



UNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

Programa de Doctorado en Biotecnología  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

***Estudio funcional de factores  
implicados en la transcripción y  
exportación de los RNAs en  
Saccharomyces cerevisiae***

Tesis Doctoral

**Varinia García Molinero**

Directora: Susana Rodríguez Navarro

Valencia, 2014



**PRINCIPE FELIPE**  
CENTRO DE INVESTIGACION



Universitat de València  
Programa de Doctorado en Biotecnología  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

*Estudio funcional de factores implicados en  
la transcripción y exportación de los RNAs  
en Saccharomyces cerevisiae*

Tesis Doctoral  
**Varinia García Molinero**

Valencia 2014



**PRINCIPE FELIPE**  
CENTRO DE INVESTIGACION



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

INFORMA: que **Varinia García Molinero**, licenciada en Ciencias Biológicas por la Universitat de València, ha realizado bajo su dirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título “*Estudio funcional de factores implicados en la transcripción y exportación de los RNAs en Saccharomyces cerevisiae*”.

Revisado el presente trabajo, expresa su conformidad para la presentación del mismo por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente, para optar al grado de Doctora por la Universitat de València.

En Valencia, Septiembre 2014

Directora

Fdo: Dra. Susana Rodríguez Navarro



*“Nunca te entregues ni te apartes  
junto al camino, nunca digas  
no puedo más y aquí me quedo”*

**Jose Agustín Goytisoló**



## Agradecimientos

*Ha llegado el momento de poder agradecer a todas aquellas personas que me han ayudado de una forma u otra a lo largo de estos años para que este proyecto, no solo laboral, sino de vida saliese adelante, y a las cuales seguramente no se lo he agradecido como se merecen:*

*Quiero agradecer a mi directora, Susana, por darme la oportunidad de entrar en el mundo de la ciencia siendo parte del I-25, por la confianza que has depositado en mí durante estos años, y por el apoyo que me has brindado.*

*A los Drs. Sebastián Chávez y Paco Navarro por darme la oportunidad de participar en vuestros trabajos. Pero también por invitarnos a vuestras reuniones en Baeza donde poder compartir nuestros proyectos, por estar siempre dispuestos a ayudarnos, y sobretodo por desprender esa extraordinaria ilusión por la ciencia. También quiero agradecer a toda la gente de los grupos de Sebastián y Paco: Xenia, Gonzalo, Lola, Vero, Ana,... con los que hemos recorrido media España compartiendo un poco de nuestro mundo.*

*A la Dra. Ana Conesa por participar con su grupo en una parte tan importante de este trabajo como es el análisis bioinformático. A Sonia Tarazona por enseñarme a manejar los datos para realizar los grupos jerárquicos. A Pedro por el gran trabajo bioinformático que ha realizado con nuestros datos, pero sobretodo por su infinita paciencia, dedicación e ilusión. Iniciarse en el mundo de la bioinformática de vuestra mano ha sido un placer.*

*A la gente del departamento de bioquímica: Al Dr. José Enrique Pérez y a todo su grupo por la gran ayuda que nos han proporcionado con todo el trabajo de microarrays, por compartir con nosotras sus datos y por los comentarios críticos sobre nuestros resultados. A Toni por enseñarme a analizar los datos de transcriptómica, pero sobretodo por ser siempre tan atento y encantador conmigo. A Ana por su ayuda técnica en la hibridación de los arrays, y por su enorme sonrisa y su alegría contagiosa. También quiero agradecer de todo corazón a Lola y Emilia el apoyo y la ayuda desinteresada que me han brindado siempre.*

Quiero agradecer a todos mis compañeros del I-25 con los que he compartido tantas cosas durante estos años. A Pau, a Andy y a Ber por haberme enseñado cuando no sabía hacer prácticamente nada en el lab, pero sobretodo por haber sido parte de la etapa más loca y divertida de estos años. A Mica por estar siempre dispuesta a hablar y compartir ideas. A Ali por ampliar nuestras mentes y darnos una visión de otros mundos. A MariCarmen por ser tan cariñosa y paciente. A Amparo y a Elo por estar dispuestas a ayudar siempre y ser no solo buenas compañeras, sino casi madres. A MEG por darme siempre unas palabras de apoyo sin necesidad de pedir las. A Sarah por sus ganas de aprender y por ser mis manos cuando lo he necesitado. A Martina por estar siempre dispuesta a escuchar y ayudar. Muy especialmente a Paula, porque te has hecho un hueco enorme en mi vida tan solo siendo como eres, gracias por tu complicidad, por tu transparencia, tu optimismo y por tu amistad.

No tengo palabras para agradecer a las dos mejores compañeras que se pueden tener todo lo que me han dado. Gracias a Ana y a Encar, por todo, por las risas infinitas, por los lloros, por todo lo que me habéis enseñado, por la ciencia, por la paciencia, por todo el apoyo, pero sobretodo por la amistad tan sincera que me dais, por estar tan cerca de mí incluso cuando estáis lejos. Esta etapa ha sido única gracias a vosotras.

Quiero agradecer a otra gran parte de mi vida, los bichólogos. Entre ellos, a Fer, por su amistad y por esa manera suya de ver y vivir la vida. A María y Ana (Burri) por seguir ahí tanto tiempo después. A Sara porque se que tengo su ayuda tan solo cruzando el pasillo.

Un agradecimiento muy especial se merecen mis meloncitas, Lara y Mar, porque me acuerdo del día que nos conocimos en clase, de lo bien que lo pasamos durante esos 5 años, de todo lo que vivimos, de lo que aprendimos, de lo que reímos y de lo que lloramos. Pero sobretodo recuerdo que 10 años después seguimos unidas, compartiendo nuestras vidas, haciendo algo que parece tan simple pero es tan difícil cuando te dedicas a la ciencia como es comprendernos!. Gracias por la infinita amistad y el amor que me dais.

Y ahora, mi otro mundo, mi conexión con la tierra: mi pueblo y mi familia. Quiero agradecer a Raquel su amistad desde que éramos crías, pero especialmente la amistad que me ha dado durante todos estos años que he estado fuera del pueblo. Porque se lo difícil que es entender mi loco mundo científico pero aun así ella siempre ha estado apoyándome e intentando entenderme. A Pilar por que

*ha sido un placer compartir estos años viviendo juntas, gracias por ser como eres.*

*Sin duda, mi mayor agradecimiento es para mi familia, toda esa gran familia, por quererme y preocuparse por mí. A mi abuelo Vicente por darme su amor y por estar siempre tan pendiente de mi bienestar y mi felicidad. A mi prima Isa por vivir conmigo esta experiencia durante 5 años maravillosos de convivencia, de amistad y cariño.*

*A mi extraordinario hermano, por ser como es, por aguantarme (incluso con mis rollos de amebas y cosas de esas) pero sobretodo por quererme y darme su amor incondicional.*

*Las palabras no son suficientes para dar las gracias a mis padres, por TODO, por vuestro apoyo en todo lo que hago, por la confianza que depositáis en mí, por intentar entenderme a mí y al mundo al que me dedico. Gracias por darme la libertad que me habéis dado siempre, libertad de pensar, de elegir y de decidir. Gracias por vuestro infinito amor.*

*Gracias a todas aquellas personas que se alegran sabiendo que este proyecto se ha hecho realidad.*







# ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| ABREVIATURAS.....   | 17 |
| INTRODUCCIÓN GENERAL.....   | 21 |
| 1. LA ORGANIZACIÓN DE LA CROMATINA EN <i>S. cerevisiae</i> .....              | 23 |
| 2. MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES IMPLICADAS EN<br>LA EXPRESIÓN GÉNICA..... | 28 |
| 2.1. ACETILACIÓN.....   | 29 |
| 2.2. METILACIÓN.....  | 32 |
| 2.3. UBICUITINACIÓN.....  | 34 |
| 2.4. OTRAS MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES.....                              | 37 |
| 3. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN <i>S. cerevisiae</i> .....            | 39 |
| 3.1. LA TRANSCRIPCIÓN POR LA RNAP III.....                                    | 40 |
| 3.2. LA TRANSCRIPCIÓN DE mRNAs POR LA RNAP II.....                            | 48 |
| 4. LA EXPORTACIÓN DE mRNAs.....   | 56 |
| 5. COORDINACIÓN Y ACOPLAMIENTO DE PROCESOS EN LA<br>EXPRESIÓN GÉNICA.....     | 59 |
| 5.1. COORDINACIÓN SAGA-TREX-2.....  | 60 |
| 5.2. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR<br>POSICIONAMIENTO GÉNICO.....     | 62 |
| 6. SAGA y TREX-2 A TRAVÉS DE LA EVOLUCIÓN.....                                | 66 |
| OBJETIVOS.....  | 69 |
| MATERIALES.....   | 73 |
| ANTICUERPOS.....  | 75 |
| CEPAS.....  | 76 |
| KITS COMERCIALES.....   | 80 |
| PLÁSMIDOS.....  | 81 |
| OLIGONUCLEÓTIDOS.....   | 82 |
| MÉTODOS.....  | 83 |
| TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS EN LEVADURA.....                                     | 85 |
| DELECIÓN DE GENES Y ETIQUETADO DE PROTEÍNAS.....                              | 87 |

|   |            |
|---|------------|
| MÉTODOS DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS .....   | 88         |
| MÉTODOS DE MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS .....  | 95         |
| ENSAYO DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA: ENSAYO DE<br>DESUBICUITINACIÓN.....   | 103        |
| TÉCNICAS MICROSCÓPICAS .....  | 106        |
| TÉCNICAS GENÓMICAS.....   | 109        |
| MÉTODOS DE ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LOS DATOS<br>GENÓMICOS .....  | 110        |
| <b>CAPÍTULO 1: ¿Quién es el complejo SLIK? .....</b>  | <b>113</b> |
| <b>INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....</b>   | <b>115</b> |
| <b>RESULTADOS .....</b>   | <b>121</b> |
| 1.1. Caracterización bioquímica y funcional del complejo SLIK. ....   | 121        |
| 1.2. Estudio de la unión de SLIK al promotor de <i>GAL1</i> . .....   | 129        |
| 1.3. Estudio global de unión de la unión de SLIK a la cromatina a<br>través de <i>Sus1</i> . .....                  | 131        |
| <b>DISCUSIÓN .....</b>  | <b>161</b> |
| <b>CAPÍTULO 2: Estudio funcional del módulo de desubicultinación de<br/>SAGA/SLIK.....</b>                          | <b>171</b> |
| <b>INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....</b>   | <b>173</b> |
| <b>RESULTADOS .....</b>   | <b>179</b> |
| 2.1. Los componentes del DUB interaccionan entre sí en mutantes<br>estructurales de SAGA/SLIK. ....                 | 179        |
| 2.2. El módulo <i>DUB-libre</i> de SAGA/SLIK contribuye a mantener los<br>niveles de H2B desubicultinada total..... | 182        |
| 2.3. El <i>DUB-libre</i> desubicultina parcialmente la histona H2B <i>in vitro</i> .<br>.....                       | 184        |
| 2.4. El <i>DUB-libre</i> no se recluta al promotor de <i>GAL1</i> de manera<br>significativa. ....                  | 185        |
| 2.5. La localización del DUB depende de <i>Spt7</i> pero no de <i>Ada1</i> .....                                    | 187        |
| <b>DISCUSIÓN .....</b>  | <b>193</b> |

|   |            |
|---|------------|
| <b>CAPÍTULO 3: Estudio de los mecanismos de la desubicitinación de H2B y su acoplamiento con exportación de mRNAs .....</b> | <b>199</b> |
| <b>INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....</b>   | <b>201</b> |
| <b>RESULTADOS .....</b>   | <b>205</b> |
| 3.1. La ubiquitinación de la histona H2B es necesaria para la interacción del DUB con la cromatina. ....                    | 205        |
| 3.2. La ubiquitinación es necesaria para la unión del DUB al promotor de <i>GAL1</i> .....                                  | 209        |
| 3.3. La interacción del DUB con las histonas es independiente de la actividad desubicitinasa de Ubp8. ....                  | 210        |
| 3.4. La actividad <i>in vitro</i> del DUB es independiente de la ubiquitinación de H2B.....                                 | 213        |
| 3.5. La ubiquitinación de la histona H2B afecta a la exportación de los mRNAs.....  | 215        |
| 3.6. Relación funcional entre la maquinaria de exportación de los mRNAs y la desubicitinación de H2B. ....                  | 218        |
| <b>DISCUSIÓN .....</b>  | <b>225</b> |
| <b>CAPÍTULO 4: Nuevas interacciones funcionales de Sus1 con Sfp1 y prolil isomerasas.....</b>                               | <b>231</b> |
| <b>INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....</b>   | <b>233</b> |
| <b>RESULTADOS .....</b>   | <b>243</b> |
| 4.1. Análisis de las interacciones físicas de Sfp1. ....  | 243        |
| 3.2. Sfp1 participa en la exportación de los mRNAs y en su acumulación en el citoplasma.....                                | 247        |
| 3.4. Sfp1 interacciona con dos peptidil-prolil isomerasas. ....   | 249        |
| 3.5. Cpr1 y Fpr1 interaccionan con SAGA y TREX-2. ....  | 250        |
| 3.6. La localización de Sfp1 depende de Cpr1 y viceversa. ....  | 255        |
| 3.7. Relaciones funcionales entre Sfp1, Cpr1 y otros complejos en el contexto de la transcripción. ....                     | 257        |
| <b>DISCUSIÓN .....</b>  | <b>263</b> |
| <b>PERSPECTIVAS.....</b>  | <b>269</b> |

|                                |     |
|--------------------------------|-----|
| CONCLUSIONES .....             | 275 |
| ARTÍCULOS SUPLEMENTARIOS ..... | 279 |
| BIBLIOGRAFÍA .....             | 285 |

## ABREVIATURAS

|            |  |
|------------|--|
| BSA        | bovine serum albumin (seroalbúmina bovina)   |
| cDNA       | <i>complementary DNA</i> (DNA complementario)  |
| C-terminal | carboxilo terminal   |
| ChIP       | <i>chromatin immunoprecipitation</i> (inmunoprecipitación de cromatina)                      |
| COMPASS    | <i>complex proteins associated with Set1</i> (proteínas de complejo asociadas a Set1)        |
| CTD        | <i>carboxyl-terminal domain</i> (dominio carboxilo terminal)                                 |
| Cy3        | fluoróforo de cianina 3  |
| DAPI       | diclorhidrato de 4 ,6-diamidino-2-fenilindol   |
| DNA        | deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)  |
| dNTPs      | <i>deoxyribonucleotide triphosphate</i> (desoxinucleótidos trifosfato)                       |
| DTT        | 1,4-ditiotreitol   |
| DUB        | <i>deubiquitylation module</i> (módulo de desubicitinación)                                  |
| EDTA       | etilendiaminotetraacetic acid (ácido etilendiaminotetraacético)                              |
| emPAI      | <i>exponentially modified protein abundance index</i> (índice de abundancia de proteínas)    |
| FACT       | <i>facilitates chromatin transcription</i> (facilitador de la transcripción de la cromatina) |
| FISH       | <i>fluorescence in situ hybridization</i> (hibridación fluorescente <i>in situ</i> )         |
| GFP        | <i>green fluorescent protein</i> (proteína verde fluorescente)                               |
| GTFs       | <i>general transcription factors</i> (factores generales de la transcripción)                |
| HA         | hemaglutinina  |
| HEPES      | ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico  |
| HAT        | <i>histone acetyltransferases</i> (histona acetiltransferasa)                                |
| HDAC       | <i>histone deacetylases</i> (histona desacetilasa)   |

|                   |  |
|-------------------|--|
| HMT               | <i>histone methyltransferases</i> (histona metiltransferasa)   |
| IgG               | inmunoglobulina G  |
| IP                | inmunoprecipitado  |
| LB                | medio <i>Luria-Bertani</i>   |
| LC                | <i>liquid chromatography</i> (cromatografía líquida)   |
| Kb                | kilobase   |
| KDa               | kilodalton   |
| mRNA              | <i>messenger ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico mensajero)   |
| mRNP              | <i>messenger ribonucleoprotein particle</i> (ribonucleoproteína mensajera)   |
| MS                | <i>mass spectrometry</i> (espectrometría de masas)   |
| MudPIT            | <i>Multidimensional Protein Identification Technology</i> (Tecnología Multidimensional de Identificación de Proteínas) |
| ncRNA             | <i>non-coding RNA</i> (RNA no codificante)   |
| NFR               | <i>nucleosome free region</i> (región libre de nucleosoma)   |
| NPC               | <i>nuclear pore complex</i> (complejo de poro nuclear)   |
| NP-40             | nonidet P40  |
| N-terminal        | amino terminal   |
| NTP               | <i>nucleoside triphosphate</i> ( <b>nucleósido trifosfato</b> )  |
| OD <sub>600</sub> | <i>optical density 600nm</i> (densidad óptica a 600nm)   |
| Oligo(dT)         | oligonucleótidos deoxitimina   |
| ORF               | <i>open reading frame</i> (pauta abierta de lectura)   |
| PCR               | <i>polymerase chain reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)   |
| PEG               | polietilenglicol   |
| PIC               | <i>pre-initiation complex</i> (complejo de preiniciación)  |
| PMSF              | fluoruro de fenilmetilsulfonilo  |
| poli(A)+          | poliadenilado  |
| P-body            | <i>processing body</i> (cuerpo P o de procesamiento)   |
| p/v               | peso/volumen   |
| qRT-PCR           | <i>quantitative reverse transcription PCR</i> (PCR cuantitativa de retrotranscripción)                                 |
| RiBi              | <i>Ribosome biogenesis</i> (Biogénesis de ribosoma)  |
| RNA               | <i>ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)   |
| RNP               | <i>ribonucleoprotein particle</i> (partícula ribonucleoproteica)   |

|          |   |
|----------|---|
| RP       | <i>Ribosomal protein</i> (proteína ribosómica)  |
| rpm      | revoluciones por minuto   |
| rRNA     | RNA ribosómico  |
| RNAP I   | RNA polimerasa I  |
| RNAP II  | RNA polimerasa II   |
| RNAP III | RNA polimerasa III  |
| RSC      | <i>chromatin structure remodeling complex</i> (complejo remodelador de la cromatina)            |
| RT-PCR   | <i>reverse transcription PCR</i> (PCR de retrotranscripción)                                    |
| SAGA     | <i>Spt/Ada/Gcn5 acetyltransferase complex</i> (complejo acetiltransferasa Spt/Ada/Gcn5)         |
| SA_SPT   | <i>SAGA-associated SuPpressors of Ty</i>  |
| SA_TAF   | <i>SAGA-associated TBP-associated factors</i>   |
| SC       | <i>synthetic complete medium</i> (medio sintético completo)                                     |
| SDS      | <i>sodium dodecyl sulfate</i> (dodecilsulfato sódico)   |
| SDS-PAGE | <i>SDS polyacrylamide gel electrophoresis</i> (electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS) |
| SLIK     | <i>SAGA-like</i> (complejo similar a SAGA)  |
| snRNA    | <i>small nuclear RNA</i> (RNA pequeño nuclear)  |
| snoRNA   | <i>small nucleolar RNA</i> (RNA pequeño nucleolar)  |
| SUMO     | <i>small ubiquitin-related modifier</i> (modificación pequeña similar a la ubiquitina)          |
| TAE      | tris-acetato sódico EDTA  |
| TAFs     | <i>TBP-associated factors</i> (factores asociados a la proteína TBP)                            |
| TAP      | <i>tandem affinity purification</i> (purificación por afinidad en tandem)                       |
| TBE      | tris-borato EDTA  |
| TBP      | <i>TATA-binding protein</i> (proteína de unión a TATA)  |
| TCA      | ácido tricloroacético   |
| TEMED    | N, N, N', N', tetrametiletileno-diamino   |
| TF       | <i>transcriptional factor</i> (factor transcripcional)  |
| Tris     | tris (hidroximetil) aminometano   |
| TREX-2   | <i>transcription export complex 2</i> (complejo transcripción-exportación 2)                    |
| tRNA     | RNA de transferencia  |
| TSS      | <i>transcription start site</i> (sitio de inicio de la transcripción)                           |

|       |   |
|-------|---|
| TTS   | <i>transcription termination site</i> (sitio de final de la transcripción)      |
| UAS   | <i>upstream activation sequence</i> (secuencia de activación aguas arriba)      |
| v/v   | volumen/volumen   |
| WB    | <i>western blot</i>   |
| WT    | <i>wild-type</i> (silvestre)  |
| YPD   | <i>yeast extract-peptone-dextrose</i> (extracto de levadura-peptona-dextrosa)   |
| YPGal | <i>yeast extract-peptone-galactose</i> (extracto de levadura-peptona-galactosa) |
| YPRaf | <i>yeast extract-peptone-raffinose</i> (extracto de levadura-peptona-rafinosa)  |

# INTRODUCCIÓN GENERAL



El alto grado de complejidad que existe en los seres vivos, ha llevado a la búsqueda de herramientas adecuadas para su estudio. Desde hace más de un siglo, se han utilizado organismos que permiten responder de manera más simple a los interrogantes sobre los mecanismos bioquímicos, genéticos y fisiológicos de la vida. Para poder abordar estudios genéticos sobre las funciones nucleares en las células eucariotas se han establecido varios organismos modelo genéticos que son capaces de reproducirse en grandes cantidades a través de ciclos de replicación cortos.

A lo largo de esta tesis doctoral se ha tomado como base para nuestros estudios la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *S. cerevisiae* es un hongo unicelular de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro, que se divide cada 90 minutos aproximadamente a través de un proceso de gemación, de manera que es relativamente sencillo hacer seguimientos durante varias generaciones. Una de las características que convierte a la levadura en un perfecto organismo modelo genético es el proceso de recombinación homóloga del DNA. Este proceso proporciona la capacidad para mutar su genoma y manipular de manera dirigida la expresión génica de la levadura y estudiar los fenotipos resultantes. La alta conservación evolutiva de los sistemas biológicos eucariotas permite extrapolar los datos obtenidos en levadura a sistemas más complejos como el de las células humanas.

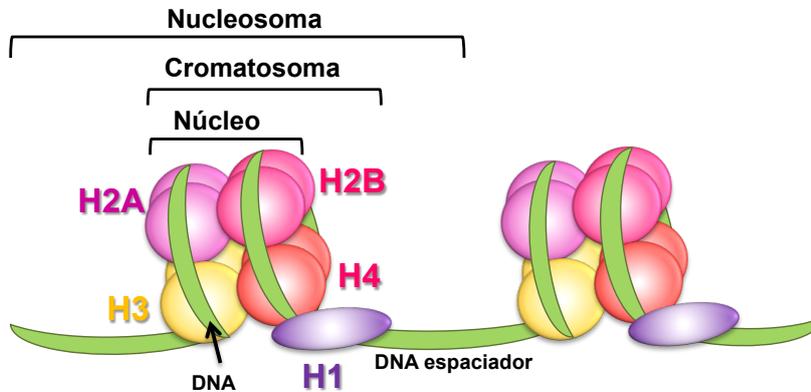
## 1. LA ORGANIZACIÓN DE LA CROMATINA EN *S. cerevisiae*

El genoma haploide de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* haploide contiene 12.000 Kb de DNA que se organizan en 16 cromosomas cuyo tamaño oscila entre 250 y 2500 Kb. Este material genético se encuentra confinado en el núcleo que es un orgánulo

redondeado de 1,5  $\mu\text{m}$  de diámetro. El núcleo está separado del citoplasma celular por una doble membrana interrumpida por los denominados poros nucleares. Los poros nucleares son estructuras de 50-100 nm de diámetro que interconectan los procesos que ocurren en el nucleoplasma y en el citoplasma.

Hace casi dos décadas, el genoma de *S. cerevisiae* se convirtió en el primer genoma eucariota secuenciado (Goffeau *et al.*, 1996). Actualmente, el número de pautas de lectura abierta verificadas (ORFs) es de 5102. Además de este número de ORFs verificadas, existen 719 ORFs sin caracterizar, 786 ORFs dudosas y otras secuencias no codificantes. Estos datos junto con la escasez de intrones y regiones intergénicas, hace que la densidad de genes codificantes de proteínas en el genoma de este organismo sea bastante alta (50 veces más denso que el genoma humano) (<http://yeastgenome.org/>; (Goffeau *et al.*, 1996; Spingola *et al.*, 1999)).

Si el genoma de una célula estuviese extendido de forma lineal sería imposible estéricamente que pudiera confinarse en el núcleo celular. Por ello el DNA genómico no se encuentra desnudo en el núcleo, sino que se organiza asociándose con unas proteínas llamadas histonas. La organización polimérica que establece el DNA junto con las histonas y otras proteínas para empaquetarse es lo que se denomina cromatina (Hansen, 2002; Widom, 1998). La unidad estructural de la cromatina es el nucleosoma (Kornberg, 1974). El núcleo del nucleosoma está compuesto por 146 pb de DNA enrollados alrededor de un octámero de histonas. Cada octámero está formado por dos copias de cada una de las histonas: H2A, H2B, H3 y H4. Los octámeros se unen entre sí a través de un fragmento de DNA espaciador al que se asocia una quinta histona (H1), lo que conforma el nucleosoma completo (Figura I1).



**Figura I1. Organización de la cromatina en nucleosomas.** La unidad fundamental de la cromatina es el nucleosoma. En conjunto, el octámero de histonas H2B, H2A, H3 y H4 forman el núcleo del nucleosoma. El núcleo junto a la histona H1 se conoce como cromatosoma, que junto al DNA espaciador completa la estructura mínima de un nucleosoma.

Las histonas son proteínas pequeñas (de 11 a 21 KDa según el tipo y el organismo) y conservadas en todos los organismos eucariotas. Estas proteínas se caracterizan por contener una región central con estructura de alfa-hélice conocido como dominio *histone-fold*. Este dominio está flanqueado por extensiones N- y C-terminal que pueden exhibir conformaciones más flexibles y son muy importantes para el plegamiento de los nucleosomas en estructuras de orden superior. Estas extensiones o colas contienen una alta densidad y diversidad de modificaciones postraduccionales que afectan a las interacciones entre histonas dentro de un mismo nucleosoma así como a su asociación con el DNA y otros factores (Peterson & Laniel, 2004).

Las histonas poseen una alta carga positiva debido a numerosos residuos de arginina y lisina. Esta carga permite al octámero de histonas interactuar con el esqueleto fosfatado de la molécula de DNA a través de su surco menor (Jansen *et al.*, 2003). Así, el DNA

envuelve 1,65 veces cada octámero en forma de hélice. Debido a la interacción tan estrecha que establecen histonas y DNA, la cromatina no es simplemente una estructura para compactar el DNA, sino que actúa como centro de señalización para todos los procesos relacionados con el DNA, incluyendo replicación, transcripción y reparación de daños. De este modo, es posible controlar tanto la composición como la densidad y posición de cada nucleosoma a lo largo del genoma. Estos procesos se pueden controlar a través de las modificaciones postraduccionales de las histonas, la incorporación de variantes de histonas en los nucleosomas, las chaperonas de histonas y los complejos especializados en remodelar la cromatina.

La organización espacial de los cromosomas en el núcleo eucariota no es aleatoria. Existe una distribución topológica determinada del genoma que juega un importante papel en la regulación de la información genética. La distribución de genes específicos en pequeños territorios cromosómicos en el núcleo de la levadura es importante para establecer interacciones entre un gen con otros genes, con el nucléolo o con la membrana nuclear (Meaburn & Misteli, 2007). De esta forma, la compartimentalización funcional del genoma permite separar regiones activas de regiones inactivas, permitiendo regular sus niveles de expresión (Lanctot *et al.*, 2007). La estructura de la cromatina afecta directamente al estado de activación o represión de una región concreta del genoma, con zonas activas menos condensadas (eucromatina) y regiones inactivas más densas (heterocromatina) (Grunstein *et al.*, 1995). Este estado de condensación afecta a las propiedades físicas de dichas regiones y por tanto, a la probabilidad de interaccionar unas con otras y a su distribución espacial (Meaburn & Misteli, 2007; Tjong *et al.*, 2012). Así pues, genes co-regulados pueden agruparse en los mismos territorios, como es el caso del regulón *GAL*, facilitando la

interacción con la maquinaria transcripcional que regula su expresión (Brickner *et al.*, 2012; Brown *et al.*, 2008; Brown *et al.*, 2006; Schoenfelder *et al.*, 2010). Se han descrito regiones de heterocromatina como los telómeros que están silenciados a través de su anclaje a la envoltura nuclear seguramente por la acumulación de factores de heterocromatina (Taddei *et al.*, 2009). Sin embargo, otros genes se localizan cerca de la envoltura nuclear bajo activación transcripcional a través de interacciones directas con el complejo del poro nuclear (NPC), y de esta forma se facilita la exportación de los RNAs mensajeros (mRNA) del núcleo al citoplasma (Cabal *et al.*, 2006; Casolari *et al.*, 2004; Taddei *et al.*, 2006). El territorio cromosómico mejor delimitado es el nucléolo. En esta región se encuentran distintos compartimentos en los que se da la transcripción de los RNA ribosómicos (rRNA) transcritos por la RNA polimerasa I (RNAP I) y que permite la localización de los rDNAs a suficiente distancia de los centrómeros (Mekhail & Moazed, 2010; Taddei *et al.*, 2010). A pesar de todas las evidencias publicadas al respecto de los territorios cromosómicos, no es posible establecer un único modelo estructural que refleje fielmente las características espaciales del genoma de toda una población dada la considerable variabilidad encontrada entre células individuales (Tjong *et al.*, 2012). Además los mecanismos moleculares que establecen la organización espacial del genoma todavía no están claros (Meaburn & Misteli, 2007).

## 2. MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES IMPLICADAS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA

La cromatina tiene un papel esencial en todos los procesos que requieren el acceso al DNA. La consecuencia principal de este hecho es que la estructura debe ser muy dinámica y estar finamente regulada. Las histonas, y las proteínas implicadas en la expresión génica, pueden ver alterada sus propiedades a través de la adición postraduccional de pequeñas modificaciones químicas. En las histonas estas modificaciones se dan principalmente en el extremo N-terminal debido a que es el extremo que sobresale del nucleosoma, aunque también se han observado modificaciones en C-terminal. Estas modificaciones son uniones covalentes que afectan a las interacciones físicas dentro de cada nucleosoma y entre nucleosomas.

Las principales modificaciones postraduccionales que pueden sufrir las histonas incluyen acetilación, metilación, ubiquitinación, fosforilación, sumoilación y la isomerización de prolinas (Figura I2) (Fuchs *et al.*, 2009; Rando & Winston, 2012). Otro tipo de modificaciones menos frecuentes incluyen la ADP-ribosilación, glicosilación, biotinilación y carbonilación (Adamietz & Rudolph, 1984; Hymes *et al.*, 1995; Liebich *et al.*, 1993; Wondrak *et al.*, 2000). El conjunto de modificaciones que sufren las histonas se engloban bajo el término de marcas epigenéticas. A pesar de que estas modificaciones son estables y pueden perdurar varias generaciones, casi todas ellas son reversibles y por lo tanto, cómo la información epigenética se mantiene y se hereda de una célula madre a una hija es objeto de intenso estudio en la actualidad (Eichten *et al.*, 2014; Lim & Brunet, 2013).

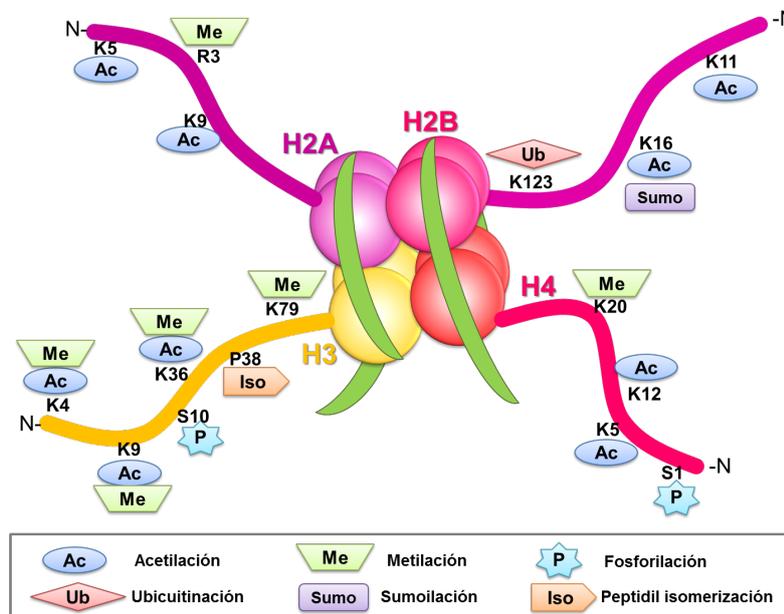


Figura I2. Modificaciones postraduccionales de las histonas. Localización de algunas de las modificaciones postraduccionales en los extremos amino-terminales de las 4 histonas canónicas.

## 2.1. ACETILACIÓN

La relación entre la acetilación y la regulación de la transcripción fue propuesta hace 50 años (Allfrey *et al.*, 1964). Sin embargo, la primera enzima acetilasa conocida en *S. cerevisiae*, Hat1, no parecía tener ninguna relación con la transcripción (Kleff *et al.*, 1995; Parthun *et al.*, 1996; Travis *et al.*, 1984). En este contexto, un evento esencial en el estudio de la relación acetilación-transcripción fue la identificación de Gcn5 como una enzima histona acetil-transferasa (HAT) que previamente ya había sido descrita como factor importante en la activación de la transcripción (Berger *et*

*al.*, 1990; Brownell *et al.*, 1996). De este modo, se demostró como la delección de una enzima HAT provocaba cambios en la transcripción. Los sustratos de Gcn5 son las histonas H2B y H3, aunque también se han descrito sustratos diferentes a las histonas, como la subunidad Rsc4 del complejo RSC (VanDemark *et al.*, 2007).

El segundo evento importante en el estudio de la relación acetilación-transcripción fue la identificación en *S. cerevisiae* de complejos proteicos con actividad HAT (Grant *et al.*, 1997). Trabajos simultáneos identificaron 4 complejos con actividad HAT, dos de ellos con Gcn5 como subunidad catalítica (Grant *et al.*, 1997; Pollard & Peterson, 1997; Saleh *et al.*, 1997). El complejo más estudiado y conocido de los que contienen a Gcn5, es SAGA (Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase) un complejo multiproteico con funciones tanto en iniciación como en elongación de la transcripción (Koutelou *et al.*, 2010). En *S. cerevisiae*, Gcn5 se encuentra en los promotores activos de los genes (Robert *et al.*, 2004) aunque también está implicado en la represión transcripcional de algunos genes en levaduras (Helmlinger *et al.*, 2008; Ricci *et al.*, 2002).

Además de Gcn5, se han descrito otras 3 HATs en *S. cerevisiae* llamadas Sas2, Sas3 y Esa1 (Clarke *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1998). Sas2 forma parte del complejo SAS y participa en el silenciamiento transcripcional de los telómeros (Kimura *et al.*, 2002; Reifsnyder *et al.*, 1996; Suka *et al.*, 2002). Por otro lado, Sas3 forma parte del complejo NuA3, mientras que Esa1 es un componente del complejo NuA4 (Allard *et al.*, 1999; Grant *et al.*, 1997). En contraste con Gcn5, Esa1 acetila las histona H4, H2A y la variante de histona H2A.Z. Es interesante el hecho de que NuA4 comparte algunas de sus subunidades con otros complejos como SAGA/SLIK, Swi/Snf, RSC y SWR1 (Allard *et al.*, 1999; Doyon & Cote, 2004).

Un aspecto interesante de estas enzimas modificadoras de histonas es que muchas de ellas modifican otros sustratos diferentes a las histonas. Por ejemplo, Gcn5 también regula a través de la acetilación la subunidad de RSC, Rsc4 (Choi *et al.*, 2008; VanDemark *et al.*, 2007), y también alguna subunidad del complejo Swi/Snf (Kim *et al.*, 2010). Por otro lado, NuA4 tiene como sustratos varias proteínas no histonas, como Pck1 (Lin *et al.*, 2009). En mamíferos, el ortólogo de Gcn5, PCAF, regula la actividad de p53 a través de sus niveles de acetilación (Barlev *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 1999).

Además de las HATs, varias enzimas histona desacetilasas (HDAC) participan en la regulación de la transcripción, generalmente a través de su efecto represor (Krebs, 2007; Millar & Grunstein, 2006). No obstante, también se han descrito casos en los que participan activando la transcripción (Sharma *et al.*, 2007). A la vez que se describió Gcn5, otro factor asociado a la represión de la transcripción, Rpd3, se identificó como enzima desacetilasa de histonas (HDAC) (Taunton *et al.*, 1996). Las HDACs son reclutadas frecuentemente por un complejo represor llamado Cyc8/Tup1 (Davie *et al.*, 2003). De este modo, es el balance entre los niveles de acetilación y desacetilación lo que va a determinar la regulación final de la transcripción.

La acetilación de histonas no es importante solo en el inicio de la transcripción, sino también en la elongación transcripcional a través de la modificación de histonas de las regiones codificantes de los genes (Fuchs *et al.*, 2009; Smith & Shilatifard, 2010). Los dos complejos acetiltransferasa SAGA y NuA4 son reclutados a las regiones codificantes donde acetilan nucleosomas durante la elongación transcripcional (Ginsburg *et al.*, 2009; Govind *et al.*, 2007a; Wyce *et al.*, 2007). Concretamente, SAGA eleva los niveles de histona H3 acetilada y esto provoca el aumento en la liberación de los nucleosomas, de los niveles de RNA Polimerasa II (RNAP II), y de

mRNA del gen *GAL1* (Govind *et al.*, 2007a). Por otro lado, NuA4 acetila la histona H4 facilitando el reclutamiento del complejo remodelador RSC y el desensamblaje de los nucleosomas, necesario para la correcta elongación de la RNAP II (Ginsburg *et al.*, 2009).

## 2.2. METILACIÓN

De todas las modificaciones de histonas, la metilación es la más diversa en cuanto a número de residuos diana, su potencial de señalización y el número de funciones biológicas que regula. Las histonas son metiladas de manera reversible en los residuos de arginina y lisina (Aletta *et al.*, 1998; Comb *et al.*, 1966). Los residuos de lisina son capaces de aceptar hasta 3 grupos metilo formando derivados mono-, di- y tri-metilados. Los residuos de arginina pueden ser mono- o di-metilados. La mayoría de residuos susceptibles de metilarse en las histonas son sitios canónicos conservados en todos los organismos (H3K4, H3K9, H3K27, H3K79, H3K36, etc...). Sin embargo, existen varios sitios no canónicos susceptibles de sufrir metilaciones (Green *et al.*, 2012; Zee *et al.*, 2011). Esta modificación no altera la carga neta de las histonas pero aumenta su basicidad e hidrofobicidad, aumentando la afinidad de las colas de histonas por moléculas aniónicas como el DNA (Rice & Allis, 2001).

Las metiltransferasas de histonas (HMTs) involucradas en la regulación transcripcional en *S. cerevisiae* son Set1, Set2 y Dot1. Estas HMTs son responsables de modificar la histona H3 en los residuos K4, K36 y K79 respectivamente (Tabla I1). Al igual que en el caso de la acetilación, se han descrito distintas enzimas lisina-desmetilasas (Rph1, Jhd1, etc...) y arginina-desmetilasas (hPADI4), capaces de revertir la metilación (Cuthbert *et al.*, 2004; Klose *et al.*, 2007; Tu *et al.*, 2007).

Tabla I1. Principales enzimas metiltransferasas en levadura.

| Metiltransferasa | Residuo diana | Principal función                                 |
|------------------|---------------|---|
| Set1 (COMPASS)   | K4            | Activación de inicio y elongación transcripcional |
| Set2             | K36           | Regulación de la elongación transcripcional       |
| Dot1             | K79           | Silenciamiento telomérico                         |

Las funciones de la metilación en la regulación de la transcripción no están totalmente esclarecidas y en la mayoría de los casos su mecanismo de acción se da a través del reclutamiento de otros factores.

La metilación del residuo K4 por Set1 se asocia a la función del complejo COMPASS y está implicada en el inicio y elongación de la transcripción (Krogan *et al.*, 2003b; Miller *et al.*, 2001; Nagy *et al.*, 2002). La dimetilación de K4 se asocia tanto a genes activos como inactivos, sin embargo la trimetilación está presente exclusivamente en genes activos (Santos-Rosa *et al.*, 2002). El reclutamiento de COMPASS a los genes activos depende de la previa ubicuitinación de la histona H2B (Dover *et al.*, 2002; Sun & Allis, 2002). Por otro lado, existe un alto número de proteínas de unión a histonas cuya actividad depende directamente de la metilación de H3K4 (Eissenberg & Shilatifard, 2010; Smith & Shilatifard, 2010).

La metilación en K36 se da a través de Set2 y se asocia al reclutamiento de la actividad de HDACs en la elongación (Carrozza *et al.*, 2005; Keogh *et al.*, 2005). Al igual que la trimetilación en H3K4, la trimetilación en H3K36 se asocia de manera global a genes transcripcionalmente activos. Set2 interacciona con la RNAP II elongante y por tanto se recluta con ésta a las regiones codificantes de los genes activos (Krogan *et al.*, 2003b; Pokholok *et al.*, 2005). Sin embargo, la metilación en H3K36 no es necesaria para la elongación sino para activar al complejo desacetilasa Rpd3 produciendo la desacetilación de los genes que se están transcribiendo (Carrozza *et*

*al.*, 2005; Drouin *et al.*, 2010; Govind *et al.*, 2010; Joshi & Struhl, 2005; Keogh *et al.*, 2005). De este modo, la metilación a través de Set2 suprime la transcripción espúrea y mantiene la precisión en la transcripción de la RNAP II (Venkatesh *et al.*, 2012).

Por último, la metilación en K79 a través de Dot1 se da en promotores y regiones codificantes de genes transcripcionalmente activos, aunque su papel no está todavía bien definido (Nguyen *et al.*, 2011). Originalmente esta modificación se identificó relacionada con el silenciamiento telomérico (Singer *et al.*, 1998). A pesar de que de forma similar a la metilación en K4 y K36, la metilación en K79 es global, no existe correlación entre los niveles de K79 metilada y los niveles de transcripción en los genes estudiados. Al igual que la metilación en H3K4, la metilación en H3K79 depende de la previa ubiquitinación de la histona H2B (Briggs *et al.*, 2002; Wood *et al.*, 2003b). La metilación en H3K79 bloquea los sitios de unión de proteínas Sir. El complejo SIR se encarga de mantener el silenciamiento en la cromatina y por tanto, la delección de *DOT1* provoca una unión indiscriminada de SIR a lo largo del genoma alterando así los niveles de silenciamiento de la cromatina (van Leeuwen *et al.*, 2002).

### 2.3. UBICUITINACIÓN

Mientras que la acetilación y metilación adhieren a sus sustratos una molécula pequeña, la ubiquitinación añade a la histona una molécula de mayor tamaño (8,5 KDa, 76 aminoácidos). La ubiquitinación de histonas más descrita es la monoubiquitinación de la histona H2B en la lisina 123 en levaduras (H2B-K123ub) o en la lisina 120 en humanos (H2B-K120ub o H2Bub1). De manera diferente a lo que ocurre con la poliubiquitinación que sirve principalmente para enviar las proteínas a degradación mediada por

el proteasoma, la monoubicuitinación afecta a la función de la proteína y no a su estabilidad.

La ubiquitinación está catalizada por un sistema de 3 enzimas: un enzima activador de la ubiquitina (E1), un enzima conjugante de ubiquitina (E2) que actúa como mediadora, y una ubiquitina ligasa (E3) que confiere la especificidad de sustrato para la reacción (Braun & Madhani, 2012). La monoubicuitinación en *S. cerevisiae* se da a través del enzima ligasa Bre1 (E3) con la participación de Rad6 como enzima conjugadora (E2) y de Lge1 (Hwang *et al.*, 2003; Wood *et al.*, 2003a). La ubiquitinación de la histona H2B parece ser el desencadenante de una ruta ordenada de modificaciones de histonas importantes para la regulación de la transcripción (Braun & Madhani, 2012; Fuchs & Oren, 2014; Osley, 2004). Bre1 interacciona directamente con activadores de la transcripción como Gal4 y se recluta a los promotores estimulado por la actividad de Lge1 (Hwang *et al.*, 2003; Kao *et al.*, 2004; Wood *et al.*, 2003a). Una vez unido al promotor, Bre1 recluta a Rad6. Sin embargo, para la monoubicuitinación son necesarios más factores que activen a Rad6/Bre1 (Osley, 2006; Weake & Workman, 2008).

La monoubicuitinación de la histona H2B ocurre principalmente en genes transcripcionalmente activos. Por un lado, la H2Bub regula el reclutamiento y la actividad de complejos que actúan en los promotores activando la transcripción y en las regiones 5' de los genes. Por otro lado, promueve la estabilidad y ocupación de los nucleosomas en la cromatina y esto puede tener diferentes efectos en los promotores y en las regiones codificantes de los genes. En *S. cerevisiae* la H2Bub está enriquecida en los cuerpos de los genes altamente transcritos y genes largos (Shieh *et al.*, 2011). Contrariamente, los niveles de H2Bub son bajos en el inicio de la mayoría de los genes (Jung *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2009). Para un grupo de genes como *GAL1* o *SUC2*, la ubiquitinación de H2B es

necesaria para la correcta activación de la transcripción (Henry *et al.*, 2003; Pavri *et al.*, 2006). La eliminación de dicha ubiquitina también es un proceso importante para la activación de algunos genes.

Al igual que las otras modificaciones de histonas, la ubiquitinación de la histona H2B es reversible. La ubiquitina puede eliminarse a través de proteasas conocidas como enzimas desubicitinasas (DUBs) (Nijman *et al.*, 2005). En levaduras, se han identificado varias desubicitinasas entre las que destacan Ubp8 y Ubp10 (Emre *et al.*, 2005; Henry *et al.*, 2003). La actividad de Ubp10 tiene lugar mayoritariamente en la heterocromatina relacionada con procesos de silenciamiento telomérico (Osley *et al.*, 2006). Por otro lado, Ubp8 es un componente, al igual que la acetiltransferasa Gcn5, del complejo coactivador de la transcripción SAGA (Daniel *et al.*, 2004; Henry *et al.*, 2003). Ubp8 controla los niveles de ubiquitinación de la histona H2B regulando el inicio de la transcripción, y por otro lado, también es necesario para el reclutamiento de la quinasa Ctk1 esencial para la correcta elongación del mRNA (Wyce *et al.*, 2007).

Además de la histona H2B, se han descrito otros sustratos de Ubp8 o su homólogo en humanos (USP22) diferentes a las histonas. Además de H2Bub, Ubp8/USP22 desubicitina la proteína Snf1 en *S. cerevisiae*, y a TRF1 (Factor de unión a repeticiones teloméricas) y FBP1 (proteína de unión a la región FUSE) en humanos (Atanassov & Dent, 2011; Wilson *et al.*, 2011). Snf1 es una proteína de la familia de las AMP quinasas que a través de su actividad quinasa regula los niveles de fosforilación de factores de transcripción que regulan la expresión de ciertos genes. La desubicitinación de Snf1 mediada por Ubp8, protege a Snf1 de su degradación por el proteasoma aumentando su estabilidad y activando además su fosforilación, esencial para su activación y su translocación al núcleo (Vincent *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 2011).

## 2.4. OTRAS MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES

### *ISOMERIZACIÓN DE PROLINAS*

La isomerización de prolinas cataliza la interconversión de dos conformaciones de los residuos de prolinas. Este cambio de conformación se basa en isomerizaciones. Existen 3 familias de peptidil-prolil isomerasas: ciclofilinas, FKBP's y parvulinas. En *S. cerevisiae* existen 8 ciclofilinas diferentes (Cpr1-Cpr8), 4 FKBP's (Fpr1-Fpr4) y una sola parvulina (Ess1).

Varias de estas enzimas están altamente conservadas desde levaduras hasta humanos. Las ciclofilinas y las FKBP's fueron descritas inicialmente en humanos como proteínas de unión a los inmunosupresores ciclosporina A y FK506 (Fischer *et al.*, 1984; Harding *et al.*, 1989).

De manera general, las prolil isomerasas juegan un papel importante en el correcto plegamiento de las proteínas en la célula. Ni las ciclofilinas ni las FKBP's son esenciales en levadura, sin embargo, la parvulina Ess1 sí es esencial para el crecimiento celular (Lu *et al.*, 1996). Ess1 isomeriza residuos de la cola CTD de la RNAP II preferiblemente tras la fosforilación de su Serina 5. Los cambios conformacionales debidos a la isomerización regulan la fosforilación en Ser7 y controlan el reclutamiento de cofactores facilitando la transición entre inicio, elongación y terminación de la transcripción. Además Ess1 es necesario para la trimetilación en H3K4 (Ma *et al.*, 2012).

Ess1 junto a la ciclofilina Cpr1, interaccionan con el complejo represor de la transcripción Sin3-Rpd3 y regulan su actividad (Arevalo-Rodriguez *et al.*, 2000). Por otro lado, la ciclofilina Cpr1 forma parte del complejo desacetilasa Set3C que actúa desacetilando

histonas elevando los niveles de transcripción en zonas justo posteriores a los promotores de genes activos (Kim & Buratowski, 2009).

Se ha descrito un mecanismo de regulación directa de la expresión génica a través de la isomerización de prolina de la cola N-terminal de la histona H3. La isomerasa Fpr4 es la encargada de llevar a cabo tal modificación en la prolina 38. Dicha modificación inhibe la metilación en H3K36 por Set3 (Nelson *et al.*, 2006). Estos resultados demostraron que la isomerización de prolina regula la transcripción a través de su conexión con la metilación de histonas.

### *SUMOILACIÓN Y FOSFORILACIÓN*

A través de la sumoilación se añade una pequeña proteína denominada SUMO (Small Ubiquitin-related MOdifier). La sumoilación se ha descrito para las 4 histonas (Nathan *et al.*, 2006). Esta modificación ha sido relacionada con procesos de represión transcripcional a través del reclutamiento de HATs y de HP1 (Heterocromatin Protein 1) (Shiio & Eisenman, 2003; Verger *et al.*, 2003). También parece tener un papel atenuando la expresión de genes activos que posteriormente serán reprimidos (Nathan *et al.*, 2003), actuando de manera opuesta a los efectos activadores de la acetilación y ubiquitinación (Nathan *et al.*, 2006).

Por último, la fosforilación en serinas y treoninas también ocurre en las histonas, catalizada por histona-quinasas. Esta modificación introduce dos cargas negativas al residuo diana, y se ha relacionado con la activación transcripcional y la condensación mitótica de los cromosomas (Berger, 2002).

### 3. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN *S. cerevisiae*.

La transcripción de un gen comienza con el ensamblaje de la maquinaria transcripcional sobre su promotor. Acto seguido esta maquinaria se desplaza a lo largo del gen para descifrar la información contenida en el DNA. Una vez convertida la información del DNA a una molécula de RNA, ésta sufre diversas etapas de procesamiento hasta convertirse en RNA maduro.

El proceso de transcripción se divide en 3 etapas principales: inicio, elongación y terminación. En eucariotas es llevado a cabo por múltiples RNA polimerasas dependientes de DNA con funciones muy específicas según el organismo. En levaduras y animales existen 3 RNA polimerasas diferentes (RNAP I, II y III) mientras que en plantas podemos encontrar hasta 5 (RNAP I, II, III, IV y V). La especificidad en las funciones de estas RNA polimerasas se basa tanto en la composición y estructura propia del complejo como de los factores asociados que regulan su actividad, así como la configuración de la cromatina que van a transcribir.

Las RNA polimerasas I, II y III, son complejos enzimáticos relacionados evolutivamente entre ellos. Las principales diferencias entre las RNA polimerasas eucariotas residen en los genes específicos que transcriben. La RNAP I está especializada en la transcripción de precursores de RNA ribosomal (pre-rRNA) que una vez procesados darán lugar a los rRNAs 28S, 18S y 5.8S esenciales para la formación de los ribosomas. La RNAP II es la encargada de la transcripción de todos los RNA mensajeros que codifican para proteínas (mRNA), así como muchos RNAs no codificantes (ncRNA), RNAs pequeños nucleares (snRNA), RNAs pequeños nucleolares (snoRNA) y micro RNAs (miRNA). Por último, la RNAP III transcribe los RNAs de

transferencia (tRNA), el RNA ribosomal 5S, el snRNA U6 esencial para la eliminación de los intrones, el RNA componente de la RNAsa P, y también algunos ncRNAs.

Debido a sus diferentes estructuras, las 3 RNA polimerasas tienen diferentes sensibilidades a drogas y estas características permiten distinguir entre una polimerasa y otra. Por ejemplo, las 3 polimerasas se diferencian en función de su sensibilidad a la  $\alpha$ -amanitina, un péptido que inhibe tanto el inicio como la elongación transcripcional uniéndose directamente a las polimerasas (Tabla I2).

Tabla I2. Principales características de las RNA polimerasas de *S. cerevisiae*.

| Tipo | Localización | Principales transcritos | Sensibilidad a $\alpha$ -amanitina |
|------|--------------|-------------------------|------------------------------------|
| I    | Nucléolo     | 18S, 28S, 5.8S rRNA     | Baja                               |
| II   | Nucleoplasma | mRNA, snRNA             | Muy alta                           |
| III  | Nucleoplasma | tRNA, 5S rRNA           | Sensible a altas concentraciones   |

En relación a los objetivos establecidos para esta tesis y al desarrollo que han llevado los mismos, se describen a continuación las principales características de la transcripción dependiente de las RNAP III y II.

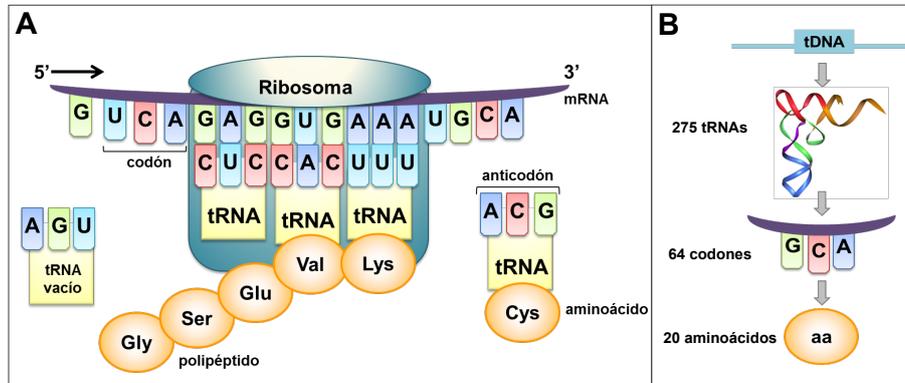
### 3.1. LA TRANSCRIPCIÓN POR LA RNAP III.

La RNAP III es la polimerasa con la composición más compleja de las tres, estando formada por un total de 17 subunidades. De esas 17 subunidades, 5 son comunes entre la RNAP II y RNAP III, mientras que 7 subunidades presentan homología estructural entre ambas polimerasas. Por último, 5 subunidades son específicas de la RNAP III y forman dos subcomplejos (C82/C34/C31 y C53/C37) (Landrieux *et al.*, 2006; Valenzuela *et al.*, 1976; Werner *et al.*, 1992). Estos dos subcomplejos presentan similitudes funcionales y

estructurales con los factores de transcripción basales de la RNAP II, TFIIE y TFIIF (Carter & Drouin, 2010; Geiger *et al.*, 2010; Vannini & Cramer, 2012). Además se sabe que C82/C34/C31 y C53/C37 ocupan posiciones similares en la maquinaria de la RNAP III a las que ocupan TFIIE y TFIIF en el complejo de preiniciación de la RNAP II (Fernandez-Tornero *et al.*, 2011; Fernandez-Tornero *et al.*, 2010; Fernandez-Tornero *et al.*, 2007).

### *LOS tRNAs*

Los RNAs de transferencia o tRNAs son los principales RNAs transcritos por la RNAP III. Estos RNAs actúan como moléculas adaptadoras en el proceso de traducción de mRNA a proteínas. Los tRNAs actúan como unión física entre la secuencia de nucleótidos del mRNA y la secuencia de aminoácidos que se está formando, siendo por tanto los tRNAs el factor limitante en el proceso de elongación traduccional (Figura I3A) (Varenne *et al.*, 1984). Actualmente, hay anotados en el genoma un total de 275 genes codificantes de tRNAs (tDNAs) nucleares distribuidos en los 16 cromosomas de levadura. Sin embargo, los tRNAs solo contienen 64 anticodones diferentes para un total de 20 aminoácidos (61 codifican para codones de aminoácidos y 3 para codones de parada). Esta disparidad entre el número de tRNAs, codones y aminoácidos se explica por el hecho de que un mismo aminoácido puede estar codificado por varios codones distintos que a su vez pueden estar representados en más de una copia de tRNA en el genoma. Por todo ello se ha descrito que el código genético es degenerado (Figura I3B).



**Figura I3. Papel de los tRNAs en la traducción de proteínas.** (A) Esquema del proceso de traducción. Durante este proceso cada molécula de tRNA carga con un aminoácido concreto en función de su anticodón. El ribosoma lee cada codón del mRNA y une su anticodón complementario. Los tRNAs van siendo cargados secuencialmente por el ribosoma para ir uniendo los aminoácidos a la cadena polipeptídica que se está generando. (B) Código genético degenerado. Los tRNAs presentes en la levadura están codificados por 275 genes (tDNAs). Los 275 tRNAs contienen un total de 64 anticodones. De este modo, los 20 aminoácidos existentes pueden estar codificados por uno o más codones diferentes.

Los tRNAs se clasifican en diferentes familias según la secuencia del anticodón. Cada familia de tRNAs puede estar codificada por genes de copia única o de copia múltiple (Bermudez-Santana *et al.*, 2010; Kanaya *et al.*, 2001). La cantidad de tRNAs que hay en un momento dado en la célula es dinámica y cambia según las necesidades celulares para acomodarse a las condiciones en las que se encuentra (Gingold *et al.*, 2012). La contribución de cada familia al total de tRNAs constituye otro mecanismo de regulación de la traducción (Bloom-Ackermann *et al.*, 2014). De este modo, deleciones en tRNAs de familias multi-copia tienen poco efecto en el total de tRNAs ya que existe una redundancia que compensa la pérdida. Por el contrario, deleciones en genes de familias de copia única provocan una respuesta a estrés proteotóxico en la célula (Bloom-Ackermann *et al.*, 2014).

### *ESTRUCTURA GENÓMICA DE LOS tDNAs*

La organización de los elementos promotores que regulan la expresión de los genes transcritos por la RNAP III (genes tipo III) es diferente a la típica distribución de promotores en regiones aguas arriba (*upstream*) de los genes transcritos por la RNAP II. En la mayoría de los genes transcritos por la RNAP III existen dos regiones promotoras que se localizan en el interior de los genes, llamadas caja A y caja B, separadas entre sí por unos 30-60 pb de distancia. En la región *upstream* a unos 30 pb del inicio del gen se encuentra otro elemento regulador, la caja TATA o TATA-like. Por último, el elemento regulador de la terminación más característico de los genes tipo III es una secuencia de varios residuos de timina (poli(T), más de 4 T en vertebrados y más de 5 T en levadura) que actúa de factor de terminación de la transcripción sin necesidad de otros factores.

Por lo general, los tDNAs transcritos por la RNAP III son cortos (menos de 150 pb) de forma que corresponden aproximadamente a la longitud del DNA que cubre un nucleosoma. Sin embargo, se ha descrito que generalmente son genes libres de nucleosomas (Lee *et al.*, 2004; Raab *et al.*, 2012). Existe un nucleosoma muy bien posicionado en la región aguas arriba del inicio del gen a 140 pb antes del TSS, manteniendo la posición -30 bp libre de nucleosomas, importante para la entrada de factores de transcripción. La zona libre de nucleosomas se extiende por todo el cuerpo del gen hasta la zona de terminación, donde se encuentra otro nucleosoma fuertemente posicionado. La posición de este nucleosoma en la región aguas abajo (*downstream*) tiene una influencia directa en la actividad de la RNAP III, y el reciclaje de la misma para el comienzo de un nuevo ciclo de transcripción.

Dos son los principales remodeladores de la cromatina implicados en mantener la característica organización de los nucleosomas en los tDNAs: ISW1 (implicado en la ausencia de nucleosomas en el cuerpo del gen, así como en el posicionamiento del nucleosoma en la región *upstream*) y RSC (regula el posicionamiento del nucleosoma en la zona de terminación *downstream* del gen). La ausencia de nucleosomas en los tDNAs no se debe a características en su secuencia ni a las altas tasas de transcripción de estos genes, sino más bien a un balance entre las actividades de ISW1 y RSC (Kumar & Bhargava, 2013).

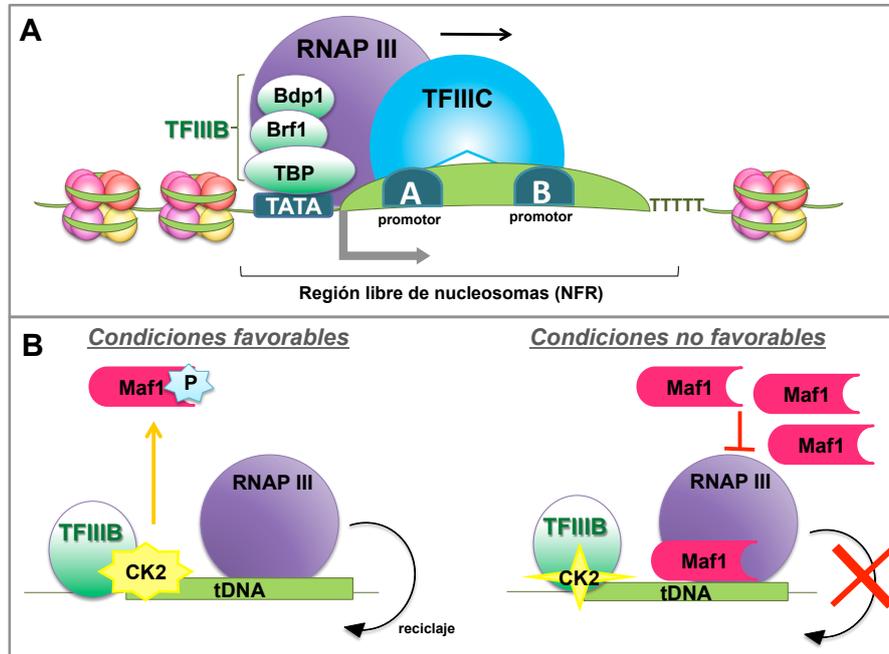
La estructura de la cromatina de los tDNAs es lo que convierte a estos genes en elementos barrera. Por un lado, los elementos barrera generan una frontera entre zonas de heterocromatina y zonas de eucromatina, separando así zonas con una estructura represora de la transcripción de otras zonas cuya estructura es más permisiva con la entrada de factores de transcripción (Brasset & Vaury, 2005). Por otro lado, la presencia de elementos barrera en la cromatina por un lado permite la separación de elementos potenciadores (*enhancer*) o represores de un promotor basal próximo evitando así que factores que se unen a dichos potenciadores o represores puedan afectar activando o reprimiendo al promotor basal erróneamente, activándolo o reprimiéndolo.

Precisamente, los tDNAs influyen la expresión de genes codificantes cercanos que son transcritos por la RNAP II, de manera que la activación de la transcripción de los tDNAs es capaz de reprimir la transcripción mediada por la RNAP II (Hull *et al.*, 1994; Kinsey & Sandmeyer, 1991). Dado que la transcripción y el primer paso del procesamiento de los tRNAs se da principalmente en el nucléolo, estos procesos de silenciamiento génico mediado por los tDNAs no solo dependen de la actividad de la RNAP III sino también de la localización nucleolar de los tDNAs (Haeusler *et al.*, 2008;

Wang *et al.*, 2005). Por otro lado, también se ha descrito que las enzimas acetiltransferasas de histonas (HAT), Gcn5 o Sas2, actúan en conjunto con el tRNA<sup>Thr</sup> para establecer barreras en la heterocromatina (Donze & Kamakaka, 2001). En resumen, el tDNA establece un mecanismo de barrera que depende de sus secuencias adyacentes, así como de factores de transcripción y de la actividad de enzimas HAT.

### **REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN DE LOS tDNAs**

En la regulación de la transcripción de los tDNAs están implicados principalmente un factor de unión al DNA (TFIIIC), un factor de iniciación (TFIIB) y la RNAP III. El primero en interactuar con el DNA es TFIIIC que reconoce las cajas promotoras A y B uniéndose a ellas a través de sus 6 subunidades. TFIIIC recluta a TFIIB a la zona promotora *upstream* del inicio del gen. TFIIB está formado por 3 subunidades, TBP, Brf1 y Bdp1, y a través de ellas establece interacciones estables con el DNA de manera que lo estabiliza para la entrada de la RNAP III en el sentido correcto (Cloutier *et al.*, 2001; Kassavetis & Geiduschek, 2006; Schramm & Hernandez, 2002). Una vez iniciada la transcripción, no son necesarios factores de elongación accesorios sino que la propia RNAP III parece ser la encargada de desplazar a TFIIIC para seguir su camino hasta que llega a la zona de terminación de poli(T) donde se soltará para poder iniciar un nuevo ciclo de transcripción (Figura I4A) (Dieci & Sentenac, 1996).



**Figura I4. Regulación de la transcripción de los tDNAs.** (A) La activación transcripcional de los tDNAs comienza con la unión de TFIIC a ambos promotores internos. TFIIB se une entonces a la caja TATA situada *upstream* del inicio del gen. Este paso recluta a la RNAP III que comenzará a transcribir hasta la región terminadora poli(T). (B) Regulación de RNAP III a través de Maf1. Maf1 se une a la RNAP III durante la elongación. Bajo condiciones favorables, Maf1 es fosforilado por CK2 y se libera de la RNAP III, exportándose al citoplasma. Esto permite el reciclaje de la RNAP III a nuevos ciclos de transcripción. Bajo condiciones desfavorables, CK2 es inactivado y por lo tanto Maf1 se acumula en el núcleo donde permanece unido a la RNAP III, inhibiendo el reinicio de la transcripción.

Otros factores reguladores se han visto implicados en la transcripción de los tRNAs. Entre ellos, el regulador negativo de la RNAP III más importante descrito hasta el momento es la proteína Maf1 que se encarga de inhibir a la RNAP III en condiciones no favorables como son la entrada en fase estacionaria, la respuesta a diversas drogas, el daño del DNA y el estrés oxidativo entre otras

(Boisnard *et al.*, 2009; Ciesla *et al.*, 2007; Desai *et al.*, 2005). La actividad y localización subcelular de Maf1 es dependiente de su estado de fosforilación (Boguta, 2013). Maf1 se une a la RNAP III en cada ciclo de transcripción, y una vez terminada la transcripción, compete con la quinasa caseína 2 (CK2) por unirse a la polimerasa. En condiciones favorables, Maf1 es fosforilada por la quinasa soltándose de la RNAP III a la vez que es exportada al citoplasma, permitiendo el inicio de un nuevo ciclo de transcripción (Figura I4B). En condiciones desfavorables CK2 se inactiva impidiendo la fosforilación de Maf1 que permanece unido a la RNAP III inhibiendo su reciclaje para un nuevo ciclo de transcripción.

De manera opuesta a Maf1, el factor Sub1 tiene funciones de activación de la transcripción de la RNAP III uniéndose tanto a TFIIB como a TFIIC, facilitando así el inicio y reinicio de la transcripción (Tavenet *et al.*, 2009).

Una vez sintetizado el pre-tRNA, sufrirá diversas modificaciones postranscripcionales hasta completar su maduración. Nada más transcribirse en el nucléolo, el pre-tRNA pasa por un proceso de corte de su extremo 5' por la RNasa P. Ya en el nucleoplasma otro proceso similar ocurrirá con el extremo 3' del pre-tRNA, tras lo cual será exportado al citoplasma donde seguirá su maduración con la eliminación de intrones en la membrana mitocondrial. A lo largo de la maduración del pre-tRNA buena parte de sus nucleótidos sufren modificaciones como metilaciones, isomerizaciones o conversiones (Wichtowska *et al.*, 2013).

