030	no determinado	no determinado	a y b probablemente dentro de 3'-UTR
<i>SUC2</i> ⁴	b) 2360 c) 2520 d)2715 Otros sitios menores	2755	2383	2580	no determinado	c dentro de 3'-UTR
<i>YIL161W</i> ⁴	e)3473-3505 f)3563-3598	alteración de nucleosomas entre 3551-3951	3534	no determinado	no determinado	e, extremo 3' de YIL161W e/f dentro de zona alterada
<i>POT1</i> ⁴	e)3473-3505 f)3563-3598	alteración de nucleosomas entre 3551-3951	3591	no determinado	no determinado	f, probablemente dentro de 3'-UTR e/f dentro de zona alterada
<i>CYCI</i> ⁵	710-755	no determinado	578	752	719	sitio desest. dentro 3'-UTR
<i>UTRI</i> ⁶	710-755	no determinado	848	698	no determinado	sitio desest. dentro 3'-UTR

65

RESULTADOS Y DISCUSION

¹ Calculados de los gráficos p(X) frente a localización de secuencia, por lo tanto se asume un error variable (entre 20 y 70 pb)

² Estos sitios habitualmente abarcan entre 40 y 150 pb, por lo tanto el número dado representa el centro del sitio

³ *PHO5* y *PHO3* se tomaron como una unidad

⁴ *SUC2*, *YIL161W* y *POT1* se tomaron como una unidad. La transcripción de *POT1* y *YIL161W* es convergente y sus mRNA solapan

⁵ Los números dados son solamente aproximados porque estas señales no están bien definidas

⁶ *CYCI* y *UTRI* se tomaron como una unidad. Su transcripción es convergente y sus mensajeros solapan

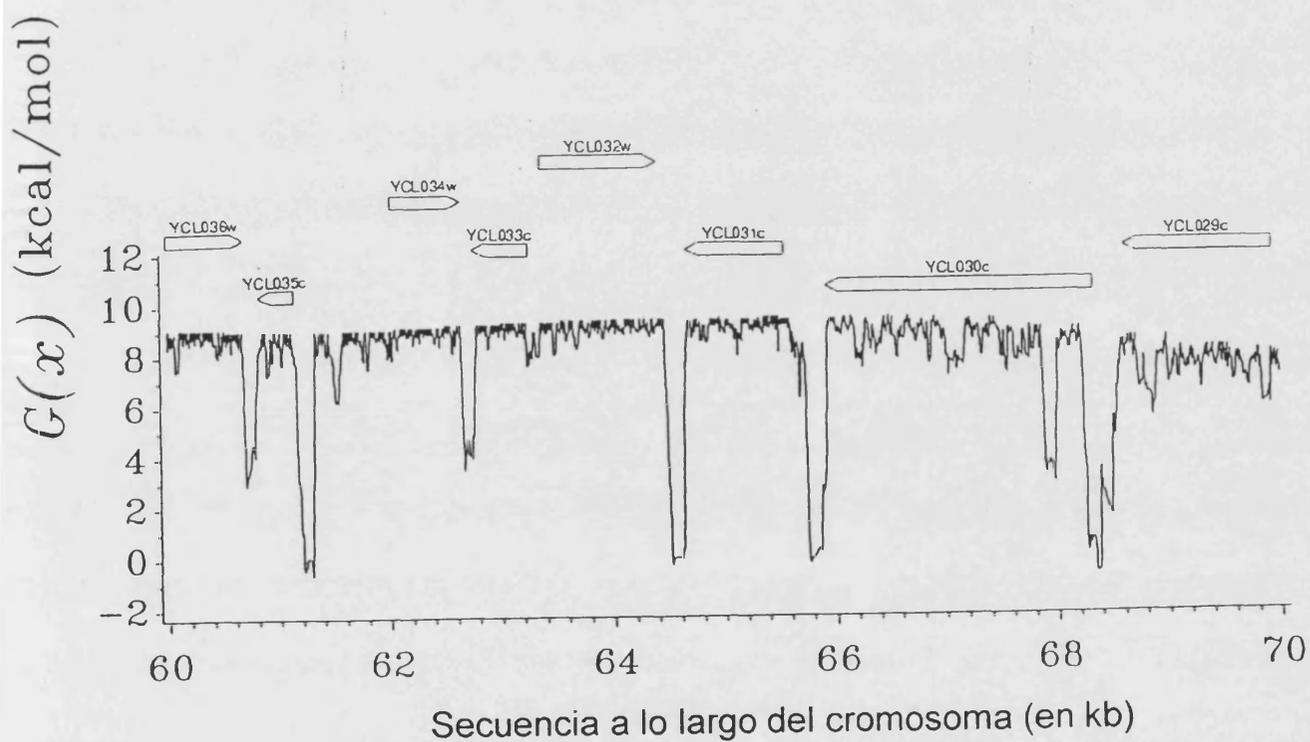


Figura 11.- Perfil de energía libre $G(x)$ de desestabilización de la región del cromosoma III situada entre 60 y 70 kb. Las ORF se indican mediante flechas y se denominan con su nombre sistemático. La diferencia de número de enlace fue de -55 ($\sigma=-0.05$).

estudiar las ORF secuenciadas dan valores de 163 y 309 pb respectivamente (Dujon *et al.*, 1996). Los estudios de numerosos genes de levadura indican que los valores de 400 y 200 pb son más apropiados pues el dato estadístico es solamente un promedio obtenido de genes cuya separación es o bien exagerada por estar en zonas de baja densidad génica o bien excesivamente corta porque promotor o terminador de dos genes están parcialmente solapados. Por estos motivos consideramos que los valores estadísticos del genoma de levadura no reflejan el tamaño real de ambos elementos. La ORF promedio consta de 1.5 kb. Se dividieron las pautas abiertas de lectura localizadas previamente en este cromosoma en tres categorías: A (genes conocidos, ORF que codifican para proteínas homologas a proteínas conocidas, para proteínas débilmente homólogas a proteínas conocidas y para proteínas homólogas a proteínas desconocidas), B (ORF que codifican para proteínas sin homología) y C (pautas abiertas de lectura cuestionables por su longitud o porque solapan con alguna otra ORF). Se utilizaron los perfiles de energía libre y se eligió un nivel umbral de 5 kcal/mol. Numéricamente se confirmó lo que se observaba en las primeras apreciaciones. Considerando las dos categorías más fiables (A+B), el 82% de las ORF presentaba desestabilización en la región 3', el 68% en la 5' y solo el 23% dentro de la región codificante.

TABLA II: ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DE PICOS DE DESESTABILIZACIÓN EN LAS ORF DEL CROMOSOMA III

Tipo de ORF	Flanco 5'	Región codificante	Flanco 3'	ORF totales
A	79 (69%)	28 (25%)	97 (85%)	114
B	30 (64%)	8 (18%)	34 (76%)	45
A+B	109 (68%)	36 (23%)	131 (82%)	159
C	9 (60%)	7 (47%)	10 (60%)	15
A+B largas (>3.3 Kb)	10 (91%)	11 (100%)	11 (100%)	11

Considerando que la región terminadora consta de una longitud equivalente a la mitad del tamaño del promotor promedio y 7.5 veces menor que la región codificante promedio, el sesgo a favor de la presencia de picos de desestabilización en 3' es acusado. Es reseñable el hecho de que las once ORF de más de mil aminoácidos posean sin excepción zonas desapareables dentro de su región codificante. De hecho todas ellas presentan más de un pico de desestabilización. De las 36 ORF incluidas en las categorías A+B, las 11 mayores presentan 107 de los 133 picos totales. La distribución de picos dentro de regiones codificantes no presenta un patrón uniforme, sino que hay tres zonas del cromosoma de unas 30 kb cada una que acumulan 104 de los 133 picos de desestabilización.

La densidad superhelicoidal utilizada a lo largo de todo el cromosoma en estas predicciones entra dentro del rango fisiológico. No obstante en un cromosoma *in vivo* existen dominios topológicos con diferentes grados de estrés torsional, lo que podría condicionar en

cada caso la presencia o no de picos en cada región. La transcripción es un proceso que también influye en el superenrollamiento, como después se explicará.

La capacidad de desestabilización de las zonas promotoras se puede explicar por la necesidad de un desapareamiento del DNA previo al comienzo de la transcripción. Pero, ¿que función pueden tener los picos de desestabilización en las regiones 3'? Se puede especular que dichas regiones desapareables tienen alguna influencia en el proceso de maduración de los mensajeros. Como se explicó en la Introducción, no existe un consenso claro y único de poliadenilación en levadura. Muchas de las secuencias consenso propuestas son ricas en A+T, e incluso algunos autores indican que el contenido alto en A+T es el único requisito necesario para la correcta poliadenilación (Osborne y Guarente, 1989). Pudiera ser que esa capacidad de desestabilización solamente reflejara en DNA la necesidad de una riqueza en A+U en el RNA. No obstante es sugerente pensar que pueda haber una relación entre estas estructuras desapareadas y la poliadenilación (factores de poliadenilación asociados a zonas de DNA desapareadas) o más probablemente con el proceso de la terminación de la transcripción. La deleción de 38 pb que elimina prácticamente la poliadenilación y la terminación de la transcripción del gen *CYC1*, elimina en el mismo grado el pico de desestabilización presente al final del gen (Benham, 1996). Lo mismo ocurre con la deleción D3 de *FBP1* que afecta también al correcto procesamiento de los mensajeros (ver más adelante). Considerando el modelo de los dominios gemelos (Liu y Wang, 1987), durante la transcripción se acumula superenrollamiento positivo enfrente de la polimerasa y superenrollamiento negativo detrás de la misma. La acumulación de superenrollamiento positivo puede dificultar la marcha de la polimerasa. Las zonas desapareadas pueden actuar como sumideros de ese superenrollamiento positivo, facilitando el avance de la polimerasa. Desde otro punto de vista, el superenrollamiento negativo producido por el paso de la maquinaria transcripcional puede estabilizar estructuras no canónicas del DNA, tal y como ocurre con el Z-DNA (Rahmouni y Wells, 1989). De esta manera el exceso de superenrollamiento negativo causado por la RNA polimerasa quedaría absorbido por la formación de una zona desapareada, regulando la topología del DNA alrededor de genes activos, actuando como "manómetros topológicos" (Schroth y Ho, 1995). Algunas de dichas estructuras pueden causar la parada de la transcripción (van Holde y Zlatanova, 1993). Es sugerente pensar que la eliminación de tensión superhelicoidal con el desapareamiento podría causar de alguna manera la pausa de la polimerasa o que la aparición de regiones desapareadas podría ser blanco de algún factor implicado en la terminación, como por ejemplo la helicasa propuesta en el modelo de terminación del Dr. Proudfoot (1989).

El centrómero del cromosoma III y las seis secuencias ARS funcionalmente descritas en este cromosoma (Dershowitz y Newlon, 1993) coinciden también con zonas desapareables como era de esperar teniendo en cuenta que en ambas estructuras la desestabilización es importante para la función. No existe diferencia entre las ARS que funcionan como auténticos orígenes de replicación en el cromosomas y aquellas que solo lo hacen en plásmido. No se vio correlación entre genes de tRNA y zonas desestabilizadas. Los microsatélites constituidos por

repeticiones TA, que son los únicos presentes en levadura (Valle, 1993), coincidieron también con picos de desnaturalización (9 de 9) aunque esto era también esperable por su elevado contenido en A+T y por situarse en regiones intergénicas, coincidiendo 5 con terminadores y 2 con promotores de genes.

Por lo tanto el análisis teórico de las secuencias potencialmente desestabilizables indica que la desestabilización se produce con mucha más frecuencia en zonas reguladoras que en zonas codificantes. La presencia de picos de desnaturalización en la mayoría de las regiones 3' indica que la zona desapareada presente en *FBP1* puede ser una propiedad muy extendida entre los terminadores de levadura, lo que hace muy atractivo el estudio de todas las posibles funcionalidades de esta región desnaturalizada

1.4.- Efecto en la cromatina de la eliminación de la secuencia $d(TA)_n$

Sitios hipersensibles en cromatina cercanos a extremos 3' similares al presente en *FBP1* se han encontrado en multitud de genes de levadura, como por ejemplo: *SUC2* (Pérez-Ortín, *et al.*, 1986), *HSP82* (Szent-Györgyi *et al.*, 1987), *TRP1* (Thoma *et al.*, 1984), *CIN2* (Lee y Garrard, 1991) y *URA3* (Thoma, 1986). En todos estos casos los sitios hipersensibles coinciden con sitios desestabilizados (Benham 1996; Tabla I) y están flanqueados por nucleosomas posicionados, tal y como ocurre en el gen sobre el que versa este estudio. Los nucleosomas pueden ser posicionados mediante varios mecanismos: interacciones DNA-proteína, elementos frontera y plegamientos tridimensionales de la cromatina (Thoma, 1992). En varios casos se ha demostrado que el posicionamiento es provocado por un efecto frontera causado por el SH (Matallana y Pérez-Ortín, resultados no publicados; Thoma, 1986). Secuencias particulares de DNA pueden actuar como fronteras frente a los nucleosomas. Datos experimentales muestran que la formación de partículas núcleo nucleosomales y las estructuras alternativas a la forma B del DNA son mutuamente excluyentes (Nickol y Martin, 1983; Nobile *et al.*, 1986): los nucleosomas parecen no formarse sobre cruciformes o sobre secuencias capaces de formar cruciformes (Estruch *et al.*, 1989) y por lo tanto los cruciformes serían capaces de actuar como posicionadores de nucleosomas.

Para determinar si la secuencia de TA alternante o la estructura de DNA desapareado que produce estaba implicada en la formación del sitio hipersensible en cromatina y/o en el posicionamiento de nucleosomas se digirieron protoplastos de las cepas CJM88/YEp2083 y YEp2083D3 con nucleasa de micrococo. Este enzima corta entre nucleosomas, permitiendo la determinación de la posición de los nucleosomas mediante el método del marcaje terminal indirecto. Resultados previos con el gen salvaje (del Olmo *et al.*, 1993) mostraron la existencia de un sitio especialmente sensible a la acción de MNasa, DNasal y nucleasas endógenas alrededor de la posición 1130, lo que coincide con la repetición invertida. Se ha demostrado anteriormente que dicho sitio es también sensible a nucleasa S1.

Se utilizaron dos estrategias para conseguir la determinación más precisa de los sitios de corte por el método del marcaje terminal indirecto. En la primera el mapeo fue hecho desde

la región central del gen (a 600 pb del HS) usando el fragmento *HpaI-BamHI* de 337 pb como sonda y digiriendo el DNA con *HpaI*. La segunda estrategia es la misma que la mostrada en la Figura 8: el fragmento *SaII-BamHI* fue utilizado como sonda. Los resultados obtenidos con cada estrategia se muestran en las Figuras 12A y 12B.

Ya que nuestros experimentos *in vitro* demostraron que solo la delección D3 elimina completamente cualquier estructura no B del DNA continuamos utilizando solo esta mutación en nuestros experimentos *in vivo*. Además experimentos previos utilizando la mutación sencilla SM no mostraron ningún cambio en la estructura de la cromatina (datos no mostrados). El análisis de los resultados con la mutación D3 mostraron varias características interesantes. En primer lugar, hay un desplazamiento de aproximadamente 30 pb en todas las bandas que están situadas después de la posición de la secuencia eliminada, según lo esperado considerando la amplitud de la delección. Esto se ha mostrado también en la Figura 8. Existe también una diferencia en el SH localizado en la región de la secuencia deleccionada. En el caso de la cepa salvaje dicho sitio se extendía a lo largo de un región de unos 160 pb. Sin embargo la mutación D3 hizo este sitio mas difuso, y en el mapeo más cercano (Figura 12b, carrera 8) aparece como un doblete. Por otro lado, los sitios de corte de la nucleasa en la región hacia 3' del gen fueron claramente distintos en cromatina y en DNA desnudo: algunos sitios de corte en cromatina no están presentes en DNA desnudo y algunos cortes en DNA desnudo están protegidos en cromatina por la estructura nucleosomal. Los cortes determinados por la estructura de la cromatina están indicados por flechas en las figuras. Estos resultados sugieren que al menos tres nucleosomas están posicionados ahí. Cuando analizamos la estructura hacia dentro del gen siguiendo las mismas reglas, encontramos 2, posiblemente 3 nucleosomas posicionados, como muestra la Figura 12a.

Este estudio mostró por tanto que la organización nucleosomal no cambia después de la delección de la secuencia y la consecuente eliminación de la estructura secundaria que adopta. Por lo tanto la secuencia $d(TA)_n$ no se comporta como un posicionador de nucleosomas. Se ha sugerido que las poliaminas tienen afinidad por las secuencias ricas en pares TA, como las cajas TATA, y que la unión de dichas moléculas a elementos de secuencia de este tipo pueden actuar freno a la desnaturalización térmica de estas zonas a la vez que obligan a los nucleosomas a situarse a ambos lados, actuando como elementos posicionadores (Matthews, 1993). Nuestros resultados descartan que en esta secuencia concreta las poliaminas se comporten de esta manera.

Está claro no obstante que dicha región de TA alternantes posee una estructura secundaria anómala que es incompatible con el ensamblado de un nucleosoma sobre ella.

Aunque la delección D3 afecta a la naturaleza del HS ya que elimina la sensibilidad a S1, se mantiene bastante de la sensibilidad a MNasa alrededor de la secuencia eliminada. Eso sugiere que alguna otra secuencia cercana sea la causante del posicionamiento de nucleosomas y de la permanencia de un sitio hipersensible a MNasa. Una secuencia interesante en este sentido es la secuencia $(A)_{11}$ situada 14 pb en posición 3' de $(TA)_n$. Las zonas poli(A) de entre 9 y 50 residuos pueden actuar como elementos frontera posicionadores de nucleosomas (Iyer y Struhl, 1995; Martínez-García *et al.*, 1989). Dichas secuencias se

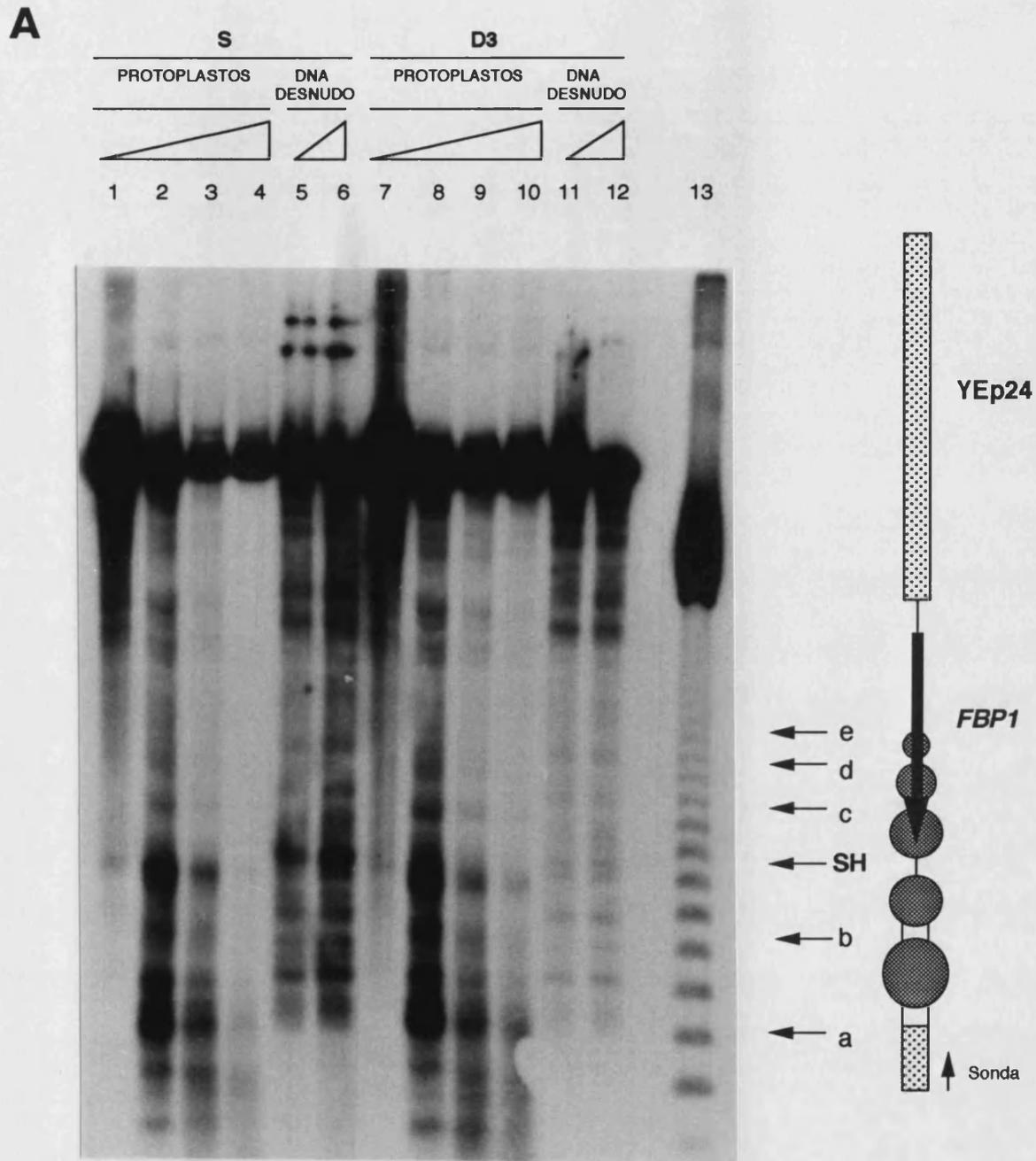
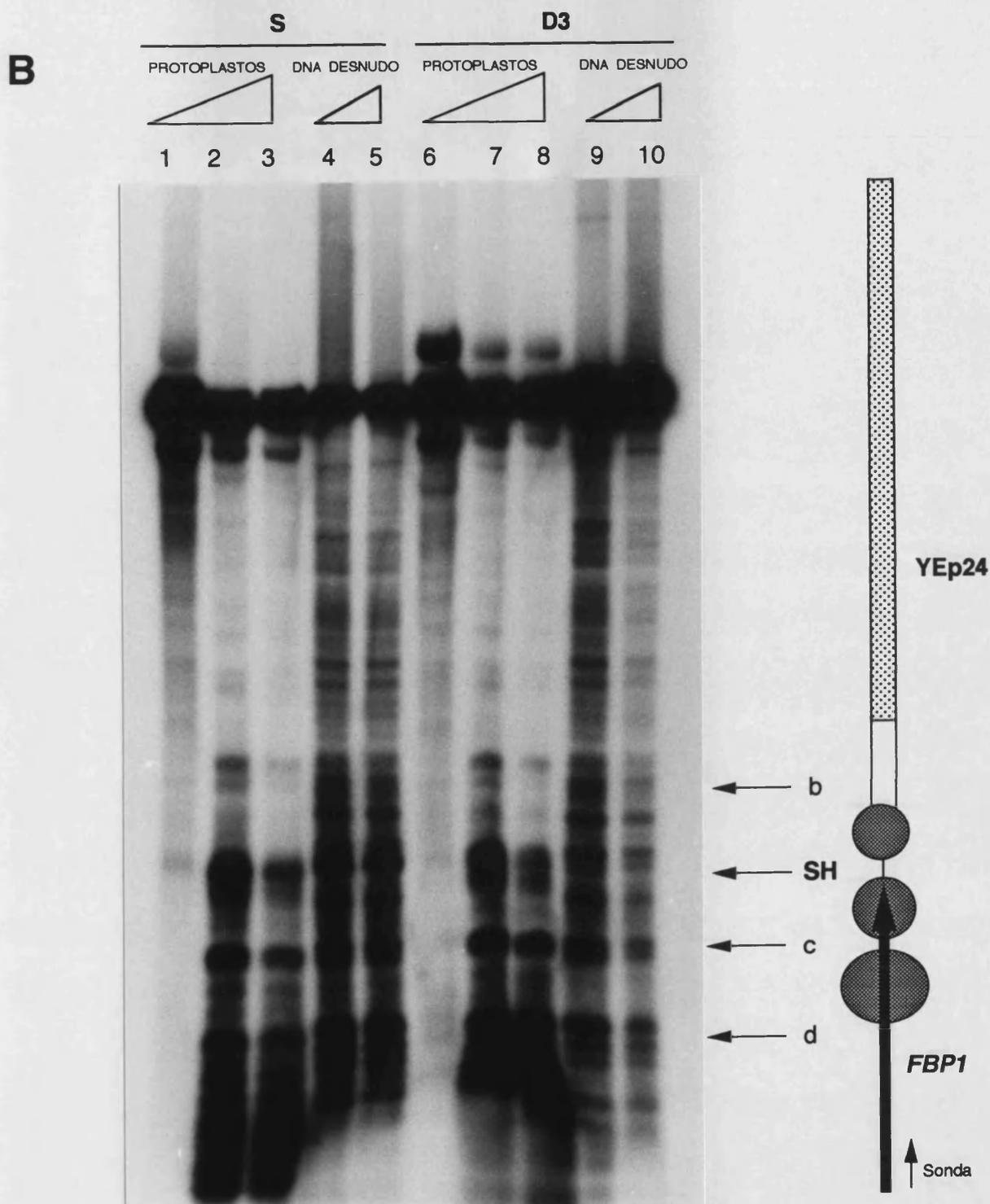


Figura 12.- Sensibilidad del extremo 3' de *FBP1* a MNasa. Protoplastos permeabilizados de las cepas CJM88/YEp2083 (carreras 1-4 en la sección A y carreras 1-3 en la sección B) y CJM88/YEp2083D3 (carreras 7-10 en la sección A y carreras 6-8 en la sección B) se digirieron con 0 (carreras 1 y 7), 30 (carreras 2 y 8), 100 (carreras 3 y 9) y 300 (carreras 4 y 10) unidades de MNasa/ml. DNA plasmídico desnudo se digirió con 1 (carreras 5 y 11) y 5 (carrera 6 y 12) unidades de nucleasa por mg DNA. En (A) todas las muestras se digirieron seguidamente con *SalI*, se corrieron en un gel de agarosa del 1% y los sitios de corte se detectaron por marcaje terminal indirecto utilizando la sonda *SalI-BamHI* localizada en la secuencia de YEp24. La carrera 13 muestra el marcador de pesos moleculares p100.



En B los protoplastos se digirieron con 0 (carreras 1 y 6), 30 (carreras 2 y 7) y 100 (carreras 3 y 8) unidades de MNasa/ml. DNA desnudo se digirió con 1 (carreras 4 y 9) y 5 (carreras 5 y 10) unidades/mg DNA. Las muestras se analizaron mediante digestión con *HpaI*, se corrieron en un gel de agarosa del 1%, y se hibridaron con la sonda *HpaI-BamHI* contenida en la región codificante del gen.

Los símbolos son los mismos que en la figura 8.

suelen situar en los promotores y estimulan su actividad en virtud de su estructura y no de su secuencia, afectando a los nucleosomas y incrementando la accesibilidad de factores a zonas vecinas. Esta secuencia se encuentra también dentro del sitio hipersensible de *FBP1* y está rodeada de nucleosomas posicionados, así que la posibilidad de que sea esta secuencia y no la región de TA la que posiciona nucleosomas resulta atractiva, aunque por el momento carecemos de pruebas experimentales al respecto. La secuencia $(TA)_n$ puede aprovechar la ausencia de nucleosomas en esa región para adoptar su estructura desapareada.