## 3.2. LA TRANSCRIPCIÓN DE mRNAs POR LA RNAP II.

### 3.2.1. INICIACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN

En eucariotas, el inicio de la transcripción de los genes que codifican proteínas (genes tipo II) involucra la coordinación en el ensamblaje de la RNAP II y los factores generales de la transcripción (GTFs: TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF y TFIIH) para formar el complejo de pre-iniciación (PIC) (Shandilya & Roberts, 2012). Estos componentes configuran la maquinaria basal de la transcripción que se unirá a los promotores de los genes, unión necesaria para la correcta formación del PIC (Smale & Kadonaga, 2003). Uno de los elementos principales del promotor mínimo o basal eucariota es una región rica en A/T conocida como caja TATA que se localiza a 50-120 pb *upstream* del inicio del gen. A esta región se unirá la proteína TBP (TATA Binding Protein).

El inicio de la transcripción se modula a través de reguladores específicos de unión a DNA (los activadores y represores que son capaces de estimular o reprimir la activación específica de un gen) y de complejos modificadores que se asocian específicamente a estos reguladores (coactivadores y correpresores). Un activador típico contiene una región de unión al promotor del gen, y otro dominio de activación que interacciona con otros factores necesarios para la transcripción. Los coactivadores y correpresores se encargan de afinar los efectos de los reguladores sobre la maquinaria basal de la transcripción, modulando su actividad.

Para que todos estos factores puedan actuar, la disrupción nucleosomal es necesaria para permitir la accesibilidad de factores a la cadena molde de DNA (Bernstein *et al.*, 2004). En levadura, los nucleosomas que flanquean el sitio de inicio de la transcripción (TSS)

se localizan en posiciones muy concretas. Por el contrario, se han descrito regiones libres de nucleosomas (NFR) que suelen coincidir con las regiones promotoras e intensificadoras (Lee *et al.*, 2007b; Mavrich *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2005). Algunos de los reguladores de la cromatina capaces de alterar sus propiedades son las chaperonas de histonas, los remodeladores de la cromatina y los complejos modificadores de histonas (Narlikar *et al.*, 2002). Los remodeladores alteran los contactos histona-DNA a través del consumo de ATP lo cual promueve cambios en el posicionamiento de los nucleosomas (Peterson & Workman, 2000; Zhang *et al.*, 2011). Los remodeladores se pueden dividir en dos grupos: grupo ISW1 y grupo SWI/SNF según necesiten o no la presencia de un DNA espaciador para actuar (Hota & Bartholomew, 2011; Whitehouse *et al.*, 2007). La variante de histona H2A.Z también se encuentra en los extremos 5' de los genes transcritos por las RNAP II y III regulando la formación de zonas libres de nucleosomas alrededor de los sitios de inicio de la transcripción (Albert *et al.*, 2007; Mahapatra *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2005).

En *S. cerevisiae*, existen dos vías principales de activación transcripcional. Cada una de estas vías está mediada por un complejo diferente: el factor transcripcional TFIID, y el complejo SAGA (Brownell & Allis, 1996; Grant *et al.*, 1997; Mizzen *et al.*, 1996). TFIID regula el 90% de los genes de levadura que corresponde con los genes involucrados en mantenimiento celular (*housekeeping*). Por otro lado, los genes regulados por SAGA correspondientes al 10% de los genes restante que incluyen genes de respuesta rápida que ven aumentada su expresión en respuesta a diversos estreses. Sus promotores se caracterizan por tener caja TATA, mientras que los regulados por TFIID tienen una secuencia similar conocida como TATA-like (Figura I5) (Huisinga & Pugh, 2004; Lee *et al.*, 2000). Ambos complejos comparten algunas subunidades conocidas como

TAFs (TBP associated factor), pero son el resto de subunidades que los diferencian lo que les confiere la especificidad en sus funciones. Ambas vías de activación difieren cualitativa y cuantitativamente en los factores transcripcionales que se reclutan a los genes regulados por TFIID o por SAGA (Venters *et al.*, 2011). Por ejemplo, NuA4 está vinculado principalmente a TFIID, mientras que los complejos SWI/SNF, RSC y Rad6/Bre1 lo están con la actividad de SAGA. Así, los factores asociados a los genes regulados por SAGA tienden a ocupar regiones cercanas al nucleosoma -1, a diferencia de los factores que trabajan en los genes regulados por TFIID que ocupan preferiblemente la región del nucleosoma +1 (Figura I5) (Venters *et al.*, 2011).

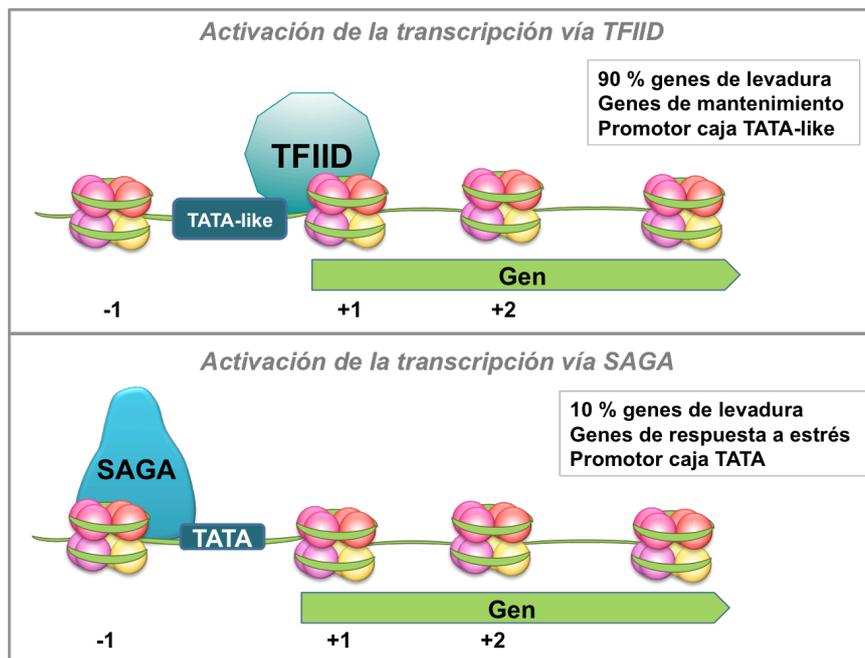


Figura I5. Principales características de las dos principales vías de activación transcripcional.

### EL COMPLEJO SAGA

SAGA es un complejo coactivador transcripcional encargado de modificar la cromatina con el fin de facilitar tanto el inicio como la elongación transcripcional. Este complejo fue descubierto inicialmente en *S. cerevisiae*, pero posteriormente varios estudios han demostrado la alta conservación evolutiva de este complejo en eucariotas como *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana* y humanos (Grant *et al.*, 1997; Martínez *et al.*, 2001; Weake *et al.*, 2008). Estructuralmente es un complejo de 1,8 MDa compuesto por 20 proteínas diferentes con una organización muy específica para la formación del macrocomplejo (Lee *et al.*, 2011).

Como vimos anteriormente, SAGA posee dos actividades catalíticas: actividad acetiltransferasa de histonas (HAT) (Grant *et al.*, 1997; Sterner *et al.*, 1999) y actividad de desubicultinación de la histona H2B (DUB) (Daniel & Grant, 2007; Daniel *et al.*, 2004; Henry *et al.*, 2003). Estas actividades son esenciales para la reestructuración de la cromatina a una conformación abierta y relajada que facilite la entrada de la maquinaria transcripcional (Suganuma & Workman, 2008). La actividad acetiltransferasa reside en el enzima Gcn5 que junto con otras 3 subunidades forma un módulo HAT dentro del complejo (Lee *et al.*, 2011). Por otro lado, la actividad de desubicultinación de la histona H2B reside en el enzima Ubp8 que junto a Sus1, Sgf11 y Sgf73 conforman el módulo DUB de SAGA (Ingvarsdottir *et al.*, 2005; Kohler *et al.*, 2006; Kohler *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2009).

Los distintos módulos de SAGA trabajan juntos para localizar las actividades HAT y DUB del complejo en el promotor de los genes, un paso necesario para la correcta activación transcripcional y para facilitar la elongación a través de las modificaciones en las colas de las

histonas que promueven la liberación de los nucleosomas. El módulo HAT de SAGA reconoce la histona H3K4 metilada y facilita el reclutamiento del complejo al promotor del gen donde acetila la histona H3 en varios residuos de lisina (Balasubramanian *et al.*, 2002; Bhaumik & Green, 2002; Daniel *et al.*, 2004; Kuo *et al.*, 1996). Esta acetilación promueve la unión de TBP y TFIIA al DNA, necesaria para la iniciación de la transcripción (Yu *et al.*, 2003). Además SAGA puede regular la transcripción independientemente de su actividad HAT a través de sus subunidades Spt8 y Spt3 que funcionan como adaptadores para controlar el reclutamiento de TBP y la formación del PIC en los promotores de algunos genes regulados por SAGA (Belotserkovskaya *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2003).

Las funciones de SAGA en la regulación de la transcripción también implican la actividad de desubicultinación (Daniel *et al.*, 2004; Henry *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005; Shukla *et al.*, 2006). La monoubicultinación de la histona H2B en su lisina 123. Esta modificación es esencial para varios procesos celulares como el silenciamiento génico, el crecimiento celular y el inicio de la transcripción (Pavri *et al.*, 2006). Además la monoubicultinación de la lisina 123 de H2B y su posterior desubicultinación a través de la actividad de Ubp8 es clave para la di- y trimetilación de la H3K4, y la posterior activación de la transcripción de los genes dependientes de SAGA (Cabal *et al.*, 2006; Henry *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2007a; Nakanishi *et al.*, 2009; Shukla *et al.*, 2006).

Además de las actividades HAT y DUB, SAGA es también capaz de interactuar física y genéticamente con el Mediador, otro complejo multiproteico con funciones de coactivador de la transcripción (Taatzes, 2010). SAGA recluta al Mediador al dominio de activación de genes específicos (Lee *et al.*, 2010; Roberts & Winston, 1997).

### 3.2.2. ELONGACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN DE mRNAs

La elongación transcripcional comienza con la síntesis procesiva del mRNA cuando la maquinaria sale del promotor y entra en la región codificante. Éste es un proceso dinámico donde la procesividad de la elongación está limitada principalmente por los obstáculos físicos que la RNAP II encuentra a su paso y que pueden frenarla, pararla para su posterior reanudación, o liberarla totalmente del DNA. Para que la elongación sea productiva es necesaria la correcta modificación de la cromatina, y para ello intervienen complejos modificadores como el Elongador, COMPASS y FACT, entre otros (Jimeno-Gonzalez *et al.*, 2006; Krogan & Greenblatt, 2001; Wood *et al.*, 2005).

Además del papel de SAGA en el inicio de la transcripción, varios estudios han revelado funciones de SAGA en la elongación. De este modo, en levaduras SAGA se localiza también en las regiones codificantes de los genes promoviendo co-transcripcionalmente la liberación de nucleosomas necesaria para la procesividad de la elongación (Govind *et al.*, 2007a; Pascual-Garcia *et al.*, 2008; Wyce *et al.*, 2007). Específicamente, la actividad de Ubp8 es necesaria para el reclutamiento de la quinasa Ctk1 que fosforila la cola de la RNAP II (Wyce *et al.*, 2007).

El dominio CTD de la RNAP II es un elemento clave durante toda la transcripción. Este dominio consiste en un número variable (según la especie) de repeticiones del heptapéptido YSPTSPS. El CTD tiene una posición estratégica para la interacción con proteínas implicadas en la transcripción. De todas las modificaciones que puede sufrir la cola CTD, hay que destacar las fosforilaciones y desfosforilaciones en las Serinas 2, 5 y 7. Estas modificaciones modulan de manera muy concreta el reclutamiento secuencial de la maquinaria transcripcional (Bataille *et al.*, 2012; Buratowski, 2003;

Egloff *et al.*, 2012). En la elongación la desubicitinación de H2B es clave para el reclutamiento de Ctk1 que se encarga de fosforilar la Ser2 de la cola CTD. Esta fosforilación promueve el reclutamiento del enzima Set2 para metilar H3K36 y facilitar la unión de la desacetilasa Rpd3 (Carrozza *et al.*, 2005; Keogh *et al.*, 2005; Krogan *et al.*, 2003b). Mediante esta secuencia de eventos se regula la elongación transcripcional de un alto número de genes.

Dentro de las funciones de SAGA en la elongación, también se ha descrito que Sus1, otro componente de su módulo de desubicitinación (DUB) copurifica con la RNAP II y otros factores de exportación de mensajeros que son reclutados a las regiones codificantes cotranscripcionalmente (Pascual-Garcia *et al.*, 2008). Así, SAGA es capaz de modular el proceso de elongación en las regiones codificantes a través de la acetilación (Gcn5), la desubicitinación (Ubp8) y la interacción con la RNAP II y factores de exportación de mRNAs (a través Sus1) (Figura I6).

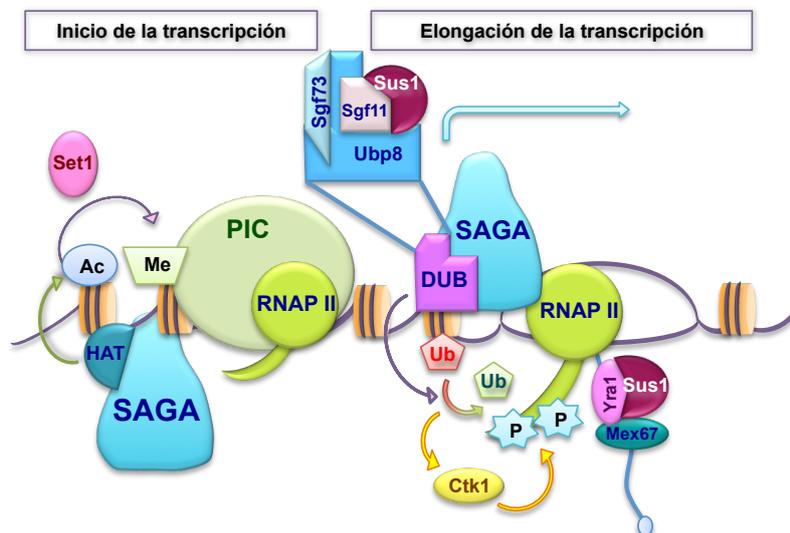


Figura I6. Esquema del papel de SAGA en la activación y elongación transcripcional. SAGA se recluta al promotor del gen bajo activación transcripcional. A través de la acetilación y desubicitinación de histonas se relaja

la cromatina, promoviendo la accesibilidad de factores de transcripción y la formación del PIC. Entonces, la RNAP II es reclutada y sintetiza la molécula de mRNA. Además, la desubicitinación de la histona H2B promueve la fosforilación de la cola CTD de la RNAP II.

### *EL COMPLEJO SLIK EN LA TRANSCRIPCIÓN*

El estudio hace más de una década de la subunidad Spt7 de SAGA llevó al descubrimiento de una forma procesada de dicha subunidad en la que parte de su extremo C-terminal ha sido procesado. Dicha forma truncada de Spt7 se ha asociado a un complejo estructuralmente casi idéntico a SAGA llamado SLIK (SAGA-Like). Principalmente dos son las diferencias estructurales entre SAGA y SLIK: una es la forma truncada de Spt7 presente en SLIK, y otra es la ausencia de la subunidad Spt8 en SLIK pero sí presente en SAGA (Pray-Grant *et al.*, 2002; Sterner *et al.*, 2002; Wu & Winston, 2002).

Hasta la fecha poco se sabe sobre las posibles funciones de SLIK en la expresión génica. Se ha propuesto su implicación en la vía de respuesta retrógrada ya que se ha descrito la proteína Rtg2 como un componente de SLIK pero no presente en SAGA y que está implicada en dicha vía de señalización (Kim *et al.*, 2004; Pray-Grant *et al.*, 2002). Otros trabajos han descrito una redundancia funcional entre SLIK y SAGA (Lee *et al.*, 2009; Pray-Grant *et al.*, 2002). Pese a todo ello, las funciones moleculares específicas de SLIK no son conocidas a día de hoy, quedando en el aire el papel de este macrocomplejo proteico en la regulación de la expresión génica.

## 4. LA EXPORTACIÓN DE mRNAs

Debido a la compartimentación de la célula eucariota, el transporte de moléculas entre el núcleo y el citoplasma es un proceso esencial para la vida celular. Determinadas alteraciones en la actividad de exportación del mRNA del núcleo al citoplasma se han asociado con el desarrollo de enfermedades en humanos como el síndrome de contractura congénita, artrogriposis letal, distrofia muscular, osteogénesis imperfecta o desarrollo de distintos tipos de cáncer (Hurt & Silver, 2008; Jamali *et al.*, 2011; Johnson *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2007; Nousiainen *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009). Entender como la exportación de mRNAs se acopla a otros procesos de la expresión génica es esencial para el desarrollo de terapias adecuadas para las patologías mencionadas.

El complejo del poro nuclear (NPC) constituye la única vía de comunicación entre el núcleo y el citoplasma. La arquitectura característica del NPC está conservada evolutivamente (Hoelz *et al.*, 2011) y consiste en una estructura simétrica en forma de anillo embebida en la envoltura nuclear y que forma el canal central del poro (D'Angelo & Hetzer, 2008). Las diferentes proteínas que forman el NPC se pueden dividir en: nucleoporinas (Nups) andamio que forman el anillo central del NPC; las nucleoporinas transmembrana que unen el anillo central a la membrana nuclear; y por último las nucleoporinas periféricas que forman estructuras auxiliares como las fibrillas citoplasmáticas o la cesta nuclear, y que son esenciales para la regulación de la permeabilidad y selectividad de las funciones del NPC (Pascual-García & Capelson, 2014).

El NPC media la exportación de los RNAs a través de su interacción con proteínas transportadoras. Estos transportadores tienen un papel fundamental en todo el proceso de la biogénesis del mRNA. En *S. cerevisiae* el factor de exportación nuclear de los

mRNAs es Mex67 (Segref *et al.*, 1997). Mex67 es una proteína esencial que forma un heterodímero con Mtr2 que es el encargado de unirse directamente a las Nups del NPC (Senay *et al.*, 2003; Strasser *et al.*, 2000). La inactivación de Mex67 conlleva la acumulación de los mRNAs poliadenilados en el núcleo. Sin embargo, Mex67 necesita proteínas adaptadoras para unirse al mRNA. Yra1 es la principal proteína adaptadora que es reclutada al mRNA a través de la proteína Sub2 y del complejo THO (Jimeno *et al.*, 2002; Strasser & Hurt, 2000, 2001). THO se une al RNA de manera co-transcripcional participando en la fase de elongación. El conjunto de THO, Yra1 y Sub2 es conocido como complejo TREX (Strasser *et al.*, 2002). Una vez que Yra1 es reclutado, Sub2 y THO se liberan permitiendo la interacción Yra1-Mex67-Mtr2-mRNA. En este contexto, Mex67 transporta el mRNA a la periferia nuclear y lo traslada al citoplasma a través del NPC. Ya en el citoplasma Mex67 se disocia del mRNA a través de una RNA helicasa (Dbp5) y su activador (Gle1) (Cole & Scarcelli, 2006; Folkmann *et al.*, 2011). De esa forma Mex67 es capaz de reciclarse volviendo al núcleo para sucesivas rondas de exportación. En todo este proceso otras proteínas también acompañan al mRNA hasta el citoplasma como por ejemplo el factor Npl3. Npl3 es una proteína adaptadora del tipo SR (rica en Ser y Arg) que es regulada por ciclos de fosforilación y desfosforilación que confieren al proceso de exportación la regulación de la dirección necesaria (Gilbert & Guthrie, 2004).

### *EL COMPLEJO TREX-2 EN LA EXPORTACIÓN DE LOS mRNAs*

TREX-2 es un complejo multiproteico involucrado en la exportación de mRNAs en levaduras. Se localiza en la cara interna del NPC y está constituido por la asociación estable de la proteína Sac3 que actúa de andamio, al que se unen las proteínas Thp1, Cdc31, Sem1 y Sus1 (Faza *et al.*, 2009; Fischer *et al.*, 2004; Fischer *et al.*, 2002; Gallardo *et al.*, 2003; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2004; Wilmes *et al.*, 2008). La estructura cristalizada de parte de este complejo ha revelado que el dominio central de Sac3 (dominio CID) adopta una conformación de alpha-hélice alrededor de la cual se enrollan Cdc31 y dos moléculas de Sus1 (Jani *et al.*, 2009). Además, Sac3 se encuentra asociado establemente al NPC a través de las nucleoporinas Nup1 y Nup60 (Oeffinger *et al.*, 2007). Diversos estudios bioquímicos indican que Sus1 y Cdc31 estabilizan la asociación de TREX-2 con el NPC y proveen una plataforma para acoplar la maquinaria de transcripción y la de exportación. Sem1 se une directamente a Thp1 estabilizando la unión Sac3-Thp1 y facilitando el ensamblaje del complejo completo (Ellisdon *et al.*, 2012).

TREX-2 también es capaz de interactuar con los factores de exportación Mex67-Mtr2 lo que sugiere que TREX-2 junto al NPC forman una plataforma para la unión de los mRNAs que han de ser exportados (Figura I7).

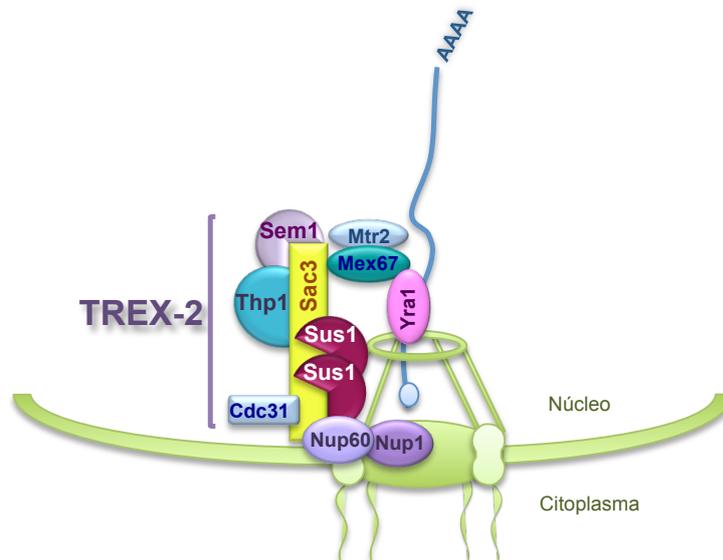


Figura I7. Esquema del papel de TREX-2 en la exportación de los mRNAs. TREX-2 a través de su interacción con el NPC y con factores de exportación que se han unido al mRNA de forma cotranscripcional, favorece la exportación de dicho mRNA.

## 5. COORDINACIÓN Y ACOPLAMIENTO DE PROCESOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA

La expresión génica se ha estudiado tradicionalmente como diferentes procesos individuales que incluyen desde la síntesis de mRNA, procesamiento, exportación, traducción, hasta la degradación, a través de un sistema lineal. Sin embargo, actualmente se entiende la expresión génica como un sistema de procesos acoplados y coordinados (Komili & Silver, 2008). No solo eso, sino que se ha propuesto un nuevo modelo de expresión génica circular. En este modelo, la síntesis de mRNA y su degradación serían procesos acoplados a través de un conjunto de factores denominado

“*synthegadosome*”. Esta maquinaria incluye factores implicados en la degradación citoplasmática de los mRNAs que son capaces de translocarse al núcleo donde regulan la transcripción asociándose directamente a la cromatina, de una manera dependiente de los niveles de degradación de los mRNAs (Haimovich *et al.*, 2013). A través de este sistema, se coordinarían de una manera robusta los niveles finales de mRNA necesarios mediante un sistema circular y no lineal, finamente regulado.

El transporte del mRNA del núcleo al citoplasma es uno de los pasos clave en la expresión génica (Kohler & Hurt, 2007). La correcta exportación depende de muchos pasos que incluyen la transcripción, la eliminación de intrones, el ensamblaje de la molécula de mRNA con otras proteínas (mRNP), el procesamiento del extremo 3' y por supuesto, el reclutamiento al NPC (Bentley, 2005; Buratowski, 2005; Rosonina *et al.*, 2006). De esta forma, factores de exportación son reclutados no solo a los pre-mRNAs sino directamente a genes activos. Además, tanto el NPC como parte de su maquinaria asociada, como TREX-2, generan un ambiente adecuado para la regulación de la expresión génica (Rondon *et al.*, 2010). Se ha descrito que la existencia de fallos en la conexión entre transcripción y exportación de los mRNAs son la causa molecular de varias enfermedades humanas (Nousiainen *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2007).

### 5.1. COORDINACIÓN SAGA-TREX-2

La coordinación entre los diferentes procesos de la biogénesis de los mRNAs está mediada por la interacción física de los factores implicados en dichos procesos. De hecho, las proteínas involucradas en pasos tempranos de la biogénesis del mRNA interactúan con el NPC, la maquinaria de exportación y factores necesarios para procesos posteriores (Luna *et al.*, 2008; Schmid & Jensen, 2008).

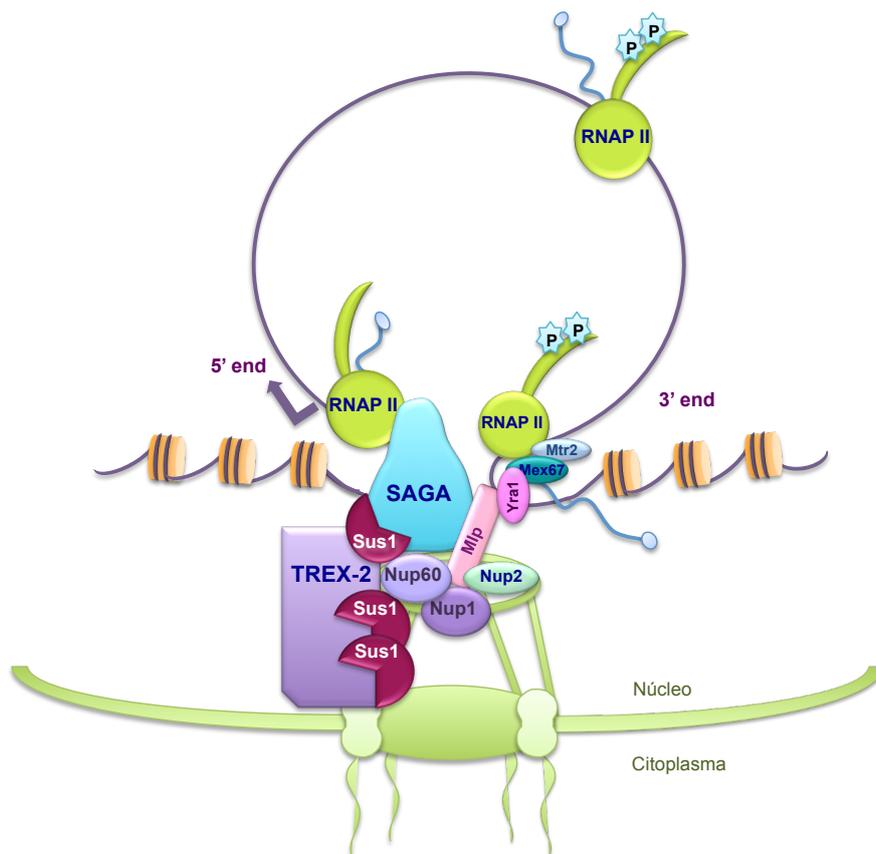
Parte de estas interacciones se establecen entre factores de los complejos SAGA y TREX-2 para permitir la coordinación entre la transcripción y la exportación de la mRNP a través del NPC. Sus1 como componente común de ambos complejos es el factor clave para la coordinación de estas maquinarias (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2004). Sus1 es reclutado a la región UAS de los promotores a través de SAGA en condiciones de inducción transcripcional. La fosforilación de la RNAP II durante la elongación promueve el reclutamiento de Sus1 a la cromatina que se está transcribiendo. Tanto SAGA como TREX-2 son necesarios para esta asociación. Así, la interacción de Sus1 con Mex67 e Yra1 sugiere que se podría reclutar a la RNAP II elongante a través de su interacción con estos factores. De manera que la interacción de Sus1 con factores de exportación así como con SAGA y TREX-2 podría estar creando un ambiente molecular apropiado para una rápida inducción y transcripción de los genes regulados por SAGA (Faza *et al.*, 2009; Gonzalez-Aguilera *et al.*, 2008; Govind *et al.*, 2007a; Pascual-García *et al.*, 2008). No obstante, las funciones de Sus1 a lo largo de la vida del mRNA no se limitan al núcleo, sino que se extienden al citoplasma donde interacciona con la maquinaria de degradación de mRNAs bajo ciertas circunstancias (Cuenca-Bono *et al.*, 2010). Todas estas evidencias pusieron de manifiesto que Sus1 es una pieza clave a lo largo de toda la vida del mRNA.

Además de Sus1, otro componente de TREX-2, Sem1, también juega un papel interesante en el acoplamiento entre SAGA y TREX-2 en la transcripción. Sem1 al igual que Sus1 es necesario para la inducción de algunos de los genes regulados por SAGA, como *GAL1* y *ARG1*. Esto es debido al papel que juega Sem1 en el reclutamiento de SAGA al promotor de dichos genes y su influencia directa sobre la actividad de desubicitinación del módulo DUB de SAGA (García-Oliver *et al.*, 2013).

## 5.2. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR POSICIONAMIENTO GÉNICO

Cada vez más datos sugieren que la interacción entre TREX-2 y SAGA media el reclutamiento de genes al NPC bajo activación transcripcional para asegurar una buena procesividad y estabilidad genética (Cabal *et al.*, 2006; Capelson *et al.*, 2010; Chekanova *et al.*, 2008; Faza *et al.*, 2009; Pascual-Garcia *et al.*, 2008). Sus1 junto a la nucleoporina Nup1 son necesarios para la interacción física entre TREX-2 y el NPC (Fischer *et al.*, 2004; Jani *et al.*, 2009; Kohler *et al.*, 2008). Estas interacciones hacen que la coordinación entre SAGA, TREX-2 y el NPC sea esencial para la regulación transcripcional. En esta línea, la nucleoporina Nup2 y las proteínas asociadas a la membrana nuclear interna (proteínas Mlps) tienden a asociarse con el final de genes activos, lo que sugiere que en el entorno del NPC, el DNA adoptaría una conformación de lazo estableciendo así un dominio de cromatina activa (Burgess-Beusse *et al.*, 2002; Casolari *et al.*, 2005; Gerasimova *et al.*, 2000; Ishii *et al.*, 2002; Schmid *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2004). Este lazo de cromatina se formaría a través de la interacción de la maquinaria del inicio de la transcripción con factores del procesamiento del mRNA en su extremo 3' (Ansari & Hampsey, 2005; Hampsey *et al.*, 2011; O'Sullivan *et al.*, 2004; Singh & Hampsey, 2007). Esta conformación facilitaría el reciclaje de factores de transcripción como la RNAP II, mejorando así la expresión génica. No solo eso, sino que también facilitaría la re-activación de la transcripción tras períodos cortos de represión transcripcional, fenómeno conocido como “*memory gene looping*” (Tan-Wong *et al.*, 2009). Este fenómeno confiere la capacidad de una mayor y mejor respuesta y versatilidad a cambios en la expresión génica ante diferentes condiciones ambientales. En este contexto, SAGA y

TREX-2 podrían tener un papel importante en la eficiencia del anclaje del gen activo al NPC durante estos procesos (Figura I8) (Luthra *et al.*, 2007; Tan-Wong *et al.*, 2009).



**Figura I8. Coordinación entre SAGA y TREX-2. SAGA se recluta a la cromatina bajo activación transcripcional. SAGA relaja la cromatina permitiendo la unión de la RNAP II. El acercamiento al poro del gen activo a través de la interacción de SAGA con TREX-2 promueve la formación de un lazo en el NPC. Mlp1, una proteína asociada a la cesta del NPC, contribuye al anclaje del gen y a la estabilización del lazo uniéndose a través de SAGA al promotor activo del gen y a su extremo 3'. Las nucleoporinas Nup1 y Nup60 también contribuyen a este proceso uniéndose a TREX-2 y a Mlp1.**

Se han descrito varios ejemplos del fenómeno de regulación génica a través del posicionamiento de los genes dentro del núcleo. Los descubrimientos en este tema han cambiado el paradigma de que la periferia nuclear se asocia a silenciamiento génico. Los genes más estudiados que se localizan preferentemente en la periferia nuclear bajo condiciones de inducción transcripcional son *GAL1* e *INO1*. Los genes *GAL* son un grupo de genes inducibles que se expresan en crecimiento en galactosa, mientras que con medios de cultivo que contienen glucosa son reprimidos y se localizan en el interior del núcleo (St John *et al.*, 1981). Cuando son inducidos, son capaces de ser reubicados a la periferia nuclear y asociarse a las nucleoporinas, y además cuando tras un periodo de represión son reactivados por galactosa, el incremento en los transcritos de los genes *GAL* ocurre mucho más rápido que en la activación inicial por el proceso de memoria transcripcional (Brickner *et al.*, 2007; Casolari *et al.*, 2004; Kundu *et al.*, 2007; Zacharioudakis *et al.*, 2007). En el caso del gen *INO1*, que codifica para una inositol-3-fosfato sintasa, este fenómeno va más allá ya que su activación requiere un posicionamiento previo en la periferia nuclear (Brickner & Walter, 2004). Este reclutamiento de *INO1* al entorno del NPC se da gracias a dos secuencias de reclutamiento del gen (*Gene Recruitment Sequences*, GRS) que son necesarias y suficientes para el posicionamiento e inducción del gen (Ahmed *et al.*, 2010). Además otra secuencia llamada *Memory Recruitment Sequence* (MRS) es la encargada de mantener el gen en la periferia nuclear en condiciones represivas esperando para la reactivación de la transcripción (Light *et al.*, 2010).

En este contexto, los datos sugieren que son bastantes los genes que se asocian a los poros nucleares a través de la interacción SAGA-TREX-2-NPC utilizándolos como punto de anclaje a la periferia nuclear y regular así su expresión génica. Este anclaje puede desestabilizarse de manera intencionada en ciertas circunstancias

como en la replicación. Con el fin de evitar la inestabilidad de la horquilla de replicación es necesario liberar la cromatina de la periferia nuclear a través de quinasas que fosforilan nucleoporinas desestabilizando la unión SAGA-TREX-2-NPC (Bermejo *et al.*, 2011).

Al igual que se ha descrito el mecanismo de acercamiento al poro nuclear de algunos genes transcritos por la RNAP II, recientemente también ha sido publicado un mecanismo similar a éste para la localización de algunos tDNAs (Chen & Gartenberg, 2014). De este modo, los tDNAs migran a los NPCs en la fase M del ciclo celular, donde la interacción tDNA-NPC es mediada por la exportina Los1, encargada de la exportación de los pre-tRNAs. A través de este mecanismo se acoplan la síntesis de tRNAs y la exportación de los mismos. Sin embargo, este fenómeno no es esencial para la supervivencia celular, aunque sí importante para la eficiencia de todos estos procesos. Todavía no existe una teoría clara sobre cómo los pre-tRNAs nacidos en el NPC sufren los procesos de maduración que tradicionalmente se han descrito en el interior del núcleo. Una propuesta es que los pre-tRNAs sintetizados en el NPC vuelvan al interior del núcleo después de su síntesis para ser procesados y vuelvan posteriormente a la periferia nuclear para ser exportados. Sin embargo, existe otra teoría más plausible, y es que los procesos de maduración que hasta ahora se han descrito en el interior del núcleo se estén dando en la periferia nuclear como ya se ha descrito en *Caenorhabditis elegans* (Ikegami & Lieb, 2013).

## 6. SAGA y TREX-2 A TRAVES DE LA EVOLUCIÓN

SAGA fue descubierto en *S. cerevisiae* y se ha demostrado su alto grado de conservación a lo largo de la evolución. Numerosos estudios han identificado homólogos de varios componentes de SAGA. En metazoos, el gen GCN5 produce dos isoformas diferentes, una corta similar al Gcn5 de levadura, y otra larga que corresponde con la versión de la proteína en *Drosophila*, ratón y humanos. De igual forma que en levaduras, los homólogos humanos de GCN5, ADA3 y ADA2 interaccionan para regular la acetilación de la cromatina (Carre *et al.*, 2005; Grau *et al.*, 2008; Qi *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008). En este sentido, el módulo DUB también está conservado tanto en composición como en función y sus funciones están ligadas a numerosas enfermedades humanas como ataxias, cáncer, diabetes o deficiencias en desarrollo neural (Dames *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013; Mohan *et al.*, 2014; Ning *et al.*, 2014; Sussman *et al.*, 2013).

La versión en humanos de TREX-2 participa en el movimiento de los mRNAs desde el sitio de transcripción hasta la periferia nuclear. A pesar de que TREX-2 es un complejo asociado al NPC de manera estable (Umlauf *et al.*, 2013), el ortólogo humano de Sac3 (GANP) actúa con los homólogos de Cdc31 (centrin-2) y Sus1 (ENY2) en el transporte de mRNAs desde las zonas de transcripción hacia los poros nucleares. Sin embargo, no se ha descrito acercamiento activo del gen a la periferia nuclear (Jani *et al.*, 2012; Wickramasinghe *et al.*, 2010).

ENY2, el homólogo de Sus1 en *Drosophila melanogaster* y humanos ha sido descrito como componente del complejo SAGA donde interacciona con los ortólogos de los componentes del módulo DUB (Kopytova *et al.*, 2010; Lang *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2008). Así

mismo también ha sido descrito como componente del complejo TREX-2 humano (Kurshakova *et al.*, 2007). En *D. melanogaster*, ENY2 además de actuar como coactivador controla la activación transcripcional participando en procesos de efecto barrera impidiendo la difusión de las regiones de heterocromatina (Maksimenko *et al.*, 2014).



## OBJETIVOS



A lo largo de esta tesis doctoral hemos profundizado en el estudio de la regulación de la expresión génica a través del acoplamiento y coordinación de los mecanismos de transcripción y exportación de los RNAs. Sus1 como parte de diferentes complejos multiproteicos juega un papel clave en dicho acoplamiento participando en procesos tanto nucleares como citoplasmáticos a lo largo de la vida del mRNA.

Con el fin de elucidar y profundizar en las funciones de Sus1 a través de los complejos SAGA, SLIK y TREX-2, pero también a través de sus relaciones con otros factores implicados en la expresión génica, establecimos los siguientes objetivos:

- ≡ Estudiar las funciones del complejo SLIK a través de Sus1 tanto en la transcripción como en la exportación de los RNAs.
- ≡ Profundizar en las funciones del módulo de desubicitinación (DUB) de los complejos SAGA/SLIK, así como sus mecanismos de regulación y el acoplamiento de sus funciones con la exportación de los mRNAs.
- ≡ Estudiar la relación física y funcional de Sus1 con otros factores de transcripción y proteínas relacionadas con la expresión génica.



# MATERIALES



## ANTICUERPOS

### *Anticuerpos Primarios*

A lo largo de esta tesis se han utilizado los anticuerpos que se detallan en la siguiente tabla a las concentraciones que se indican en ella para el análisis por Western Blot (WB):

| Nombre                    | Huésped | Dilución y aplicación | Origen/ Proveedor                                  |
|---------------------------|---------|-----------------------|--|
| Anti-TAP                  | Conejo  | 1:5000 (WB)           | Thermo scientific (Pierce)                         |
| Anti-Flag                 | Conejo  | 1:2000 (WB)           | Sigma Scientific                                   |
| Anti-HA<br>High affinity  | Rata    | 1:1000 (WB)           | Roche  |
| Anti-PK                   | Ratón   | 1:2000 (WB)           | ABD Serotec  |
| Anti-Sem1                 | Conejo  | 1:10000 (WB)          | Dr. Kobayashi<br>(Universidad de Kyushu,<br>Japón) |
| Anti-Taf12                | Conejo  | 1:2000 (WB)           | Dr. Hinnebusch<br>(NICHD- NIH, EEUU)               |
| Anti-Pgk1                 | Conejo  | 1:20000 (WB)          | Thermo Scientific<br>(Pierce)                      |
| Anti-H2B-<br>ubiquitinada | Conejo  | 1:5000 (WB)           | Cell Signaling Technology                          |

### *Anticuerpos Secundarios*

| Nombre                                | Origen/ Proveedor |
|---------------------------------------|-------------------|
| Anti-Ratón-IgG-ECL <sup>TM</sup> HRP  | GE Healthcare     |
| Anti-Conejo-IgG-ECL <sup>TM</sup> HRP | GE Healthcare     |
| Anti-Rata-IgG-ECL <sup>TM</sup> HRP   | DAKO              |

Para la detección de la inmunotinción se ha utilizado el revelador ECL Select o ECL Prime, de GE Healthcare.

## CEPAS

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en esta tesis se detallan a continuación:

| Nombre                    | Genotipo   | Origen                        |
|---------------------------|--|-------------------------------|
| BY4741                    | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0</i>  | Euroscarf                     |
| <i>cpr1Δ</i>              | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0<br/>cpr1::KANMX4</i>                         | Euroscarf                     |
| <i>sfp1Δ</i>              | <i>Mat α, leu2-Δ0, his3-Δ1, lys2-Δ0, ura3-Δ0<br/>sfp1::KANMX4</i>                          | Dr. S. Chávez                 |
| <i>sfp1Δ cpr1Δ</i>        | <i>Mat a, his3-Δ1, leu2-Δ0, lys2-Δ0, met15-Δ0, ura3-Δ0,<br/>sfp1::KanMX4, cpr1::KanMX4</i> | Dr. S. Chávez                 |
| <i>sgf73Δ</i>             | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0<br/>sgf73::KANMX4</i>                        | Euroscarf                     |
| <i>sus1Δ</i>              | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0<br/>sus1::KANMX4</i>                         | Este laboratorio              |
| <i>ubp8Δ</i>              | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0<br/>ubp8::KANMX4</i>                         | Euroscarf                     |
| <i>spt7-1180</i>          | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, spt7-1180::KanMX4</i>                                | Esta tesis                    |
| <i>spt7-1180 spt8Δ</i>    | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, spt7-1180::HIS3, spt8::KanMX4</i>                    | Esta tesis                    |
| SUS1-TAP                  | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, SUS1-TAP::URA3</i>                                   | Este laboratorio              |
| SUS1-TAP <i>ubp8Δ</i>     | <i>Mat α, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, SUS1-TAP::TRP1, ubp8::KanMX4</i>                   | Este laboratorio              |
| SUS1-TAP <i>sem1Δ</i>     | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, SUS1-TAP::URA3, sem1::KanMX4</i>            | (García-Oliver et al., 2013)  |
| SUS1-TAP <i>sgf73Δ</i>    | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, SUS1-TAP::URA3, sgf73::KanMX4</i>           | (Pascual-García et al., 2008) |
| SUS1-TAP <i>nup60Δ</i>    | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, SUS1-TAP::URA3, nup60::KanMX4</i>           | Este laboratorio              |
| SUS1-TAP <i>pep4Δ</i>     | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, SUS1-TAP::URA3 pep4::KanMX4</i>                      | Esta tesis                    |
| SUS1-TAP <i>spt7-1180</i> | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, SUS1-TAP::URA3 spt7-1180::KanMX4</i>                 | Esta tesis                    |

|                               |  |                              |
|-------------------------------|--|------------------------------|
| SUS1-TAP <i>spt8</i> Δ        | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, SUS1-TAP::URA3 spt8::KanMX4</i>                | Esta tesis                   |
| SUS1-TAP <i>spt7-1180</i> -PK | <i>Mat a, leu2-Δ0, met15-Δ0, SUS1-TAP::URA3 spt7-1180-PK::HIS3</i>                   | Esta tesis                   |
| SUS1-TAP <i>spt7</i> Δ        | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, SUS1-TAP::URA3 spt7::KanMX4</i>                | Esta tesis                   |
| SUS1-TAP <i>spt20</i> Δ       | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, SUS1-TAP::URA3 spt20::KanMX4</i>               | Este laboratorio             |
| SUS1-TAP <i>ada1</i> Δ        | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, SUS1-TAP::URA3 ada1::KanMX4</i>                | Este laboratorio             |
| SUS1-TAP <i>bre1</i> Δ        | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, SUS1-TAP::URA3 bre1::KanMX4</i>                | Esta tesis                   |
| SUS1-TAP <i>spt7-1180</i>     | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, SUS1-TAP::URA3, spt7-1180::KanMX4</i>          | Esta tesis                   |
| ADA2-TAP                      | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, ADA2-TAP::URA3</i>                    | (García-Oliver et al., 2013) |
| ADA2-TAP <i>spt7-1180</i>     | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, ADA2-TAP::URA3, spt7-1180::KanMX4</i> | Esta tesis                   |
| GCN5-TAP                      | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, GCN5-TAP::URA3</i>                    | Esta tesis                   |
| GCN5-TAP <i>spt7-1180</i>     | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, GCN5-TAP::URA3, spt7-1180::KanMX4</i> | Esta tesis                   |
| UBP8-TAP                      | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, UBP8-TAP::URA3</i>                    | (García-Oliver et al., 2013) |
| UBP8-TAP <i>sus1</i> Δ        | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, UBP8-TAP::URA3, sus1::KanMX4</i>      | Esta tesis                   |
| UBP8-TAP <i>spt7</i> Δ        | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, UBP8-TAP::URA3, spt7::KanMX4</i>      | Esta tesis                   |
| UBP8-TAP <i>sac3</i> Δ        | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, UBP8-TAP::URA3, sac3::KanMX4</i>      | Esta tesis                   |
| UBP8-TAP <i>nup60</i> Δ       | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, UBP8-TAP::URA3, nup60::KanMX4</i>     | Esta tesis                   |
| UBP8-TAP <i>sem1</i> Δ        | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, UBP8-TAP::URA3, sem1::KanMX4</i>      | Este laboratorio             |
| UBP8-TAP <i>spt7-1180</i>     | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, UBP8-TAP::URA3, spt7-1180::KanMX4</i>          | Esta tesis                   |
| SFP1-TAP                      | <i>Mat a, leu2-Δ0, ura3-Δ0, met15-Δ0, SFP1-TAP::HIS3</i>                             | Dr. S. Chávez                |

|                           |  |                      |
|---------------------------|--|----------------------|
| CPR1-TAP                  | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, CPR1-TAP::URA3</i>                         | Esta tesis           |
| FPR1-TAP                  | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, FPR1-TAP::URA3</i>                         | Esta tesis           |
| <i>CPR1-TAP sfp1Δ</i>     | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, CPR1-TAP::URA3, sfp1::KanMX4</i>           | Dr. S. Chávez        |
| <i>FPR1-TAP sfp1Δ</i>     | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, FPR1-TAP::URA3, sfp1::KanMX4</i>           | Esta tesis           |
| SFP1-TAP<br>FPR1-6PK      | <i>Mat a, leu2-Δ0, met15-Δ0, SFP1-TAP::URA3, FPR1-6PK::HIS3</i>                  | Esta tesis           |
| SFP1-TAP<br>CPR1-6PK      | <i>Mat a, leu2-Δ0, met15-Δ0, SFP1-TAP::URA3, CPR1-6PK::HIS3</i>                  | Esta tesis           |
| SUS1-GFP                  | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0 SUS1-GFP::KanMX4</i>               | Esta tesis           |
| SGF11-GFP                 | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0 SGF11-GFP::HIS3</i>                | Esta tesis           |
| UBP8-GFP                  | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0 UBP8-GFP::HIS3</i>                 | Esta tesis           |
| SUS1-GFP <i>spt7Δ</i>     | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0 SUS1-GFP::HIS3, spt7::KanMX4,</i>  | Esta tesis           |
| SGF11-GFP<br><i>ada1Δ</i> | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, SGF11-GFP::HIS3, ada1::KanMX4</i> | Esta tesis           |
| SGF11-GFP<br><i>sus1Δ</i> | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, SGF11-GFP::HIS3, sus1::KanMX4</i> | Esta tesis           |
| UBP8-GFP<br><i>ada1Δ</i>  | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0 UBP8-GFP::HIS3, ada1::KanMX4</i>   | Esta tesis           |
| UBP8-GFP <i>sus1Δ</i>     | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0 UBP8-GFP::HIS3, sus1::KanMX4</i>   | Esta tesis           |
| UBP8-GFP <i>spt7Δ</i>     | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0 UBP8-GFP::HIS3, spt7::KanMX4</i>   | Esta tesis           |
| HA- <i>spt7-1180-TAP</i>  | <i>Mat a HA-spt7-1180-TAP::TRP1 ura3_0 leu2_1 trp1_63 his4-917_ lys2-173R2</i>   | (Wu & Winston, 2002) |
| CPR1-GFP                  | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, CPR1-GFP::HIS3</i>                | Esta tesis           |
| CPR1-GFP <i>sfp1Δ</i>     | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, CPR1-GFP::HIS3, sfp1::KanMX4</i>  | Esta tesis           |
| SFP1-GFP                  | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, SFP1-GFP::NAT</i>                 | Dr. S. Chávez        |
|                           |  |                      |

|                               |   |                                       |
|-------------------------------|---|---------------------------------------|
| SFP1-GFP <i>cpr1</i> Δ        | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, SFP1-GFP::NAT, cpr1::KanMX4</i>  | Dr. S. Chávez                         |
| SET3-GFP                      | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, SET3-GFP::KanMX4</i>   | Esta tesis                            |
| SET3-GFP <i>sfp1</i> Δ        | <i>Mat a, leu2-Δ0, met15-Δ0, ura3-Δ0, SET3-GFP::HIS3, sfp1::KanMX4</i>  | Esta tesis                            |
| CFK920 HTB1                   | <i>Mat a, hta1-htb1::LEU2, hta2-htb2, ura3-1, trp1-1, leu2-3,-112, his3-11, ade2-1, can1-100, GAPDH-HA-UBI4::URA3 &lt;pZS145 HTA1-Flag-HTB1, CEN, HIS3&gt;</i>                        | (Fleming <i>et al.</i> , 2008)        |
| CFK921 htb1-K123R             | <i>Mat a, hta1-htb1::LEU2, hta2-htb2, ura3-1, trp1-1, leu2-3,-112, his3-11, ade2-1, can1-100, GAPDH-HA-UBI4::URA3 &lt;pZS146 HTA1-Flag-htb1-K123R, CEN, HIS3&gt;</i>                  | (Fleming <i>et al.</i> , 2008)        |
| SUS1-MYC                      | <i>Mat a, leu2-Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, ura3-Δ0, SUS1-MYC::HIS3</i>   | (Pascual-García <i>et al.</i> , 2008) |
| CFK920 HTB1<br>SUS1-MYC       | <i>Mat a, hta1-htb1::LEU2, hta2-htb2, ura3-1, trp1-1, leu2-3,-112, his3-11, ade2-1, can1-100, GAPDH-HA-UBI4::URA3 &lt;pZS145 HTA1-Flag-HTB1, CEN, HIS3&gt; SUS1-MYC::KANMX4</i>       | Esta tesis                            |
| CFK921 htb1-K123R<br>SUS1-MYC | <i>Mat a, hta1-htb1::LEU2, hta2-htb2, ura3-1, trp1-1, leu2-3,-112, his3-11, ade2-1, can1-100, GAPDH-HA-UBI4::URA3 &lt;pZS146 HTA1-Flag-htb1-K123R, CEN, HIS3&gt; SUS1-MYC::KANMX4</i> | Esta tesis                            |
| CFK920 HTB1<br>SUS1-TAP       | <i>Mat a, hta1-htb1::LEU2, hta2-htb2, ura3-1, trp1-1, leu2-3,-112, his3-11, ade2-1, can1-100, GAPDH-HA-UBI4::URA3 &lt;pZS145 HTA1-Flag-HTB1, CEN, HIS3&gt; SUS1-TAP::KANMX4</i>       | Esta tesis                            |
| CFK921 htb1-K123R<br>SUS1-TAP | <i>Mat a, hta1-htb1::LEU2, hta2-htb2, ura3-1, trp1-1, leu2-3,-112, his3-11, ade2-1, can1-100, GAPDH-HA-UBI4::URA3 &lt;pZS146 HTA1-Flag-htb1-K123R, CEN, HIS3&gt; SUS1-TAP::KANMX4</i> | Esta tesis                            |
| CFK920 HTB1<br>SGF73-TAP      | <i>Mat a, hta1-htb1::LEU2, hta2-htb2, ura3-1, trp1-1, leu2-3,-112, his3-11, ade2-1, can1-100, GAPDH-HA-UBI4::URA3 &lt;pZS145 HTA1-Flag-HTB1, CEN, HIS3&gt; SGF73-TAP::KANMX4</i>      | Esta tesis                            |

|                                  |   |            |
|----------------------------------|---|------------|
| CFK920 HTB1<br>UBP8-MYC          | <i>Mat a, hta1-htb1::LEU2, hta2-htb2, ura3-1, trp1-1, leu2-3,-112, his3-11, ade2-1, can1-100, GAPDH-HA-UBI4::URA3 &lt;pZS145 HTA1-Flag-HTB1, CEN, HIS3&gt; UBP8-MYC::KANMX4</i>       | Esta tesis |
| CFK921<br>htb1-K123R<br>UBP8-MYC | <i>Mat a, hta1-htb1::LEU2, hta2-htb2, ura3-1, trp1-1, leu2-3,-112, his3-11, ade2-1, can1-100, GAPDH-HA-UBI4::URA3 &lt;pZS146 HTA1-Flag-htb1-K123R, CEN, HIS3&gt; UBP8-MYC::KANMX4</i> | Esta tesis |
| CFK920 HTB1<br>UBP8-TAP          | <i>Mat a, hta1-htb1::LEU2, hta2-htb2, ura3-1, trp1-1, leu2-3,-112, his3-11, ade2-1, can1-100, GAPDH-HA-UBI4::URA3 &lt;pZS145 HTA1-Flag-HTB1, CEN, HIS3&gt; UBP8-TAP::KANMX4</i>       | Esta tesis |
| CFK921<br>htb1-K123R<br>UBP8-TAP | <i>Mat a, hta1-htb1::LEU2, hta2-htb2, ura3-1, trp1-1, leu2-3,-112, his3-11, ade2-1, can1-100, GAPDH-HA-UBI4::URA3 &lt;pZS146 HTA1-Flag-htb1-K123R, CEN, HIS3&gt; UBP8-TAP::KANMX4</i> | Esta tesis |
| CFK920 HTB1<br><i>sac3Δ</i>      | <i>Mat a, hta1-htb1::LEU2, hta2-htb2, ura3-1, trp1-1, leu2-3,-112, his3-11, ade2-1, can1-100, GAPDH-HA-UBI4::URA3 &lt;pZS145 HTA1-Flag-HTB1, CEN, HIS3&gt; sac3::KANMX4</i>           | Esta tesis |

## KITS COMERCIALES

A lo largo de este trabajo se han utilizado los siguientes kits comerciales siguiendo las instrucciones del fabricante:

| Nombre   | Proveedor     |
|--|---------------|
| Wizard™ Plus SV Minipreps DNA Purification System™                                     | Promega       |
| Wizard™ SV Gel and PCR Clean-Up System™  | Promega       |
| Kit de inmunotinción Amersham Western Blotting Detection Kit™ (ECL Select y ECL Prime) | GE Healthcare |
| Coomassie coloidal Novex Colloidal Blue Staining Kit™                                  | Invitrogen    |
| Geles de gradiente NUPAGE 4-12% Bis-Tris Gel™  | Invitrogen    |
| Maxima SYBR® Premix Ex Taq™  | Takara        |

## PLÁSMIDOS

En la siguiente tabla figuran los plásmidos que se han usado para la obtención de los módulos de delección o etiquetaje (Chavez & Aguilera, 1997; Gietz & Sugino, 1988; Longtine *et al.*, 1998; Puig *et al.*, 2001; Sikorski & Hieter, 1989; Snay-Hodge *et al.*, 1998) así como los plásmidos portadores de las construcciones que se han utilizado en esta tesis.

| Plásmido                  | Descripción   | Origen                               |
|---------------------------|---|--------------------------------------|
| <i>pFA6a-KanMX4</i>       | Integración del marcador KanMX4 para la delección de genes            | (Wach <i>et al.</i> , 1994)          |
| <i>pFA6a-HIS3</i>         | Integración del marcador <i>HIS3</i> para la delección de genes       | (Longtine <i>et al.</i> , 1998)      |
| <i>pUC19-GFP-KanMX4</i>   | Integración de la etiqueta GFP con el marcador KanMX4                 | (Longtine <i>et al.</i> , 1998)      |
| <i>pUC19-GFP-HIS3</i>     | Integración de la etiqueta GFP con el marcador <i>HIS3</i>            | (Longtine <i>et al.</i> , 1998)      |
| <i>pFA6a-MYC-HIS3</i>     | Integración de la etiqueta MYC con marcador <i>HIS3</i>               | (Longtine <i>et al.</i> , 1998)      |
| <i>pBS2623</i>            | Integración de la etiqueta TAP con el marcador KanMX4                 | (Puig <i>et al.</i> , 2001)          |
| <i>pBS1539</i>            | Integración de la etiqueta TAP con el marcador <i>URA3</i>            | (Puig <i>et al.</i> , 2001)          |
| <i>pUC19-6xPK-HIS3</i>    | Integración de 6 copias del epítipo PK con marcador <i>HIS3</i>       | (Lengronne <i>et al.</i> , 2006)     |
| <i>pPA6a-3FLAG-KANMX4</i> | Integración de 3 copias de la etiqueta FLAG con el marcador de KanMX4 | Dra. Calvo (U. Salamanca)            |
| <i>pRS416 CEN-URA3</i>    | Plásmido centromérico vacío (sin ninguna secuencia clonada)           | (Ingvarsdottir <i>et al.</i> , 2005) |

|                                   |   |                                      |
|-----------------------------------|---|--------------------------------------|
| <i>pRS416 ubp8-C146S-CEN-URA3</i> | Plásmido centromérico con el gen <i>UBP8</i> mutado en su dominio catalítico (residuo C146) | (Ingvarsdottir <i>et al.</i> , 2005) |
| <i>pRS416 ubp8-H419A-CEN-URA3</i> | Plásmido centromérico con el gen <i>UBP8</i> mutado en su dominio catalítico (residuo H419) | (Ingvarsdottir <i>et al.</i> , 2005) |

## OLIGONUCLEÓTIDOS

A continuación se describen los oligonucleótidos más relevantes utilizados en este trabajo para su uso en PCR cuantitativa. Todos ellos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. Para su diseño se siguieron las recomendaciones dadas por LightCycler<sup>TM</sup> 480 Real-Time PCR System con una  $T_m$  próxima a 60 °C y un tamaño final de amplicón de 100-180 pb.

| Región amplificada             | Nombre                  | Secuencia 5' → 3'          |
|--------------------------------|-------------------------|----------------------------|
| Promotor de <i>GAL1</i>        | <i>yGAL1-PR-240-UP</i>  | AAAATTGGCAGTAACCTGGCC      |
|                                | <i>yGAL1-PR-240-DN</i>  | CCCCAGAAATAAGGCTAAAAAACTAA |
| ORF de <i>GAL1</i>             | <i>yGAL1-ORF+190-UP</i> | TTGCTAGATCGCCTGGTAGAGTC    |
|                                | <i>yGAL1-ORF+190-DN</i> | GGCGCAAAGCATATCAAAATC      |
| ORF de <i>SCR1</i>             | Up- <i>SCR1-RT</i>      | AACCGTCTTTCCTCCGTCGTAA     |
|                                | Dw- <i>SCR1-RT</i>      | AGAACTACCTTGCCGCACCA       |
| Región intergénica cromosoma V | <i>IntV-UP</i>          | TGTTCCTTTAAAGAGGTGATGGTGA  |
|                                | <i>IntV-DW</i>          | GTGCGCAGTACTTGTGAAAACC     |
| ORF de <i>ACT1</i>             | <i>ACT1-UP</i>          | GTTTTGGATTCCGGTGATGG       |
|                                | <i>ACT1-DW</i>          | AATCTCTACCGCCAAATCG        |
| ORF de <i>RPS3</i>             | <i>RPS3-UP</i>          | CTCTAAGAAAAGAAAGCTAGTCGCTG |
|                                | <i>RPS3-DW</i>          | ACACCGGAGTAACCTTCTTCAG     |
| ORF de <i>RPL25</i>            | <i>RPL25-UP</i>         | TGGTTTTCCAAGTTTCCATGAA     |
|                                | <i>RPL25-DW</i>         | AACTTCGTATAATTCCTTGACGGC   |

## MÉTODOS



## TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS EN LEVADURA

### CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Las células de levadura empleadas en esta tesis se crecieron en diferentes medios de cultivo líquido que detallo a continuación:

- Medio rico YPD (YPD): extracto de levadura al 1 % (p/v), bactopectona al 2 % (p/v) y glucosa al 2 % (p/v).

- YP + Galactosa (YPGal): en el que se proporciona galactosa al 2 % (p/v) como fuente de carbono, extracto de levadura al 1 % (p/v), bactopectona al 2 % (p/v).

- YP + Rafinosa (YPRaf): en el que se proporciona rafinosa al 2 % (p/v) como fuente de carbono, extracto de levadura al 1 % (p/v), bactopectona al 2 % (p/v).

- Medio sintético completo (SC): base nitrogenada para levadura sin aminoácidos ni sulfato amónico al 1,7 % (p/v),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 0.5 % (p/v) y Drop Out Mix al 0.2 % (p/v). El Drop Out Mix contiene una mezcla de todos los aminoácidos proteicos al 0.2 %.

El crecimiento en medio líquido se hizo a 30 °C con una agitación de 150 rpm. Para la elaboración de los soportes sólidos de crecimiento se agregó agar al 2 % (p/v) al medio correspondiente y las placas se incubaron a 30 °C. Las cepas auxótrofas transformadas con plásmidos o con módulos de integración fueron cultivadas en medio sintético mínimo o SC sin el aminoácido marcador de la auxotrofia. Las cepas que contienen plásmidos o módulos de integración asociados al gen de resistencia a geneticina (módulos de integración KanMX4) fueron seleccionadas suplementando los medios de cultivo con geneticina a 20 mg/mL.

### *ENSAYOS DE CRECIMIENTO*

Para los ensayos de crecimiento en placa, los cultivos celulares de levadura se crecieron a 30 °C hasta una OD<sub>600</sub> de 0,3-0,4 unidades, y después de igualar las OD<sub>600</sub> de los distintos cultivos utilizados, se prepararon cuatro diluciones seriadas (1; 1:10; 1:100; 1:1000) en una placa de 96 pocillos. Las gotas se replicaron con ayuda de un peine de replicación sobre las distintas placas de los medios requeridos. Éstas se incubaron a la temperatura necesaria para el estudio entre 24-72 horas dependiendo del experimento.

### *TRANSFORMACIÓN DE LEVADURA*

Las cepas de levadura fueron transformadas siguiendo el protocolo basado en la incubación con Acetato de Litio (Gietz & Woods, 2002). A partir de cultivos celulares crecidos en YPD durante toda una noche hasta una OD<sub>600</sub> de 0,4-0,6 unidades. Se recogieron las células centrifugándolas 3 minutos a 2.000 rpm. Se lavaron con agua desionizada estéril y se transfirieron a un eppendorf con 1 mL de agua estéril. A partir de ese mL de células resuspendidas, para cada transformación se utilizarán unos 120 µL que se centrifugarán para eliminarles el agua sobrenadante. Las células se resuspenden en una mezcla de 240 µL de una solución de polietilenglicol al 50 % (p/v), 34 µL de TE 10X (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0), 36 µL de AcLi 1 M y 50 µL de DNA de esperma de salmón desnaturalizado (2 mg/mL). Una vez resuspendidas las células, se añade 1-2 µg del módulo de integración o delección obtenido por PCR si se va a delecionar un gen o etiquetar una proteína, o 0,1-0,5 µg de DNA plasmídico si es el caso. El tubo que contiene toda la mezcla se incubó a 30 °C durante 30 minutos y seguidamente se le aplicó un choque térmico a 42 °C en un termobloque durante 15 minutos con

agitación (300-350 rpm en termoagitador). Finalmente, las células se recogieron por centrifugación, eliminándose el sobrenadante por aspiración. En el caso de transformaciones con plásmidos las células se resuspendieron en 200  $\mu$ L de agua desionizada estéril para ser sembradas en placas del medio mínimo selectivo correspondiente. En el caso de las transformaciones con módulos de integración las células se recuperaron en medio líquido YPD durante 2-5 horas en agitación a 30 °C, lo que permitió a las células transformadas recuperarse del choque térmico y además expresar la cantidad de antibiótico necesario para poder crecer en las placas con 0.2 mg/mL de geneticina. Una vez pasadas esas horas de recuperación, las células se sembraron en placas del medio selectivo correspondiente al módulo de integración utilizado. Las placas se dejan crecer 2-4 días para la obtención de colonias.

## DELECIÓN DE GENES Y ETIQUETADO DE PROTEÍNAS

Tanto para la delección de genes, como para la inserción de las etiquetas TAP, GFP, PK y MYC se utilizó la estrategia de módulos de integración obtenidos por PCR (Baudin *et al.*, 1993). Los módulos de integración o delección contienen un gen marcador flanqueado de secuencias de DNA homólogas a las secuencias del gen diana que queremos etiquetar o deleccionar. Las amplificaciones de los módulos se detallan en el apartado de PCR.

Después de la transformación, dependiendo del módulo obtenido por PCR las consecuencias tras su recombinación con el genoma de levadura pueden ser:

i) En el caso de delección de genes, se sustituye el gen silvestre por el gen marcador.

ii) En el caso de etiquetado, se añade la secuencia de la etiqueta junto a la secuencia del gen marcador en el extremo C-terminal del gen en cuestión en pauta de lectura abierta.

Los genes marcadores empleados en este trabajo son KanMX4, que confiere a la célula resistencia al antibiótico geneticina, o genes que complementan las auxotrofías que presentan los fondos genéticos de los microorganismos utilizados (*URA3*, *HIS3*, etc...).

Una vez se obtienen colonias de las transformaciones realizadas con los módulos de integración, se verifica la integración del módulo de disrupción mediante PCR de colonia (ver más adelante). La verificación de las integraciones de las diferentes etiquetas, además de la comprobación por PCR de colonia, se realiza una comprobación por WB, detallada más adelante.

## MÉTODOS DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

### *AISLAMIENTO DE DNA PLASMÍDICO DE E. coli*

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

### *ASILAMIENTO DE DNA GENÓMICO DE *S. cerevisiae**

La obtención de DNA genómico se llevó a cabo a partir de cultivos de 5 mL en YPD crecidos durante toda la noche a 30 °C. Las células se recogieron por centrifugación a 2.500 rpm durante 3 minutos y se lavaron dos veces con agua desionizada estéril. Al pellet de células se le añadió 200 µL de tampón de lisis (Triton X-100 al 2 % (v/v), SDS al 1 % (p/v), 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0), 200 µL de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y 200 µL de perlas de vidrio. La mezcla se agitó durante 15 minutos en el vórtex modelo Genie-2 (Scientific Instruments) a 4 °C. Seguidamente, se añadieron 200 µL de tampón TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0) y se centrifugó durante 5 minutos a 13.200 rpm a 4 °C. Se recogió la fase acuosa en un nuevo tubo y se añadieron dos volúmenes de etanol al 96 % (v/v) frío. Se dejó a -20 °C durante 20 minutos para que precipitara el DNA y éste se centrifugó a 13.200 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante por aspiración y se lavó el DNA con etanol frío al 70 % (v/v). Finalmente, se eliminó el sobrenadante y, cuando el precipitado estuvo seco, se resuspendió en un volumen de entre 50 y 100 µL de agua desionizada estéril y se guardó a -20°C hasta su utilización.

### *EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL*

Para la extracción de RNA total de levadura para la hibridación en microchips de embaldosado, se recogieron por centrifugación 25 mL de cada cultivo crecido en medio YPD durante toda la noche a 25 °C hasta crecimiento exponencial.

Para la extracción de RNA total de levadura para ver la expresión de *GAL1*, se recogieron por centrifugación 15 mL del mismo cultivo que se usó para hacer la inmunoprecipitación de

cromatina. Dichos cultivos se crecieron en medio YPRaf durante toda la noche a 30 °C hasta crecimiento exponencial al que se le añadió durante 30 minutos glucosa o galactosa para reprimir o inducir, respectivamente, el gen *GAL1*.

Para la extracción de RNA total de levadura para ver la expresión de los genes RP, se crecieron 30 mL de cultivo en YPD durante toda la noche hasta crecimiento exponencial. Se separaron en dos mitades de 15 mL, añadiendo a una de las mitades 100 mM de rapamicina e incubándolos 1 hora con dicha droga. La otra mitad siguió creciendo de igual manera pero sin droga.

Las células se lavaron dos veces con agua desionizada estéril fría y el pellet celular se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido, almacenándose a -80 °C hasta su procesamiento posterior. Las células se descongelaron en hielo y se resuspendieron en 0,5 mL de tampón LETS (0.1 M LiCl, 10 µM EDTA, 10 µM Tris-HCl, SDS al 0.2 % (p/v)). Se añadieron 0,5 mL de fenol (pH 4) y 0,3 mL de perlas de vidrio. Las células se rompieron por agitación en el vórtex modelo Genie-2 (Scientific Instruments) durante seis períodos de 30 segundos entre los cuales las células se mantuvieron 30 segundos en hielo. Posteriormente, se centrifugaron las muestras durante 5 minutos a 13.200 rpm a 4°C. El sobrenadante acuoso se extrajo y se mezcló con fenol:cloroformo (5:1 pH 4.3) para hacer una segunda extracción. Se volvió a centrifugar la mezcla y la fase acuosa obtenida se mezcló con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) para hacer la última extracción. El RNA se precipitó con un volumen de LiCl 5 M a -80°C durante un mínimo de 3 horas. Se recogió por centrifugación durante 20 minutos a 13.200 rpm a 4°C, se lavó con etanol al 70 % (v/v) y se resuspendió en agua desionizada estéril para volver a precipitarlo. Para ello se añadió acetato sódico a una concentración final 0,3 M y dos volúmenes de EtOH al 100 % (v/v). Se volvió a dejar

al menos 2 horas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para volver a centrifugar durante 15 minutos a 13.200 rpm a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El precipitado se lavó con EtOH al 70 %, se dejó secar y finalmente se resuspendió en agua desionizada estéril. La concentración del RNA obtenido se evaluó midiendo la absorbancia a 260 nm mediante un espectrómetro (NanoDrop™ ND-2000).

### *TRANSCRIPCIÓN REVERSA O SÍNTESIS DE cDNA*

Se incubaron 2  $\mu\text{g}$  de RNA con 10 unidades de DNasa libre de RNasas (Sigma 20U/ $\mu\text{L}$ ) y su tampón correspondiente en un volumen final de 10  $\mu\text{L}$  a temperatura ambiente durante 20 minutos. El RNA se extrajo dos veces con la mezcla de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y se realizó una tercera extracción con cloroformo:isoamílico (24:1). El RNA se precipitó durante toda la noche con dos volúmenes de EtOH al 100 % y 1  $\mu\text{L}$  de glucógeno. Se centrifugó durante 20 minutos a 13.200 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ , se lavó con etanol al 70 % (v/v) y se resuspendió en 12  $\mu\text{L}$  de agua desionizada. Se realizó una medida con 1  $\mu\text{L}$  en el NanoDrop™ ND-2000 para medir las cantidades de RNA antes de comenzar con la retrotranscripción, y otro  $\mu\text{L}$  se utilizó para comprobar por PCR que el tratamiento con DNasa funcionó correctamente. A continuación se incubó el RNA digerido con 1  $\mu\text{L}$  de oligos random y 1  $\mu\text{L}$  de una mezcla de los cuatro dNTPs a una concentración de 10 mM cada uno, a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos, tras lo cual se transfirió la mezcla al hielo. Se añadieron entonces 4  $\mu\text{L}$  de tampón 5X First-strand (Invitrogen), 2  $\mu\text{L}$  de DTT 0.1 M y 1  $\mu\text{L}$  de inhibidor de RNasa Out (Invitrogen). Esta mezcla se incubó 2 minutos a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se añadió 1  $\mu\text{L}$  de transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen). Las muestras se incubaron durante 10 minutos a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  y 50 minutos a

37 °C, y finalmente se inactivó la enzima congelando las muestras. Para la amplificación del producto de la transcripción reversa (cDNA) se realizó una dilución 1/20 del cDNA obtenido y se utilizaron 3 µL como molde de la qPCR (volumen final de 10 µL).

### *REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)*

Las amplificaciones de los módulos de integración o delección se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µL empleándose, 1 µL de una dilución 1:10 de DNA del plásmido molde procedente de una Mini-Prep; 0,3 µL de Taq polimerasa (1 U/µL Roche); 5 µL del tampón 10X de la Taq polimerasa (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl pH 8,3 y 250 mM MgCl<sub>2</sub>); 0,5 mM de cada uno de los cebadores y 5 µL de una mezcla de los 4 dNTP a 4 mM. El protocolo de amplificación es el siguiente:

|  |   |           |
|--|---|-----------|
| 95 °C 3 minutos                        |   |           |
| 94 °C 15 segundos                      | } | 9 ciclos  |
| 54 °C 30 segundos                      |   |           |
| 72 °C 2 minutos                        |   |           |
| 94 °C 15 segundos                      |   |           |
| 54 °C 30 segundos                      | } | 25 ciclos |
| 72 °C 2 minutos + 5 segundos por ciclo |   |           |
| 72 °C 7 minutos                        |   |           |
| 4 °C                                   |   |           |

Para verificar la correcta integración de los módulos de interrupción se llevó a cabo una reacción de PCR de colonia. Para lo cual se recogieron en 20 µL de SDS al 0,01 % la cantidad de células frescas crecidas en placa que caben en equivalente al extremo de una asa de siembra de 1 µL, y se hirvió la muestra durante 3 minutos a 95 °C. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 15 µL donde añadimos, 0,15 µL de Taq polimerasa (Invitrogen); 1,5 µL del tampón 10X de la Taq polimerasa (Invitrogen) que incluye MgCl<sub>2</sub>;

0,45  $\mu\text{L}$  de cada cebador a 10 mM y 1,5  $\mu\text{L}$  de una mezcla de los 4 dNTPs a 2,5 mM. El protocolo de amplificación en estos casos es el siguiente:

|                   |   |           |
|-------------------|---|-----------|
| 95 °C 3 minutos   | } | 35 ciclos |
| 94 °C 15 segundos |   |           |
| 54 °C 30 segundos |   |           |
| 72 °C 2 minutos   |   |           |
| 72 °C 7 minutos   |   |           |
| 4 °C              |   |           |

### *PCR CUANTITATIVA (qPCR)*

Tanto los análisis de expresión génica para *GAL1*, *RPL25* y *RPL3*, como los análisis de inmunoprecipitación de cromatina para el promotor de *GAL1* se llevaron a cabo, respectivamente, mediante RT-PCR y PCR cuantitativa en el termociclador LightCycler™ 480. Se utilizó el kit SYBR Premix Ex Taq (Tli RNase H Plus (Takara)). El diseño de oligonucleótidos, la mezcla de reacción y las condiciones de amplificación se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante para un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ . Se hizo triplicado técnico de PCR para todas las muestras.

La cuantificación relativa de los amplicones obtenidos se realizó con las siguientes fórmulas:

#### *RT-qPCR*

$$\text{Eficiencia de los oligos}^{\wedge}(\text{CT control positivo} - \text{CT muestra}) * 100$$

#### *qPCR para ChIP*

$$\text{Eficiencia de los oligos}^{\wedge}(\text{CT control positivo} - \text{CT de la IP}) * 100$$

---


$$\text{Eficiencia de los oligos}^{\wedge}(\text{CT control positivo} - \text{CT del INPUT}) * 100$$

La eficiencia de los oligos empleada para el procesamiento de los datos se comprobó en cada qPCR empleando el siguiente cálculo, y fijando como control de calidad una eficiencia mínima de un 80 % para cada qPCR:

$$\text{Eficiencia} = (10^{-1/\text{pendiente obtenida en cada reacción de PCR}})$$

Los datos obtenidos para cada pareja de oligos se normalizaron respecto a genes de referencia: *SCR1* para la expresión de *GAL1*; *ADH1* para la expresión de *RPL25* y *RPL3*; y una región Intergénica en el cromosoma V (chrV: 9754-9837) para los ChIPs en el promotor de *GAL1*.

## SEPARACIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS POR ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

### *Electroforesis de DNA en geles de agarosa*

La separación de fragmentos de DNA se realizó en geles de agarosa de concentración variable (0.8 %-1,5 % (p/v)) según los tamaños de los fragmentos de DNA a separar. Los geles se prepararon en tampón TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA pH 8.0), que también fue utilizado como tampón de electroforesis. Los geles se prepararon añadiendo 3 µL de bromuro de etidio 10 mg/mL por cada 50 mL de gel. Las muestras se mezclaron con tampón de carga 6X (azul de bromofenol al 0.25 % (p/v), azul de xilencianol al 0.25 % (p/v), glicerol al 30 % (v/v)) hasta una concentración final 1X y la electroforesis se realizó a voltaje constante (6-10 V/cm) durante un tiempo variable en función de la resolución requerida.

### *Electroforesis de RNA en geles de agarosa en tampón TAE*

La integridad del RNA obtenido tras las extracciones se comprobó mediante la visualización de 2 µg de RNA total en un gel TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA pH 8.0) con agarosa al 1 % (p/v). Estas electroforesis se llevaron a cabo durante 10-15 minutos a 10 V/cm en una cubeta rociada con RNasa ZAP (Invitrogen) para prevenir la degradación por RNasas.

## **MÉTODOS DE MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS**

### *OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS*

Los extractos proteicos extraídos mediante protocolo con ácido tri-cloroacético (TCA) se realizaron mediante el siguiente procedimiento. Se recogieron 5-15 mL de cultivo líquido mediante centrifugación de 3 minutos a 3.000 rpm a 4 °C. El pellet de células se resuspende con 1 mL de TCA al 20 % (v/v). Se centrifuga 1 minuto a máxima velocidad para eliminar el sobrenadante. Para neutralizar la carga ácida que ha dejado el TCA se lavan 3 veces las células con 1 mL de Tris-Base 1M (sin ajustar el pH). Tras los lavados, se resuspende el pellet en 100 µL de tampón de carga de proteínas SDS-PAGE 2X (250mM Tris-HCl pH 6.8, 140 mM SDS, 30 mM azul de bromofenol, 27 µM glicerol) conteniendo DTT 0.1 mM. Se hierven las muestras 2 minutos a 95 °C y se añaden 200 µL de perlas de vidrio. Se vuelve a hervir 2 minutos a 95 °C y se pasa a romper las células durante 2 minutos a 4 °C en el vórtex modelo Genie-2 (Scientific Instruments). Tras romper las células se vuelven a hervir 2 minutos a 95 °C. Haciendo un agujero con una aguja al rojo vivo y dando un golpe de centrífuga a las muestras se consigue recoger en un tubo nuevo los extractos. Las muestras se hierven 5 minutos a 95 °C y se

conservan a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para la obtención de extractos proteicos mediante protocolo con NaOH, los cultivos celulares se recogieron por centrifugación (3 minutos a 3.000 rpm) y se lavaron con agua destilada estéril fría. Las células se resuspendieron en 1 mL de agua y se añadió 15  $\mu\text{L}$  de NaOH 2 M y 2  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol. Se dejaron 10 minutos en hielo y se centrifugaron durante 1 minuto a 13.200 rpm. Se aspiró el sobrenadante, se resuspendió el precipitado en 50  $\mu\text{L}$  de tampón de carga de proteínas SDS-PAGE 2X conteniendo DTT 0.1 mM y se incubaron las muestras a  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos. Se centrifugaron de nuevo durante 10 minutos a 13.200 rpm y el sobrenadante, que constituye el extracto proteico, se transfirió a un tubo nuevo.

### *EXTRACCIÓN DE HISTONAS TOTALES*

Los cultivos celulares se recogieron por centrifugación durante 3 minutos a 3000 rpm y se lavaron con agua destilada estéril fría. El pellet de células se resuspendió en 1 mL de TCA al 20 %. Se centrifugaron las células y el pellet se congeló en nitrógeno líquido. Tras descongelar de nuevo el pellet se resuspendió en 0,5 mL de TCA al 20 % y se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de perlas de vidrio. La mezcla se agitó en vórtex Genie-2 durante 2 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El lisado se recogió en un tubo nuevo y se lavaron las perlas de vidrio con 0,5 mL de TCA al 5 % que se añadió al lisado anterior. Se centrifugó el lisado 10 minutos a 3.000 rpm y el pellet resultante se resuspendió en 0,2 mL de tampón Laemmli (0,06M Tris pH 6,8; 10 % SDS; 0,0025 % azul de bromofenol) con 5 % de  $\beta$ -mercaptoetanol frío y 50  $\mu\text{L}$  de Tris-Base 2 M. Se hirvieron las muestras 3 minutos a  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se centrifugaron 10 minutos a 3.000 rpm. El sobrenadante se pasó a un tubo nuevo y se guardó hasta su utilización.

## PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE TÉCNICA TAP

La técnica de *Tandem Affinity Purification* permite recuperar complejos proteicos nativos altamente purificados a partir de extractos totales. Para ello, se debe sustituir la copia silvestre de la región codificante de la proteína de interés por una versión del gen que además incluye la etiqueta de afinidad TAP. Esta etiqueta está constituida por dos unidades de proteína A (PA) de *Staphylococcus aureus*, seguida de un sitio de corte para la proteasa TEV (*Tobacco Etch Virus*), y finalmente por el péptido de unión a calmodulina (CBP) (Figura M1). Estos experimentos siguieron el protocolo descrito en los trabajos de Rigaut (Schmitt *et al.*, 1999) y Puig (Puig *et al.*, 2001) con ciertas modificaciones. Se crecieron 2 L de células hasta una OD<sub>600</sub> de 2,5, equivalente a 12-15 gr de pellet celular, se recogieron por centrifugación y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido conservándose a -80 °C hasta su utilización. Las células se resuspendieron en tampón de lisis (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, glicerol al 20 % (v/v), Nonidet P-40 al 0.1 % (v/v), 1 mM PMSF, 1 mM DTT y media tableta de cóctel inhibidor de proteasas Complete (Roche) y se introdujeron en los contenedores del BeadBeater (Fritsch-Pulverisette) junto con 25 mL de perlas de vidrio. Se mantuvo todo en frío. La rotura se realizó mediante 3 rondas de 4 minutos a 490 rpm con una pausa de 1 minuto entre cada ronda. El lisado se centrifugó durante 1 hora a 4 °C a 14.000 rpm. Se recuperó el sobrenadante al que se le añadió glicerol si no se va a seguir con el protocolo y se va a congelar la muestra hasta el día siguiente para una mejor conservación. Se tomaron unos 15 µl de dicha muestra (**Lisado**) para analizar por WB. El lisado resultante se transfirió en un nuevo tubo y se incubó durante 1 hora a 4 °C en agitación rotatoria con 400 µL de suspensión de resina

IgG-Sepharose 6 Fast Flow™ (Amersham Bioscience) previamente lavada con LB (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, glicerol al 20 % (v/v), Nonidet P-40 al 0.1 % (v/v)). Dicha resina tiene avidez por el epítipo PA. Tras la incubación, la resina fue lavada con 10 mL de tampón LB. Posteriormente, se incubó la resina a la que se ha unido nuestra proteína etiquetada con TAP, con 3-4 µg de la proteasa TEV durante 2 horas a 16 °C en agitación rotatoria. Esta digestión produce la liberación del epítipo PA de la etiqueta TAP, liberando un eluido enriquecido en nuestra proteína de interés. Se tomó una alícuota de dicho **Eluido TEV** para analizar por WB. Por último, se volvió a purificar el eluido con una segunda cromatografía de afinidad, incubando el eluido purificado con 400 µL de la resina afín a la calmodulina (Calmodulin Affinity Resin™, Stratagene) en presencia de una concentración 4 mM de CaCl<sub>2</sub>. La incubación de la resina con el eluido anterior se efectuó durante 1 hora a 4 °C con agitación rotatoria. A continuación, la resina fue lavada con 5 mL de tampón LB suplementado con 2 mM de CaCl<sub>2</sub> y 1 mM DTT. La elución final se llevó a cabo incubando la resina con tampón de elución (5 mM EGTA, 10 mM Tris-HCl pH 8.0 y 50 mM NaCl) en 3 rondas de 10 minutos a 37 °C. El eluido enriquecido (**Eluido Calmodulina**) en las proteínas que interaccionan con nuestra proteína de interés fueron precipitados con TCA a una concentración final del 10 % (v/v). Los eluidos fueron resueltos generalmente por SDS-PAGE. En otras ocasiones, tras la precipitación con TCA se analizó el pellet total de proteínas por LC-MS/MS para la identificación de las proteínas en la muestra.

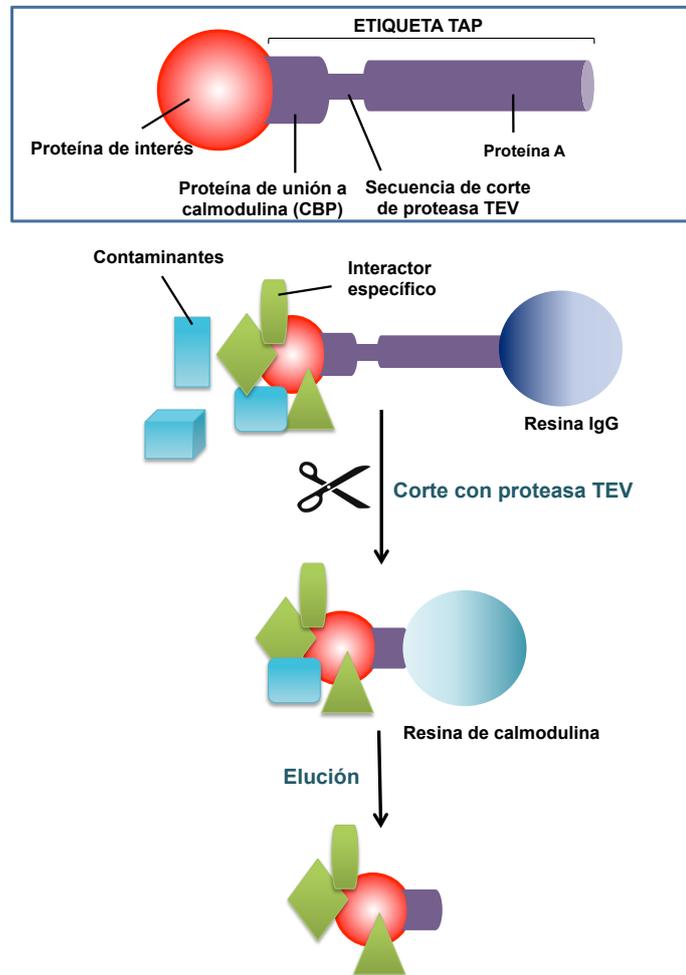


Figura M1. Esquema del proceso de purificación mediante etiqueta TAP.

### SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA DE PROTEÍNAS

Los extractos proteicos fueron separados en función de su tamaño mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida que se prepararon siguiendo las especificaciones detalladas en (Sambrook & Rusell, 2001). La electroforesis se desarrolló en cubetas Mini Protean II y III (Bio-Rad) a voltaje

constante de 120 V durante el tiempo necesario para separar las proteínas de interés. El tampón de electroforesis se preparó con 25 mM Tris-base, 190 mM de glicina y SDS al 0,01 % (p/v). Los geles en gradiente desnaturizante de poliacrilamida NUPAGE 4-12 % Bis-Tris Gel™, fueron adquiridos a Invitrogen y se utilizó el tampón proporcionado por la casa comercial, MOPS, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

### *TRANSFERENCIA E INMUNOTINCIÓN*

Las proteínas separadas mediante electroforesis se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm (Hybond-ECL Amersham Biosciences) con un mini trans-blot cell de Biorad siguiendo el procedimiento descrito en (Sambrook & Rusell, 2001). El tampón de transferencia utilizado contiene 25 mM Tris pH 8.3, 192 mM glicina, SDS al 0.1 % (p/v) y metanol al 20 % (v/v). La transferencia se llevó a cabo durante 1 hora aplicando 100 V de voltaje. Para la transferencia de histonas se aplicó un voltaje de 100 V durante 15 min, seguido de otros 30 minutos a 60 V.

Las proteínas transferidas se tiñeron con una solución de Ponceau al 1 % (p/v) en ácido acético al 1 % (v/v) durante 1 minuto. El colorante se eliminó lavando la membrana con agua destilada. La membrana se bloqueó con TBS-Tween (0.02 M Tris-HCl pH 7.6 y NaCl al 0.8 % (p/v))-Tween-20 al 0.01 % (v/v)) suplementado con leche en polvo 5 % (p/v) durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C. El anticuerpo primario se diluyó en TBS-Tween con leche en polvo al 5 % (p/v) y la membrana se incubó en esta disolución durante una hora en agitación constante. La membrana se lavó tres veces durante 15 minutos con TBS-Tween con alta agitación. El anticuerpo secundario se preparó también en

TBS-Tween con leche en polvo al 5 % (p/v) y se incubó la membrana durante 1 hora con agitación. Se realizaron 3 lavados adicionales de 10 minutos con TBS-Tween y la detección quimioluminiscente se realizó mediante el sistema ECL Select o Prime (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### *TINCIÓN COOMASSIE COLOIDAL*

Una vez separadas las proteínas mediante electroforesis, la tinción de las proteínas se realizó con Coomassie coloidal en polvo o con el kit Coomassie coloidal Novex Colloidal Blue Staining Kit™ (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La tinción con Coomassie coloidal en polvo se hizo sumergiendo el gel en solución colorante durante al menos 30 minutos, y después se realizaron varios lavados con solución decolorante (metanol al 30 % (v/v), ácido acético al 5 % (v/v)) hasta eliminar el exceso del colorante.

### *IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS*

La identificación de proteínas mediante espectrometría de masas fue llevada a cabo mediante LC MS/MS por el personal de la sección de Espectrometría de Masas del Servei Central de Suport a la Investigació (SCSIE) de la Universitat de València que está integrado y sigue los estándares de Proteored España (<http://www.proteored.org/>) y el SCSIE de la UV (<http://scsie.uv.es>).

### INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (ChIP)

Para la inmunoprecipitación de cromatina, necesaria para el análisis de la ocupación del gen *GAL1* por nuestra proteína interés, se utilizaron células procedentes de cultivos de 120 mL en medio YPRaf crecidas a una OD<sub>600</sub> de 0,6-0,7. El cultivo se dividió en dos y el gen *GAL1* se indujo o se reprimió agregando galactosa o glucosa al 2 % durante 25 minutos. Las células se entrecruzaron *in vivo* con formaldehído al 1 %, durante 20 minutos a temperatura ambiente. El entrecruzamiento se detuvo añadiendo glicina (125 mM) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron 4 veces con 25 mL de TBS frío y se congelaron a -20 °C. Las células se lisaron con 300 µL de tampón de lisis (HEPES-KOH 50 mM pH 7.5, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 al 1 % (v/v), desoxicolato sódico al 0.1 % (p/v), PMSF 1 mM, Benzamidina 1 mM e inhibidor de proteasas Complete (Roche) y 300 µL de perlas de vidrio. La lisis se llevó a cabo durante 13 minutos a 4 °C en un vórtex modelo Genie-2 (Scientific Industries) a 4 °C. Tras eliminar las perlas de vidrio, la cromatina se fragmentó (tamaño medio entre 200 y 600 pb) por sonicación (30 pulsos de 30 segundos ON / 30 segundo OFF a la máxima potencia con un sonicador BioRuptor Diagenode, manteniendo fría siempre el agua) y se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 minutos. 10 µL del lisado fue utilizado como INPUT y se mantuvo sin purificar para su posterior procesamiento con el resto de muestras. El resto del lisado se incubó a 4 °C en agitación rotatoria durante 2 horas con las bolas magnéticas Dynabeads Pan Mouse IgG (Invitrogen) a las que se unirá la proteína A de la etiqueta TAP de las cepas utilizadas. Las bolas magnéticas se lavaron 2 veces con tampón de lisis, dos veces con tampón de lisis suplementado con 500 mM NaCl, dos veces con tampón de lavado (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 250 mM LiCl, NP-40 al 0.5 % (v/v), desoxicolato sódico al 0.5 % (p/v)

y 1mM EDTA) y una vez con tampón TE (Tris-HCl y EDTA 1mM). La elución se realizó con tampón de elución (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA y 10 % SDS (p/v)) calentando a 65 °C durante 10 minutos dos veces consecutivas. El entrecruzamiento entre DNA y proteína se revirtió a 65 °C durante toda la noche. El eluido se digirió durante 90 minutos a 45 °C con 7,5 µL de proteinasa K (600 mAU/ml, Novagen). El DNA se purificó mediante 2 extracciones consecutivas con fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y se precipitó con etanol al 100 %. El DNA final se resuspendió en 40 µL de agua libre de DNAsas. Para su utilización en qPCR se usaron diluciones 1:10 y 1:100 de la IP y del INPUT, respectivamente.

## ENSAYO DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA: ENSAYO DE DESUBICUITINACIÓN

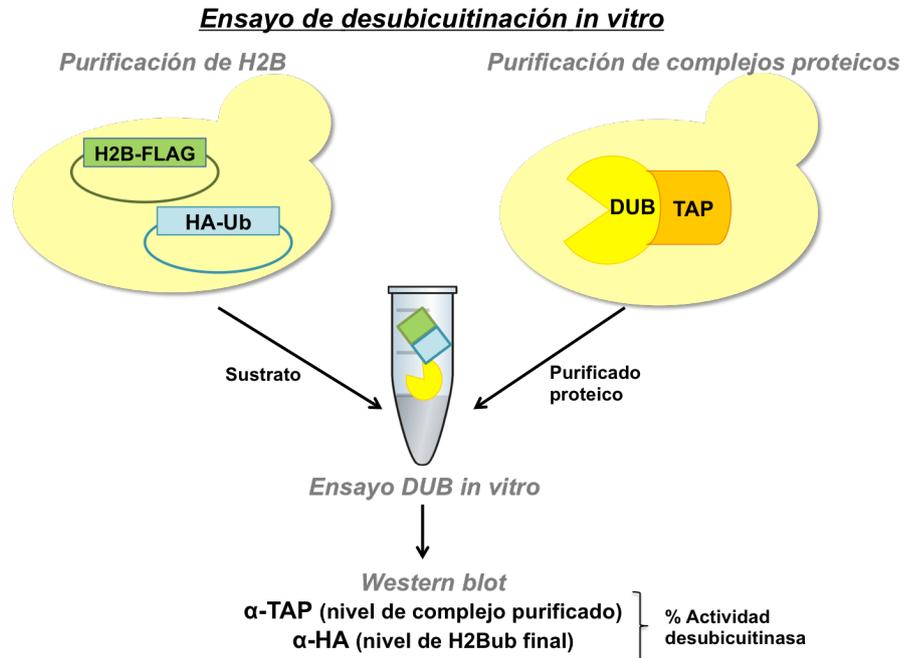
### 1. PURIFICACIÓN DE HISTONA H2B

En primer lugar se purificó la histona H2B que servirá de sustrato en el ensayo. Para ello, se recogió la cepa *HTB1* que tiene deleciónado el gen codificante para la histona H2B. Dicha cepa contiene dos plásmidos: uno con una versión de H2B etiquetada con FLAG (pZS145 HTA1-Flag-HTB1-CEN-HIS3), y otro con la proteína ubiquitina etiquetada con el epítipo HA (GAPDH-3HA-UB14::URA3). Se lavó con ácido tricloroacético al 20 % y se rompió en el vórtex modelo Genie-2 (Scientific Instruments) a 4 °C durante 15 minutos con perlas de vidrio. El lisado se centrifugó durante 10 minutos a 3.000 rpm. El pellet se resuspendió en 0,2 mL de tampón de carga de proteínas y en 50 µL de Tris 2M, para neutralizar el pH. La muestra se hirvió durante 3 minutos y se centrifugó 10 minutos a 3.000 rpm. 50 µl del sobrenadante se guardó como control

y el resto se incubó con 800  $\mu\text{L}$  de tampón IP (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, NP-40 al 0.5 %, y 0.5 mg/ml BSA) con 25  $\mu\text{L}$  de resina M2 anti-Flag (Sigma). Tras una incubación de una hora a 4 °C, la resina se lavó con tampón IP tres veces. La histona enriquecida se eluyó mediante competición incubando la resina con 2  $\mu\text{L}$  de péptido Flag (Sigma) a una concentración de 4 mg/ml en 40  $\mu\text{L}$  de tampón IP durante 30 minutos a temperatura ambiente. El eluido final contendrá la histona H2B purificada necesaria para el ensayo de desubicitinación (Figura M2).

## 2. ENSAYO DE DESUBICUITINACIÓN

El ensayo se realizó incubando 4  $\mu\text{L}$  de histona purificada (H2B-Flag ubiquitinada y sin ubiquitinar) con 100  $\mu\text{L}$  de eluido nativo purificado por la técnica TAP y eluido durante 30 minutos a 30 °C. Como control negativo se incubó la histona junto con el tampón de elución de la TAP, o bien, junto con un purificado nativo procedente de la cepa Sus1-TAP *sgf73* $\Delta$ . La actividad desubicitinasa se detectó mediante WB empleando anticuerpos anti-HA (Sigma), lo que permitió inmunodetectar la cantidad de histona H2B ubiquitinada (H2Bub-HA) (Figura M2).



**Figura M2.** Procedimiento experimental del ensayo de desubicitinación *in vitro*. La histona H2B-Flag que sirve como sustrato del ensayo se purificó con la resina M2 (Sigma). El ensayo se realizó incubando 500 ng de histona purificada con 100  $\mu$ L de eluido nativo purificado por la técnica TAP durante 30 minutos a temperatura ambiente. Como control negativo se incubó la histona H2B junto con el tampón de elución. Los niveles de complejo purificado y de histona H2Bub final se detectaron por WB.

## TÉCNICAS MICROSCÓPICAS

### *LOCALIZACIÓN IN VIVO DE PROTEÍNAS*

La visualización de proteínas etiquetadas con GFP se llevó a cabo creciendo las células en el medio correspondiente a una OD<sub>600</sub> de 0,3-0,5. Las células se centrifugaron y lavaron con 5 mL de PBS 1X (13,7 mM de NaCl, 0,27 mM de KCl, 0,43 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,14 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Las células se fijaron con 0,5 mL de metanol incubándolas 10 minutos en hielo. Tras la fijación se volvieron a lavar con 1 mL de PBS. Se resuspendieron en un volumen final de 100 µL de H<sub>2</sub>O y utilizaron unos 5 µL para su visualización en microscopio inmobilizadas en un porta. Para la visualización de los núcleos celulares añadió un medio de montaje que contiene DAPI (Vectashield Mounting Media, VectorLabs). La obtención de las imágenes se hizo con un microscopio confocal TCS-SP2-AOBS de Leica por el personal del Servicio de Microscopía Confocal del Centro de Investigación Príncipe Felipe.

### *HIBRIDACIÓN IN SITU DE RNAs*

#### DETECCIÓN DE mRNAs POLIADENILADOS

La hibridación de los mRNA poliadenilados se realizó empleando cultivos de 50 mL con una OD<sub>600</sub> 0,5-0,8. Las células se fijaron con formaldehído al 4 % (v/v) incubándose a temperatura ambiente durante 60 minutos. Tras recoger las células por centrifugación a 3.000 rpm 3 minutos, se lavaron con 5 mL KPO<sub>4</sub> 0,1 M pH 6,4. Se hizo un lavado adicional con una mezcla de tampón de lavado (KPO<sub>4</sub> 0,1 M y sorbitol 1,2 M). Las células se transfirieron a un nuevo tubo. Se centrifugó 1 minuto a 3.000 rpm y se volvió a resuspender en 1 mL de tampón de lavado con Zymoliasa

100T (5 mg de Zymoliasa en 10 mL de tampón de lavado), incubando 30 minutos a 30 °C en agitación rotatoria para obtener los esferoplastos. Tras una centrifugación de 3 minutos a 3.000 rpm y un lavado con 1 mL de tampón de lavado, el sedimento se resuspendió en 30 µL de este tampón. Toda la solución se añadió a pocillos recubiertos de poli-L-lisina. Estos pocillos fueron preparados con anterioridad, cubriendo con poli-L-lisina cada uno de los pocillos de la placa que se iban a utilizar, dejando secar el exceso de poli-L-lisina. Una vez aplicada la muestra en los pocillos así tratados, se dejaron reposar las células sobre los pocillos durante 10 minutos para su adhesión, y las células no adheridas fueron retiradas por aspiración. Los pocillos se lavaron dos veces con 100 µL/pocillo de SSC 2X (0,3 M NaCl, 0,03 M citrato de sodio) y las muestras se incubaron en la misma solución durante 10 minutos. Se retiró el SSC 2X, se añadió 25 µL de tampón de pre-hibridación (sulfato de dextrano al 10 % (p/v), formamida desionizada al 50 % (v/v), tRNA de *Escherichia coli* 125 µg/mL, DNA de esperma de salmón 500 µg/mL, Denhart 1X, DTT 1mM y RNasina 4 U/mL) y se incubó al menos 1 hora a 37 °C. Se añadió 1 pmol de una sonda de oligo(dT)<sub>18</sub> acoplada al fluoróforo Cy3, y se incubó a 37 °C durante toda la noche en una cámara húmeda. Los pocillos se lavaron sucesivamente dos veces con 100 µL de SSC 2X, dos veces con SSC 1X y otras dos con SSC 0,5X. Tras los lavados se dejó secar la placa, se añadió 3 µL/pocillo de medio de montaje Vectashield, el cual contiene DAPI, se colocó un cubre y se dejó al menos 1 hora a temperatura ambiente antes de observar la preparación al microscopio de fluorescencia DM6000B de Leica con el objetivo 63X PL APO.

### DETECCIÓN DE RNAs ESPECÍFICOS (*STL1*)

Para la hibridación *in situ* de los RNAs específicos de *STL1* se crecieron las células en YPD toda la noche hasta una OD exponencial y se trataron con 0,4 M de NaCl durante 20 minutos. La continuación del protocolo es similar al que se sigue para detectar todos los RNA poliadenilados. Se recogen y lavan las células con tampón B (KPO<sub>4</sub> 0,1 M a pH 7,5 y 1,2 M de sorbitol). Para la obtención de los esferoplastos se utilizan tampón B que además contiene 20 mM de Complejo Vanadyl-Ribonucleosido (Sigma), 28 mM de β-mercaptoetanol, 0,06 mg/mL de PMSF y 5 mg de Zymoliase 100T. SSC 2X con 300 mM NaCl, 30 mM citrato de sodio y 50 % de formamida. Tras la incubación de 30 minutos se lavan las células con tampón B sin Zymoliase. Una vez adheridas las células a los portas se añaden 30 µL de tampón de hibridación (10 % dextran sulfato, 2 mM Complejo Vanadyl, 0,02 % BSA, 40 µg de tRNA de *E. coli*, SSC 2X y 50 % formamida) y 20 ng de sondas específicas para *STL1* acoplados al fluoróforo Cy3. Tras la incubación durante toda la noche se lavan los portas con tampón de rehidratación (SSC 2X y 50 % formamida).

### ANÁLISIS DE IMAGEN

La cuantificación de las bandas obtenidas por WB, y el análisis de las imágenes procedentes del microscopio de fluorescencia se realizó usando el programa Image J (Instituto Nacional de la salud (NIH) de EEUU, <http://imagej.nih.gov/ij/>).

## TÉCNICAS GENÓMICAS

### *CHIP-EXO*

La obtención y secuenciación de muestras por la técnica de ChIP-EXO para detectar el reclutamiento de Sus1 al genoma de levadura, fue realizada por la empresa Peconic® LLC (State College, PA, USA). Para ello se etiquetó a Sus1 con el epítipo MYC en las cepas WT, *spt8Δ* y *spt7-1180*. Las 3 cepas se crecieron toda la noche en YPD a 25 °C. Cuando llegaron a fase exponencial de crecimiento, parte del cultivo se sometió a choque térmico de 37 °C durante 15 minutos. El protocolo detallado del ensayo de ChIP-EXO que se siguió a continuación para las 6 muestras se puede encontrar en (Rhee & Pugh, 2012).

### *HIBRIDACIÓN DE MICROCHIPS DE EMBALDOSADO*

Para el estudio del transcriptoma de los mutantes escogidos, obtuvimos los RNAs totales de las cepas seleccionadas (3 réplicas biológicas por cada cepa) y se hibridaron en microchips de embaldosado Tiling Array Custom (PN 52005, Affymetrix, Santa Clara, CA). El diseño de estos arrays fue realizado por Lars Steinmetz del Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL Heidelberg, Alemania) (David *et al.*, 2006), utilizando como referencia la secuencia de la cepa de laboratorio *Saccharomyces cerevisiae* S288c. Estos microchips de embaldosado se caracterizan por cubrir las dos cadenas del genoma de *S. cerevisiae* utilizando 6,5 millones de sondas de una longitud de 25 nt que se disponen de tal manera que existe un solapamiento de unos 17 nt entre ellas (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/files/A-AFFY-116>).

Las hibridaciones se realizaron a través del Servicio de Análisis Multigénico de la Unidad Central de Investigación UCIM/INCLIVA de la Universidad de Valencia y los datos crudos obtenidos nos fueron proporcionados para su posterior análisis.

## MÉTODOS DE ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LOS DATOS GENÓMICOS

### CHIP-EXO

Los archivos proporcionados por Peconic® LLC con las lecturas obtenidas mediante secuenciador Illumina® para las 6 muestras analizadas (3 cepas en dos condiciones diferentes) fueron analizados por Pedro Furió Tarí del laboratorio de Genómica de la Expresión Génica del Centro de Investigación Príncipe Felipe dirigido por la Dra. Ana Conesa. Para la obtención de los picos de unión de Sus1 a partir de las lecturas obtenidas se utilizó el algoritmo MACS (<http://liulab.dfci.harvard.edu/MACS/>). Para eliminar las lecturas correspondientes a inespecificidades de la inmunoprecipitación, las lecturas obtenidas a partir de cepas sin etiqueta (controles negativos) crecidas a 25 °C y a 37 °C se restaron a las lecturas obtenidas en nuestras muestras.

Una vez identificados los picos, éstos se filtraron para eliminar posibles falsos positivos relacionados con regiones *calientes* que suelen ser inmunoprecipitadas y secuenciadas de manera inespecífica. Para ello, se eliminaron de nuestros análisis las lecturas correspondientes a 238 regiones descritas como secuencias “*hiperchipeables*” en (Teytelman *et al.*, 2013). Por último, dado que existen diferencias entre las distintas profundidades de secuenciación de las

muestras para filtrar los picos significativos de los que no lo son y establecer un punto de corte equivalente para todas las muestras, se establecieron los puntos de corte para cada muestra de manera correlativa a su profundidad de secuenciación. De esta forma el porcentaje de picos significativos detectados es similar en todas las muestras. Los picos finales obtenidos se asignaron a los elementos del genoma anotados hasta la fecha. Los datos finales fueron procesados mediante software basado en *scripts* de código en lenguaje estadístico R (<http://www.r-project.org/>) escritos por Pedro Furió Tarí para la obtención de las diferentes representaciones gráficas.

### *MICROCHIPS DE EMBALDOSADO*

Los archivos .CEL proporcionados por el Servicio de Análisis Multigénico (Unidad Central de Investigación UCIM/INCLIVA, Universidad de Valencia), que contienen las imágenes adquiridas mediante el scanner de microchips, se procesaron y normalizaron con el software *Tiling Array Software* (TAS, Affymetrix) siguiendo los parámetros fijados por defecto. Los datos normalizados a partir de las 3 réplicas biológicas para cada cepa, fueron procesados posteriormente a través de un software basado en *scripts* de código en lenguaje estadístico R (<http://www.r-project.org/>). Los códigos usados fueron escritos y adaptados por Vicent Pelechano, Ishaan Gupta y Zhenyu Xu (EMBL Heidelberg) y cedidos para su uso por el Dr. José Enrique Pérez Ortín y el Dr. Antonio Jordán (Universitat de València).

### *AGRUPACIÓN DE PERFILES TRANSCRIPCIONALES*

Los datos de microchips utilizados para la realización de la clasificación jerárquica se obtuvieron del trabajo del grupo del Dr. Hölstege (Lenstra *et al.*, 2011b). Los datos fueron filtrados mediante software basado en *scripts* de código en lenguaje estadístico R (<http://www.r-project.org/>) escrito por Sonia Tarazona (Laboratorio de Genómica de la Expresión Génica del Centro de Investigación Príncipe Felipe). Los datos filtrados se procesaron para la generación de los árboles jerárquicos con el software MultiExperiment Viewer (<http://www.tm4.org/mev.html>).

**CAPÍTULO 1:**  
**¿Quién es el complejo SLIK?**



## INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Múltiples formas del complejo SAGA han sido descritas desde hace casi dos décadas (Belotserkovskaya *et al.*, 2000; Grant *et al.*, 1998b; Saleh *et al.*, 1997). El complejo SLIK (*SAGA-Like*) fue descubierto como un nuevo complejo histona acetil-transferasa, muy similar en composición y especificidad de sustrato al complejo SAGA (Pray-Grant *et al.*, 2002; Wu & Winston, 2002). Ambos complejos tienen preferencia por acetilar los mismos residuos de lisina de la histona H3. También se ha descrito actividad de desubicutinación en ambos complejos (Lee *et al.*, 2009).

### COMPOSICIÓN DE SLIK

SLIK fue descrito como una versión de SAGA que contiene una forma truncada de la subunidad Spt7, y que además ha perdido la subunidad Spt8. SLIK podría potencialmente incluir componentes adicionales no encontrados en SAGA, sin embargo, sólo un único componente ha sido identificado por espectrometría de masas, Rtg2 (Kim *et al.*, 2004; Pray-Grant *et al.*, 2002).

Rtg2 es una de las 3 proteínas (Rtg1, Rtg2 y Rtg3) no esenciales identificadas como componentes de la vía de respuesta retrógrada en levaduras (Jia *et al.*, 1997; Liao & Butow, 1993). Esta vía de señalización está implicada en la comunicación entre orgánulos, especialmente entre la mitocondria y el núcleo, que regula la expresión de genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales, peroxisomales y citoplasmáticas (Epstein *et al.*, 2001). Rtg1 y Rtg3 forman un heterodímero que actúa como factor de transcripción uniéndose a promotores de algunos genes. Rtg2 se une a este

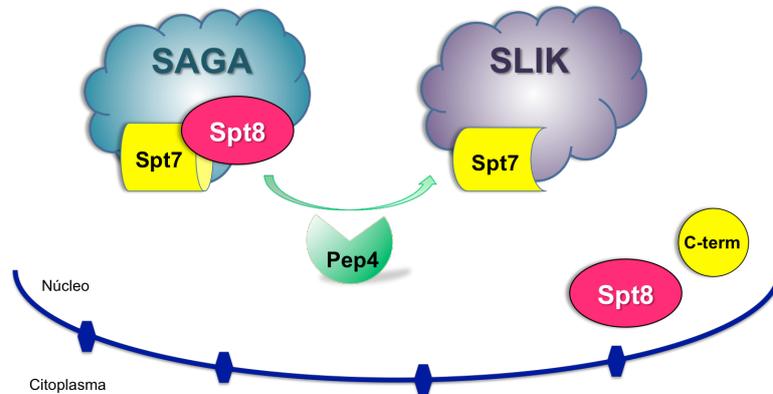
heterodímero en el citoplasma y es esencial para su translocación al núcleo (Sekito *et al.*, 2000). Existen evidencias de que Rtg2 podría ser un componente estable de SLIK, y de que SLIK a través de Rtg2 se une al promotor de ciertos genes bajo condiciones de inducción, sugiriendo un papel de SLIK en la activación transcripcional mediada por Rtg3. Rtg2 además juega un papel fundamental en la regulación del tiempo de vida media celular y se ha propuesto que lo hace a través de SLIK (Kim *et al.*, 2004).

### FORMACIÓN DE SLIK

El procesamiento del extremo C-terminal de Spt7 necesario para la formación de SLIK es llevado a cabo por una proteasa. La proteasa encargada del corte de Spt7 es Pep4. Pep4 es una proteasa vacuolar (proteínasa A) implicada en la maduración y activación de hidrolasas vacuolares. Tratamientos con ácido acético o peróxido de hidrógeno alteran la permeabilidad vacuolar, de modo que Pep4 migra de la vacuola al citoplasma para mediar en la degradación mitocondrial y de algunas nucleoporinas (Mason *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2010). También está implicada en envejecimiento y apoptosis, siendo esencial bajo condiciones de ayuno nutricional (Marques *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2010; Teichert *et al.*, 1989). Pep4 presenta alrededor de un 50% de homología con proteasas lisosomales humanas como la catepsina L, que es capaz de migrar del compartimento lisosomal al núcleo donde regula la actividad de factores de transcripción y el corte de la cola de la histona H3 (Duncan *et al.*, 2008; Goulet *et al.*, 2004).

Existen dos mecanismos propuestos por los que se podría producir el corte de Spt7 para la formación de SLIK:

- En el primer mecanismo propuesto, Spt7 se procesaría en el citoplasma en un paso previo al ensamblaje de SLIK (Hoke *et al.*, 2007). En este caso, el procesamiento de Spt7 para dar tanto la forma que encontramos en SLIK, como una segunda forma truncada descrita, ocurriría en ausencia del resto de componentes de SAGA y SLIK. Además, la acetilación de la histona H3 llevada a cabo por Gcn5 tampoco sería un paso previo para que esto ocurra, y por tanto sería un proceso independiente de las funciones de SAGA. De hecho, el estudio de los cambios en los niveles de Spt7 completa y Spt7 truncada a lo largo del tiempo, ha demostrado que la versión de Spt7 de SAGA no se convertiría en formas más cortas que formarían parte de SLIK, sino que la biosíntesis de las diferentes formas de Spt7 de SAGA y SLIK se daría de manera independiente (Hoke *et al.*, 2007).
- En el segundo mecanismo propuesto, SLIK se formaría en el núcleo a partir del corte de moléculas de Spt7 que forman parte de SAGA (Figura I9). En este último caso, Spt8 jugaría un papel fundamental. El corte del dominio C-terminal de Spt7 que conlleva la formación de SLIK se da entre los residuos 1141 y 1143 (Mischerikow *et al.*, 2009). Este sitio de corte está situado justo antes del sitio de unión de Spt8 (Wu & Winston, 2002). El corte y eliminación del extremo C-terminal de Spt7 implica la liberación de Spt8. Además, la ausencia de Spt8 aumenta la eficiencia con la que Spt7 es truncado. Por lo tanto, la unión de Spt8 a Spt7 interfiere en su procesamiento reduciendo la accesibilidad de la proteasa Pep4, posiblemente mediante impedimentos estéricos (Spedale *et al.*, 2010).



**Figura I9.** Modelo propuesto del proceso de formación de SLIK en el núcleo. Las moléculas de SAGA que se encuentran en el núcleo sufren un proceso proteolítico a través de la proteasa Pep4. En dicho proceso, la subunidad Spt8 y el extremo C-terminal de la subunidad Spt7 son liberados, dando como resultado la formación de SLIK.

La interacción Spt7-Spt8 es directa, permaneciendo ambos unidos incluso en ausencia de dos componentes esenciales para la correcta organización del complejo como son Spt20 y Ada1. Sin embargo, aunque Spt8 es importante en el procesamiento de Spt7, no es necesario para el corte proteolítico y la formación de SLIK (Wu & Winston, 2002).

### *LAS FUNCIONES DE SLIK EN LA TRANSCRIPCIÓN*

A través de los mecanismos descritos, la regulación del corte de Spt7 dependerá de los balances que se establezcan entre las concentraciones de Pep4 y Spt8. Se ha propuesto que bajo condiciones de estrés o ayuno de nitrógeno, los niveles de Pep4 son más elevados, de manera que se incrementaría el corte de Spt7 (Spedale *et al.*, 2010). En este sentido, la delección de varias subunidades comunes a SAGA y SLIK parece aumentar la

sensibilidad a la droga rapamicina (simula condiciones de ayuno de nitrógeno). Por tanto, bajo condiciones de ayuno de nitrógeno, los niveles de Pep4 se verían aumentados induciendo el corte de Spt7 que conllevaría la liberación de Spt8 de SAGA y la formación de SLIK. A través de este mecanismo SLIK actuaría regulando la expresión de genes implicados en la respuesta a dicho estado nutricional (Spedale *et al.*, 2010).

A pesar de que SAGA es un coactivador, sus subunidades Spt7, Spt3 y Spt8 están implicadas en la regulación negativa de los promotores *HIS3* y *TRP3* (Sternier *et al.*, 2002). Se ha propuesto un modelo en el que en condiciones de inducción de dichos genes, Spt7 de SAGA es procesada y Spt8 se libera del complejo, dando como resultado la formación de SLIK. De este modo SLIK actuaría como un complejo activador específico de dichos promotores (Sternier *et al.*, 2002). Este modelo explicaría un mecanismo molecular por el cual un complejo regulador de la transcripción sería capaz de modular negativa (SAGA) y positivamente (a través de SLIK) la transcripción de ciertos genes (Sternier *et al.*, 2002).

El homólogo de Spt7 identificado en humanos es llamado STAF65 $\gamma$ , y es una proteína considerablemente más pequeña que en levaduras (414 aminoácidos (aa) en humanos frente a 1332 aa en levadura). Curiosamente, STAF65 $\gamma$  es homólogo de la región C-terminal de Spt7 en *S. cerevisiae* (últimos 543 aa), incluyendo la región donde Spt7 es truncada. Este dato concuerda con el hecho de que fragmentos C-terminal de Spt7 sean capaces de complementar fenotipos del mutante *spt7* $\Delta$ . Parece ser que la región N-terminal de Spt7 en *S. cerevisiae* estaría codificado en humanos por otro gen distinto (Wu & Winston, 2002).

Actualmente no se ha identificado ningún homólogo de Spt8 en humanos. Sin embargo, esta proteína juega un papel clave en el inicio

de la transcripción en levaduras. En condiciones de represión transcripcional, SAGA se une a TBP a través de las subunidades Spt8, Spt3 y Ada1 (Mohibullah & Hahn, 2008). Spt8 es necesario (Sternier *et al.*, 1999) y suficiente (Sermwittayawong & Tan, 2006) para la unión de TBP a SAGA. Sin embargo, TBP no se une simultáneamente a SAGA y al DNA, de forma que SAGA secuestra a TBP inhibiendo su unión a los promotores. De esta manera Spt8 inhibe la unión de SAGA al PIC en ausencia de activación (Warfield *et al.*, 2004). En condiciones de inducción transcripcional, un factor activador se une a la región UAS del promotor reclutando a SAGA que liberará a TBP para su unión a la caja TATA del promotor permitiendo el inicio de la transcripción (Sermwittayawong & Tan, 2006).

Dentro de los objetivos de mi trabajo doctoral nos propusimos profundizar en el estudio de las funciones de SLIK en *S. cerevisiae* en la transcripción así como su posible relación funcional con la exportación de RNAs a través de Sus1.

## RESULTADOS

### 1.1. Caracterización bioquímica y funcional del complejo SLIK.

#### 1.1.1. Sus1 es un componente estable de SLIK, independientemente de SAGA.

Atendiendo al hecho de que la levadura *S. cerevisiae* posee dos complejos prácticamente idénticos, SAGA y SLIK, de los cuales SAGA es el mejor descrito y estudiado en los últimos 15 años, nos propusimos hacer un estudio más detallado de las funciones del complejo SLIK con el objetivo de comprender los roles que ambos complejos tienen en la célula.

Considerando que Sus1 es un factor coordinador del acoplamiento entre la transcripción y la exportación de los mRNAs a través de los complejos SAGA y TREX-2, parte de nuestra investigación sobre SLIK se diseñó a través del estudio de Sus1. De esa manera centramos el estudio sobre SLIK en el contexto del acoplamiento entre transcripción y exportación de los RNAs. Por este motivo, comenzamos nuestros estudios llevando a cabo un análisis de las interacciones físicas de Sus1 en mutantes en los que se impide la formación de uno de los complejos, SAGA o SLIK, de forma selectiva. Para ello llevamos a cabo purificaciones TAP de las siguientes cepas crecidas en YPD a 30 °C:

- Sus1-TAP *pep4* $\Delta$  (*slik* $\Delta$ ): SLIK no puede formarse por la ausencia de Pep4, la proteasa encargada de truncar el dominio C-terminal de Spt7, necesario para la formación de SLIK.
- Sus1-TAP *spt8* $\Delta$  y Sus1-TAP *spt7-1180*-PK (*saga* $\Delta$ ): SAGA no se forma debido a la ausencia de SPT8. En el caso del

mutante *spt7-1180* se deletionó la secuencia correspondiente al extremo C-terminal de la proteína a partir del aminoácido 1180 para producir una versión truncada de Spt7. Tanto la ausencia de *SPT8* como el procesamiento de Spt7 fuerzan la formación de SLIK.

- Sus1-TAP *spt7Δ* (*sagaΔ slikΔ*): la deletión del componente estructural *SPT7* provoca que ambos complejos, SAGA y SLIK, se desorganicen y desestructuren.

El análisis mediante espectrometría de masas LC-MS/MS de los eluidos purificados obtenidos de las diferentes muestras mostró que no existen diferencias en las proteínas que interactúan con Sus1 en los mutantes *pep4Δ*, *spt8Δ* y *spt7-1180*-PK (Tabla 1.1). Sin embargo, el análisis del mutante estructural *spt7Δ* mostró que Sus1 permanece físicamente unido específicamente a los otros 3 componentes del módulo de desubcunitación (DUB) del que forma parte, pero no al resto de componentes de SAGA/SLIK.

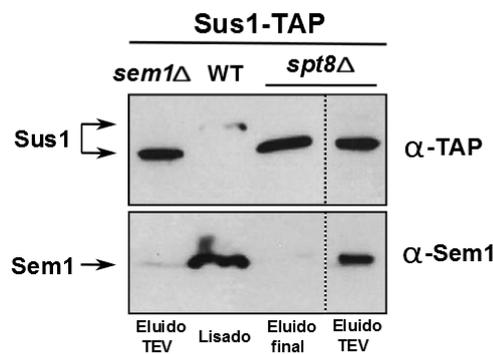
Curiosamente en ninguna de las purificaciones de SLIK en los mutantes *sagaΔ*, se identificó por espectrometría de masas (MS) a Rtg2 como interactor de Sus1. Este dato contrasta con las publicaciones que sugieren que Rtg2 es un componente estable de SLIK.

| Complejo multiproteico | Nombre de la proteína | Sus1-TAP                 | Sus1-TAP <i>spt7Δ</i> | Sus1-TAP <i>pep4Δ</i> | Sus1-TAP <i>spt8Δ</i> | Sus1-TAP <i>spt7-1180-PK</i> |
|------------------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------------|
|                        |                       | Proteínas detectadas (✓) |                       |                       |                       |                              |
| <b>SAGA</b>            | Sus1                  | ✓                        | ✓                     | ✓                     | ✓                     | ✓                            |
|                        | Ubp8                  | ✓                        | ✓                     | ✓                     | ✓                     | ✓                            |
|                        | Sgf11                 | ✓                        | ✓                     | ✓                     | ✓                     | ✓                            |
|                        | Sgf73                 | ✓                        | ✓                     | ✓                     | ✓                     | ✓                            |
|                        | Taf9                  | ✓                        | -                     | ✓                     | ✓                     | ✓                            |
|                        | Taf10                 | ✓                        | -                     | ✓                     | ✓                     | ✓                            |
|                        | Taf6                  | ✓                        | -                     | ✓                     | ✓                     | ✓                            |
|                        | Taf5                  | ✓                        | -                     | ✓                     | ✓                     | ✓                            |
|                        | Taf12                 | ✓                        | -                     | ✓                     | ✓                     | ✓                            |
|                        | Spt20                 | ✓                        | -                     | ✓                     | ✓                     | ✓                            |
|                        | Spt3                  | ✓                        | -                     | ✓                     | ✓                     | ✓                            |
|                        | Spt7                  | ✓                        | -                     | ✓                     | ✓                     | ✓                            |
|                        | Spt8                  | ✓                        | -                     | ✓                     | -                     | -                            |
|                        | Tra1                  | ✓                        | -                     | ✓                     | ✓                     | ✓                            |
|                        | Ada1                  | ✓                        | -                     | ✓                     | ✓                     | ✓                            |
|                        | Ada3                  | ✓                        | -                     | ✓                     | ✓                     | ✓                            |
|                        | Ada2                  | ✓                        | -                     | ✓                     | ✓                     | ✓                            |
| Gcn5                   | ✓                     | -                        | ✓                     | ✓                     | ✓                     |                              |
| Sgf29                  | ✓                     | -                        | ✓                     | ✓                     | ✓                     |                              |
| <b>TREX-2</b>          | Cdc31                 | ✓                        | ✓                     | ✓                     | ✓                     | ✓                            |
|                        | Thp1                  | ✓                        | -                     | ✓                     | ✓                     | ✓                            |
|                        | Sem1                  | ✓                        | ✓                     | ✓                     | -                     | -                            |
|                        | Sac3                  | ✓                        | ✓                     | ✓                     | ✓                     | ✓                            |

Tabla 1.1. Análisis de las interacciones de Sus1 en una cepa silvestre y en mutantes *sagaΔ* y *slikΔ*. Identificación mediante espectrometría de masas (MudPIT) de los péptidos obtenidos en las purificaciones TAP mencionadas. Los datos obtenidos se validaron con la información almacenada en las bases de datos de secuencias conocidas mediante el motor de búsqueda MASCOT. En la tabla se indica si se han identificado péptidos para cada proteína de los complejos SAGA y TREX-2.

Por otro lado, Sus1 interacciona con la mayoría de componentes de TREX-2 tanto en *sagaΔ* como en *slikΔ*. Sin embargo, el componente de TREX-2, Sem1 no fue identificado en algunas de estas muestras. De trabajos anteriores de nuestro laboratorio sabemos que la identificación de Sem1 por espectrometría de masas no siempre es posible, de modo que

procedimos a verificar este resultado por WB. Como se muestra en la Figura 1.1, en ausencia de *SPT8*, Sus1 no copurifica con Sem1 en el eluido final de la purificación. Sin embargo, el hecho de que en el primer eluido de la purificación (eluido TEV) sí se observe una banda específica correspondiente a Sem1, sugiere que la interacción Sus1-Sem1 es más lábil en el mutante *spt8Δ* y por ello no se detecta en el eluido final.



**Figura 1.1.** Sus1 interacciona de forma lábil con Sem1 en ausencia de *SPT8*. Se analizaron las purificaciones TAP de Sus1 en la cepa WT y los mutantes *sem1Δ* y *spt8Δ*. La presencia de Sem1 se estudió en 3 momentos diferentes de la purificación TAP: lisado (antes de purificar), eluido TEV (tras la primera purificación) y eluido final (tras la segunda purificación). Los niveles de proteína cebo Sus1-TAP se comprobaron mediante WB con anticuerpo α-TAP (panel superior). Los niveles de proteína Sem1 se detectaron con anticuerpo específico α-Sem1 (panel inferior).

Los resultados obtenidos sugieren que la unión de Sus1 a SAGA o SLIK es independiente de la formación del otro complejo, y además que la ausencia de cualquiera de los dos no afecta a la interacción de Sus1 con el complejo TREX-2. Sin embargo, hemos visto como la desorganización simultánea de SAGA y SLIK en el mutante *spt7Δ* sí provoca que Sus1 pierda su interacción con la mayoría de proteínas de SAGA y SLIK, excepto con los componentes del módulo de

desubicultinación (DUB). Esto parece indicar que las interacciones que se establecen entre las 4 subunidades del DUB son más estables que su unión con el resto de subunidades de SAGA/SLIK (este punto se desarrolla con mayor profundidad en el Capítulo 2).

### **1.1.2. SLIK participa en la desubicultinación de la histona H2B *in vivo* e *in vitro*.**

Tal y como se describe en la introducción a este capítulo, SLIK fue descubierto como un complejo con actividad de acetilación de histonas, y dada su semejanza con SAGA, la cuestión de si también posee actividad de desubicultinación ha sido de obligada respuesta. El Dr. Lee y colaboradores (Lee *et al.*, 2009) han mostrado mediante un ensayo de desubicultinación *in vitro* cómo el complejo purificado a partir de la versión truncada de Spt7 (*spt7-1180*) que se asocia con SLIK, presenta una actividad de desubicultinación similar a la obtenida para el complejo SAGA intacto. De esta forma, mostraron como SLIK también presenta, al igual que SAGA, actividad de desubicultinación *in vitro*.

Con el objetivo de comprobar que la actividad de desubicultinación de SLIK es un proceso global que se da *in vivo*, llevamos a cabo un análisis de los niveles totales de histona H2B ubicuitinada en distintos extractos celulares. Para ello, realizamos extractos totales de histonas de las siguientes cepas:

- WT: cepa silvestre con actividad de desubicultinación máxima.
- *sgf73Δ*: actividad de desubicultinación mínima debido a la inactivación del módulo de desubicultinación.

- *spt7-1180*: cepa *sagaΔ* donde SLIK mantendría su actividad de desubicitinación propuesta por Lee y colaboradores.

Los niveles de histona H2B ubiquitinada fueron analizados mediante WB con anticuerpo específico que detecta H2B ubiquitinada (anti-H2Bub). Los datos se normalizaron por los niveles obtenidos para un control de carga (Pgk1). Como se observa en la Figura 1.2 los niveles normalizados de histona H2B ubiquitinada en el mutante *spt7-1180* son muy similares a los de la cepa WT. De modo que probablemente, en el mutante *spt7-1180*, SLIK estaría participando en la desubicitinación de la histona H2B *in vivo*, aunque no podemos descartar que otras desubicitinasas participen en la regulación de estos procesos ante la ausencia de SAGA.

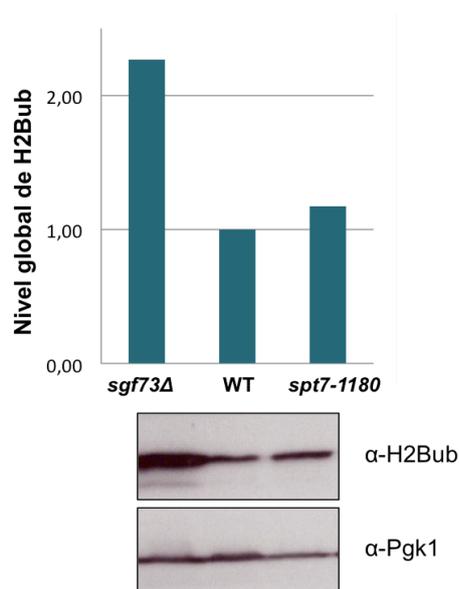


Figura 1.2. SLIK podría participar en mantener los niveles globales de H2Bub *in vivo*. Análisis de los niveles de histona H2B ubiquitinada global. Se obtuvieron extractos totales de histonas de las cepas WT (control positivo de actividad

desubcuitinasa), *sgf73* $\Delta$  (control negativo de actividad desubcuitinasa) y *spt7-1180*, crecidas en YPD a 30 °C hasta OD<sub>600</sub> exponencial. Los niveles totales de H2B ubiquitinada se detectaron mediante WB con anticuerpo específico  $\alpha$ -H2Bub (panel superior). Como control de carga del experimento se midieron los niveles de proteína Pgc1 con anticuerpo  $\alpha$ -Pgc1. Los niveles de H2Bub totales se normalizaron en función de los niveles de Pgc1 para cada muestra (gráfico).

En vista de estos datos, decidimos corroborar los resultados descritos en (Lee *et al.*, 2009), y comprobar la actividad desubcuitinasa de SLIK mediante un ensayo de desubcuitinación *in vitro*.

Para realizar este experimento, por un lado se purificó la histona H2B a partir de una cepa que contiene la histona H2B etiquetada con FLAG (H2B-FLAG) y la proteína ubiquitina etiquetada con HA (Ub-HA) (ver materiales y métodos). Por otro lado, purificamos mediante la técnica TAP los complejos asociados a dos subunidades del módulo de desubcuitinación: Ubp8 y Sus1. Ambas proteínas fueron purificadas a partir de la cepa WT y el mutante *spt7-1180* (*saga* $\Delta$ ).

Cada purificado se incubó con histona H2B y la actividad desubcuitinasa se analizó mediante WB empleando anticuerpo anti-HA para detectar la histona ubiquitinada. Los niveles de histona ubiquitinada final para cada muestra se normalizaron respecto a los niveles de histona ubiquitinada de un control negativo donde no hay desubcuitinación.

Los datos obtenidos indican que SLIK tiene actividad de desubcuitinación *in vitro*, manteniendo unos niveles similares a los obtenidos en la cepa WT (Figura1.3)

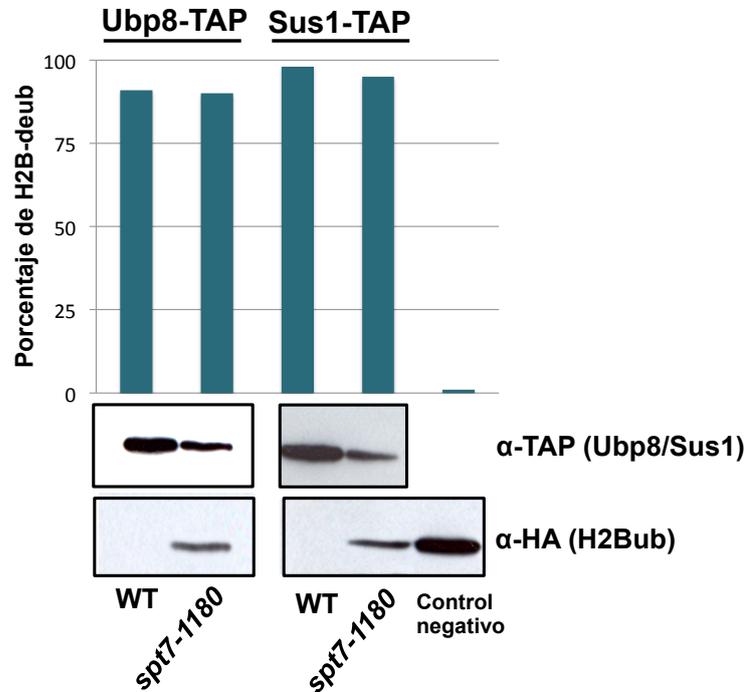


Figura 1.3. SLIK tiene actividad de desubicitinación *in vitro*. Ensayo de desubicitinación *in vitro* del complejo SLIK. Para ello se llevaron a cabo purificaciones TAP de Ubp8 y Sus1 en la cepa WT y en el mutante *spt7-1180*. Dichos purificados se incubaron con histona H2B. Como control negativo la histona H2B purificada se incubó con tampón de elución TAP, sin purificado proteico. Los niveles de complejo purificado se detectaron mediante WB con anticuerpo  $\alpha$ -TAP (paneles superiores). Los niveles de histona H2B ubiquitinada final se detectaron mediante WB con anticuerpo  $\alpha$ -HA (paneles inferiores). Cuando los niveles de H2Bub finales en las muestras son cercanos a 0, para su cuantificación se utilizó un valor mínimo de área = 1. Los niveles de H2Bub de cada muestra se referenciaron a los niveles del control negativo. El porcentaje de H2B desubicitinada final se obtuvo referenciando los niveles de H2Bub a la cantidad de proteína cebo purificada en cada muestra (gráfico).