No podemos determinar si la funcionalidad, si la hubiere, del sitio hipersensible está asociada al extremo 3' del gen *FBP1* o por el contrario está más ligada al posible promotor de la pauta abierta de lectura situada en 3', la YLR376c, una ORF de 729 pb de función desconocida y sin ninguna homología que se transcribe en la misma dirección que *FBP1*. Se carece de datos experimentales acerca de las secuencias implicadas en la expresión de dicha ORF. La proximidad entre ambas regiones codificantes sugieren que los elementos reguladores de ambos genes pueden estar solapados. De hecho el sitio de poliadenilación de *FBP1* se mapeó a solo 50 pb del triplete de inicio de YLR376c, lo que indica que debe existir una interferencia entre las polimerasas que están transcribiendo *FBP1* y el promotor de la ORF situada a continuación. No obstante la transcripción de YLR376c es bastante baja y es independiente de la tasa de transcripción de *FBP1* (datos no mostrados). Buscando potenciales elementos pertenecientes al promotor de YLR376c, la teórica caja TATA estaría contenida en la secuencia $d(TA)_n$ que hemos estudiado, ya que coincide con el consenso en cuestión y está situada a unos 90 pb del triplete de inicio, lo que en levadura es una distancia habitual. La secuencia $(A)_{11}$ comentada anteriormente está situada 14 pb en posición 5' respecto a esta teórica caja TATA.

Recapitulando podemos destacar que la secuencia $d(TA)_n$ adopta una estructura secundaria *in vivo* consistente en una región desapareada, tal y como se preveía teóricamente. No obstante ni dicha secuencia ni la estructura secundaria derivada de ella actúan como posicionadores de nucleosomas ni son los principales determinantes de la formación de un sitio hipersensible en cromatina. La presencia de una estructura desapareada en 3' puede ser una característica bastante extendida entre los genes de levadura, tal y como muestran las predicciones teóricas de zonas desapareables.

2.- ESTUDIO DE LAS SECUENCIAS IMPLICADAS EN LA POLIADENILACIÓN Y TERMINACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN *FBP1*

En la sección previa hemos estudiado la región 3' del gen *FBP1* desde un punto de vista puramente estructural. No obstante la posibilidad de que secuencias y/o estructuras de esa zona estuvieran implicadas en el proceso de corte y poliadenilación del mensajero de dicho gen, o bien en la pausa y posterior terminación de la transcripción ya ha sido planteada. Como se recordará en los 120 pb que siguen a la pauta abierta de lectura de *FBP1* existen varios de los consensos propuestos en poliadenilación, incluyendo los más efectivos de ellos. De hecho la propia repetición (TA)_n, sobre cuya estructura se ha disertado hasta ahora, no es sino la reiteración del hexanucleótido TATATA propuesto como elemento de eficiencia de la poliadenilación en múltiples genes (Imniger *et al.*, 1992; Russo *et al.*, 1993; Guo y Sherman, 1995).

En esta parte del trabajo se investigarán las secuencias implicadas en la poliadenilación, indicando cual de todas las secuencias consenso es la utilizada. Además se verá si la estructura de esa región, tanto a nivel de DNA como a nivel de RNA, tiene alguna implicación en la maduración de los mensajeros o en la terminación de la transcripción. Para tales fines se introdujeron diversas modificaciones en esta secuencia (deleciones por 5' y 3', deleciones internas y mutaciones puntuales) y se analizó el efecto de estas mutaciones en la eficiencia de procesamiento *in vivo* e *in vitro*.

2.1.- Estudio sobre la capacidad para producir poliadenilación bidireccional de un fragmento de 397 pb del gen *FBP1*

En nuestra primera aproximación a la identificación de elementos requeridos para la maduración del extremo 3' del gen *FBP1* utilizamos un fragmento perteneciente a la región terminal de dicho gen. El fragmento se obtuvo del plásmido pFBP391, ya utilizado en los experimentos de digestión de plásmidos superenrollados con nucleasas. Dicho plásmido contenía el fragmento de 391 pb *Sau3A-Sau3A* localizado entre las posiciones 1054 y 1445 (considerando 1 el inicio de traducción; Figura 13) del gen *FBP1* clonado en el sitio *Bam*HI de pUC18. El fragmento se aisló de pFBP391 como un fragmento como *Sma*I-*Hind*III de 408 pb que contenía 397 pb de secuencia de *FBP1* (se debe tener en cuenta que los sitios *Sau3A* se mantienen durante la clonación y que hay una coincidencia de dos bases después del último sitio *Sau3A* entre *FBP1* y el sitio de clonación múltiple de pUC18). La secuencia de 397 pb incluye prácticamente toda la región 3' no traducida de *FBP1* (el sitio *Sau3A* está situado a sólo 7 pb del triplete de parada de la traducción) y el comienzo de la pauta abierta de lectura conocida por el nombre sistemático YLR376c, una ORF de 729 pb de función desconocida y sin ninguna homología que se transcribe en la misma dirección que *FBP1* y que comienza a tan sólo 195 pb después del fin de la región codificante de este. Tan breve región intergénica contiene todas las secuencias consenso de interés.

2.1.1.- Estudio de la eficiencia de la poliadenilación *in vivo* del fragmento 397 utilizando el vector pME729.

Para ensayar la poliadenilación *in vivo* utilizamos el vector pME729 (Irniger *et al.*, 1992, Figura 14). Dicho plásmido es un vector tipo lanzadera (capaz de replicarse tanto en *E.coli* como en *S.cerevisiae*) de alto número de copias derivado del plásmido 2 μ m que posee el gen *URA3* como marcador de selección en levadura. Contiene además la región 5' del gen *ACT1* de la actina, incluyendo promotor, el primer exón y 80 pb del intrón. Después del sitio de restricción *XhoI* situado al final de este fragmento, comienza la región terminal del gen *ADH1* incluyendo su muy eficaz señal de poliadenilación. Para clonar los fragmentos de interés en este vector, se digirió en primer lugar con *XhoI*, se rellenó con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I y se desfosforiló con fosfatasa alcalina. Si la secuencia introducida se comportaba como una señal de poliadenilación, la transcripción proveniente del promotor del gen *ACT1* (un promotor muy fuerte y de expresión constitutiva) se veía truncada dando un RNA de pequeño tamaño, que llamaremos a partir de ahora "truncado". Si no ocurría así, la transcripción llegaba a la señal de poliadenilación de *ADH1*, produciendo un mRNA más largo que llamaremos "entero". Mediante este ensayo de competición de secuencias poli(A) se pudo determinar la eficiencia poliadeniladora de la secuencia introducida comparando la cantidad de ambas bandas.

Los plásmidos resultantes de la clonación del fragmento de 397 pb (pVPA397F, orientación directa, y pVPA397R, orientación reversa), junto con el plásmido original pME729 fueron introducidos en la cepa de levadura SEY2101 y se extrajo RNA total de dichas cepas crecidas en medio selectivo (para mantener el plásmido) conteniendo glucosa. Dichos RNAs se separaron en un gel de agarosa desnaturalizante del 2%, se transfirieron a un filtro y se hibridaron con la sonda de 500 pb *BamHI-XhoI* procedente del propio plásmido pME729. Dicha sonda contiene secuencias del gen de la actina, desde el promotor hasta el sitio de clonación *XhoI*. Los resultados se muestran en la Figura 14. En todas las carreras se observó la presencia de una banda de 1.4 kb correspondiente a la copia cromosomal del gen *ACT1*, lo que sirvió de control interno de la cantidad de RNA aplicado en la electroforesis. La transcripción del plásmido pME729 dio lugar a una banda única de 0.6 kb correspondiente a un RNA entero que va desde el inicio de transcripción del promotor de la actina hasta el sitio poli(A) del terminador del *ADH1*. Este resultado indicó que la fusión entre *ACT1* y *ADH1* no mostraba ningún sitio de poliadenilación artefactual, y que el sitio de poliadenilación de la región 3' de *ADH1* era único y muy eficiente. De hecho hay varios sitios de poliadenilación muy juntos (Heidmann *et al.*, 1992), aunque la escasa resolución del gel no distingue entre ellos. El análisis de pVPA397F mostró una banda abundante de 0.4 kb (truncado) y una muy minoritaria de 1.0 kb (entero) aproximadamente. Teniendo en cuenta que se transcribían unas 0.22 kb del gen de la actina antes del sitio *XhoI* y que la longitud de la cola poli(A) en levadura es de cerca de unos 50 en el citoplasma, el sitio poli(A) de la banda más intensa debía estar situado dentro del fragmento de *FBP1*, mientras que el de la otra banda debía estar dentro de la secuencia de *ADH1*. Esto indicó que la secuencia de poliadenilación de *FBP1* es usada en esta construcción, dando lugar

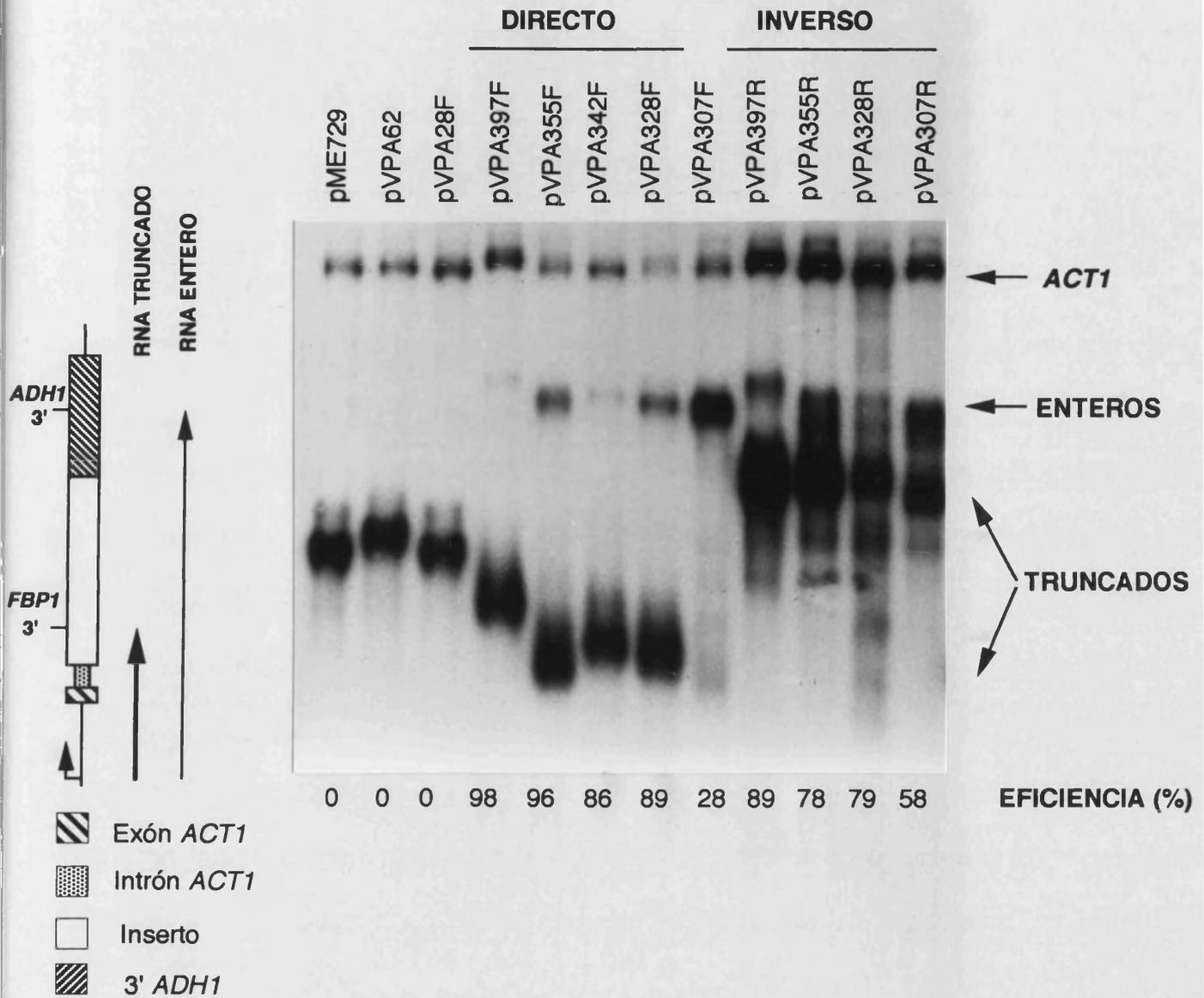


Figura 14.- Análisis la poliadenilación *in vivo* de los plásmidos pVPA llevando el fragmento 397, deleciones de este fragmento desde 5' en ambas orientaciones y las repeticiones invertidas de 28 y 62 pb. Se extrajo RNA total de las cepas conteniendo el plásmido indicado sobre cada carrera (un derivado del plásmido pME729 con una secuencia de *FBP1* cuya longitud se indica en el nombre). Las muestras se migraron en un gel de agarosa desnaturalizante del 2%. Se hibridó con una sonda *BamHI-XhoI* perteneciente al promotor de la actina. La eficiencia de poliadenilación se muestra debajo de cada carrera. Se considera el porcentaje de transcritos truncados respecto a la suma de truncados y enteros.

a un transcrito truncado mayoritario en relación con el transcrito *readthrough* correspondiente al uso de la secuencia de poliadenilación de *ADH1*. Como la población de los mRNA truncados supone el 98% de los transcritos, mientras que el otro transcrito sólo supone el 2% de la población de mRNA se concluyó que el fragmento de 397 era una señal de poliadenilación muy eficaz.

Utilizando el mismo vector, la región 3' del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), que funciona como señal de poliadenilación en levadura, poseía una eficiencia de procesamiento del 62% (Irniger *et al.*, 1992). La región 3' de *FBP1* es más eficaz como señal de poliadenilación de lo que lo son las regiones 3' de los genes *TRP1*, *TRP4* y *ARO4* probados en un sistema similar, bajo el mismo promotor de la actina (Irniger *et al.*, 1991). Dichos genes comparten con *FBP1* la secuencia consenso propuesta por Zaret y Sherman (1982), aunque en estos genes sólo se detectaron niveles de transcrito truncado de entre el 20 y el 50%. En ensayos de este tipo, una región del gen *CYC1*, que también contiene una secuencia tipo Zaret y Sherman, mostró una eficiencia de acerca del 65% (Ruohola *et al.*, 1988). La eficiencia que se obtuvo con el fragmento de 397 pb de *FBP1* fue similar a la observada en los genes *GCN4* y *PHO5* (Irniger *et al.*, 1991), que contienen la señal de poliadenilación TTTTAT propuesta por Henikoff y Cohen (1984). La región 3' del gen *ADH1*, con su señal de eficiencia (A)₈, también posee una eficiencia similar a *FBP1* (Heidmann *et al.*, 1994).

Respecto a la orientación inversa (pVPA397R), existía una banda minoritaria de alrededor de 1.0 kb, idéntica a la observada en pVPA397F y correspondiente por tanto al transcrito tipo *entero*. La banda mayoritaria (89% de los transcritos) era un RNA de unas 0.7 kb, lo que correspondía a un sitio de poliadenilación situado aproximadamente al final del inserto de *FBP1*. La secuencia responsable de esta poliadenilación debía estar situada dentro del inserto de *FBP1*, ya que no existía un sitio de poliadenilación situado en la parte proximal de *ADH1*, como indicó la ausencia de transcritos truncados a ese nivel en el plásmido sin inserto.

Estos resultados mostraron que el fragmento de 397 puede competir eficientemente en ambas orientaciones con la señal poli(A) de *ADH1*, ya que contiene los elementos necesarios para la formación eficiente del extremo 3'. Como ya comentamos en la Introducción, en levadura hay señales de poliadenilación unidireccionales y bidireccionales, siendo *FBP1* una de estas últimas. Como sabemos que la ORF contigua, la YLR376c apunta en la misma dirección, la bidireccionalidad del terminador de *FBP1* es una característica propia del mismo y no el resultado de la presencia de un terminador convergente de un gen contiguo.

Esta claro que se asumió desde el primer momento que los mensajeros detectados con este sistema estaban poliadenilados, como lo están los de todos los genes estudiados en levadura, incluidos los de las histonas que en eucariotas superiores no lo están. Los transcritos obtenidos de este y otros plásmidos similares cuya función es determinar la eficiencia de la poliadenilación *in vivo*, siempre han resultado estar poliadenilados (Irniger *et al.*, 1991; 1992). De todas maneras se comprobó que esto era así purificando RNA poli(A)⁺ mediante cromatografía con oligo-dT celulosa y analizando estas fracciones mediante Northern utilizando la misma estrategia. Los resultados obtenidos fueron exactamente los mismos que los logrados

con RNA total tanto en eficiencia como en tamaño de las bandas (Aranda 1993). Este resultado resultó importante, pues confirmaba nuestros cálculos previos y nos permitía el uso futuro de RNA total en futuros experimentos.

2.1.2.- Mapeo de los sitios poli(A) mediante RT-PCR

Para determinar el punto de poliadenilación a nivel de nucleótido se utilizó la técnica del RT-PCR. Todos los mensajeros probados mediante esta técnica dieron lugar a un producto de amplificación, lo cual confirmó que todos ellos estaban poliadenilados. En primer lugar se utilizó una versión completa del gen contenida en el plásmido pRS2083. En este caso de la PCR se obtuvo una banda única (Figura 15), lo que sugería un sitio de poliadenilación único o varios sitios muy próximos. Secuenciando varios de estos cDNAs (Tabla III) se observó que 4 de los 5 clones secuenciados poseían una T situada en posición 1177 como último residuo antes de la cola poli(A). Como en la mayoría de los puntos de poliadenilación en *S. cerevisiae*, el sitio de corte coincidió con una o varias A, así que fue imposible determinar si ese o esos residuos estaban codificados por el DNA y eran copiados por la RNA polimerasa II o fueron añadidos por la PAP. El consenso más repetido en sitios de poliadenilación en levadura es $Py(A)_n$ (Heidmann et al., 1992), por lo que TAA parece un sitio típico de poliadenilación. El quinto clon procedió del corte entre el residuo de C y la T perteneciente al triplete mencionado. Aunque lo usual es un corte coincidente con una A, por la proximidad se consideró el mismo sitio de poliadenilación.

Respecto a los transcritos producidos por pVPA397F, se produjo también una banda única de PCR y una distribución muy similar de sitios poli(A) a la encontrada en pRS2083, excepto que uno de los clones indicó un corte en la secuencia GAAAA. Los cortes detrás de purina no son habituales, pero la abundancia de residuos de A detrás de la misma y la proximidad al sitio mayoritario hace pensar que todos esos clones entran dentro de un sitio de poliadenilación muy limitado en el espacio, como demuestra la existencia de una banda única en el PCR. No hubo influencia por el hecho de que el gen completo se transcribiese en presencia de etanol y el plásmido pVPA397 lo hiciese en presencia de glucosa. El estado metabólico de la célula no afecta por tanto al procesamiento. Cabe destacar que todos los consensos de poliadenilación se sitúan entre ese residuo 1177 y el final de la región codificante, así que no se pudo descartar ninguno de ellos. Esta semejanza de sitios de poliadenilación entre el fragmento clonado en pME729 y el gen completo indicó que dicho plásmido era perfectamente válido para estudiar las señales implicadas en la poliadenilación de *FBP1*.

El caso de la orientación inversa (pVPA397R) resultó más complejo. Se produjo también una banda única con un tamaño consecuente con lo observado en los *northern*. Al secuenciar varios de los cDNAs obtenidos se vio que no había un sitio mayoritario, sino que los puntos de corte se extendían entre la repetición $(TA)_n$ y el final del inserto, cayendo incluso uno de ellos en el fragmento de sitio de clonación múltiple que permanece en dicha construcción. Tres de los cinco clones coincidían con el dinucleótido TA como era de esperar, y otro en un dinucleótido CA, por lo que parece que el consenso PyA era utilizado incluso en esta poco

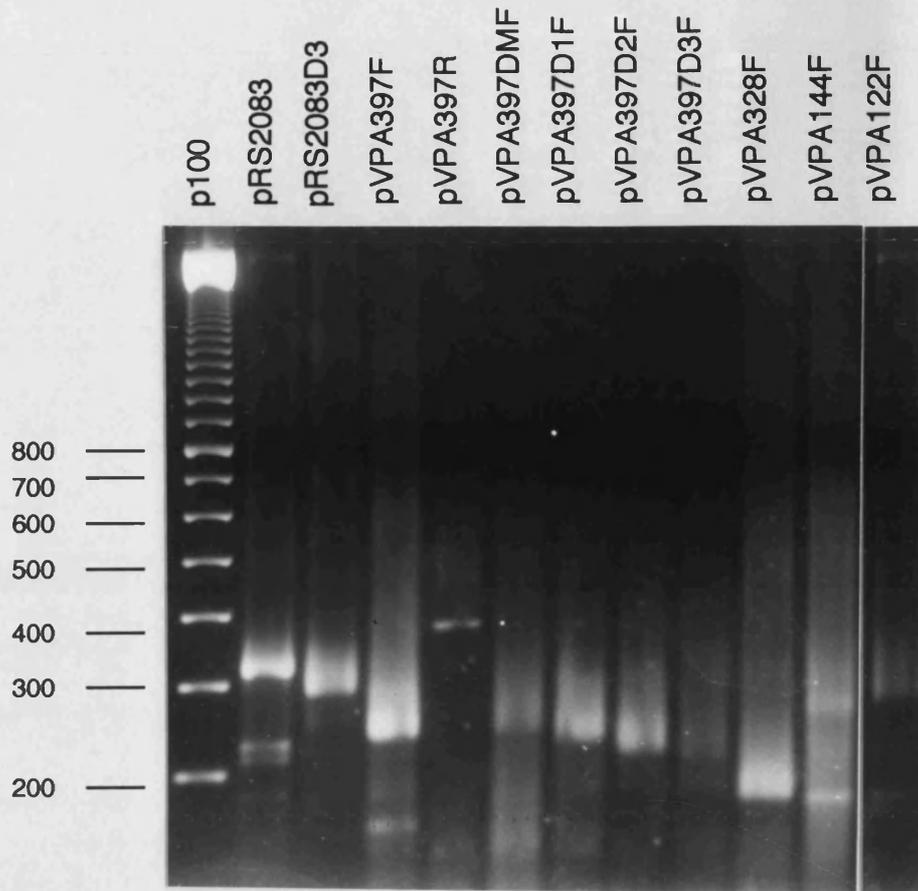


Figura 15.- Análisis de los sitios poli(A) mediante RT-PCR. Las muestras se prepararon tal y como se describe en Materiales y Métodos a partir de cepas transformadas con los plásmidos que se indican al principio de cada carrera y se corrieron en un gel de agarosa al 2%. Se indica el tamaño de algunas muestras del patrón de pesos moleculares p100.

TABLA III: SITIOS POLI(A)

2083wt	TCCT ^{x4} <u>C</u> TAATAATGAAAATTCTTAGGAAAAGAGAAA 1181 1216
2083D3	TCCTC ^{x4} <u>I</u> AA <u>I</u> AATGAAAATTCTTAGGAAAAGAGAAA 1181 1216
397F	TCCT ^{x3} <u>C</u> TAATAAT <u>G</u> AAAATTCTTAGGAAAAGAGAAA 1181 1216
397R	TATATATAAGGACATATA <u>C</u> AGATTTTTITTTTTCGCGG <u>I</u> ACTAAA 1133 GTACCGAACAAAGAAAATAAGAAAAGAAGGCGATCccccggg <u>t</u> accgag
5'-328F	TCCT ^{x4} <u>C</u> TA <u>I</u> AA <u>I</u> AAT <u>G</u> AAAATTCT <u>I</u> AGGAAAAGAGAAAG <u>G</u> AAGTA 1181 1223
3'-144F	TCCTC ^{x4} <u>I</u> AA <u>I</u> AATGAA 1181 1196
3'-122F	TGTAC <u>C</u> GTAAGgcaagcttcg AGCTTTG <u>G</u> ACTT <u>C</u> TT <u>C</u> GCCAGAGGTTT 1164 GGTCAAGTCTCCAATCAAGGTTGTCGGCTTGTC <u>I</u> AC
397DM	TCCTT ^{x3} <u>C</u> TA <u>I</u> AA <u>I</u> AATGAAAATTCTTAG <u>G</u> AAAAGAGAAA 1181 1216
397D1	TCCTT ^{x3} <u>C</u> TAATAATGAAAATTCTTAG <u>G</u> AAAAGAGAAAGGAAGTAGCGAAT 1181 GGAATGGGATGGAAGTTTTAAAAGAACATTAGAATT <u>I</u> ATCCTTTGTCAAACCTTCATCACATCA 1291
397D2	TCCTT ^{x3} <u>C</u> TAATAATGAAAATTCTTAG <u>G</u> AAAAGAGAAAGGAAGTAGCGAAT 1181 GGAATGGGATGGAAGTTTTAAAAGAACATTAGAATTTATCCTTTGTCAAACCTTCATCACATCA 1291
397D3	TCCTT ^{x3} <u>C</u> TAATAATGAAAATTCTTAGGAAAAGA <u>G</u> AAAGGAAGTAGCGAAT 1181 GGAATGGGATGGAAGTTTTAAAAGAACATTAGAATTTATCCTTTGTCAAACCTTCATCACATCA ACCAAGAACT <u>I</u> ATATAAAC 1309

Las letras sombreadas indican el último nucleótido antes de la cola poli(A) de varios cDNA obtenidos mediante RT-PCR de mRNA del gen entero (llamado 2083) o de varios plásmidos de la serie pVPA. Las letras minúsculas corresponden a secuencias de sitios de clonación múltiple y las letras en cursiva pertenecen a secuencia del gen *ADHI*

natural orientación. La ligera menor eficiencia del fragmento en orientación inversa puede reflejar la falta de un sitio de poliadenilación tan óptimo como el que parece existir en la orientación natural del gen.

Una vez determinado que la región 3' de *FBP1* es una eficiente señal bidireccional de poliadenilación que contiene todos los elementos necesarios para este proceso, se pasó a delimitar los elementos que la componen.

2.2.- Delimitación por deleciones seriadas de la región mínima requerida para el procesamiento *in vivo*

Con el objetivo de determinar las secuencias requeridas para la formación del extremo 3' del gen *FBP1* se llevó a cabo la reducción del fragmento 397 mediante deleciones seriadas por los flancos 5' y 3' debido al escaso número de sitios de restricción adecuados dentro de ese fragmento. Las deleciones se realizaron sobre el plásmido pFBP391 y se muestran en la Figura 13. Los plásmidos resultantes se nombraron pFBP con adición del número de pb de la secuencia de *FBP1* que permanece en ellos. Los fragmentos obtenidos se clonaron en el vector pME729, la mayoría de ellos en ambas orientaciones, para determinar su capacidad de producir poliadenilación *in vivo*. Los resultados se muestran en las figuras 14 (deleciones por 5') y 16 (deleciones por 3').

2.2.1.- Deleciones por 5'

Se seleccionaron cuatro deleciones por 5'. En la primera (5'-355) se eliminó una secuencia muy rica en T y el triplete TAG, el elemento 3' del consenso de poliadenilación originalmente propuesto por Zaret y Sherman (1982). En este caso la eficiencia en la poliadenilación fue similar en la orientación directa a la del fragmento 397 original, detectándose un 96% de RNAs correspondientes a la población de los transcritos truncados. Por lo tanto podemos descartar que el primer elemento de la secuencia tripartita TAG...TATGT...TTT tenga efecto alguno en la poliadenilación del gen *FBP1*. Irrniger y Braus (1994) ya demostraron mediante mutagénesis saturante que dicho triplete carecía de importancia en el procesamiento de la señal de poliadenilación del CaMV.

En la orientación inversa la eficiencia de la poliadenilación cae del 89 al 78%. Como se vio mediante RT-PCR algunos de los puntos de poliadenilación caían dentro de la secuencia eliminada. Esta deleción eliminaba parte de los sitios potenciales de poliadenilación, lo que justificaría la caída de la eficiencia. De todas maneras el descenso no era muy apreciable, lo que parecía indicar que la elección del sitio de corte era bastante laxa y que no se requería gran cantidad de secuencia específica en posición 3' respecto a los puntos de poliadenilación para obtener un procesamiento aceptable. Se detectó una banda adicional entre la correspondiente al transcrito truncado y al entero como si existiese un punto de procesamiento críptico entre ambas señales de poliadenilación que se utilizase al eliminar los sitios originalmente situados al

final del inserto de *FBP1*. Dicho punto se situaba dentro de la secuencia de *ADH1*, siendo provocado por los elementos de eficiencia de la poliadenilación situados en el inserto introducido.