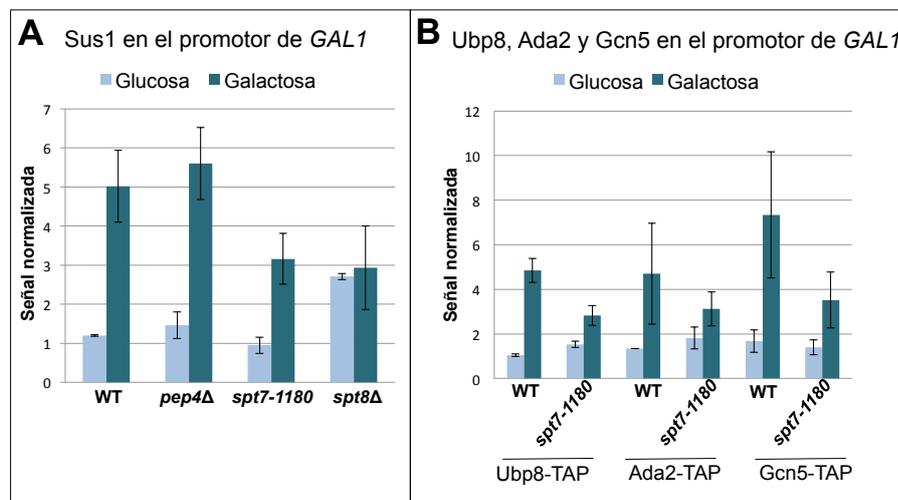
## 1.2. Estudio de la unión de SLIK al promotor de *GAL1*.

Sabemos por nuestro trabajo y otros trabajos publicados que SLIK comparte con SAGA, no solo la mayoría de sus componentes, sino también sus actividades enzimáticas. SAGA se recluta a los promotores de los genes y allí es donde a través de sus actividades de acetilación y desubicitinación regula la iniciación y elongación transcripcional de los mismos. Una cuestión que quisimos abordar fue si SLIK, al igual que SAGA, también se recluta a la cromatina para participar en la regulación de la transcripción. Para contestar a esta pregunta tomamos como modelo el gen *GAL1* por ser uno de los genes regulados por SAGA mejor descritos a nivel molecular (Lohr *et al.*, 1995).

Con el fin de determinar la unión de SLIK al promotor de *GAL1*, utilizamos la técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). Para ello crecimos en YPRaf las siguientes cepas: Sus1-TAP *spt7-1180* (*saga* $\Delta$ ), Sus1-TAP *spt8* $\Delta$  (*saga* $\Delta$ ), y Sus1-TAP *pep4* $\Delta$  (*slik* $\Delta$ ). En medio con rafinosa el gen *GAL1* se encuentra no inducido. De manera que para reprimir o inducir su transcripción, dividimos cada cultivo en dos para añadirles glucosa o galactosa, respectivamente. A través de la etiqueta TAP inmunoprecipitamos Sus1 en las distintas condiciones. Mediante qPCR analizamos los niveles de reclutamiento de Sus1 a la región promotora de *GAL1* tanto en condiciones de represión (glucosa) como de inducción (galactosa), normalizando los datos en función de la cantidad de DNA original (Input) y posteriormente a los valores obtenidos para una región intergénica control.

Los datos obtenidos muestran como Sus1 se une al promotor de *GAL1* en ausencia de *PEP4* (*slik* $\Delta$ ) con niveles similares al WT en condiciones de inducción transcripcional (Figura 1.4A), sugiriendo que la ausencia de SLIK no parece afectar a la unión de Sus1 a través

de SAGA al promotor de *GAL1*. Sin embargo, en los mutantes *saga* $\Delta$  (*spt7-1180* y *spt8* $\Delta$ ) se observa una disminución en la unión de Sus1 al promotor de *GAL1*. Estos resultados indican que SAGA es importante para el reclutamiento de Sus1 al promotor de *GAL1*, pero éste es capaz de ser reclutado en menor medida en ausencia de SAGA, presumiblemente como componente de SLIK.



**Figura 1.4. SLIK es reclutado al promotor de *GAL1* en condiciones de inducción.** Análisis de la unión de las subunidades Sus1 (A), Ubp8, Ada2 y Gcn5 (B) al promotor de *GAL1* en cepas WT y *spt7-1180*. En todos los casos el gen *GAL1* se reprimió o indujo con glucosa o galactosa respectivamente, durante 25 minutos. La unión al promotor de dicho gen se detectó mediante qPCR y se calculó el porcentaje de inmunoprecipitado respecto al lisado (Input). La señal obtenida para el promotor de *GAL1* se normalizó por la señal obtenida para una región intergénica. Las barras de error representan la desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes.

La disminución de la asociación de Sus1 a la cromatina en los mutante *saga* $\Delta$  nos hizo plantearnos si otras subunidades tanto del módulo DUB como de otros módulos de SAGA como el módulo HAT, seguían un patrón similar. Para ello, se realizaron nuevos

ChIPs en el mutante *spt7-1180 (sagaΔ)* para analizar el reclutamiento de las subunidades Ubp8 perteneciente al módulo DUB; y Gcn5 y Ada2 ambas del módulo de acetilación (HAT). Las 3 subunidades analizadas mostraron una unión similar a la de Sus1 en los mutantes *sagaΔ*, reduciéndose su reclutamiento alrededor de un 40-50% respecto del WT (Figura 1.4B). Estos datos sugieren que SAGA se requiere para la correcta unión de distintos submódulos al promotor de *GAL1*, si bien las subunidades estudiadas son capaces de asociarse a dicha región como parte del complejo SLIK.

### 1.3. Estudio global de unión de la unión de SLIK a la cromatina a través de Sus1.

Con el objetivo de profundizar en las funciones de SLIK a nivel de la cromatina, nos propusimos extender a nivel global nuestro estudio de unión de SLIK a la cromatina. Para investigar el posicionamiento global de SLIK en la cromatina decidimos realizar un experimento de ChIP-EXO de la subunidad Sus1 (Rhee & Pugh, 2012). La técnica de ChIP-EXO es una combinación de ChIP-seq y digestión del DNA con exonucleasa lambda. Esta metodología permite la identificación de los sitios de unión de proteínas al DNA con una resolución de casi un nucleótido sin apenas ruido de fondo.

En levaduras, la respuesta a estrés incluye la respuesta a choque térmico. Esta respuesta provoca cambios en la expresión de genes a través de cambios en el posicionamiento de complejos implicados en el inicio de la transcripción. Los genes que más ven inducida su expresión bajo choque térmico son los genes regulados por SAGA a través del reclutamiento del mismo complejo SAGA y otros reguladores (SWI/SNF, INO80, NuA4, Mediador, etc...) (Venters *et*

*al.*, 2011). Por ello decidimos analizar el reclutamiento de SLIK a la cromatina en condiciones normales (25 °C) y de estrés (choque térmico a 37 °C). Para analizar el reclutamiento de SLIK a la cromatina se etiquetó Sus1 con la etiqueta MYC en las cepas WT, *spt7-1180* y *spt8Δ* (*sagaΔ*). La inmunoprecipitación de Sus1-MYC y la secuenciación de las muestras fue llevado a cabo por la empresa Peconic® LLC (State College, PA, USA).

Para el análisis bioinformático de los datos establecimos una colaboración con la Dra. Ana Conesa, jefa del grupo de Genómica de la Expresión Génica del Centro de Investigación Príncipe Felipe. El procesado, normalización y representación gráfica de los datos fue realizado por Pedro Furió Tarí (ver Métodos).

### 1.3.1. Reclutamiento global de Sus1 a genes transcritos por la RNAP II.

Tras normalizar los datos obtenidos para las 3 cepas en las dos condiciones ensayadas, se representó la ocupación de Sus1 en los genes que codifican para proteínas.

Para evaluar el reclutamiento medio de Sus1 a lo largo de todos los genes nucleares transcritos por la RNAP II verificados hasta el momento (n=5076) se optó por una representación tipo “*metagen*”. En este tipo de representación la región comprendida entre el sitio de inicio de la transcripción (TSS) y el sitio de terminación de la transcripción (TTS) se escalan a una longitud común para todos ellos. Esto permite eliminar del análisis la variable de la longitud de los genes. En este caso, las regiones transcritas de los genes se escalaron a una longitud de 1000 pb desde el TSS al TTS. Junto a las regiones transcritas también son representadas las regiones *upstream* (hasta la posición -400 respecto del TSS) y *downstream* (hasta la

posición +300 respecto del TTS) de los genes. Este tipo de representación gráfica permite la visualización del comportamiento global de los datos para un “*gen modelo*”.

#### 1.3.1.1. Distribución general de *Sus1* en los genes que codifican proteínas.

El perfil general del posicionamiento de *Sus1* a lo largo del *gen modelo* en la cepa WT se representa en la Figura 1.5. En ella se observa como *Sus1* se posiciona a lo largo de toda la región transcrita del gen tanto a 25 °C como a 37 °C, con una bajada de unión en las regiones *upstream* y *downstream* (Figura 1.5A y B). Además se puede observar un ligero enriquecimiento de *Sus1* hacia la región 3' de la región transcrita. Curiosamente, el análisis del posicionamiento de SLIK a través de *Sus1* en los mutantes *spt7-1180* y *spt8Δ* mostró un posicionamiento similar al encontrado en el WT (Figura 1.5C). Las pequeñas diferencias observadas entre las 6 muestras pueden ser debidas a las diferentes profundidades de secuenciación de las muestras.

Estos datos muestran un perfil global de unión de *Sus1* diferente del publicado para otros componentes de SAGA cuya unión se da en la región promotora de los genes (Venters & Pugh, 2009; Venters *et al.*, 2011). El hecho de que el perfil de unión de *Sus1* no cambie significativamente en los dos mutantes *sagaΔ* sugiere que dicha unión no se está dando en el contexto del complejo SAGA, pudiendo ocurrir en el contexto de SLIK.

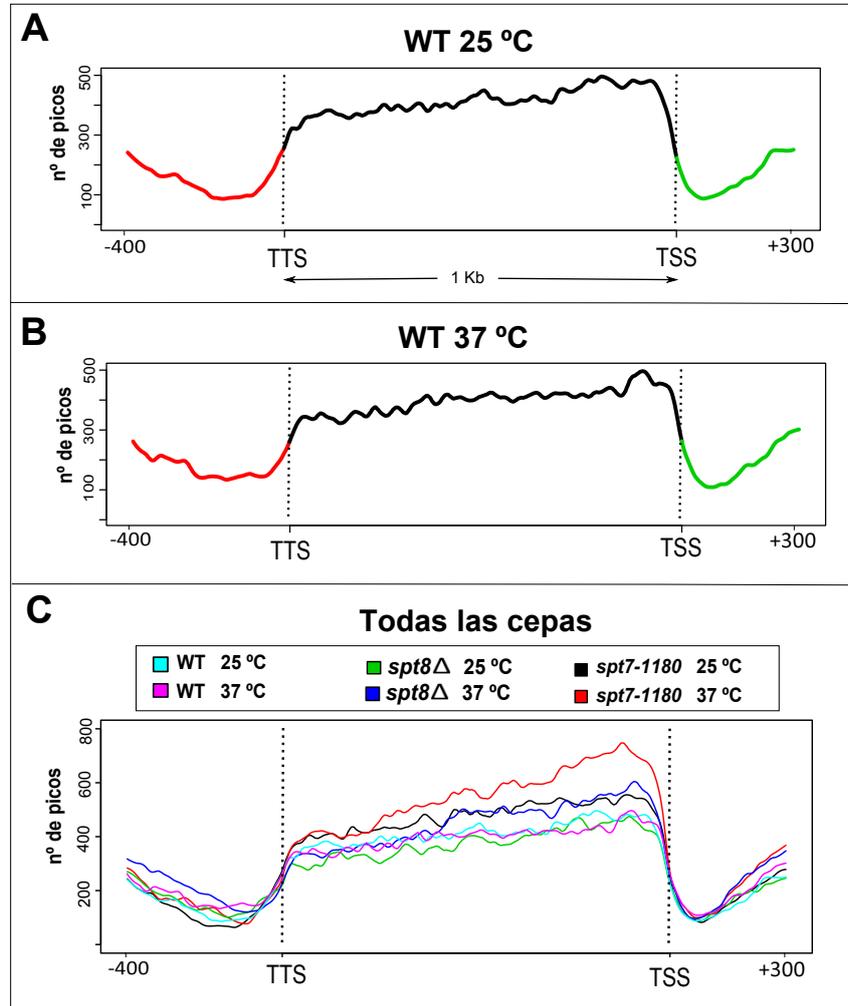


Figura 1.5. Sus1 se enriquece de forma global en la región transcrita de los genes. Análisis del perfil global de unión de Sus1 a los genes codificantes de proteínas verificados ( $n=5076$ ). (A) Representación de la unión de Sus1 en una cepa WT a 25 °C. (B) Representación de la unión de Sus1 en una cepa WT a 37 °C. (C) Representación de la unión de Sus1 todas las muestras: WT a 25 °C (Profundidad de secuenciación=1,81); WT a 37 °C (Prof. Sec. = 1,52); *spt8*Δ a 25 °C (Prof. Sec. = 2,13); *spt8*Δ a 37 °C (Prof. Sec. = 8,01); *spt7-1180* a 25 °C (Prof. Sec. = 6,17) y *spt7-1180* a 37 °C (Prof. Sec. = 11,62).

El análisis del total de los genes a los que se une Sus1 en cada muestra reveló que se une aproximadamente al 70 % de los genes codificantes de proteínas en al menos una de las 3 regiones diferenciadas (*upstream*, región transcrita, *downstream*) (Tabla 1.2A). Si analizamos por separado cada región, Sus1 se recluta en las regiones codificantes de aproximadamente el 63 % de los genes, así como a las regiones promotoras del 15 % de los genes. Estos datos sugieren una unión global de Sus1 a la mayoría de los genes tipo II.

| A                | Porcentaje de regiones en las que se recluta Sus1 |               |                 |              |               |               |
|------------------|---|---------------|-----------------|--------------|---------------|---------------|
|                  | Región transcrita                                 |               | <i>upstream</i> |              | Gen completo  |               |
|                  | 25 °C   | 37 °C         | 25 °C           | 37 °C        | 25 °C         | 37 °C         |
| WT               | 63,3 (n=3211)                                     | 65,6 (n=3329) | 14,5 (n=903)    | 17,8 (n=903) | 70,5 (n=3578) | 73,4 (n=3727) |
| <i>spt8Δ</i>     | 62,3 (n=3182)                                     | 62,7 (n=3011) | 16,1 (n=819)    | 16,7 (n=847) | 70,7 (n=3588) | 67,7 (n=3435) |
| <i>spt7-1180</i> | 63,5 (n=3223)                                     | 63,8 (n=3239) | 13,3 (n=677)    | 15 (n=763)   | 69,8 (n=3544) | 70,4 (n=3575) |
| % medio          | 63,70%  |               | 15,60%          |              | 70,40%        |               |

| B                | Porcentaje de regiones <i>upstream</i> |       |                        |
|------------------|--|-------|------------------------|
|                  | 25 °C                                  | 37 °C | incremento de regiones |
| WT               | 14,5                                   | 17,8  | 3,3                    |
| <i>spt8Δ</i>     | 16,1                                   | 16,7  | 0,6                    |
| <i>spt7-1180</i> | 13,3                                   | 15    | 1,7                    |

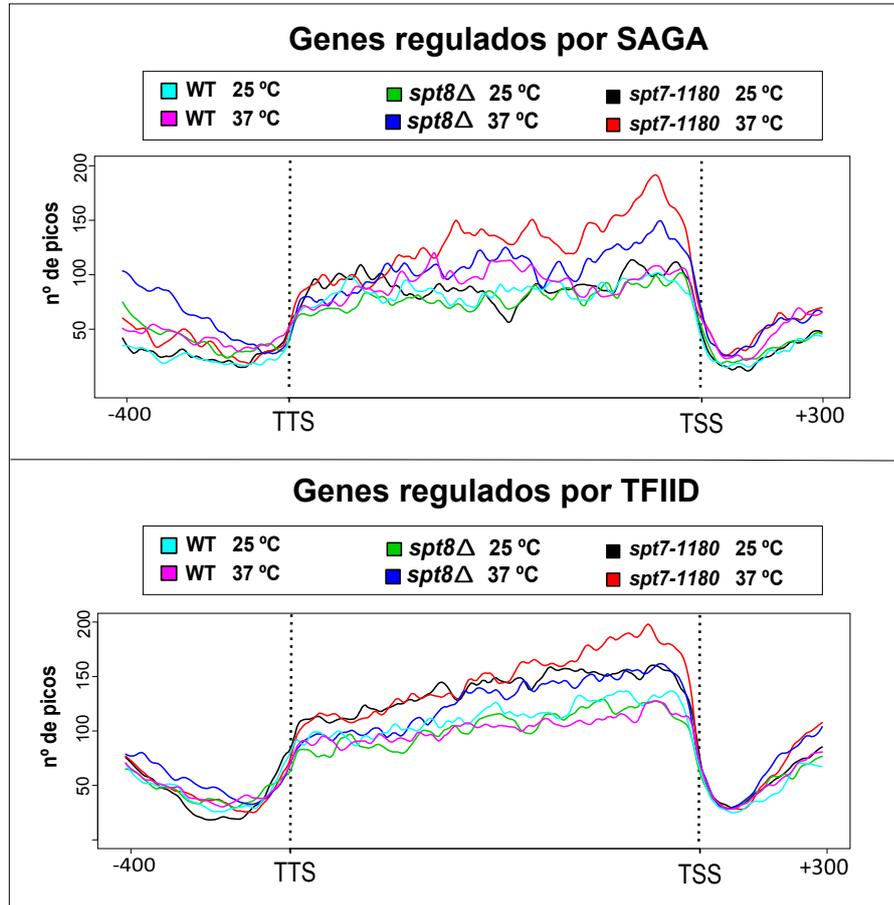
Tabla 1.2. Análisis del número de regiones a las que se recluta Sus1 en las diferentes muestras. (A) Porcentaje de genes para las que se han detectado picos de unión de Sus1 respecto al número total de genes estudiados (n=5076). Se reflejan por separado los porcentajes obtenidos para las regiones transcritas, las regiones *upstream*, y por último para el gen completo (en al menos una de las 3 regiones *upstream*, región transcrita y *downstream*). Entre paréntesis se indican los números totales de regiones encontradas. (B) Porcentaje de regiones *upstream* en las que se han encontrado picos para Sus1, así como el incremento de porcentaje de dichas regiones al pasar de 25 °C a 37 °C.

Como ya hemos comentado, a altas temperaturas se da un incremento en la unión de SAGA a los promotores (Venters *et al.*, 2011). De acuerdo con esto, en la muestra WT a 37 °C se da un incremento en el % tanto de regiones codificantes como de zonas *upstream* a las que se une Sus1, respecto a su unión a 25 °C (17,8 % y 14,5 %, respectivamente). Sin embargo, se observa que este incremento en la unión de Sus1 a la región promotora a 37 °C es menor en los dos mutantes *sagaΔ* respecto del WT (Tabla 1.2B).

#### 1.3.1.2. Distribución de Sus1 en genes regulados por SAGA vs. genes regulados por TFIID.

Los estudios de posicionamiento global de SAGA muestran como este complejo tiende a ocupar la región cercana al nucleosoma -1 (región desde -150 a -300 respecto del TSS), mientras que TFIID regula su set de genes ocupando la región del nucleosoma +1 (Venters *et al.*, 2011). Sin embargo, a pesar de conocerse el papel de SAGA en la regulación de la elongación transcripcional no se ha descrito su posicionamiento de manera global a las regiones codificantes de los genes. Por tanto, el perfil de posicionamiento global de Sus1 y de SLIK obtenido en nuestro estudio difiere substancialmente de lo conocido para SAGA. Dado que los datos sugieren que Sus1 se está uniendo de forma global al 70 % de los genes, decidimos examinar si existía algún tipo de sesgo hacia la unión a genes regulados por SAGA o por TFIID, así como evaluar si el perfil de reclutamiento de Sus1 es similar en ambos grupos de genes.

El posicionamiento de Sus1 en ambos grupos de genes es independiente a la vía de activación de su transcripción (Figura 1.6).



**Figura 1.6.** Sus1 presenta un perfil de unión similar a genes regulados por SAGA y por TFIID. Análisis del perfil global de unión de Sus1 a los genes codificantes de proteínas en función de si su transcripción está regulada por el complejo SAGA (panel superior) o por TFIID (panel inferior).

El análisis en detalle de los perfiles indica que en los genes regulados por SAGA, Sus1 tiene tendencia a acumularse en la zona 3' de la ORF solo en determinadas circunstancias. Mientras que en la cepa WT el cambio de temperatura no afecta a la unión de Sus1 (comparar azul claro y rosa) (Figura 1.6), en los mutantes *saga*Δ se observa la tendencia a acumularse en la región 3' tras el choque

térmico (comparar negro y rojo) (Figura 1.6). Sin embargo, en los genes regulados por TFIID el enriquecimiento de Sus1 en la región 3' se observa en todas las muestras, independientemente de la mutación o de la temperatura.

Con el fin de visualizar mejor estas tendencias, se calcularon las pendientes de los perfiles de asociación de Sus1 en el metagen para cada situación. La tendencia de Sus1 a enriquecerse en las regiones 3' de los genes regulados por TFIID en comparación con los regulados por SAGA, se observa en la Figura 1.7.

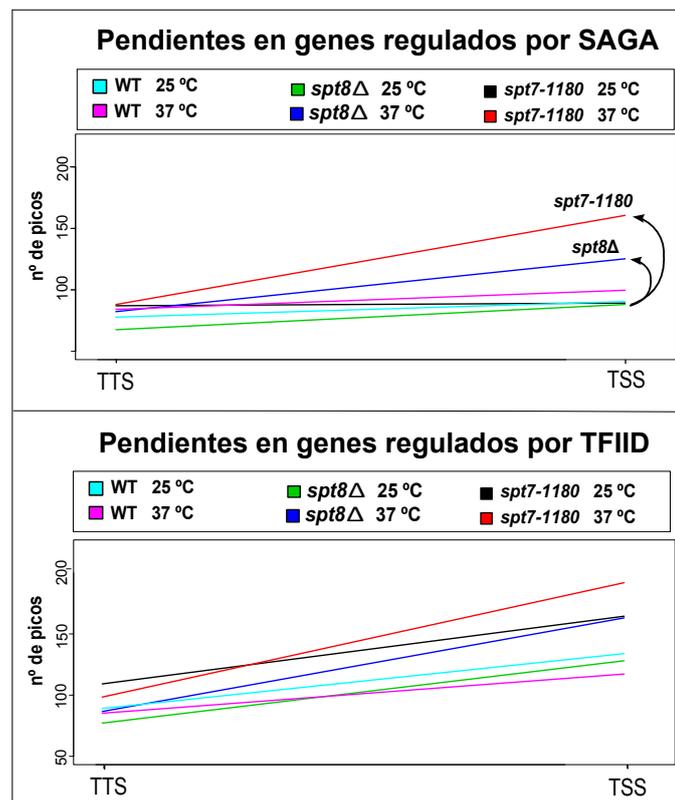
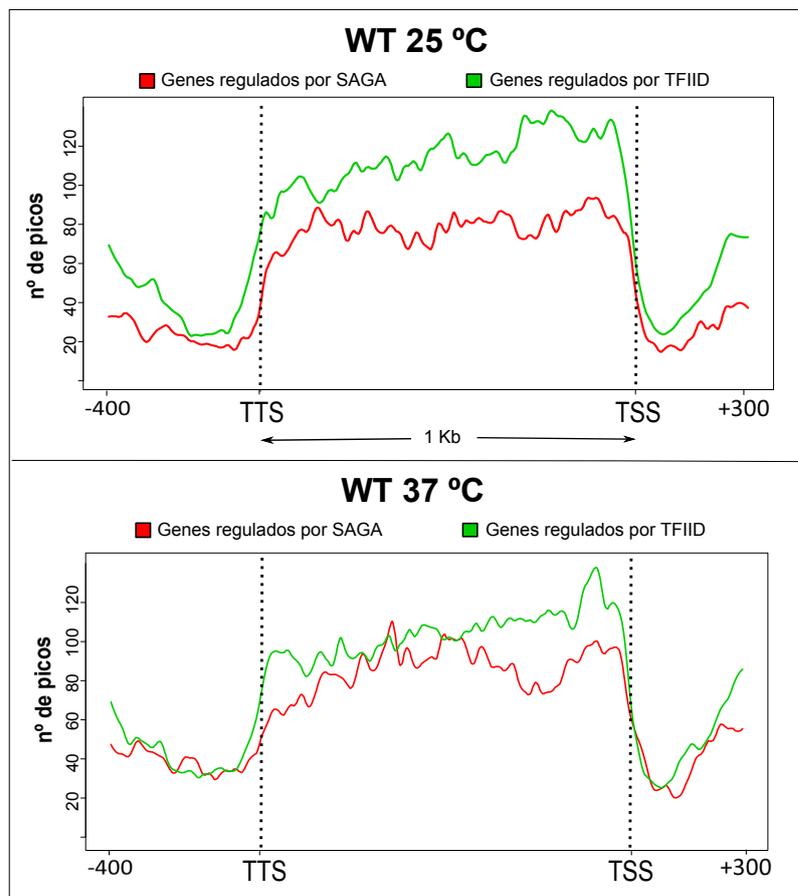


Figura 1.7. Pendientes de los perfiles de unión de Sus1. Análisis de las pendientes resultantes de los perfiles obtenidos de unión de Sus1 para los genes regulados por SAGA y por TFIID representados en la Figura 1.6.

Además, la comparación directa del perfil de unión de Sus1 para genes regulados por SAGA y por TFIID muestra como Sus1 se une más a los genes regulados por TFIID que a los regulados por SAGA, en contra de lo que cabría esperar dadas las funciones de Sus1 en el complejo SAGA (Figura 1.8).



**Figura 1.8. Comparación de los perfiles de unión de Sus1 a genes regulados por SAGA y por TFIID.** Se representan juntos los perfiles correspondientes a los genes regulados por SAGA (rojo) y por TFIID (verde) en la cepa WT a 25 °C y a 37 °C. El número de genes que componen ambos grupos difiere substancialmente (genes regulados por SAGA  $\approx$  1000), genes regulados por TFIID  $>$  4000). Para igualar el número de elementos (n) que componen cada perfil y poder compararlos, el perfil

de los genes regulados por TFIID que se muestra en esta figura se obtuvo generando 10 perfiles independientes de unión de Sus1 a 1000 genes regulados por TFIID escogidos aleatoriamente. El perfil que se muestra en la gráfica es la media de los 10 perfiles obtenidos como representación de todos los genes regulados por TFIID. Los resultados obtenidos para el resto de cepas y condiciones son similares a los mostrados aquí.

En resumen, los datos indican que Sus1 se une en las regiones codificantes de los genes regulados tanto por SAGA como por TFIID, aunque con niveles más altos a éstos últimos. Además en los genes regulados por TFIID existe una tendencia en todas las condiciones de acumularse en la zona 3' de la ORF. Dicha tendencia también se observa en ausencia de SAGA y de manera dependiente de la temperatura en los genes regulados por dicho complejo.

Los genes regulados por SAGA constituyen el 19 % del total de genes utilizados en nuestro análisis (959 de 5076). Con el fin de analizar si la proporción observada de unión de Sus1 a las regiones promotoras y a las regiones transcritas variaba en estos genes, se calculó el porcentaje de genes dependientes de SAGA donde Sus1 se une en cada región. Los resultados indican que entre un 21 y un 17 % de los genes a los que se une Sus1 en su región promotora o transcrita son dependientes de SAGA, lo cual no supone una diferencia con respecto al porcentaje de genes regulados por SAGA a nivel global (19%) (Tabla 1.3).

|    |       |                 | Porcentaje de regiones en las que se recluta Sus1 |           |                   |           |
|----|-------|-----------------|---|-----------|-------------------|-----------|
|    |       |                 | Upstream  |           | Región transcrita |           |
| WT | 25 °C | Todos los genes | 14,5  |           | 63,3              |           |
|    |       |                 | vía SAGA  | vía TFIID | vía SAGA          | vía TFIID |
|    |       |                 | 17  | 83        | 16,9              | 83,1      |
|    | 37 °C | Todos los genes | 17,8  |           | 65,6              |           |
|    |       |                 | vía SAGA  | vía TFIID | vía SAGA          | vía TFIID |
|    |       |                 | 22,1  | 77,9      | 17,5              | 82,5      |

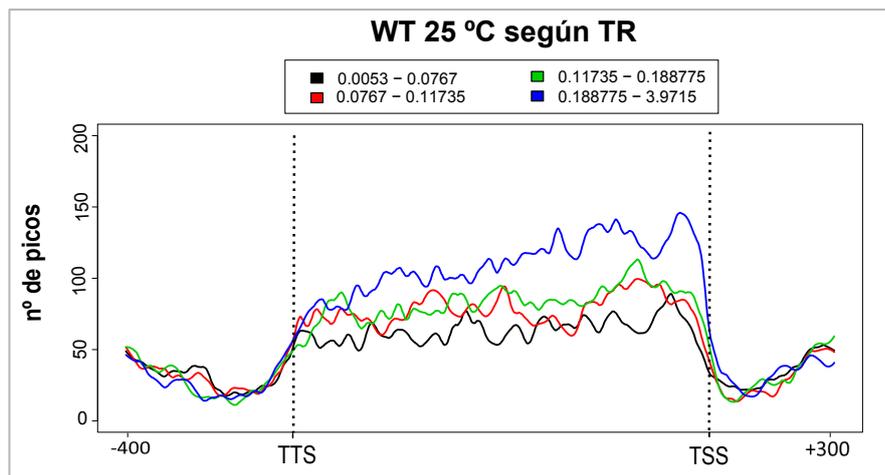
Tabla 1.3. Porcentaje de genes a los que se recluta Sus1 según si dependen de SAGA o TFIID. Se muestran los porcentajes de genes a los que se une Sus1 en una cepa WT tanto a 25 °C como a 37 °C, tanto en las regiones promotoras como en las regiones transcritas. Del total de regiones a las que se une Sus1 en cada caso se muestran los porcentajes en función de si los genes pertenecen a la vía regulada por SAGA o por TFIID.

### 1.3.1.3. Distribución de Sus1 en función de las tasas de transcripción naciente.

Hasta ahora los datos sugieren que Sus1 se une a lo largo de las regiones codificantes de manera global a los genes transcritos por la RNAP II. En trabajos previos, nuestro laboratorio mostró la interacción física entre la RNAP II y Sus1, demostrando el papel de Sus1 en la elongación transcripcional (Pascual-García *et al.*, 2008). Este dato junto a los nuevos resultados aportados hasta el momento podrían indicar un papel general de Sus1 en la elongación de los genes tipo II. Si esta función estuviese directamente relacionada con la actividad de la RNAP II, podrían observarse diferencias en el reclutamiento de Sus1 en función de las tasas de transcripción naciente de los genes (TR, tasa a la que una molécula de RNA está siendo sintetizada). Para llevar a cabo este análisis se generaron 4

categorías de genes en función de sus tasas de transcripción naciente (obtenidas de (Pelechano *et al.*, 2010)).

Como se observa en la Figura 1.9, Sus1 presenta una distribución muy similar en las 4 categorías de genes. Sólo en la categoría de los genes más expresados parece darse un pequeño enriquecimiento de Sus1, sobretudo en la región 3' de la región transcrita. Por lo tanto, estos datos sugieren que el reclutamiento de Sus1 a las regiones codificantes de los genes es mayoritariamente independiente de las tasas de transcripción naciente, pudiendo estar ligeramente más unido a regiones 3' de los genes con mayor TR.



**Figura 1.9.** Sus1 se une de manera similar a los genes independientemente a su tasa de transcripción naciente, pudiendo enriquecerse ligeramente en los genes más transcritos. Análisis del perfil global de unión de Sus1 a los genes en la cepa WT a 25 °C en función de sus tasas de transcripción naciente. Los resultados obtenidos para el resto de cepas y condiciones son similares a los mostrados aquí.

### 1.3.2. Análisis de los niveles de RNA en ausencia de SAGA o de Sus1.

#### 1.3.2.1. Estudio de los niveles de mRNAs maduros en mutantes *saga*Δ.

La metodología del ChIP-EXO nos ha permitido llevar a cabo un estudio global de la unión a la cromatina de Sus1 como subunidad de los complejos SAGA y SLIK en la cepa WT, y como parte de SLIK en los dos mutantes *saga*Δ.

Con el objetivo de complementar los datos de posicionamiento de SAGA y SLIK a través de Sus1, nos propusimos analizar los niveles de RNAs maduros en mutantes *saga*Δ. Para ello se utilizaron microchips de embaldosado que nos permitieron medir los niveles totales de mRNA maduros (n=5171) en una cepa WT y tres mutantes *saga*Δ (*spt8*Δ, *spt7-1180* y doble mutante *spt8*Δ *spt7-1180*).

El estudio de las variaciones en los niveles de los mRNAs en los 3 mutantes respecto del WT mostró que la ausencia de SAGA no afecta de manera significativa al grupo de transcritos maduros de dichas células. Como se observa en la Figura 1.10, los coeficientes de correlación entre los datos de los 3 mutantes respecto del WT son muy cercanos a 1 (R=0,97-0,98). Además, los coeficientes de correlación entre los 3 mutantes son superiores a 0,99, lo que indica que los 3 presentan fenotipos similares (Figura 1.10).

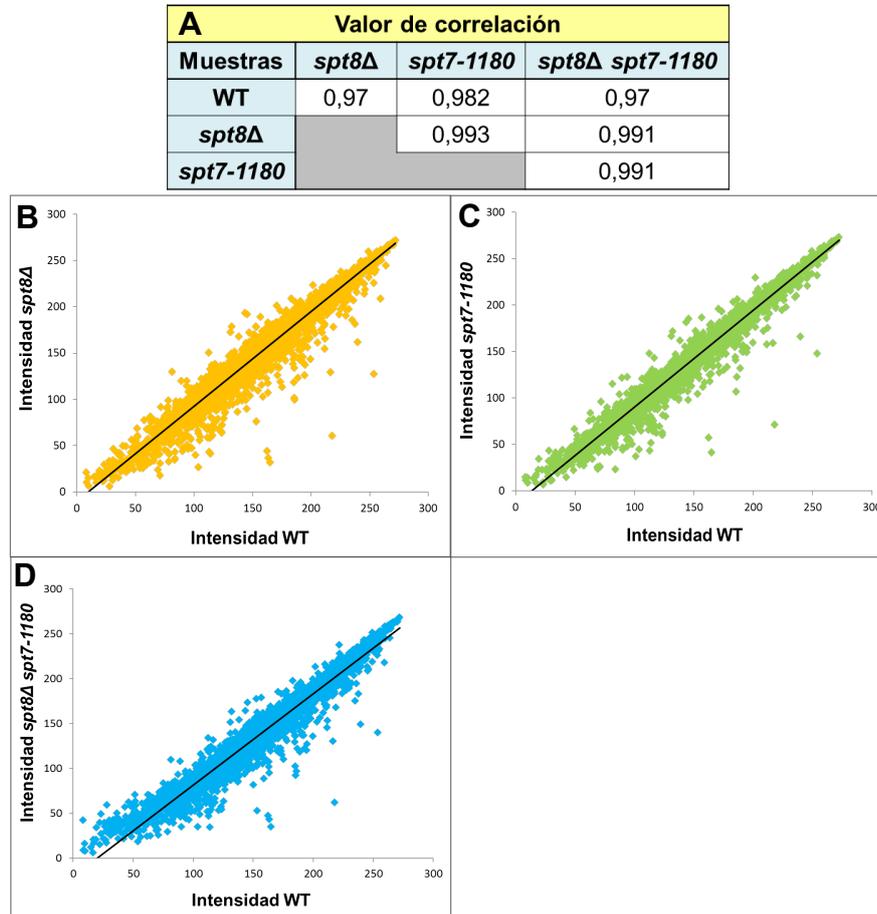


Figura 1.10. Datos de correlación entre los resultados obtenidos en las 4 cepas analizadas. (A) Valores de correlación obtenidos entre los datos obtenidos para 5171 mRNAs maduros en las diferentes muestras. (B), (C), (D) Representación gráfica la correlación de los datos de intensidad obtenidos para cada RNA analizado en cada mutante y en la cepa WT.

Con el objetivo de profundizar en los genes cuya expresión está alterada en los mutantes, filtramos los mRNAs en función de si sus niveles se ven aumentados o disminuidos 1,7 veces respecto del WT. La búsqueda de las ontologías de los genes correspondientes a los mRNAs filtrados desveló que como ya habíamos visto, los 3 mutantes

*sagaΔ* presentan un fenotipo casi idéntico (Tabla 1.4). Por otro lado las categorías funcionales que ven alterados sus niveles totales de mRNA en ausencia de SAGA corresponden a rutas metabólicas de aminoácidos, sulfatos, procesos catabólicos, etc.

| Principales ontologías génicas encontradas |   |  |   |
|--|---|--|---|
|  | <i>spt8Δ</i>  | <i>spt7-1180</i>   | <i>spt8Δ spt7-1180</i>  |
| <b>Niveles aumentados</b>                  | Asimilación y reducción de sulfatos<br>Procesos metabólicos de sulfatos<br>Procesos metabólicos de sulfuros<br>Procesos metabólicos de aminoácidos<br>Procesamiento de rRNA<br>Maduración de 5,8S rRNA<br>Biogénesis de subunidad pequeña ribosomal<br>Nucleolo<br>Procesamiento de ncRNA<br>Biogénesis de RNPs | Asimilación y reducción de sulfatos<br>Procesos metabólicos de sulfatos<br>Procesos metabólicos de sulfuros<br>Procesos metabólicos de aminoácidos<br>Actividad reductasa (NADPH)<br>Procesos oxidación-reducción<br>Metabolismo de ácidos orgánicos | Asimilación y reducción de sulfatos<br>Procesos metabólicos de sulfatos<br>Procesos metabólicos de sulfuros<br>Procesos metabólicos de aminoácidos<br>Actividad reductasa (NADPH)<br>Metabolismo de ácidos orgánicos                |
| <b>Niveles disminuidos</b>                 | Actividad transportadora de membrana<br>Complejo chaperona vacuolar<br>Biosíntesis de IMP de novo<br>Procesos metabólicos de reserva de energía<br>Metabolismo de pirimidinas<br>Procesos catabolismo de aminoácidos<br>Biosíntesis de carbohidratos<br>Biosíntesis de nucleótidos<br>Periferia celular         | Complejo chaperona vacuolar<br>Catabolismo de aminoácidos<br>Transportadores transmembrana<br>Procesos catabólicos<br>Periferia celular<br>Actividad transportadora  | Complejo chaperona vacuolar<br>Biosíntesis de IMP de novo<br>Procesos metabólicos de reserva de energía<br>Metabolismo de pirimidinas<br>Anclaje a membranas<br>Pared celular<br>Procesos catabólicos<br>Biosíntesis de nucleótidos |

Tabla 1.4. Principales ontologías génicas a las que pertenecen los genes que codifican los mRNAs cuyos niveles se han visto aumentados o disminuidos más de 1,7 veces respecto a los niveles del WT. El análisis de las ontologías se llevó a cabo a través del software Funcassociate 2.0 (Berriz 2003).

Como ya hemos comentado, las funciones en transcripción de SAGA descritas hasta el momento, se dan mayoritariamente en el inicio de la transcripción y el principio de la elongación. Con el objetivo de evaluar si la ausencia de SAGA altera los niveles de mRNAs de igual manera a lo largo de toda su extensión analizamos el *gen modelo* de cada mutante respecto del WT (Figura 1.11). En este caso, la región transcrita de los genes comprendida entre el TSS y el TTS se ajustó a una longitud de 1000 pb. Además se representan 1000 pb de cada una de las regiones flanqueantes *upstream* y *downstream* respecto del TSS y TTS, respectivamente. Los datos representados para cada mutante frente al WT corresponden a los valores normalizados de las 3 réplicas biológicas de cada muestra. De este

modo, los valores están referenciados al valor medio obtenido en el WT (línea roja).

Los datos muestran como la señal media de los transcritos obtenida en los mutantes sencillos, *spt8Δ* y *spt7-1180*, no se ve alterada de forma acusada respecto de la señal del WT. Sin embargo, el perfil obtenido en el doble mutante *spt8Δ spt7-1180* sí varía respecto del WT y de los dos mutantes sencillos. Los dos mutantes simples presentan un ligero aumento de señal en la región 5' de los mRNAs, mientras que el doble mutante tiene una disminución generalizada de señal a lo largo de toda la longitud del RNA (Figura 1.11). Estos datos sugieren que la falta de ambos factores disminuye de manera global la transcripción de los genes analizados.

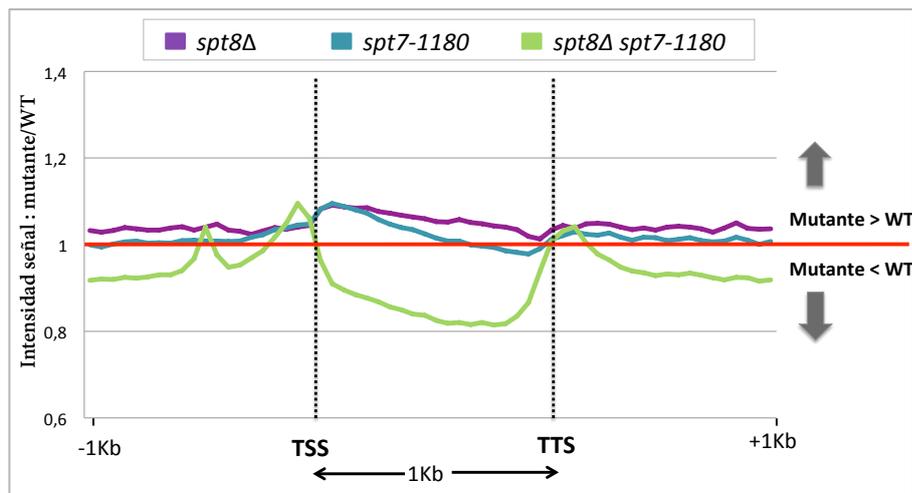


Figura 1.11. Análisis del perfil promedio del nivel de mRNA en mutantes *sagaΔ*. Se muestran los genes modelo obtenidos para los niveles de mRNA de los 3 mutantes normalizados respecto al WT (línea roja).

Para poder analizar si las variaciones observadas en el gen modelo de los 3 mutantes *sagaΔ* respecto del WT, son similares para los RNAs de genes regulados por SAGA y por TFIID, representamos el gen modelo de cada grupo de genes. En la Figura 1.12 se puede

observar como en líneas generales la ausencia de SAGA provoca un fenotipo similar tanto en los genes regulados por SAGA como los regulados por TFIID. No obstante, indicar que la pequeña subida de señal en la región 5' que observamos anteriormente en los mutantes simples, se da en el gen modelo de los transcritos regulados por TFIID y no en el regulado por SAGA.

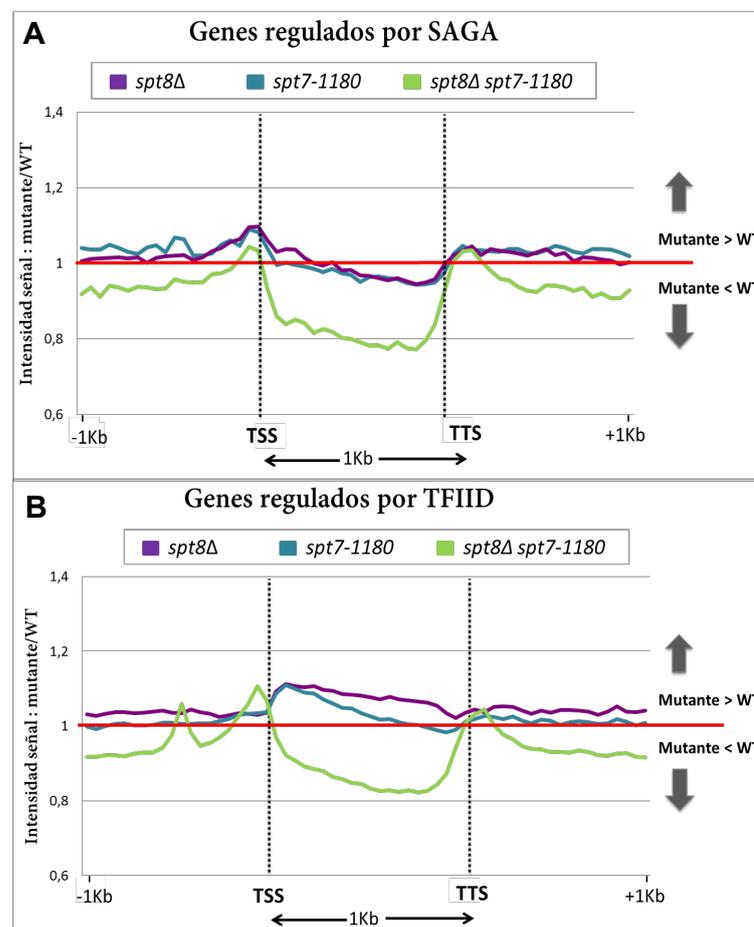


Figura 1.12. Análisis del gen modelo de niveles de mRNA en función de si son regulados por SAGA o por TFIID. Niveles de mRNA de los 3 mutantes normalizados respecto al WT. Se muestran por separado los mRNAs cuya transcripción está regulada por SAGA (A) o por TFIID (B).

Con el objetivo de examinar si la ausencia de SAGA afecta de forma diferente a los genes dependiendo de su tasa de transcripción naciente, representamos el gen modelo en función de dichas tasas (Figura 1.13).

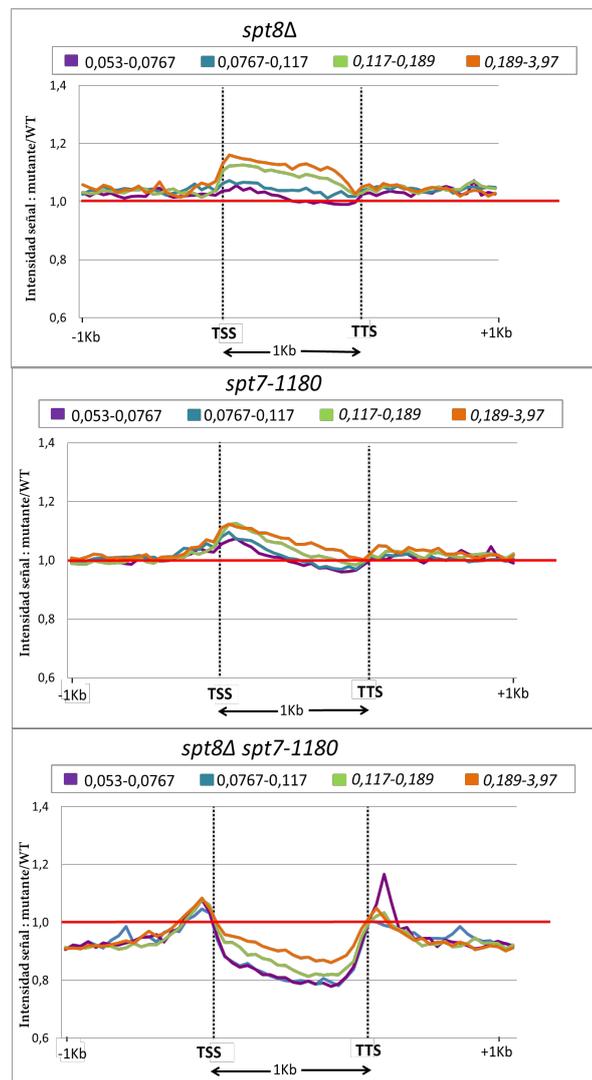


Figura 1.13. Análisis del gen modelo de niveles de mRNA en función tasas de transcripción naciente. Niveles de mRNA en función de 4 categorías de tasa de transcripción naciente.

Los datos obtenidos indican que la ausencia de SAGA provoca un aumento general en los niveles de RNA maduro cuanto mayor es su tasa de transcripción. Esto indica que SAGA puede estar implicado en la regulación negativa de la expresión de los genes o en la estabilidad de los RNAs con mayores tasas de transcripción naciente.

Por otro lado, analizamos si la longitud de los genes podría tener algo que ver con las variaciones observadas en los niveles de mRNA. Como se puede ver en la Figura 1.14, la longitud de los genes no afecta significativamente a los niveles de mRNAs maduros obtenidos en ausencia de SAGA en ninguno de los mutantes.

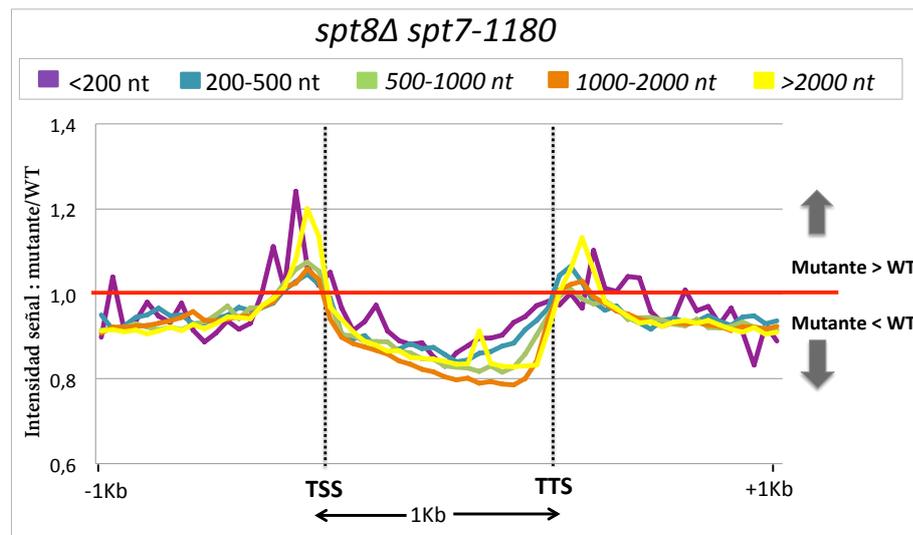


Figura 1.14. Análisis del gen modelo de niveles de mRNA en función de la longitud de los genes. Niveles de mRNA del doble mutante *spt8Δ spt7-1180* para 5 rangos de longitud del gen. Los resultados obtenidos para los dos mutantes simples tampoco muestran diferencias entre las diferentes categorías analizadas (datos no mostrados).

### *1.3.2.2. Estudio de correlación entre la unión de Sus1 a la cromatina y los niveles de mRNA naciente y maduro.*

Los datos de unión de Sus1 a lo largo del genoma obtenidos por ChIP-EXO muestran un reclutamiento general a la mayoría de las regiones codificantes de los genes transcritos por la RNAP II.

Para evaluar si existe algún tipo de relación entre la unión de Sus1 y la actividad de la RNAP II, analizamos los niveles de correlación de la unión de Sus1 a las regiones transcritas con la tasa de transcripción naciente (TR) y los niveles de RNAs maduros (RA) en el mutante *sus1* $\Delta$  (Dichas tasas pertenecen al trabajo de investigación del laboratorio del Dr. José Enrique Pérez Ortín todavía no publicados). Como se observa en la Figura 1.15, no existe una correlación directa entre las tasas TR ni RA dependientes de Sus1 y la unión de éste a dichos genes. Estos datos indican que la unión de Sus1 a las regiones transcritas de los genes no se correlaciona directamente con la actividad de la RNAP II elongante, ni con la estabilidad de los mRNA generados.

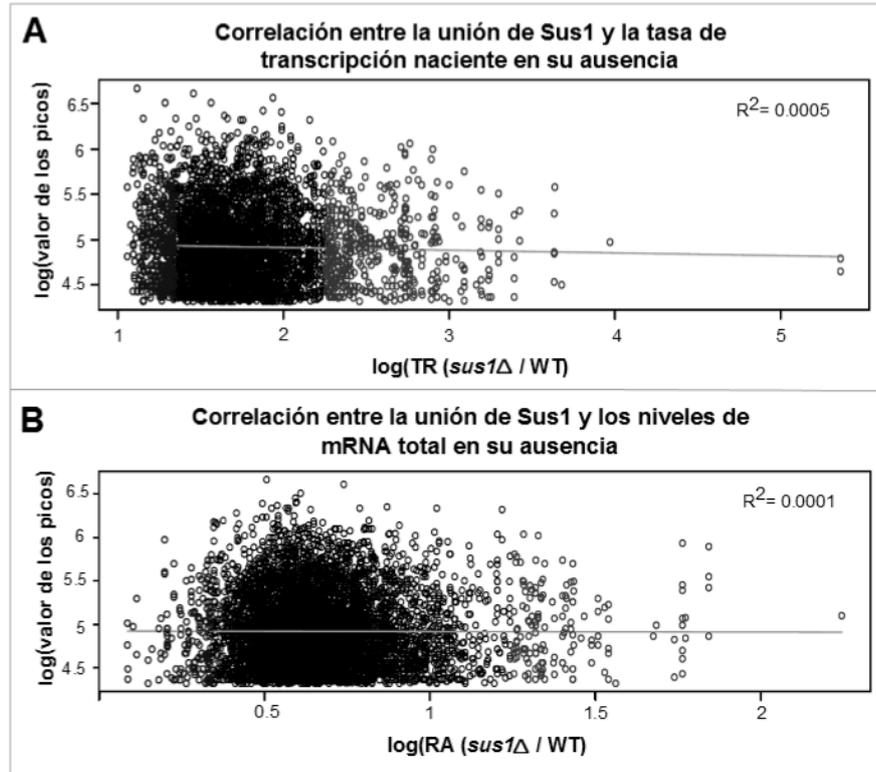


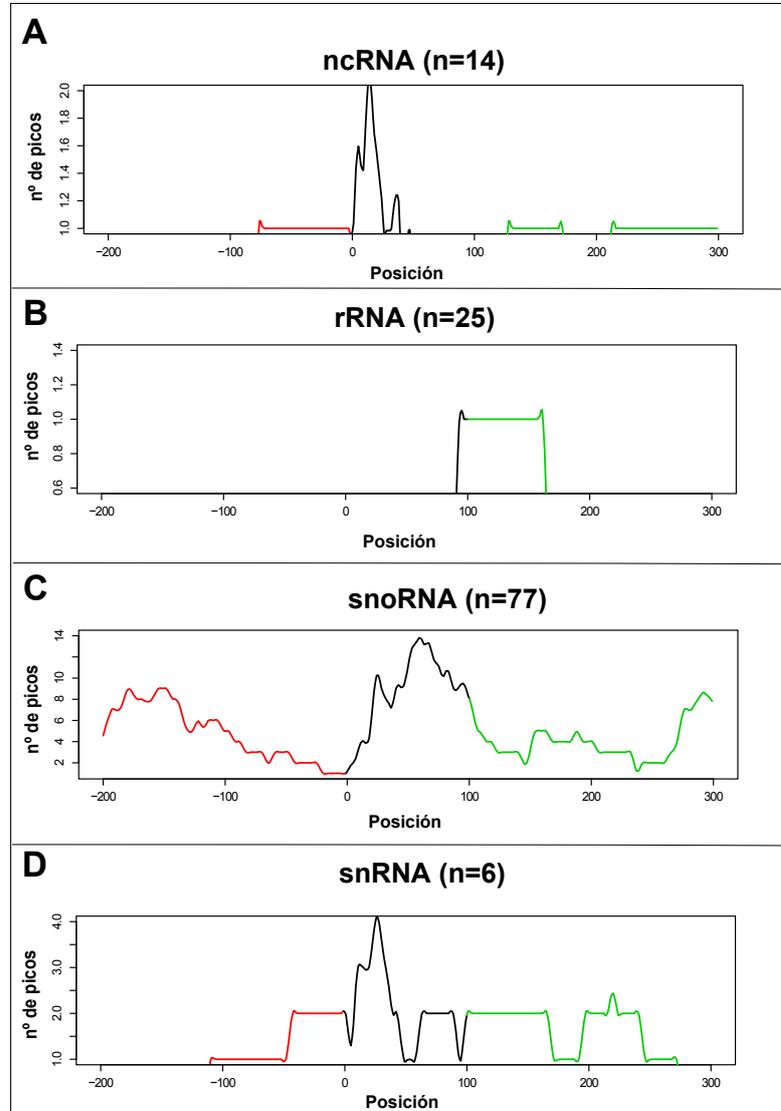
Figura 1.15. Datos de correlación entre la unión de Sus1 a los genes y las tasas de transcripción naciente o mRNAs maduros en ausencia de Sus1. Análisis de correlación entre los valores de los picos de unión de Sus1 a las regiones transcritas de los genes en la cepa WT a 25 °C, y por un lado, las tasas de transcripción naciente del mutante *sus1*Δ (A), y por otro lado los niveles de mRNA maduros en dicho mutante (B).

### 1.3.3. Reclutamiento global de Sus1 a genes transcritos por la RNAP III.

#### 1.3.3.1. Distribución de Sus1 en diferentes tipos de elementos del genoma.

En conjunto, los datos de posicionamiento de Sus1 mostrados hasta ahora sugieren una unión de este factor a la cromatina más general de lo descrito hasta el momento. Por ello, decidimos ampliar y profundizar nuestro estudio del posicionamiento de Sus1 y de SLIK a lo largo de la cromatina. De todos los elementos anotados del genoma de *S. cerevisiae*, escogimos varias categorías de las que nos interesó analizar los datos de ChIP-EXO obtenidos para Sus1 en el WT y en ambos mutantes *saga* $\Delta$ .

En la Figura 1.16 se observan los perfiles de reclutamiento de Sus1 a varios elementos del genoma en el WT a 25 °C. Los perfiles de las regiones genómicas codificantes para snRNA, ncRNA y rRNA no muestran un patrón común de unión de Sus1 a ellos. A pesar de que el perfil encontrado para los snoRNA podría potencialmente definir un patrón común para dichos genes, nuestro interés se centró en los resultados obtenidos para la unión de Sus1 a los genes codificantes de tRNAs (ver más adelante).

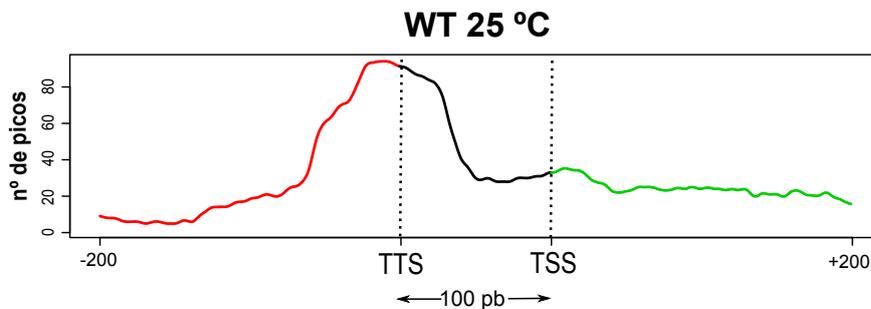


**Figura 1.16. Análisis de la unión de Sus1 a diferentes elementos del genoma.** Análisis del perfil global de unión de Sus1 en la cepa WT a 25 °C a los siguientes elementos del genoma: RNA no codificante (A), RNA ribosomal (B), RNA pequeño nucleolar (C) y RNA pequeño nuclear (D). Dado la corta longitud de este tipo de elementos del genoma, la región comprendida entre el TSS y el TTS se ajustó a una longitud de 100 pb, y las regiones *upstream* (rojo) y *downstream* (verde) comprenden 200 y 300 pb, respectivamente. Entre paréntesis se indican el número de elementos analizados en cada grupo.

### 1.3.2.2. Distribución general de *Sus1* en los tDNAs.

En los últimos años cada vez son más las evidencias de una interconexión entre la maquinaria de transcripción mediada por la RNAP II y la mediada por la RNAP III. Varios estudios globales han demostrado que la RNAP II humana está estrechamente relacionada con los genes de clase III (transcritos por la RNAP III). De hecho, en levaduras varios son los factores de transcripción asociados a la RNAP II que se han encontrado también en genes de clase III (TFIIS, Yox1, Fkh1, Reb1, Yap6) (Acker *et al.*, 2013). Como se comentó en la introducción, la RNAP III es la encargada de la transcripción de los tRNAs, el rRNA 5S y algunos ncRNAs y snRNAs.

El análisis del reclutamiento de *Sus1* a los tDNAs en todas las muestras reveló un enriquecimiento de *Sus1* desde los 50 nt anteriores al TSS que continúa hasta aproximadamente la mitad del gen donde cae de manera acusada (Figura 1.17). Este dato sugiere un papel de *Sus1* en la transcripción de los tDNAs transcritos por la RNAP III.



**Figura 1.17. Perfil de unión global de *Sus1* al tDNA modelo.** Análisis del perfil global de unión de *Sus1* a los genes codificantes de tRNAs tras eliminar posibles falsos positivos (n=157) en una cepa WT a 25 °C. El *gen modelo* se ajustó a 200 pb antes del TSS, 100 pb entre el TSS y el TTS, y 200 pb tras el TTS. Los resultados obtenidos para el resto de cepas y condiciones son similares a los mostrados aquí.

Tal y como se describe en Métodos, parte del procesamiento de los datos de ChIP-EXO consistió en eliminar del análisis ciertas regiones que se habían descrito como regiones “*hiper-chipeables*” por la alta probabilidad de ser inmunoprecipitadas inespecíficamente en este tipo de experimentos (Teytelman *et al.*, 2013). De las 238 regiones calientes eliminadas, alrededor de un 60 % coincidían total o parcialmente con tDNAs. En vista de los datos obtenidos y ante la posibilidad de que Sus1 esté enriquecido en los tDNAs de manera específica, decidimos revisar nuestros datos incluyendo todas las regiones hiper-chipeables previamente excluidas e incluyendo la totalidad de tDNAs anotados hasta el momento (n=275).

Los perfiles de unión de Sus1 a la totalidad de tDNAs mantienen el mismo patrón observado anteriormente, con un hombro que cubre tanto la región anterior al TSS como la primera mitad de la región transcrita. En ese punto la unión de Sus1 disminuye y se mantiene en niveles medios hasta el final del gen donde no hay unión (Figura 1.18). Los perfiles son similares en cuanto a forma para todas las cepas y condiciones, pero sí se observa niveles mayores de unión de Sus1 de manera general en los mutantes *saga* $\Delta$  respecto del WT, aunque no podemos asegurar que sea un efecto de las diferentes profundidades de secuenciación de las muestras.

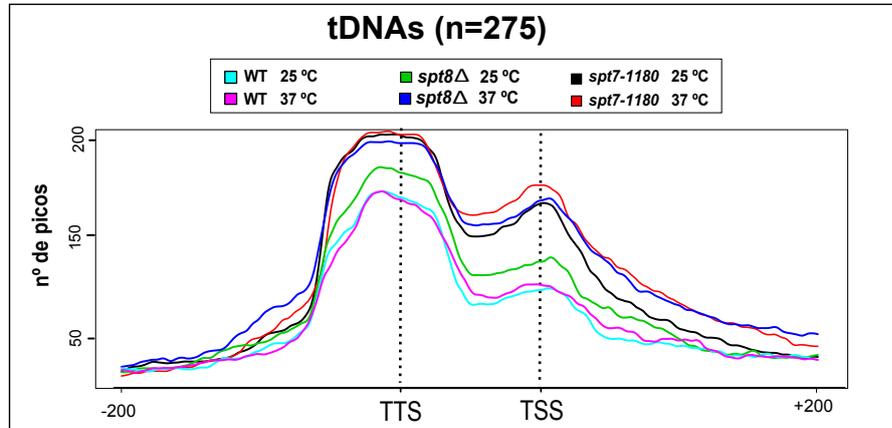
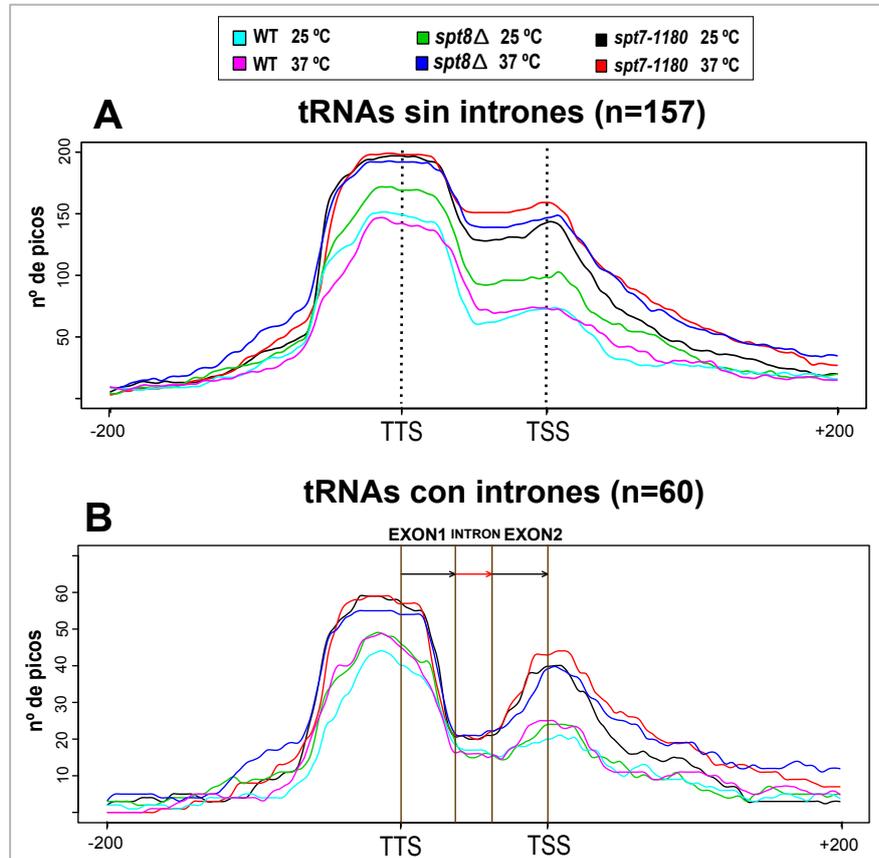


Figura 1.18. Perfil de unión global de Sus1 al tDNA modelo. Análisis del perfil global de unión de Sus1 a todos los tDNAs anotados (n=275) en las diferentes muestras analizadas.

De los 275 tDNAs anotados hasta el momento en el genoma de *S. cerevisiae*, 60 presentan regiones intrónicas. El procesamiento de los intrones de los tDNAs no es un proceso cotranscripcional y por tanto es substancialmente diferente a la eliminación de intrones de los genes transcritos por la RNAP II. A pesar de ello, estudios realizados por los Drs. Antonio Jordán y José Enrique Pérez Ortín indican que la densidad de RNAP III elongante disminuye al atravesar las regiones intrónicas y vuelve a aumentar en el segundo exón (Jordan A, 2013).

Con el objetivo de evaluar si la unión de Sus1 a los tDNAs pudiera estar directamente asociada al posicionamiento y actividad de la RNAP III, analizamos por separado el reclutamiento de Sus1 a genes con y sin intrones. Como se observa en la Figura 1.19A, los perfiles de unión de Sus1 a los tDNAs sin intrones son similares a los obtenidos previamente para el conjunto de todos los tDNAs (Figura 1.18).



**Figura 1.19.** Perfil de unión global de Sus1 a tDNAs en función de la presencia o ausencia de intrones. Análisis del perfil global de unión de Sus1 a tDNAs en función de si no tienen regiones intrónicas (A) o si las tienen (B).

Curiosamente, los datos de unión de Sus1 para los tDNAs con intrones muestran como la disminución en la unión de Sus1 observada en la primera mitad del gen corresponde con el final del primer exón e inicio del intrón (Figura 1.19B). Sin embargo, mientras que en los genes sin intrones tras esa bajada la densidad perfila una meseta hasta el final del gen, en los genes con intrones la densidad de Sus1 vuelve a ascender coincidiendo con el segundo exón. De este modo observamos un segundo pico de densidad de Sus1 en la región final de los tDNAs con intrones (Figura 1.19A). Los datos de

posicionamiento de Sus1 obtenidos para los tDNAs con intrones indican que su unión prevalece en las región *upstream* y en las regiones exónicas, disminuyendo en los intrones. Así pues la unión de Sus1 parece seguir un patrón similar al obtenido para la RNAP III del estudio antes mencionado (Jordan A, 2013).

Si analizamos los datos porcentualmente, Sus1 se une de media en todas las muestras analizadas de forma general a un 92 % de los genes codificantes para tRNAs. Esta unión se ve reducida a un 71 % si dichos genes no contienen intrones (Tabla 1.5). Al desglosar los datos por cepas vemos como la unión de Sus1 a los tDNAs es menor en el WT (85 %) mientras que puede llegar hasta un 97 % de los tDNAs en el mutante *spt7-1180*. Por lo tanto, estos resultados parecen indicar que, por un lado, Sus1 tiene preferencia por unirse a los tDNAs que contienen algún intrón en su secuencia. Y por otro lado, la ausencia de SAGA en los mutantes *spt8Δ* pero sobretodo en el mutante *spt7-1180* parece favorecer la unión de Sus1 a estos genes.

|                  |       | Porcentaje de tDNAs en las que se recluta Sus1 |              |       |
|------------------|-------|--|--------------|-------|
|                  |       | sin intrones                                   | con intrones | Total |
| WT               | 25 °C | 67,6   | 90           | 87,3  |
|                  | 37 °C | 64,7   | 93,3         | 85,1  |
| <i>spt8Δ</i>     | 25 °C | 70,9   | 93,3         | 91,2  |
|                  | 37 °C | 74,2   | 95           | 94,9  |
| <i>spt7-1180</i> | 25 °C | 74,6   | 98,3         | 96    |
|                  | 37 °C | 76   | 98,3         | 97,4  |
| Porcentaje medio |       | 71,3   | 94,7         | 92    |

Tabla 1.5. Análisis del número de tDNAs a los que se recluta Sus1. Porcentaje de genes para los que se han detectado picos de unión de Sus1 respecto al número total de tDNAs estudiados (n=275). Se reflejan por separado los porcentajes obtenidos para los tDNAs con intrones, tDNAs sin intrones y para todos los tDNAs en conjunto.

### 1.3.4. Análisis de los niveles de tRNAs maduros.

Ante los resultados presentados en el apartado anterior, existe la posibilidad de que *Sus1* regule la transcripción de los tRNAs. A partir de los datos obtenidos en el apartado 1.3.2, analizamos los niveles de tRNAs a nivel global en los distintos mutantes estudiados. Representamos en un gen modelo los ratios de tRNAs obtenidos en cada mutante relativos a los niveles del WT. Como se puede observar en la Figura 1.20, los 3 mutantes presentan el mismo patrón de cambio en los niveles de tRNAs, con unos niveles de tRNAs 1,5 veces mayor en los mutantes *sagaΔ* respecto al WT. Estos datos parecen indicar que la ausencia de SAGA provoca un aumento en los niveles globales de tRNAs, sugiriendo una nueva función de SAGA en la expresión de los tRNAs. Cabe destacar que los 3 mutantes presentan un fenotipo similar en contra de lo que sucede para los mRNAs transcritos por la RNAP II. Además, este aumento en los niveles de tRNAs se correlacionaría con una mayor presencia de *Sus1* en dichos genes en estos mutantes (Figura 1.17).

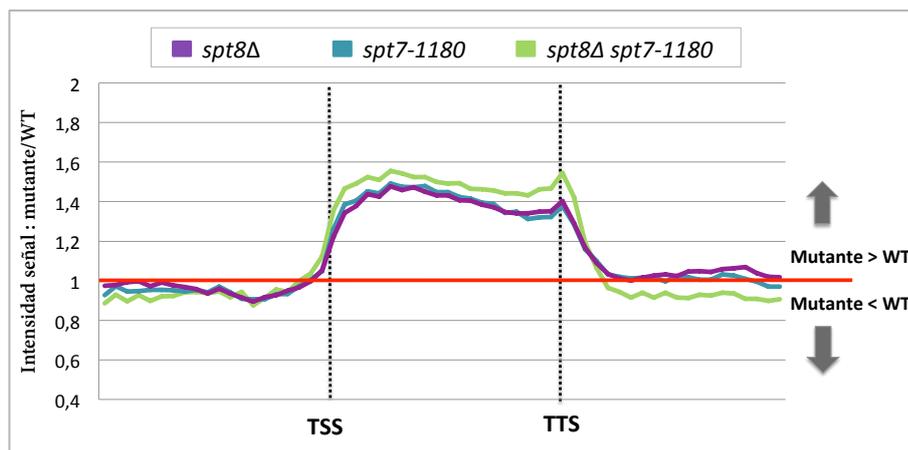


Figura 1.20. Análisis del perfil promedio del nivel de tRNAs en mutantes *sagaΔ*. Se muestran los genes modelo obtenidos para los niveles de tRNAs de los tres mutantes normalizados respecto al WT (línea roja).



## DISCUSIÓN

A pesar de que hace casi dos décadas que se describió el complejo SAGA en levaduras y desde entonces se ha profundizado ampliamente en sus funciones en la expresión génica, ningún estudio ha conseguido descifrar con certeza los mecanismos generales que rigen las funciones del complejo SLIK en *S. cerevisiae*. A lo largo de esta tesis doctoral, hemos intentado comprender el papel de SLIK en la transcripción, así como en el acoplamiento con la exportación de los RNAs.

Nuestro análisis bioquímico a nivel de interacciones y actividades enzimáticas nos ha permitido concluir que en primer lugar, las interacciones de Sus1 con las subunidades de SAGA/SLIK son estables en ausencia de uno u otro complejo. Y en segundo lugar, que la actividad enzimática de desubicitinación de SLIK se da tanto *in vitro* como *in vivo*, de manera similar a SAGA.

Un dato interesante de nuestros análisis bioquímicos ha sido identificar que Spt8 es importante para la interacción estable entre Sus1 y el componente de TREX-2, Sem1. En un trabajo previo de nuestro grupo (García-Oliver, 2013) se describió que en ausencia de Sem1, la interacción Sus1-Spt8 no es detectada. En dicho trabajo también se describió un papel esencial de Sem1 en la interacción de Sus1 con TREX-2 y por lo tanto, en la estabilidad e integridad de dicho complejo. Los datos de dicho trabajo junto a los aportados en esta tesis sugieren que tanto Sem1 como Spt8 tiene un papel importante en la estabilización de la interacción de Sus1 con SAGA y TREX-2, a través de las subunidades Spt8 y Sem1. La desestabilización de la unión de Sus1 con SAGA a través del papel de Sem1, podría repercutir en una mayor unión de Sus1 al complejo

SLIK. En este sentido, a través de purificaciones de diferentes subunidades de SAGA/SLIK analizadas con tinción Coomassie hemos observado la aparición de la versión truncada de Spt7 (SLIK) frente a la versión completa (SAGA) en mutantes del complejo TREX-2 bajo ciertas circunstancias (datos no mostrados). Estos datos apoyan la importancia del sistema de estabilización entre SAGA-SLIK-TREX-2. De esta forma, la estabilidad de TREX-2 jugaría un papel importante en la dinámica de formación de SAGA y SLIK. Conocer como las dinámicas de interacción entre los tres complejos influyen en su estabilidad y funciones será uno de los puntos a desarrollar en futuros trabajos en nuestro laboratorio.

Con el fin de profundizar en las funciones más relevantes de SAGA y SLIK, hemos estudiado la unión a la cromatina de varias subunidades comunes a ambos, en ausencia de uno u otro complejo. Los datos mostrados aquí revelan que SAGA y, en menor medida, SLIK son necesarios para la unión de dichos factores al promotor del gen *GAL1*. Sin embargo, la reducción en la unión observada en los diferentes mutantes analizados, pone de manifiesto que SAGA juega un papel más relevante en la unión de los factores estudiados al promotor de *GAL1*.

El resultado más notable de este primer capítulo es el descubrimiento de la unión global de Sus1 a la cromatina. Como hemos descrito, Sus1 se recluta al 70 % de los genes codificantes de proteínas y al 92 % de genes codificantes de tRNAs, regulados por la RNAP II y III, respectivamente. Hasta la fecha varios estudios del reclutamiento a nivel global de componentes de SAGA han permitido establecer las posiciones que ocupa en las regiones promotoras (Ghosh & Pugh, 2011; Venters & Pugh, 2009; Venters *et al.*, 2011). Sin embargo, a pesar de conocerse su papel en la elongación transcripcional y las relaciones funcionales de algunos de sus

componentes con procesos posteriores al inicio de la transcripción (Govind *et al.*, 2007b; Pascual-García *et al.*, 2008), los estudios globales publicados no han profundizado en el estudio de la unión de SAGA a las regiones codificantes de los genes en *S. cerevisiae*. En este sentido, nuestro trabajo ha permitido estudiar el posicionamiento global de un componente de SAGA/SLIK, Sus1, no solo en las zonas promotoras de los genes sino también en las regiones codificantes y terminadoras, descubriéndose que Sus1 no se limita a las regiones promotoras sino que por el contrario, se une preferentemente a las regiones transcritas de la mayoría de los genes tipo II. Este dato está en concordancia con datos previos de nuestro grupo que mostraban una interacción directa de Sus1 con la RNAP II elongante (Pascual-García *et al.*, 2008). Además, la unión global de Gcn5 en *Schizosaccharomyces pombe*, muestra una unión similar a la de Sus1 en las regiones codificantes de los genes altamente transcritos (Johnsson *et al.*, 2009). Sin embargo, un dato interesante de nuestro análisis ha sido que de forma contraria a lo esperado dadas las funciones de Sus1 en SAGA, éste se une en mayor medida tanto en número como en intensidad a los genes regulados por TFIID, con tendencia a acumularse en las regiones 3' de las regiones codificantes de dichos genes. De este modo, nuestros datos aportan una nueva visión sobre las posibles funciones de Sus1 en la expresión génica.

Ante este nuevo escenario, nos preguntamos si el perfil de asociación de Sus1 es similar al de otros factores implicados en la expresión génica. Para ello contrastamos el perfil de unión de Sus1 con los perfiles de unión de otros factores implicados en diferentes etapas de la transcripción publicados hasta el momento (Mayer *et al.*, 2010). En dicho análisis encontramos que Sus1 comparte un perfil de unión a los genes tipo II similar a factores de elongación, especialmente al factor Spt5. Spt5 es un factor de elongación clave

para regular la procesividad de la RNAP II (Hartzog & Fu, 2013). Curiosamente, análisis previos de nuestro laboratorio han identificado a Spt5 en purificaciones TAP de Sus1. Sin embargo, no habíamos prestado especial atención a dicha interacción física. En vista de estos nuevos resultados sería muy interesante profundizar en las relaciones funcionales entre Sus1 y Spt5.

El hecho de disponer de datos de unión de Sus1 en las cepas WT y *sagaΔ*, nos ha permitido tener una nueva visión sobre el papel de esta proteína en la expresión génica global. Estudios bioquímicos anteriores demuestran que existe una parte de Sus1 libre en la célula del que se desconoce su funcionalidad (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2004). En este sentido, los datos que aportamos en este trabajo no nos permiten discernir cómo la dinámica de interacción de Sus1 puede verse afectada por la ausencia total de los complejos de los que forma parte (SAGA/SLIK/TREX-2), y por lo tanto, si parte de los fenotipos observados estarían relacionados con moléculas de Sus1 libre. De hecho, recientemente se ha descrito que Sus1 es capaz de facilitar la formación del PIC de manera independiente a sus funciones en SAGA (Durairaj *et al.*, 2014). En cualquier caso, los datos de los que disponemos hasta el momento nos permiten plantear un modelo en el que la unión de Sus1 a las regiones codificantes sea mayoritariamente dependiente del complejo SLIK. En una situación de activación transcripcional, SAGA se une a los promotores de los genes, activándolos. Tras dicha activación, SAGA sería procesado para dar lugar a SLIK, cuyas actividades enzimáticas serían importantes a lo largo de la elongación transcripcional (Figura D1). Este modelo concuerda con el hecho de que la ausencia de SLIK no afecte a la unión de los módulos DUB y HAT a la región promotora de *GAL1*. Como se comentó en la introducción, Spt8 (presente sólo en SAGA) tiene un papel fundamental en el inicio de la transcripción

secuestrando a TBP y liberándolo cuando la transcripción ha de ser iniciada (Sermwittayawong & Tan, 2006). En el modelo que proponemos, podría ocurrir que la liberación de TBP para su unión a la región promotora pudiese estar mediada por el procesamiento de Spt7 y la liberación de Spt8 de SAGA, formándose SLIK, en concordancia con el modelo propuesto por el Dr. Pijnappel y colaboradores (Spedale *et al.*, 2010) (Figura D1).

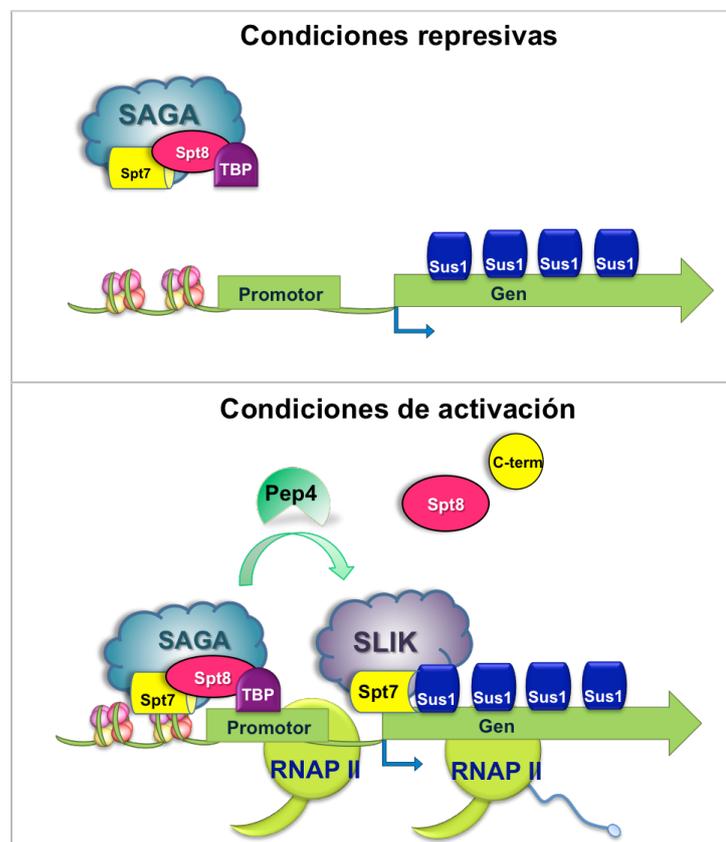


Figura D1. Modelo propuesto para la actividad de Sus1 y SLIK en el proceso de transcripción. En condiciones de represión transcripcional, SAGA se encarga a través de Spt8 y otras subunidades de secuestrar la proteína TBP, inhibiendo así su unión a la región promotora y el inicio de la transcripción. En condiciones de

activación transcripcional, SAGA es reclutado al promotor del gen. Allí Pep4 será la encargada de procesar a Spt7 y liberar a Spt8, permitiendo la liberación y unión de TBP al promotor y promoviendo la formación del PIC, iniciándose la transcripción. El complejo SLIK formado en la región promotora acompañaría a la RNAP II a lo largo del gen en la elongación transcripcional favoreciendo su procesividad. En ambas situaciones Sus1 podría permanecer unido de manera general a las regiones codificantes de los genes, manteniendo a la cromatina en un estado adecuado para su futura transcripción.

Un punto clave en este modelo es que el mecanismo propuesto no se limita a los genes regulados por SAGA sino que se da de manera global en los genes codificantes de proteínas. El carácter general de la regulación de la transcripción propuesto para SAGA y SLIK coincide con el hecho de que en ausencia de SAGA, los niveles de mRNA maduros se ven disminuidos de manera similar en los genes regulados por SAGA y en los regulados por TFIID (Figura 1.12). Uno de los objetivos principales de nuestro grupo en la actualidad es por un lado, corroborar el modelo propuesto a través de análisis bioquímicos y moleculares, y por otro lado analizar mediante experimentos de CHIP-seq hasta qué punto los datos de unión de Sus1 a la cromatina dependen de su presencia en los complejos SAGA, SLIK y TREX-2, y si las moléculas de Sus1 libre participan también en el mecanismo propuesto.

La monoubicuitinación de H2B ha sido descrita globalmente asociada a las regiones codificantes de los genes en levaduras (Schulze *et al.*, 2011) y en humanos, donde dicha modificación está acoplada a la actividad de la RNAP II (Fuchs & Oren, 2014; Minsky *et al.*, 2008). La desubicuitinación de H2B en levaduras está asociada a dos patrones diferentes, uno asociado a Ubp8 en las regiones 5' de las regiones codificantes de los genes. El otro patrón está asociado a la desubicuitinasa Ubp10 a lo largo del cuerpo de los genes (Fuchs &

Oren, 2014). Dentro del mecanismo de regulación de la transcripción propuesto, podría ser que la unión de Sus1 (a través de SLIK) estuviese asociada a la monoubicuitinación de H2B en las regiones codificantes de los genes, y actuase desubicultinándolas para facilitar la procesividad de la RNAP II. Nuestros datos indican que la unión de Sus1 parece ser ligeramente mayor en genes con altas tasas de transcripción. Sin embargo, aunque no existe una correlación directa entre la unión de Sus1 y los cambios en las tasas de transcripción en su ausencia (Figura 1.15), sí sabemos que de forma global la ausencia de Sus1 afecta a un 18 % de los genes analizados por GRO (Fold-change = 2,5). Por lo tanto, cabe la posibilidad de que Sus1 (libre o a través de SLIK) se uniese a las regiones codificantes previamente monoubicuitinadas donde podría actuar en el mantenimiento de la cromatina a la espera de tener que participar en la elongación de los genes activados (Figura D1).

La unión de Sus1 a tDNAs es un dato novedoso e inesperado. Las funciones conocidas hasta el momento de SAGA y Sus1 en la regulación de la transcripción se limitan a los genes codificantes de proteínas regulados por la RNAP II. Nuestro análisis ha revelado un papel importante de ambos en la transcripción de los tDNAs regulada por la RNAP III. A pesar de que un estudio ha demostrado una interacción física entre los homólogos humanos de Gcn5 y Tra1, y los tRNAs (Kenneth *et al.*, 2007), ningún trabajo en levaduras ha relacionado a SAGA con la expresión de los tDNAs, hasta el momento. En este contexto, SAGA podría unirse a las regiones *upstream* de los tDNAs donde regularía la formación del PIC de manera similar a como lo hace en los genes tipo II. Sin embargo, su ausencia tiene el efecto contrario a lo que ocurre en dichos genes. En el caso de los tRNAs, la ausencia de SAGA provoca un incremento en

los niveles de tRNAs finales. Por lo tanto, en este caso SAGA podría estar regulando negativamente la transcripción de los tDNAs. Por otro lado, nuestros datos muestran que Sus1 se une al 90 % de los tDNAs en la región libre de nucleosomas. Esta unión de Sus1 igual que en el caso de los genes tipo II, parece darse de manera independiente de SAGA, pudiendo ocurrir a través de SLIK. En resumen, nuestro trabajo aporta datos que sugieren un papel relevante tanto de SAGA como de Sus1 en la regulación de este tipo de genes regulados por la RNAP III. Obviamente, el próximo paso para tener un modelo consistente del posible papel de Sus1 en la transcripción de estos genes, será el análisis de los niveles de expresión de los mismos en el mutante *sus1*Δ. Además, sería interesante analizar la interactómica de SAGA con la maquinaria de regulación de la transcripción de los tRNAs.

Existen en la bibliografía posibles vínculos funcionales indirectos entre Sus1, SAGA, TREX-2 y los tRNAs. La acetilación de histonas tiene un papel esencial en la compactación de la cromatina. La heterocromatina en levaduras está asociada a zonas hipoacetiladas (Braunstein *et al.*, 1993). En este contexto, varias subunidades de SAGA se han identificado como elementos barrera (Oki *et al.*, 2004). ENY2, el homólogo de Sus1 en *Drosophila* actúa como aislante de la cromatina (Erokhin *et al.*, 2010; Kurshakova *et al.*, 2007). En levaduras, la subunidad de SAGA, Ada2 se recluta a los telómeros y actúa evitando la dispersión de las regiones de heterocromatina (Jacobson & Pillus, 2009). En este sentido, el mantenimiento de las regiones libres de nucleosomas en los tDNAs es esencial para su transcripción. Se ha descrito un papel fundamental de la acetilación a través de Gcn5 en el mantenimiento de la actividad barrera de dichas regiones (Donze & Kamakaka, 2001). Por lo tanto, no podemos descartar la posibilidad de que Sus1 a través de las actividades

acetiltransferasas de SAGA y SLIK pudiera participar en el mantenimiento de la región libre de nucleosomas de los tDNAs para asegurar su correcta transcripción (Figura D2).

Por otro lado, existe un posible vínculo funcional entre el complejo TREX-2 y los tRNAs, en el contexto de su exportación al citoplasma. Recientemente, se han publicado trabajos que ponen de manifiesto la coordinación de la transcripción de tRNAs con su exportación a nivel del NPC tanto en *S. cerevisiae* (Chen & Gartenberg, 2014) como en *Caenorhabditis elegans* (Ikegami & Lieb, 2013). De manera similar a como se conoce el proceso de acercamiento al poro de genes codificantes de proteínas al poro nuclear para facilitar su transcripción y exportación del mRNA. En ambos trabajos se describen mecanismos por los cuales los tDNAs que van a ser transcritos se unen a las nucleoporinas del NPC. Este proceso de acercamiento al poro está relacionado con la unión y actividad de la RNAP III. Estos datos junto con nuestros resultados, podrían sugerir un papel activo de Sus1, SAGA y de TREX-2 en el proceso de acoplamiento entre transcripción y exportación de tRNAs en levaduras (Figura D2). Este enfoque abre nuevas vías de estudio de los procesos de acoplamiento de expresión génica de tRNAs mediados por Sus1.

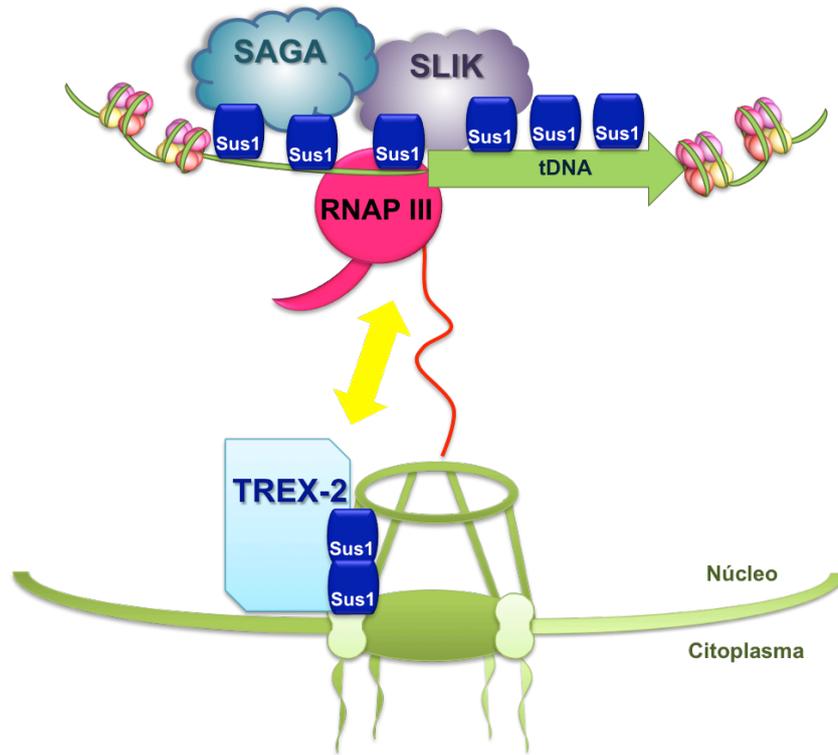


Figura D2. Modelo propuesto para la coordinación de Sus1, SAGA/SLIK y TREX-2 en la expresión génica de tDNAs. Sus1 participaría uniéndose a las regiones libres de nucleosomas de los tDNAs para mantener dichas regiones accesibles a los factores necesarios para la transcripción. Dicha transcripción estaría acoplada a la exportación de los tRNAs a través del acercamiento del locus del tDNA al NPC. Dicho acercamiento estaría mediado de forma similar que en los genes tipo II, por SAGA/SLIK y TREX-2 a través de Sus1. Fallos en dicha coordinación desregularían la transcripción, tal y como ocurre en ausencia de SAGA.

**CAPÍTULO 2:**  
**Estudio funcional del módulo de**  
**desubicuición de SAGA/SLIK**



## INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

### *ENSAMBLAJE DE COMPLEJOS MULTIPROTEICOS ENZIMÁTICOS*

Gran parte de las enzimas de la célula no funcionan de una manera individual e independiente, sino que se asocian con otras proteínas para formar complejos multiproteicos que son capaces de actuar de manera muy específica y regulada. Una cuestión importante al respecto de estos complejos multiproteicos es cómo las distintas subunidades se ensamblan de manera coordinada y específica para que el complejo esté preparado y se active cuando las condiciones lo requieran.

A pesar de que la metodología para la identificación de las distintas proteínas que forman parte de un mismo complejo multiproteico está ampliamente desarrollada a través de diferentes tipos de purificación y análisis proteómicos, el estudio e investigación de los mecanismos de ensamblaje de las diferentes subunidades de un complejo es un reto bioquímico.

La síntesis proteica es un evento citoplasmático, sin embargo, las funciones de muchos de los complejos multiproteicos se dan en el núcleo. Existen por tanto dos posibles modelos sobre cómo se ensambla el complejo entero: uno en el que cada subunidad es translocada al núcleo tras su síntesis y se ensambla con el resto de subunidades dentro del núcleo; y otro por el que las diferentes subunidades se acoplan en el citoplasma para entrar juntas al núcleo bien como un complejo completo o bien como módulos que se acabarán de ensamblar en el núcleo.

Un ejemplo de este segundo mecanismo es el ensamblaje de la RNAP II. Las subunidades que forman este complejo provienen de una nueva síntesis proteica en el citoplasma o bien del reciclaje de otras RNAP II en el núcleo. Para el ensamblaje de todas estas subunidades es necesaria la participación de varios factores intermedios implicados tanto en la organización de las subunidades como en la importación nuclear de la polimerasa. Los factores de ensamblaje estabilizan los dos subcomplejos de pre-ensamblaje que se forman en los primeros pasos. Todavía en el citoplasma ambos subcomplejos se unen para formar la RNAP II que se importa al núcleo donde se liberará de los factores de ensamblaje e importación que han participado en el proceso (Wild & Cramer, 2012).

### *ESTRUCTURA MODULAR DE SAGA/SLIK*

SAGA es un complejo dinámico y sus componentes se ensamblan en subcomplejos relacionados entre sí pero con diferentes funciones. Para entender como funciona el complejo, es de relevancia entender como sus componentes están organizados y unidos. Un estudio, a través de una combinación de estrategias bioquímicas, proteómicas y métodos computacionales, ha propuesto un modelo en el que el complejo SAGA estaría ensamblado en 4 módulos diferenciados (Figura I10):

- El módulo de desubicultinación (DUB) en el que reside la actividad de desubicultinación de la histona H2B y está formado por 4 proteínas: la proteasa Ubp8, Sgf11, Sgf73 y Sus1 (Ingvarsdottir *et al.*, 2005; Kohler *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2009).
- El módulo acetiltransferasa (HAT/Core) cuya principal función es la acetilación de la histona H3. Este módulo contiene las subunidades Gcn5, Ada2, Ada3 y Sgf29.

Ésta última tiene una función de reconocimiento de la metilación de H3K4 necesario para reclutar a SAGA (Balasubramanian *et al.*, 2002; Bian *et al.*, 2011).

- El módulo SA\_TAF está compuesto por todas las proteínas TAF (proteínas asociadas a TBP), que son mediadores de la actividad HAT ayudando al reclutamiento de la maquinaria transcripcional basal y también sirven como subunidades estructurales (Dylnacht *et al.*, 1991; Grant *et al.*, 1998a; Struhl & Moqtaderi, 1998).
- El módulo SA\_SPT que consiste en las proteínas SPT (supresores de Ty), junto con Ada1 y Tra1 cuya función es el reclutamiento del módulo HAT (Brown *et al.*, 2001).

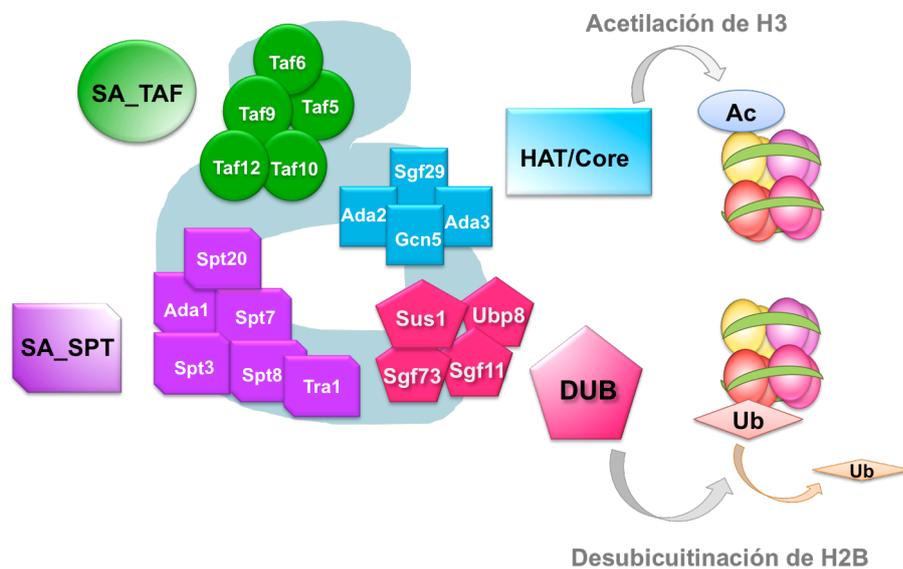


Figura I10. Organización modular de las subunidades del complejo SAGA en 4 submódulos diferentes.

Algunos componentes de estos módulos han sido descritos como unidades que mantienen la estructura y organización del complejo, y está descrito que la delección de *SPT20*, *ADA1* o *SPT7* compromete la integridad de SAGA (Grant *et al.*, 1997; Sterner *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2004). Se ha sugerido la posibilidad de que estos submódulos se puedan ensamblar independientemente unos de otros, lo que sugiere que el complejo SAGA maduro probablemente se ensamble a través de los distintos módulos preformados que posteriormente se unen para formar el complejo entero.

Mientras que no existen estructuras cristalizadas para el complejo SAGA en su totalidad, varios estudios han resuelto la estructura cristalizada del módulo DUB. Esta estructura muestra como cada subunidad del módulo contacta físicamente con las otras 3 proteínas, lo que explica como la formación del complejo activo requiere de la presencia de las 4 subunidades del DUB (Figura I11) (Kohler *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009; Weake *et al.*, 2008).

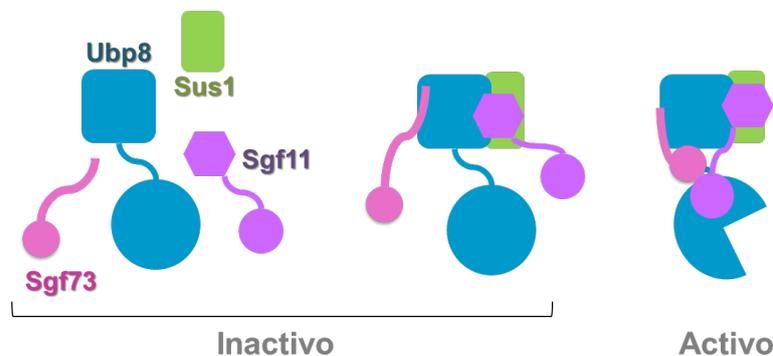


Figura I11. Modelo del ensamblaje y activación del módulo DUB de SAGA.

El módulo DUB se une al resto del complejo a través del dominio central de Sgf73, y se ha visto que Sgf11 juega un papel importante en la activación de Ubp8 y en mantener los residuos en

una conformación catalíticamente activa para favorecer la interacción con la lisina 123 ubiquitinada de la histona H2B (Kohler *et al.*, 2010; Samara *et al.*, 2010). Más recientemente se ha descrito que Sgf11 promueve la organización adecuada del DUB para compensar la flexibilidad intrínseca que tiene Ubp8 (Samara *et al.*, 2012). En vista de todos los datos estructurales conocidos hasta ahora, la organización modular de las subunidades que conforman SAGA y SLIK parece ser clave para la regulación de las actividades de estos complejos.



## RESULTADOS

### 2.1. Los componentes del DUB interactúan entre sí en mutantes estructurales de SAGA/SLIK.

Como hemos visto en el capítulo anterior Sus1 interactúa físicamente con todas las subunidades del módulo DUB en el mutante estructural *spt7* $\Delta$  (Tabla 1.1). Este dato refuerza la idea de que las interacciones que se establecen entre los componentes de un módulo son más estables que las que se establecen entre los diferentes módulos de un mismo complejo y ello es esencial para el ensamblaje del complejo entero.

Con el fin de estudiar si el fenotipo observado era dependiente específicamente de la subunidad Spt7, o de forma más general del ensamblaje del resto de módulos de SAGA/SLIK, decidimos analizar otros dos mutantes estructurales de SAGA/SLIK: *spt20* $\Delta$  y *ada1* $\Delta$ . Los datos obtenidos mediante espectrometría de masas de purificaciones TAP realizadas en nuestro laboratorio, muestran como Sus1 en los mutantes *spt20* $\Delta$  y *ada1* $\Delta$  al igual que en *spt7* $\Delta$  mantiene las interacciones físicas con los componentes del DUB y los principales componentes de TREX-2, pero se ven afectadas las interacciones con el resto de componentes de SAGA (Tabla 2.1). Los resultados demostraron que tras el desensamblaje de SAGA/SLIK, las interacciones de Sus1 con el DUB y con TREX-2 no se ven afectadas.

| Complejo multiproteico | Nombre de la proteína | Sus1-TAP                 | Sus1-TAP <i>spt7</i> Δ | Sus1-TAP <i>spt20</i> Δ | Sus1-TAP <i>ada1</i> Δ |
|------------------------|-----------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
|                        |                       | Proteínas detectadas (✓) |                        |                         |                        |
| SAGA                   | Sus1                  | ✓                        | ✓                      | ✓                       | ✓                      |
|                        | Ubp8                  | ✓                        | ✓                      | ✓                       | ✓                      |
|                        | Sgf11                 | ✓                        | ✓                      | ✓                       | ✓                      |
|                        | Sgf73                 | ✓                        | ✓                      | ✓                       | ✓                      |
|                        | Taf9                  | ✓                        | -                      | -                       | -                      |
|                        | Taf10                 | ✓                        | -                      | -                       | -                      |
|                        | Taf6                  | ✓                        | -                      | -                       | -                      |
|                        | Taf5                  | ✓                        | -                      | -                       | -                      |
|                        | Taf12                 | ✓                        | -                      | -                       | -                      |
|                        | Spt20                 | ✓                        | -                      | -                       | -                      |
|                        | Spt3                  | ✓                        | -                      | -                       | -                      |
|                        | Spt7                  | ✓                        | -                      | -                       | -                      |
|                        | Spt8                  | ✓                        | -                      | -                       | -                      |
|                        | Tra1                  | ✓                        | -                      | -                       | -                      |
|                        | Ada1                  | ✓                        | -                      | -                       | -                      |
|                        | Ada3                  | ✓                        | -                      | -                       | -                      |
|                        | Ada2                  | ✓                        | -                      | -                       | -                      |
| Gcn5                   | ✓                     | -                        | -                      | -                       |                        |
| Sgf29                  | ✓                     | -                        | -                      | -                       |                        |
| TRES-2                 | Cdc31                 | ✓                        | ✓                      | ✓                       | ✓                      |
|                        | Thp1                  | ✓                        | -                      | ✓                       | ✓                      |
|                        | Sem1                  | ✓                        | ✓                      | -                       | -                      |
|                        | Sac3                  | ✓                        | ✓                      | ✓                       | ✓                      |

Tabla 2.1. Sus1 mantiene las interacciones con los componentes del módulo DUB en los mutantes estructurales de SAGA/SLIK. Identificación mediante espectrometría de masas (MudPIT) de los péptidos obtenidos en las purificaciones TAP mencionadas. Los datos obtenidos se validaron con la información almacenada en las bases de datos de secuencias conocidas mediante el motor de búsqueda MASCOT. En la tabla se indica si se han identificado péptidos para cada proteína de los complejos SAGA y TRES-2.

Con el fin de confirmar estos datos decidimos realizar purificaciones TAP del componente central del módulo DUB, Ubp8, en cepas WT y *spt7*Δ. Los datos que mostramos en la Tabla 2.2 confirman que al igual que Sus1, Ubp8 mantiene sus interacciones con todas las subunidades del módulo DUB cuando el complejo SAGA/SLIK se desorganiza, pero no cuando uno de los componentes

de dicho módulo (Sus1) no está presente. Esto sugiere que las interacciones entre las subunidades del DUB son estables incluso en ausencia del complejo completo, pero no en ausencia de uno de los componentes del módulo.

| Complejo multiproteico | Nombre de la proteína | Ubp8-TAP                 | Ubp8-TAP <i>spt7</i> Δ | Ubp8-TAP <i>sus1</i> Δ |
|------------------------|-----------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|
|                        |                       | Proteínas detectadas (✓) |                        |                        |
| <b>SAGA</b>            | Sus1                  | ✓                        | ✓                      | -                      |
|                        | Ubp8                  | ✓                        | ✓                      | ✓                      |
|                        | Sgf11                 | ✓                        | ✓                      | -                      |
|                        | Sgf73                 | ✓                        | ✓                      | -                      |
|                        | Taf9                  | ✓                        | -                      | -                      |
|                        | Taf10                 | ✓                        | -                      | -                      |
|                        | Taf6                  | ✓                        | -                      | -                      |
|                        | Taf5                  | ✓                        | -                      | -                      |
|                        | Taf12                 | ✓                        | -                      | -                      |
|                        | Spt20                 | ✓                        | -                      | -                      |
|                        | Spt3                  | ✓                        | -                      | -                      |
|                        | Spt7                  | ✓                        | -                      | -                      |
|                        | Spt8                  | ✓                        | -                      | -                      |
|                        | Tra1                  | ✓                        | -                      | -                      |
|                        | Ada1                  | ✓                        | -                      | -                      |
|                        | Ada3                  | ✓                        | -                      | -                      |
|                        | Ada2                  | ✓                        | -                      | -                      |
| Gcn5                   | ✓                     | -                        | -                      |                        |
| Sgf29                  | ✓                     | -                        | -                      |                        |

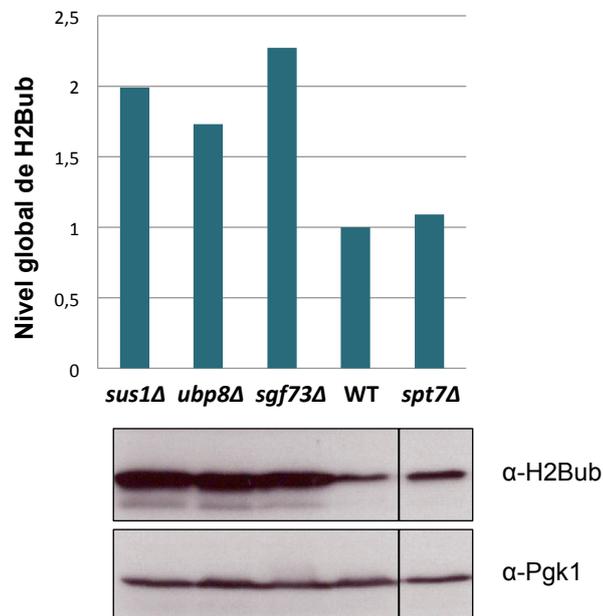
Tabla 2.2. Ubp8 mantiene interacciones con los componentes del módulo DUB en ausencia de *SPT7*. Identificación mediante espectrometría de masas (MudPIT) de los péptidos obtenidos en las purificaciones TAP mencionadas y validados con a través del motor de búsqueda MASCOT. En la tabla se indica si se han identificado péptidos para cada proteína de SAGA.

## 2.2. El módulo *DUB-libre* de SAGA/SLIK contribuye a mantener los niveles de H2B desubicitinada total.

La correcta interacción física entre los 4 componentes del módulo DUB es necesaria para su activación. En vista de los resultados obtenidos y de la organización modular de SAGA/SLIK una cuestión a resolver cuando comenzamos con esta línea de investigación fue si, además de necesarias, son suficientes esas interacciones para ensamblar un módulo DUB funcional en ausencia del resto del complejo.

Para abordar si este “*DUB-libre*” es activo, decidimos estudiar los niveles de histona H2B ubicuitinada total en distintos mutantes. En este sentido, resultados anteriores del grupo de la Dra. Berger proponen que si bien la actividad de Ubp8 se daba mayoritariamente en el contexto de SAGA, los niveles de H2Bub en el mutante estructural *spt20Δ* eran menores que los observados en el mutante *ubp8Δ*. Estos datos sugieren que el *DUB-libre* mantendría parte de su actividad fuera del contexto del complejo SAGA/SLIK (Henry *et al.*, 2003).

En vista de nuestros datos bioquímicos, decidimos analizar los niveles de H2B ubicuitinada totales a partir de extractos de proteínas de mutantes en los que el módulo DUB está inactivo (*sus1Δ*, *ubp8Δ* y *sgf73Δ*), así como en el mutante estructural *spt7Δ* en el que encontramos al *DUB-libre* y que no había sido analizado previamente. Los niveles de H2B ubicuitinada medidos a través de WB con un anticuerpo específico anti-H2Bub y normalizados a un control de carga, revelaron que la ausencia de *SPT7* no afecta a la desubicitinación global de H2B *in vivo* (Figura 2.1).



**Figura 2.1. La ausencia de Spt7 no afecta a los niveles globales de H2Bub *in vivo*.** Análisis de los niveles de histona H2B ubiquitinada global. Se obtuvieron extractos totales de histonas de las cepas WT (control positivo de actividad desubicitinasa), *sgf73Δ*, *ubp8Δ*, *sus1Δ* (controles negativo de actividad desubicitinasa) y *spt7Δ*, crecidas en YPD a 30 °C hasta OD<sub>600</sub> exponencial. Los niveles totales de H2B ubiquitinada se detectaron mediante WB con anticuerpo específico α-H2Bub (panel superior). Como control de carga del experimento se midieron los niveles de proteína Pgk1 con anticuerpo α-Pgk1. Los niveles de H2Bub totales se normalizaron en función de los niveles de Pgk1 para cada muestra (gráfico).

Estos datos sugieren que a pesar de no formar parte de los complejos SAGA/SLIK, el *DUB-libre* podría estar activo y ser capaz de desubicitinar a la histona H2B. Sin embargo, no descartamos que existan otros mecanismos diferentes implicados que ayuden a regular el nivel de H2B ubiquitinada global.

### 2.3. El *DUB-libre* desubicultina parcialmente la histona H2B *in vitro*.

Como veíamos en el apartado anterior, los niveles globales de H2Bub no parecen verse afectados en el mutante *spt7Δ*. Con el objeto de confirmar que el *DUB-libre* tiene actividad desubicultinasa, llevamos a cabo un ensayo de desubicultinación *in vitro*. En este ensayo de actividad enzimática purificamos el módulo *DUB-libre* a través de inmunoprecipitaciones de Upb8-TAP en los mutantes *spt7Δ* (donde SAGA/SLIK se desestructuran y purificamos al *DUB-libre*) y *sus1Δ* (donde el DUB será inactivo).

Los resultados obtenidos muestran que, en ausencia de *SPT7* el *DUB-libre* conserva los niveles de histona ubiquitinada en un 52%, frente a un 98% de la cepa WT, mientras que en el mutante *sus1Δ* apenas existe un 18% de H2Bub residual (Figura 2.2). Estos resultados sugieren que el *DUB-libre* conserva parte de su actividad *in vitro* cuando se purifica de células en las que no interacciona con SAGA/SLIK, si bien existe una reducción con respecto a la cepa WT. Este resultado, junto con los datos obtenidos *in vivo* sugiere que a pesar de que el *DUB-libre* mantiene parcialmente su actividad de desubicultinación, otras desubicultinasas podrían estar actuando en ausencia de *SPT7* sobre H2Bub para mantener los niveles adecuados.

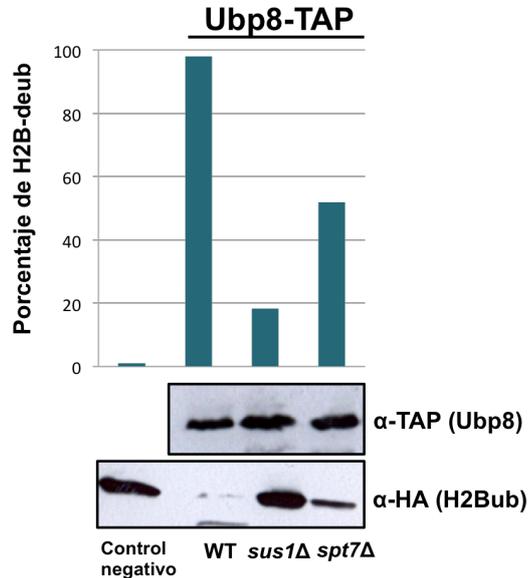
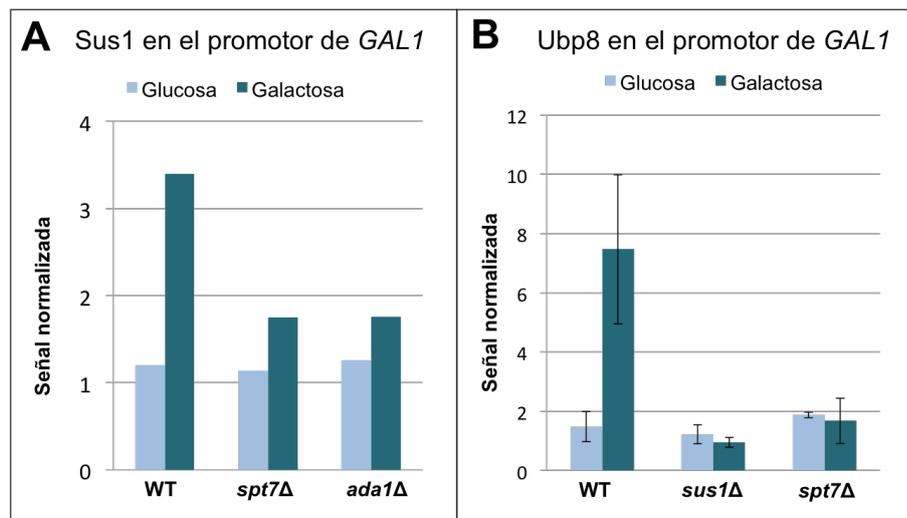


Figura 2.2. El *DUB-libre* tiene actividad de desubicitinación *in vitro*. Ensayo de desubicitinación *in vitro* del *DUB-libre*. Se llevaron a cabo purificaciones TAP de Ubp8 en la cepa WT y en los mutantes *sus1*Δ y *spt7*Δ. Dichos purificados se incubaron con histona H2B. Como control negativo la histona H2B purificada se incubó con tampón de elución TAP, sin purificado proteico. Los niveles de complejo purificado se detectaron mediante WB con anticuerpo α-TAP (panel superior). Los niveles de histona H2B ubiquitinada final se detectaron mediante WB con anticuerpo α-HA (panel inferior). Los niveles de H2Bub de cada muestra se referenciaron a los niveles del control negativo. El porcentaje de H2B desubicitinada final se obtuvo referenciando los niveles de H2Bub a la cantidad de proteína cebo purificada en cada muestra (gráfico).

#### 2.4. El *DUB-libre* no se recluta al promotor de *GAL1* de manera significativa.

Se ha descrito que Ubp8 desubicitina H2B a nivel del promotor de los genes regulados por SAGA mediante su reclutamiento a los mismos. Por ello, decidimos estudiar la unión

específica del *DUB-libre* al promotor de *GAL1*. El análisis mediante ChIP de la unión de Sus1 en dos de los mutantes estructurales de SAGA/SLIK, *spt7* $\Delta$  y *ada1* $\Delta$ , reveló que la unión de Sus1 al promotor de *GAL1* se ve reducida en dichos mutantes (Figura 2.3A).



**Figura 2.3. El *DUB-libre* no es reclutado al promotor de *GAL1*.** Análisis de la unión de las subunidades Sus1 (A) y Ubp8 (B) al promotor de *GAL1* en cepas WT y diferentes mutantes de SAGA/SLIK. En todos los casos el gen *GAL1* se reprimió o indujo con glucosa o galactosa respectivamente, durante 25 minutos. La unión al promotor de dicho gen se detectó mediante qPCR y se calculó el porcentaje de inmunoprecipitado respecto al lisado (Input). La señal obtenida para el promotor de *GAL1* se normalizó por la señal obtenida para una región intergénica. Las barras de error representan la desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes.

Dado que la unión de Sus1 al promotor de *GAL1* también depende de su asociación a TREX-2 (Garcia-Oliver *et al.*, 2013), decidimos estudiar el reclutamiento del *DUB-libre* al promotor de *GAL1* a través de otra subunidad en principio componente solo de SAGA/SLIK, Ubp8. Como control negativo de la unión de Ubp8 se

utilizó el mutante *sus1* $\Delta$  en el que el DUB se desensambla. El CHIP de Ubp8 en el mutante *spt7* $\Delta$  mostró que al igual que la unión de Sus1, la unión de Ubp8 al promotor de *GAL1* se ve drásticamente reducida en ausencia de *SPT7* (Figura 2.3B).

En conjunto, los datos obtenidos sobre la unión de Sus1 y Ubp8 indican que el módulo *DUB-libre* no se recluta eficientemente al promotor de *GAL1* en ausencia de SAGA/SLIK.

## 2.5. La localización del DUB depende de Spt7 pero no de Ada1.

Como hemos mostrado, en ausencia de *SPT7* el DUB no se recluta a *GAL1* ni se asocia a SAGA/SLIK. Tanto SAGA como SLIK son complejos nucleares, sin embargo se desconoce la localización subcelular del complejo *DUB-libre*. Por tanto, decidimos estudiar mediante microscopía confocal la localización subcelular del módulo DUB en diferentes mutantes. Para ello etiquetamos con la proteína fluorescente GFP tres de las 4 subunidades del DUB: Sus1, Ubp8 y Sgf11, en diferentes fondos genéticos. En una cepa silvestre, la localización de estas proteínas es mayoritariamente nuclear aunque una pequeña fracción se observa en el citoplasma. A pesar de que la fracción citoplasmática observada podría considerarse intrascendente, en un trabajo previo demostramos que Sus1 se asocia en el citoplasma a P-bodies en condiciones de sobreexpresión y presenta una fuerte interacción genética con la maquinaria de degradación de RNAs en el citoplasma (Cuenca-Bono *et al.*, 2010).

Como vemos en la Figura 2.4, Ubp8 pierde su localización nuclear predominante y se observa en el citoplasma en el mutante *spt7* $\Delta$ . Un fenotipo similar se observó para Sus1 en dicho mutante.

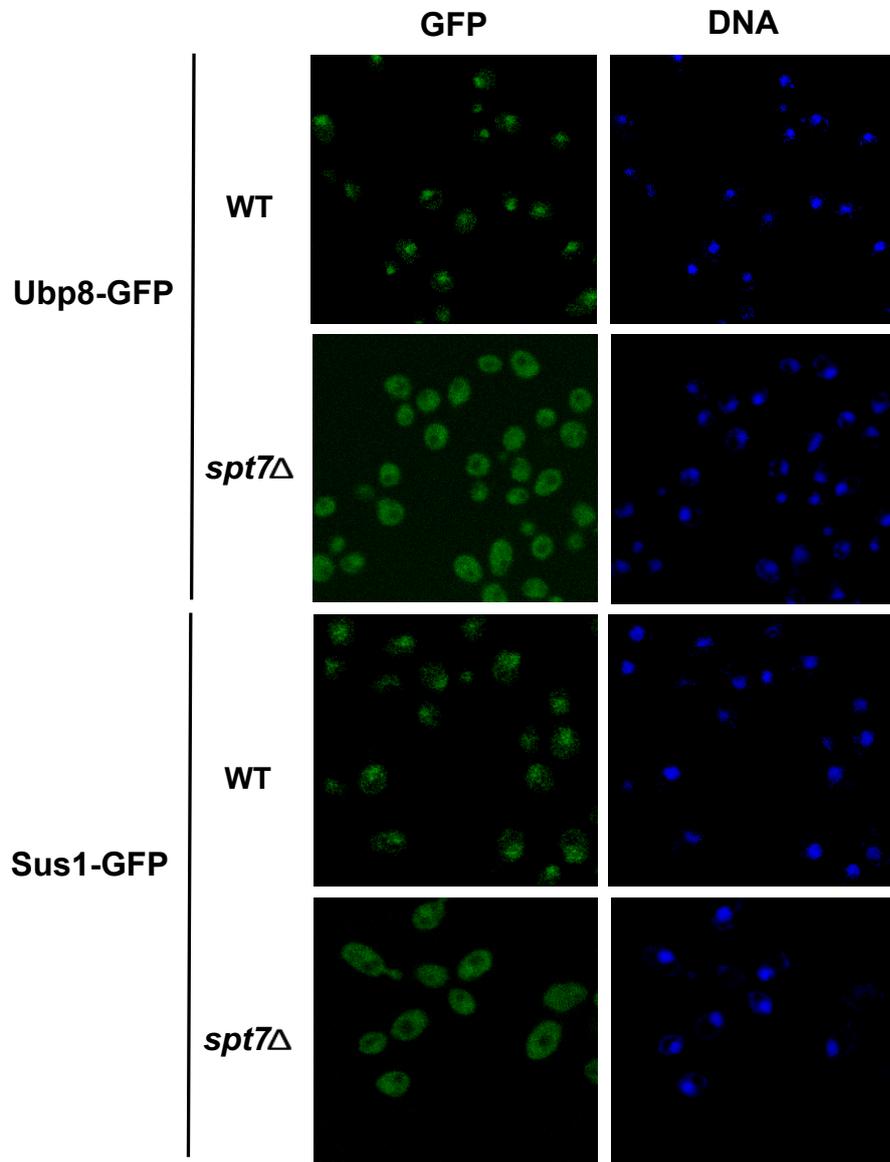


Figura 2.4. La localización de Sus1 y Ubp8 depende de Spt7. Localización celular in vivo de Sus1-GFP y Ubp8-GFP (paneles izquierdos) mediante microscopía de fluorescencia confocal en una cepa WT y en el mutante  $\Delta$ . La localización del núcleo celular se muestra a través del marcador fluorescente DAPI (paneles derechos). Las imágenes mostradas son una muestra representativa de todas las obtenidas.

Dado que Ada1 es otra de las subunidades descritas como estructural de SAGA/SLIK, decidimos evaluar si su ausencia también tiene el mismo efecto en la localización del DUB. Sin embargo, la localización de Ubp8 y Sgf11 no depende de Ada1 como demuestra la localización nuclear de ambas proteínas en dicho mutante (Figura 2.5). No obstante, sí se observa una clara deslocalización de ambos en el mutante *sus1* $\Delta$  donde la organización del DUB está afectada.

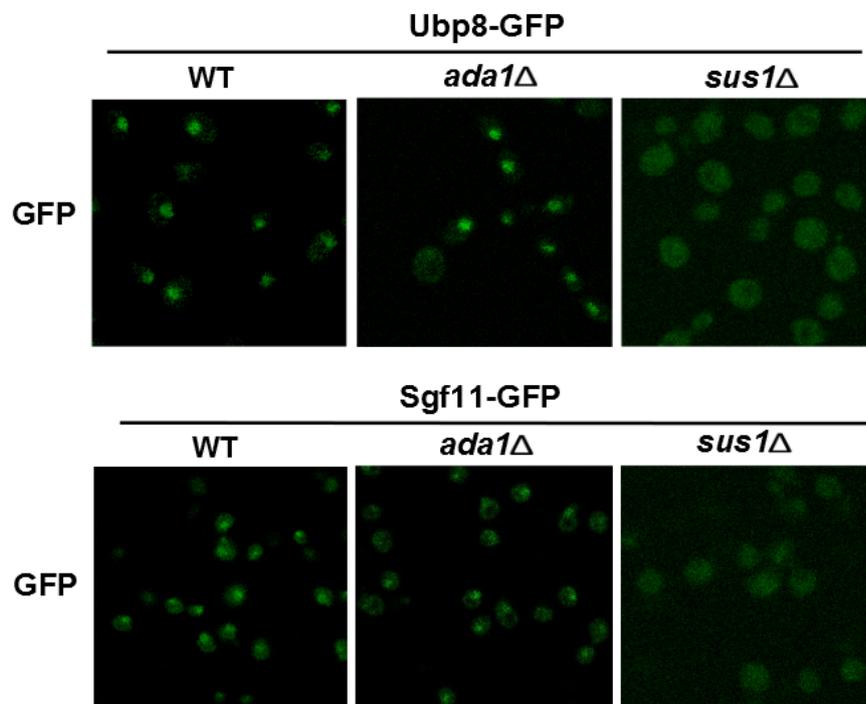
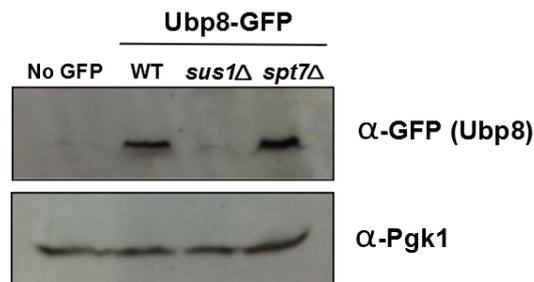


Figura 2.5. La localización de Sgf11 y Ubp8 no dependen de Ada1, pero sí de Sus1. Localización celular *in vivo* de Sgf11-GFP y Ubp8-GFP mediante microscopía de fluorescencia confocal en una cepa WT y en los mutante *ada1* $\Delta$  y *sus1* $\Delta$ . Las imágenes mostradas son una muestra representativa de todas las obtenidas.

Los diferentes fenotipos observados en los mutantes *ada1* $\Delta$  y *spt7* $\Delta$  resultan en primera instancia sorprendentes dado el hecho de que tanto Ada1 como Spt7 son ambos componentes estructurales de

SAGA/SLIK y esperaríamos el mismo resultado tras su delección. Sin embargo, estudios previos a esta tesis ya mostraron cómo los niveles tanto de Ada1 como Spt20 son dependientes de Spt7 (Wu & Winston, 2002) sugiriendo que estos tres componentes no juegan el mismo papel en la organización de las subunidades de SAGA/SLIK.

Para cerciorarnos de que la pérdida de señal en el núcleo en el mutante *spt7Δ* no se debe a una degradación de la proteína Ubp8, realizamos extractos totales para medir los niveles de Ubp8-GFP en las siguientes cepas: control negativo (cepa sin etiqueta), Ubp8-GFP, Ubp8-GFP *sus1Δ* y Ubp8-GFP *spt7Δ*. Tal como se observa en la Figura 2.6 los niveles de Ubp8-GFP, medidos por WB con anticuerpo anti-GFP, permanecen constantes en el mutante *spt7Δ*, mientras que se ven considerablemente reducidos en *sus1Δ*, presumiblemente por una desestabilización de la proteína en ese mutante.



**Figura 2.6.** Los niveles de Ubp8-GFP dependen de Sus1 pero no de Spt7. Análisis de niveles totales de proteína Ubp8-GFP en cepa WT y los mutantes *sus1Δ* y *spt7Δ* crecidas en medio líquido YPD a 30 °C. Se realizaron extractos totales de proteínas y se analizaron mediante WB con anticuerpos  $\alpha$ -GFP, y  $\alpha$ -Pgk1 como control de carga.

Estos datos confirmaron que la deslocalización de Ubp8 en el mutante *spt7Δ* no es un efecto debido a la bajada en los niveles de proteína, sino que es un reflejo de la deslocalización de parte de Ubp8, y por tanto del DUB, al citoplasma. Si tal es el caso, Spt7 podría tener un papel fundamental en la importación del módulo *DUB-libre* para su unión al resto de módulos de SAGA/SLIK.



## DISCUSIÓN

El modelo macromolecular que describe cómo las subunidades del complejo SAGA se distribuyen asociándose en 4 módulos diferentes ha permitido entender no solo la organización estructural del mismo sino cómo las interacciones entre los componentes son necesarias para su activación. Un aspecto importante de la estructura modular de SAGA es que la formación de los dos submódulos enzimáticos DUB y HAT es independiente del resto del complejo.

Tanto nuestros resultados como los publicados por otros grupos ponen de manifiesto que en ausencia de las subunidades estructurales de SAGA, éste es incapaz de ensamblar sus 4 módulos juntos (Grant *et al.*, 1997; Sterner *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2004). No obstante y pese a todos los datos bioquímicos de los que se cuenta actualmente en la bibliografía, nuestro trabajo es el primero en abordar como la ausencia de ciertas subunidades afectan a la localización subcelular de los módulos del complejo. Nuestros datos indican que pese a que en ausencia de Spt7, tanto Ubp8 como Sus1 siguen localizados en el núcleo, la cantidad de estas proteínas que encontramos en el citoplasma aumenta considerablemente. Sin embargo, la localización nuclear de Ubp8 y Sgf11 no parece verse afectada por la ausencia de otra de las subunidades estructurales, Ada1. Una posible interpretación de estos resultados sería que a pesar de que las 3 subunidades estructurales, Spt20, Ada1 y Spt7, forman parte del mismo módulo, Spt7 actuaría como núcleo del módulo SPT ejerciendo un papel de “*scaffold*” o andamiaje de la formación de SAGA en el citoplasma (Figura D3). De acuerdo a este modelo, en ausencia de Spt7 el ensamblaje citoplasmático de los módulos de SAGA se vería reducido lo que conllevaría la

acumulación de los diferentes submódulos preformados en el citoplasma. No obstante, trabajos que aborden el análisis de la localización del resto de submódulos son necesarios para confirmar el papel de Spt7 en el ensamblaje de SAGA en el citoplasma.

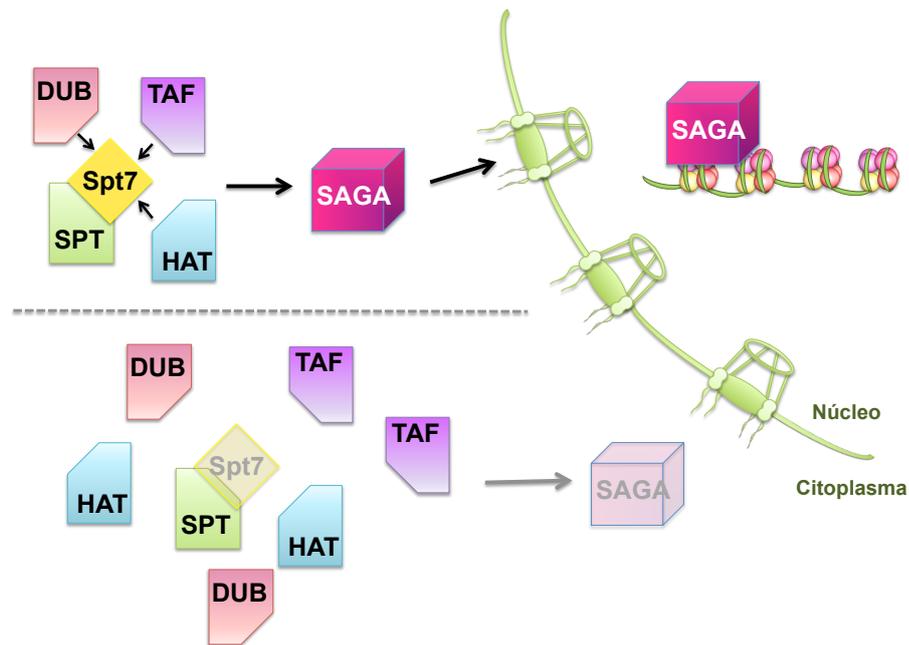


Figura D3. Modelo de ensamblaje del complejo SAGA en el citoplasma. Los 4 submódulos de SAGA se pre-ensamblarían en el citoplasma. La subunidad Spt7 del módulo SPT actuaría como factor de andamiaje para la unión de los submódulos para formar a SAGA que será translocado al núcleo. En ausencia de Spt7, los módulos pre-ensamblados no son capaces de unirse eficazmente y se acumularían en el citoplasma.

Uno de los resultados más interesantes de este segundo capítulo es la demostración de que el módulo *DUB-libre* es parcialmente activo y participa, al menos en parte, en mantener los niveles globales de histona H2B ubiquitinada. Sin embargo, dado que el *DUB-libre* no

es activo al 100 %, hemos de suponer que otras enzimas desubicultinasas como Ubp10 podrían estar implicadas en la homeostasis de H2Bub en ausencia de SAGA.

Cabe destacar que el *DUB-libre* podría ejercer su actividad sobre otros sustratos diferentes a las histonas. De hecho, como comentamos en la introducción general los sustratos de Ubp8 no se limitan solo a la histona H2B. En levaduras se ha descrito al factor Snf1 como un sustrato no-histona de Ubp8 (Wilson *et al.*, 2011). Snf1 es una quinasa que regula los niveles de fosforilación de factores de transcripción que regulan la expresión de ciertos genes (Young *et al.*, 2012). La desubicultinación de Snf1 parece ser necesaria para su activación como factor de transcripción. Si bien en el trabajo de Wilson y colaboradores, se concluye que la actividad de Ubp8 sobre Snf1 se da en el contexto de SAGA, en nuestra opinión en las condiciones experimentales utilizadas es demasiado aventurado realizar dicha conclusión. De hecho, dado que el *DUB-libre* es activo por sí mismo y se puede encontrar en el citoplasma, elucubramos con la idea de que éste módulo tuviese algún papel regulando la actividad de Snf1, de forma independiente a su unión a SAGA. En un intento de contestar dicha cuestión, medimos los niveles de Snf1 ubicuitinado en el mutante *spt7Δ*. A pesar de que los datos indicaban que el *DUB-libre* puede ser capaz de disminuir los niveles de Snf1 ubicuitinado, problemas técnicos con los anticuerpos utilizados impidieron la confirmación de dichos datos. En cualquier caso, cabe destacar que Snf1 es una proteína citoplasmática que se transloca al núcleo cuando es activado, para lo cual ha de ser desubicultinado. Este dato sugiere que la desubicultinación ocurriría en el citoplasma, lo que concuerda con la presencia del *DUB-libre* citoplasmático, siendo menos probable que sea desubicultinado por SAGA en esta localización (Figura D4).

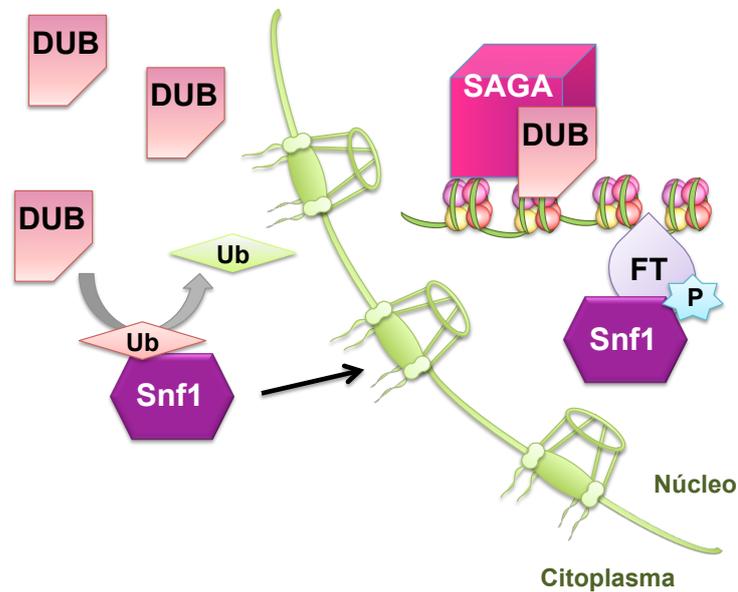


Figura D4. Modelo de activación por desubicitinación de Snf1 a través del *DUB-libre*. Snf1 es una proteína mayoritariamente citoplasmática que bajo ciertas condiciones ha de activarse. Para ello ha de ser desubicitinado por Ubp8 en el citoplasma, posiblemente a través del *DUB-libre*. Este proceso favorece su translocación al núcleo donde activará factores de transcripción (FT) necesarios para la transcripción.