La segunda deleción probada fue la 5'-342. Esta carece de una parte de la repetición de A situada justo en 3' del elemento TAG. En este caso en orientación directa hay una ligera caída en la eficiencia al 86%, pero queda claro que la secuencia de A no es elemento clave en el procesamiento, al contrario de lo que ocurre en el gen *ADH1* (Heidmann et al., 1994).

En la siguiente deleción (3'-328) se eliminó toda la secuencia A_{11} y los elementos TAG...TATGT, manteniéndose alta la eficiencia del procesamiento (89% de RNA truncado). El análisis de los sitios poli(A) mediante RT-PCR de esta construcción mostró una variabilidad de sitios ligeramente mayor que en el fragmento 397, produciéndose cortes en las posiciones 1176, 1177 (el sitio mayoritario), 1180, 1185, 1193 y 1209. Según esto, se produjo un deslizamiento del punto de poliadenilación hacia sitios situados en posición más 3'. Por lo tanto los elementos A_{11} y TATGT carecen de influencia en la eficiencia de la poliadenilación, aunque pueden tener cierta influencia en la elección del sitio de poliadenilación (elementos ricos en A, como en este caso el A_{11} , han sido propuestos para este papel; Russo et al., 1993), aunque ésta no sea muy fuerte, ya que el sitio salvaje mayoritario se mantiene y los sitios restantes están muy cercanos a él, produciéndose una banda única en el experimento de RT-PCR (ver Figura 15).

En orientación inversa se mantiene la eficiencia de la deleción 5'-355, a pesar de que en la región eliminada se encuentran todos los sitios de corte secuenciados. Queda claro que en la orientación inversa el sitio de corte en sí no es demasiado determinante y que la reducción en la capacidad de poliadenilación es más progresiva que en la orientación directa. La banda de tamaño intermedio permanece, de modo que la situación entre las deleciones 5'-355 y 3'-328 es comparable.

El fragmento correspondiente a la última deleción (5'-307) carece de la mitad de la secuencia $(TA)_n$. Esta deleción fue seleccionada por dos razones. En primer lugar porque este tipo de secuencias han sido descritas en varios genes como elementos con una función en el proceso de formación del extremo 3' (Russo et al., 1993; Irniger y Braus 1994). Además la deleción de parte de la secuencia reduce la capacidad de esta de formar una estructura cruciforme (o una horquilla a nivel de RNA) y podía indicar la contribución de elementos estructurales en la formación del extremo 3' en levadura. Como se muestra en la Figura 14, hubo un descenso dramático de la eficiencia de poliadenilación en la orientación directa (menos del 30% de transcrito truncado). De acuerdo con esto la secuencia $(TA)_n$ es un elemento esencial en el procesamiento de *FBP1*, ya sea por razones de secuencia o estructurales. En esta deleción persisten 5 repeticiones TA. Por lo tanto se podría postular que un hexanucleótido TATATA no es suficiente para dirigir una poliadenilación totalmente satisfactoria, y que, o bien se requiere un mayor número de repeticiones TA, o bien es necesario un entorno determinado alrededor de la secuencia $(TA)_n$ que se ve alterado al eliminar secuencias en 5' o al acercarse

secuencias ajenas al terminador como son el sitio de clonación múltiple y el intrón de la actina. No se pudo mapear en este caso los sitios poli(A) por la baja cantidad de transcritos truncados.

En cuanto a la orientación inversa la eficiencia bajó del 78 al 58%, lo que indicó cierta implicación de la secuencia $(TA)_n$ también en esta orientación. No obstante la capacidad de procesamiento fue mayor que en orientación directa. Esto sugirió que la bidireccionalidad no estaba provocada por la formación de la horquilla de RNA formada por la secuencia $(TA)_n$. Las diferencias entre ambas orientaciones parecen indicar que en la señal de poliadenilación en orientación inversa están implicadas otras secuencias, o que el elemento $(TA)_n$ es muy dependiente de la secuencia que se encuentra en 5'.

2.2.2.- Deleciones por 3'

En las deleciones por 3' se encontró un patrón más gradual (Figura 16). En orientación directa, los fragmentos más grandes probados (3'-214, 3'-161 y 3'-144) muestran una capacidad de procesamiento similar al fragmento completo (aproximadamente 98%). Los sitios poli(A) producidos en el plásmido pVPA144F son perfectamente normales, siendo el sitio de corte encontrado en pVPA397 el más utilizado (4 de 5 clones). Dicha deleción posee sólo unos pocos nucleótidos en 3' después del sitio poli(A), lo indica que no se requieren secuencias en 3' para producir un correcto procesamiento.

En la deleción 3'-122, cuando se eliminó la secuencia del sitio de poliadenilación se observó una caída al 85%. Respecto a los sitios de poliadenilación, sólo uno se desplazó a la secuencia restante de *FBP1*. El resto correspondían a corte dentro de la secuencia contigua de *ADH1*, manteniéndose en tres de los cinco clones secuenciados una distancia similar entre los sitios de corte y la secuencias causantes de la poliadenilación situadas en 5'. Es de destacar el hecho de que sólo uno de los clones secuenciados obedecía al consenso de sitio de corte PyA. lo cual indicaba que se había alterado la especificidad de corte. La caída en la eficiencia fue ligera, comparable a la que acontecía al eliminar los sitios de poliadenilación en orientación inversa, lo que indicó que el sitio de poliadenilación no es un requerimiento que determine de forma crucial la eficiencia del procesamiento. El mismo comportamiento se ha visto en otros genes, como en el caso del gen *ARO4*, en el cual se han detectado sitios poli(A) situados en el intrón de la actina utilizado en el vector en que se ensayaba (Irniger *et al.*, 1991), lo que indicó que existían secuencias cerca o dentro del intrón de la actina con influencia en la poliadenilación. Sin embargo en el vector y en las secuencias de *TRP1* y *TRP4* en orientación inversa probadas en ese ensayo no se encontraron sitios poli(A) en esa región, lo que indica que cada secuencia tiene un comportamiento propio. En el caso de que se carece de un fuerte elemento posicionador y un sitio poli(A) óptimo, se ha detectado que los sitios poli(A) se extienden a lo largo de una región extensa (Guo y Sherman, 1995). Esto sugiere que la maquinaria celular no es muy exigente en cuanto a los sitios poli(A) y éstos pueden situarse dentro y fuera de la secuencia de los genes. Es interesante en este sentido el resultado obtenido con el gen *GAL7* (Abe *et al.*, 1991): la sustitución del sitio poli(A) del gen por secuencia

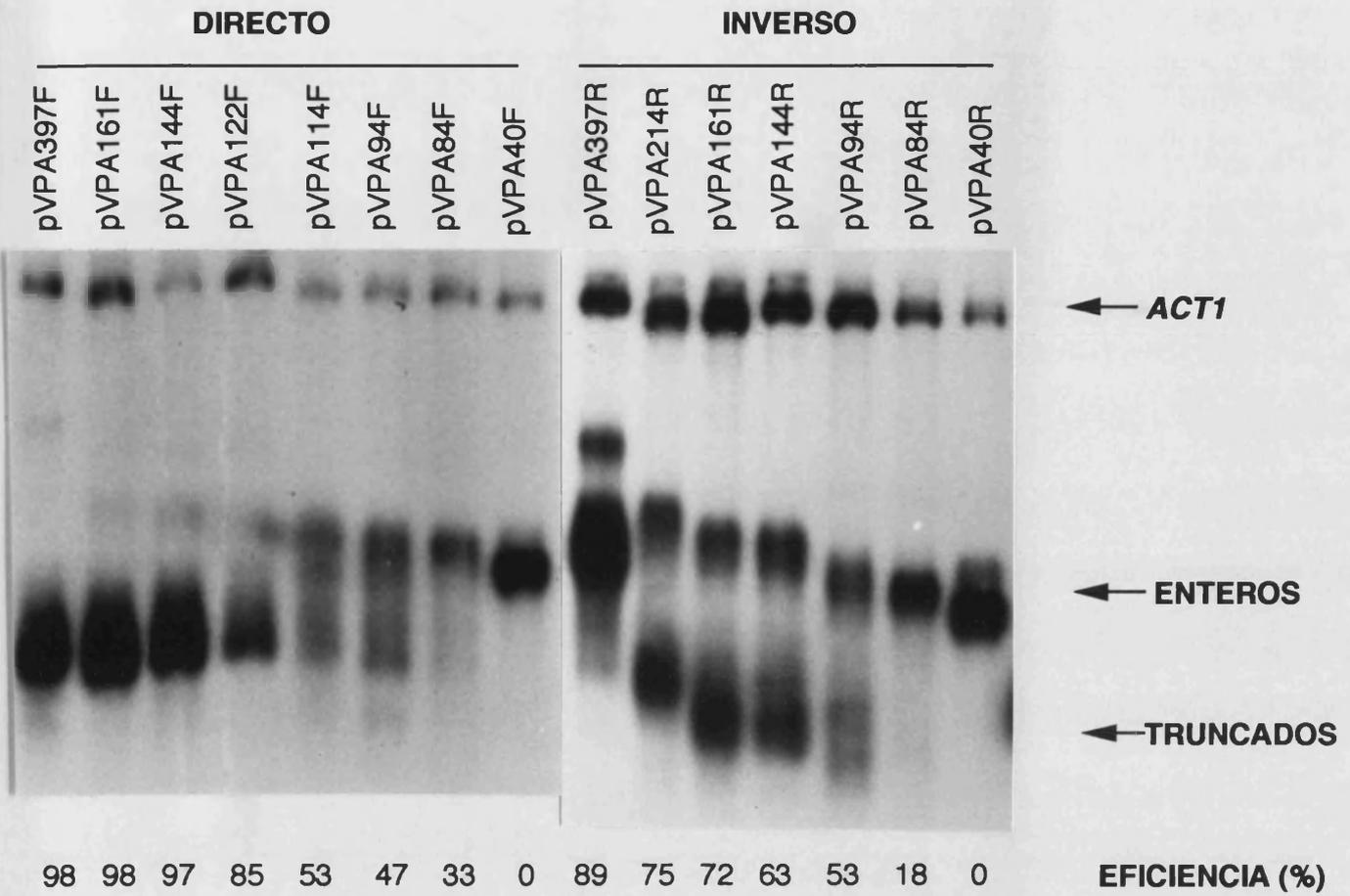


Figura 16.- Análisis la poliadenilación *in vivo* de los plásmidos pVPA llevando el fragmento 397 y deleciones de este fragmento desde 3' en ambas orientaciones. Las condiciones experimentales son las mismas que en la Figura 14.

de pBR322 no afecta la eficiencia de la poliadenilación y sólo modifica la posición del procesamiento en 4-5 bases.

En el caso de la delección 3'-144 se produjo una caída mayor en el procesamiento (53%) lo que sugiere que algún elemento de secuencia situado entre la secuencia $(TA)_n$ y el sitio de poliadenilación está implicada en el procesamiento, aunque la secuencia afectada por esta delección carece de parecido con ningún consenso conocido. No se ha encontrado ningún elemento posicionador de tipo AAGAA, AATAAA, AAAAA (Russo *et al.*, 1993) en toda esa zona.

En la siguiente delección (3'-94) hubo una ligera bajada adicional de la eficiencia hasta el 47%. Este resultado indicó que el hexanucleótido TATGTA no se comportaba como el elemento de eficiencia en este gen. Además la eliminación de una parte pequeña de la secuencia $(TA)_n$ parece no afectar determinadamente a la poliadenilación, por lo que se puede suponer que muestra cierta redundancia.

En la delección 3'-84 la eficiencia es peor, bajando hasta el 33%. En este caso permanecían los seis primeros pares TA y la eficiencia fue similar a la encontrada en la delección 5'-307, que carece de los primeros siete pares TA. por lo tanto se puede afirmar que para obtener un procesamiento óptimo se requiere la totalidad de la secuencia $(TA)_n$ y que además dicha secuencia necesita de secuencias en 3' y 5' para ser completamente funcional.

Por último la delección 3'-40 careció de ninguna capacidad poliadeniladora, hecho esperable ya que se han eliminado todas las repeticiones TA, la secuencia A_{11} y el elemento TATGT. Por lo tanto el triplete TAG por si solo carece de cualquier implicación en el procesamiento.

En la orientación inversa existió una caída en la eficiencia de procesamiento desde la primera delección probada (3'-214), en la cual se pasó del 89% de transcritos truncados en el fragmento 397 al 65%. Este hecho sugirió que la secuencia contenida dentro del fragmento eliminado tiene algún efecto en la eficiencia, actuando como un elemento estimulador en 5', ya que está a una considerable distancia de los puntos de corte mapeados, tal y como existe en *ADH2* (Hyman *et al.*, 1991). En la secuencia eliminada existe un elemento TAG...TATG, parecido a la secuencia consenso de Zaret y Sherman y similar al presente en *ADH2*, que puede tener algún tipo de papel en el procesamiento en esa orientación. Considerando que la secuencia eliminada se encuentra dentro de la región codificante de YLR376c, la influencia de esta región puede ser meramente artefactual, producto del azar y no una característica intrínseca del terminador, ya que es difícil suponer que un elemento regulador de este tipo este conservado dentro de una pauta abierta de lectura, y más en la orientación inversa. Existe una secuencia de poliadenilación situada en el interior de la ORF del gen CBP1 que es utilizada para disminuir la expresión del gen (Mayer y Dieckman, 1991), aunque este no parece ser un caso similar.

La eficiencia no varió en las delecciones siguientes 3'-161 (72%) y 3'-144 (63%), lo que indica que la secuencia entre 3'-214 y 3'-144 es prescindible. No existe ningún consenso conocido en esa zona.

La delección 3'-94 provocó una caída ligera del procesamiento (53%), posiblemente debido a que se empezó a eliminar la secuencia $(TA)_n$.

Los niveles se redujeron al 18% en la delección 3'-84, indicando un papel claro de la secuencia $(TA)_n$ también en la orientación inversa. La eficiencia de este fragmento es muy baja comparada con la delección 5'-307 en la misma orientación, lo cual indicó que hay secuencias en 3' del $(TA)_n$ del fragmento 397 (presente en 5'-307 y no en 3'-84) que compensan de la pérdida de parte de la repetición de TA.

La delección final 3'-40 carece de funcionalidad, no presenta ninguna secuencia capaz de provocar por si misma la poliadenilación, una vez eliminados todos los consensos.

De acuerdo con estos resultados se delimitó una región de 77 pb que, en la orientación directa, era requerida para la poliadenilación. Esta región se extiende entre las posiciones 1120 y 1196 y está delimitada por las delecciones 5'-328 y 3'-144. Incluye el elemento $(TA)_n$, el sitio de poliadenilación (con poca secuencia alrededor de ambos elementos) y las secuencias intermedias. Es probable sin embargo, que esa región no sea suficiente para producir la correcta poliadenilación por si misma, como indica alguno de nuestros resultados, necesiéndose el concurso de secuencias en 5' (posiblemente los elementos TAG...TATAGT o A_{11}), al menos en la elección del sitio de corte.

En la orientación inversa la secuencia $(TA)_n$ posee también una función importante, y forma, junto con los sitios de poliadenilación, la base de la secuencia de poliadenilación. Esta situación similar a la obtenida en la orientación directa está complicada por la presencia de elementos activadores situados en la parte 3' de la secuencia de 397 (5' en el caso de la disposición adoptada por el fragmento), aunque como se dijo anteriormente la presencia de dichos elementos puede ser puramente artefactual. Es curioso también en este sentido que dichos elementos no sean requeridos para la poliadenilación en orientación directa.

2.2.3.- Estudio de la capacidad de poliadenilación de repeticiones invertidas

Para determinar si la secuencia $(TA)_n$ entera es capaz de producir procesamiento ella sola, se subclonó en el vector pME729 la secuencia de 28 pb correspondiente a la repetición de TA en orientación directa, es decir, con el dinucleótido TT en medio, en lugar del dinucleótido AA que aparece en la orientación inversa, obteniéndose el plásmido llamado pVPA28. El resultado se muestra en la Figura 14. No se vio traza de transcrito truncado en esta construcción, lo que indica que se requieren elementos adicionales para producir la formación del extremo 3' y que ni el cruciforme, ni la horquilla de RNA que puede formar esa secuencia de DNA pueden producir el procesamiento por ellos mismos.

Para probar la capacidad de otras repeticiones invertidas para producir procesamiento en este sistema, se seleccionó una repetición invertida de 2x31 pb obtenida del fago M13mp2IR62E (Jensch et al., 1989), que es rica en A+T (65%). El plásmido resultante (pVPA62) fue incapaz de producir nada de transcrito truncado (Figura 14), lo que corroboró que las repeticiones invertidas o las horquillas de RNA no pueden producir procesamiento por el

simple hecho de poseer una estructura en horquilla, sino que se requiere algún determinante de secuencia.

2.3.- Efecto de las mutaciones puntuales y deleciones internas en la secuencia $(TA)_n$ en la eficiencia de poliadenilación.

Ya que la secuencia $(TA)_n$ parece comportarse como un elemento de eficiencia en el procesamiento en ambas direcciones, procedimos a modificarla selectivamente para obtener más información acerca de los requerimientos estructurales y de secuencia de la señal de poliadenilación de *FBP1*.

2.3.1.- Mutaciones puntuales

El primer tipo de modificaciones, las mutaciones puntuales, fueron seleccionadas y obtenidas para determinar los condicionantes de la estructura secundaria que adopta la secuencia $(TA)_n$ *in vivo* e *in vitro*, como ya hemos descrito en la sección anterior (mutaciones SM y DM; Aranda *et al.*, 1996). Aquí las usamos para determinar además la influencia de la estructura secundaria del RNA en el procesamiento. Es posible que estructuras de RNA acerquen elementos situados lejos en la secuencia; esta posibilidad se ha encontrado en virus humano HTLV-1 (Brown *et al.*, 1991). Una horquilla de RNA se haya también implicada en el procesamiento de los mensajeros de las histonas de eucariotas superiores (Birstiel y Schaufele, 1988).

Las mutaciones se realizaron sobre el plásmido pFBP391, y los fragmentos resultantes se clonaron en ambas orientaciones en el vector pME729 tal y como se hizo con el fragmento 397 salvaje. Ya se ha descrito a nivel de DNA lo que ocurre con estas mutaciones. El efecto de estas mutaciones en la horquilla de RNA equivalente causaría una desestabilización semejante. No obstante la formación de esta horquilla puede estar influida por las secuencias adyacentes. Para predecir teóricamente la estructura global que adoptaría el RNA de esta región se utilizó el programa de predicción de estructuras secundarias de RNA MFOLD (Paquete GCG, University of Wisconsin). Los resultados se muestran en la Figura 17. En la orientación directa (Figura 17A) probamos el fragmento de 144 pb delimitado por la deleción 3'-144, ya que contenía toda la secuencia necesaria para una poliadenilación eficiente. A nivel de RNA existe la posibilidad de apareamiento G-U, y como en 3' de $(TA)_n$ existe una serie de repeticiones TG alternadas con repeticiones TA, en RNA se formaba una horquilla mayor que el cruciforme de DNA, donde la secuencia de TA quedaba desplazada. En la mutación puntual sencilla SM, se producía una ligera apertura del lazo de la horquilla, pero la variación de energía libre era mínima. En la mutación doble DM, se producía un deslizamiento de la horquilla, creando nuevos apareamientos y disminuyendo incluso la energía libre. En la orientación inversa (Figura 17B) se utilizó la misma secuencia de 144 pb, que retiene la mayor parte de la capacidad de procesamiento en esa orientación, para que los resultados sean comparables. Se analizó

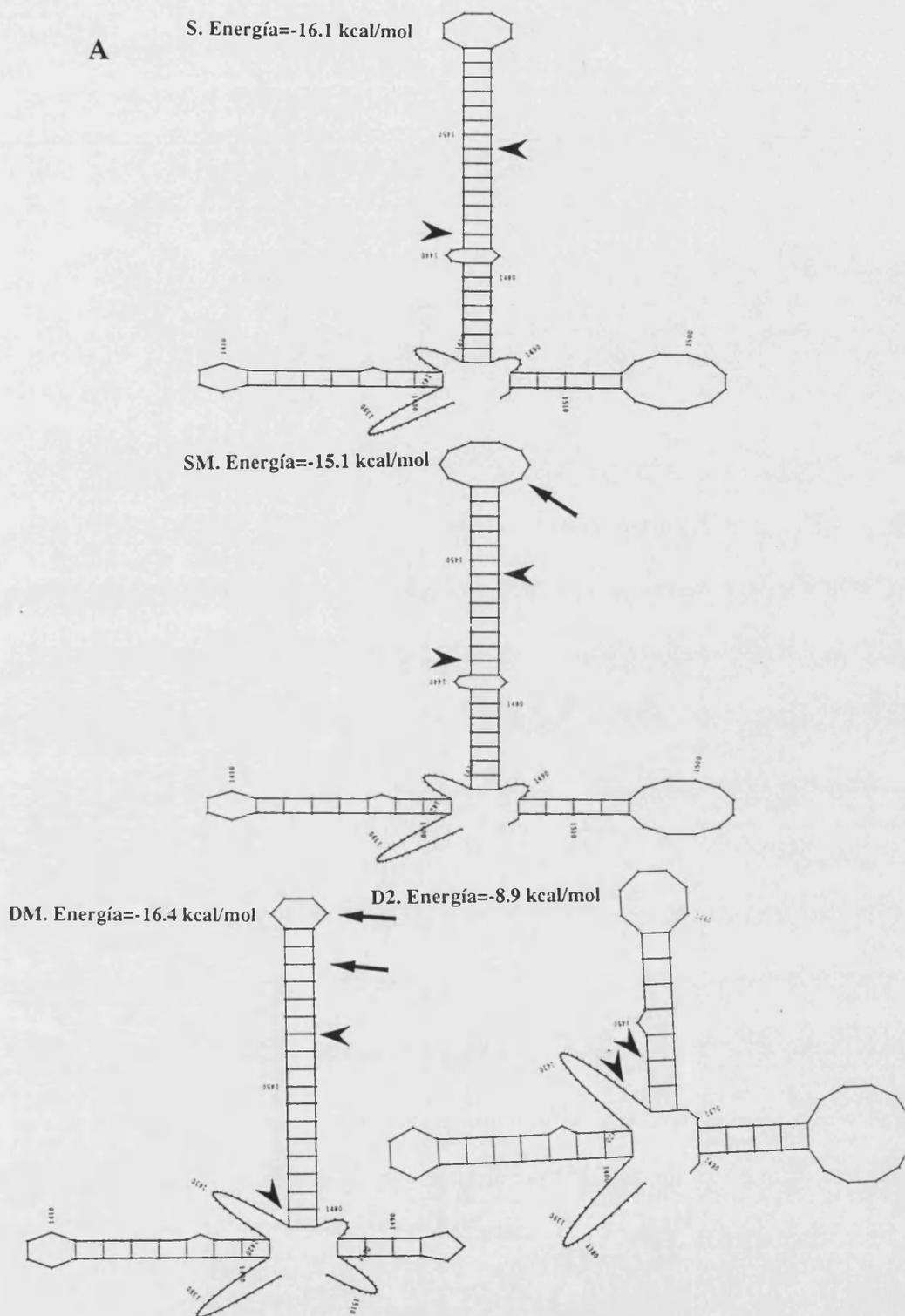
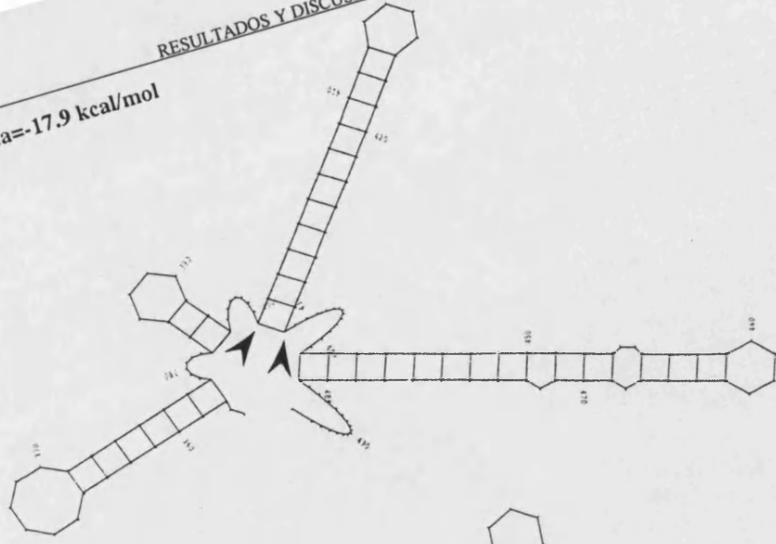


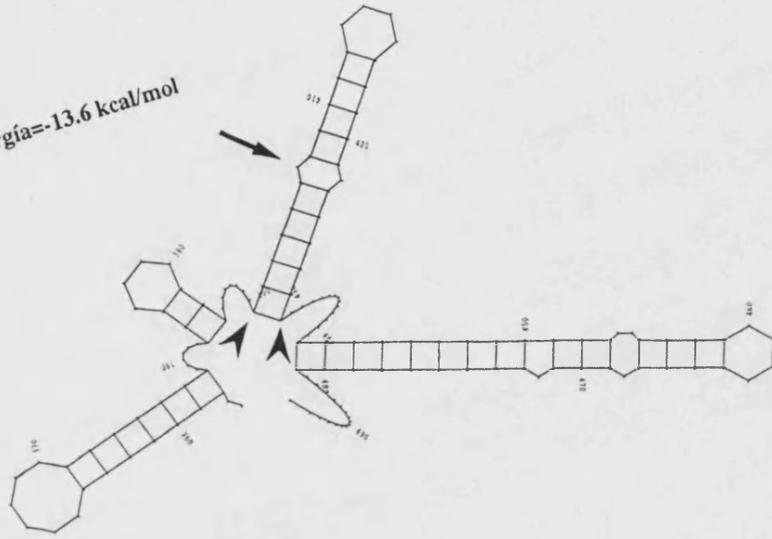
Figura 17.- Plegamientos teóricos de RNA. (A) Fragmento 144 en orientación directa. Se representa la secuencia de tipo salvaje (S), las mutaciones puntuales SM y DM y la delección interna D2. Se indica la energía libre de cada una de esas estructuras. La secuencia (TA)_n está flanqueada por cabezas de flecha. Las flechas indican las mutaciones puntuales. (B) Fragmento 144 en orientación inversa. Los símbolos son los mismos del apartado A. La numeración es la de la secuencia de *FBPI* depositada bajo el número de acceso Y00754.

B

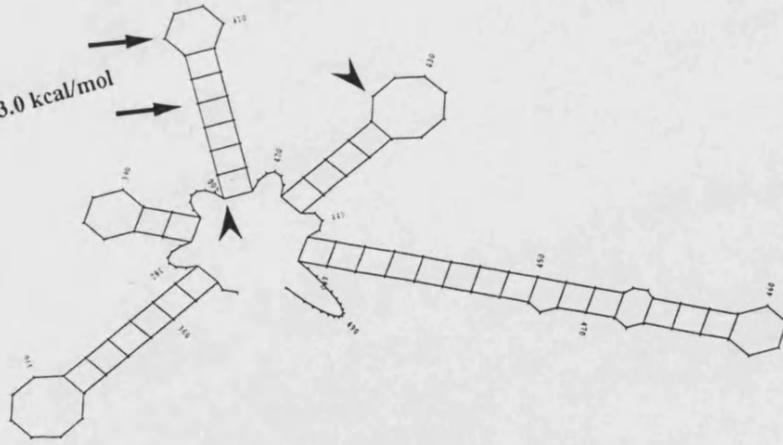
S. Energía=-17.9 kcal/mol



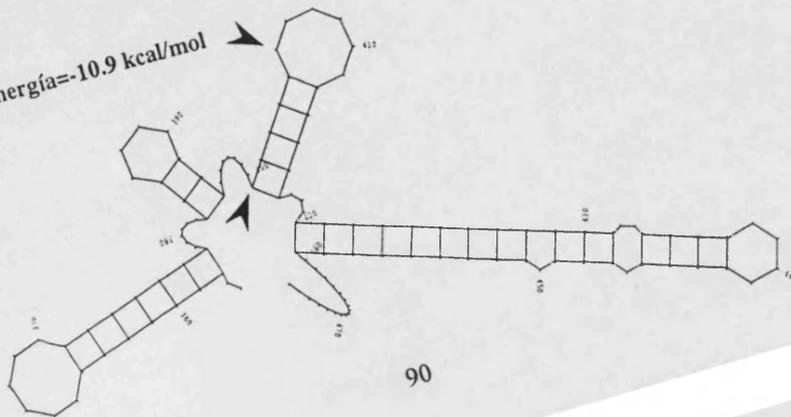
SM. Energía=-13.6 kcal/mol



DM. Energía=-13.0 kcal/mol



D2. Energía=-10.9 kcal/mol



también la secuencia del fragmento completo de 397 pb que posee una eficiencia de poliadenilación completa y se ha visto que el comportamiento frente a las mutaciones es el mismo (datos no mostrados). En este caso la horquilla de RNA correspondía al cruciforme de DNA. La SM alteró la perfecta simetría de la horquilla, creando un desapareamiento central equivalente al que desestabilizaba el cruciforme. En la mutación doble DM, el efecto era mucho más devastador, produciéndose una reorganización completa de la zona. Existen horquillas que permanecen y que pueden poseer alguna influencia, aunque las deleciones seriadas indican que no será una influencia decisiva en la poliadenilación. No obstante estas son consideraciones puramente termodinámicas, que no consideran la influencia de factores adicionales como puedan ser proteínas que puedan unirse a estas secuencias *in vivo*. Si existiese por ejemplo alguna proteína con afinidad por las horquillas ricas en A+T, se podría estabilizar una horquilla en orientación directa correspondiente al cruciforme, con la influencia negativa consiguiente de las mutaciones elegidas. En este caso los datos revelarían que la estructura de RNA no tiene influencia en la poliadenilación en la orientación directa.

Con estos antecedentes teóricos cabría esperar que si la estructura global del RNA es la responsable del procesamiento, las mutaciones puntuales deberían no afectar apenas a las mutaciones en orientación directa y de modo creciente a las de orientación inversa. Si la formación simplemente de la horquilla de RNA correspondiente al cruciforme de DNA fuera determinante en el procesamiento se afectaría por igual a ambas direcciones. En la Figura 18 se describen los resultados obtenidos. No se afectó visiblemente la eficiencia de ninguna orientación con ambas mutaciones. Los puntos de poliadenilación del DM en orientación directa resultaron ser perfectamente normales (Tabla III). Por lo tanto estos resultados apuntan a que la estructura de RNA no juega un papel determinante en la eficiencia y/o bidireccionalidad del procesamiento de *FBP1*.

Otro dato aportado por estas mutaciones era la aparente redundancia de la secuencia $(TA)_n$. Se puede alterar al menos dos pares TA sin afectar a la poliadenilación. Quizás el hecho de mantener la riqueza global de A+T era suficiente para producir procesamiento. Según los datos previos la región completa $(TA)_n$ era requerida para el procesamiento aunque no suficiente. Sin embargo estábamos utilizando deleciones que modificaban la secuencia por 5' y por 3'.

2.3.2.- Deleciones internas

Para determinar si los pares TA resultaban redundantes sin alterar secuencias circundantes se utilizaron las deleciones internas D1, D2 y D3 descritas con anterioridad. Dichas mutaciones alteraban teóricamente de manera significativa la estructura del RNA en la región $d(TA)_n$ (ver deleción D2 en Figura 17), como era de esperar en deleciones ya más significativas. Las dos primeras deleciones, la D1 (en la que la secuencia $(TA)_n$ quedaba reducida a 9 pares TA) y la D2 (en la que restaba solo tres pares), mostraron una buena eficiencia en ambas direcciones, siendo sólo detectable una ligerísima bajada en la orientación

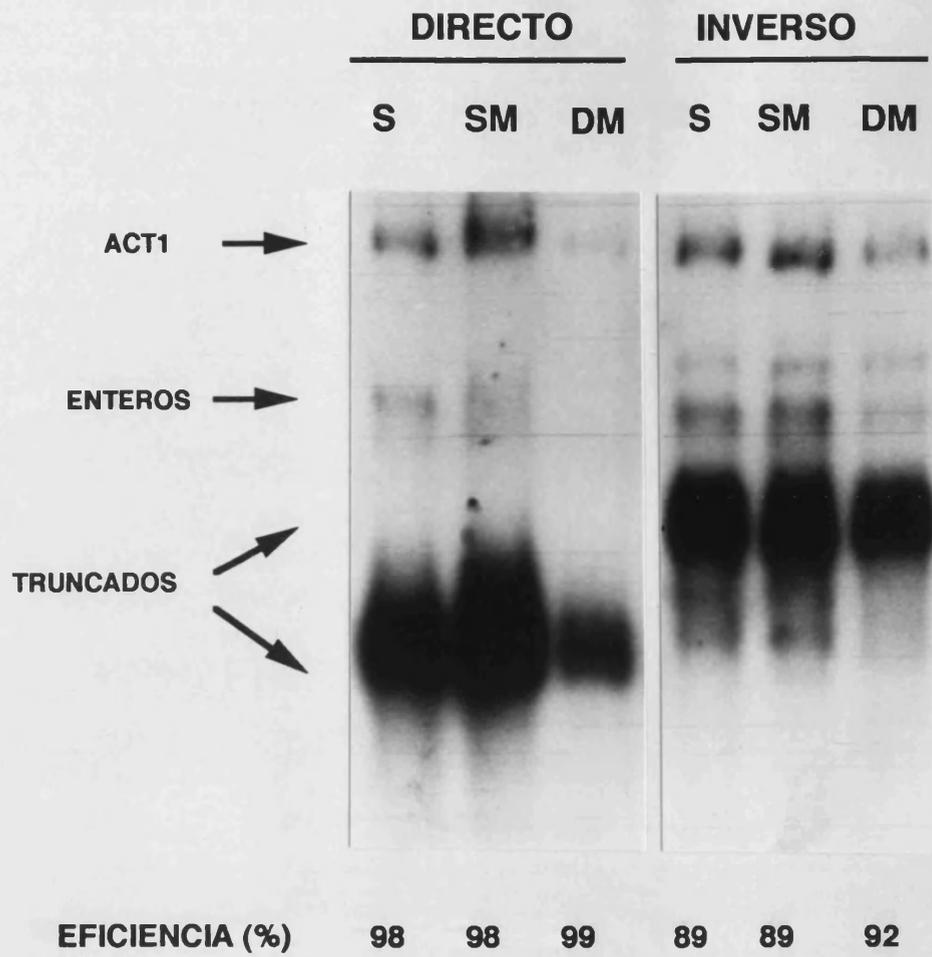


Figura 18.- Análisis de la poliadenilación *in vivo* de los plásmidos pVPA llevando el fragmento 397 con las mutaciones puntuales SM y DM. Las condiciones experimentales son las mismas que en la Figura 14.

inversa (Figura 19A). Por lo tanto quedaba claro que las repeticiones TA eran redundantes para un correcto procesamiento en ambas direcciones. Además, el hexanucleótido TATATA parecía suficiente para producir un procesamiento efectivo, lo que venía a confirmar a esta secuencia como uno de los consensos de elemento de eficiencia más extendido y eficaz. Ya que esta secuencia es simétrica se explicaría su bidireccionalidad en el proceso.

Para determinar si efectivamente la secuencia de TA era el elemento de eficiencia se probó la delección D3 que eliminaba la totalidad de los 28 pb de la repetición invertida. En orientación inversa sí que se produjo una caída clara de la eficacia en el procesamiento hasta el 39%. En la orientación directa la proporción de transcritos truncados respecto a los enteros se mantenía todavía alta (75%). No obstante, considerando la banda del mensajero cromosómico de la actina, se vio a simple vista que pese a haber inyectado en el gel cantidades similares de RNA, la cantidad de transcritos procedentes del plásmido había caído bruscamente, sobre todo el truncado, que es el mayoritario. Realizando una normalización de la suma de transcrito truncado y entero respecto al mensajero de la actina resultaba evidente que tal caída era real. Dicho cociente era de 0.7 frente al 5.7 salvaje, lo que suponía una caída de 8 veces en la cantidad de transcrito. En la orientación inversa la proporción caía ligeramente, 1.8 veces solamente. Revisando las delecciones D1 y D2 se vio que la caída existía en ambas en orientación directa, pero a niveles menores, de manera que por ejemplo en D2 había la mitad de transcritos procedentes de pME729 que en el salvaje, aunque el hecho no era tan aparente como en D3. En la orientación inversa D1 y D2 sufrían una ligerísima caída. Por lo tanto la reducción de pares TA llevaba a una caída en los niveles de transcrito, que cuando se eliminaba la secuencia (TA)_n se acentuaba.

Se determinaron los sitios de poliadenilación de las tres delecciones en orientación directa. En todos los casos el punto mayoritario de corte era el salvaje, en posición 1177, pero en todos ellos existían algunos puntos de corte que se desplazaban en dirección 3', en algunos casos a una distancia considerable, introduciéndose en la ORF YLR376c. Parece claro que la secuencia (TA)_n no es el determinante principal de la elección del sitio poli(A), debe existir alguno otro sin identificar, aunque que la reducción de la secuencia (TA)_n puede afectar ligeramente, tal vez por la alteración de la estructura secundaria del RNA.

Para determinar los efectos de las delecciones sobre un sustrato más pequeño, y con el fin de probarlas en procesamiento *in vitro* con extractos totales (ver más adelante), se repitió la mutagénesis D2 y D3 sobre el fragmento resultante de la delección 3'-144, que funciona perfectamente en la orientación directa y bastante bien en la inversa. Se clonaron en ambas orientaciones en pME729 los fragmentos resultantes y se analizaron los resultados del mismo modo (Figura 19B). En la orientación directa D2 y D3 muestran un comportamiento parecido al obtenido con el fragmento entero, con una eficiencia de 95% en el D2 (idéntica al 96% del fragmento salvaje) y de 72% en el D3 (75% en 397D3), observándose una caída de los niveles en la delección D3 de 4.3 veces, no tan grande como en el caso de 397, pero significativa. Por tanto todas las secuencias en 3' del punto de poliadenilación no están implicadas en este comportamiento, que parece centrado en la señal de poliadenilación. En orientación inversa los

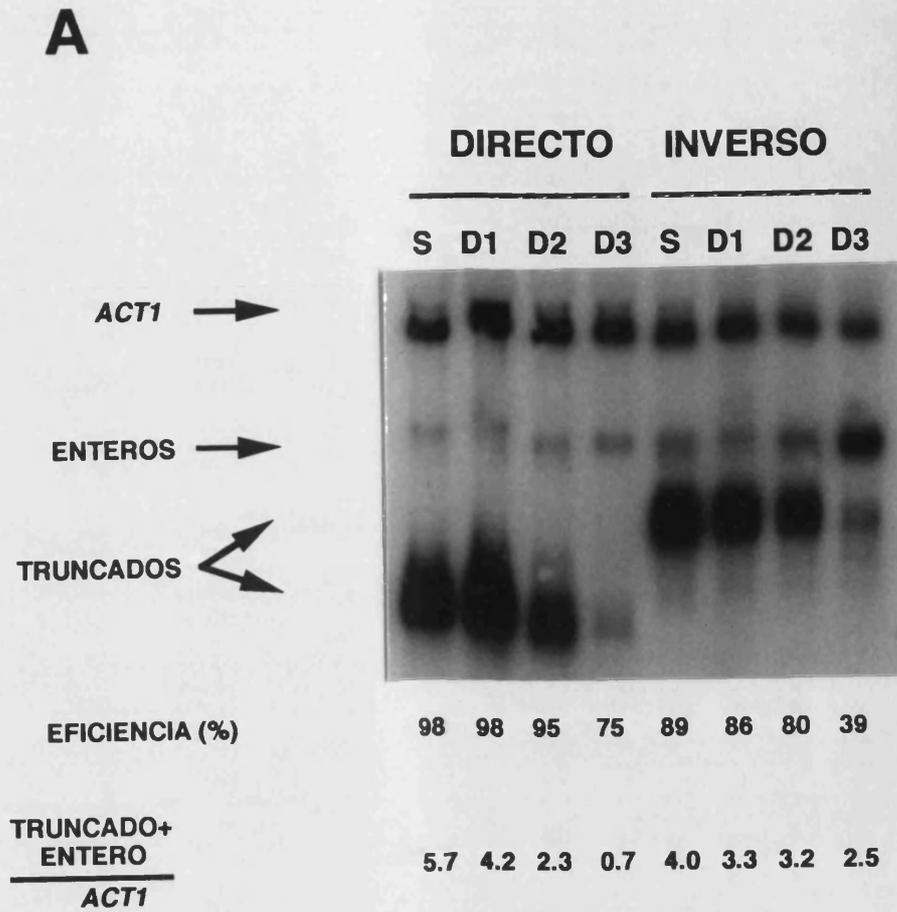
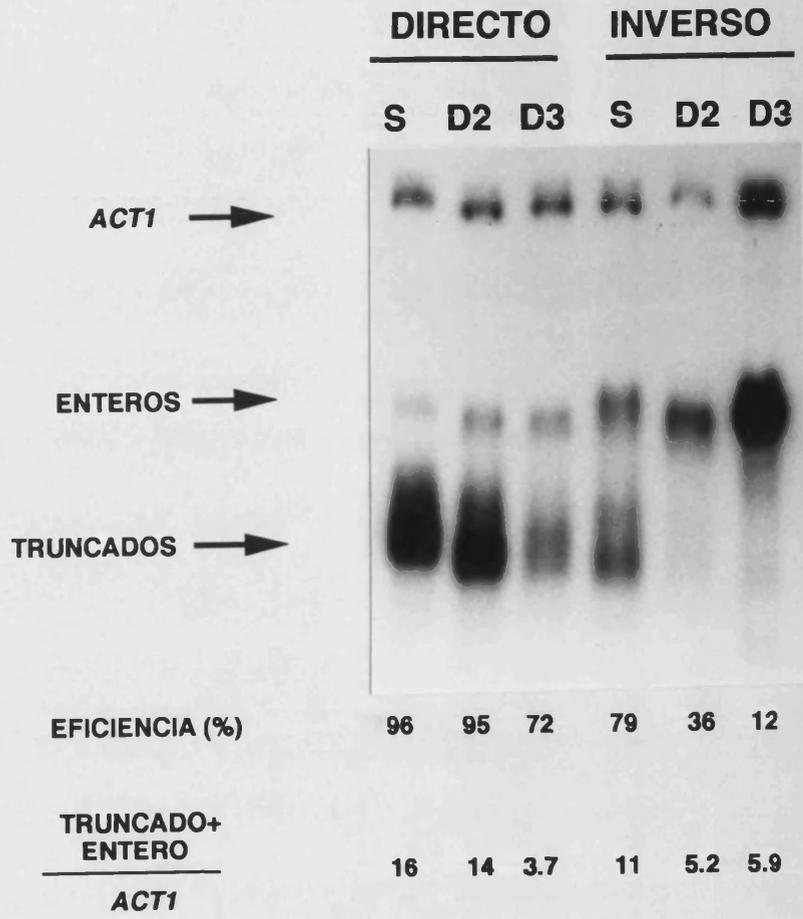


Figura 19.- Análisis de la poliadenilación *in vivo* de los plásmidos pVPA llevando las deleciones internas D1, D2 y D3 realizadas sobre el fragmento 397 (apartado A) y sobre el fragmento 144 (apartado B). Las condiciones experimentales son las mismas que en la Figura 14. Se indica la relación entre la suma de los transcritos truncados y enteros de cada uno de los plásmidos y el transcrito cromosómico del gen de la actina, que actúa como referencia interna de cantidades

B



resultados fueron diferentes a los obtenidos en el fragmento 397. La eficiencia fue mucho más baja en D2 (36%) y sobre todo en D3 (12%). Por lo tanto, una vez eliminadas las secuencias en 3' del fragmento 397 (en 5' en esta orientación), la dependencia de la secuencia (TA)_n es mucho más acusada. En la orientación directa existe otro tipo de consensos en 5' que pueden paliar en parte la falta de repeticiones TA, pero en 3' dichos consensos no son tan aparentes (y en la deleción 3'-144 se ha eliminado el único posible, la secuencia TAG...TATG) y la eliminación de la secuencia (TA)_n es mucho más determinante.

La pérdida de niveles de transcritos truncados se podría deber al hecho de que dicha deleción altera la estructura secundaria del DNA, lo que originaría que las polimerasas se bloqueasen en esa zona, provocando incluso una terminación aberrante e inestable. Los resultados de la deleción D3 en 397 y 144, en los cuales las pérdidas de transcritos son diferentes en ambas orientaciones (sobre todo en 144), nos permite afirmar que si el efecto fuese a nivel de DNA, se debería observar una mayor bidireccionalidad, y no esa diferencia entre ambas orientaciones. Los resultados apuntan más a un efecto a nivel de RNA, como más adelante se verá.

2.3.3.- Estudio de la deleción D3 y su implicación en la caída de niveles de mensajero

Para explicar el descenso de los niveles de transcrito en las deleciones nos centramos en 397D3 que era el caso más dramático y se probaron varias posibilidades. En primer lugar se descartó que la deleción estuviese afectando la estabilidad del plásmido, aunque la misma deleción en el plásmido YEp2083 no mostró ningún problema a este respecto. Para ello se midió el número de copias mediante análisis por Southern (datos no mostrados). El nivel transcripción del gen *URA3* del plásmido no estaba afectada, por lo que parece que no era un problema de que la topología del plásmido pudiese afectar de alguna manera a la transcripción de los genes presentes en el mismo (datos no mostrados).

Se probó el fragmento mutado en un entorno diferente para ver si el resultado era similar. Se usó el plásmido pHZ18Δ2SMA, que permite una detección fenotípica de la eficiencia del procesamiento (Hyman *et al.*, 1991). Este es un plásmido multicopia lanzadera (Figura 20A) que contiene una fusión génica bajo el control de la secuencia activadora en 5' de *GAL1* y transcrita por el promotor del gen *CYC1*. La región no traducible de la proteína ribosomal 51 (rp51) y la región inicial del gen, conteniendo el intrón, está fusionada en fase con el gen *lacZ*. En este sistema la actividad β-galactosidasa del gen *lacZ* situado en 3' respecto al fragmento a probar no se produce si la secuencia clonada dentro del intrón de rp51 contiene señales de procesamiento. Se subclonaron en este vector los fragmentos 397 (orientación directa e inversa) y 397D3 (en ambas orientaciones) y se transformaron con los plásmidos resultantes las cepa W303-1a. En todos casos se obtuvo colonias blancas, en contraste con las colonias azules del plásmido sin inserto, indicando que los fragmentos introducidos en el plásmido contienen secuencias requeridas para el procesamiento, o que no hay transcripción más allá del inserto de *FBP1*. Las medidas de actividad β-galactosidasa confirmaron esta apreciación. En

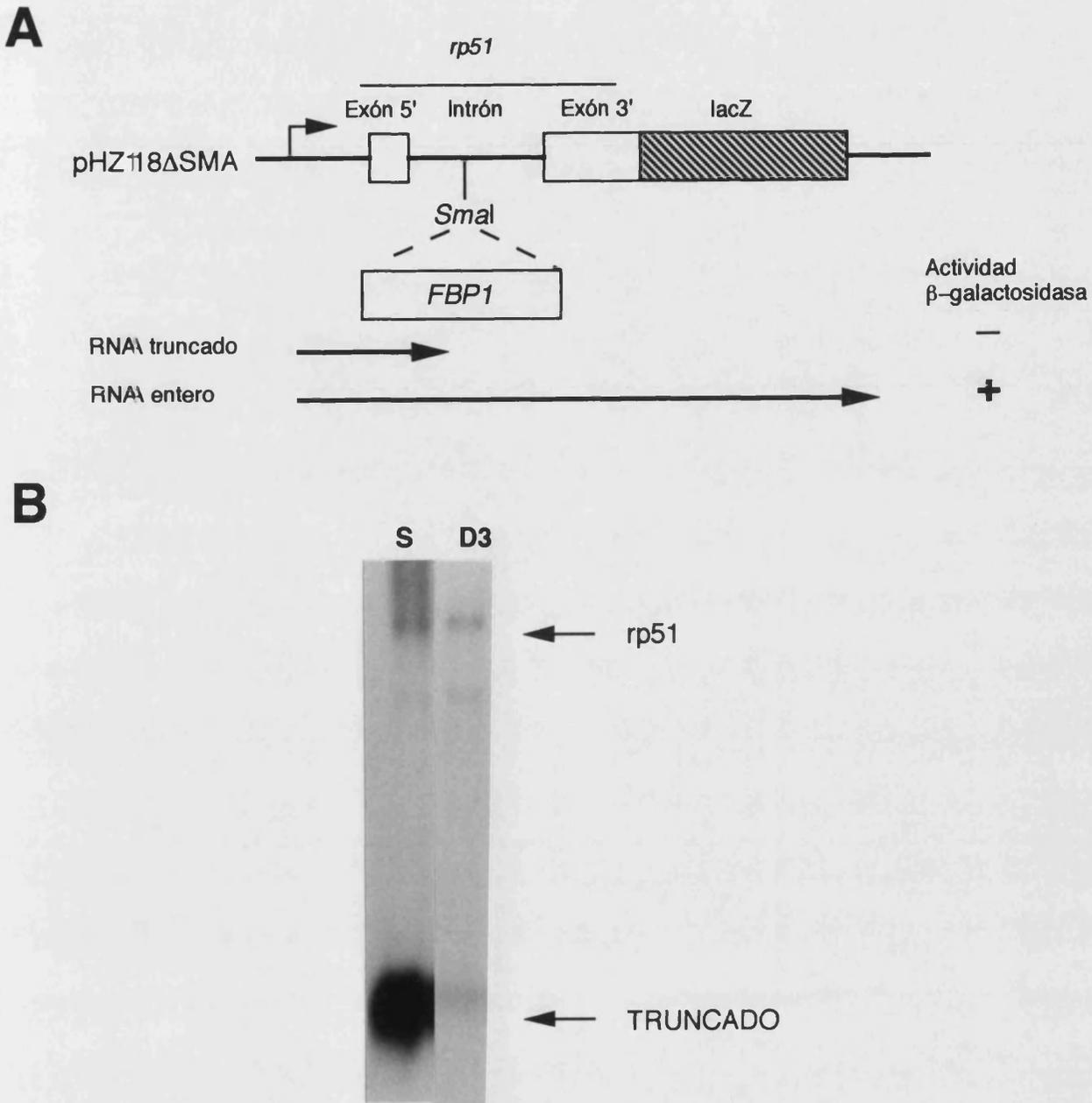


Figura 20).- Análisis de la poliadenilación *in vivo* del fragmento 397 salvaje y portando la mutación D3 utilizando el plásmido pHZ18D2SMA. (A) Esquema del plásmido. pHZ18D2SMA es un vector derivado del plásmido 2 μ m que contiene el gen *URA3* como marcador y una fusión *rp51-lacZ* que expresa niveles altos de β -galactosidasa. La introducción de un fragmento de DNA a probar en el sitio de restricción *SmaI* situado en el intrón de *rp51* puede producir un transcrito truncado, si es buena señal de poliadenilación, o bien un transcrito entero que llega hasta *lacZ* y que produce actividad enzimática, si no lo es. (B) Estudio de los mensajeros producidos por las cepas transformadas con los plásmidos pHZ397F (S) y pHZ397D3F (D3). Se extrajo RNA total de las cepas conteniendo el plásmido indicado sobre cada carrera (un derivado del plásmido pHZ18Δ2SMA con una secuencia de *FBP1* cuya longitud se indica en el nombre). Las muestras se migraron en un gel de agarosa desnaturante del 2%. Se hibridó con una sonda *SmaI-HindIII* perteneciente a la porción 5' del gen *rp51*.

medidas duplicadas de dos aislados independientes encontramos 180 unidades arbitrarias para el vector, mientras que en el caso de 397F y 397R medimos menos de una unidad, en 397D3F 1 unidad y en 397D3R alrededor de 5 unidades. Como en este ensayo lo que se mide es la cantidad de transcrito entero, independientemente de lo que le ocurra al transcrito truncado. Estaba claro que en el inserto salvaje en ambas orientaciones se producía un bajo nivel de transcritos tipo entero, tal y como se observaba por la escasa proporción de transcritos de este tipo en los *northern* producidos en la serie pVPA

En la delección D3 en orientación directa se produce un ligerísimo aumento de actividad, lo que es consecuente con el ligero aumento de la banda de entero de pVP397D3F. En la orientación inversa se observaba una mayor actividad, al igual que aumenta el RNA truncado en pVPA397D3R. Las medidas de actividad β -galactosidasa eran coherentes con lo observado en los entero de la Figura 18A, pero para determinar lo que sucedía a los transcritos truncados se extrajo RNA total de las cepas transformadas con los plásmidos pHZ conteniendo los insertos 397F y 397D3F y se vio que existía una caída en los niveles de los transcritos truncados en el mutante D3 comparable a lo observado en pME729 (Figura 20B). Por lo tanto los experimentos en el plásmido pHZ18 Δ 2SMA confirman los resultados en pME729 respecto a la caída en los niveles de mensajeros causada por la delección D3, independientemente del entorno en que se sitúe.

La reducción en los niveles de transcritos puede explicarse aduciendo que dichos mRNA tienen una estabilidad afectada por la delección D3. Para descartar esta posibilidad utilizamos las construcciones en orientación directa obtenidas a partir del pHZ18 Δ 2SMA. En dichos plásmidos el promotor está bajo el control de *GAL1*, por lo que la transcripción a partir de ese promotor en una cepa creciendo en galactosa puede ser reprimida pasando las células a un medio con glucosa. Extrayendo RNA a partir del momento de cambio de medio y a cada cierto tiempo se puede obtener una cinética de la desaparición del mensajero. Con este tipo de experimentos determinamos las vidas medias de los transcritos truncados a partir del inserto salvaje ($t_{1/2}=6.3\pm 1$ min) y del inserto con la delección D3 ($t_{1/2}=6.0\pm 1$ min). Como se ve la estabilidad es del mismo orden, por lo que podemos descartar que la eliminación de la secuencia (TA)_n causase inestabilidad en el citoplasma a los transcritos que carezcan de ella.