Por tanto, nuestros datos apoyan la idea de la existencia de un módulo *DUB-libre* independiente de SAGA capaz de actuar desubicitinando la histona H2B en el núcleo, y quizás otros sustratos no-histonas, regulando su actividad. Recientemente, ha sido publicado un artículo que apoya nuestra idea de un *DUB-libre* con un papel clave en un contexto diferente al de SAGA (Lim *et al.*, 2013). En dicho trabajo se propone que el módulo DUB es disociado de SAGA a través de la subunidad del proteasoma Rpt2. Dicha disociación parece ser importante para la entrada del DUB a la región codificante del gen transcrito, junto a la RNAP II. Esta hipótesis concuerda con nuestros datos que indican que el módulo *DUB-libre*

no se une al promotor de *GAL1*. En este sentido, son necesarios experimentos que confirmen si el *DUB-libre* es capaz de unirse a la región codificante de dicho gen. En el trabajo mencionado, también se sugiere que el corte proteolítico mediado por Rpt2 que libera al DUB de SAGA también parece ser importante para la disociación de TREX-2 de la cromatina y su posterior reclutamiento al NPC, necesario para el acoplamiento entre transcripción y exportación. Como decimos Rpt2 es una subunidad del proteasoma (Kohler *et al.*, 2001), al igual que la subunidad de TREX-2, Sem1 (Funakoshi *et al.*, 2004). Es ampliamente conocido el papel de Sem1 como estabilizador de complejos y su papel en la regulación de las funciones tanto de TREX-2 como de SAGA (Faza *et al.*, 2010; Garcia-Oliver *et al.*, 2013; Tomko & Hochstrasser, 2014). Por ello, podría ser que el papel de Rpt2 en la liberación del DUB y de TREX-2 de la cromatina, tuviese alguna relación con Sem1 y su papel estabilizador de dichos complejos. En cualquier caso, en conjunto los datos sugieren que la formación del *DUB-libre* es un hecho regulado que no solo afectaría a la transcripción sino a su acoplamiento con la exportación de RNAs.



**CAPÍTULO 3:**  
**Estudio de los mecanismos de la**  
**desubicultinación de H2B y su**  
**acoplamiento con exportación de**  
**mRNAs**



## INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

### *LA UBICUITINACIÓN EN LA TRANSCRIPCIÓN*

La principal diana conocida de la monoubicuitinación durante la transcripción es sin duda la modificación de histonas. La ubiquitinación de histonas no solo regula la dinámica de los nucleosomas sino que también participa en el reclutamiento de factores y proteínas regulando su actividad. Esta modificación establece una comunicación en *trans* con otras histonas provocando sucesivas modificaciones en otros residuos de diferentes histonas alterando la estructura de la cromatina.

Durante la activación transcripcional se ensambla la maquinaria basal que se encargará de fosforilar la cola CTD de la RNAP II, y esto reclutará el complejo PAF permitiendo la ubiquitinación de H2B a través de Rad6/Bre1 (Xiao *et al.*, 2005). El complejo PAF también actúa reclutando al complejo COMPASS sobre la RNAP II. COMPASS es el encargado de la metilación en H3K4 a través de Set1. La ubiquitinación de la subunidad Csp35 de COMPASS es además necesaria para el reclutamiento de otra subunidad del complejo y su activación. De esta forma, PAF ayuda a la comunicación en *trans* entre la ubiquitinación y metilación de histonas (Krogan *et al.*, 2003a; Ng *et al.*, 2002).

Durante la elongación, la ubiquitinación de la histona H2B afecta a la dinámica de la cromatina y su accesibilidad (Pavri *et al.*, 2006; Shukla & Bhaumik, 2007; Tanny *et al.*, 2007). La H2Bub promueve la actividad del complejo remodelador FACT que reorganiza los nucleosomas para permitir el paso de la RNAP II elongante, y tras su paso reestructura de nuevo la cromatina para evitar fenómenos de transcripción críptica (Fleming *et al.*, 2008; Xin *et al.*, 2009).

Las modificaciones postraduccionales en la expresión génica afectan no solo a las histonas, sino también a muchos otros factores implicados. Más del 50% de las nucleoporinas del NPC están monoubicuitinadas. A pesar de que no se ha demostrado una correlación entre esta modificación y la función de las Nups, éstas son las únicas proteínas de la envoltura nuclear que son modificadas. Esta modificación no está relacionada con la degradación proteosómica, lo que sugiere que su ubiquitinación podría tener alguna función en la regulación de sus funciones. Un ejemplo de esto es Nup159, una nucleoporina del lado citoplasmático del NPC involucrada en la unión de las cadenas de dineína al NPC. El bloqueo de la ubiquitinación de Nup159 no altera la organización del NPC pero sí altera la segregación nuclear durante la mitosis (Hayakawa *et al.*, 2012).

Como hemos visto, la ubiquitinación es una marca reversible y por tanto la desubiquitinación juega un papel clave en los procesos regulados por la ubiquitinación de H2B. Como hemos descrito previamente la desubiquitinasa Ubp8 a través del DUB regula la transcripción mediada por la RNAP II. Por otro lado, la desubiquitinasa Ubp10 es responsable de mantener unos niveles adecuados de ubiquitinación y metilación esenciales para el silenciamiento telomérico (Emre *et al.*, 2005; Gardner *et al.*, 2005). Por lo tanto, los ciclos de ubiquitinación/desubiquitinación de la histona H2B son clave para la correcta regulación de la expresión génica (Weake & Workman, 2008).

### ACOPLAMIENTO ENTRE DESUBICUITINACIÓN Y EXPORTACIÓN DE RNAs

La correcta exportación de los mRNAs depende de la correcta ejecución de los procesos implicados en su metabolismo. Tanto la transcripción como la colocación de la caperuza, la eliminación de intrones o la formación de la cola poli(A) (Cole & Scarcelli, 2006; Kohler & Hurt, 2007; Lei & Silver, 2002; Lewis & Izaurralde, 1997; Reed, 2003; Schmitt *et al.*, 1999; Strasser & Hurt, 2001) son procesos determinantes para el transporte del mRNA del núcleo al citoplasma. La desubicultinación de H2B es importante durante la exportación de los mRNAs. La transcripción y la exportación están acopladas a través de Sus1 como componente de SAGA y TREX-2. De hecho, los componentes del módulo DUB de SAGA/SLIK, Sus1 y Sgf11 están implicados en la exportación de mensajeros (Kohler *et al.*, 2006), mientras que Ubp8 y Sgf73 están implicados en la exportación de algunos mRNAs específicos, como por ejemplo *GAL1* (Yuan *et al.*, 2005). Sgf73 es necesario para la asociación de Sus1 con ambos complejos y también para la estabilización de la asociación NPC-TREX-2 (Lee *et al.*, 2009).

A pesar de los datos de los que disponemos actualmente, no está claro si la desubicultinación de la histona H2B es un paso necesario para el acercamiento del gen a la periferia nuclear y se desconoce el mecanismo por el cual la desubicultinación de la histona H2B regularía la exportación de los mRNAs. Por otro lado, otra cuestión sin resolver es cómo las modificaciones de histonas podrían afectar a la presencia y estabilidad de Sus1 en el complejo TREX-2, y por tanto a la exportación.

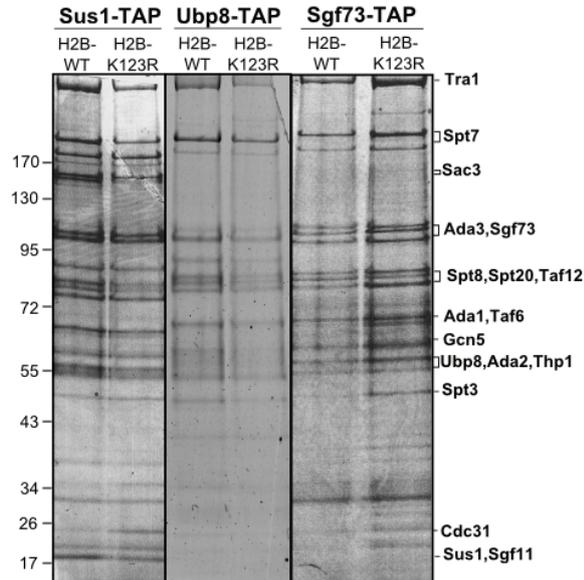
En este contexto, planeamos estudiar las conexiones entre la ubiquitinación/desubiquitinación de la histona H2B y la exportación de RNAs. Para ello, por un lado quisimos indagar en los procesos de regulación de la actividad del módulo DUB. Y por otro lado, estudiar los mecanismos moleculares del acoplamiento entre la ubiquitinación y exportación de mRNAs.

## RESULTADOS

### **3.1. La ubiquitinación de la histona H2B es necesaria para la interacción del DUB con la cromatina.**

Con el fin de entender como influye la ubiquitinación de la histona H2B en las funciones de SAGA y TREX-2, examinamos en primer lugar si las interacciones físicas del módulo DUB con otros componentes de SAGA/SLIK o con la cromatina se ven afectadas en ausencia de ubiquitinación de la histona H2B. Para ello etiquetamos con TAP tres componentes del DUB: Sus1, Ubp8 y Sgf73 en la cepa H2B-WT, y en el mutante H2B-K123R que contiene una mutación en la lisina 123 que bloquea la ubiquitinación de la histona.

La visualización de los purificados mediante tinción Coomassie no reveló ningún cambio significativo en los patrones de bandas obtenidos en las cepas H2B-WT y H2B-K123R para ningún componente del DUB (Figura 3.1).



**Figura 3.1.** Análisis del perfil de interacción del módulo DUB en ausencia de ubiquitinación de la histona H2B. Purificaciones TAP de Sus1, Ubp8 y Sgf73 en la cepa H2B-WT y el mutante H2B-K123R. Las purificaciones se analizaron en un gel de gradiente de poliacrilamida (4-12%) y las proteínas fueron teñidas con Coomassie coloidal. Se indican las bandas características de las subunidades de SAGA y TREX-2.

El análisis detallado por espectrometría de masas de los eluidos de las purificaciones, reveló que de un modo general, los 3 componentes del DUB analizados, pierden interacción total o parcialmente con las histonas en el mutante H2B-K123R, mientras que mantienen sus interacciones con el resto de componentes de SAGA/SLIK, y TREX-2 en el caso de Sus1 (Tabla 3.1).

|  |                       | Sus1-TAP<br>H2B-WT       | Sus1-TAP<br>H2B-K123R | Ubp8-TAP<br>H2B-WT | Ubp8-TAP<br>H2B-K123R | Sgf73-TAP<br>H2B-WT | Sgf73-TAP<br>H2B-K123R |
|--|-----------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|---------------------|------------------------|
| Complejo multiproteico                                     | Nombre de la proteína | Proteínas detectadas (✓) |                       |                    |                       |                     |                        |
| <b>SAGA</b>  | Sus1                  | ✓                        | ✓                     | ✓                  | ✓                     | ✓                   | ✓                      |
|  | Ubp8                  | ✓                        | ✓                     | ✓                  | ✓                     | ✓                   | ✓                      |
|  | Sgf11                 | ✓                        | ✓                     | ✓                  | ✓                     | ✓                   | ✓                      |
|  | Sgf73                 | ✓                        | ✓                     | ✓                  | ✓                     | ✓                   | ✓                      |
|  | Taf9                  | ✓                        | ✓                     | ✓                  | ✓                     | ✓                   | ✓                      |
|  | Taf10                 | ✓                        | ✓                     | ✓                  | ✓                     | ✓                   | ✓                      |
|  | Taf6                  | ✓                        | ✓                     | ✓                  | ✓                     | ✓                   | ✓                      |
|  | Taf5                  | ✓                        | ✓                     | ✓                  | ✓                     | ✓                   | ✓                      |
|  | Taf12                 | ✓                        | ✓                     | ✓                  | ✓                     | ✓                   | ✓                      |
|  | Spt20                 | ✓                        | ✓                     | ✓                  | ✓                     | ✓                   | ✓                      |
|  | Spt3                  | ✓                        | ✓                     | ✓                  | ✓                     | ✓                   | ✓                      |
|  | Spt7                  | ✓                        | ✓                     | ✓                  | ✓                     | ✓                   | ✓                      |
|  | Spt8                  | ✓                        | ✓                     | ✓                  | ✓                     | ✓                   | ✓                      |
|  | Tra1                  | ✓                        | ✓                     | ✓                  | ✓                     | ✓                   | ✓                      |
|  | Ada1                  | ✓                        | ✓                     | ✓                  | ✓                     | ✓                   | ✓                      |
|  | Ada3                  | ✓                        | ✓                     | ✓                  | ✓                     | ✓                   | ✓                      |
|  | Ada2                  | ✓                        | ✓                     | ✓                  | ✓                     | ✓                   | ✓                      |
| Gcn5   | ✓                     | ✓                        | ✓                     | ✓                  | ✓                     | ✓                   |                        |
| Sgf29  | ✓                     | ✓                        | ✓                     | ✓                  | ✓                     | ✓                   |                        |
| <b>TREX-2</b>  | Cdc31                 | ✓                        | ✓                     |                    |                       |                     |                        |
|  | Thp1                  | ✓                        | ✓                     |                    |                       |                     |                        |
|  | Sem1                  | -                        | -                     |                    |                       |                     |                        |
|  | Sac3                  | ✓                        | ✓                     |                    |                       |                     |                        |
| <b>Cantidades relativas de péptidos detectados (emPAI)</b> |                       |                          |                       |                    |                       |                     |                        |
| <b>HISTONAS</b>  | H2B                   | 0,01                     | -                     | 2,6                | -                     | 0,53                | 0,01                   |
|  | H2A                   | 0,25                     | -                     | 0,25               | -                     | 0,23                | -                      |
|  | H3                    | 0,22                     | -                     | -                  | -                     | -                   | -                      |
|  | H4                    | 0,3                      | -                     | 0,7                | -                     | 0,69                | 0,3                    |

Tabla 3.1. Análisis de las interacciones del módulo DUB en ausencia de ubiquitinación de la histona H2B. Identificación mediante espectrometría de masas (MudPIT) de los péptidos obtenidos en las purificaciones TAP mencionadas. Los datos obtenidos se validaron con la información almacenada en las bases de datos de secuencias conocidas mediante el motor de búsqueda MASCOT. En la parte superior de la tabla se indica si se han identificado péptidos para cada proteína del complejo SAGA en todas las purificaciones, y péptidos para las proteínas de TREX-2 en las purificaciones de Sus1. En la parte inferior de la tabla se indican las cantidades relativas de péptidos correspondientes a las 4 histonas. Dichas cantidades se expresan como valor de emPAI. Dicho parámetro estima la abundancia relativa de una proteína en función del número de péptidos detectados de dicha proteína en relación al número total de péptidos detectados en la muestra (Ishihama *et al.*, 2005).

En este análisis también se analizaron las interacciones de Sus1 en ausencia de *BRE1*, la ubiquitin-ligasa encargada de ubiquitinar a H2B. El resultado es similar al obtenido en el mutante H2B-K123R, no viéndose afectadas las interacciones con los componentes de SAGA y TREX-2 (Tabla 3.2). Sin embargo, las interacciones con las histonas no parecen verse afectadas significativamente por la ausencia de *BRE1* (datos no mostrados).

| Complejo multiproteico | Nombre de la proteína | Sus1-TAP                 | Sus1-TAP <i>bre1Δ</i> |
|------------------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------|
|                        |                       | Proteínas detectadas (✓) |                       |
| SAGA                   | Sus1                  | ✓                        | ✓                     |
|                        | Ubp8                  | ✓                        | ✓                     |
|                        | Sgf11                 | ✓                        | ✓                     |
|                        | Sgf73                 | ✓                        | ✓                     |
|                        | Taf9                  | ✓                        | ✓                     |
|                        | Taf10                 | ✓                        | ✓                     |
|                        | Taf6                  | ✓                        | ✓                     |
|                        | Taf5                  | ✓                        | ✓                     |
|                        | Taf12                 | ✓                        | ✓                     |
|                        | Spt20                 | ✓                        | ✓                     |
|                        | Spt3                  | ✓                        | ✓                     |
|                        | Spt7                  | ✓                        | ✓                     |
|                        | Spt8                  | ✓                        | ✓                     |
|                        | Tra1                  | ✓                        | ✓                     |
|                        | Ada1                  | ✓                        | ✓                     |
|                        | Ada3                  | ✓                        | ✓                     |
| Ada2                   | ✓                     | ✓                        |                       |
| Gcn5                   | ✓                     | ✓                        |                       |
| Sgf29                  | ✓                     | ✓                        |                       |
| TREX-2                 | Cdc31                 | ✓                        | ✓                     |
|                        | Thp1                  | ✓                        | -                     |
|                        | Sem1                  | ✓                        | ✓                     |
|                        | Sac3                  | ✓                        | ✓                     |

Tabla 3.2. Análisis de las interacciones del módulo DUB en ausencia de ubiquitinación de la histona H2B. Identificación mediante espectrometría de masas (MudPIT) de los péptidos obtenidos en las purificaciones TAP mencionadas. Los datos obtenidos se validaron con la información almacenada en las bases de datos de secuencias conocidas mediante el motor de búsqueda MASCOT. En la tabla superior se indica si se han identificado péptidos para cada proteína de los complejos SAGA y TREX-2.

En resumen, los datos sugieren que la ubiquitinación no se requiere para la correcta interacción entre el DUB y el resto de componentes de SAGA, ni con TREX-2, pero sí afecta a las interacciones con las histonas.

### 3.2. La ubiquitinación es necesaria para la unión del DUB al promotor de *GAL1*.

Ante la pérdida de interacción del DUB con las histonas observada en los mutantes H2B-K123R, decidimos ahondar en esta cuestión y analizar mediante ChIP la unión de las subunidades del DUB, Sus1 y Ubp8, directamente al promotor de *GAL1*. Los resultados del ChIP mostraron que tanto Sus1 como Ubp8, en condiciones de inducción transcripcional, ven drásticamente reducida su unión al promotor de *GAL1* en los mutantes H2B-K123R (Figura 3.2A).

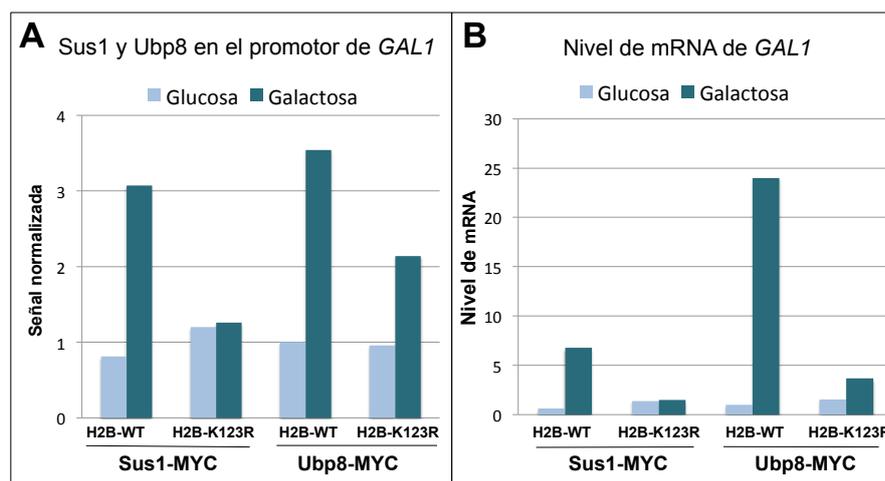


Figura 3.2. La ubiquitinación de H2B es necesaria para el reclutamiento de Sus1 y Ubp8 al promotor de *GAL1* y su correcta inducción. Análisis de la unión de las

subunidades Sus1 y Ubp8 al promotor de *GAL1* en cepas H2B-WT y H2B-K123R. En todos los casos el gen *GAL1* se reprimió o indujo con glucosa o galactosa respectivamente, durante 25 minutos. La unión al promotor de dicho gen se detectó mediante qPCR y se calculó el porcentaje de inmunoprecipitado respecto al lisado (Input). La señal obtenida para el promotor de *GAL1* se normalizó por la señal obtenida para una región intergénica. (B) Análisis de los niveles de mRNA del gen *GAL1* a partir de las mismas muestras utilizadas en los ChIPs anteriores. Los niveles relativos de mRNA se determinaron mediante RT-qPCR y se normalizaron respecto a los niveles de expresión de *SCR1*.

Los datos obtenidos sugieren que la ubiquitinación es un proceso necesario para el reclutamiento del módulo DUB al promotor de *GAL1*. Del mismo modo observamos que esta bajada de reclutamiento se correlaciona con una disminución de los niveles de RNA totales de *GAL1* medidos mediante RT-qPCR en los mutantes H2B-K123R respecto de los niveles medidos en las cepas H2B-WT (Figura 3.2B).

### 3.3. La interacción del DUB con las histonas es independiente de la actividad desubcunitinasa de Ubp8.

La mutación K123R bloquea la ubiquitinación de la histona H2B, y por lo tanto, su posterior desubcunitinación, de modo que los cambios en las interacciones físicas del DUB observados en los mutantes H2B-K123R y *bre1* $\Delta$  podrían ser asociados al bloqueo de la ubiquitinación ya que es el paso previo a la actividad del DUB. No obstante nos planteamos la posibilidad de que la propia actividad de desubcunitinación del módulo DUB fuese importante para establecer las correctas interacciones con la cromatina y con otros complejos.

Para intentar esclarecer si la actividad desubicitinasa es necesaria para las interacciones del DUB con las histonas, se realizaron purificaciones TAP de Sus1 en dos mutantes del dominio catalítico de Ubp8 que inactivan su acción enzimática. Ambos mutantes específicos de la actividad catalítica de Ubp8 se consiguieron transformando un mutante Sus1-TAP *ubp8* $\Delta$  con dos tipos de plásmidos que contienen el gen *UBP8* con una mutación puntual en el sitio catalítico del enzima: *ubp8*-C146S ó *ubp8*-H419A (Ingvarsdottir *et al.*, 2005), de manera que aunque Ubp8 se expresará en las células, será inactivo e incapaz de desubicitinar. Además se incluyó un control transformando la cepa Sus1-TAP *ubp8* $\Delta$  con un plásmido vacío. El análisis de las interacciones mostró que en ninguno de los dos mutantes catalíticos de Ubp8, Sus1 pierde interacción física con SAGA, TREX-2 o las histonas (Tabla 3.3). Sin embargo, como ya se había visto anteriormente, la ausencia de *UBP8* provoca la pérdida de asociación de Sus1 con SAGA e histonas, mientras que su unión a TREX-2 no se ve afectada (Lee *et al.*, 2007b). Estos resultados confirmaron que la correcta actividad de Ubp8 no es necesaria para la interacción de Sus1 con las histonas y el resto de componentes de SAGA/SLIK y TREX-2.

En conjunto, los datos obtenidos sugieren que la ubiquitinación, y no la actividad de desubicitinación, es necesaria para la interacción del DUB tanto con las histonas como su unión al promotor de *GAL1*. No obstante, ninguno de los dos procesos son necesarios para la unión de Sus1 con TREX-2.

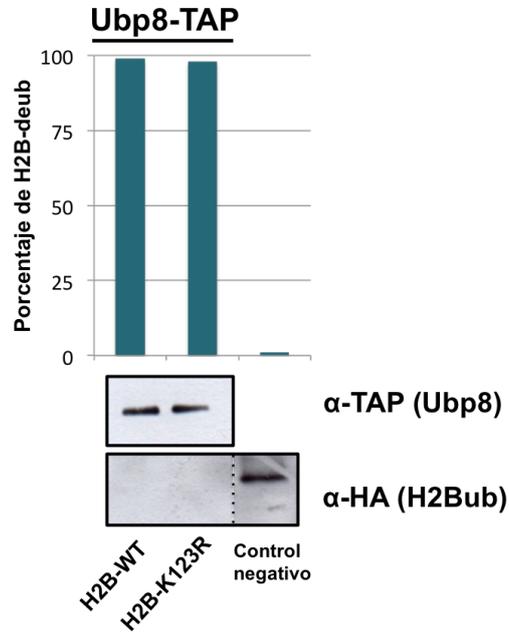
|                        |                       | Sus1-TAP<br><i>ubp8-C146S</i> | Sus1-TAP<br><i>ubp8-H419A</i> | Sus1-TAP<br><i>ubp8Δ</i> |
|------------------------|-----------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| Complejo multiproteico | Nombre de la proteína | Proteínas detectadas (✓)      |                               |                          |
| <b>SAGA</b>            | Sus1                  | ✓                             | ✓                             | ✓                        |
|                        | Ubp8                  | ✓                             | ✓                             | -                        |
|                        | Sgf11                 | ✓                             | ✓                             | ✓                        |
|                        | Sgf73                 | ✓                             | ✓                             | -                        |
|                        | Taf9                  | ✓                             | ✓                             | ✓                        |
|                        | Taf10                 | ✓                             | ✓                             | -                        |
|                        | Taf6                  | ✓                             | ✓                             | -                        |
|                        | Taf5                  | ✓                             | ✓                             | -                        |
|                        | Taf12                 | ✓                             | ✓                             | -                        |
|                        | Spt20                 | ✓                             | ✓                             | -                        |
|                        | Spt3                  | ✓                             | ✓                             | -                        |
|                        | Spt7                  | ✓                             | ✓                             | -                        |
|                        | Spt8                  | ✓                             | ✓                             | -                        |
|                        | Tra1                  | ✓                             | ✓                             | -                        |
|                        | Ada1                  | ✓                             | ✓                             | -                        |
|                        | Ada3                  | ✓                             | ✓                             | -                        |
| Ada2                   | ✓                     | ✓                             | ✓                             |                          |
| Gcn5                   | ✓                     | ✓                             | -                             |                          |
| Sgf29                  | ✓                     | ✓                             | -                             |                          |
| <b>TREX-2</b>          | Cdc31                 | ✓                             | ✓                             | ✓                        |
|                        | Thp1                  | ✓                             | ✓                             | ✓                        |
|                        | Sem1                  | ✓                             | ✓                             | ✓                        |
|                        | Sac3                  | ✓                             | ✓                             | ✓                        |
| <b>HISTONAS</b>        | H2B                   | ✓                             | ✓                             | ✓                        |
|                        | H2A                   | ✓                             | ✓                             | ✓                        |
|                        | H3                    | ✓                             | ✓                             | ✓                        |
|                        | H4                    | ✓                             | ✓                             | -                        |

Tabla 3.1. Análisis de las interacciones del módulo DUB en ausencia de ubiquitinación de la histona H2B. Identificación mediante espectrometría de masas (MudPIT) de los péptidos obtenidos en las purificaciones TAP mencionadas. Los datos obtenidos se validaron con la información almacenada en las bases de datos de secuencias conocidas mediante el motor de búsqueda MASCOT. En la tabla superior se indica si se han identificado péptidos para cada proteína de los complejos SAGA y TREX-2.

### 3.4. La actividad *in vitro* del DUB es independiente de la ubiquitinación de H2B.

Nuestros datos hasta el momento sugieren que la ubiquitinación es necesaria para la correcta unión del módulo DUB a la cromatina, más concretamente al promotor de *GAL1*, y para su expresión. Una posibilidad sería que la propia ubiquitinación de H2B fuera necesaria para la activación del módulo. Si bien esta hipótesis es difícil de estudiar técnicamente, nos propusimos comprobar mediante ensayo de desubiquitinación si la ubiquitinación de H2B es necesaria para la actividad del módulo DUB *in vitro*.

Para ello, purificamos el complejo DUB a través de Ubp8 tanto en la cepa H2B-WT como en el mutante H2B-K123R. Los resultados de la (Figura 3.1) mostraron que no existen diferencias en la composición de SAGA (y el DUB) en esta purificación. De acuerdo a estos resultados, el ensayo de desubiquitinación *in vitro* reveló que la actividad del complejo no se ve afectada por el bloqueo de la ubiquitinación de la histona H2B (Figura 3.3). De modo que la ubiquitinación parece ser importante para el reclutamiento del DUB a la cromatina pero no así para su activación *in vitro*.



**Figura 3.3.** La actividad desubicitinasa de Ubp8 no depende de la previa ubiquitinación de H2B. Ensayo de desubicitinación *in vitro* del complejo SLIK. Para ello se llevaron a cabo purificaciones TAP de Ubp8 en la cepa H2B-WT y en el mutante H2B-K123R. Dichos purificados se incubaron con histona H2B. Como control negativo la histona H2B purificada se incubó con tampón de elución TAP, sin purificado proteico. Los niveles de complejo purificado se detectaron mediante WB con anticuerpo  $\alpha$ -TAP (panel superior). Los niveles de histona H2B ubiquitinada final se detectaron mediante WB con anticuerpo  $\alpha$ -HA (panel inferior). Cuando los niveles de H2Bub finales en las muestras son cercanos a 0, para su cuantificación se utilizó un valor mínimo de área = 1. Los niveles de H2Bub de cada muestra se referenciaron a los niveles del control negativo. El porcentaje de H2B desubicitinada final se obtuvo referenciando los niveles de H2Bub a la cantidad de proteína cebo purificada en cada muestra (gráfico).

### 3.5. La ubiquitinación de la histona H2B afecta a la exportación de los mRNAs.

El acoplamiento entre la transcripción y la exportación de los mRNAs es un paso fundamental para una eficiente respuesta a las condiciones de crecimiento a través del rápido procesamiento de los mRNAs, de hecho existe una relación funcional entre la ubiquitinación y la exportación de mRNAs. Al inicio de este trabajo se desconocía si la ubiquitinación de H2B tenía un efecto directo sobre la salida de los mRNAs del núcleo al citoplasma. Con el fin de estudiar los posibles efectos de la ausencia de ubiquitinación de H2B en el transporte de mRNAs, realizamos hibridaciones *in situ* para la localización de distintos mRNAs mediante microscopía de fluorescencia. Por un lado, se hibridaron todos los mRNAs utilizando sondas oligo(dT<sub>18</sub>), y por otro lado se hibridó el mRNA del gen inducible *STL1* usando sondas específicas para su detección. Crecimos en YPD a 30 °C las cepas Sus1-MYC H2B-WT y Sus1-MYC H2B-K123R que ya habíamos empleado en ensayos de CHIP con anterioridad (Figura 3.2). Se utilizó el mutante termosensible *mex67-5* como control positivo del bloqueo en la exportación de RNAs (Figura 3.4A). Como muestra la Figura 3.4B la mutación K123R de H2B provoca una acumulación de los mRNAs y del RNA específico de *STL1*, mientras que no se observa ningún defecto en la cepa Sus1-MYC H2B-WT en las mismas condiciones. Estos datos sugieren que la ubiquitinación de H2B podría ser necesaria para la exportación de los mRNAs.

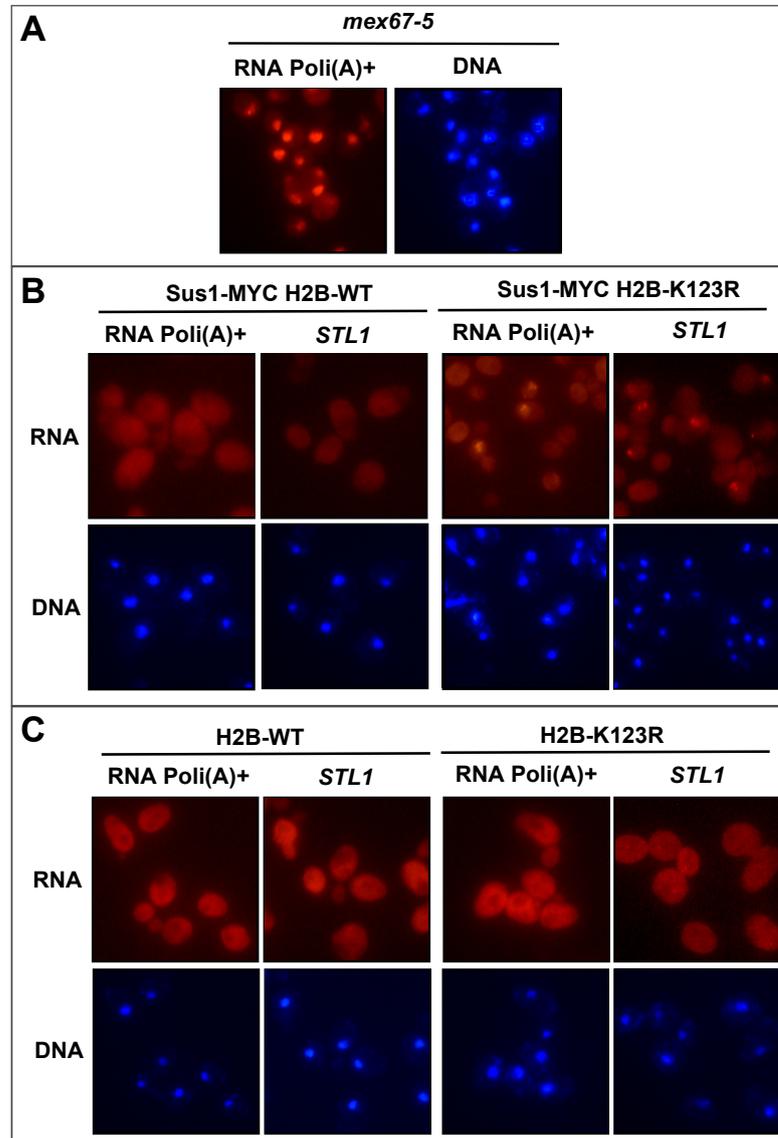


Figura 3.4. La ubiquitinación de la histona H2B es necesaria para la exportación de RNAs bajo ciertas condiciones. Análisis de la exportación de los RNAs poli(A)+ y *STL1* en las cepas H2B-WT y H2B-K123R, con y sin Sus1 etiquetado con MYC (paneles superiores e inferiores, respectivamente). El mutante *mex67-5* fue tratado durante 20 minutos a 37 °C para exacerbar sus fenotipos. La localización de los RNAs poli(A)+ se comprobó mediante hibridación *in situ* utilizando una sonda oligo(dT) marcada con Cy3. La localización de los RNAs de

*STL1* se comprobó mediante hibridación *in situ* utilizando una sonda específicas marcadas con Cy3. Los núcleos fueron detectados mediante el marcaje del DNA con DAPI. Las imágenes mostradas son una muestra representativa de las fotografías obtenidas en el microscopio de fluorescencia.

Con el fin de verificar este resultado decidimos repetir el experimento con las mismas cepas sin *Sus1* etiquetado con MYC: H2B-WT y H2B-K123R. Sin embargo, de manera contraria a lo observado anteriormente, en las mismas condiciones de crecimiento no fuimos capaces de reproducir el fenotipo de defecto de exportación en el mutante H2B-K123R (Figura 3.4C).

Atendiendo a estos resultados, nos planteamos la posibilidad de que la etiqueta MYC estuviese provocando un efecto negativo sobre las funciones de *Sus1*, y esto se viese reflejado en los defectos de exportación de los RNAs en el mutante H2B-K123R. A pesar de que en nuestro laboratorio nunca hemos observado fenotipos asociados al etiquetado de *Sus1* con MYC, decidimos realizar ensayos de crecimiento por goteo para comprobar el crecimiento de las cepas H2B-WT y H2B-WT *Sus1*-MYC, al igual que H2B-K123R con H2B-K123R *Sus1*-MYC. Como se muestra en la Figura 3.5, no existe defecto de crecimiento en las cepas etiquetadas con respecto a sus respectivas cepas isogénicas sin etiquetar.

En vista a estos datos, concluimos que la ausencia de ubiquitinación en determinadas condiciones (*Sus1* etiquetada) puede derivar en un defecto de exportación de los mRNAs.

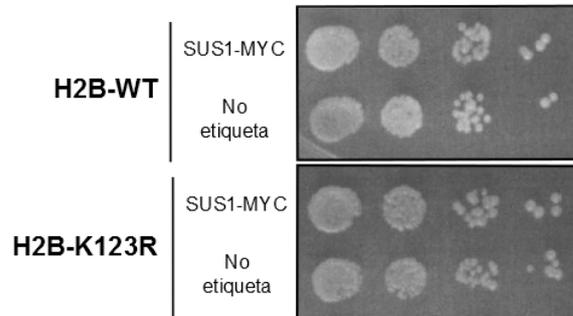


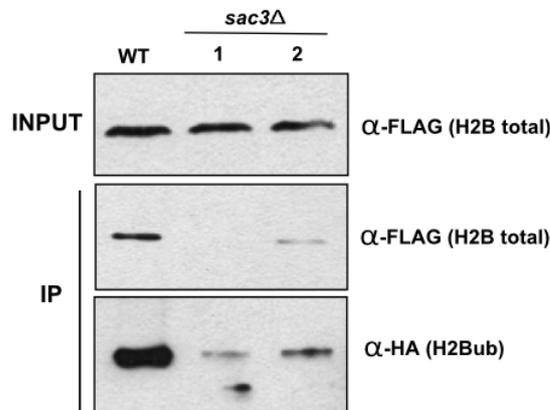
Figura 3.5. La etiqueta MYC sobre Sus1 no afecta al crecimiento celular. Análisis del crecimiento celular de las cepas H2B-WT (panel superior) y H2B-K123R (panel inferior) con y sin etiqueta MYC sobre la proteína Sus1. Las cepas se crecieron hasta alcanzar una  $OD_{600}$  de 0,4. Se sembraron diluciones seriadas de las cepas indicadas en placas de YPD y se incubaron a 30 °C durante 48 h.

### 3.6. Relación funcional entre la maquinaria de exportación de los mRNAs y la desubicitinación de H2B.

#### 3.6.1. Sac3 podría afectar al metabolismo de la cromatina.

En la línea de nuestro estudio sobre la interacción funcional de la desubicitinación de H2B y la exportación de los RNA mensajeros, decidimos analizar los niveles de histona H2Bub en mutantes de subunidades del complejo del poro nuclear (NPC) y TREX-2. Utilizando las cepas que contienen los plásmidos H2B-FLAG y HA-Ub, purificamos la histona H2B mediante la etiqueta FLAG en los mutantes *sac3* $\Delta$  (componente estructural de TREX-2) y *nup60* $\Delta$  (nucleoporina del NPC). Ambas mutaciones provocan defectos en la exportación de los RNAs.

Como se observa en la Figura 3.6, pese a que en todos los casos los inputs de H2B-FLAG de los distintos experimentos fueron similares, cuando se analizó la cantidad de H2B total inmunoprecipitada con anti-FLAG, en el mutante *sac3Δ* apenas es detectada. Por otro lado, el mutante *nup60Δ* mostraba niveles de H2Bub similares a la cepa WT (datos no mostrados). Estos resultados indican que Nup60 no juega un papel relevante en la ubiquitinación de la histona H2B a nivel global. Los datos obtenidos en ausencia de SAC3 no nos permiten concluir si afecta a los niveles de ubiquitinación de H2B ya que el rendimiento de la inmunoprecipitación en este mutante es muy bajo, posiblemente por una alteración en el metabolismo de la cromatina.



**Figura 3.6. La histona H2B no se purifica correctamente en ausencia de SAC3.** Análisis de los niveles de histona H2B ubiquitinada total en cepas WT y *sac3Δ*. Las purificaciones de H2B-FLAG se llevaron a cabo siguiendo el protocolo de purificación de histona utilizado para los ensayos de desubiquitinación *in vitro*. El análisis de los niveles de H2B total se llevó a cabo para los lisados celulares (INPUT, panel superior) y para los inmunoprecipitados (IP) mediante WB con anticuerpo  $\alpha$ -FLAG (panel intermedio). El análisis de los niveles de H2Bub total se llevó a cabo para las IPs mediante WB con anticuerpo  $\alpha$ -HA (panel inferior).

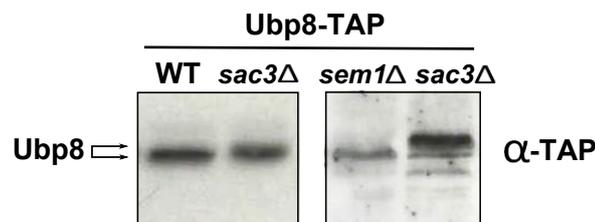
### 3.6.2. *Sac3* afecta a la unión de Ubp8 con las histonas y a su movilidad electroforética.

Para continuar estudiando la relación entre desubicultinación y exportación, decidimos estudiar si la ausencia de *SAC3* o *NUP60* afectaba a las interacciones físicas de Ubp8. Para ello purificamos Ubp8 mediante TAP y posteriormente se identificaron mediante espectrometría de masas las proteínas con las que interacciona en cada mutante. El análisis de estas interacciones mostró una disminución en la interacción de Ubp8 con las histonas en el mutante *sac3* $\Delta$  (Tabla 3.4), mientras que no parecen existir cambios en el mutante *nup60* $\Delta$ . Los resultados sugieren que *Sac3* puede afectar a la unión entre Ubp8 y las histonas, mientras que la nucleoporina *Nup60* no afecta a dichas interacciones.

|                        |                       | Ubp8-TAP  | Ubp8-TAP<br><i>sac3Δ</i> | Ubp8-TAP<br><i>nup60Δ</i> |
|------------------------|-----------------------|---|--------------------------|---------------------------|
| Complejo multiproteico | Nombre de la proteína | Proteínas detectadas (✓)                            |                          |                           |
| <b>SAGA</b>            | Sus1                  | ✓   | ✓                        | ✓                         |
|                        | Ubp8                  | ✓   | ✓                        | ✓                         |
|                        | Sgf11                 | ✓   | ✓                        | ✓                         |
|                        | Sgf73                 | ✓   | ✓                        | ✓                         |
|                        | Taf9                  | ✓   | ✓                        | ✓                         |
|                        | Taf10                 | ✓   | ✓                        | ✓                         |
|                        | Taf6                  | ✓   | ✓                        | ✓                         |
|                        | Taf5                  | ✓   | ✓                        | ✓                         |
|                        | Taf12                 | ✓   | ✓                        | ✓                         |
|                        | Spt20                 | ✓   | ✓                        | ✓                         |
|                        | Spt3                  | ✓   | ✓                        | ✓                         |
|                        | Spt7                  | ✓   | ✓                        | ✓                         |
|                        | Spt8                  | -   | -                        | -                         |
|                        | Tra1                  | ✓   | ✓                        | ✓                         |
|                        | Ada1                  | ✓   | ✓                        | ✓                         |
|                        | Ada3                  | ✓   | ✓                        | ✓                         |
| Ada2                   | ✓                     | ✓   | ✓                        |                           |
| Gcn5                   | ✓                     | ✓   | ✓                        |                           |
| Sgf29                  | ✓                     | ✓   | ✓                        |                           |
|                        |                       | Cantidades relativas de péptidos detectados (emPAI) |                          |                           |
| <b>HISTONAS</b>        | H2B                   | 0,9   | 0,53                     | 1,35                      |
|                        | H2A                   | 0,25  | -                        | 0,55                      |
|                        | H3                    | -   | -                        | 0,7                       |
|                        | H4                    | 1,89  | 0,4                      | 0,49                      |

Tabla 3.4. Análisis de las interacciones de Ubp8 en ausencia de SAC3 y NUP60. Identificación mediante espectrometría de masas (MudPIT) de los péptidos obtenidos en las purificaciones TAP mencionadas. Los datos obtenidos se validaron con la información almacenada en las bases de datos de secuencias conocidas mediante el motor de búsqueda MASCOT. En la parte superior de la tabla se indica si se han identificado péptidos para cada proteína de SAGA. En la parte inferior de la tabla se indican las cantidades relativas de péptidos correspondientes a las 4 histonas. Dichas cantidades se expresan como valor de emPAI. Dicho parámetro estima la abundancia relativa de una proteína en función del número de péptidos detectados de dicha proteína en relación al número total de péptidos detectados en la muestra.

Una observación relevante derivada de estos experimentos fue el hecho de que Ubp8-TAP presentaba una movilidad electroforética diferente en el mutante *sac3Δ*, sobretodo cuando trabajamos con extractos totales. Como se observa en la Figura 3.7, Ubp8 presenta una movilidad ligeramente menor en el mutante *sac3Δ* cuando se compara con el WT. Con el fin de comprobar que este resultado era específico de la ausencia de *SAC3* o estaba relacionado con la estabilidad general de TREX-2, analizamos también el mutante *sem1Δ* donde la movilidad fue similar al WT.



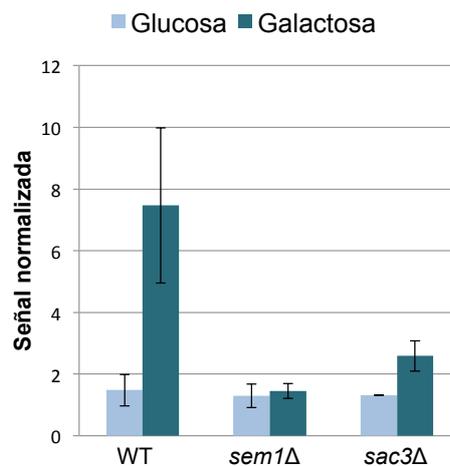
**Figura 3.7. Ubp8 presenta una menor movilidad electroforética en ausencia de *SAC3*.** Análisis de la movilidad electroforética de la proteína Ubp8-TAP en las cepas WT, *sac3Δ* y *sem1Δ*. Las muestras obtenidas a partir de cultivo líquido crecido a 30 °C toda la noche se analizaron mediante WB con anticuerpo α-TAP.

### 3.6.3. El complejo TREX-2 es necesario para el reclutamiento de Ubp8 al promotor de *GAL1*.

Con el fin de corroborar la idea de que factores clave en la exportación de los RNAs tengan un papel en la correcta interacción de Ubp8 con las histonas y por tanto con la cromatina, llevamos a cabo ensayos de CHIP para ver cómo el reclutamiento de Ubp8 al promotor de *GAL1* se podría ver afectado en los mutantes del complejo TREX-2: *sem1Δ* y *sac3Δ*. Como se observa en la Figura 3.8, existe una pérdida de la unión de Ubp8 al promotor de *GAL1* en los

dos mutantes de TREX-2. Este dato sugiere que existe una relación entre la integridad de TREX-2 y el reclutamiento de Ubp8 al promotor de *GAL1*.

#### Sus1 y Ubp8 en el promotor de *GAL1*

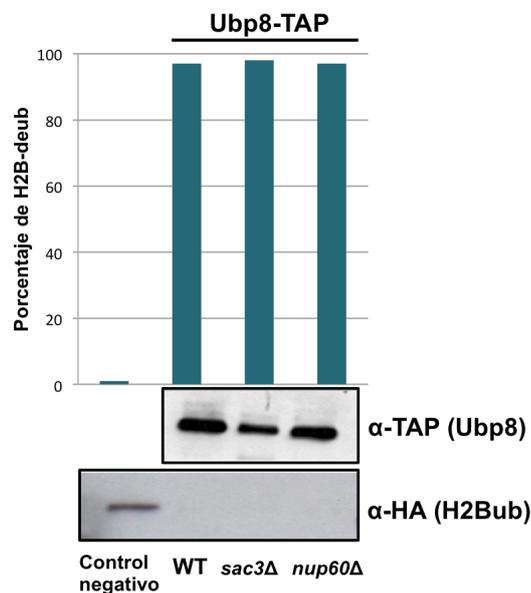


**Figura 3.8. Sem1 y Sac3 son necesarios para el reclutamiento de Ubp8 al promotor de *GAL1*.** Análisis de la unión de Ubp8 al promotor de *GAL1* en cepas WT, *sac3Δ* y *sem1Δ*. En todos los casos el gen *GAL1* se reprimió o indujo con glucosa o galactosa respectivamente, durante 25 minutos. La unión al promotor de dicho gen se detectó mediante qPCR y se calculó el porcentaje de inmunoprecipitado respecto al lisado (Input). La señal obtenida para el promotor de *GAL1* se normalizó por la señal obtenida para una región intergénica. Las barras de error representan la desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes.

#### 3.6.4. La actividad DUB *in vitro* es independiente de Sac3 y Nup60.

Datos de nuestro grupo han demostrado que Sem1 es necesario para la actividad DUB tanto *in vitro* como *in vivo* (Garcia-Oliver *et al.*, 2013). Con el fin de averiguar si la actividad del módulo DUB se

ve afectada *in vitro* por la ausencia de *SAC3* y *NUP60*, se realizaron ensayos de desubicitinación purificando Ubp8 en dichos mutantes. Estos experimentos demostraron que ni *Sac3* ni *Nup60* son factores necesarios para actividad desubicitinasa *in vitro* en estas condiciones (Figura 3.9).



**Figura 3.9. La actividad desubicitinasa de Ubp8 no depende de *Sac3* ni *Nup60*.** Ensayo de desubicitinación *in vitro* del módulo DUB. Para ello se llevaron a cabo purificaciones TAP de Ubp8 en las cepas WT, *sac3Δ* y *nup60Δ*. Dichos purificados se incubaron con histona H2B. Como control negativo la histona H2B purificada se incubó con tampón de elución TAP, sin purificado proteico. Los niveles de complejo purificado se detectaron mediante WB con anticuerpo  $\alpha$ -TAP (panel superior). Los niveles de histona H2B ubiquitinada final se detectaron mediante WB con anticuerpo  $\alpha$ -HA (panel inferior). Cuando los niveles de H2Bub finales en las muestras son cercanos a 0, para su cuantificación se utilizó un valor mínimo de área = 1. Los niveles de H2Bub de cada muestra se referenciaron a los niveles del control negativo. El porcentaje de H2B desubicitinada final se obtuvo referenciando los niveles de H2Bub a la cantidad de proteína cebo purificada en cada muestra (gráfico).

## DISCUSIÓN

Que la transcripción y la exportación de los mRNAs están acopladas es un hecho ampliamente descrito, sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales se da esta coordinación no están claros. La ubiquitinación y la desubiquitinación de H2B a través del módulo DUB de SAGA/SLIK parecen tener un papel clave en dicha coordinación. Nuestro trabajo al respecto ha aportado evidencias sobre cómo ambos procesos se coordinan.

Los análisis realizados en esta tesis indican que la unión del módulo DUB a las histonas y más concretamente al promotor de *GAL1* depende de la previa ubiquitinación de la histona H2B. Estos datos contrastan con otros publicados por la Dra. Osley en los que se describe que el reclutamiento de SAGA a través de Gcn5 no se ve afectado en el mutante H2B-K123R (Henry *et al.*, 2003). Sin embargo, posteriormente a dicho trabajo, se ha demostrado que el mutante utilizado por el grupo de la Dra. Osley contiene en su genoma una copia WT del gen de H2B (Nakanishi *et al.*, 2009), señalando que el dato de reclutamiento de SAGA publicado corresponde a una cepa silvestre y no al mutante K123R. Por lo tanto, la ubiquitinación de H2B sí parece ser un paso previo necesario para el reclutamiento del DUB a la cromatina (Figura D5). A pesar de ello, la actividad del módulo permanece intacta en ausencia de H2Bub. De hecho los datos sugieren que aunque el módulo DUB no tenga actividad catalítica, su interacción con las histonas no se ve afectada si H2B se ubiquitina con normalidad. En conjunto, los datos indican que la ubiquitinación de H2B es un factor limitante para el reclutamiento del DUB a la cromatina, independientemente de su capacidad catalítica (Figura D5).

La dinámica de eventos moleculares en la coordinación transcripción-exportación está poco estudiada. Aquí proponemos que la influencia de la ubiquitinación de H2B sobre eventos posteriores no se limita al reclutamiento del DUB a la cromatina. Nuestros datos sugieren que la ubiquitinación de H2B es importante para la exportación de los RNAs. Al mismo tiempo que nosotros abordábamos la relación entre la ubiquitinación y la exportación, un trabajo del grupo de la Dra. Dargemont confirmaba nuestra hipótesis de que la ubiquitinación de la histona H2B afecta a la exportación de los mRNAs a través del reclutamiento de factores de exportación a las mRNPs (Vitaliano-Prunier *et al.*, 2012). En dicho trabajo se muestra como el bloqueo de la ubiquitinación de H2B (mutantes H2B-K123R y *bre1*Δ), de manera similar a lo que mostramos nosotros aquí provoca un defecto de exportación de mRNAs bajo ciertas circunstancias concretas (3h a 39 °C, en su caso). Los datos publicados sugieren que la ubiquitinación de H2B es necesaria para la estabilidad del complejo de corte y poliadenilación, APT (Associated with Pta1 (Nedeá *et al.*, 2003)) en las regiones 3' de los genes y que es esencial para el reclutamiento de factores de exportación como Mex67 o Yra1, y la formación de las mRNPs para su exportación. El mecanismo propuesto por el trabajo de Vitaliano-Prunier y colaboradores, el acoplamiento entre ubiquitinación y exportación se da en el contexto del corte en el extremo 3' de los pre-mRNAs y su poliadenilación. Los datos aportados por esta tesis junto a otros trabajos de nuestro grupo sugieren la existencia de otro mecanismo, quizás previo, de acoplamiento entre ambos procesos a través de SAGA y TREX-2.



tesis han confirmado que en ausencia de *SEM1* y *SAC3*, *Ubp8* no se recluta a dicho promotor. Sin embargo, en el trabajo de la Dra. García-Oliver se muestra como *Sus1* sí se une a dicha región en ausencia de *SEM1*. Estos datos confirman, tal y como habíamos propuesto anteriormente, que *TREX-2* es necesario para que el módulo DUB se una al promotor de *GAL1*. No obstante, los datos abren la posibilidad de que moléculas de *Sus1* libre, como ya se ha sugerido en los capítulos anteriores, puedan unirse a dicha región de manera autónoma e independiente al DUB.

Tanto *Sem1* como *Thp1* son necesarios para la activación del módulo DUB, sin embargo, nuestros resultados muestran que, al menos *in vitro*, ni *Sac3* ni la nucleoporina *Nup60* lo son. Estos datos sugieren que el factor clave en la regulación entre la exportación de RNAs y la transcripción no es la integridad de los complejos, sino que ciertas subunidades poseen una actividad reguladora sobre estos procesos quizás más directa incluso que la propia integridad de los mismos (Figura D5).

Curiosamente, un par de datos sí nos han sugerido la existencia de una relación funcional entre *Sac3* y *Ubp8*. Por un lado, *Ubp8* parece presentar una menor movilidad electroforética en ausencia de *SAC3*. El análisis de las modificaciones post-traduccionales detectables mediante LC-MS/MS de los purificados TAP de *Ubp8* incluye acetilaciones, carbamidometilaciones, deaminaciones, y la conversión de *Gln* a *pyro-Glu* en diferentes residuos. No descartamos por tanto, que alguna de estas modificaciones u otras sean responsables de ese cambio en la movilidad de *Ubp8* en el mutante *sac3Δ* y que pueda afectar a las funciones o características de la proteína. De hecho, existen precedentes en la regulación de SAGA a través de modificaciones postraduccionales de sus componentes (Saleh *et al.*, 1998). En este sentido, la ubiquitin ligasa *Tom1* interacciona directamente con *Ada3* y es la encargada de ubiquitinar

a Spt7. Dicha ubiquitinación parece ser importante para la interacción de SAGA con TBP y por tanto, para la activación de la transcripción (Saleh *et al.*, 1998). De este modo, cabe la posibilidad de que la actividad de Ubp8 pueda estar regulada por modificaciones postraduccionales, que a su vez pueden estar influenciadas por Sac3. La alteración de la actividad de Ubp8 por modificaciones postraduccionales provocaría cambios estructurales en la cromatina, compactándola y dificultando la correcta inmunoprecipitación de la histona H2B como ocurre en ausencia de SAC3 (Figura D5).

En conjunto estos datos aportan nuevas evidencias de las relaciones funcionales entre ubiquitinación de H2B, desubicultinación a través del DUB y exportación de RNAs a través de TREX-2. Futuras líneas de investigación irán encaminadas a acabar de entender las funciones concretas que tienen las proteínas implicadas en estos procesos para ser capaces de regular tan finamente dichos eventos.



**CAPÍTULO 4:**  
**Nuevas interacciones funcionales de**  
**Sus1 con Sfp1 y prolil isomerasas**



## INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

### LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN TOR

En la década de los 80 la rapamicina era una droga conocida por inhibir el sistema inmune en organismos vertebrados. El interés por el estudio de los mecanismos de acción de esta droga se basaba en la posibilidad de identificar nuevas vías de señalización para la proliferación y control del ciclo celular. Al igual que el ayuno, la rapamicina provoca en las células una dramática bajada en la síntesis de proteínas, inducción de autofagia y salida del ciclo celular y entrada en quiescencia (G<sub>0</sub>, estado metabólicamente activo pero sin división celular). Sin embargo, por aquel entonces, lo único conocido en cuanto a su modo de acción era que podía estar inhibiendo a una peptidil-prolil isomerasa citosólica llamada FKBP12 (Schreiber, 1991). El homólogo de FKBP12 en levadura es Fpr1. Fpr1 es una peptidil-prolil isomerasa cuya disrupción provoca la resistencia de la célula a la rapamicina (Heitman *et al.*, 1991a; Heitman *et al.*, 1991b). No obstante, Fpr1 es sólo un cofactor o receptor necesario para la acción de la droga pero no el factor principal para su efecto tóxico.

Posteriormente, a través de un cribado genético se identificaron dos nuevos genes, TOR1 y TOR2 (Target Of Rapamycin), cuya delección provocaba la resistencia a la rapamicina (Cafferkey *et al.*, 1993; Helliwell *et al.*, 1994; Kunz *et al.*, 1993). Estos datos sugirieron que los genes TOR1 y TOR2 eran las dianas del complejo FKBP-rapamicina, siendo inhibidos por éste (Kunz *et al.*, 1993). El hecho de que *S. cerevisiae* posea dos genes TOR es inusual ya que la mayoría de eucariotas posee sólo uno. Posteriormente se descubrió que TOR1 y TOR2 aunque estructuralmente son similares, funcionalmente no lo son. Ambas proteínas se incluyeron en la

familia de quinasas PIKK (Keith & Schreiber, 1995). TOR2 tiene dos funciones esenciales, una función redundante con TOR1 y otra única para TOR2, lo que permite a la célula controlar el crecimiento celular de dos maneras diferentes (Barbet *et al.*, 1996; Helliwell *et al.*, 1998; Loewith, 2011). Uno de los principales logros en el estudio de estas funciones, fue la identificación de los dos complejos multiproteicos TORC1 (contiene TOR1 o TOR2 y es sensible a la rapamicina) y TORC2 (sólo contiene a TOR2 y es insensible a la rapamicina), y que proveyó una base molecular para la señalización mediada por TOR (Loewith *et al.*, 2002; Reinke *et al.*, 2004; Wullschleger *et al.*, 2005).

Todos estos datos permitieron demostrar que TOR controla el crecimiento celular en respuesta a nutrientes tanto en levaduras como en eucariotas superiores. De manera que la conjunción de las funciones de TOR1 y TOR2 permite un control espacio-temporal del crecimiento celular (Loewith & Hall, 2004).

TORC1 es un complejo de unos 2 MDa compuesto por TOR1 o TOR2, y otras 3 subunidades (Loewith & Hall, 2011; Reinke *et al.*, 2004; Wedaman *et al.*, 2003). TORC1 se concentra en la membrana vacuolar de manera constitutiva (Sturgill *et al.*, 2008). Sin embargo, también se ha descrito la unión de TOR1 con el locus rDNA que regula la transcripción del rRNA que codifica para la subunidad ribosomal 35S, pudiendo existir por tanto una fracción de TORC1 activo en otros compartimentos celulares (Li *et al.*, 2006).

### **REGULACIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN VÍA TORC1**

TORC1 en respuesta a los niveles celulares de nitrógeno y carbono, puede promover el secuestro de factores de transcripción en el citoplasma (Beck & Hall, 1999), y esto se ve reflejado en el perfil transcriptómico de esas células (Gasch & Werner-Washburne, 2002;

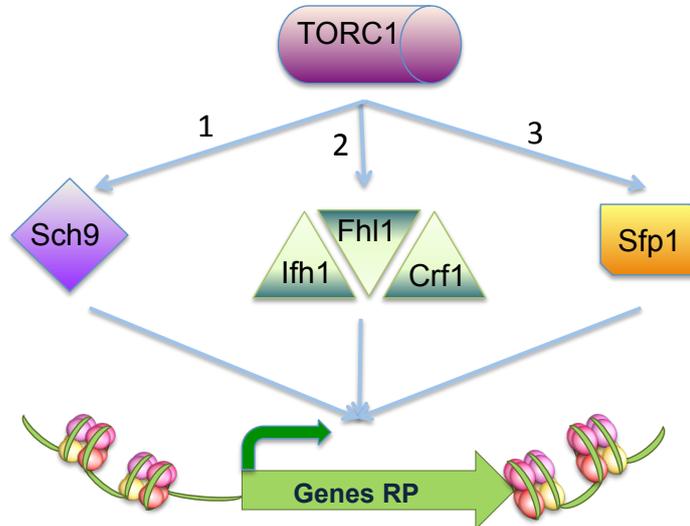
Hardwick *et al.*, 1999). El sustrato mejor conocido de TORC1 es Sch9 que es rápidamente desfosforilado en presencia de rapamicina o en ayuno de carbono, nitrógeno, fosfatos o amino ácidos (Urban *et al.*, 2007). TORC1 y por tanto Sch9, también están regulados por condiciones de estrés como alta concentración de sales, estrés oxidativo, alta temperatura o cafeína (Kuranda *et al.*, 2006; Urban *et al.*, 2007).

A pesar de que TORC1 responde principalmente a señales extracelulares, cada vez existen más evidencias de que también responde a condiciones intracelulares. Un ejemplo de ello es la biogénesis de los ribosomas. TORC1 regula la síntesis de ribosomas mediante dos dianas: Sch9 y Sfp1. La reducción en la síntesis ribosomal por mutaciones en *SCH9* o *SFP1* provoca un aumento importante de la actividad de TORC1 (Lempiainen *et al.*, 2009).

Cuando las condiciones de crecimiento son adecuadas, TORC1 está activo promoviendo la acumulación de masa celular, y lo hace regulando diferentes procesos como la biogénesis de ribosomas, la síntesis de proteínas, la regulación del ciclo y el tamaño celular, la respuesta a condiciones de estrés, la autofagia, la integridad de la pared celular, así como la regulación de la vida media celular y el envejecimiento celular. En condiciones óptimas, las células se dividirán y crecerán de forma eficiente y rápida, para lo cual son necesarias altas tasas de síntesis proteica y por tanto una alta tasa de reposición de ribosomas. Cada ribosoma contiene 78 proteínas diferentes, codificadas por un total de 137 genes (muchas RPs están codificadas por dos genes dando proteínas casi idénticas) llamados genes RP y que son transcritos por la RNAP II (Warner, 1999). Además, en los ribosomas también hay 4 moléculas de rRNA, transcritas por la RNAP I y III. Asimismo, un alto número de proteínas y pequeños RNAs, conocidos como factores de la

biogénesis de ribosomas (RiBi), son necesarios para el correcto procesamiento, plegamiento y transporte de las partículas pre-ribosomales para su maduración final en el citoplasma en forma de partículas 40S y 60S (Fromont-Racine *et al.*, 2003). Para poder regular eficientemente la producción de todas estas moléculas la célula ha desarrollado complejos sistemas de control.

Dentro de toda esta compleja red de regulación, la vía de señalización de TORC1 juega un papel importante controlando la transcripción. Por un lado regula la acumulación de transcritos de la RNAP I (Reiter *et al.*, 2011). Por otro lado, a través de Sch9, TORC1 regula la actividad de la RNAP III. Y por último, TORC1 coordina la expresión de los genes RP transcritos por la RNAP II (Lempiainen & Shore, 2009). La vía central de la regulación de la expresión de los genes RP y RiBi está mediada por las proteínas Fhl1, Ifh1 y Crf1. Fhl1 y Rap1 están unidos constitutivamente a los promotores de los genes RP. En función del estado de activación de TORC1, Ifh1 y Crf1 son fosforilados y compiten por unirse a Fhl1 para activar o inhibir, respectivamente, la transcripción de los genes RP (Martin *et al.*, 2004). Recientemente, se ha descrito que la actividad de Ifh1 está regulada a través de la acetilación por Gcn5 (Cai *et al.*, 2013; Downey *et al.*, 2013a). De este modo, la acetilación de Ifh1 a través de SAGA limita y regula la potencia de la activación de la transcripción de los genes RP a través de Ifh1. No obstante, la regulación de los genes RP también se controla por otros mecanismos adicionales. Una de esas vías alternativas la lleva a cabo Sfp1 (Figura I12).



**Figura I12. Vías de control de la expresión de los genes RP a través de TORC1.** (1) Sch9 activado a través de TORC1 fosforila e inhibe la acción de represores transcripcionales. (2) Fhl1 se une constitutivamente a los promotores RP. Cuando TORC1 es activado, Ifh1 se une a Fhl1 activando la transcripción a través del reclutamiento de otros complejos como NuA4. Cuando TORC1 está inactivo, Crf1 inhibe la unión Ifh1-Fhl1. (3) TORC1 fosforila a Sfp1 que se activa y se une a los promotores RP para su activación transcripcional.

### EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN SFP1

Sfp1 es una proteína que se describió hace más de dos décadas como una proteína de unión a DNA con dedos de zinc y cuya disrupción provoca crecimiento celular lento (Blumberg & Silver, 1991). Los mutantes *sfp1Δ* se caracterizan por una entrada prematura en mitosis, mientras que la sobreexpresión de Sfp1 provoca retrasos en G2, de forma que Sfp1 se caracterizó como un represor de la transición G2/M y se propuso que lo hacía regulando la expresión de los genes implicados en dicha transición (Xu & Norris, 1998). Esto es la causa del fenotipo *wee* característico de las células mutantes *sfp1Δ* (tamaño más pequeño del normal). Ya en el año 2003 un trabajo del

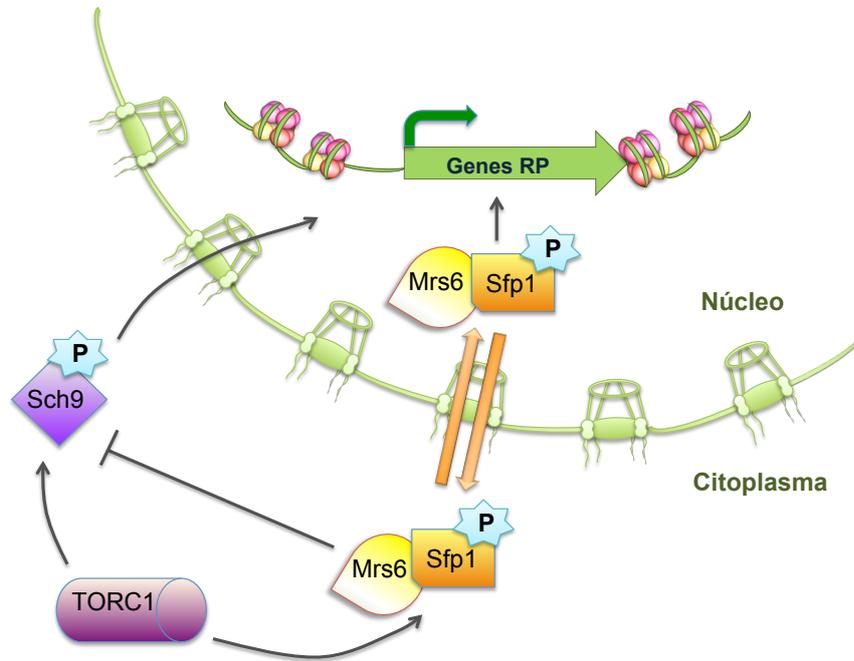
Dr. Vershon (Fingerman *et al.*, 2003) demostró la relación de Sfp1 con la biogénesis de los ribosomas y por tanto su papel en la correcta traducción de proteínas debido a los defectos en el procesamiento de la subunidad 60S en los mutantes *sfp1Δ*. Pero no fue hasta un año después cuando se demostró la relación directa entre Sfp1 y la regulación de la expresión génica de los genes RP en respuesta a las condiciones nutritivas, de estrés o la presencia de rapamicina a través de la vía de señalización TOR (Marion *et al.*, 2004).

El complejo TORC1 se une directamente a Sfp1, que es fosforilado y activado para unirse al promotor de algunos genes RP. Aunque la interacción física directa con los genes RiBi no se ha descrito, la sobreexpresión de Sfp1 provoca un aumento en la transcripción de la mayoría de genes RiBi, sugiriendo que Sfp1 puede estar también regulándolos. De hecho se ha propuesto que Sfp1 podría estar regulando preferentemente a más de 200 genes RiBi, además de estar implicado directa o indirectamente en la regulación de los genes RP (Jorgensen *et al.*, 2002; Jorgensen *et al.*, 2004).