El siguiente paso fue analizar el efecto de la delección en la actividad del gen completo, ya que conocíamos el efecto que tenía a nivel de la estructura del DNA y de la cromatina. Introducimos el fragmento de 2083 pb conteniendo el gen entero en su versión salvaje y mutada (D3) en el plásmido centromérico de copia única pRS316, produciendo pRS2083 y pRS2083D3 respectivamente. Ambos plásmidos fueron utilizados para transformar la cepa RG1-5d (una cepa sin el gen *FBP1* cromosomal completo). Se extrajo RNA total de las cepas obtenidas y se analizó por *northern* utilizando una sonda de la región codificante del gen. El resultado se muestra en la Tabla IV. Se puede ver que los niveles de transcrito descienden a una tercera parte en el caso de la delección 3', indicando que la delección afecta a la señal de poliadenilación gravemente, pudiéndose descartar en este plásmido cualquier efecto debido al número de copias del mismo. No se vio la aparición de transcritos de mayor tamaño en esta delección

(datos no mostrados). Los sitios poli(A) fueron mapeados por RT-PCR a partir de la cepa transformada con el plásmido pRS2083D3 y se encontró que el sitio salvaje seguía siendo utilizado con plena normalidad, confirmando que la secuencia (TA)_n no tiene implicación en la elección del sitio de corte. La existencia de otros consensos en 5' respecto a la secuencia (TA)_n puede ser la causa de que persista una cantidad apreciable de procesamiento, ya que al eliminar la repetición invertida, los elementos TAG...TATGT y A₁₁ se acercan al sitio de poliadenilación y pueden funcionar como elementos de eficiencia de la poliadenilación. Los mRNA mutados eran perfectamente funcionales, ya que el plásmido era capaz de complementar la disrupción de la copia cromosómica de *FBP1* (datos no mostrados). Los niveles de actividad fructosa-1,6-bifosfatasa se reducen también una tercera parte con la deleción (Tabla IV), en perfecta correlación con los niveles de mensajeros. De acuerdo con estos datos la traducción a partir de los mRNA mutados es normal, lo que puede indicar que la cola poli(A) tiene la longitud habitual, ya que está implicada también en la correcta traducción de los mensajeros.

TABLA IV: EFECTO DE LA DELECIÓN DE LA SECUENCIA (TA)_n EN LOS NIVELES DE mRNA DEL GEN COMPLETO Y EN LA ACTIVIDAD FRUCTOSA-1,6-BIFOSFATASA

	Niveles de mRNA (relativos a actina)	Actividad FBPasa (mU/mg de proteína)
RG1-5d/pRS2083	3,05	136
RG1-5d/pRS2083D	1,13	41
Cociente	2,7	3,3

Una vez realizadas todas estas modificaciones tenemos suficientes datos como para determinar la naturaleza de la bidireccionalidad de la señal de poliadenilación del gen *FBP1*. Este no es el comportamiento general de todos los genes de levadura. En los genes *CYC1* (Osborne y Guarente, 1989) y *ADH1* (Irniger *et al.*, 1991) la señal poliadenila unidireccionalmente, pero la presencia de genes convergentes hace que fragmentos grandes de las regiones 3' de estos genes produzcan procesamiento bidireccional. En *FBP1* la región codificante situada inmediatamente en 3' transcribe en la misma orientación, así que no es un caso comparable. Otras secuencias con la señal de poliadenilación propuesta por Henikoff y Cohen (1984) son también unidireccionales incluso cuando no se detecta ninguna ORF convergente (Irniger *et al.*, 1991). Existen casos en que la región 3' contiene la secuencia de Zaret y Sherman TAG...TA(T)GT...TTT en ambas direcciones (*ARO4*, *TRP1* y *TRP4*; Irniger *et al.*, 1991), tal y como ocurre en *FBP1*. No obstante en nuestro caso la secuencia que la contiene posee una nula influencia en el procesamiento en orientación directa y cuando es eliminada en orientación inversa (deleción 3'-214), la bajada en la eficiencia de procesamiento es pequeña, con lo que esta señal no es el determinante último del procesamiento en esta dirección. El hecho de que se encuentre dentro de una región codificante hace que la

importancia real sea todavía más dudosa. Es conocido que hay genes sin un consenso claro de poliadenilación (*GAL1* y *GAL10*, por ejemplo) que pueden ser procesados bidireccionalmente (Sadhale y Platt, 1992). Se ha postulado la influencia de estructuras de RNA secundaria para postular el procesamiento bidireccional de estos y otros genes (Irniger *et al.*, 1991). Nuestros experimentos con mutaciones puntuales y deleciones indicaron que este no parece ser el caso de *FBP1*.

Las deleciones seriadas indican que la secuencia $(TA)_n$ es el principal elemento de eficiencia en ambas orientaciones. La capacidad de poliadenilación de 397D2 en ambas orientaciones en comparación con 397D3 indicaba que la presencia del hexanucleótido TATATA, de naturaleza simétrica, estaba implicado en el procesamiento en ambas direcciones. Por lo tanto el principal candidato para explicar la bidireccionalidad de la secuencia poli(A) de *FBP1* era el elemento $(TA)_n$. Curiosamente un terminador parecido, el de *GAL7*, que también posee un elemento de eficiencia rico en TA, resultó ser unidireccional (Abe *et al.*, 1991). Los resultados con el fragmento 144 en orientación inversa indicaban que dicho fragmento era más sensible a la pérdida de pares TA que el fragmento 397, lo que indica que en orientación inversa funcionan secuencias en 3' del fragmento (situadas en 5' en estos ensayos) que pueden ayudar a la bidireccionalidad en orientación inversa. Puede ocurrir por tanto que la bidireccionalidad sea debida al carácter simétrico del elemento TATATA pero requieren además un determinado entorno.

De acuerdo con esto existen dos elementos implicados en la poliadenilación *in vivo* en orientación directa: el elemento de eficiencia $(TA)_n$ y los alrededores del sitio poli(A). En orientación inversa la señal parece contener tres partes: el elemento $(TA)_n$, los alrededores de los sitios poli(A) y un elemento estimulante en 5'. No encontramos evidencia clara que indique la presencia del elemento posicionador propuesto para *CYC1* (Russo *et al.*, 1993; Guo y Sherman, 1995).

2.4.- Determinación de las secuencias implicadas en el procesamiento *in vitro* del preRNA de *FBP1*

Durante los pasados años varios laboratorios han desarrollado sistemas de procesamiento *in vitro* para determinar las secuencias o los factores implicados en el evento de la poliadenilación (Buttler y Platt, 1988; Butler *et al.*, 1990; Chen y Moore, 1992). En este trabajo se ha aplicado esta metodología para determinar que secuencias de *FBP1* estaban implicadas en la poliadenilación *in vitro*. Esta estrategia nos permitió comparar los datos *in vivo* con los *in vitro* y obtener mas información acerca del efecto de las diversas modificaciones de secuencia.

Se realizaron dos aproximaciones para este tipo de experimentos. Una de ellas se basa en la preparación de extractos totales de proteínas de levadura y la posterior incubación con un RNA precursor transcrito *in vitro* por una polimerasa fágica en presencia de ^{32}P -UTP, de manera que queda homogéneamente marcado. Durante el procesamiento se producía un corte en el precursor seguido de la poliadenilación del mismo. Alternativamente se puede incubar el

preRNA con combinaciones de factores parcialmente purificados implicados en cada una de las partes del proceso. Los productos que se producen en este tipo de reacciones se separan en un gel desnaturalizante, dando lugar a un patrón de bandas tal y como el que se explica en la Figura 21. El uso de cada una de las alternativas depende de la capacidad del sustrato para ser procesado *in vitro* en cada caso.

2.4.1.- Estudios con extractos totales

La primera alternativa que se probó fue el corte y poliadenilación de mRNA precursores en presencia del extracto de proteínas celulares. Los resultados se muestran en la Figura 22. El vector de transcripción se digirió con una enzima de restricción que cortó en 3' respecto a la secuencia a probar y se transcribió con una polimerasa fágica hasta que el fragmento de DNA definido por el corte acaba, produciendo un precursor de longitud definida. Los fragmentos de interés se clonaron en el vector transcripcional pT7T318U, denominándose pIVP más la longitud de la secuencia de *FBP1* clonada. El primer sustrato a probar fue el fragmento 397 completo, digiriéndose para ello el plásmido pIVP397 que lo contiene con la enzima *HindIII* y transcribiéndolo con la RNA polimerasa del fago T7. Este fragmento contiene todas las secuencias implicadas en la poliadenilación *in vivo*, pero sorprendentemente fue completamente ineficiente en el procesamiento *in vitro* en orientación directa (Figura 22), al contrario del control positivo, un precursor con la señal de poliadenilación de *GAL7*. Esto podía debido a la excesiva longitud del transcrito probado por 3' (se suelen emplear fragmentos de 100 a 150 nucleótidos de longitud; Sadhale y Platt, 1992), o a la carencia de secuencias por 5' (en este sustrato hay 132 nucleótidos antes del sitio poli(A), y en *GAL1* se requiere más de 189 y menos de 400 y en *GAL10* más de 120 y menos de 300; Sadhale y Platt, 1992). Otras posibilidades son la formación de estructuras secundarias de RNA inhibitorias o a un efecto inhibitorio a nivel de la ORF YLR376c situada inmediatamente después. Esta última posibilidad parecía la mas plausible, ya que al transcribirse toda la secuencia e incubarse con un extracto total, cabría la posibilidad de que las secuencias implicadas en la iniciación de la traducción del YLR376c, que se deben encontrar muy próximas, si no solapantes con las de poliadenilación, fuesen copadas por factores implicados en este proceso, imposibilitando la formación del complejo de poliadenilación.

Posteriormente se probó un fragmento menor, el procedente de la delección 3'-144, que contiene todas las secuencias suficientes para el procesamiento *in vivo* en la orientación directa, pero con pocos nucleótidos más allá del punto de poliadenilación. El plásmido pIVP144 fue cortado con *HindIII* y transcrito por la polimerasa de T7, lo cual producía un transcrito con pocos nucleótidos después del sitio de corte (Figura 23A). Ese transcrito fue procesado con una eficiencia del 61%, produciéndose exclusivamente producto poliadenilado y nada de producto de corte, como es habitual en este tipo de extractos (Figura 23B). Esto no es una simple adición de A al final del precursor, considerando la longitud del precursor. Además cuando se realizaron las pruebas con factores de corte purificados (ver más adelante), el corte se produjo de manera

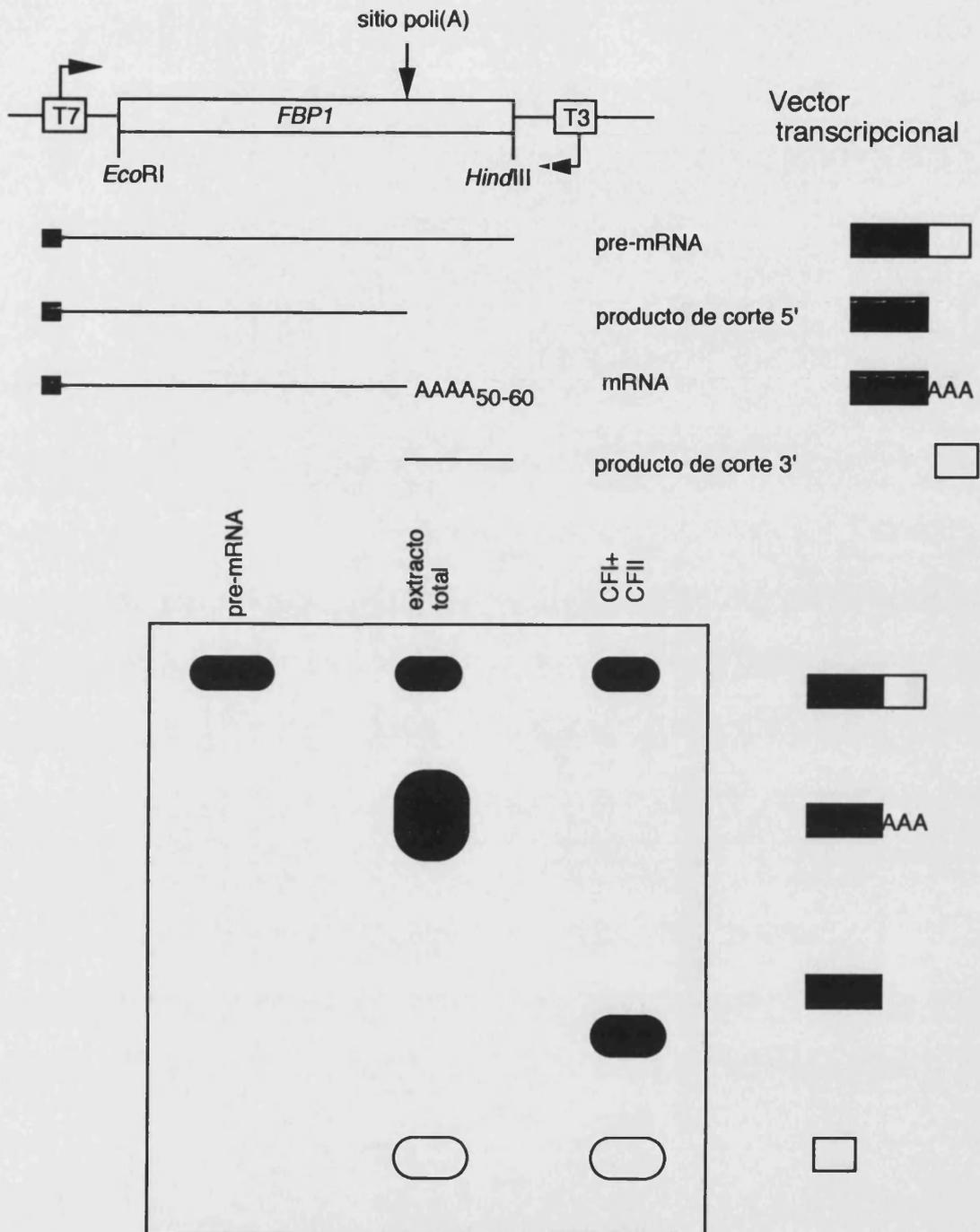


Figura 21.- Esquema de los experimentos de procesamiento *in vitro*. En la parte superior se esquematiza el vector transcripcional y todos los posibles productos del procesamiento. En la parte inferior se muestra un diagrama de como se resuelven dichos productos en un gel de poliacrilamida desnaturalizantes según el tipo de reacción a que se somete el pre-mRNA. El producto de corte 3' se degrada rápidamente y habitualmente no se detecta.

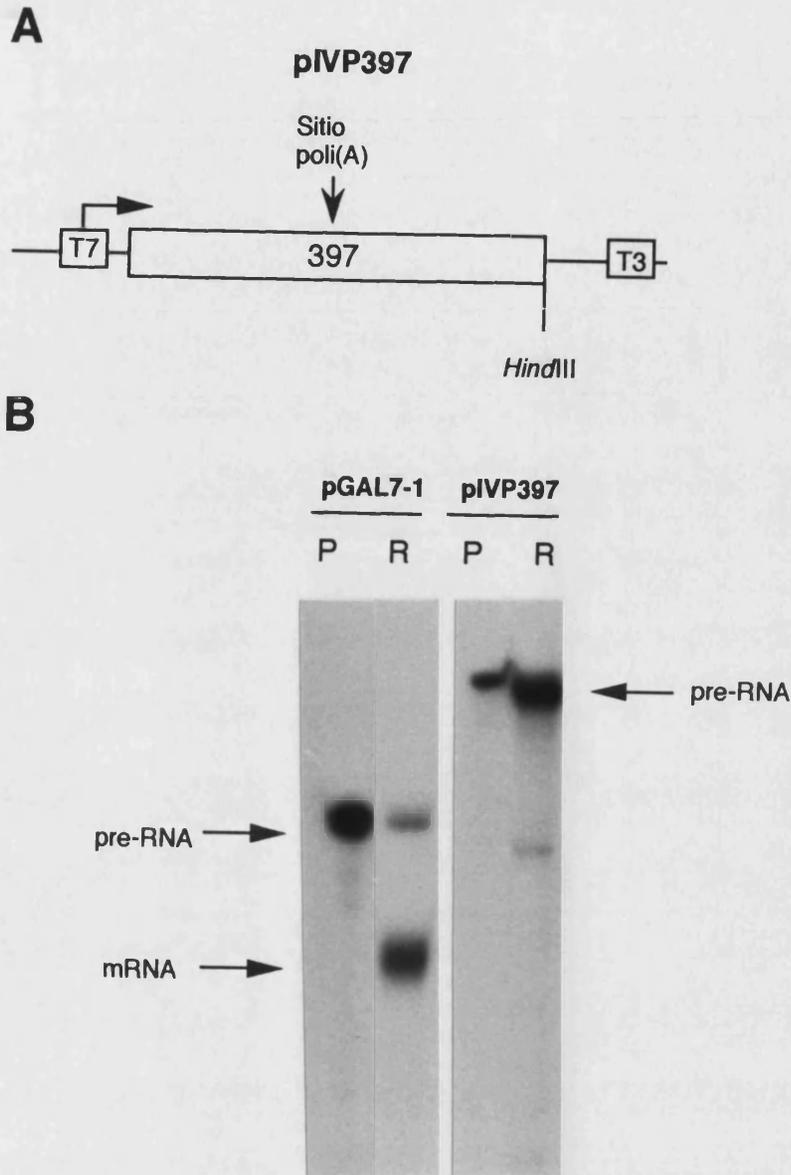


Figura 22.- Análisis de la poliadenilación *in vitro* usando el vector pIVP397. (A) Esquema del plásmido indicando el sitio de poliadenilación *in vivo* y el origen de la transcripción del promotor T7 y fin de la misma en el sitio *HindIII*. (B) Experimento de procesamiento *in vitro*. Como control positivo se utilizó el plásmido pGAL7-1, conteniendo la señal poli(A) del gen *GAL7*, cortado con *AvaI* y transcrito con la polimerasa T3. Se digirió pIVP397 con *HindIII* y se transcribió con T7. Los productos del procesamiento se migraron en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 5%.

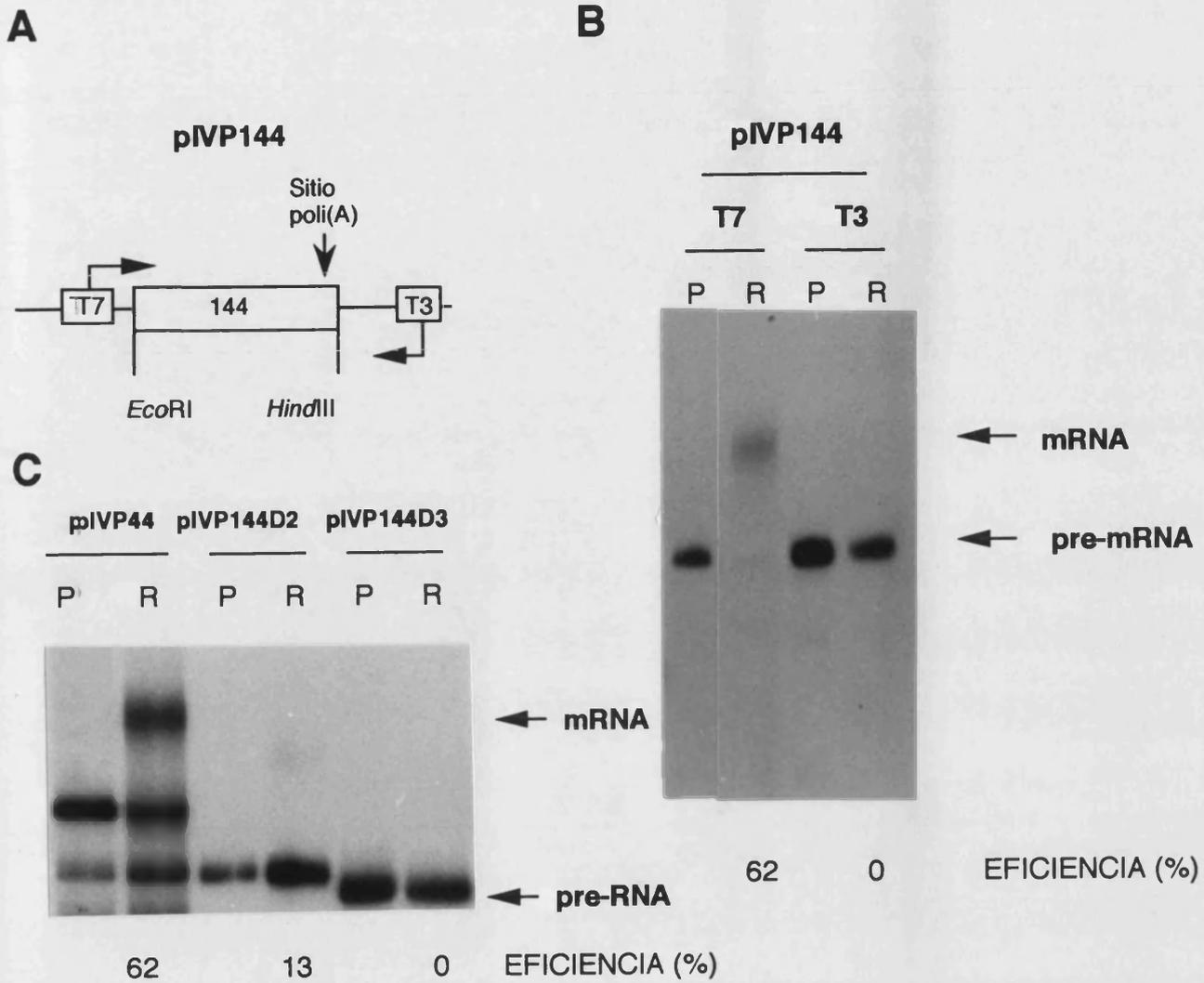


Figura 23.- Análisis de la poliadenilación *in vitro* con extractos celulares totales usando el vector pIVP144 y sus derivados D2 y D3. (A) Esquema del plásmido indicando la estrategia seguida para producir el precursor. Se marca el sitio de poliadenilación en la orientación directa. (B) Experimento de procesamiento *in vitro*. T7 indica que la transcripción se ha realizado con esa polimerasa después de cortar el vector de transcripción con *HindIII*. T3 indica lo propio referido a la polimerasa T3 y la enzima *EcoRI*. Al pie de la foto se indica el porcentaje de precursor que ha sido transformado en producto poliadenilado. En todos los casos los datos sobre la eficiencia de procesamiento son la media de tres reacciones independientes. (C) Mismo experimento que en la carrera T7 de la sección B, pero incluyendo las deleciones D2 y D3 realizadas sobre el fragmento 144. Condiciones descritas en la Figura 22.

correcta. Cuando se transcribió el plásmido pIVP144 en orientación inversa, utilizando como enzima de corte *EcoRI* y como polimerasa la RNA polimerasa del fago T3, no se produjo procesamiento, lo que indicó que la bidireccionalidad tan eficiente encontrada *in vivo* no se producía *in vitro*. Este comportamiento no es común a todos los genes de levadura, donde se dan todas las combinaciones posibles. El caso de *FBP1* es exactamente el opuesto al que ocurre en el gen *GAL7*, en el cual la señal de poliadenilación es unidireccional *in vivo* (Abe *et al.*, 1991) y bidireccional *in vitro* (Sadhale y Platt, 1992). *ADH2* por el contrario funciona bien *in vivo*, pero muy pobremente *in vitro*, tal como le ocurre a *FBP1* (Hyman *et al.*, 1992). Otros genes como *ACT1*, *YPT1* y *ADH1* funcionan correctamente en ambas orientaciones *in vivo* e *in vitro* (Heidmann *et al.*, 1992).

Con el extracto total se puede detectar el producto de corte si se realiza la reacción en presencia de cordicepina (3'-dATP) o de CTP en lugar de ATP. En este tipo de ensayo y con este precursor, ambos nucleótidos resultaron incapaces de inducir sólo corte (datos no mostrados) por lo que se utilizaron factores de corte purificados para ver el proceso de corte sin poliadenilación (ver más adelante).

El sistema *in vitro* pudo ser utilizado además para obtener más información acerca de la secuencia (TA)_n. Se realizó el procesamiento con extracto total del plásmido pIVP144 portando las deleciones D2 y D3 en orientación directa. Como se muestra en la Figura 23D, el pIVP144D2 cortado con *HindIII* y transcrito con la RNA polimerasa de T7 mostró una reducción del procesamiento hasta el 13%. En estas condiciones de procesamiento el hexanucleótido TATATA no aportó una eficiencia de procesamiento semejante a la que presenta *in vivo*. En el precursor derivado de pIVP144D3 no existió traza de procesamiento. Por lo tanto parece claro que la secuencia (TA)_n se comporta con el elemento principal de eficiencia en estas condiciones de procesamiento. Parece ser que dicha secuencia repetitiva presenta un efecto aditivo: cuanto más repeticiones TA hay, mayor es la eficiencia. La redundancia de señales ya ha sido propuesta para otros genes, como el *CYC1* (Guo *et al.*, 1995) y *GCN4* (Egli *et al.*, 1995). Es sugerente pensar que existe un factor que reconozca la secuencia TATATA como unidad elemental de la secuencia de eficiencia. Si la secuencia posee más de una de estas secuencias, más factores se pueden unir, estimulando en mayor medida el procesamiento. Puede incluso que la unión de uno de estos factores tenga un efecto cooperativo, estimulando la unión de otros factores similares, estableciendo sobre el RNA precursor un complejo de procesamiento más estable. En dicho extracto total existen muchas actividades nucleasas, tal y como indica la degradación total del fragmento 3' carente de caperuza que se produce durante el corte de todos los precursores de los genes probados en este sistema hasta ahora. El hecho de que no se vea una degradación mayor del transcrito portador de la mutación D3 respecto de la secuencia salvaje viene a apoyar la idea de que dicha deleción no disminuye la estabilidad del transcrito que la porta, aunque por supuesto no existe la certeza de que en dicho extracto total estén presentes todas las actividades ribonucleasas presentes *in vivo*.

2.4.2.- Estudio con factores de corte purificados

Se probó otro procedimiento alternativo: el procesamiento de precursores en presencia de factores de corte (CFI y CFII) parcialmente purificados. Los resultados de estos experimentos se muestran en las Figuras 24 y 25. El primer sustrato a probar fue el derivado del plásmido pVP397 digerido con *DraI* y transcrito por la polimerasa T7. Esta enzima corta dentro de la secuencia de *FBP1*, produciendo un preRNA con 199 nucleótidos correspondientes al gen en orientación directa (Figura 24A). Poseía más secuencia que las delecciones 3'-144 y 3'-161, que muestran un procesamiento óptimo *in vivo*, proporcionando bastante secuencia propia del gen entre el sitio de corte y el final del transcrito. Hay un único producto de corte consistente con el procesamiento en el sitio poli(A) principal (Figura 24B). La eficiencia de corte en este sitio fue del 50%. El sustrato obtenido al cortar pVP144 con *HindIII* produce en esas condiciones el mismo producto de corte con eficiencia similar, por lo que los resultados obtenidos con extracto total con este sustrato y derivados representan un procesamiento *bona fide*.

El siguiente paso consistió en el estudio del mismo transcrito, pero careciendo de la secuencia (TA)_n completa. Para ello se transcribió el vector pVP397D3 (Figura 24B). Hubo una caída del procesamiento a un 8%, sin cambio en el sitio de corte (la diferencia de tamaño es la correspondiente a la eliminación de las 28 pb en D3). Existen otros elementos no identificados diferentes de la secuencia (TA)_n que están implicados en la elección del sitio poli(A). De acuerdo con este resultado, la repetición (TA)_n se encuentra implicada en la eficiencia en el procesamiento, revelándose como el elemento de eficiencia que reconocen los factores de corte, posiblemente la proteína Rna15p de CFI. La falta de consenso de poliadenilación en levadura y la probable implicación de la misma maquinaria en el procesado de todos los mensajeros indica que el reconocimiento no debe ser completamente específico. Curiosamente la presencia de otros consensos en 5' de la región eliminada no es suficiente como para restaurar la capacidad de poliadenilación tanto con extractos totales como con factores purificados. Esta claro que dichos consensos son muchas veces necesarios, pero nunca suficientes. Es difícil determinar que entornos de secuencia, estructuras de RNA o que combinaciones con otros elementos, posicionadores y sitio poli(A), hacen que una secuencia consenso funcione como elemento de eficiencia o no. En la secuencia poli(A) de *FBP1* existe una jerarquización de secuencias consenso entre las cuales la derivada del hexanucleótido TATATA es la más efectiva. No se pudo determinar porqué la eliminación de dicha secuencia y la consiguiente aproximación de los consensos en 5' al sitio poli(A) no produjo una restauración de la capacidad de procesamiento. Es posible que secuencias de eficiencia específicas necesiten trabajar en coordinación con elementos posicionadores específicos.

Se usó la misma estrategia con las dos delecciones por 5' más significativas: 307 y 328. Los plásmidos pVP307 y pVP328 fueron cortados con *DraI* y transcritos con la polimerasa T7. Ambas dieron un doblete muy próximo (Figura 24B), con una eficiencia cercana a la del tipo

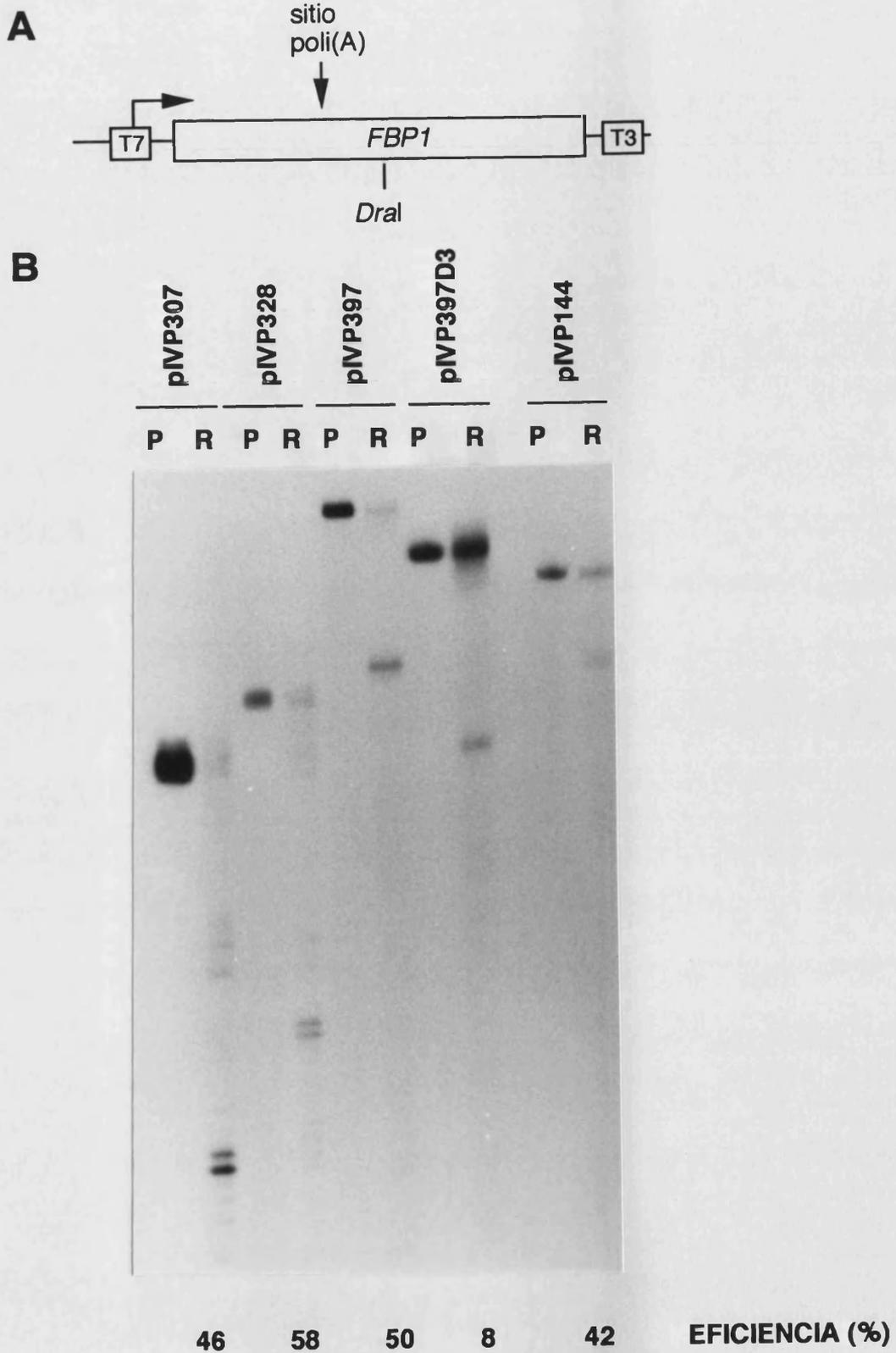


Figura 24.- Análisis de la poliadenilación *in vitro* con factores de corte purificados usando el vector pIVP397 y su derivado D3 y las deleciones por 5' 307 y 328. También se indica el procesamiento con CFs del precursor de pIVP144 descrito en la figura 23. (A) Esquema de la estrategia seguida para producir los precursores. (B) Resultado del procesamiento. Condiciones descritas en la figura 22.

salvaje (46% en pIVP307 y 58% en pIVP328). Respecto al sitio de corte, el hecho de que se vea un doblete puede estar relacionado simplemente con una mayor resolución de ambas bandas debido a su pequeño tamaño, por lo que no se puede descartar que en el fragmento salvaje el corte también de un doblete difícil de apreciar. El sitio de corte se mapeo unas 10 pb en 5' respecto a la salvaje en ambos casos. Dicha diferencia no parece significativa debido a la diferencia de tamaño, por lo que se consideró que el sitio de procesamiento coincidía en todos los casos. Siendo esto así, en estas condiciones las secuencias en 5' de la repetición (TA)_n (TAG...TATGT o A₁₁) y la totalidad de las repeticiones TA carecían de importancia en la elección del sitio de corte. Eso indicaría que el elemento posicionador se encuentra entre la repetición (TA)_n y el sitio poli(A), o que no existe en absoluto, y que un elemento de eficiencia muy fuerte y un sitio poli(A) pueden ser suficientes para producir procesamiento *in vitro*. Respecto a la eficiencia de corte el resultado es diferente a lo encontrado *in vivo*, donde se vio una caída en la eficiencia al pasar de 328 a 307 al eliminar la primera parte de la repetición de TA. Parece que esta pérdida es indiferente a los factores de corte a la hora de producir el reconocimiento del precursor de RNA. La mayor concentración de factores en las fracciones purificadas puede compensar la reducción en pares TA. Alternativamente la diferencia producida entre ambos ensayos puede deberse a la acción positiva o negativa de las secuencias del vector que en la delección 5'-307 se acercan a la secuencia de TA restante. En cualquier caso los consensos en 5' (TAG...TATGT o A₁₁) resultan tan prescindibles como ocurría *in vivo*.

Para estudiar las delecciones por 3' utilizando CF purificados, los vectores de transcripción *in vitro* fueron cortados con *PvuII*, que corta dentro del plásmido, proporcionando a todos los precursores secuencias 3' adicionales comunes (Figura 25A). Se encontró en pIVP144 en orientación directa una eficiencia del 42%, similar al 50% producido por pIVP397, con el mismo producto de corte (Figura 25B). Por lo tanto, al igual que *in vivo*, las secuencias en 3' respecto del sitio poli(A) no son determinantes en el corte. En pIVP122, donde el sitio de corte mayoritario en el gen salvaje y sus alrededores son eliminados se produce una bajada ligera en el procesamiento (32%), comparable a la que se producía *in vivo*. El sitio de corte se ha desplazado en dirección 5', cayendo todavía dentro de la secuencia de *FBP1*. *In vivo*, la mayoría de los sitios de poliadenilación caían dentro de la secuencia adyacente de *ADH1* (Tabla III). En este caso las secuencias procarióticas situadas en el vector de transcripción pudieron inhibir de alguna manera el corte, desplazándolo hacia regiones más en 5'. En pIVP144 se encontró una eficiencia de 30% y un desplazamiento similar del sitio de corte, que se hizo menos definido, hacia 5', similar al caso anterior. A diferencia con lo acontecido *in vivo*, la caída de eficiencia entre 122 y 114 fue apenas perceptible, aunque si pareció alterar la elección del sitio de corte. En pIVP94 la situación fue diferente. Existió un 15% de procesamiento en una banda desplazada hacia 5', siguiendo con el patrón de desplazamiento del sitio de corte y disminución de la eficiencia. La diferencia fue la aparición de una banda de corte más intensa situada en 3', ya dentro de la secuencia del vector, a una distancia sólo ligeramente superior a la que se produce el corte en el sitio salvaje. Este resultado viene a indicar que la ausencia del

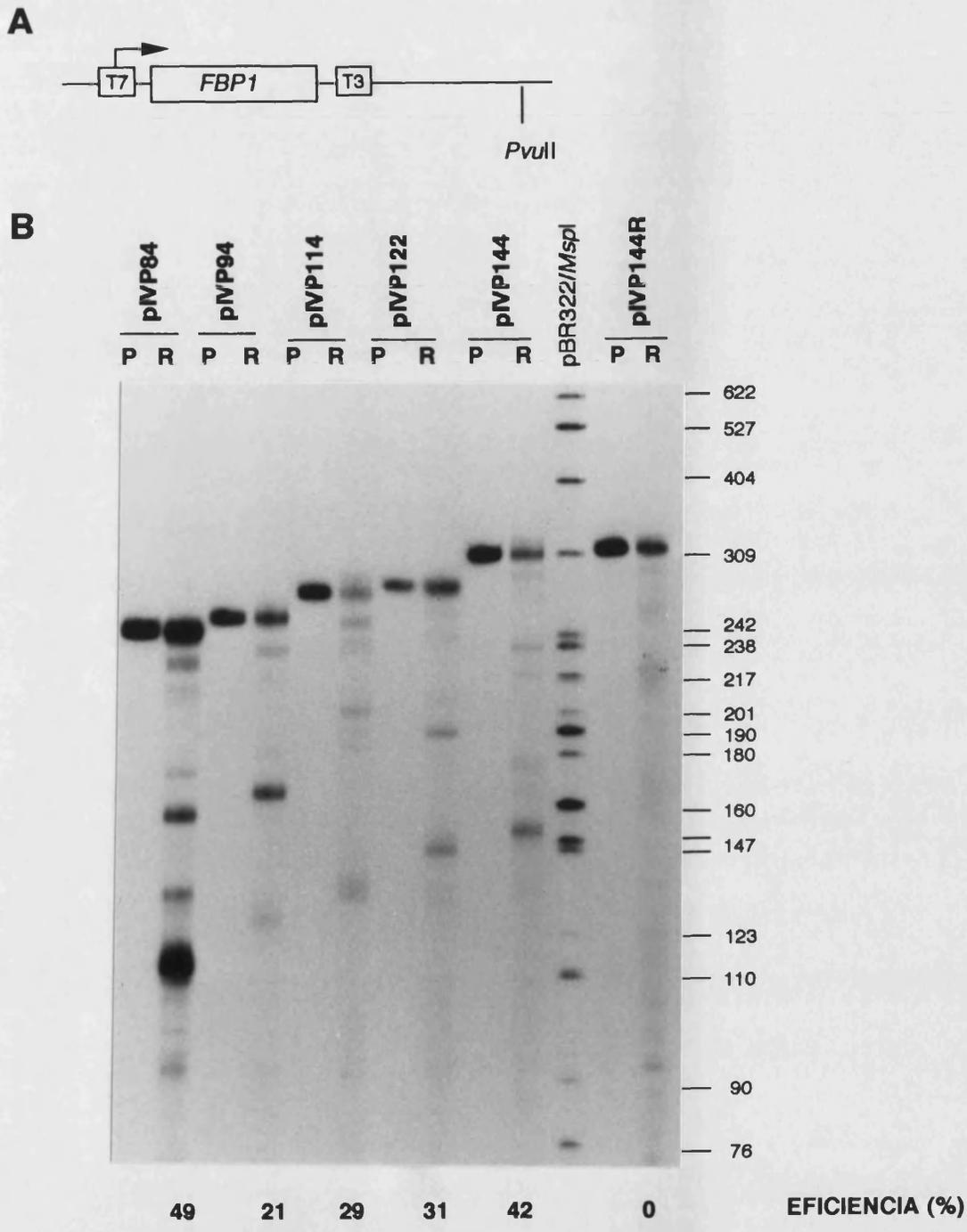


Figura 25.- Análisis de la poliadenilación *in vitro* con factores de corte purificados y utilizando los vectores con las deleciones por 3'. También se indica el procesamiento con CFs del precursor de pVP144R, consistente en el fragmento 144 clonado en pT7T319U en lugar de pT7T318U y transcrito por la polimerasa T3. (A) Esquema de la estrategia seguida para producir los precursores. (B) Resultado del procesamiento. Condiciones descritas en la figura 22. Se indica el tamaño del patrón pBR322/MspI.

sitio de corte natural es reemplazada por la aparición fortuita de un sitio críptico, y que mientras que existan repeticiones TA, se producirá un procesamiento eficiente siempre que haya un sitio de poliadenilación adecuado a una distancia apropiada.

Estos resultados de bajada progresiva de la eficiencia conforme se eliminan secuencias por 3' estaban en buena correlación con los resultados producidos *in vivo*. En el caso del precursor derivado del plásmido pIVP84, la correlación se rompió. Se produjo un corte con una eficiencia similar a la producida por el fragmento completo (49%) en un sitio inmediatamente después de lo que queda de repeticiones TA, aparecido crípticamente posiblemente por combinación de secuencias de *FBP1* y del vector de transcripción. Persiste el sitio de corte críptico presente en pIVP94, pero con una intensidad menor. Como ocurre en el caso de las deleciones por 5', una sola porción de la secuencia $(TA)_n$ es capaz de producir un procesamiento efectivo, siempre que cuente con un sitio de poliadenilación apropiado.

El fragmento 3'-144 clonado en orientación inversa en el vector pT7T319U (pIVP144R), cortado con *PvuII* y transcrito con polimerasa de T7. No mostró procesamiento en el sitio esperado, lo que confirma el resultado de que esta secuencia de poliadenilación no es bidireccional *in vitro*, ni con extracto total ni con factores de corte purificados. También indica que la repetición de TA *per se* es incapaz de producir corte, por lo que el entorno en que se encuentra el elemento de eficiencia es crucial para producir un procesamiento eficiente.

Se observa que existía discrepancia entre algunos datos obtenidos *in vivo* con algunos de los obtenidos *in vitro*. Varias explicaciones se pueden dar para explicar algunas de estas discrepancias, aunque se carece por el momento de datos que apoyen alguna de las posibilidades. Es posible que los extractos sean deficientes en algún/os factor/es que module/n el reconocimiento de los elementos de la señal de poliadenilación, o que las proporciones respecto a otros integrantes de la maquinaria de procesamiento estén aumentadas o disminuidas. En los extractos totales existía una mayor eficiencia de procesamiento cuanto mayor era la longitud de la secuencia $(TA)_n$, mientras que en los experimentos con factores purificados la eficiencia era la misma aunque se eliminase la mitad de esta secuencia (obteniéndose un procesamiento aún mayor que *in vivo*). Pudiera ser que algún componente que estuviese disminuido en los extractos totales esté en exceso en los factores purificados. Otra explicación alternativa es que exista un vínculo entre el proceso de la transcripción y el procesamiento. Algunos factores implicados en la maduración pueden estar asociados a la RNA pol II o al DNA transcrito, por lo que secuencias que sean más eficientemente procesadas *in vivo* no lo sean tanto en este sistema *in vitro* en el que no se da ese acoplamiento. Por ejemplo, si el factor que reconoce el hexanucleótido TATATA se encuentra asociado a la RNA polimerasa y reconoce la secuencia en cuanto es transcrita, eso explicaría porqué el sustrato 144D2 funciona mejor *in vivo* que *in vitro*. Por último, un factor difícil de definir es la implicación positiva o negativa de estructuras de orden superior del pre-RNA en el reconocimiento del mismo por parte de los factores. En los ensayos *in vitro*, el RNA está libre de proteínas, de manera que es plausible pensar que el plegamiento obedece a parámetros termodinámicos y/o

cinéticos. *In vivo*, los RNA emergentes se asocian rápidamente con proteínas formando agregados ribonucleoproteicos cuya estructura secundaria es imposible determinar *a priori*.

De todos los resultados *in vitro* se pudo extraer varias conclusiones. En primer lugar que es la repetición (TA)_n, y no otras secuencias, la que proporciona la procesabilidad *in vitro*. Podemos afirmar que los resultados de la delección D3 *in vivo*, la pérdida de los niveles de mensajero, es debida a una carencia en el procesamiento, o a un procesamiento incorrecto que hace que los mensajeros no sean maduros y se degraden rápidamente, y no a una menor estabilidad de los mensajeros maduros. Se necesita de un sitio de poliadenilación a una distancia adecuada para que se produzca el procesamiento. No se han detectados elementos definidos adicionales para el procesamiento, pero parece claro que los situados en 5' de (TA)_n carecen de implicación importante para el procesamiento. Finalmente, en los procesamientos *in vitro*, la secuencia de poliadenilación es unidireccional, a diferencia de lo que ocurre *in vivo*.

2.5.- Terminación de la transcripción en el gen *FBP1*

Un aspecto no por desconocido menos interesante en el proceso de formación del extremo 3' en levadura es la relación entre la poliadenilación y la terminación de la transcripción (es decir la parada de la RNA polimerasa y disociación del complejo ternario formado por polimerasa, RNA y DNA). Se acepta que ambos procesos están acoplados en eucariotas superiores. La prueba evidente de este hecho es que la inactivación de la secuencia consenso de poliadenilación AATAAA afecta a la terminación de la transcripción (Proudfoot, 1991). El modelo más convincente para explicar este acoplamiento postula que en primer lugar la secuencia AATAAA dirige el procesamiento del transcrito emergente. Posteriormente el fragmento en 3' del corte, sin caperuza en 5', es reconocido por una exoribonucleasa y una RNA-DNA helicasa que juntas degradan el RNA causando desestabilización en el complejo ternario y la posterior disociación de la polimerasa (Connely y Manley, 1988; Proudfoot, 1989). De acuerdo con este modelo se necesita una señal de poliadenilación y un sitio de pausa para producir el proceso completo y así evitar la interferencia transcripcional o la oclusión del promotor del gen en 3'.

En levadura hay muy poca información acerca del proceso de terminación. El mecanismo de corte y poliadenilación es básicamente el mismo que en eucariotas superiores (Butler y Platt, 1988), por lo que también es posible que exista un acoplamiento entre procesamiento y terminación de la transcripción. La delección del consenso de poliadenilación del gen *CYC1* elimina la terminación de la transcripción (Russo y Sherman, 1989; Russo, 1995), lo que indica que para terminar la transcripción se necesita una señal de poliadenilación efectiva. Sin embargo en otros casos, como el *GAL7*, no es así (Hyman y Moore, 1993).

2.5.1.- Estudio de la terminación de la transcripción mediante interferencia transcripcional

Para determinar la capacidad de terminación de la región 3' de *FBP1* y su acoplamiento con el proceso de poliadenilación, se probaron varias de las secuencias cuya capacidad de poliadenilación ha sido ensayada en un plásmido diseñado para determinar que secuencias inducen terminación de la transcripción. Dicho plásmido es el pNN363 (Snyder *et al.*, 1988; Figura 26A). Es un plásmido centromérico, es decir de copia única, cuya principal característica es que la secuencia ARS causante de su replicación se encuentra bajo el control del promotor inducible del gen *GAL10*. En presencia de galactosa en el medio de cultivo se induce una transcripción intensa a partir de ese promotor, produciéndose una interferencia entre las moléculas de RNA polimerasa y los elementos implicados en la función del ARS, de manera que el plásmido se hace inestable. En presencia de glucosa en el medio no existe transcripción a través del ARS y el plásmido es estable. Si entre el promotor *GAL10* y el ARS se sitúa una secuencia que produzca terminación de la transcripción, las polimerasas que inician la transcripción desde el promotor en presencia de galactosa se verán bloqueadas, y el plásmido será estable. Hemos utilizado para estimar la pérdida de plásmido el método de las medias colonias (ver Materiales y Métodos). Dicho método es incapaz de detectar diferencias en los casos en que la pérdida es muy grande, pero sólo muestra un 4% de desviación respecto a los métodos de crecimiento en medio líquido (Snyder *et al.*, 1988), que son mucho más tediosos. Como se verá, la mayoría de los fragmentos probados tenían gran capacidad de terminación, por lo que el ensayo se convirtió prácticamente en una prueba de todo o nada, resultando las diferencias entre insertos escasamente significativas.

Los resultados obtenidos clonando secuencias de *FBP1* se muestran en la Figura 26B. Como se ve la diferencia de estabilidad en medio con glucosa y en medio con galactosa del plásmido sin inserto es muy abultada. Los plásmidos derivados de pNN363 se denominan pTER+número de pb de *FBP1* del inserto. En primer lugar probamos la secuencia de 397 pb completa en orientación directa. Como se puede ver, esta secuencia además de contener una señal de poliadenilación muy fuerte fue capaz de inducir la terminación de la polimerasa eficientemente, ya que la estabilidad es comparable en glucosa y galactosa. Posee una gran cantidad de secuencia específica de la región 3' respecto a la secuencia codificante de *FBP1* (unos 250 pb) después del sitio poli(A), incluyendo una parte de la ORF posterior YLR376c, por lo que cabe suponer que la parada de la polimerasa se produzca dentro del fragmento insertado, ya que la terminación en levadura se produce cerca del sitio poli(A) (dentro de los siguientes 100 pb en *CYC1*; Russo y Sherman, 1988).

En la orientación inversa la pérdida de plásmido por generación en presencia de galactosa volvió a ser comparable a lo observado en presencia de glucosa. Por lo tanto la terminación es también plenamente satisfactoria en este caso. Como se recordará dicho fragmento en orientación inversa poseía una buena capacidad de poliadenilación, solo ligeramente inferior a la del fragmento en orientación directa. No obstante los puntos de poliadenilación se encuentran al final del fragmento (recuérdese que algunos se mapeaban

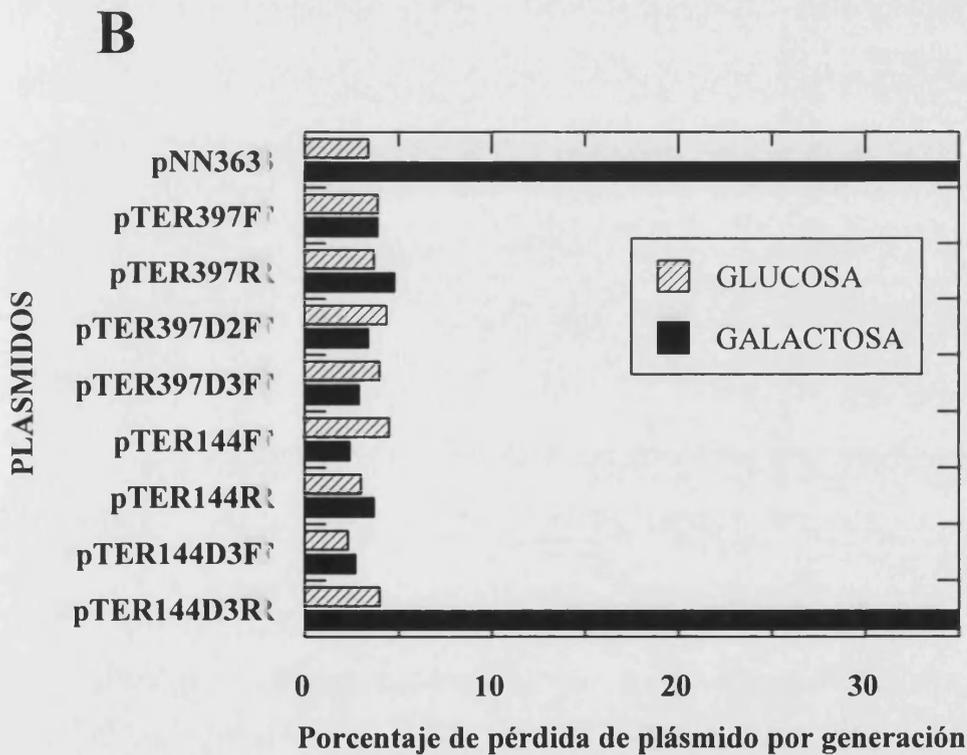
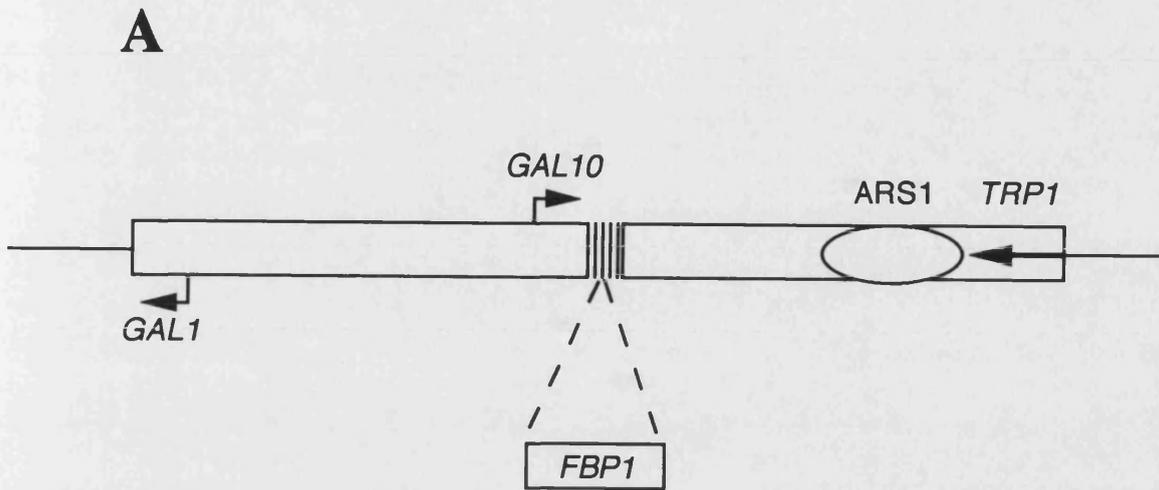


Figura 26.- Estudio de la terminación de la transcripción en el gen *FBP1* utilizando el plásmido pNN363. (A) Esquema del plásmido pNN363. Se indican los elementos implicados en el ensayo y el lugar de clonación de los fragmentos de *FBP1* a probar. (B) Estabilidad de los minicromosomas medida mediante análisis de colonias con hemisectores. Se crecieron sin selección células conteniendo los plásmidos indicados en ordenadas en medios conteniendo glucosa o galactosa y se transfirieron a placas equivalentes. Se contaron varios cientos de colonias y se contabilizó el porcentaje de colonias mitad rojas-mitad rosas frente al total de colonias rosas

dentro de la secuencia del sitio de clonación múltiple, fuera ya de la secuencia de *FBP1*), por lo que no se puede asegurar que la parada de la polimerasa ocurra en todos los casos dentro del fragmento insertado.