Tal y como describen el Dr. Shore y colaboradores (Lempiainen *et al.*, 2009), en presencia de rapamicina y de cafeína la interacción física entre Sfp1 y TORC1 se reduce y por tanto, también disminuyen los niveles de fosforilación de Sfp1. Tanto Sfp1 como Sch9 regulan positivamente la expresión de los genes RiBi y RP a través de dos vías diferentes pero paralelas y conectadas, de forma que a mayor expresión de Sfp1 se reduce la actividad de Sch9 (Fingerman *et al.*, 2003; Jorgensen *et al.*, 2004; Marion *et al.*, 2004; Urban *et al.*, 2007).

La localización de Sfp1 depende en gran medida de las condiciones nutritivas en las que se encuentre la célula. Así pues, cuando el medio contiene glucosa como fuente de carbono, Sfp1 se localizaría mayoritariamente en el núcleo unido a promotores de genes RP, pero bajo condiciones restrictivas en nutrientes o

exposición a diferentes estreses o drogas como la rapamicina, Sfp1 cambia su localización en cuestión de minutos al citoplasma (Jorgensen *et al.*, 2004; Marion *et al.*, 2004). De hecho, Sfp1 también interacciona con Mrs6. Mrs6 es una carabina molecular esencial para la organización de membrana del sistema intracelular de vesículas (Lempiainen *et al.*, 2009). Prácticamente todas las moléculas de Sfp1 se unen a Mrs6 y esto promueve tanto la fosforilación de Sfp1 como su localización nuclear cuando es activado como factor de transcripción de los genes RP. Así pues, Mrs6 es necesaria y suficiente para retener a Sfp1 en el citoplasma cuando está inactivo, y además esta función de anclaje sólo afecta a Sfp1 y no a otras proteínas implicadas en la ruta TOR. De este modo, Mrs6 es sensible a las condiciones de nutrientes para su interacción con Sfp1 (Figura I13).



**Figura I13. Regulación de actividad de Sfp1 como factor de transcripción.** Sfp1 se localiza en el citoplasma unido a Mrs6 cuando se encuentra inactivo. Cuando TORC1 se activa, fosforila a Sfp1 que junto a Mrs6 se transloca al núcleo donde activará la expresión de genes RP. A su vez, la fosforilación y activación de Sfp1, inactiva la ruta de activación paralela mediada por Sch9.

Recientemente un trabajo del laboratorio del Dr. Chávez centrado en el estudio de las funciones del factor TFIIS en la transcripción en situaciones de estrés ha descrito a Sfp1 como un factor esencial para la supervivencia celular en condiciones de estrés (Gomez-Herreros *et al.*, 2012). TFIIS es un factor implicado en el procesamiento del RNA y tiene funciones en la iniciación y elongación transcripcional (Malagon *et al.*, 2004; Mason & Struhl, 2005; Prather *et al.*, 2005). En este trabajo se propone que TFIIS es necesario especialmente para la transcripción de los genes RP en condiciones de falta de nucleótidos (NTPs), de manera que TFIIS

parece reclutarse preferentemente junto a las RNAP II que están pausadas y ayuda a la reanudación de la actividad de la polimerasa en los genes RP cuando los NTPs son escasos. Debido a ello, los mutantes deficientes en TFIIS (*dst1Δ*) son muy sensibles a las drogas que impiden la síntesis *de novo* de NTPs como el 6-azauracilo (6AU). En ausencia de Sfp1, el tratamiento con 6AU no afecta a la transcripción de los genes RP. De modo que se ha propuesto que Sfp1 estaría actuando aguas arriba de TFIIS y con una función antagónica al mismo. Además, el fenotipo de la delección de *SFP1* en presencia de 6AU parece tener el mismo efecto en genes RP como no-RP, lo que deja abierta la posibilidad de que Sfp1 pudiese tener un papel más general en la expresión de los genes transcritos por la RNAP II (Gomez-Herreros *et al.*, 2012).

Tanto TORC1 como Sch9 y Mrs6 están altamente conservados en organismos pluricelulares. Por el contrario no se conoce ningún ortólogo de Sfp1 en humanos (Urban *et al.*, 2007; Wullschleger *et al.*, 2006). Sin embargo, Sfp1 comparte con el proto-oncogen c-Myc muchas características, como la relación entre c-Myc y la vía de señalización mTOR y PKA (de Nigris *et al.*, 2006) y su relación con la expresión de genes ribosomales, así como con el tamaño celular (Kim *et al.*, 2000). De manera que se ha sugerido que c-Myc podría ser el análogo en mamíferos de Sfp1 (Cook & Tyers, 2007).



## RESULTADOS

### 4.1. Análisis de las interacciones físicas de Sfp1.

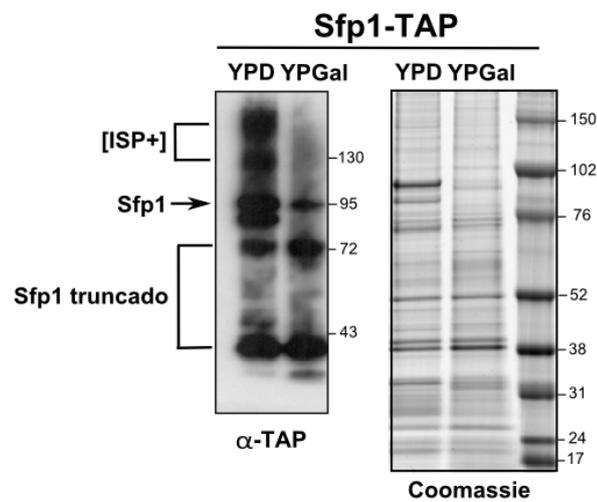
#### 4.1.1. Sfp1 y Sus1 interactúan físicamente.

Como parte del estudio sobre los mecanismos de regulación de la RNAP II, establecimos una colaboración científica con el laboratorio del Dr. Sebastián Chávez del Instituto de Biomedicina de Sevilla. Trabajos anteriores en nuestro grupo en los que se realizaron purificaciones TAP de la proteína Sfp1 revelaron interacciones físicas con factores implicados en transcripción y metabolismo del RNA así como factores de traducción. Entre todas las proteínas con las que Sfp1 interactúa físicamente, se identificó a Sus1. Dado nuestro interés en el estudio de Sus1 y sus funciones en el metabolismo del RNA, decidimos profundizar en las relaciones funcionales entre Sfp1 y Sus1.

#### 4.1.2. Las interacciones físicas de Sfp1 dependen de la fuente de carbono.

Los primeros estudios sobre Sfp1 mostraron que sus funciones dependen de las condiciones nutricionales celulares, de hecho su delección provoca características específicas en función de la fuente de carbono, mostrando fenotipos más exacerbados bajo crecimiento en glucosa (Cipollina *et al.*, 2005). En este sentido, Sfp1 es necesario para la activación transcripcional de los genes RP cuando hay bajas concentraciones de glucosa, pero no cuando ésta se encuentra en exceso (Cipollina *et al.*, 2008a; Cipollina *et al.*, 2008b). Con el objetivo de comprobar la interacción física entre Sfp1 y Sus1, así

como analizar las interacciones físicas de Sfp1 en diferentes fuentes de carbono, se repitió la purificación TAP de Sfp1. Para ello se realizaron las purificaciones en dos condiciones diferentes: YPD e YPGal, con glucosa (condiciones casi exclusivamente fermentativas) y galactosa (condiciones respiro-fermentativas) como fuente de carbono, respectivamente (Conrad *et al.*, 2014) (Figura 4.1).



**Figura 4.1.** Análisis del perfil de interacciones de Sfp1 en YPD e YPGal. Purificaciones TAP de Sfp1 en una cepa WT crecida en YPD o en YPGal a 30 °C hasta una  $OD_{600}$  de 1. Los niveles de Sfp1 purificado se analizaron mediante WB con anticuerpo  $\alpha$ -TAP (panel izquierdo). El perfil de proteínas purificadas se analizó mediante gel de gradiente de poliacrilamida (4-12%) y las proteínas fueron teñidas con Coomassie coloidal.

Una observación recurrente en los experimentos realizados para purificar Sfp1 es la identificación de formas truncadas/ degradadas de Sfp1. Por este motivo, a pesar de que Sfp1 tiene un tamaño de unos 75 KDa, el análisis de los niveles de proteína purificada mediante WB reveló que además de la banda esperada, encontramos reiteradamente en todas nuestras purificaciones una

banda alrededor de unos 40 KDa que previsiblemente sea un producto de degradación de la proteína (Figura 4.1). A pesar de numerosos intentos de optimizar las purificaciones con el fin de impedir la degradación de la proteína, no conseguimos evitarla. Además de las bandas correspondientes a Sfp1 y su versión truncada, observamos bandas de mayor tamaño al esperado. Existen evidencias de la existencia de formas priónicas de Sfp1 ([ISP+]) que explicarían este resultado (Rogoza *et al.*, 2010; Rogoza *et al.*, 2009).

Los priones son isoformas proteicas con capacidad infecciosa de autopropagarse y formar agregados proteicos. La lista de priones identificados en levaduras es cada vez más extensa (Liebman & Chernoff, 2012). Dado el tamaño superior al esperado de las bandas observadas especulamos que éstas puedan corresponder a formas priónicas agregadas de Sfp1 [ISP+].

El perfil de bandas de proteínas co-purificadas observado mediante tinción Coomassie reveló que, aunque la mayor parte de las bandas purificadas son comunes en ambos experimentos, existen bandas diferenciales (Figura 4.1). Esto podría indicar diferentes funciones celulares de Sfp1 en función del medio de crecimiento.

La identificación mediante espectrometría de masas de los eluidos de ambas purificaciones confirmó la existencia de diferencias importantes entre ambas (Tabla 4.1). La búsqueda de las ontologías génicas de las proteínas identificadas mostró que en glucosa, Sfp1 interacciona principalmente con proteínas implicadas en la regulación de los procesos de ensamblaje del complejo de pre-iniciación de la transcripción de la RNAP II. Sin embargo, en galactosa, Sfp1 interacciona con proteínas relacionadas con el metabolismo de azúcares así como otros procesos metabólicos generales (Tabla 4.1).

| Sfp1-TAP   |  |   |
|--|--|---|
| Medio  | YPD  | YPGal   |
| <b>Principales proteínas identificadas</b>             | TDH2, PMA1, KAR2, TIF4631, IMD3, MLP2, NOP58, YRA1, RPT6, SUI3, RAD50, PS38, INO80, SRV2, MRH1, MRC1, TPD3, YR087C, ESF2, ECM32, POB3, MIP1, PBP1, THI6, PRP22, ICS2, YNL134C, TIF34, RPN4, PFK1, UGA2, CWC22, TIF32, YIR007W, CMK1, TAF5, NET1, RGA1, PBP4, LSG1, MOT1, NFT1, YET1, SNU13 | ATP1, ATP2, HXK1, PGI1, CPR1, FPR1, TPI1, YHB1, CIT1, ZEO1, GND1, PET9, BMH2, ASC1, ADK1, DYN1, HXK2, GCY1, MMF1, ALD6, TMA19, PDA1, PDA2, TRM3, MLP1, STM1, TRM3, SRS2, SOD1, PDB1, SOG2, SSK2, HOS4, GLK1, NUM1, TRP3, NUP116, NAF1, DED81, FKS3, RDI1, LOS1, SAC6, ATG4, TAL1, NUM1, YIL027W, PIL1, HEH2, COF1, KEM1 |
| <b>Ontología génica de las proteínas identificadas</b> | > Regulación del inicio de transcripción en promotores de la RNAP II   | > Importación de glucosa  |
|  |  | > Actividad hexoquinasa   |
|  |  | > Regeneración de NADPH   |
|  | > Regulación del ensamblaje del complejo de preiniciación de la RNAP II  | > Glicólisis  |
|  |  | > Procesos de metabolismo de NADP   |
|  |  | > Procesos de catabolismo de glucosa  |
| > Nucleoído  |  |   |
|  | > Nucleoído mitocondrial   |   |
|  | > Procesos catabólicos de monosacáridos  |   |
|  | > Procesos catabólicos de hexosas  |   |

Tabla 4.1. Análisis de las proteínas identificadas como interactores de Sfp1. Purificaciones TAP de Sfp1 en una cepa WT crecida en YPD o en YPGal a 30 °C hasta una OD<sub>600</sub> de 1. Identificación MudPIT de los péptidos obtenidos en las purificaciones. En la tabla se resumen las principales proteínas identificadas. También se muestran las ontologías génicas a las que pertenecen las proteínas identificadas. El análisis de las ontologías se llevó a cabo a través del software Funcassociate 2.0 (Berriz 2003).

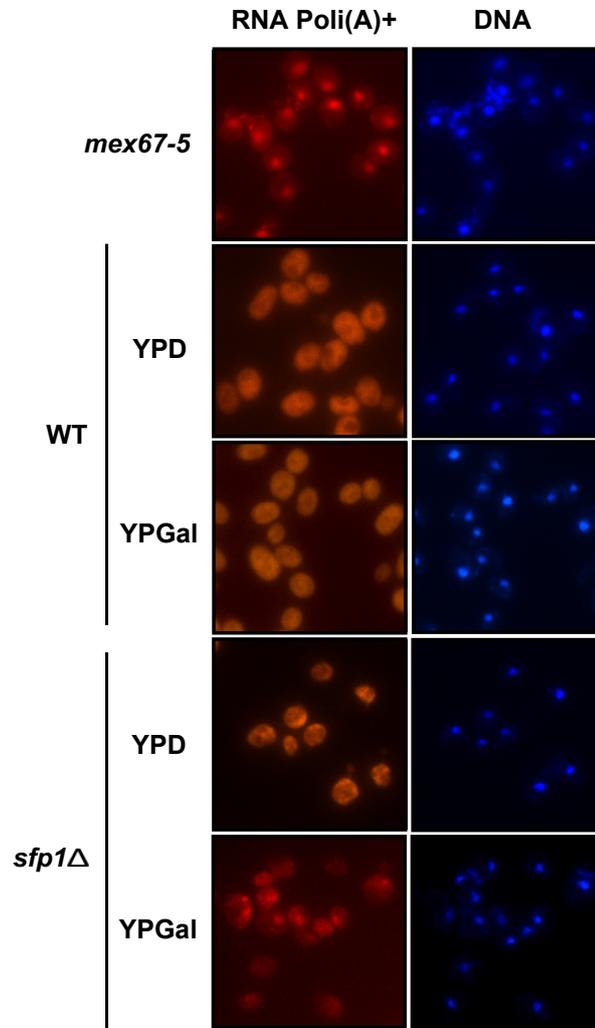
A pesar del alto número de proteínas identificadas, no pudimos confirmar la interacción inicial con Sus1 mediante este análisis. No podemos descartar que esto se deba al alto grado de degradación en nuestros purificados, o bien al hecho de que la interacción Sfp1-Sus1 sea transitoria y lábil. Sin embargo, en nuestro grupo se identificó a Sfp1 como interactor de Sus1 en una purificación previa (datos no mostrados).

### 3.2. Sfp1 participa en la exportación de los mRNAs y en su acumulación en el citoplasma.

Como hemos visto, Sfp1 y Sus1 son capaces de interactuar físicamente bajo ciertas circunstancias. Dado el papel fundamental de Sus1 en la exportación de los mRNAs como componente de TREX-2, decidimos analizar si Sfp1 podría estar implicado en dicho proceso. Para ello se llevaron a cabo hibridaciones *in situ* con el fin de determinar la localización de RNAs poli(A)+ utilizando una sonda fluorescente de oligo(dT)<sub>18</sub>.

El análisis se hizo en el mutante *sfp1*Δ y se utilizaron como controles negativo y positivo para el defecto de exportación las cepas WT y *mex67-5*, respectivamente. Dadas las diferencias que parecen existir entre las funciones de Sfp1 en glucosa y galactosa, decidimos analizar el fenotipo de exportación en ambas condiciones. Tras crecer las células durante toda la noche en YPD, parte del cultivo se creció durante 2 horas en YPGal. Los resultados obtenidos muestran como la ausencia de *SFP1* no afecta a la exportación de los RNAs en glucosa. Sin embargo, sí existe defecto de exportación en el mutante *sfp1*Δ tras crecer en galactosa. Curiosamente, en el mutante *sfp1*Δ en todas las condiciones analizadas se observan acumulaciones puntuales de mRNAs en el citoplasma (Figura 4.2).

En resumen, Sfp1 parece ser importante para la exportación de RNAs bajo crecimiento en galactosa y además su ausencia provoca la acumulación de parte de los RNAs en gránulos citoplasmáticos.



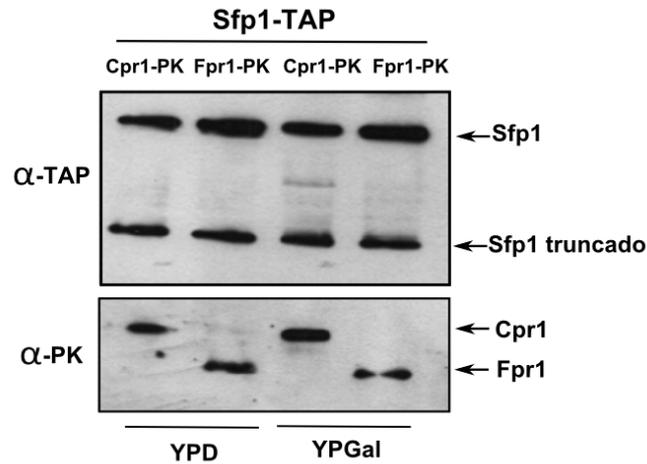
**Figura 4.2.** Sfp1 participa en la exportación de los mRNAs y en la formación de gránulos de mRNA citoplasmáticos. Análisis de la exportación de los RNAs poli(A)+ en las cepas WT y *sfp1*Δ crecidas en YPD o en YPGal a 30 °C. El mutante *mex67-5* fue tratado durante 20 minutos a 37 °C para exacerbar sus fenotipos. La localización de los RNAs poli(A)+ se comprobó mediante hibridación *in situ* utilizando una sonda Oligo(dT) marcada con Cy3. Los núcleos fueron detectados mediante el marcaje del DNA con DAPI. Las imágenes mostradas son una muestra representativa de las fotografías obtenidas en el microscopio de fluorescencia.

### 3.4. Sfp1 interacciona con dos peptidil-prolil isomerasas.

De todas las proteínas identificadas como interactores de Sfp1, dos de las que mostraron una mayor abundancia relativa en galactosa fueron Cpr1 y Fpr1.

Como hemos comentado anteriormente Cpr1 y Fpr1 son dos peptidil-prolil isomerasas capaces de catalizar la isomerización cis-trans de residuos de prolina en las proteínas. Dadas las interesantes funciones relacionadas con la expresión génica asociadas a estas enzimas (Cpr1 como componente del complejo desacetilasa Set3C (ver introducción general, página 37) y Fpr1 como factor clave en la señalización por rapamicina (ver introducción de capítulo 4, página 233), nos propusimos profundizar en su relación con Sfp1.

Con el objetivo de confirmar la interacción física entre Sfp1 y las prolil isomerasas construimos las cepas Sfp1-TAP Cpr1-PK y Sfp1-TAP Fpr1-PK. A partir de purificados TAP de Sfp1 comprobamos mediante WB la interacción física tanto en glucosa como en galactosa. Como se observa en la Figura 4.3, Cpr1 y Fpr1 copurifican con Sfp1 en ambas condiciones.



**Figura 4.3.** Sfp1 interacciona físicamente con las peptidil-prolil isomerasas Cpr1 y Fpr1 en YPD e YPGal. Análisis de la interacción física de Sfp1 con Cpr1 y Fpr1. Purificaciones TAP de Sfp1 en cepas con Cpr1 o Fpr1 etiquetados con PK y crecidas en YPD o en YPGal a 30 °C. Los niveles de proteína cebo purificada se analizaron por WB con anticuerpo  $\alpha$ -TAP (panel superior). La presencia de Cpr1 o Fpr1 en dichas purificaciones se analizó por WB con anticuerpo  $\alpha$ -PK.

### 3.5. Cpr1 y Fpr1 interaccionan con SAGA y TREX-2.

Considerando las funciones que las peptidil-prolil isomerasas pueden tener en la regulación de la expresión génica, decidimos hacer un análisis más en profundidad de las interacciones físicas que establecen. Para ello analizamos mediante espectrometría de masas purificaciones TAP de Cpr1 y Fpr1 realizadas tanto en glucosa como en galactosa (Tabla 4.2).

| Proteínas identificadas más destacadas |  |   |                                  |                                      |       |
|--|--|---|----------------------------------|--------------------------------------|-------|
|  |  | Cpr1-TAP  |                                  | Fpr1-TAP                             |       |
|  |  | YPD   | YPGal                            | YPD                                  | YPGal |
| <b>Isomerasa</b>                       | Fpr1   | Fpr1  | Cpr1                             | Cpr1                                 |       |
| <b>SAGA</b>                            | Sus1<br>Taf12<br>Taf9<br>Sgf73<br>Spt20<br>Ada1<br>Ada2<br>Taf6<br>Spt7<br>Spt3<br>Taf10<br>Ada3<br>Gcn5<br>Ubp8<br>Tra1<br>Taf5 |   |                                  |                                      |       |
| <b>TREX-2</b>                          | Sac3   |   |                                  |                                      |       |
| <b>Set3C</b>                           | Set3<br>Hos4<br>Snt1   | Snt1<br>Hos4<br>Set3<br>Sif2<br>Hos2              |                                  |                                      |       |
| <b>Otros</b>                           | Yra1<br>H4   | H2B<br>H4<br>Yra1<br>Abf2<br>Ded1<br>Tef1<br>Pab1 | H2B<br>H2A<br>H4<br>Yra1<br>Fap1 | Fap1<br>Pab1<br>Sro9<br>Ded1<br>Yra1 |       |

Tabla 4.2. Principales proteínas identificadas en purificaciones TAP de Cpr1 y Fpr1. Identificación mediante espectrometría de masas (MudPIT) de los péptidos obtenidos en las purificaciones TAP mencionadas. Los datos obtenidos se validaron con la información almacenada en las bases de datos de secuencias conocidas mediante el motor de búsqueda MASCOT.

Estos experimentos revelaron que ambas proteínas interactúan entre ellas. Del mismo modo, como previamente se había descrito Cpr1 interactúa con las subunidades del complejo Set3C. Sin embargo, lo más relevante de los datos obtenidos fue la identificación en la purificación de Cpr1-TAP en glucosa de la

mayoría de subunidades del complejo SAGA y también de la proteína estructural de TREX-2, Sac3 (Tabla 4.2).

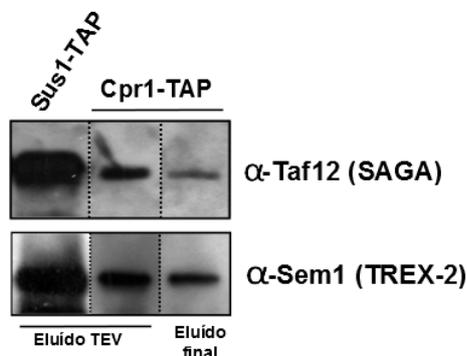
Nuevamente, pese a que en este análisis se identificaron tanto proteínas cuya interacción ya ha sido descrita (Cpr1 y Set3C), como nuevas interacciones (Cpr1 con SAGA, TREX-2,...), no se identificaron péptidos de Sfp1. Esto se podría deber a que la interacción de Sfp1 con las protil isomerasas sea transitoria y dependiente de las condiciones de crecimiento.

El interés del laboratorio en las funciones de SAGA y TREX-2 nos hizo centrarnos en esta nueva interacción física con Cpr1 y decidimos corroborar estos datos. Para ello se realizaron nuevas purificaciones TAP de Cpr1 y Fpr1 en YPD, y para determinar si algunas de las interacciones detectadas dependían de Sfp1, incluimos las cepas mutantes *sfp1*Δ. Los resultados confirmaron la interacción física de Cpr1 con componentes de SAGA y TREX-2. Aunque no se identificaron algunas subunidades de SAGA en el mutante *sfp1*Δ, no podemos concluir que existan diferencias significativas entre las purificaciones de Cpr1 de manera dependiente de Sfp1. En esta ocasión también se identificaron componentes de SAGA y TREX-2 en la purificación Fpr1-TAP (Tabla 4.3). Por lo tanto, nuestros datos ponen de manifiesto que tanto Cpr1 como Fpr1 copurifican subunidades de SAGA y TREX-2.

|                  | Proteínas identificadas |              |          |              |
|------------------|-------------------------|--------------|----------|--------------|
|                  | Cpr1-TAP                |              | Fpr1-TAP |              |
|                  | WT                      | <i>sfp1Δ</i> | WT       | <i>sfp1Δ</i> |
| <b>Isomerasa</b> | Fpr1                    | Fpr1         | Cpr1     | Cpr1         |
| <b>SAGA</b>      | Ada1                    | Ada3         | Ada3     | Ada3         |
|                  | Ada3                    | Spt20        | Gcn5     | Ada1         |
|                  | Gcn5                    | Spt3         | Sus1     | Spt3         |
|                  | Sgf29                   | Sgf73        | Taf10    | Sgf73        |
|                  | Sgf73                   | Spt7         | Taf5     | Spt3         |
|                  | Spt7                    | Sus1         | Taf6     | Sus1         |
|                  | Sus1                    | Taf10        | Tra1     | Taf10        |
|                  | Taf10                   | Taf12        |          | Taf5         |
|                  | Taf12                   | Taf5         |          | Taf9         |
|                  | Taf5                    | Taf6         |          | Taf6         |
|                  | Taf6                    | Tra1         |          |              |
|                  | Taf9                    |              |          |              |
|                  | Tra1                    |              |          |              |
| <b>TREX-2</b>    | Cdc31<br>Sem1           | Cdc31        | Cdc31    | Cdc31        |
| <b>Set3C</b>     | Hos2                    | Hos2         |          |              |
|                  | Hos4                    | Hos4         |          |              |
|                  | Set3                    | Set4         |          |              |
|                  | Sif2                    | Sif3         |          |              |
|                  | Snt1                    | Snt2         |          |              |

Tabla 4.3. Principales proteínas identificadas en purificaciones TAP de Cpr1 y Fpr1 en cepas WT y *sfp1Δ*. Identificación mediante espectrometría de masas (MudPIT) de los péptidos obtenidos en las purificaciones TAP mencionadas. Los datos obtenidos se validaron con la información almacenada en las bases de datos de secuencias conocidas mediante el motor de búsqueda MASCOT.

Con el fin de validar los datos obtenidos por espectrometría de masas, analizamos mediante WB la presencia de componentes de SAGA y TREX-2 en purificaciones de Cpr1-TAP. Tal y como se observa en la Figura 4.4, utilizando anticuerpos específicos contra Taf12 y Sem1 (componentes de SAGA y TREX-2, respectivamente) validamos la presencia de ambas proteínas en la purificación de Cpr1.



**Figura 4.4.** Cpr1 interacta con subunidades de SAGA y TREX-2. Análisis de las interacciones físicas entre Cpr1 y dos subunidades de SAGA (Taf12) y TREX-2 (Sem1). Se llevaron a cabo purificaciones TAP de Cpr1 y de Sus1 (control positivo). Las interacciones físicas entre Cpr1 y Taf12 y Sem1 se analizaron mediante WB a partir del eluido TEV y eluido final de la purificación. Se utilizaron anticuerpos específicos  $\alpha$ -Taf12 y  $\alpha$ -Sem1.

Dada la interacción física entre las prolil isomerasas Cpr1 y Fpr1 con SAGA y TREX-2, revisamos las proteínas que hemos identificado mediante espectrometría de masas a partir de purificaciones de componentes de SAGA y TREX-2 en el laboratorio, con el objetivo de ver si se identificaron peptidil-prolil isomerasas en otras ocasiones. La Tabla 4.4 muestra la identificación tanto de Cpr1, Fpr1 como otras peptidil-prolil isomerasas en purificaciones de componentes de SAGA como Sus1, Ada2, Spt7 o Ubp8, así como de la subunidad de TREX-2, Thp1. Señalar que ni Cpr1 ni Fpr1 han sido identificadas como contaminantes comunes en purificaciones TAP por nosotros ni por otros autores (Gavin *et al.*, 2002).

En resumen, los experimentos revelaron nuevas interacciones físicas entre Cpr1 y Fpr1 con componentes de los complejos SAGA y TREX-2.

| Purificación TAP                               | Prolil isomerasas detectadas |
|--|------------------------------|
| Sus1-TAP <i>rad6</i> Δ                         | Cpr1                         |
| Sus1-TAP <i>sem1</i> Δ                         | Cpr1, Fpr1                   |
| Sus1-TAP <i>sac3</i> Δ                         | Cpr1, Fpr1                   |
| <i>spt7-1180</i> -TAP                          | Cpr1, Fpr1, Cpr3             |
| Ada2-TAP                                       | Fpr1, Cpr1, Fpr3             |
| Sus1-TAP <i>ubp8-C146S</i> y <i>ubp8-H419A</i> | Cpr1, Cpr5                   |
| Ubp8-TAP                                       | Cpr1, Fpr1, Cpr3             |
| Thp1-TAP                                       | Cpr1                         |

Tabla 4.4. Lista de purificaciones en las que se han identificado peptidil-prolil isomerasas. En la tabla se muestran las cepas a partir de las cuales se realizaron las purificaciones TAP junto a los nombres de las peptidil-prolil isomerasas identificadas mediante espectrometría de masas.

### 3.6. La localización de Sfp1 depende de Cpr1 y viceversa.

La localización subcelular de Sfp1 varía en función de las condiciones de crecimiento y por tanto es crucial para sus funciones celulares. En vista a la interacción física entre Sfp1 y Cpr1, nos planteamos investigar si la localización de ambas proteínas podría estar relacionada. Para ello analizamos mediante microscopía confocal la localización subcelular de Sfp1-GFP en cepas WT y *cpr1*Δ. Como se observa en la Figura 4.5, Sfp1 se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma en cultivos con glucosa. La localización de Sfp1 se vuelve mayoritariamente nuclear en ausencia de *CPR1*. A su vez, también se estudió la localización de Cpr1. Cpr1-GFP se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma en la cepa WT en glucosa. Sin embargo, en ausencia de *SFP1* se observa un enriquecimiento de la fracción nuclear. Estos datos demuestran que Cpr1 es necesario para la correcta localización de Sfp1 y viceversa.

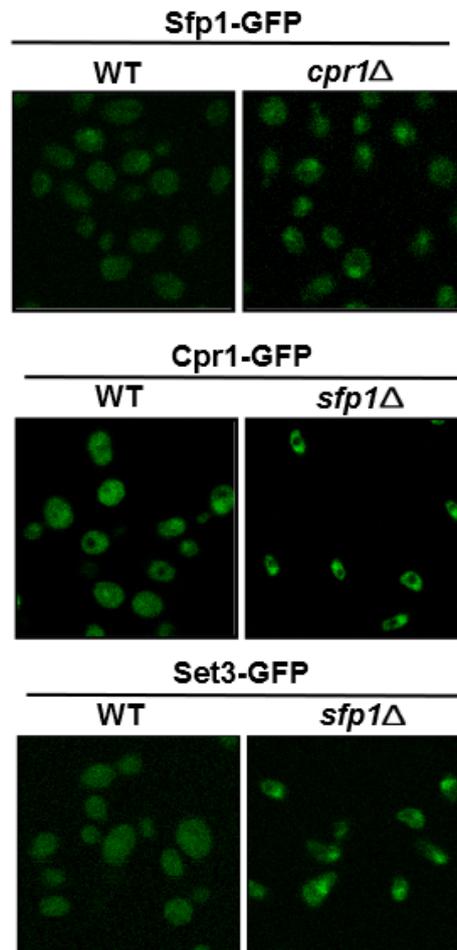


Figura 4.5. Localización celular *in vivo* de Sfp1, Cpr1 y Set3 mediante microscopía confocal. Localización celular de Sfp1-GFP, Cpr1-GFP y Set3-GFP mediante microscopía de fluorescencia confocal en las cepas WT, *sfp1Δ* y *cpr1Δ*. Las imágenes mostradas son una muestra representativa de todas las obtenidas.

Los resultados de localización obtenidos indican que la localización de Cpr1 depende de Sfp1. Como ya hemos comentado, Cpr1 es parte del complejo desacetilasa Set3C. Por tanto, nos planteamos averiguar si los cambios de localización de Cpr1

observados se dan en el contexto de dicho complejo o por el contrario se dan en una fracción libre de Cpr1. Para ello analizamos la localización de la subunidad central del complejo, Set3. De igual forma que le ocurre a Cpr1, Set3 también presenta un enriquecimiento en su fracción nuclear en el mutante *sfp1*Δ con respecto del WT (Figura 4.5).

En conjunto, la localización de Sfp1 y Cpr1 parecen ser co-dependientes, y se dan al menos en parte en el contexto del complejo Set3C.

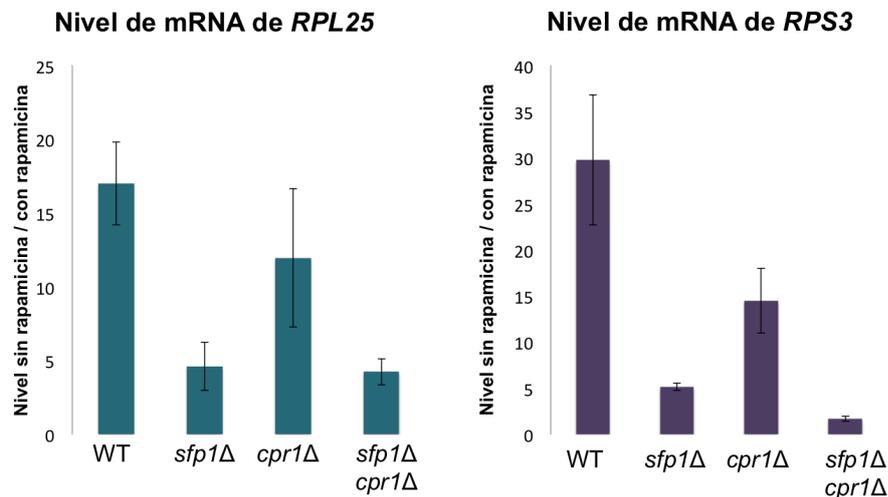
### 3.7. Relaciones funcionales entre Sfp1, Cpr1 y otros complejos en el contexto de la transcripción.

Como se explica en la introducción, Sfp1 es un factor de transcripción clave para la regulación de la transcripción de genes RP y RiBi en función de las condiciones de crecimiento. En vista de los datos obtenidos que revelan interacciones físicas y de localización entre Sfp1 y Cpr1, nos propusimos estudiar si Cpr1 podría estar implicado de manera similar a Sfp1 en la transcripción de estos genes.

Con este objetivo, decidimos analizar los niveles totales de RNA de dos genes RP directamente regulados por Sfp1 a través de la vía TOR, *RPS3* y *RPL25*. Un mismo cultivo se dividió en dos mitades: una de las mitades se trató con rapamicina durante 1 hora, mientras que la otra mitad control no fue tratada (Marion *et al.*, 2004).

Mediante RT-qPCR analizamos los niveles totales de RNA de los genes *RPS3* y *RPL25* en los mutantes simples *sfp1*Δ y *cpr1*Δ, así como en el doble mutante *sfp1*Δ*cpr1*Δ. En la Figura 4.6 se muestran los niveles de RNA como ratios (sin/con rapamicina) para cada cepa.

Los resultados obtenidos para las cepas WT y *sfp1* $\Delta$  son similares a los descritos por Marion y colaboradores (Marion *et al.*, 2004), confirmando que Sfp1 es necesario para la correcta expresión de genes RP en presencia de rapamicina a través de la vía TOR. En ausencia de Cpr1 se observa una tendencia decreciente en la expresión de ambos genes analizados. Sin embargo, los experimentos realizados no nos permiten concluir si existen diferencias entre el WT y el mutante *cpr1* $\Delta$ .



**Figura 4.6. Sfp1 y Cpr1 afectan a la transcripción de genes RP.** Análisis de los niveles de mRNA de los genes *RPL25* y *RPS3* a partir de las cepas WT, *sfp1* $\Delta$ , *cpr1* $\Delta$  y el doble mutante *sfp1* $\Delta$  *cpr1* $\Delta$ . Las cepas se crecieron en YPD a 30 °C hasta OD exponencial. La mitad de los cultivos se sometió a tratamiento con rapamicina. Los niveles relativos de mRNA se determinaron mediante RT-qPCR y se normalizaron respecto a los niveles de RNA de *ACT1*. Los niveles obtenidos en ausencia de rapamicina se relativizaron a los obtenidos en las muestras tratadas con rapamicina.

Siguiendo con el estudio de las funciones de Cpr1 en transcripción, en un intento de entender cómo Cpr1 puede estar relacionado con las funciones de SAGA en transcripción, realizamos un agrupamiento de perfiles transcripcionales (transcriptional hierarchical clustering) de todos los componentes de SAGA y el complejo Set3C del que forma parte Cpr1. Para hacerlo utilizamos los datos de transcriptómica de los mutantes publicados por el laboratorio del Dr. Frank Hölstege (University Medical Center, Utrecht) (Lenstra *et al.*, 2011b). A partir de los datos originales del Dr. Hölstege, y con ayuda de Sonia Tarazona (Genómica de la Expresión Génica del Centro de Investigación Príncipe) filtramos los perfiles transcriptómicos para quedarnos con los mutantes que nos interesaban y generamos los árboles jerárquicos que agrupan las distintas subunidades de los complejos en función de la similitud entre los perfiles de transcripción de cada mutante respecto del WT.

Como se observa en la Figura 4.7 el perfil transcriptómico del mutante *cpr1* $\Delta$  queda ubicado entre dos ramas, una que agrupa el módulo DUB de SAGA y otra que agrupa a Set3C y el módulo SPT de SAGA. Si incluimos en el análisis otros complejos implicados en la transcripción (remodeladores de cromatina, metiltransferasas, acetiltransferasas, desacetilasas, etc...) el perfil transcriptómico de *cpr1* $\Delta$  presenta una similitud mayor con el complejo acetiltransferasa NuA4. En este agrupamiento *cpr1* $\Delta$  presenta mayor similitud con el módulo DUB de SAGA y con TREX-2, que con Set3 y el módulo SPT de SAGA que quedan más alejados.

Estos datos sugieren que Cpr1 estaría implicado en la transcripción no solo a través de Set3C, como se ha publicado, sino en relación con otros complejos implicados en la acetilación/desacetilación de histonas como SAGA y NuA4.

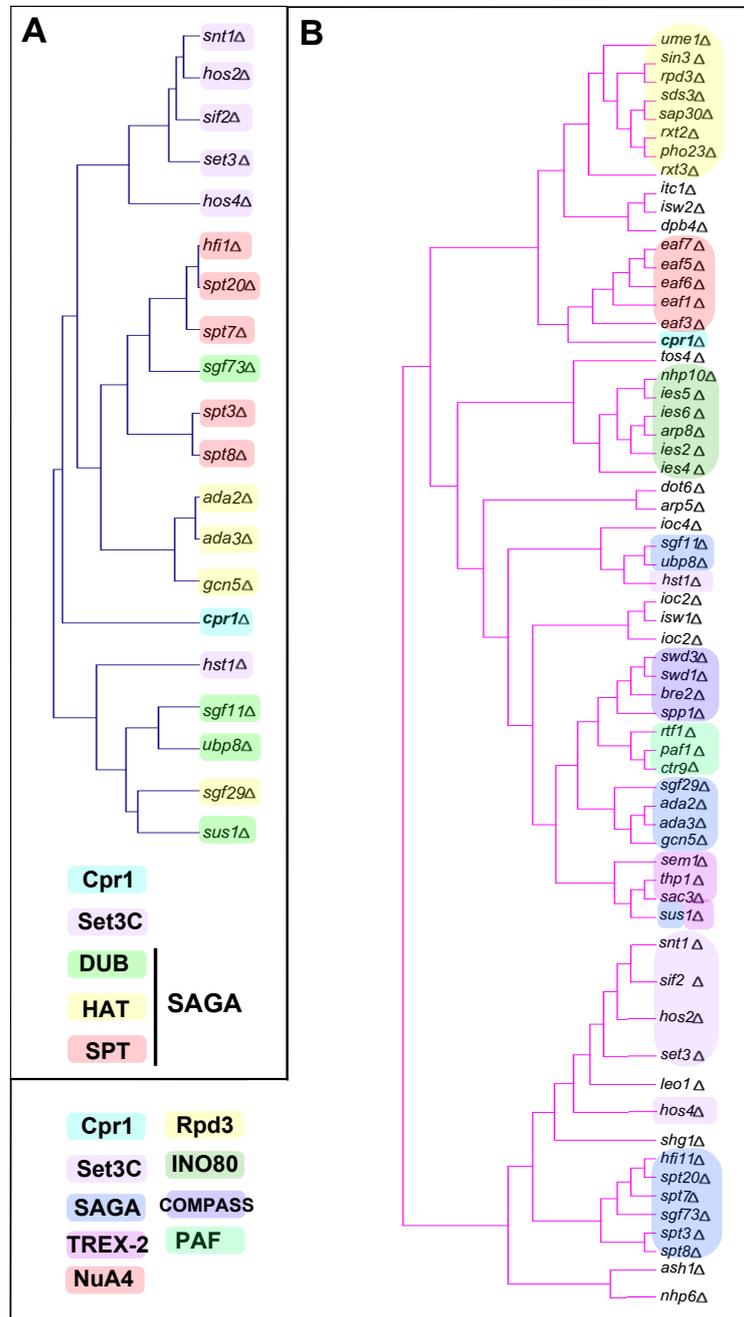


Figura 4.7. Análisis de perfiles transcripcionales de mutantes de subunidades de complejos implicados en la transcripción. Diagramas de agrupación jerárquica de

los perfiles de niveles de RNAs de mutantes de complejos con funciones en la transcripción eucariota obtenidos del trabajo (Lenstra *et al.*, 2011a). Los perfiles obtenidos para cada mutante están normalizados respecto a la cepa silvestre. (A) Agrupación jerárquica de mutantes de complejos SAGA (modificador de cromatina), TREX-2 (exportación de mRNAs) y Set3C (acetiltransferasa). (B) Agrupación jerárquica de mutantes de complejos SAGA, TREX-2, Set3C, FACT (remodelador de cromatina), Rpd3 (desacetiltransferasa), COMPASS (metiltransferasa), Paf1 (coregulador), ISW1 (remodelador de cromatina), ISW2 (remodelador de cromatina), INO80 (remodelador de cromatina), NuA3 y NuA4 (acetiltransferasas).



## DISCUSIÓN

Sfp1 es uno de los reguladores clave de la biogénesis ribosomal y el control del tamaño celular dependiente de nutrientes. Dado su papel como factor transcripcional de los genes RP transcritos por la RNAP II, y a partir de descubrir su interacción física con Sus1, nos resultó muy interesante indagar en las posibles relaciones funcionales entre ambos factores. A pesar de que no en todos los casos hemos sido capaces de detectar la interacción física Sfp1-Sus1, dicha interacción también ha sido observada por el Dr. Lee y colaboradores (Lee *et al.*, 2011). La interacción de Sfp1 con componentes de SAGA también ha sido descrita previamente en otros trabajos. Por un lado, ha sido identificada una interacción física entre Sfp1 y Taf5 (también presente en nuestras purificaciones, Tabla 4.1) (Lee *et al.*, 2011). Por otro lado, también se ha observado una interacción física entre Sfp1 y Tra1 (Lempiainen *et al.*, 2009). Estos datos parecen indicar una relación directa entre Sfp1 y SAGA, lo cual podría abrir la posibilidad a que las funciones de Sfp1 como factor de transcripción no se limiten solo a los genes RP sino también a los regulados por SAGA. De hecho, esta idea ya ha sido propuesta a raíz del efecto sobre la transcripción general (genes RP y no RP) que Sfp1 tiene en presencia de la droga 6AU, como ya se comentó en la introducción a este capítulo (Gomez-Herreros *et al.*, 2012).

En el contexto de la relación Sfp1-Sus1, también ha sido descrita una interacción genética entre Sfp1 y el componente de TREX-2, Sac3 (Beltrao *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2010). Dadas las evidencias de la relación entre Sfp1 y SAGA, podríamos especular con que dicha interacción pueda darse en el contexto del NPC y el acercamiento del gen a la periferia nuclear. Esta hipótesis viene

avalada por nuestros resultados acerca del papel de Sfp1 en la exportación de los mRNAs donde la ausencia de *SFP1* provoca un defecto de exportación en ciertas circunstancias. Además, hemos visto a través de nuestras purificaciones que Sfp1 también interacciona con proteínas asociadas al NPC como son Nup116, Mlp1 y Mlp2 (Tabla 4.1). Cabe destacar también la interacción física entre Sfp1 y la exportina Los1, que exporta los tRNAs al citoplasma (Hellmuth *et al.*, 1998). No solo eso, sino que también se identificaron como interactores de Sfp1 a las proteínas Trm3 y Trl1, ambas implicadas en el procesamiento de los tRNAs (Cavaille *et al.*, 1999; Wang & Shuman, 2005). Por lo tanto, dejamos la puerta abierta no solo al papel de Sfp1 en la exportación de mRNAs sino también en el procesamiento y exportación de tRNAs.

Los ensayos de hibridación *in situ* también nos han permitido describir que en ausencia de *SFP1* se generan acumulaciones citoplasmáticas de RNAs. Este dato indica que además de un papel en la exportación de mensajeros, Sfp1 puede estar implicado en el metabolismo de los RNAs en procesos posteriores a su exportación al citoplasma. En eucariotas existen principalmente dos tipos de gránulos citoplasmáticos: los P-bodies (*processing bodies*) que acumulan mRNPs cuya traducción ha sido bloqueada, junto con maquinaria de degradación de mRNAs (Parker & Sheth, 2007); y los gránulos de estrés que contienen mRNPs junto a componentes de la maquinaria de traducción que se acumulan cuando su inicio es bloqueado bajo situaciones de estrés (Buchan & Parker, 2009). Nuestros datos indican que Sfp1 tendría un papel relevante en inhibir la formación de estos gránulos, posiblemente favoreciendo la traducción de los mRNAs y evitando así su acumulación. De hecho, se ha descrito que Sfp1 puede tener una función importante favoreciendo la terminación de la traducción a través de la regulación

de los niveles de Sup35, un factor de terminación de la traducción (Drozdova *et al.*, 2013; Radchenko *et al.*, 2011). Por otro lado, también se ha descrito una interacción física entre Sfp1 y Whi3, una proteína de unión a RNA implicada en el secuestro de RNAs en gránulos de estrés (Holmes *et al.*, 2013). No obstante, es necesario realizar más experimentos que ayuden a identificar por un lado, la naturaleza de los gránulos y por otro, el rol de Sfp1 en su formación.

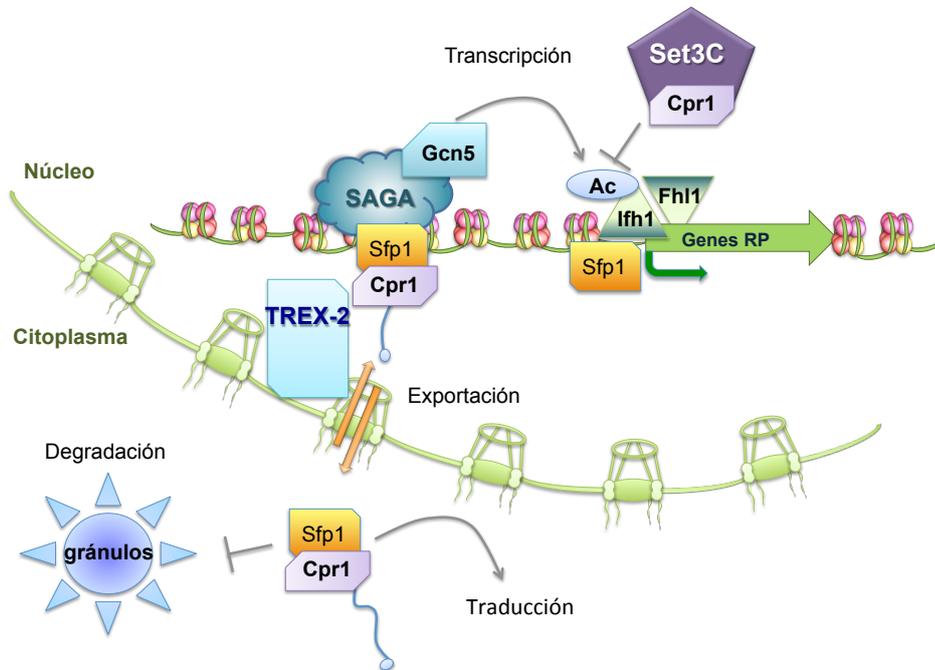
Otro de los resultados más notables de este capítulo fue la interacción física de Sfp1 con las dos peptidil-prolil isomerasas Cpr1 y Fpr1, no descrita previamente. Como se ha comentado, estas enzimas tienen un papel fundamental en la transcripción regulando la actividad de las proteínas implicadas a través de la isomerización de residuos. Por ello, nos resultó de interés profundizar en el papel que dichas enzimas podrían tener en la regulación de la actividad de Sfp1. Sfp1 es translocado del citoplasma al núcleo junto a Mrs6 en función de las condiciones celulares (Lempiainen *et al.*, 2009). Nuestros datos indican que la localización de Sfp1 y Cpr1 son dependientes una de la otra, siendo más nuclear en ausencia de una de las dos. Por lo tanto, podría ser que la unión Sfp1-Cpr1 sea clave para las funciones de ambas así como para su exportación al citoplasma una vez realizadas sus funciones en el núcleo. A pesar de que la localización de Set3 también parece ser dependiente de Sfp1, en la bibliografía se ha descrito a Set3 como una proteína mayoritariamente nuclear en condiciones fisiológicas (Huh *et al.*, 2003), a diferencia de nuestros resultados (Figura 4.5). Por ello, no nos aventuramos a concluir que la localización dependiente Sfp1-Cpr1 se de en el contexto del complejo Set3C. Lo que parece claro es que Cpr1 está implicado en la regulación de la transcripción de genes RP dado que su ausencia provoca una disminución en sus niveles de expresión de manera dependiente de rapamicina (Figura

4.6), y por lo tanto, dicha regulación se daría a través de la vía TOR. El papel de Cpr1 a través de la vía TOR podría darse junto a Sfp1 y en ese sentido, las interacciones físicas de las isomerasas con SAGA y TREX-2, junto a los datos que relacionan a Sfp1 con dichos complejos, abre la posibilidad a que la relación Sfp1-Cpr1 se de en el contexto de SAGA-TREX-2. De hecho, como ya sabemos, Cpr1 está implicado en la desacetilación de histonas a través del complejo Set3C (Pijnappel *et al.*, 2001) y a su vez existen evidencias de interacciones físicas y genéticas con componentes de otros complejos modificadores o remodeladores de la cromatina como SWI/SNF, COMPASS, INO80, SAS y NuA4 (Collins *et al.*, 2007; Gavin *et al.*, 2006; Gavin *et al.*, 2002; Shevchenko *et al.*, 2002). Por lo tanto, el papel de Cpr1 en la regulación de la transcripción no parece limitarse solo a sus funciones en el complejo Set3C, sino que podría estar regulando la actividad de otros complejos esenciales en la transcripción.

Sin embargo, no podemos olvidar que Cpr1 podría estar regulando la expresión de genes RP a través de la rama de la vía TOR que implica a Ifh1/Fhl1. Como comentamos brevemente en la introducción, Ifh1 activa la transcripción de los genes RP uniéndose a Fhl1. La actividad de Ifh1 está regulada por fosforilación (Martin *et al.*, 2004) y por acetilación (Cai *et al.*, 2013; Downey *et al.*, 2013b). Dicha acetilación es llevada a cabo por Gcn5 a través de SAGA. Bajo condiciones de falta de nutrientes, Gcn5 acetila a Ifh1, inhibiéndolo. Cuando las concentraciones de nutrientes son adecuadas, la acetilación se revierte a través de dos desacetilasas, activando de nuevo la transcripción de los genes RP a través de Ifh1 (Downey *et al.*, 2013a). Una de las desacetilasas implicadas es Hst1, componente al igual que Cpr1 del complejo Set3C (Pijnappel *et al.*, 2001). Por lo tanto, una hipótesis plausible sería que Cpr1 a través de Set3C,

tuviera funciones antagónicas a las de Gcn5 a través de SAGA, para regular la actividad de Ifh1 en función de las condiciones nutricionales de la célula.

En conjunto, nuestros datos sugieren un papel de Sfp1 en el metabolismo de los RNAs mucho más amplio del conocido hasta el momento. Mucho más allá de su papel en la transcripción de los genes RP, Sfp1 puede estar implicado en la transcripción de otros grupos de genes (a través de SAGA) así como en la exportación de los mRNAs al citoplasma (a través de TREX-2). En el citoplasma, se asociaría a los mRNAs hasta la traducción evitando que se acumulasen en gránulos citoplasmáticos. Por lo tanto, Sfp1 acompañaría al mRNA a través de toda su vida, regulando su procesamiento. En dichos eventos podría estar acompañado de la isomerasa Cpr1, que además participaría en la transcripción de los genes RP a través de Ifh1 (Figura D6).



**Figura D6. Sfp1 y Cpr1 en la expresión génica.** Sfp1 participaría en la transcripción activando la expresión de los genes RP, pero también en la de otros genes junto al complejo SAGA. Una vez transcrito, Sfp1 junto a Cpr1 acompañaría al mRNA para facilitar su exportación al citoplasma donde estaría también implicado en el proceso de traducción, evitando la formación de gránulos citoplasmáticos de mRNPs. Cpr1 también participaría en la transcripción de genes RP a través del complejo Set3C, desacetilando a Ifh1, activándolo y facilitando el inicio de la transcripción.

# PERSPECTIVAS



La célula eucariota constituye un sistema biológico altamente complejo por el alto número de procesos que ocurren en ella. En este sentido, la célula ha tenido que desarrollar complejos mecanismos de regulación de dichos procesos, y a su vez asegurar la viabilidad energética de todos ellos. Para ello, a lo largo de la evolución se ha generado un intrincado sistema de acoplamiento de los diferentes eventos celulares. Para que los mecanismos de acoplamiento funcionen, existen proteínas y complejos que son capaces de participar en más de un proceso independiente, conectando a través de sus funciones los diferentes procesos en los que participan. El descubrimiento de Sus1 fue un punto clave para entender como dos procesos esenciales de la expresión génica, como son la transcripción y la exportación de los mRNAs al citoplasma, se acoplan para una mayor eficiencia. Por otro lado, es interesante entender que el hecho de que la célula mantenga dos complejos prácticamente iguales como son SAGA y SLIK, parece indicar que ambos deben de tener funciones importantes en la célula.

A lo largo de esta tesis hemos tratado de diseccionar cuales son las posibles funciones del complejo SLIK con el fin de comprender cual es su papel en la expresión génica eucariota. De hecho, los datos de los que se dispone hasta el momento parecen indicar que el complejo homólogo de SAGA en humanos podría en realidad ser SLIK, ya que no se conoce ningún homólogo de Spt8.

Los datos aportados muestran el papel de SLIK en el mantenimiento de los niveles globales de H2B ubiquitinada a través de su módulo DUB. De hecho, los datos de unión global de Sus1 en ausencia de SAGA indican que, Sus1 se une a la gran mayoría de genes, presumiblemente como parte de SLIK. Cuando comenzamos esta tesis, los datos indicaban que Sus1 participaba en la transcripción mediada por la RNAP II, principalmente en la transcripción de los genes regulados por SAGA. Nuestros datos aportan evidencias de que

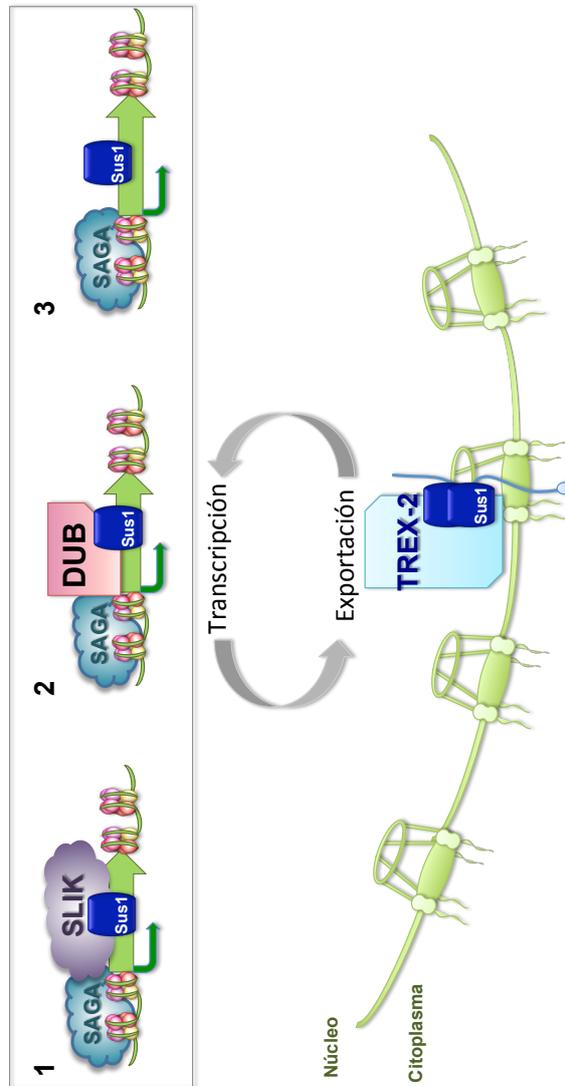
Sus1 no solo está implicada en la transcripción de dichos genes sino que su papel se extiende a la mayoría de los genes transcritos por la RNAP II. Este hecho viene apoyado por la relación funcional que hemos descrito entre Sus1 y Sfp1, un factor esencial para la transcripción de los genes RP. Además, el papel de Sus1 en la transcripción también se extendería a los genes regulados por la RNAP III, como son los tDNAs.

Sin embargo, el descubrimiento por nuestra parte y por parte de otro laboratorio (Lim *et al.*, 2013) de que el módulo DUB de SAGA y SLIK es capaz de soltarse del resto del complejo sin que su actividad desaparezca, abre la posibilidad a que la unión global de Sus1 a la cromatina se dé a través de lo que hemos denominado *DUB-libre*, y que su procesamiento y liberación de SAGA sea otro de los mecanismos por los que la célula regula el proceso de transcripción. De hecho, Sus1 es una proteína polivalente capaz de participar en eventos desde el inicio hasta el final de la vida del RNA. Este hecho junto con el conocimiento de la existencia de una parte de moléculas de Sus1 circulando libres en la célula (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2004) nos hace plantear la posibilidad de que dichas moléculas sean capaces de unirse de manera general a la cromatina de forma independiente a cualquier forma de DUB, SAGA o SLIK. En este sentido, hemos diseñado experimentos que nos ayudarán a comprender en qué contexto Sus1 es capaz de unirse de manera tan global a la cromatina, y que esperamos llevar a cabo próximamente.

Nuestros datos no se limitan solo al papel de estos factores en transcripción, sino que también hemos intentado conocer si SLIK al igual que SAGA puede participar en el proceso de acercamiento del gen al poro, así como en la exportación de los mRNAs. Los datos preliminares que hemos obtenido muestran que la ausencia de SLIK en el mutante *pep4Δ*, no afecta a la exportación general de los mRNAs (datos no mostrados). Sin embargo, sí que parece existir una

relación funcional entre SLIK y TREX-2, a través de Sem1 y Spt8, cuya naturaleza no hemos sido capaces de describir pero esperamos hacerlo en un futuro próximo. De igual manera, hemos puesto a punto un protocolo para localizar mediante microscopio de fluorescencia la posición del locus génico que se va a transcribir y poder analizar en mutantes *sagaΔ* y *slikΔ*, si el acercamiento al poro se ve afectado o no.

En el contexto del acoplamiento transcripción-exportación, la ubiquitinación/desubicuitinación de H2B parece tener un papel clave en la biogénesis de los RNAs. En este sentido, el acoplamiento transcripción-exportación no se da solo en sentido *downstream*, es decir, a través de que eventos iniciales de la transcripción como la ubiquitinación, afecten a eventos posteriores como el reclutamiento del DUB a la cromatina o la correcta exportación de RNAs. Los datos parecen indicar que dicho acoplamiento también se da en sentido *upstream*, es decir, factores implicados en eventos como la exportación afectan al correcto funcionamiento de procesos iniciales en la expresión génica como la desubicuitinación. De hecho, la intrincada red de factores conectados en todos estos procesos cada vez parece ser mayor, como el papel de Sfp1 en la exportación de mRNAs o la posible participación de Sus1 en la exportación de los tRNAs. Serán necesarios muchos esfuerzos para poder arrojar luz a como todos ellos participan en el complejo sistema de regulación que hace de la expresión génica un proceso tan fascinante.



**Figura D7. Acoplamiento transcripción-exportación.** Las funciones de Sus1 en la transcripción a nivel global pueden darse como componente de SLIK (1), como componente del DUB-libre (2), o como una molécula independiente (3). En cualquier caso, Sus1 es esencial para el acoplamiento entre la transcripción y la exportación. Sin embargo, en dicho acoplamiento están implicados muchos otros factores que regulan en ambas direcciones los dos procesos para que se den correctamente en tiempo, lugar y modo.

## CONCLUSIONES



Las principales conclusiones de esta tesis se resumen a continuación:

1. Sus1 es un componente estable del complejo SLIK cuyas funciones incluyen el mantenimiento de los niveles de histona H2B ubiquitinada global.
2. Sus1 se recluta al 70 % de los genes transcritos por la RNAP II, preferiblemente a su región codificante.
3. Sus1 se une con un perfil similar a los genes regulados por SAGA y por TFIID, aunque lo hace con mayor intensidad a estos últimos.
4. La ausencia de SAGA en el doble mutante *spt8Δ spt7-1180* provoca una disminución en los niveles de transcritos, de manera independiente a si son regulados por SAGA o por TFIID, la longitud de los genes o su tasa de transcripción naciente.
5. Sus1 se une al 92 % de los genes que codifican tRNAs transcritos por la RNA polimerasa III, preferiblemente a la región *upstream* del inicio del gen y a sus regiones exónicas.
6. La ausencia de SAGA provoca un aumento en los niveles globales de tRNAs.
7. El módulo DUB es capaz de ensamblarse y conservar su actividad en ausencia del resto del complejo SAGA/SLIK.
8. La localización celular del *DUB-libre* depende del componente estructural de SAGA, Spt7 pero no de Ada1.
9. La ubiquitinación de H2B es necesaria para el reclutamiento del DUB al promotor de *GAL1*, pero no para su actividad desubcuitinasa.

10. La ubiquitinación de H2B puede ser importante en la exportación de mRNAs bajo ciertas circunstancias.
11. El complejo TREX-2 es necesario para la correcta unión del DUB al promotor de *GAL1*, pero su activación no depende del componente estructural de TREX-2, Sac3.
12. Sfp1 interacciona con Sus1 y participa en el proceso de exportación de los mRNAs, así como en la acumulación de dichos mRNAs en gránulos citoplasmáticos.
13. Sfp1 interacciona con dos peptidil-prolil isomerasas Cpr1 y Fpr1, que a su vez interaccionan con componentes de SAGA y TREX-2.
14. La localización celular de Spf1 depende de Cpr1, y viceversa.
15. Cpr1 está implicada en la transcripción de algunos genes RP.

## ARTÍCULOS SUPLEMENTARIOS



Los temas principales de esta tesis doctoral han sido el estudio de las funciones del complejo SLIK en la transcripción y exportación de los RNAs, así como la profundización en el conocimiento sobre el módulo DUB de SAGA/SLIK y sus mecanismos de regulación. Así mismo, hemos podido describir nuevas relaciones funcionales del factor de transcripción Sfp1 con peptidil-prolil isomerasas, así como su posible función en la exportación y metabolismo citoplasmático de los RNAs. En este contexto, durante el período que he trabajado en el laboratorio de la Dra. Rodríguez-Navarro he podido participar en otros trabajos cuyo desarrollo no está incluido en los objetivos de esta tesis. Dicho trabajo se ha visto reflejado en 4 artículos originales y una revisión bibliográfica ya publicados.

Dada la relación de estos trabajos con el tema general de esta tesis en transcripción y metabolismo del RNA, a continuación se resumen dichos artículos. En la copia digital que acompaña a esta tesis, se pueden encontrar los artículos completos.

≡ **A novel link between Sus1 and the cytoplasmic mRNA decay machinery suggests a broad role in mRNA metabolism.**

\*Cuenca-Bono B, \*García-Molinero V, Pascual-García P, García-Oliver E, Llopis A, Rodríguez-Navarro S.

*\*Co-autores.*

BMC Cell Biol. 2010 Mar 15;11:19.

≡ **SUS1 introns are required for efficient mRNA nuclear export in yeast.**

\*Cuenca-Bono B, \*García-Molinero V, Pascual-García P, Dopazo H, Llopis A, Vilardell J, Rodríguez-Navarro S.

*\*Co-autores.*

Nucleic Acids Res. 2011 Oct;39(19):8599-611.

≡ **mRNA export and gene expression: the SAGA-TREX-2 connection.**

García-Oliver E, **García-Molinero V**, Rodríguez-Navarro S.

Biochim Biophys Acta. 2012 Jun;1819(6):555-65.

Licencia de uso y reproducción emitida por Elsevier número 3442430248691.

≡ **The prefoldin bud27 mediates the assembly of the eukaryotic RNA polymerases in an rpb5-dependent manner.**

Mirón-García MC, Garrido-Godino AI, **García-Molinero V**, Hernández-Torres F, Rodríguez-Navarro S, Navarro F.

PLoS Genet. 2013.

≡ **A novel role for Sem1 and TREX-2 in transcription involves their impact on recruitment and H2B deubiquitylation activity of SAGA.**

García-Oliver E, Pascual-García P, **García-Molinero V**, Lenstra TL, Holstege FC, Rodríguez-Navarro S.

Nucleic Acids Res. 2013 Jun;41(11):5655-68.

### *RESUMEN*

Sus1 es una pieza clave en la coordinación de diferentes procesos del metabolismo del RNA que ocurren en el núcleo. Sin embargo, en el artículo “*A novel link between Sus1 and the cytoplasmic mRNA decay machinery suggests a broad role in mRNA metabolism*” describimos relaciones genéticas y bioquímicas entre Sus1 y componentes del metabolismo del RNA en el citoplasma. Además, demostramos que Sus1 se puede acumular en gránulos citoplasmáticos como P-bodies o gránulos de estrés. En resumen, ampliamos la visión de las funciones nucleares de Sus1 a un papel mucho más general y relacionado con el metabolismo del mRNA a nivel citoplasmático.

En *Saccharomyces cerevisiae*, mientras la mayoría de los genes no contienen intrones, el gen *SUS1* contiene dos de ellos. En el trabajo “*SUS1 introns are required for efficient mRNA nuclear export in yeast*” demostramos que esta característica del gen *SUS1* está conservada evolutivamente y es crítica para la correcta función de Sus1. De este modo, la incorrecta regulación de la eliminación de los intrones de *SUS1* provoca defectos en la exportación de los mRNAs así como en el crecimiento celular.

La relevancia del papel de Sus1 acoplando procesos a través de SAGA y TREX-2 quedó resumida en la revisión “*mRNA export and gene expression: the SAGA-TREX-2 connection*”. En ella revisamos además otros procesos relacionados con el NPC como el acercamiento de genes a la envoltura nuclear para su transcripción, la estructura de la cromatina y el contexto celular en que estos procesos tienen lugar.

Más recientemente, hemos descrito una nueva relación entre componentes del complejo TREX-2 con la transcripción, mediada por la actividad de SAGA (“*A novel role for Sem1 and TREX-2 in transcription involves their impact on recruitment and H2B deubiquitylation activity of SAGA*”). En este trabajo se describe como la subunidad de TREX-2, Sem1 también participa en la activación transcripcional a través del reclutamiento de las subunidades de SAGA al promotor de los genes y de la activación de la desubicitinación de la histona H2B.