Una vez probado el inserto completo, se ensayaron algunas de las deleciones seriadas e internas. En primer lugar se introdujeron las deleciones internas D2 y D3 sobre el inserto de 397 pb. Como se ve en la Figura 26B, ambas deleciones no afectan a la capacidad de inducir la terminación de la transcripción del inserto completo. La deleción D2 poseía una buena eficiencia de procesamiento, con un ligero desplazamiento de algunos puntos de corte hacia 3'. Estos datos parecen indicar que, al igual que en *CYC1*, mientras exista un buen procesamiento se producirá terminación. Como ya se sabe el comportamiento de el fragmento 397D3 en poliadenilación es complejo. Sabemos que muestra una capacidad de procesamiento afectada, tal y como vimos en nuestros experimentos *in vitro*. *In vivo* existía una caída de los niveles del transcrito truncado, sin el correlativo aumento de los transcritos *entero*. Con este resultado se muestra que la transcripción no prosigue normalmente hasta la secuencia ARS, al igual que en los ensayos con el plásmido pVPA397 no llegaba hasta la secuencia de poliadenilación de *ADH1*. Por lo tanto el fragmento 397D3 es capaz de inducir la terminación de la transcripción, pese a tener mermada su capacidad de procesamiento. Si la estructura secundaria de la secuencia d(TA)_n tuviera alguna implicación en la terminación, la progresiva eliminación en D2 y D3 hubiera acarreado una disminución correlativa de la capacidad de inducir terminación. Como este no es el caso se puede afirmar que la estructura, tanto a nivel de DNA como a nivel de RNA, de la repetición alternante de TA carece de influencia en la terminación. Deben existir otros determinantes en la secuencia de poliadenilación diferentes de (TA)_n capaces de inducir terminación.

La siguiente secuencia ensayada fue la deleción 3'-144. En orientación directa esta secuencia produce una poliadenilación eficaz, careciendo de secuencia de *FBP1* más allá del punto de poliadenilación. *A priori* era interesante porque se eliminaba cualquier hipotético sitio de pausa en 3'. Dicho fragmento presentó un funcionamiento óptimo. Por lo tanto se confirma que para una terminación eficiente se necesita una señal de poliadenilación eficiente. En este caso tan es así que se puede afirmar que una secuencia de poliadenilación eficiente no necesita necesariamente de un sitio de pausa para producir terminación. No podemos descartar que entre el sitio de clonación del inserto y la secuencia ARS exista algún sitio de pausa, pero el hecho de que el plásmido sin inserto no presente ninguna protección del ARS frente a la transcripción de *GAL10* indica lo contrario. Una deleción similar realizada en el gen *CYC1* en la que se elimina la secuencia inmediatamente posterior al sitio de poliadenilación es incapaz de inducir terminación en un sistema parecido (Russo y Sherman, 1989). En el vector desarrollado por estos autores es el centrómero y no el ARS el que está bajo el control del gen *GAL1*. La diferencia entre ambos caso puede ser que en este último caso la distancia entre la secuencia insertada y el centrómero es muy corta, de 33 pb. mientras que en el ensayo que nosotros aplicamos existe una distancia apreciable entre el inserto y la secuencia ARS (más de 350 pb entre el sitio de clonación múltiple y el consenso ARS). El mismo fragmento era capaz de

producir terminación de la transcripción, tal como se vio en el efecto que causa en nivel de superenrollamiento de un plásmido que lo porta (Osborne y Guarente, 1988), indicando que la presencia de secuencias específicas no son necesarias para que se produzca terminación en este gen. Si aceptamos el modelo de terminación en el cual la terminación está inducida por el procesamiento, si el procesamiento es muy rápido y los factores implicados en terminación (helicasa y/o nucleasa) son más veloces que la RNA polimerasa, es sólo una cuestión de tiempo (reflejado en una distancia determinada en DNA) que el posible complejo de terminación alcance a la maquinaria transcripcional, desestabilizándola. Por lo tanto una separación grande, aunque sea de secuencia inespecífica y sin capacidad de pausa, entre el sitio de corte y el elemento implicado en la estabilidad del plásmido puede favorecer que se produzca terminación antes de llegar al centrómero o al ARS. En un genoma tan compacto como levadura es de esperar que se minimice la distancia a la que pare la polimerasa, ya que la posibilidad de introducirse en el gen vecino cuando se transcriben unas pocas decenas de pb es bastante considerable. Tal vez la levadura posea sistemas diferentes a los presentes en eucariotas superiores de manera que la presencia de sitios de pausa no sea tan determinante.

El mismo inserto en orientación inversa fue también capaz de inducir terminación efectiva. Dicho fragmento era ligeramente menos eficaz en poliadenilación, pero estas diferencias parecen no ser suficientes como para inestabilizar a la secuencia ARS.

Seguidamente se probó el fragmento 144D3, que combinaba las características de los fragmentos 397D3 y 144. Dicho fragmento *in vivo* producía un patrón similar al observado en 397D3, una bajada en los niveles de los transcritos truncados sin el aumento de *entero*. A nivel de terminación, dicho inserto la induce de manera eficiente. El resultado obtenido es coherente con el hecho de que en el plásmido p1VP144D3 la transcripción no llegue al terminador de la *ADH1*. El hecho de que carezca de la secuencia en 3' indica que cualquiera que sea el determinante de la terminación se encuentra antes del sitio de poliadenilación, y no es por supuesto la secuencia $(TA)_n$. Si suponemos que la reacción de corte está afectada (como se vio en las digestiones *in vitro* con CF purificados) y que no se produce el extremo 5' sin caperuza que se ha postulado como el elemento que reconoce la nucleasa para seguir a la polimerasa (Proudfoot, 1989), debemos postular que al menos en este caso la implicación de una nucleasa no está tan clara. La implicación de una helicasa que reconociese secuencias diferentes a la $(TA)_n$ (tal vez alguno de los consensos restantes, tipo TAG...TATGT o A_{11}) o algún tipo de complejo de procesamiento no activo y produjese terminación independientemente del procesamiento sería la explicación más razonable. Los terminadores rho-dependientes procarióticos funcionan de esa manera. Se ha propuesto que la falta de consenso en los terminadores de levadura se debe a que funcionan de manera más parecida a terminadores procarióticos que eucarióticos. De hecho la proteína rho de *E. coli* es capaz de inducir *in vitro* la terminación de la RNA PolIII de levadura cuando ésta transcribe secuencias de terminadores rho-dependientes de *E. coli* (Wu y Platt, 1993). En dichos experimentos *in vitro* se detectó también terminación de la transcripción provocada por un extracto total de levadura. Dicha terminación se producía independientemente del procesado de los mensajeros. De manera

similares extractos diseñados para producir una transcripción *in vitro* específica de los genes *ADH2* y *GAL7* detectó la presencia del transcrito primario no procesado, que se extendía hasta el sitio de terminación (Hyman y Moore, 1993). La eliminación de las secuencias de poliadenilación de ambos genes no afectaba a la presencia y naturaleza del sitio de parada, por lo que se sugería la presencia de un sitio de pausa fuerte que causaba terminación independiente de procesamiento. Estos experimentos *in vitro* demostraron que puede haber parada de la transcripción sin necesidad de procesamiento.

Existe otro modelo, con menos fundamento experimental, para explicar la terminación de la transcripción en eucariotas superiores (Logan *et al.*, 1987). En él se postula que la RNA polimerasa II posee un factor de elongación específico que la capacita para transcribir eficientemente a lo largo del gen, pero que es liberado al transcribir la señal de poliadenilación. Sin este factor la polimerasa es más propensa a una terminación aleatoria, produciendo una terminación heterogénea al final del gen. Dicho modelo no parece muy extensible a *S. cerevisiae*, donde la terminación se produce en un espacio muy reducido y de manera eficaz. Tal vez la presencia de un sitio fuerte de pausa fuera necesaria en este caso para explicar una terminación eficiente, pero no explicaría la fuerte capacidad terminadora del fragmento 3'-144. Si este mecanismo funcionase en *FBP1*, el elemento que produce la disociación del hipotético factor de elongación debería ser diferente al elemento (TA)_n que aporta la eficiencia en el proceso de poliadenilación.

Por último, el fragmento 144D3 en orientación reversa, que posee una escasísima capacidad poliadeniladora, es igualmente incapaz de inducir terminación de la transcripción, indicando que la transcripción discurre sin alteración alguna a través de este fragmento. Eso indica que la delección D3 no causa ninguna alteración en la estructura del DNA que sea responsable de alguna manera de la pérdida de niveles de mensajero.

Podemos concluir de todos los resultados que la señal de poliadenilación de *FBP1* no requiere de secuencias específicas en 3' para producir una terminación efectiva de la transcripción. De los resultados con la delección D3 se deduce que existen elementos ajenos al determinante de la poliadenilación (TA)_n que causan la terminación de la transcripción. Dicho modelo explicaría la bajada de los niveles de transcritos *in vivo* en dicha mutación. Si se produjese una terminación de la transcripción eficiente, pero el precursor producido no es buen sustrato para la maquinaria de procesamiento (como se muestra en los experimentos *in vitro*), los transcritos que no fuesen procesados correctamente serían degradados inmediatamente, pues carecerían de cola poli(A).

2.5.2.- Estudio mediante *run-on* de la terminación de la transcripción

La metodología conocida como *transcription run-on* (TRO) ha sido la principal herramienta para diferenciar el hecho de la poliadenilación de la terminación de la transcripción *per se* (Proudfoot, 1989). El procedimiento consiste en suministrar un pulso de rUTP radiactivo a células permeabilizadas con un detergente, para extraer inmediatamente el RNA total de las

mismas. De esta manera se marcan todos los RNA que se están transcribiendo en ese momento, independientemente de si la polimerasa está copiando zonas que van a constituir parte del mRNA maduro o zonas posteriores al sitio de poliadenilación que no se detectan en los experimentos normales de hibridación con sondas marcadas. Dicho RNA marcado es hibridado con sondas monocatenarias inmovilizadas en una membrana de hibridación. Las sondas derivan de fagos M13 que contienen secuencias de diversas zonas de interés a lo largo del gen en cuestión. En RNA marcado hibridará con fagos que tengan polaridad inversa (sentido-) y no lo hará con fagos con el mismo inserto en el mismo sentido del RNA (sentido+). Una hibridación intensa en una de esas sondas indica que en esa región del DNA existe un gran número de polimerasas transcribiendo.

Como se esquematiza en la Figura 27, se obtuvieron sondas monocatenarias de tres zonas de la región 3' de *FBP1*. Una de ellas, la sonda 196 abarca las secuencias implicadas en la poliadenilación del gen en orientación directa, incluyendo el sitio poli(A), situadas entre los sitios de restricción *Sau3A* y *DraI*, (Figura 13). Las dos sondas restantes 142 y 165 abarcan zonas en 3' respecto al sitio de poliadenilación (fragmentos *DraI-DraI* y *DraI-XbaI* respectivamente). Se utilizó RNA marcado procedente de la cepa SEY2101/pVPA397F. Como se muestra en la figura 27 los fagos en orientación sentido+, carecen de hibridación apreciable, tan y como era de esperar. En el caso de los fagos antisentido se detectó una hibridación fuerte en la sonda 196 correspondiente a la región 3'-UTR más unas 60 pb después del sitio poli(A), indicando que existía una fuerte densidad de polimerasas en esta zona. En las sondas posteriores la hibridación fue menor, lo que indicó que existían menos moléculas de polimerasa transcribiendo esa zona. Estos datos parecen indicar que la mayor parte de la transcripción procedente del promotor de la actina no va más allá del fragmento 196. Esto indicaría que la terminación mayoritaria se produce dentro de los 60 pb posteriores al sitio de poliadenilación, o muy poco más allá, dato coherente con la distancia de menos de 100 pb requerida en el gen *CYC1* (Russo y Sherman, 1989).

Las sondas 142 y 165 se encuentran dentro de la presunta ORF YLR376c (Figura 13). Utilizando el fragmento 165 de doble cadena como sonda, hemos detectado un mensajero procedente del plásmido pVPA397 coherente con una transcripción desde un hipotético promotor de dicha ORF que empezase a transcribir a unos 50 pb del inicio de la región codificante y terminase en la señal de poliadenilación de *ADH1* (datos no mostrados). Dicha transcripción es débil en comparación de la producida por el promotor de la actina, y posiblemente sea la responsable del nivel de hibridación reducido presente en las sondas 142 y 165. La no hibridación de las sondas sentido+ parece descartar una transcripción en sentido contrario al del promotor de la actina.

Por lo tanto, la transcripción del gen *FBP1* avanza poco más allá del sitio de poliadenilación, aunque ignoramos si existe algún elemento en 3' que contribuya a ello.

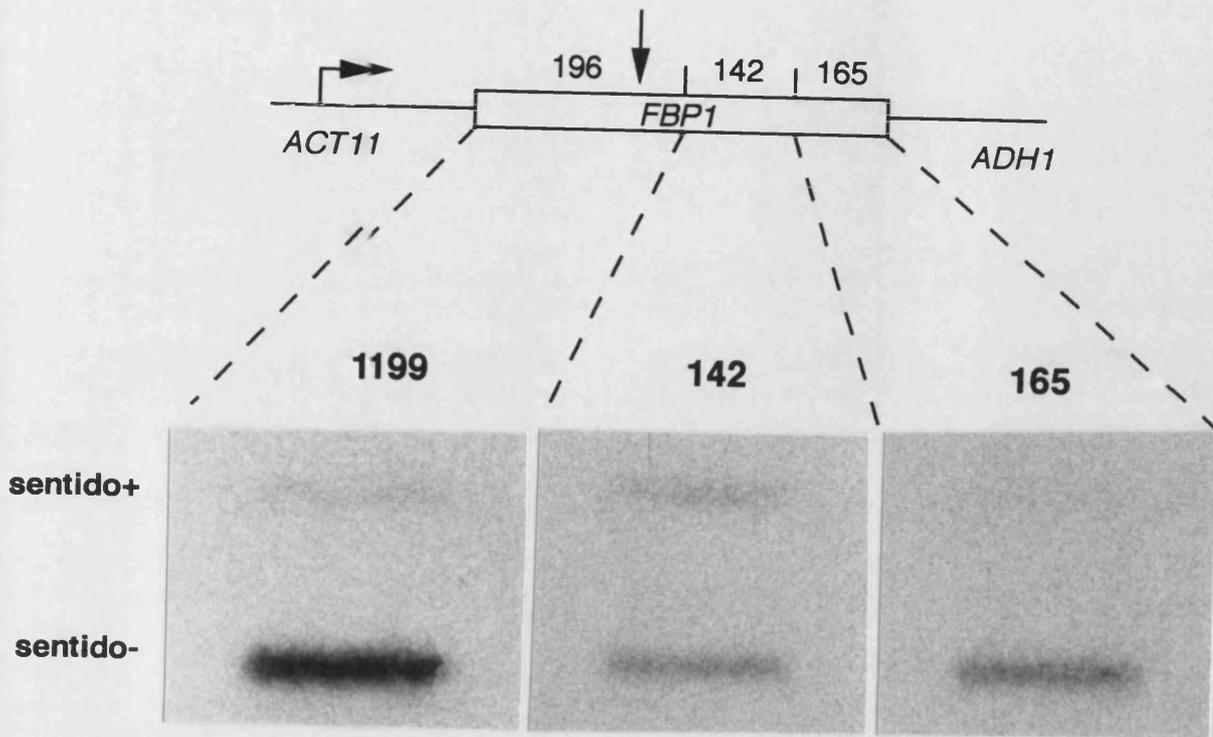


Figura 27.- Experimentos de *transcription run-on*. Las tres sondas utilizadas se indican sobre el esquema del plásmido pVPA397 que fue el elegido para este tipo de experimentos. Se indica con una flecha el sitio de poliadenilación. En la fila de sentido+ se ve el resultado obtenido con las sondas control de la misma polaridad que el RNA transcrito desde el promotor del gen de la actina. La fila sentido- corresponde a las sondas antisentido que sí hibridan con el RNA que proviene de *ACT1*.

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se pueden extraer de este trabajo se muestran esquematizadas en la Figura 28 y son las siguientes:

1.- Las digestiones con nucleasa S1 y Endo VII de plásmidos superenrollados conteniendo mutaciones y deleciones puntuales de la secuencia $d(TA)_n$ presente en el flanco 3' del gen *FBP1* indican que dicha secuencia adopta en determinadas circunstancias una estructura desapareada, que coexiste con la estructura cruciforme previamente descrita. La capacidad de desnaturalización de esta región depende del número de pares TA, como preveía la teoría.

2.- La sensibilidad a nucleasa S1 *in vivo* se extiende a lo largo de toda la secuencia $d(TA)_n$, indicando que su estructura predominante en cromatina es la de una región desapareada, no un cruciforme. Este resultado sugiere que en el DNA nucleosomal existe un grado de superenrollamiento negativo suficiente para una desnaturalización local del DNA. La eliminación de la totalidad de la repetición invertida (delección D3) elimina la sensibilidad a S1, indicando que dicha secuencia es responsable también *in vivo* de la estructura anómala del DNA. Dicha delección D3 produce cambios en el sitio hipersensible a MNasa pero éste se mantiene al igual que el posicionamiento de nucleosomas a ambos lados del mismo, lo que indica que ni esa secuencia ni la estructura secundaria que adopta son responsables de dichos fenómenos.

3.- El estudio computacional del genoma de *S.cerevisiae* indica que sitios de desestabilización como el encontrado en el gen *FBP1* se concentran en las regiones 3' de los genes

4.- La secuencia $(TA)_n$ actúa como elemento de eficiencia de la señal de poliadenilación de *FBP1* en su orientación directa tanto *in vivo* como *in vitro*. Dicha secuencia es redundante, y puede reducirse al hexanucleótido TATATA. La eliminación de la secuencia completa de TA produce una caída en los niveles de mensajero, atribuible a un procesamiento insuficiente o incorrecto. Junto a este elemento de eficiencia influyen en menor medida en la formación del extremo 3' del mRNA el sitio de poliadenilación (que coincide mayoritariamente con el consenso PyA_n) y secuencias aún no definidas situadas entre ambos. Ni el cruciforme en DNA ni la correspondiente horquilla de RNA tienen ningún papel en el procesamiento ni en la bidireccionalidad observada *in vivo*. Dicha bidireccionalidad está probablemente dictada por la simetría de las repeticiones TA y sorprendentemente no se observa *in vitro*. En orientación inversa para una poliadenilación eficiente *in vivo*, además de la secuencia $(TA)_n$ son requeridos los sitios de poliadenilación y secuencias no definidas en 5'.

5.- La terminación de la transcripción se produce muy cerca del sitio poli(A) (a menos de 100 pb) y no requiere de secuencias específicas en 3' respecto de dicho punto de corte y poliadenilación. La eliminación de la secuencia $(TA)_n$ no afecta a la terminación, indicando que existen otras secuencias en la región 3' no traducida implicadas en este proceso.

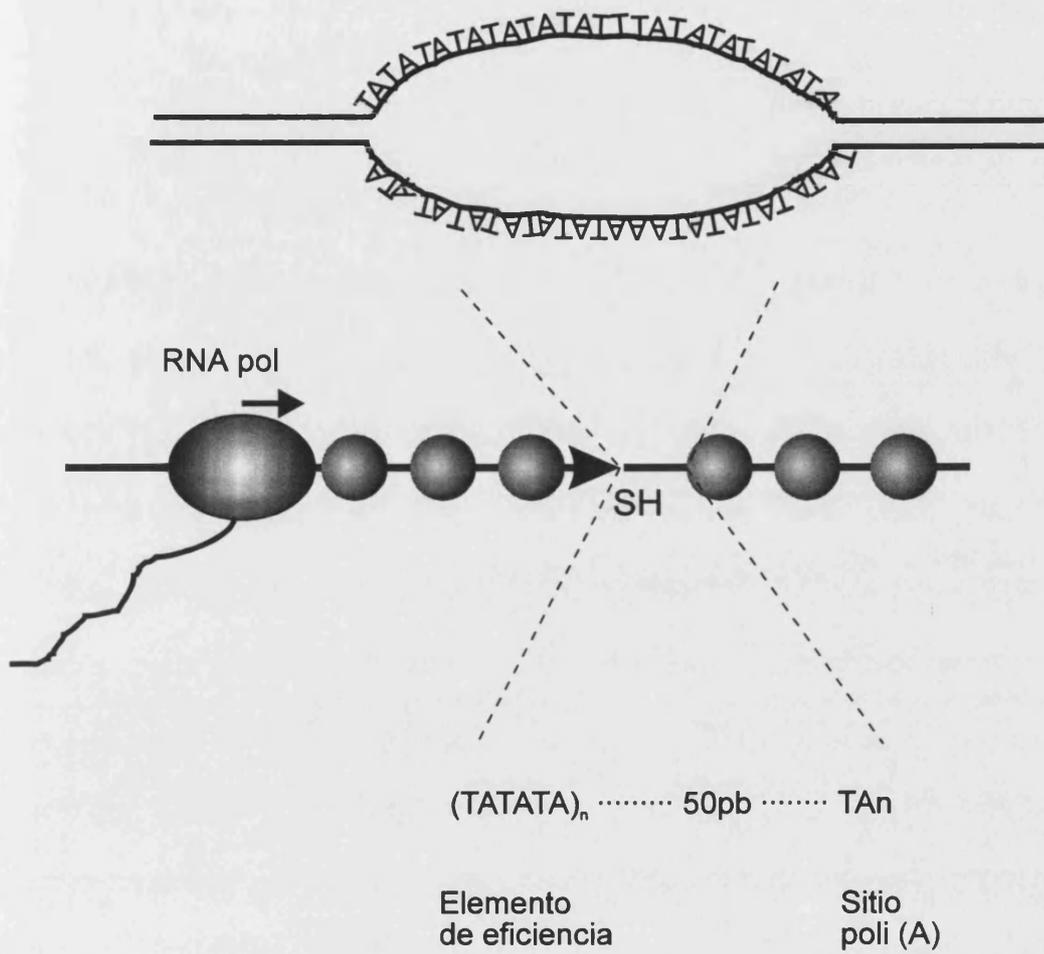


Figura 28.- Esquema de las conclusiones de este trabajo

BIBLIOGRAFIA

- ABE, A., HIRAOKA, Y. y FUKASAWA, T. 1990. Signal sequence for generation of mRNA 3'end in the *Saccharomyces cerevisiae* GAL7 gene. *EMBO J.* **9**, 3691-3697
- AMATI, B.B. y GASSER, S.M. 1988. Chromosomal ARS and CEN elements bind specifically to the yeast nuclear scaffold. *Cell* **54**, 967-978.
- AMERSHAM INTERNATIONAL PIC. 1985. Membrane transfer and detection protocols
- ARANDA, A. 1993. Estudio preliminar de las secuencias implicadas en la poliadenilación/terminación de la transcripción del gen FBP1 de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Licenciatura. Universitat de València.
- ARANDA, A., PÉREZ-ORTÍN, J.E., BENHAM, C.J. y DEL OLMO, M. 1996. Analysis of the structure of a natural d(TA)_n sequence in yeast chromatin. *Yeast*, aceptado.
- ASHFIELD, R., PATEL, A.J., BOSSONE, S.A., BROWN, H., CAMPBELL, R.D., MARCU, K.B., y PROUDFOOT, N.J. 1994. MAZ-dependent termination between closely spaced human complement genes. *EMBO J.* **13**, 5656-5667
- ATWATER, J.A., WISDOM, R. y VERMA, I. 1990. Regulated mRNA stability. *Annu. Rev. Genet.* **24**, 519-541
- AUSUBEL, F. M., BRENT, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SEIDMAN, J. G., SMITH, J. A. y STRUHL, K. 1987. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons. New York
- AXELROD, J.D. y MAJORS, J. 1989. An improved method for photofootprinting yeast genes *in vivo* using *Taq* polymerase. *Nucleic Acids Res.* **17**, 171-183.
- BATTISTONI, A., LEONI, L., SAMPAOLESE, B. y SAVINO, M. 1988. Kinetic persistence of cruciform structures in reconstituted nucleosomes. *Biochim. Biophys. Acta.* **950**, 161-171.
- BENHAM, C.J. 1981. Theoretical analysis of competitive conformational transitions in torsionally stressed DNA. *J. Mol. Biol.* **150**, 43-68

- BENHAM, C.J. 1982. Stable cruciform formation at inverted repeat sequences in supercoiled DNA. *Biopolymers* **21**, 679-696.
- BENHAM, C.J. 1992. Energetics of the strand separation transition in superhelical DNA. *J. Mol. Biol.* **225**, 835-847
- BENHAM, C. J. 1993. Sites of predicted stress-induced DNA duplex destabilization occur preferentially at regulatory loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 2999-3003.
- BENHAM, C.J. 1996. Duplex destabilization in superhelical DNA is predicted to occur at specific transcriptional regulatory regions. *J. Mol. Biol.* **255**, 425-434
- BERNSTEIN, P. y ROSS, J. 1989. Poly(A), poly(A) binding protein and the regulation of mRNA stability. *Trends Biochem. Sci.* **14**, 373-377
- BIRNSTIEL, M.L. y SCHAUFLELE, F.J. 1988 en *Structure and function of major and minor small nuclear ribonucleoprotein particles* (Birnstiel, ed.), pp. 155-182, Springer, Berlin
- BLAHO, J.A., LARSON, J.E., McLEAN, M.J. y WELLS, R.D. 1988. Multiple DNA secondary structures in perfect inverted repeat inserts in plasmids. *J. Biol. Chem.* **263**, 14446-14455
- BODE, J., KOHWI, Y., DICKINSON, L., JOH, T., KLEHR, D., MIELKE, C. y KOHWI-SHIGEMAYSU, T. 1992. Biological significance of unwinding capability of nuclear matrix-associating DNAs. *Science* **255**, 195-197
- BOROWIEC, J.A., ZHANG, L., SASSE-DWIGHT, S. y GRALLA, J.D. 1987. DNA supercoiling promotes formation of a bent repression loop in *lac* DNA. *J. Mol. Biol.* **196**, 101-110
- BOWATER, R.P.; ABOUL-ELA, F. y LILLEY, D.M.J. 1994. Large-scale opening of A+T rich regions within supercoiled DNA molecules is suppressed by salt. *Nucleic Acids Res.* **22**, 2042-2050
- BROWN, P. H., TILEY, L. S. y CULLEN, B. R. 1991. Effect of RNA secondary structure on polyadenylation site selection. *Genes Dev.* **5**, 1277-1284

- BURNS, D. M. y BEACHAM, I. R. 1983. A method for the ligation of DNA following isolation from low melting temperature agarose. *Anal. Biochem.* **135**, 48-51
- BUTLER, J.S. y PLATT, T. 1988. RNA processing generates the mature 3' end of yeast *CYC1* messenger RNA *in vitro*. *Science* **242**, 1270-1274
- BUTLER, J.S., SADHALE, P.P. y PLATT, T. 1990. RNA processing *in vitro* produces mature 3' ends of a variety of *Saccharomyces cerevisiae* mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 2599-2605
- CONNELY, S. y MANLEY, J.L. 1988. A functional mRNA polyadenylation signal is required for transcriptional termination by RNA polymerase II. *Genes Dev.* **2**, 440-452
- CONNELY, S. y MANLEY, J.L. 1989. RNA polymerase II transcription termination is mediated specifically by protein binding to CCAATbox sequence. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 5254-5259
- COUREY, A.J. y WANG, J.C. 1983. Cruciform formation in a negatively supercoiled DNA may be kinetically forbidden under physiological conditions. *Cell* **33**, 817-829
- CHEN, J. y MOORE, C.L. 1992. Separation of factors required for cleavage and polyadenylation of yeast pre-mRNA. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 3470-3481
- DAYN, A., MALKHOSYAN, S., DUZHY, D., LYAMICHEV, V., PANCHENKO, Y. y MIRKIN, S. 1991. Formation of (dA-dT)_n cruciforms in *Escherichia coli* cells under different environmental conditions. *J. Bacteriol.* **173**, 2658-2664
- DAYN, A., MALKHOSYAN, S. y MIRKIN, S. 1992. Transcriptionally driven cruciform formation *in vivo*. *Nucleic Acids Res.* **20**, 5991-5997
- DEL OLMO, M. 1991. Estructura de la cromatina del gen *FBP1* de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis doctoral. Universitat de València
- DEL OLMO, M., SOGO, J., FRANCO, L. y PEREZ-ORTIN, J. 1993. Chromatin structure of the yeast *FBP1* gene: transcription-dependent changes in the regulatory and coding regions. *Yeast* **9**, 1229-1240

- DEL OLMO, M. y PEREZ-ORTIN, J. 1993. A natural AT-rich sequence from the yeast *FBP1* gene exists as a cruciform in *Escherichia coli*. *Plasmid* **29**, 222-232
- DERSHOWITZ, A. y NEWLON C.S. 1993. The effect on chromosome stability of deleting replication origins. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 391-398
- DUJON, B. *et al.* 1994. Complete DNA sequence of yeast chromosome XI. *Nature* **369**, 371-378
- EGLI, C.M., SPRINGER, C. y BRAUS, G.H. 1995. A complex unidirectional signal element mediates *GCN4* mRNA 3'-end formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 2466-2473
- ENTIAN, K.-D., VOGEL, R.F., ROSE, M., HOFMANN, L. y MECKE, D. 1988. Isolation and primary structure of the gene encoding fructose-1,6-bisphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **236**, 195-200
- ESTRUCH, F., PEREZ-ORTIN, J.E., MATALLANA, E. y FRANCO, L. 1989. *In vivo* assembly of chromatin on pBR322 sequences cloned into yeast plasmids. *Plasmid* **21**, 113-119
- FOELICH-AMMON, S.J., GALE, K.C. y OSHEROFF, W. 1994. Site-specific cleavage of a DNA hairpin by topoisomerase II. *J. Biol. Chem.* **10**, 7719-7725
- FORRESTER, W., STUTZ, F. ROSBASH, M., y WICKENS, M. 1992. Defects in mRNA 3'-end formation, transcription initiation, and mRNA transport associated with the yeast mutation *prp20*: possible coupling of mRNA processing and chromatin structure. *Genes Dev.* **6**, 1914-1926
- FROHMAN, M. A. 1992. RACE: rapid amplification of cDNA ends, en PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press
- FUNAYAMA, S., GANCEDO, J.M. y GANCEDO, C. 1980. Turnover of yeast fructose-bisphosphatase in different metabolic conditions. *Eur. J. Biochem.* **109**, 61-66
- FUNK, M., HEGEMANN, H., y PHILIPPSEN, P. 1989. Chromatin digestion with restriction endonuclease reveals 150-160 bp of protected DNA in the centromere of chromosome XIV in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **219**, 153-160

- GANCEDO, J.M. y GANCEDO, C. 1971. Fructose-1,6-diphosphatase, phosphofructokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase from fermenting and non-fermenting yeasts. Arch. microbiol. **76**, 132-138
- GREAVES, D.R., PATIENT, R.K. y LILLEY, D.M.J. 1985. Facile cruciform formation by an (A-T)₂₄ sequence from a *Xenopus* globin gene. J. Mol. Biol. **185**, 461-478
- GUO, Z. y SHERMAN, F. 1995. 3'-end forming signals of yeast mRNA. Mol. Cell. Biol. **15** 5983-5990
- GUO Z., RUSSO, P., YUN, D.-F., BUTLER, J.S. y SHERMAN, F. 1995. Redundant 3' end-forming signals for the yeast *CYC1* mRNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**, 4211-4214
- GUO, Z. y SHERMAN, F. 1996. Signals sufficient for 3'-end formation of yeast mRNA. Mol. Cell. Biol. **16**, 2772-2776
- HANAHAN, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. **166**, 557-580
- HANIFORD, D.B. y PULLEYBLANCH, D.E. 1985. Transition of a cloned d(AT)_n-d(AT)_n tract to a cruciform *in vivo*. Nucleic Acids Res. **13**, 4343-4363
- HEDGES, D., PROFT, M. y ENTIAN, K.D. 1995. *CAT8*, a new zinc cluster-encoding gene necessary for derepression of gluconeogenic enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. **15**, 1915-1922
- HEIDMANN, S., OBERMAIER, B., VOGEL, K., DOMDEY, H. 1992. Identification of pre-mRNA polyadenylation sites in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. **12**, 4215-4229
- HEIDMANN, S., SCHINDEWOLF, C., STUMPF, G. y DOMDEY, H. 1994. Flexibility and interchangeability of polyadenylation signals in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. **14**, 4633-4642
- HENIKOFF, S. 1984. Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. Gene **28**, 351-359

- HENIKOFF, S. y COHEN, E.H. 1984. Sequences responsible for transcription termination on a gene segment in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **4**, 1515-1520
- HERR, W. 1985. Diethyl pyrocarbonate: a chemical probe for secondary structure in negatively supercoiled DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 8009-8013
- HOLZER, H. 1976. Catabolite inactivation. *Trends Biochem. Sci.* **1**, 178-181
- HORWITZ, M.S.Z. y LOEB, L.A. 1988. An *E. coli* promoter that regulates transcription by DNA superhelix-induced cruciform extrusion. *Science* **241**, 703-705
- HUMPHREY, T., SADHALE, P., PLATT, T. y PROUDFOOT, N. 1991. Homologous mRNA 3' end formation in fission and budding yeast. *EMBO J.* **10**, 3503-3511
- HYMAN, L. E., SEILER, S.H., WHORISKEY, J. y MOORE, C.L. 1991. Point mutations upstream of the yeast *ADH2* poly(A) site significantly reduce the efficiency of 3'-end formation. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 2004-2012
- HYMAN, L. y MOORE, C.L. 1993. Termination and pausing of RNA polymerase II downstream of a yeast polyadenylation sites. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 5159-5167
- INOUE, S. y INOUE, M. 1987. Oligonucleotide-directed site-specific mutagenesis using double-stranded plasmid DNA in Narang, S. (Ed.) *DNA and RNA synthesis*, Academic Press Inc., New York, vol. 1. pp. 181-206
- IRNIGER, S., EGLI, C.M. y BRAUS, G.H. 1991. Different classes of polyadenylation sites in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 3060-3069
- IRNIGER, S., SANFAÇON, H., EGLI, C.M. y BRAUS, G. H. 1992. Different sequence elements are required for function of the cauliflower mosaic virus polyadenylation site in *Saccharomyces cerevisiae* compared with plants. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 2322-2330
- IRNIGER, S., EGLI, C. M., y BRAUS, G. H. 1993. Messenger RNA 3'-end formation of a DNA fragment from the human *c-myc* 3'-end region in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **23**, 201-204

IRNIGER, S. y BRAUS, G.H. 1994. Saturation mutagenesis of a polyadenylation signal reveals a hexanucleotide element essential for mRNA 3' end formation in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**, 257-261

ITO, H., FUKUDA, Y., MURATA, K. y KIMURA, A. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. J. Bacteriol. **153**, 163-168

IYER, V. y STRUHL, K. 1995. Poly(dA:dT), a ubiquitous promoter element that stimulates transcription via its intrinsic DNA structure. EMBO J. **14**, 2570-2579

JAERGER, J. A., TURNER, D. H. y ZUCKER, M. 1989. Improved predictions of secondary structures for RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**, 7706-7710

JENNY, A., HAURI, H.-P. y KELLER, W. 1994. Characterization of cleavage and polyadenylation specificity factor and cloning of its 100-kilodalton subunit. Mol. Cell. Biol. **14**, 8183-8190

JENSCH, F., KOSAK, H., SEEMAN, N.C. y KEMPER, B. 1989. Cruciform cutting endonucleases from *Saccharomyces cerevisiae* and phage T4 show conserved reactions with branched DNAs. EMBO J. **8**, 4325-4334

KELLER, W. 1995. No end yet to messenger RNA 3' processing. *Cell* **81**, 829-832

KEMPER, B. y POTTMEYER, S. 1992. T4 endonuclease resolves cruciform DNA with nick and counter-nick and its activity is directed by local nucleotide sequence. J. Mol. Biol. **223**, 607-615

KENT, N.A., BIRD, L.E. y MELLOR, J. 1993. Chromatin analysis in yeast using NP-40 permeabilised sphaeroplasts. Nucleic Acids Res. **21**, 4653-4654

KERPPOLA, T.K. y KANE, C.M. 1990. Analysis of the signals for transcription termination by purified RNA polymerase II. Biochemistry **29**, 269-278

KESSLER, M., ZHELKOVSKY, A., SKVORAK, A. y MOORE, C. 1995. Monoclonal antibodies to the yeast poly(A) polymerase (PAP) provide evidence for association of PAP with cleavage factor I (CFI) Biochemistry **34**, 1750-1759

- KLEFF, S., KEMPER, B. y STERNGLANZ, R. 1992. Identification and characterization of yeast mutants and the gene for a cruciform cutting endonuclease. *EMBO J.* **11**, 699-704
- KOHWI, Y. y KOHWI-SIGEMATSU, T. 1988. Magnesium ion-dependent triple-helix structure formed by homopurine homopyrimidine sequences in supercoiled plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 3781-3785
- KOHWI-SIGEMATSU, T. y KOHWI, Y. 1990. Torsional stress stabilizes extended base unpairing in suppressor sites flanking immunoglobulin heavy chain enhancer. *Biochemistry* **29**, 9551-9563
- KOWALSKI, D. y EDDY, M.J. 1989. The DNA unwinding element: a novel, cis acting component that facilitates opening of the *E. coli* replication origin. *EMBO J.* **8**, 4335-4344
- KOWALSKI, D., NATALE, D.A. y EDDY, M.J. 1988. Stable DNA unwinding, not breathing, accounts for single-strand-specific nuclease hypersensitivity of specific A+T rich sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 9464-9468
- LARSEN, A. y WEINTRAUB, H. 1982. An altered DNA conformation detected by S1 nuclease occurs at specific regions in active chick globin chromatin. *Cell* **29**, 609-622
- LEE, M.S. y GARRARD., W.T. 1991. Transcription-induced nucleosome "splitting" an underlying structure for DNase I sensitive chromatin. *EMBO J.* **10**, 607-615
- LILLEY, D.M.J. 1980. The inverted repeat as a recognizable structural feature in supercoiled DNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 6468-6472
- LILLEY, D.M.J. 1989. Structural isomerization in DNA: the formation of cruciform structures in supercoiled DNA molecules. *Chem. Soc. Rev.* **18**, 53-68
- LILLEY, D.M.J. y HALLAM, L.R. 1984. Thermodynamics of the ColE1 cruciform: comparison between probing and topological experiments using single topoisomers. *J. Mol. Biol.* **180**, 179-200
- LILLEY, D.M.J. y MARKMAN, A.F. 1983. Dynamics of cruciform extrusion in supercoiled DNA: use of a synthetic inverted repeat to study conformational populations. *EMBO J.* **2**, 527-533

LINGNER, J., RADTKE, I., WAHLE, E. y KELLER, W. 1991a. Purification and characterization of poly(A) polymerase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **266**, 8741-8746

LINGNER, J., KELLERMANN, J. y KELLER, W. 1991b. Cloning and expression of the essential gene for poly(A) polymerase from *S. cerevisiae*. *Nature* **354**, 496-498

LIU, L.F. y WANG, J.C. 1987. Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 7024-7027

LIU, J. y PARKINSON, J.S. 1989. Genetics and sequence analysis of the *pcnB* locus, an *Escherichia coli* gene involved in plasmid copy number control. *J. Bacteriol.* **171**, 1254-1261

LOGAN, J., FALK-PEDERSEN, E., DARNELL, J.E. y SHENK, T. 1987. A poly(A) addition site and a downstream termination region are required for efficient cessation of transcription by RNA polymerase II in the mouse beta-major globin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 8306-8310

LOHR, D. e IDE, G. 1979. Comparison of the structure and transcriptional activity of growing phase and stationary yeast chromatin: a model for reversible gene activation. *Nucleic Acids Res.* **6**, 1909-1927.

LUDERUS, M.E.E., DEN BLAAUWEN, J.L., SMIT, O.J.B., COMPTON, D.A. y van DRIEL, R. 1994. Binding of matrix attachment regions to lamin polymers involves single-stranded region and the minor groove. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 6297-6305

MACDONALD, C.C., WILUSZ, J. y SHENK, T. 1994. The 64-kilodalton subunit of the CstF polyadenylation factor binds the pre-mRNAs downstream of the cleavage site and influence cleavage site location. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 6647-6654

MANIATIS, T., FRITSCH, E.F. y SAMBROOK, J. 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Lab. New York

MARTÍNEZ-GARCÍA, J.F.; ESTRUCH, F. y PÉREZ-ORTÍN, J.E. 1989. Chromatin structure of the 5' flanking region of the yeast *LEU2* gene. *Mol. Gen. Genet.* **217**, 464-470

MAUNDRELL, K. 1990. A highly transcribed gene repressed by thiamine. *J. Biol. Chem.* **265**, 10857-10864.

MATTHEWS, H.R. 1993. Polyamines, chromatin structure and transcription. *BioEssays* **15**, 561-566

MAYER, S. A. y DIECKMANN, C.L. 1991. Yeast *CBP1* mRNA 3' end formation is regulated during the induction of mitochondrial function. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 813-821

MCCLELLAN J.A. y LILLEY, D.M.J. 1987. A two-state conformational equilibrium for alternating (A-T)_n sequences in negatively supercoiled DNA. *J. Mol. Biol.* **197**, 707-711

MCCLELLAN J.A., PALECEK, E. y LILLEY, D.M.J. 1986. (A-T)_n tracts embedded in random sequence DNA-formation of a structure which is chemically reactive and torsionally deformable. *Nucleic Acids Res.* **14**, 9291-9309

MERCADO, J.J. y GANCEDO, J. M. 1992. Regulatory regions in the yeast *FBP1* and *PCK1* genes. *FEBS Lett.* **311**, 110-114

MICHELOTTI, G.A., MICHELOTTI, E.F., DUHLER, A., DUNCAN, R.C., ERIK, D. y LEVENS, D. 1996. Multiple single-stranded cis elements are associated with activated chromatin of the human *c-myc* gene *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 2656-2669

MINVIELLE-SEBASTIA, L., PREKER, P.J. y KELLER, W. 1994. RNA14 and RNA15 proteins as components of a yeast pre-mRNA 3'-end processing factor. *Science* **266**, 1702-1705

MIZUUCHI, K., KEMPER, B., HAGS, J., WEISBERG, R.A. 1982. T4 endonuclease VII cleaves Holliday structures. *Cell* **29**, 357-365

MUNROE, D. y JACOBSON, A. 1990. mRNA poly(A) tail: a 3' enhancer of translational initiation. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 3441-3455

NATALE, D.A., UMEK, R.M. y KOWALSKI, D. 1993. Ease of DNA unwinding is a conserved property of yeast replication origins. *Nucleic Acids Res.* **21**, 555-560

NICKOL, J.M. y FELSENFELD, G. 1983. DNA conformation at the 5' end of the chicken adult β -globin gene. *Cell.* **35**, 467-477

NICKOL, J. y MARTIN, R.G. 1983. DNA stem-loop structures bind poorly to histone octamer cores. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 4669-4673

NIEDEREACHER, D. SCHULER, H.J., GRZESITZA, D., GUTLICH, H., HAUSER, H. P., WAGNER, T. y ENTIAN, K. D. 1992. Identification of UAS elements and binding proteins necessary for derepression of *Saccharomyces cerevisiae* fructose-1,6-biphosphatase. *Curr. Genet.* **22**, 363-370

NOBILE, C., NICKOL, J. y MARTIN, R.G. 1986. Nucleosome phasing on a DNA fragment from the replication origin of simian virus 40 and rephasing upon cruciform formation of the DNA. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 2916-2922

O'HARA, E.B., CHEKANOVA, J.A., INGLE, C.A., KUSHNER, Z.R., PETERS, E. y KUSHNER, S.R. 1995. Polyadenylation helps regulate mRNA decay in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 1807-1811
OSBORNE, B.I. y GUARENTE, L. 1988. Transcription by RNA polymerase II induces changes of DNA topology in yeast. *Genes Dev.* **2**, 766-772

OSBORNE, B.I. y GUARENTE, L. 1989. Mutational analysis of a yeast transcriptional terminator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 4097-4101

PALECEK, E. BOUBLIKOVA, P., JELEN, F., KREJCOVA, A., MAKATUROVA, E., NEJEDLY, K., PECINKA, P. Y VOJTISKOVA, M. 1990. Chemical probing of the DNA polymorphic structure *in vitro* and *in situ*, en *Structure and Methods*, **3**, DNA and RNA. Adenine Press, Schenectady, NY, 237-265

PALECEK, E. 1991. Local supercoil-stabilized DNA structures. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **26**, 151-226

PANAYOTATOS, N. y WELLS, R.D. 1981. Cruciform structures in supercoiled DNA. *Nature* **289**, 466-470

PÉREZ-ORTÍN, J.E., ESTRUCH, F., MATALLANA, E. y FRANCO, L. 1986. DNase I sensitivity of the chromatin of the yeast *SUC2* gene for invertase. *Mol. Gen. Genet.* **205**, 422-427

POTTMEYER, S. y KEMPER, B. 1992. T4 Endonuclease VII resolves cruciform DNA with nick and counter-nick and its activity is directed by local nucleotide sequence. *J. Mol. Biol.* **223**, 607-615

PREKER, P.J., LIGNER, J., MINVIELLE-SEBASTIA, L. y KELLER, W. 1995. The *FIP1* gene encodes a component of a yeast pre-mRNA polyadenylation factor that directly interacts with poly(A) polymerase. *Cell* **81**, 379-389

PROUDFOOT, N. 1991. Poly(A) signals. *Cell* **64**, 671-674

PROUFOOT, N. 1989. How RNA polymerase II terminates transcription in higher eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* **14**, 105-110

PRIBYL, T. M., y MARTINSON, H. G. 1988. Transcription termination at the chicken b-globin gene. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 5369-5377

PULLEYBLANCH, D.E., HANIFORD, D.B. y MORGAN, A.R. 1985. A structural basis for S1 nuclease sensitivity of double-stranded DNA. *Cell* **42**, 271-280

RAABE, T., BOLLUM, F.J. y MANLEY, J.L. 1991. Primary structure and expression of bovine poly(A) polymerase. *Nature* **353**, 229-234

RAHMOUNI, A.R. y WELLS, R.D. 1989. Stabilization of Z DNA in vivo by localized supercoiling. *Science* **246**, 358-363

ROGERS, D.T., HILLER, E., MITSOCK, L. y ORR, E. 1988. Characterization of the gene for fructose-1,6-bisphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **236**, 6051-6057

RUOHOLA, H., BAKER, S. M., PARKER, R. y PLATT, T. 1988. Orientation-dependent function of a short *CYC1* DNA fragment in directing mRNA 3' end formation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5041-5045

RUSSELL, D.W., SMITH, M. COX, D., WILLIAMSON, U.M. y YOUNG, E.T. 1983. DNA sequences of two yeast promoter-up mutants. *Nature* **304**, 652-654

- RUSSNAK, R., NEHRKE, K.H. y PLATT, T. 1995. *REF2* encodes an RNA-binding protein directly involved in yeast mRNA 3'-end formation. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 1689-1697
- RUSSO, P. 1995. *Saccharomyces cerevisiae* mRNA 3' end forming signals are also involved in transcription termination. *Yeast* **11**, 447-453
- RUSSO, P., LI, W.-Z., GUO, Z. y SHERMAN, F. 1993. Signals that produce 3' end of yeast in *CYC1* mRNA of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7836-7849
- RUSSO, P., LI, W.-Z., HAMPSEY, D.M., ZARET, K.S. y SHERMAN, F. 1991. Distinct cis-acting signals enhance 3' endpoint formation of *CYC1* mRNA in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **10**, 563-571
- RUSSO, P. y SHERMAN, F. 1989. Transcription terminates near the poly(A) site in the *CYC1* gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 8348-8352
- SADHALE, P.P. y PLATT, T. 1992. Unusual aspects of *in vitro* RNA processing in the 3' regions of the *GAL1*, *GAL7*, and *GAL10* genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 4262-4270
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Lab. New York
- SANDER, M. y HSIEH, T.-S. 1985. *Drosophila* topoisomerase II double-strand DNA cleavage: analysis of DNA sequence homology at the cleavage site. *Nucleic Acids Res.* **13**, 1057-1072
- SANGER, F., NICKLEN, S. y COULSON, R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 5463-5467
- SCROTH, G.P. y HO, P.S. 1995. Occurrence of potential cruciform and H-DNA forming sequences in genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* **23**, 1977-1983
- SEDIVY, J.M. y FRAENKEL, D.G. 1985. Fructose bisphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. Cloning, disruption and regulation of the *FBP1* structural gene. *J. Mol. Biol.* **186**, 307-319

SHEETS, M.D., OGG, S.C. y WICKENS, M. 1990. Point mutations in AAUAAA and the poly(A) addition site: effects on the accuracy and efficiency of cleavage and polyadenylation *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* **18**, 5799-5805

SHERMAN, F., FINK, G.R. y HICKS, J.B. 1995. *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Lab. New York

SIKORSKI, R.S. y HIETER, P. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**, 19

SINDEN, R.R., BROYLES, S.S. y PETTIJOHN, D.E. 1983. Perfect palindromic lac operator DNA sequence exists a stable cruciform structure in supercoiled DNA *in vitro* but not *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 1797-1801

SINDEN, R.R., ZHENG, G., BRANKAMP, R.G. y ALLEN, K.N. 1991. On the deletion of inverted repeated DNA in *Escherichia coli* : Effects of length, thermal stability and cruciform formation *in vivo*. *Genetics* **129**, 991-1005.

SINGLETON, C.K., KLYSIK, J., STIRDIVANT, S.M. y WELLS, R.D. 1982. Left-handed Z-DNA is induced by supercoiling in physiological ionic conditions. *Nature* **299**, 312-316

SINGLETON, C.K. y WELLS, R.D. 1982. Relationship between superhelical density and cruciform formation in plasmid pVH51. *J. Biol. Chem.* **257**, 6292-6295

SKARNES, W.C., TESSIEK, P.C. y ACHESON, N.H. 1988. RNA polymerases stall and/or prematurely terminate nearby both early and late promoters on polyomavirus DNA. *J. Mol. Biol.* **203**, 153-171

SNYDER, M., SAPOLSKY, R. J. y DAVIS, R. W: 1988. Transcription interferes with elements important for chromosome maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 2184-2194

SOUTHERN, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517

- STUMPF, G., GOPPELT, A. y DOMDEY, H. 1996. Pre-mRNA topology is important for 3'-end formation in *Saccharomyces cerevisiae* and mammals. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 2204-2213
- SUGGS, W. y WARNER, R.W. 1986. Nuclease recognition of an alternating structure in a d(AT)₁₄ plasmid insert. *Nucleic Acids Res.* **14**, 3703-3716
- SUTTON, A. y BROACH, J.R. 1985. Signals for transcription initiation and termination in the *Saccharomyces cerevisiae* plasmid 2 mm circle. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 2770-2780
- SZENT-GYORGY, C., FINKELSTEIN, D.B. y GARRARD, W.T. 1987. Sharp boundaries demarcate the chromatin structure of a yeast heat shock gene. *J. Mol. Biol.* **193**, 71-80
- TINOCO, I., BORER, P.N., DENGLER, B. y LEVINE, M.B. 1973. *Nature New Biol.* **264**, 40-41
- THOMA, F. 1986. Protein-DNA interactions and nuclease-sensitive regions determine nucleosome positions on yeast plasmid chromatin. *J. Mol. Biol.* **190**, 177-190
- THOMA, F. (1992) Nucleosome positioning. *Biochim. Biophys. Acta* **1130**, 1-19
- THOMA, F., BERGMAN, L.W. y SIMPSON, R.T. 1984. Nuclease digestions of circular TRP1ARS1 chromatin reveals positioned nucleosomes separated by nuclease-sensitive regions. *J. Mol. Biol.* **177**, 715-733
- THURESSON, A.-C., ASTROM, J., ASTROM, A., GRONVIK, K.-O. y VIRTANEN, A. 1994. Multiple forms of poly(A) polymerases in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 979-983
- UMEK, R.M. y KOWALSKI, D. 1987. Yeast regulatory sequences preferentially adopt a non-B conformation in supercoiled DNA. *Nucleic Acids Res.* **15**, 4467-4480
- UMEK, R.M. y KOWALSKI, D. 1988. The ease of DNA unwinding as a determinant of initiation at yeast replication origin. *Cell* **52**, 559-562
- VALLE, G. 1993. TA-repeat microsatellites are closely associated with ARS consensus sequences in yeast chromosome III. *Yeast* **9**, 753-759

- VAN HOLDE, K. y ZLATANOVA, J. 1993. Unusual DNA structures, chromatin and transcription. *BioEssays* **16**, 59-68
- VAN HOUTEN, J.V. y NEWLON, C.S. 1990. Mutational analysis of the consensus sequence of a replication origin from yeast chromosome III. *Mol. Cell. MBiol.* **10**, 3917-3925
- VINCENT L. y GANCEDO J.M. 1995. Analysis of positive elements sensitive to glucose in the promoter of the FBP1 gene from yeast. *J. Biol. Chem.* **2705**, 12832-12838
- VOLOGODSKII, A.V. y FRANK-KAMENETSKII, M.D. 1982. Theoretical study of cruciform states in superhelical DNAs. *FEBS Lett.* **143**, 257-260
- WAHLE, E. y KELLER, W. 1992. The biochemistry of 3'-end cleavage and polyadenylation of messenger RNA precursors. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 419-440
- WAHLE, E. 1995. 3'-end cleavage and polyadenylation of mRNA precursors. *Biochim. Biophys. Acta* **1261**, 183-194
- WAHLE, E. y KELLER, W. 1996. The biochemistry of polyadenylation. *TIBS* **21**, 247-250
- WARD, G.K., MCKENZIE, R., ZANNIS-HADJOPOULOS, M. y PRICE, G.B. 1990. The dynamic distribution and quantification of DNA cruciforms in eukaryotic nuclei. *Exp. Cell Res.* **188**, 235-246.
- WHITELAW E. y PROUDFOOT, N.J. 1986. α -thalassaemia cause by a poly(A) site mutation reveals that transcriptional termination is linked to 3' end processing in the human $\alpha 2$ globin gene. *EMBO J.* **261**, 3838-3845
- WICKENS, M. 1990a. In the beginning is the end: regulation of poly(A) addition and removal during early development. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 320-324
- WICKENS, M. 1990b. How the messenger got its tail: addition of poly(A) in the nucleus. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 277-281
- WU, C. 1980. The 5' ends of *Drosophila* heat shock genes in chromatin are hypersensitive to DNase I. *Nature* **286**, 854-860

WU C. y PLATT, T. 1993 Transcriptional arrest of yeast RNA polymerase II by *E. coli* Rho protein *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**, 6606-6610

YAGIL, G. 1991. Paranemic structures of DNA and their role in DNA unwinding. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. **26**, 475-559

YARGER, J. G., ARMILEI, G. y GORMAN, M.C. 1986. Transcription terminator-like element within a *Saccharomyces cerevisiae* promoter region. Mol. Cell. Biol. **6**, 1095-1101

YU, K. y ELDER, R.T. 1989. Some of the signals for 3'-end formation in transcription of the *Saccharomyces cerevisiae* Ty-D15 element are immediately downstream of the initiation site. Mol. Cell. Biol. **9**, 2431-2444

ZARET, K.S. y SHERMAN, F. 1982. DNA sequence required for efficient transcription termination in yeast. Cell **28**, 563-573

ZHELKOVSKY, A.M., KESSLER, M.M. y MOORE, C.L. 1995. Structure-function relationships in the *Saccharomyces cerevisiae* poly(A) polymerase. J. Biol. Chem. **44**, 26715-26720

ZOLLER, M. J., y SMITH, M. 1983. Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA cloned into M13 vectors. Methods Enzymol. **100**, 468-500

ZUCKER, M. 1989. On folding all suboptimal foldings of an RNA molecule. Science **244**, 48-52

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha,
acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de
D. AGUSTIN ARANDA FERNANDEZ
la calificación de APTO "cum laude" por unanimidad.
Valencia, a 21 de Noviembre de 1996

El Secretario,

El Presidente