Por último, a través de una colaboración con el laboratorio del Dr. Francisco Navarro (Universidad de Jaén), pude participar en un estudio sobre el papel de la prefoldina Bud27 en el ensamblaje de las RNA polimerasas de levadura (“*The prefoldin bud27 mediates the assembly of the eukaryotic RNA polymerases in an rpb5-dependent manner*”).



## BIBLIOGRAFÍA



- Acker, J., Conesa, C., and Lefebvre, O. (2013). Yeast RNA polymerase III transcription factors and effectors. *Biochim Biophys Acta* 1829, 283-295.
- Adamietz, P., and Rudolph, A. (1984). ADP-ribosylation of nuclear proteins in vivo. Identification of histone H2B as a major acceptor for mono- and poly(ADP-ribose) in dimethyl sulfate-treated hepatoma AH 7974 cells. *J Biol Chem* 259, 6841-6846.
- Ahmed, S., Brickner, D.G., Light, W.H., Cajigas, I., McDonough, M., Froysheter, A.B., Volpe, T., and Brickner, J.H. (2010). DNA zip codes control an ancient mechanism for gene targeting to the nuclear periphery. *Nat Cell Biol* 12, 111-118.
- Albert, I., Mavrich, T.N., Tomsho, L.P., Qi, J., Zanton, S.J., Schuster, S.C., and Pugh, B.F. (2007). Translational and rotational settings of H2A.Z nucleosomes across the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 446, 572-576.
- Aletta, J.M., Cimato, T.R., and Ettinger, M.J. (1998). Protein methylation: a signal event in post-translational modification. *Trends Biochem Sci* 23, 89-91.
- Allard, S., Utley, R.T., Savard, J., Clarke, A., Grant, P., Brandl, C.J., Pillus, L., Workman, J.L., and Cote, J. (1999). NuA4, an essential transcription adaptor/histone H4 acetyltransferase complex containing Esa1p and the ATM-related cofactor Tra1p. *Embo J* 18, 5108-5119.
- Allfrey, V.G., Faulkner, R., and Mirsky, A.E. (1964). Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 51, 786-794.
- Ansari, A., and Hampsey, M. (2005). A role for the CPF 3'-end processing machinery in RNAP II-dependent gene looping. *Genes Dev* 19, 2969-2978.
- Arevalo-Rodriguez, M., Cardenas, M.E., Wu, X., Hanes, S.D., and Heitman, J. (2000). Cyclophilin A and Ess1 interact with and regulate silencing by the Sin3-Rpd3 histone deacetylase. *Embo J* 19, 3739-3749.
- Atanassov, B.S., and Dent, S.Y. (2011). USP22 regulates cell proliferation by deubiquitinating the transcriptional regulator FBP1. *EMBO Rep* 12, 924-930.
- Balasubramanian, R., Pray-Grant, M.G., Selleck, W., Grant, P.A., and Tan, S. (2002). Role of the Ada2 and Ada3 transcriptional coactivators in histone acetylation. *J Biol Chem* 277, 7989-7995.
- Barbet, N.C., Schneider, U., Helliwell, S.B., Stansfield, I., Tuite, M.F., and Hall, M.N. (1996). TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast. *Mol Biol Cell* 7, 25-42.
- Barlev, N.A., Liu, L., Chehab, N.H., Mansfield, K., Harris, K.G., Halazonetis, T.D., and Berger, S.L. (2001). Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases. *Mol Cell* 8, 1243-1254.
- Bataille, A.R., Jeronimo, C., Jacques, P.E., Laramée, L., Fortin, M.E., Forest, A., Bergeron, M., Hanes, S.D., and Robert, F. (2012). A universal RNA polymerase II CTD cycle

- is orchestrated by complex interplays between kinase, phosphatase, and isomerase enzymes along genes. *Mol Cell* 45, 158-170.
- Baudin, A., Ozier-Kalogeropoulos, O., Denouel, A., Lacroute, F., and Cullin, C. (1993). A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 21, 3329-3330.
- Beck, T., and Hall, M.N. (1999). The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* 402, 689-692.
- Belotserkovskaya, R., Sterner, D.E., Deng, M., Sayre, M.H., Lieberman, P.M., and Berger, S.L. (2000). Inhibition of TATA-binding protein function by SAGA subunits Spt3 and Spt8 at Gcn4-activated promoters. *Mol Cell Biol* 20, 634-647.
- Beltrao, P., Trinidad, J.C., Fiedler, D., Roguev, A., Lim, W.A., Shokat, K.M., Burlingame, A.L., and Krogan, N.J. (2009). Evolution of phosphoregulation: comparison of phosphorylation patterns across yeast species. *PLoS Biol* 7, e1000134.
- Bentley, D.L. (2005). Rules of engagement: co-transcriptional recruitment of pre-mRNA processing factors. *Curr Opin Cell Biol* 17, 251-256.
- Berger, S.L. (2002). Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev* 12, 142-148.
- Berger, S.L., Cress, W.D., Cress, A., Triezenberg, S.J., and Guarente, L. (1990). Selective inhibition of activated but not basal transcription by the acidic activation domain of VP16: evidence for transcriptional adaptors. *Cell* 61, 1199-1208.
- Bermejo, R., Capra, T., Jossen, R., Colosio, A., Frattini, C., Carotenuto, W., Cocito, A., Doksani, Y., Klein, H., Gomez-Gonzalez, B., *et al.* (2011). The replication checkpoint protects fork stability by releasing transcribed genes from nuclear pores. *Cell* 146, 233-246.
- Bermudez-Santana, C., Attolini, C.S., Kirsten, T., Engelhardt, J., Prohaska, S.J., Steigele, S., and Stadler, P.F. (2010). Genomic organization of eukaryotic tRNAs. *BMC Genomics* 11, 270.
- Bernstein, B.E., Liu, C.L., Humphrey, E.L., Perlstein, E.O., and Schreiber, S.L. (2004). Global nucleosome occupancy in yeast. *Genome Biol* 5, R62.
- Bhaumik, S.R., and Green, M.R. (2002). Differential requirement of SAGA components for recruitment of TATA-box-binding protein to promoters in vivo. *Mol Cell Biol* 22, 7365-7371.
- Bian, C., Xu, C., Ruan, J., Lee, K.K., Burke, T.L., Tempel, W., Barsyte, D., Li, J., Wu, M., Zhou, B.O., *et al.* (2011). Sgf29 binds histone H3K4me2/3 and is required for SAGA complex recruitment and histone H3 acetylation. *Embo J* 30, 2829-2842.
- Bloom-Ackermann, Z., Navon, S., Gingold, H., Towers, R., Pilpel, Y., and Dahan, O. (2014). A comprehensive tRNA deletion library unravels the genetic architecture of the tRNA pool. *PLoS Genet* 10, e1004084.
- Blumberg, H., and Silver, P. (1991). A split zinc-finger protein is required for normal yeast growth. *Gene* 107, 101-110.

- Boguta, M. (2013). Maf1, a general negative regulator of RNA polymerase III in yeast. *Biochim Biophys Acta* 1829, 376-384.
- Boisnard, S., Lagniel, G., Garmendia-Torres, C., Molin, M., Boy-Marcotte, E., Jacquet, M., Toledano, M.B., Labarre, J., and Chedin, S. (2009). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activates the nuclear localization of Msn2 and Maf1 through thioredoxins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 8, 1429-1438.
- Brasset, E., and Vaury, C. (2005). Insulators are fundamental components of the eukaryotic genomes. *Heredity (Edinb)* 94, 571-576.
- Braun, S., and Madhani, H.D. (2012). Shaping the landscape: mechanistic consequences of ubiquitin modification of chromatin. *EMBO Rep* 13, 619-630.
- Braunstein, M., Rose, A.B., Holmes, S.G., Allis, C.D., and Broach, J.R. (1993). Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation. *Genes Dev* 7, 592-604.
- Brickner, D.G., Ahmed, S., Meldi, L., Thompson, A., Light, W., Young, M., Hickman, T.L., Chu, F., Fabre, E., and Brickner, J.H. (2012). Transcription factor binding to a DNA zip code controls interchromosomal clustering at the nuclear periphery. *Dev Cell* 22, 1234-1246.
- Brickner, D.G., Cajigas, I., Fondufe-Mittendorf, Y., Ahmed, S., Lee, P.C., Widom, J., and Brickner, J.H. (2007). H2A.Z-mediated localization of genes at the nuclear periphery confers epigenetic memory of previous transcriptional state. *PLoS Biol* 5, e81.
- Brickner, J.H., and Walter, P. (2004). Gene recruitment of the activated INO1 locus to the nuclear membrane. *PLoS Biol* 2, e342.
- Briggs, S.D., Xiao, T., Sun, Z.W., Caldwell, J.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Allis, C.D., and Strahl, B.D. (2002). Gene silencing: trans-histone regulatory pathway in chromatin. *Nature* 418, 498.
- Brown, C.E., Howe, L., Sousa, K., Alley, S.C., Carrozza, M.J., Tan, S., and Workman, J.L. (2001). Recruitment of HAT complexes by direct activator interactions with the ATM-related Tra1 subunit. *Science* 292, 2333-2337.
- Brown, J.M., Green, J., das Neves, R.P., Wallace, H.A., Smith, A.J., Hughes, J., Gray, N., Taylor, S., Wood, W.G., Higgs, D.R., *et al.* (2008). Association between active genes occurs at nuclear speckles and is modulated by chromatin environment. *J Cell Biol* 182, 1083-1097.
- Brown, J.M., Leach, J., Reittie, J.E., Atzberger, A., Lee-Prudhoe, J., Wood, W.G., Higgs, D.R., Iborra, F.J., and Buckle, V.J. (2006). Coregulated human globin genes are frequently in spatial proximity when active. *J Cell Biol* 172, 177-187.
- Brownell, J.E., and Allis, C.D. (1996). Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr Opin Genet Dev* 6, 176-184.

- Brownell, J.E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D.G., Roth, S.Y., and Allis, C.D. (1996). Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 84, 843-851.
- Buchan, J.R., and Parker, R. (2009). Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Mol Cell* 36, 932-941.
- Buratowski, S. (2003). The CTD code. *Nat Struct Biol* 10, 679-680.
- Buratowski, S. (2005). Connections between mRNA 3' end processing and transcription termination. *Curr Opin Cell Biol* 17, 257-261.
- Burgess-Beusse, B., Farrell, C., Gaszner, M., Litt, M., Mutskov, V., Recillas-Targa, F., Simpson, M., West, A., and Felsenfeld, G. (2002). The insulation of genes from external enhancers and silencing chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 Suppl 4, 16433-16437.
- Cabal, G.G., Genovesio, A., Rodriguez-Navarro, S., Zimmer, C., Gadal, O., Lesne, A., Buc, H., Feuerbach-Fournier, F., Olivo-Marin, J.C., Hurt, E.C., *et al.* (2006). SAGA interacting factors confine sub-diffusion of transcribed genes to the nuclear envelope. *Nature* 441, 770-773.
- Cafferkey, R., Young, P.R., McLaughlin, M.M., Bergsma, D.J., Koltin, Y., Sathe, G.M., Faucette, L., Eng, W.K., Johnson, R.K., and Livi, G.P. (1993). Dominant missense mutations in a novel yeast protein related to mammalian phosphatidylinositol 3-kinase and VPS34 abrogate rapamycin cytotoxicity. *Mol Cell Biol* 13, 6012-6023.
- Cai, L., McCormick, M.A., Kennedy, B.K., and Tu, B.P. (2013). Integration of multiple nutrient cues and regulation of lifespan by ribosomal transcription factor Ifh1. *Cell Rep* 4, 1063-1071.
- Capelson, M., Liang, Y., Schulte, R., Mair, W., Wagner, U., and Hetzer, M.W. (2010). Chromatin-bound nuclear pore components regulate gene expression in higher eukaryotes. *Cell* 140, 372-383.
- Carre, C., Szymczak, D., Pidoux, J., and Antoniewski, C. (2005). The histone H3 acetylase dGcn5 is a key player in *Drosophila melanogaster* metamorphosis. *Mol Cell Biol* 25, 8228-8238.
- Carrozza, M.J., Li, B., Florens, L., Suganuma, T., Swanson, S.K., Lee, K.K., Shia, W.J., Anderson, S., Yates, J., Washburn, M.P., *et al.* (2005). Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription. *Cell* 123, 581-592.
- Carter, R., and Drouin, G. (2010). The increase in the number of subunits in eukaryotic RNA polymerase III relative to RNA polymerase II is due to the permanent recruitment of general transcription factors. *Mol Biol Evol* 27, 1035-1043.
- Casolari, J.M., Brown, C.R., Drubin, D.A., Rando, O.J., and Silver, P.A. (2005). Developmentally induced changes in transcriptional program alter spatial organization across chromosomes. *Genes Dev* 19, 1188-1198.

- Casolari, J.M., Brown, C.R., Komili, S., West, J., Hieronymus, H., and Silver, P.A. (2004). Genome-wide localization of the nuclear transport machinery couples transcriptional status and nuclear organization. *Cell* 117, 427-439.
- Cavaille, J., Chetouani, F., and Bachellerie, J.P. (1999). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* YDL112w ORF encodes the putative 2'-O-ribose methyltransferase catalyzing the formation of Gm18 in tRNAs. *Rna* 5, 66-81.
- Chavez, S., and Aguilera, A. (1997). The yeast HPR1 gene has a functional role in transcriptional elongation that uncovers a novel source of genome instability. *Genes Dev* 11, 3459-3470.
- Chekanova, J.A., Abruzzi, K.C., Rosbash, M., and Belostotsky, D.A. (2008). Sus1, Sac3, and Thp1 mediate post-transcriptional tethering of active genes to the nuclear rim as well as to non-nascent mRNP. *Rna* 14, 66-77.
- Chen, M., and Gartenberg, M.R. (2014). Coordination of tRNA transcription with export at nuclear pore complexes in budding yeast. *Genes Dev* 28, 959-970.
- Choi, J.K., Grimes, D.E., Rowe, K.M., and Howe, L.J. (2008). Acetylation of Rsc4p by Gcn5p is essential in the absence of histone H3 acetylation. *Mol Cell Biol* 28, 6967-6972.
- Ciesla, M., Towpik, J., Graczyk, D., Oficjalska-Pham, D., Harismendy, O., Suleau, A., Balicki, K., Conesa, C., Lefebvre, O., and Boguta, M. (2007). Maf1 is involved in coupling carbon metabolism to RNA polymerase III transcription. *Mol Cell Biol* 27, 7693-7702.
- Cipollina, C., Alberghina, L., Porro, D., and Vai, M. (2005). SFP1 is involved in cell size modulation in respiro-fermentative growth conditions. *Yeast* 22, 385-399.
- Cipollina, C., van den Brink, J., Daran-Lapujade, P., Pronk, J.T., Porro, D., and de Winde, J.H. (2008a). *Saccharomyces cerevisiae* SFP1: at the crossroads of central metabolism and ribosome biogenesis. *Microbiology* 154, 1686-1699.
- Cipollina, C., van den Brink, J., Daran-Lapujade, P., Pronk, J.T., Vai, M., and de Winde, J.H. (2008b). Revisiting the role of yeast Sfp1 in ribosome biogenesis and cell size control: a chemostat study. *Microbiology* 154, 337-346.
- Clarke, A.S., Lowell, J.E., Jacobson, S.J., and Pillus, L. (1999). Esa1p is an essential histone acetyltransferase required for cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 19, 2515-2526.
- Cloutier, T.E., Librizzi, M.D., Mollah, A.K., Brenowitz, M., and Willis, I.M. (2001). Kinetic trapping of DNA by transcription factor IIIB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9581-9586.
- Cole, C.N., and Scarcelli, J.J. (2006). Transport of messenger RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol* 18, 299-306.
- Collins, S.R., Miller, K.M., Maas, N.L., Roguev, A., Fillingham, J., Chu, C.S., Schuldiner, M., Gebbia, M., Recht, J., Shales, M., *et al.* (2007). Functional dissection of protein complexes involved in yeast chromosome biology using a genetic interaction map. *Nature* 446, 806-810.

- Comb, D.G., Sarkar, N., and Pinzino, C.J. (1966). The methylation of lysine residues in protein. *J Biol Chem* 241, 1857-1862.
- Conrad, M., Schothorst, J., Kankipati, H.N., Van Zeebroeck, G., Rubio-Teixeira, M., and Thevelein, J.M. (2014). Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology reviews* 38, 254-299.
- Cook, M., and Tyers, M. (2007). Size control goes global. *Curr Opin Biotechnol* 18, 341-350.
- Cuenca-Bono, B., Garcia-Moliner, V., Pascual-Garcia, P., Garcia-Oliver, E., Llopis, A., and Rodriguez-Navarro, S. (2010). A novel link between Sus1 and the cytoplasmic mRNA decay machinery suggests a broad role in mRNA metabolism. *BMC Cell Biol* 11, 19.
- Cuthbert, G.L., Daujat, S., Snowden, A.W., Erdjument-Bromage, H., Hagiwara, T., Yamada, M., Schneider, R., Gregory, P.D., Tempst, P., Bannister, A.J., *et al.* (2004). Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* 118, 545-553.
- D'Angelo, M.A., and Hetzer, M.W. (2008). Structure, dynamics and function of nuclear pore complexes. *Trends Cell Biol* 18, 456-466.
- Dames, P., Weise, M., Puff, R., Goke, B., Parhofer, K.G., Seissler, J., and Lechner, A. (2012). Suppression of the nuclear factor Eny2 increases insulin secretion in poorly functioning INS-1E insulinoma cells. *Exp Diabetes Res* 2012, 460869.
- Daniel, J.A., and Grant, P.A. (2007). Multi-tasking on chromatin with the SAGA coactivator complexes. *Mutat Res* 618, 135-148.
- Daniel, J.A., Torok, M.S., Sun, Z.W., Schieltz, D., Allis, C.D., Yates, J.R., 3rd, and Grant, P.A. (2004). Deubiquitination of histone H2B by a yeast acetyltransferase complex regulates transcription. *J Biol Chem* 279, 1867-1871.
- David, L., Huber, W., Granovskaia, M., Toedling, J., Palm, C.J., Bofkin, L., Jones, T., Davis, R.W., and Steinmetz, L.M. (2006). A high-resolution map of transcription in the yeast genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5320-5325.
- Davie, J.K., Edmondson, D.G., Coco, C.B., and Dent, S.Y. (2003). Tup1-Ssn6 interacts with multiple class I histone deacetylases in vivo. *J Biol Chem* 278, 50158-50162.
- de Nigris, F., Balestrieri, M.L., and Napoli, C. (2006). Targeting c-Myc, Ras and IGF cascade to treat cancer and vascular disorders. *Cell Cycle* 5, 1621-1628.
- Desai, N., Lee, J., Upadhyya, R., Chu, Y., Moir, R.D., and Willis, I.M. (2005). Two steps in Maf1-dependent repression of transcription by RNA polymerase III. *J Biol Chem* 280, 6455-6462.
- Dieci, G., and Sentenac, A. (1996). Facilitated recycling pathway for RNA polymerase III. *Cell* 84, 245-252.
- Donze, D., and Kamakaka, R.T. (2001). RNA polymerase III and RNA polymerase II promoter complexes are heterochromatin barriers in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 20, 520-531.

- Dover, J., Schneider, J., Tawiah-Boateng, M.A., Wood, A., Dean, K., Johnston, M., and Shilatifard, A. (2002). Methylation of histone H3 by COMPASS requires ubiquitination of histone H2B by Rad6. *J Biol Chem* 277, 28368-28371.
- Downey, M., Knight, B., Vashisht, A.A., Seller, C.A., Wohlschlegel, J.A., Shore, D., and Toczyski, D.P. (2013a). Gcn5 and sirtuins regulate acetylation of the ribosomal protein transcription factor Ifh1. *Curr Biol* 23, 1638-1648.
- Downey, M., Knight, B., Vashisht, A.A., Seller, C.A., Wohlschlegel, J.A., Shore, D., and Toczyski, D.P. (2013b). Gcn5 and sirtuins regulate acetylation of the ribosomal protein transcription factor Ifh1. *Curr Biol* 23, 1638-1648.
- Doyon, Y., and Cote, J. (2004). The highly conserved and multifunctional NuA4 HAT complex. *Curr Opin Genet Dev* 14, 147-154.
- Drouin, S., Laramee, L., Jacques, P.E., Forest, A., Bergeron, M., and Robert, F. (2010). DSIF and RNA polymerase II CTD phosphorylation coordinate the recruitment of Rpd3S to actively transcribed genes. *PLoS Genet* 6, e1001173.
- Drozdova, P.B., Radchenko, E.A., Rogozha, T.M., Khokhrina, M.A., and Mironova, L.N. (2013). [SFP1 controls translation termination in *Saccharomyces cerevisiae* via regulation of the Sup35p (eRF3) level]. *Molekuliarnaia biologiiia* 47, 275-281.
- Duncan, E.M., Muratore-Schroeder, T.L., Cook, R.G., Garcia, B.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Allis, C.D. (2008). Cathepsin L proteolytically processes histone H3 during mouse embryonic stem cell differentiation. *Cell* 135, 284-294.
- Durairaj, G., Sen, R., Uprety, B., Shukla, A., and Bhaumik, S.R. (2014). Sus1p facilitates pre-initiation complex formation at the SAGA-regulated genes independently of histone H2B de-ubiquitylation. *J Mol Biol* 426, 2928-2941.
- Dynlacht, B.D., Hoey, T., and Tjian, R. (1991). Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation. *Cell* 66, 563-576.
- Egloff, S., Dienstbier, M., and Murphy, S. (2012). Updating the RNA polymerase CTD code: adding gene-specific layers. *Trends Genet* 28, 333-341.
- Eichten, S.R., Schmitz, R.J., and Springer, N.M. (2014). Epigenetics: Beyond Chromatin Modifications and Complex Genetic Regulation. *Plant Physiol* 165, 933-947.
- Eissenberg, J.C., and Shilatifard, A. (2010). Histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation in development and differentiation. *Dev Biol* 339, 240-249.
- Ellisdon, A.M., Dimitrova, L., Hurt, E., and Stewart, M. (2012). Structural basis for the assembly and nucleic acid binding of the TREX-2 transcription-export complex. *Nat Struct Mol Biol* 19, 328-336.
- Emre, N.C., Ingvarsdottir, K., Wyce, A., Wood, A., Krogan, N.J., Henry, K.W., Li, K., Marmorstein, R., Greenblatt, J.F., Shilatifard, A., *et al.* (2005). Maintenance of low histone ubiquitylation by Ubp10 correlates with telomere-proximal Sir2 association and gene silencing. *Mol Cell* 17, 585-594.

- Epstein, C.B., Waddle, J.A., Hale, W.t., Dave, V., Thornton, J., Macatee, T.L., Garner, H.R., and Butow, R.A. (2001). Genome-wide responses to mitochondrial dysfunction. *Mol Biol Cell* 12, 297-308.
- Erokhin, M., Parshikov, A., Georgiev, P., and Chetverina, D. (2010). E(y)2/Sus1 is required for blocking PRE silencing by the Wari insulator in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* 119, 243-253.
- Faza, M.B., Kemmler, S., Jimeno, S., Gonzalez-Aguilera, C., Aguilera, A., Hurt, E., and Panse, V.G. (2009). Sem1 is a functional component of the nuclear pore complex-associated messenger RNA export machinery. *J Cell Biol* 184, 833-846.
- Faza, M.B., Kemmler, S., and Panse, V.G. (2010). Sem1: a versatile "molecular glue"? *Nucleus* 1, 12-17.
- Fernandez-Tornero, C., Bottcher, B., Rashid, U.J., and Muller, C.W. (2011). Analyzing RNA polymerase III by electron cryomicroscopy. *RNA Biol* 8, 760-765.
- Fernandez-Tornero, C., Bottcher, B., Rashid, U.J., Steuerwald, U., Florchinger, B., Devos, D.P., Lindner, D., and Muller, C.W. (2010). Conformational flexibility of RNA polymerase III during transcriptional elongation. *Embo J* 29, 3762-3772.
- Fernandez-Tornero, C., Bottcher, B., Riva, M., Carles, C., Steuerwald, U., Ruigrok, R.W., Sentenac, A., Muller, C.W., and Schoehn, G. (2007). Insights into transcription initiation and termination from the electron microscopy structure of yeast RNA polymerase III. *Mol Cell* 25, 813-823.
- Fingerman, I., Nagaraj, V., Norris, D., and Vershon, A.K. (2003). Sfp1 plays a key role in yeast ribosome biogenesis. *Eukaryot Cell* 2, 1061-1068.
- Fischer, G., Bang, H., and Mech, C. (1984). [Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides]. *Biomed Biochim Acta* 43, 1101-1111.
- Fischer, T., Rodriguez-Navarro, S., Pereira, G., Racz, A., Schiebel, E., and Hurt, E. (2004). Yeast centrin Cdc31 is linked to the nuclear mRNA export machinery. *Nat Cell Biol* 6, 840-848.
- Fischer, T., Strasser, K., Racz, A., Rodriguez-Navarro, S., Oppizzi, M., Ihrig, P., Lechner, J., and Hurt, E. (2002). The mRNA export machinery requires the novel Sac3p-Thp1p complex to dock at the nucleoplasmic entrance of the nuclear pores. *Embo J* 21, 5843-5852.
- Fleming, A.B., Kao, C.F., Hillyer, C., Pikaart, M., and Osley, M.A. (2008). H2B ubiquitylation plays a role in nucleosome dynamics during transcription elongation. *Mol Cell* 31, 57-66.
- Folkmann, A.W., Noble, K.N., Cole, C.N., and Wentz, S.R. (2011). Dbp5, Gle1-IP6 and Nup159: a working model for mRNP export. *Nucleus* 2, 540-548.
- Fromont-Racine, M., Senger, B., Saveanu, C., and Fasiolo, F. (2003). Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene* 313, 17-42.

- Fuchs, G., and Oren, M. (2014). Writing and reading H2B monoubiquitylation. *Biochim Biophys Acta* 1839, 694-701.
- Fuchs, S.M., Laribee, R.N., and Strahl, B.D. (2009). Protein modifications in transcription elongation. *Biochim Biophys Acta* 1789, 26-36.
- Funakoshi, M., Li, X., Velichutina, I., Hochstrasser, M., and Kobayashi, H. (2004). Sem1, the yeast ortholog of a human BRCA2-binding protein, is a component of the proteasome regulatory particle that enhances proteasome stability. *J Cell Sci* 117, 6447-6454.
- Gallardo, M., Luna, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Aguilera, A. (2003). Nab2p and the Thp1p-Sac3p complex functionally interact at the interface between transcription and mRNA metabolism. *J Biol Chem* 278, 24225-24232.
- García-Oliver, E. (2013). Tesis Doctoral: Papel de Sus1 y proteínas relacionadas en el proceso de expresión génica. In Centro de Investigación Príncipe Felipe (Valencia).
- García-Oliver, E., Pascual-García, P., García-Molinero, V., Lenstra, T.L., Holstege, F.C., and Rodríguez-Navarro, S. (2013). A novel role for Sem1 and TREX-2 in transcription involves their impact on recruitment and H2B deubiquitylation activity of SAGA. *Nucleic Acids Res* 41, 5655-5668.
- Gardner, R.G., Nelson, Z.W., and Gottschling, D.E. (2005). Ubp10/Dot4p regulates the persistence of ubiquitinated histone H2B: distinct roles in telomeric silencing and general chromatin. *Mol Cell Biol* 25, 6123-6139.
- Gasch, A.P., and Werner-Washburne, M. (2002). The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation. *Functional & integrative genomics* 2, 181-192.
- Gavin, A.C., Aloy, P., Grandi, P., Krause, R., Boesche, M., Marzioch, M., Rau, C., Jensen, L.J., Bastuck, S., Dumpelfeld, B., *et al.* (2006). Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature* 440, 631-636.
- Gavin, A.C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J.M., Michon, A.M., Cruciat, C.M., *et al.* (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415, 141-147.
- Geiger, S.R., Lorenzen, K., Schreieck, A., Hanecker, P., Kostrewa, D., Heck, A.J., and Cramer, P. (2010). RNA polymerase I contains a TFIIF-related DNA-binding subcomplex. *Mol Cell* 39, 583-594.
- Gerasimova, T.I., Byrd, K., and Corces, V.G. (2000). A chromatin insulator determines the nuclear localization of DNA. *Mol Cell* 6, 1025-1035.
- Ghosh, S., and Pugh, B.F. (2011). Sequential recruitment of SAGA and TFIID in a genomic response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 31, 190-202.

- Gietz, R.D., and Sugino, A. (1988). New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* 74, 527-534.
- Gietz, R.D., and Woods, R.A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* 350, 87-96.
- Gilbert, W., and Guthrie, C. (2004). The Glc7p nuclear phosphatase promotes mRNA export by facilitating association of Mex67p with mRNA. *Mol Cell* 13, 201-212.
- Gingold, H., Dahan, O., and Pilpel, Y. (2012). Dynamic changes in translational efficiency are deduced from codon usage of the transcriptome. *Nucleic Acids Res* 40, 10053-10063.
- Ginsburg, D.S., Govind, C.K., and Hinnebusch, A.G. (2009). NuA4 lysine acetyltransferase Esa1 is targeted to coding regions and stimulates transcription elongation with Gcn5. *Mol Cell Biol* 29, 6473-6487.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., *et al.* (1996). Life with 6000 genes. *Science* 274, 546, 563-547.
- Gomez-Herreros, F., de Miguel-Jimenez, L., Morillo-Huesca, M., Delgado-Ramos, L., Munoz-Centeno, M.C., and Chavez, S. (2012). TFIIS is required for the balanced expression of the genes encoding ribosomal components under transcriptional stress. *Nucleic Acids Res* 40, 6508-6519.
- Gonzalez-Aguilera, C., Tous, C., Gomez-Gonzalez, B., Huertas, P., Luna, R., and Aguilera, A. (2008). The THP1-SAC3-SUS1-CDC31 complex works in transcription elongation-mRNA export preventing RNA-mediated genome instability. *Mol Biol Cell* 19, 4310-4318.
- Goulet, B., Baruch, A., Moon, N.S., Poirier, M., Sansregret, L.L., Erickson, A., Bogyo, M., and Nepveu, A. (2004). A cathepsin L isoform that is devoid of a signal peptide localizes to the nucleus in S phase and processes the CDP/Cux transcription factor. *Mol Cell* 14, 207-219.
- Govind, C.K., Qiu, H., Ginsburg, D.S., Ruan, C., Hofmeyer, K., Hu, C., Swaminathan, V., Workman, J.L., Li, B., and Hinnebusch, A.G. (2010). Phosphorylated Pol II CTD recruits multiple HDACs, including Rpd3C(S), for methylation-dependent deacetylation of ORF nucleosomes. *Mol Cell* 39, 234-246.
- Govind, C.K., Zhang, F., Qiu, H., Hofmeyer, K., and Hinnebusch, A.G. (2007a). Gcn5 promotes acetylation, eviction, and methylation of nucleosomes in transcribed coding regions. *Mol Cell* 25, 31-42.
- Govind, C.K., Zhang, F., Qiu, H., Hofmeyer, K., and Hinnebusch, A.G. (2007b). Gcn5 promotes acetylation, eviction, and methylation of nucleosomes in transcribed coding regions. *Mol Cell* 25, 31-42.
- Grant, P.A., Duggan, L., Cote, J., Roberts, S.M., Brownell, J.E., Candau, R., Ohba, R., Owen-Hughes, T., Allis, C.D., Winston, F., *et al.* (1997). Yeast Gcn5 functions in

- two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev* 11, 1640-1650.
- Grant, P.A., Schieltz, D., Pray-Grant, M.G., Steger, D.J., Reese, J.C., Yates, J.R., 3rd, and Workman, J.L. (1998a). A subset of TAF(II)s are integral components of the SAGA complex required for nucleosome acetylation and transcriptional stimulation. *Cell* 94, 45-53.
- Grant, P.A., Schieltz, D., Pray-Grant, M.G., Yates, J.R., 3rd, and Workman, J.L. (1998b). The ATM-related cofactor Tra1 is a component of the purified SAGA complex. *Mol Cell* 2, 863-867.
- Grau, B., Popescu, C., Torroja, L., Ortuno-Sahagun, D., Boros, I., and Ferrus, A. (2008). Transcriptional adaptor ADA3 of *Drosophila melanogaster* is required for histone modification, position effect variegation, and transcription. *Mol Cell Biol* 28, 376-385.
- Green, E.M., Mas, G., Young, N.L., Garcia, B.A., and Gozani, O. (2012). Methylation of H4 lysines 5, 8 and 12 by yeast Set5 calibrates chromatin stress responses. *Nat Struct Mol Biol* 19, 361-363.
- Grunstein, M., Hecht, A., Fisher-Adams, G., Wan, J., Mann, R.K., Strahl-Bolsinger, S., Laroche, T., and Gasser, S. (1995). The regulation of euchromatin and heterochromatin by histones in yeast. *J Cell Sci Suppl* 19, 29-36.
- Haeusler, R.A., Pratt-Hyatt, M., Good, P.D., Gipson, T.A., and Engelke, D.R. (2008). Clustering of yeast tRNA genes is mediated by specific association of condensin with tRNA gene transcription complexes. *Genes Dev* 22, 2204-2214.
- Haimovich, G., Medina, D.A., Causse, S.Z., Garber, M., Millan-Zambrano, G., Barkai, O., Chavez, S., Perez-Ortin, J.E., Darzacq, X., and Choder, M. (2013). Gene expression is circular: factors for mRNA degradation also foster mRNA synthesis. *Cell* 153, 1000-1011.
- Hampsey, M., Singh, B.N., Ansari, A., Laine, J.P., and Krishnamurthy, S. (2011). Control of eukaryotic gene expression: gene loops and transcriptional memory. *Adv Enzyme Regul* 51, 118-125.
- Hansen, J.C. (2002). Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 31, 361-392.
- Harding, M.W., Galat, A., Uehling, D.E., and Schreiber, S.L. (1989). A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase. *Nature* 341, 758-760.
- Hardwick, J.S., Kuruvilla, F.G., Tong, J.K., Shamji, A.F., and Schreiber, S.L. (1999). Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signaling pathways directly controlled by the Tor proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14866-14870.

- Hartzog, G.A., and Fu, J. (2013). The Spt4-Spt5 complex: a multi-faceted regulator of transcription elongation. *Biochim Biophys Acta* 1829, 105-115.
- Hayakawa, A., Babour, A., Sengmanivong, L., and Dargemont, C. (2012). Ubiquitylation of the nuclear pore complex controls nuclear migration during mitosis in *S. cerevisiae*. *J Cell Biol* 196, 19-27.
- Heitman, J., Movva, N.R., and Hall, M.N. (1991a). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 253, 905-909.
- Heitman, J., Movva, N.R., Hiestand, P.C., and Hall, M.N. (1991b). FK 506-binding protein proline rotamase is a target for the immunosuppressive agent FK 506 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 1948-1952.
- Helliwell, S.B., Howald, I., Barbet, N., and Hall, M.N. (1998). TOR2 is part of two related signaling pathways coordinating cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 148, 99-112.
- Helliwell, S.B., Wagner, P., Kunz, J., Deuter-Reinhard, M., Henriquez, R., and Hall, M.N. (1994). TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast. *Mol Biol Cell* 5, 105-118.
- Hellmuth, K., Lau, D.M., Bischoff, F.R., Kunzler, M., Hurt, E., and Simos, G. (1998). Yeast Los1p has properties of an exportin-like nucleocytoplasmic transport factor for tRNA. *Mol Cell Biol* 18, 6374-6386.
- Helmlinger, D., Marguerat, S., Villen, J., Gygi, S.P., Bahler, J., and Winston, F. (2008). The *S. pombe* SAGA complex controls the switch from proliferation to sexual differentiation through the opposing roles of its subunits Gcn5 and Spt8. *Genes Dev* 22, 3184-3195.
- Henry, K.W., Wyce, A., Lo, W.S., Duggan, L.J., Emre, N.C., Kao, C.F., Pillus, L., Shilatifard, A., Osley, M.A., and Berger, S.L. (2003). Transcriptional activation via sequential histone H2B ubiquitylation and deubiquitylation, mediated by SAGA-associated Ubp8. *Genes Dev* 17, 2648-2663.
- Hoelz, A., Debler, E.W., and Blobel, G. (2011). The structure of the nuclear pore complex. *Annu Rev Biochem* 80, 613-643.
- Hoke, S.M., Liang, G., Mutiu, A.I., Genereaux, J., and Brandl, C.J. (2007). C-terminal processing of yeast Spt7 occurs in the absence of functional SAGA complex. *BMC Biochem* 8, 16.
- Holmes, K.J., Klass, D.M., Guiney, E.L., and Cyert, M.S. (2013). Whi3, an *S. cerevisiae* RNA-binding protein, is a component of stress granules that regulates levels of its target mRNAs. *PLoS One* 8, e84060.
- Hota, S.K., and Bartholomew, B. (2011). Diversity of operation in ATP-dependent chromatin remodelers. *Biochim Biophys Acta* 1809, 476-487.
- Huh, W.K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., and O'Shea, E.K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425, 686-691.

- Huisinga, K.L., and Pugh, B.F. (2004). A genome-wide housekeeping role for TFIID and a highly regulated stress-related role for SAGA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* 13, 573-585.
- Hull, M.W., Erickson, J., Johnston, M., and Engelke, D.R. (1994). tRNA genes as transcriptional repressor elements. *Mol Cell Biol* 14, 1266-1277.
- Hurt, J.A., and Silver, P.A. (2008). mRNA nuclear export and human disease. *Dis Model Mech* 1, 103-108.
- Hwang, W.W., Venkatasubrahmanyam, S., Ianculescu, A.G., Tong, A., Boone, C., and Madhani, H.D. (2003). A conserved RING finger protein required for histone H2B monoubiquitination and cell size control. *Mol Cell* 11, 261-266.
- Hymes, J., Fleischhauer, K., and Wolf, B. (1995). Biotinylation of histones by human serum biotinidase: assessment of biotinyl-transferase activity in sera from normal individuals and children with biotinidase deficiency. *Biochem Mol Med* 56, 76-83.
- Ikegami, K., and Lieb, J.D. (2013). Integral nuclear pore proteins bind to Pol III-transcribed genes and are required for Pol III transcript processing in *C. elegans*. *Mol Cell* 51, 840-849.
- Ingvarsdottir, K., Krogan, N.J., Emre, N.C., Wyce, A., Thompson, N.J., Emili, A., Hughes, T.R., Greenblatt, J.F., and Berger, S.L. (2005). H2B ubiquitin protease Ubp8 and Sgf11 constitute a discrete functional module within the *Saccharomyces cerevisiae* SAGA complex. *Mol Cell Biol* 25, 1162-1172.
- Ishihama, Y., Oda, Y., Tabata, T., Sato, T., Nagasu, T., Rappsilber, J., and Mann, M. (2005). Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol Cell Proteomics* 4, 1265-1272.
- Ishii, K., Arib, G., Lin, C., Van Houwe, G., and Laemmli, U.K. (2002). Chromatin boundaries in budding yeast: the nuclear pore connection. *Cell* 109, 551-562.
- Jacobson, S., and Pillus, L. (2009). The SAGA subunit Ada2 functions in transcriptional silencing. *Mol Cell Biol* 29, 6033-6045.
- Jamali, T., Jamali, Y., Mehrbod, M., and Mofrad, M.R. (2011). Nuclear pore complex: biochemistry and biophysics of nucleocytoplasmic transport in health and disease. *Int Rev Cell Mol Biol* 287, 233-286.
- Jani, D., Lutz, S., Hurt, E., Laskey, R.A., Stewart, M., and Wickramasinghe, V.O. (2012). Functional and structural characterization of the mammalian TREX-2 complex that links transcription with nuclear messenger RNA export. *Nucleic Acids Res* 40, 4562-4573.
- Jani, D., Lutz, S., Marshall, N.J., Fischer, T., Kohler, A., Ellisdon, A.M., Hurt, E., and Stewart, M. (2009). Sus1, Cdc31, and the Sac3 CID region form a conserved interaction platform that promotes nuclear pore association and mRNA export. *Mol Cell* 33, 727-737.

- Jansen, R., Yu, H., Greenbaum, D., Kluger, Y., Krogan, N.J., Chung, S., Emili, A., Snyder, M., Greenblatt, J.F., and Gerstein, M. (2003). A Bayesian networks approach for predicting protein-protein interactions from genomic data. *Science* 302, 449-453.
- Jia, Y., Rothermel, B., Thornton, J., and Butow, R.A. (1997). A basic helix-loop-helix-leucine zipper transcription complex in yeast functions in a signaling pathway from mitochondria to the nucleus. *Mol Cell Biol* 17, 1110-1117.
- Jimeno, S., Rondon, A.G., Luna, R., and Aguilera, A. (2002). The yeast THO complex and mRNA export factors link RNA metabolism with transcription and genome instability. *Embo J* 21, 3526-3535.
- Jimeno-Gonzalez, S., Gomez-Herreros, F., Alepuz, P.M., and Chavez, S. (2006). A gene-specific requirement for FACT during transcription is related to the chromatin organization of the transcribed region. *Mol Cell Biol* 26, 8710-8721.
- Johnson, C., Primorac, D., McKinstry, M., McNeil, J., Rowe, D., and Lawrence, J.B. (2000). Tracking COL1A1 RNA in osteogenesis imperfecta. splice-defective transcripts initiate transport from the gene but are retained within the SC35 domain. *J Cell Biol* 150, 417-432.
- Johnsson, A., Durand-Dubief, M., Xue-Franzen, Y., Ronnerblad, M., Ekwall, K., and Wright, A. (2009). HAT-HDAC interplay modulates global histone H3K14 acetylation in gene-coding regions during stress. *EMBO Rep* 10, 1009-1014.
- Jordan A (2013). Tesis Doctoral. BIOGRO: Un nuevo método de alta resolución para el estudio de la transcripción naciente a escala genómica en levadura. In Departamento de Bioquímica y Biología molecular (Universidad de Valencia).
- Jorgensen, P., Nishikawa, J.L., Breikreutz, B.J., and Tyers, M. (2002). Systematic identification of pathways that couple cell growth and division in yeast. *Science* 297, 395-400.
- Jorgensen, P., Rupes, I., Sharom, J.R., Schneper, L., Broach, J.R., and Tyers, M. (2004). A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size. *Genes Dev* 18, 2491-2505.
- Joshi, A.A., and Struhl, K. (2005). Eaf3 chromodomain interaction with methylated H3-K36 links histone deacetylation to Pol II elongation. *Mol Cell* 20, 971-978.
- Jung, I., Kim, S.K., Kim, M., Han, Y.M., Kim, Y.S., Kim, D., and Lee, D. (2012). H2B monoubiquitylation is a 5'-enriched active transcription mark and correlates with exon-intron structure in human cells. *Genome Res* 22, 1026-1035.
- Kanaya, S., Yamada, Y., Kinouchi, M., Kudo, Y., and Ikemura, T. (2001). Codon usage and tRNA genes in eukaryotes: correlation of codon usage diversity with translation efficiency and with CG-dinucleotide usage as assessed by multivariate analysis. *J Mol Evol* 53, 290-298.
- Kao, C.F., Hillyer, C., Tsukuda, T., Henry, K., Berger, S., and Osley, M.A. (2004). Rad6 plays a role in transcriptional activation through ubiquitylation of histone H2B. *Genes Dev* 18, 184-195.

- Kassavetis, G.A., and Geiduschek, E.P. (2006). Transcription factor TFIIB and transcription by RNA polymerase III. *Biochem Soc Trans* 34, 1082-1087.
- Keith, C.T., and Schreiber, S.L. (1995). PIK-related kinases: DNA repair, recombination, and cell cycle checkpoints. *Science* 270, 50-51.
- Kenneth, N.S., Ramsbottom, B.A., Gomez-Roman, N., Marshall, L., Cole, P.A., and White, R.J. (2007). TRRAP and GCN5 are used by c-Myc to activate RNA polymerase III transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 14917-14922.
- Keogh, M.C., Kurdistani, S.K., Morris, S.A., Ahn, S.H., Podolny, V., Collins, S.R., Schuldiner, M., Chin, K., Punna, T., Thompson, N.J., *et al.* (2005). Cotranscriptional set2 methylation of histone H3 lysine 36 recruits a repressive Rpd3 complex. *Cell* 123, 593-605.
- Kim, J., Guermah, M., McGinty, R.K., Lee, J.S., Tang, Z., Milne, T.A., Shilatifard, A., Muir, T.W., and Roeder, R.G. (2009). RAD6-Mediated transcription-coupled H2B ubiquitylation directly stimulates H3K4 methylation in human cells. *Cell* 137, 459-471.
- Kim, J.H., Saraf, A., Florens, L., Washburn, M., and Workman, J.L. (2010). Gcn5 regulates the dissociation of SWI/SNF from chromatin by acetylation of Swi2/Snf2. *Genes Dev* 24, 2766-2771.
- Kim, S., Li, Q., Dang, C.V., and Lee, L.A. (2000). Induction of ribosomal genes and hepatocyte hypertrophy by adenovirus-mediated expression of c-Myc in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 11198-11202.
- Kim, S., Ohkuni, K., Couplan, E., and Jazwinski, S.M. (2004). The histone acetyltransferase GCN5 modulates the retrograde response and genome stability determining yeast longevity. *Biogerontology* 5, 305-316.
- Kim, T., and Buratowski, S. (2009). Dimethylation of H3K4 by Set1 recruits the Set3 histone deacetylase complex to 5' transcribed regions. *Cell* 137, 259-272.
- Kimura, A., Umehara, T., and Horikoshi, M. (2002). Chromosomal gradient of histone acetylation established by Sas2p and Sir2p functions as a shield against gene silencing. *Nat Genet* 32, 370-377.
- Kinsey, P.T., and Sandmeyer, S.B. (1991). Adjacent pol II and pol III promoters: transcription of the yeast retrotransposon Ty3 and a target tRNA gene. *Nucleic Acids Res* 19, 1317-1324.
- Kleff, S., Andrulis, E.D., Anderson, C.W., and Sternglanz, R. (1995). Identification of a gene encoding a yeast histone H4 acetyltransferase. *J Biol Chem* 270, 24674-24677.
- Klose, R.J., Gardner, K.E., Liang, G., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Zhang, Y. (2007). Demethylation of histone H3K36 and H3K9 by Rph1: a vestige of an H3K9 methylation system in *Saccharomyces cerevisiae*? *Mol Cell Biol* 27, 3951-3961.
- Kohler, A., Cascio, P., Leggett, D.S., Woo, K.M., Goldberg, A.L., and Finley, D. (2001). The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. *Mol Cell* 7, 1143-1152.

- Kohler, A., and Hurt, E. (2007). Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 761-773.
- Kohler, A., Pascual-Garcia, P., Llopis, A., Zapater, M., Posas, F., Hurt, E., and Rodriguez-Navarro, S. (2006). The mRNA export factor Sus1 is involved in Spt/Ada/Gcn5 acetyltransferase-mediated H2B deubiquitinylation through its interaction with Ubp8 and Sgf11. *Mol Biol Cell* 17, 4228-4236.
- Kohler, A., Schneider, M., Cabal, G.G., Nehrbass, U., and Hurt, E. (2008). Yeast Ataxin-7 links histone deubiquitination with gene gating and mRNA export. *Nat Cell Biol* 10, 707-715.
- Kohler, A., Zimmerman, E., Schneider, M., Hurt, E., and Zheng, N. (2010). Structural basis for assembly and activation of the heterotetrameric SAGA histone H2B deubiquitinase module. *Cell* 141, 606-617.
- Komili, S., and Silver, P.A. (2008). Coupling and coordination in gene expression processes: a systems biology view. *Nat Rev Genet* 9, 38-48.
- Kopytova, D.V., Orlova, A.V., Krasnov, A.N., Gurskiy, D.Y., Nikolenko, J.V., Nabirochkina, E.N., Shidlovskii, Y.V., and Georgieva, S.G. (2010). Multifunctional factor ENY2 is associated with the THO complex and promotes its recruitment onto nascent mRNA. *Genes Dev* 24, 86-96.
- Kornberg, R.D. (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 184, 868-871.
- Koutelou, E., Hirsch, C.L., and Dent, S.Y. (2010). Multiple faces of the SAGA complex. *Curr Opin Cell Biol* 22, 374-382.
- Krebs, J.E. (2007). Moving marks: dynamic histone modifications in yeast. *Mol Biosyst* 3, 590-597.
- Krogan, N.J., Dover, J., Wood, A., Schneider, J., Heidt, J., Boateng, M.A., Dean, K., Ryan, O.W., Golshani, A., Johnston, M., *et al.* (2003a). The Paf1 complex is required for histone H3 methylation by COMPASS and Dot1p: linking transcriptional elongation to histone methylation. *Mol Cell* 11, 721-729.
- Krogan, N.J., and Greenblatt, J.F. (2001). Characterization of a six-subunit holo-elongator complex required for the regulated expression of a group of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 21, 8203-8212.
- Krogan, N.J., Kim, M., Tong, A., Golshani, A., Cagney, G., Canadien, V., Richards, D.P., Beattie, B.K., Emili, A., Boone, C., *et al.* (2003b). Methylation of histone H3 by Set2 in *Saccharomyces cerevisiae* is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 23, 4207-4218.
- Kumar, Y., and Bhargava, P. (2013). A unique nucleosome arrangement, maintained actively by chromatin remodelers facilitates transcription of yeast tRNA genes. *BMC Genomics* 14, 402.
- Kundu, S., Horn, P.J., and Peterson, C.L. (2007). SWI/SNF is required for transcriptional memory at the yeast GAL gene cluster. *Genes Dev* 21, 997-1004.

- Kunz, J., Henriquez, R., Schneider, U., Deuter-Reinhard, M., Movva, N.R., and Hall, M.N. (1993). Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. *Cell* 73, 585-596.
- Kuo, M.H., Brownell, J.E., Sobel, R.E., Ranalli, T.A., Cook, R.G., Edmondson, D.G., Roth, S.Y., and Allis, C.D. (1996). Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines. *Nature* 383, 269-272.
- Kuranda, K., Leberre, V., Sokol, S., Palamarczyk, G., and Francois, J. (2006). Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. *Mol Microbiol* 61, 1147-1166.
- Kurshakova, M., Maksimenko, O., Golovnin, A., Pulina, M., Georgieva, S., Georgiev, P., and Krasnov, A. (2007). Evolutionarily conserved E(y)2/Sus1 protein is essential for the barrier activity of Su(Hw)-dependent insulators in *Drosophila*. *Mol Cell* 27, 332-338.
- Lancot, C., Cheutin, T., Cremer, M., Cavalli, G., and Cremer, T. (2007). Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nat Rev Genet* 8, 104-115.
- Landrieux, E., Alic, N., Ducrot, C., Acker, J., Riva, M., and Carles, C. (2006). A subcomplex of RNA polymerase III subunits involved in transcription termination and reinitiation. *Embo J* 25, 118-128.
- Lang, G., Bonnet, J., Umlauf, D., Karmodiya, K., Koffler, J., Stierle, M., Devys, D., and Tora, L. (2011). The tightly controlled deubiquitination activity of the human SAGA complex differentially modifies distinct gene regulatory elements. *Mol Cell Biol* 31, 3734-3744.
- Lee, C.K., Shibata, Y., Rao, B., Strahl, B.D., and Lieb, J.D. (2004). Evidence for nucleosome depletion at active regulatory regions genome-wide. *Nat Genet* 36, 900-905.
- Lee, J.S., Shukla, A., Schneider, J., Swanson, S.K., Washburn, M.P., Florens, L., Bhaumik, S.R., and Shilatifard, A. (2007a). Histone crosstalk between H2B monoubiquitination and H3 methylation mediated by COMPASS. *Cell* 131, 1084-1096.
- Lee, K.K., Florens, L., Swanson, S.K., Washburn, M.P., and Workman, J.L. (2005). The deubiquitylation activity of Ubp8 is dependent upon Sgf11 and its association with the SAGA complex. *Mol Cell Biol* 25, 1173-1182.
- Lee, K.K., Sardiou, M.E., Swanson, S.K., Gilmore, J.M., Torok, M., Grant, P.A., Florens, L., Workman, J.L., and Washburn, M.P. (2011). Combinatorial depletion analysis to assemble the network architecture of the SAGA and ADA chromatin remodeling complexes. *Mol Syst Biol* 7, 503.
- Lee, K.K., Swanson, S.K., Florens, L., Washburn, M.P., and Workman, J.L. (2009). Yeast Sgf73/Ataxin-7 serves to anchor the deubiquitination module into both SAGA and Slik(SALSA) HAT complexes. *Epigenetics Chromatin* 2, 2.

- Lee, S.K., Fletcher, A.G., Zhang, L., Chen, X., Fischbeck, J.A., and Stargell, L.A. (2010). Activation of a poised RNAPII-dependent promoter requires both SAGA and mediator. *Genetics* 184, 659-672.
- Lee, T.I., Causton, H.C., Holstege, F.C., Shen, W.C., Hannett, N., Jennings, E.G., Winston, F., Green, M.R., and Young, R.A. (2000). Redundant roles for the TFIID and SAGA complexes in global transcription. *Nature* 405, 701-704.
- Lee, W., Tillo, D., Bray, N., Morse, R.H., Davis, R.W., Hughes, T.R., and Nislow, C. (2007b). A high-resolution atlas of nucleosome occupancy in yeast. *Nat Genet* 39, 1235-1244.
- Lei, E.P., and Silver, P.A. (2002). Intron status and 3'-end formation control cotranscriptional export of mRNA. *Genes Dev* 16, 2761-2766.
- Lempiainen, H., and Shore, D. (2009). Growth control and ribosome biogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 21, 855-863.
- Lempiainen, H., Uotila, A., Urban, J., Dohnal, I., Ammerer, G., Loewith, R., and Shore, D. (2009). Sfp1 interaction with TORC1 and Mrs6 reveals feedback regulation on TOR signaling. *Mol Cell* 33, 704-716.
- Lengronne, A., McIntyre, J., Katou, Y., Kanoh, Y., Hopfner, K.P., Shirahige, K., and Uhlmann, F. (2006). Establishment of sister chromatid cohesion at the *S. cerevisiae* replication fork. *Mol Cell* 23, 787-799.
- Lenstra, T.L., Benschop, J.J., Kim, T., Schulze, J.M., Brabers, N.A., Margaritis, T., van de Pasch, L.A., van Heesch, S.A., Brok, M.O., Groot Koerkamp, M.J., *et al.* (2011a). The specificity and topology of chromatin interaction pathways in yeast. *Mol Cell* 42, 536-549.
- Lenstra, T.L., Benschop, J.J., Kim, T., Schulze, J.M., Brabers, N.A., Margaritis, T., van de Pasch, L.A., van Heesch, S.A., Brok, M.O., Groot Koerkamp, M.J., *et al.* (2011b). The specificity and topology of chromatin interaction pathways in yeast. *Mol Cell* 42, 536-549.
- Lewis, J.D., and Izaurralde, E. (1997). The role of the cap structure in RNA processing and nuclear export. *Eur J Biochem* 247, 461-469.
- Li, H., Tsang, C.K., Watkins, M., Bertram, P.G., and Zheng, X.F. (2006). Nutrient regulates Tor1 nuclear localization and association with rDNA promoter. *Nature* 442, 1058-1061.
- Li, Y., Lin, A.W., Zhang, X., Wang, Y., Wang, X., and Goodrich, D.W. (2007). Cancer cells and normal cells differ in their requirements for Thoc1. *Cancer Res* 67, 6657-6664.
- Li, Z.H., Yu, Y., Du, C., Fu, H., Wang, J., and Tian, Y. (2013). RNA interference-mediated USP22 gene silencing promotes human brain glioma apoptosis and induces cell cycle arrest. *Oncol Lett* 5, 1290-1294.
- Liao, X., and Butow, R.A. (1993). RTG1 and RTG2: two yeast genes required for a novel path of communication from mitochondria to the nucleus. *Cell* 72, 61-71.

- Liebich, H.M., Gesele, E., Wirth, C., Woll, J., Jobst, K., and Lakatos, A. (1993). Non-enzymatic glycation of histones. *Biol Mass Spectrom* 22, 121-123.
- Liebman, S.W., and Chernoff, Y.O. (2012). Prions in yeast. *Genetics* 191, 1041-1072.
- Light, W.H., Brickner, D.G., Brand, V.R., and Brickner, J.H. (2010). Interaction of a DNA zip code with the nuclear pore complex promotes H2A.Z incorporation and INO1 transcriptional memory. *Mol Cell* 40, 112-125.
- Lim, J.P., and Brunet, A. (2013). Bridging the transgenerational gap with epigenetic memory. *Trends Genet* 29, 176-186.
- Lim, S., Kwak, J., Kim, M., and Lee, D. (2013). Separation of a functional deubiquitylating module from the SAGA complex by the proteasome regulatory particle. *Nat Commun* 4, 2641.
- Lin, Y.Y., Lu, J.Y., Zhang, J., Walter, W., Dang, W., Wan, J., Tao, S.C., Qian, J., Zhao, Y., Boeke, J.D., *et al.* (2009). Protein acetylation microarray reveals that NuA4 controls key metabolic target regulating gluconeogenesis. *Cell* 136, 1073-1084.
- Liu, L., Scolnick, D.M., Trievel, R.C., Zhang, H.B., Marmorstein, R., Halazonetis, T.D., and Berger, S.L. (1999). p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 19, 1202-1209.
- Loewith, R. (2011). A brief history of TOR. *Biochem Soc Trans* 39, 437-442.
- Loewith, R., and Hall, M.N. (2004). TOR signaling in yeast: temporal and spatial control of cell growth. *Cell Growth: Control of Cell Size* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 139-166.
- Loewith, R., and Hall, M.N. (2011). Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. *Genetics* 189, 1177-1201.
- Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J.L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P., and Hall, M.N. (2002). Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell* 10, 457-468.
- Lohr, D., Venkov, P., and Zlatanova, J. (1995). Transcriptional regulation in the yeast GAL gene family: a complex genetic network. *Faseb J* 9, 777-787.
- Longtine, M.S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., and Pringle, J.R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 953-961.
- Lu, K.P., Hanes, S.D., and Hunter, T. (1996). A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. *Nature* 380, 544-547.
- Luna, R., Gaillard, H., Gonzalez-Aguilera, C., and Aguilera, A. (2008). Biogenesis of mRNPs: integrating different processes in the eukaryotic nucleus. *Chromosoma* 117, 319-331.
- Luthra, R., Kerr, S.C., Harreman, M.T., Apponi, L.H., Fasken, M.B., Ramineni, S., Chaurasia, S., Valentini, S.R., and Corbett, A.H. (2007). Actively transcribed GAL

- genes can be physically linked to the nuclear pore by the SAGA chromatin modifying complex. *J Biol Chem* 282, 3042-3049.
- Ma, Z., Atencio, D., Barnes, C., DeFiglio, H., and Hanes, S.D. (2012). Multiple roles for the Ess1 prolyl isomerase in the RNA polymerase II transcription cycle. *Mol Cell Biol* 32, 3594-3607.
- Mahapatra, S., Dewari, P.S., Bhardwaj, A., and Bhargava, P. (2011). Yeast H2A.Z, FACT complex and RSC regulate transcription of tRNA gene through differential dynamics of flanking nucleosomes. *Nucleic Acids Res* 39, 4023-4034.
- Maksimenko, O., Kyrchanova, O., Bonchuk, A., Stakhov, V., Parshikov, A., and Georgiev, P. (2014). Highly conserved ENY2/Sus1 protein binds to Drosophila CTCF and is required for barrier activity. *Epigenetics* 9.
- Malagon, F., Tong, A.H., Shafer, B.K., and Strathern, J.N. (2004). Genetic interactions of DST1 in *Saccharomyces cerevisiae* suggest a role of TFIIS in the initiation-elongation transition. *Genetics* 166, 1215-1227.
- Marion, R.M., Regev, A., Segal, E., Barash, Y., Koller, D., Friedman, N., and O'Shea, E.K. (2004). Sfp1 is a stress- and nutrient-sensitive regulator of ribosomal protein gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14315-14322.
- Marques, M., Mojzita, D., Amorim, M.A., Almeida, T., Hohmann, S., Moradas-Ferreira, P., and Costa, V. (2006). The Pep4p vacuolar proteinase contributes to the turnover of oxidized proteins but PEP4 overexpression is not sufficient to increase chronological lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 152, 3595-3605.
- Martin, D.E., Soulard, A., and Hall, M.N. (2004). TOR regulates ribosomal protein gene expression via PKA and the Forkhead transcription factor FHL1. *Cell* 119, 969-979.
- Martinez, E., Palhan, V.B., Tjernberg, A., Lyman, E.S., Gamper, A.M., Kundu, T.K., Chait, B.T., and Roeder, R.G. (2001). Human STAGA complex is a chromatin-acetylating transcription coactivator that interacts with pre-mRNA splicing and DNA damage-binding factors in vivo. *Mol Cell Biol* 21, 6782-6795.
- Mason, D.A., Shulga, N., Undavai, S., Ferrando-May, E., Rexach, M.F., and Goldfarb, D.S. (2005). Increased nuclear envelope permeability and Pep4p-dependent degradation of nucleoporins during hydrogen peroxide-induced cell death. *FEMS Yeast Res* 5, 1237-1251.
- Mason, P.B., and Struhl, K. (2005). Distinction and relationship between elongation rate and processivity of RNA polymerase II in vivo. *Mol Cell* 17, 831-840.
- Mavrich, T.N., Ioshikhes, I.P., Venters, B.J., Jiang, C., Tomsho, L.P., Qi, J., Schuster, S.C., Albert, I., and Pugh, B.F. (2008). A barrier nucleosome model for statistical positioning of nucleosomes throughout the yeast genome. *Genome Res* 18, 1073-1083.

- Mayer, A., Lidschreiber, M., Siebert, M., Leike, K., Soding, J., and Cramer, P. (2010). Uniform transitions of the general RNA polymerase II transcription complex. *Nat Struct Mol Biol* 17, 1272-1278.
- Meaburn, K.J., and Misteli, T. (2007). Cell biology: chromosome territories. *Nature* 445, 379-781.
- Mekhail, K., and Moazed, D. (2010). The nuclear envelope in genome organization, expression and stability. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 317-328.
- Millar, C.B., and Grunstein, M. (2006). Genome-wide patterns of histone modifications in yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 657-666.
- Miller, T., Krogan, N.J., Dover, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Johnston, M., Greenblatt, J.F., and Shilatifard, A. (2001). COMPASS: a complex of proteins associated with a trithorax-related SET domain protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12902-12907.
- Minsky, N., Shema, E., Field, Y., Schuster, M., Segal, E., and Oren, M. (2008). Monoubiquitinated H2B is associated with the transcribed region of highly expressed genes in human cells. *Nat Cell Biol* 10, 483-488.
- Mischerikow, N., Spedale, G., Altelaar, A.F., Timmers, H.T., Pijnappel, W.W., and Heck, A.J. (2009). In-depth profiling of post-translational modifications on the related transcription factor complexes TFIID and SAGA. *J Proteome Res* 8, 5020-5030.
- Mizzen, C.A., Yang, X.J., Kokubo, T., Brownell, J.E., Bannister, A.J., Owen-Hughes, T., Workman, J., Wang, L., Berger, S.L., Kouzarides, T., *et al.* (1996). The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* 87, 1261-1270.
- Mohan, R.D., Dialynas, G., Weake, V.M., Liu, J., Martin-Brown, S., Florens, L., Washburn, M.P., Workman, J.L., and Abmayr, S.M. (2014). Loss of *Drosophila* Ataxin-7, a SAGA subunit, reduces H2B ubiquitination and leads to neural and retinal degeneration. *Genes Dev* 28, 259-272.
- Mohibullah, N., and Hahn, S. (2008). Site-specific cross-linking of TBP in vivo and in vitro reveals a direct functional interaction with the SAGA subunit Spt3. *Genes Dev* 22, 2994-3006.
- Nagy, P.L., Griesenbeck, J., Kornberg, R.D., and Cleary, M.L. (2002). A trithorax-group complex purified from *Saccharomyces cerevisiae* is required for methylation of histone H3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 90-94.
- Nakanishi, S., Lee, J.S., Gardner, K.E., Gardner, J.M., Takahashi, Y.H., Chandrasekharan, M.B., Sun, Z.W., Osley, M.A., Strahl, B.D., Jaspersen, S.L., *et al.* (2009). Histone H2BK123 monoubiquitination is the critical determinant for H3K4 and H3K79 trimethylation by COMPASS and Dot1. *J Cell Biol* 186, 371-377.
- Narlikar, G.J., Fan, H.Y., and Kingston, R.E. (2002). Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 108, 475-487.
- Nathan, D., Ingvarsdottir, K., Sterner, D.E., Bylebyl, G.R., Dokmanovic, M., Dorsey, J.A., Whelan, K.A., Krsmanovic, M., Lane, W.S., Meluh, P.B., *et al.* (2006). Histone

- sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications. *Genes Dev* 20, 966-976.
- Nathan, D., Sterner, D.E., and Berger, S.L. (2003). Histone modifications: Now summoning sumoylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13118-13120.
- Nedea, E., He, X., Kim, M., Pootoolal, J., Zhong, G., Canadien, V., Hughes, T., Buratowski, S., Moore, C.L., and Greenblatt, J. (2003). Organization and function of APT, a subcomplex of the yeast cleavage and polyadenylation factor involved in the formation of mRNA and small nucleolar RNA 3'-ends. *J Biol Chem* 278, 33000-33010.
- Nelson, C.J., Santos-Rosa, H., and Kouzarides, T. (2006). Proline isomerization of histone H3 regulates lysine methylation and gene expression. *Cell* 126, 905-916.
- Ng, H.H., Xu, R.M., Zhang, Y., and Struhl, K. (2002). Ubiquitination of histone H2B by Rad6 is required for efficient Dot1-mediated methylation of histone H3 lysine 79. *J Biol Chem* 277, 34655-34657.
- Nguyen, A.T., Xiao, B., Nepl, R.L., Kallin, E.M., Li, J., Chen, T., Wang, D.Z., Xiao, X., and Zhang, Y. (2011). DOT1L regulates dystrophin expression and is critical for cardiac function. *Genes Dev* 25, 263-274.
- Nijman, S.M., Luna-Vargas, M.P., Velds, A., Brummelkamp, T.R., Dirac, A.M., Sixma, T.K., and Bernards, R. (2005). A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* 123, 773-786.
- Ning, Z., Wang, A., Liang, J., Xie, Y., Liu, J., Yan, Q., and Wang, Z. (2014). USP22 promotes epithelial-mesenchymal transition via the FAK pathway in pancreatic cancer cells. *Oncol Rep* 32, 1451-1458.
- Nousiainen, H.O., Kestila, M., Pakkasjarvi, N., Honkala, H., Kuure, S., Tallila, J., Vuopala, K., Ignatius, J., Herva, R., and Peltonen, L. (2008). Mutations in mRNA export mediator GLE1 result in a fetal motoneuron disease. *Nat Genet* 40, 155-157.
- O'Sullivan, J.M., Tan-Wong, S.M., Morillon, A., Lee, B., Coles, J., Mellor, J., and Proudfoot, N.J. (2004). Gene loops juxtapose promoters and terminators in yeast. *Nat Genet* 36, 1014-1018.
- Oeffinger, M., Wei, K.E., Rogers, R., DeGrasse, J.A., Chait, B.T., Aitchison, J.D., and Rout, M.P. (2007). Comprehensive analysis of diverse ribonucleoprotein complexes. *Nature methods* 4, 951-956.
- Oki, M., Valenzuela, L., Chiba, T., Ito, T., and Kamakaka, R.T. (2004). Barrier proteins remodel and modify chromatin to restrict silenced domains. *Mol Cell Biol* 24, 1956-1967.
- Osley, M.A. (2004). H2B ubiquitylation: the end is in sight. *Biochim Biophys Acta* 1677, 74-78.
- Osley, M.A. (2006). Regulation of histone H2A and H2B ubiquitylation. *Brief Funct Genomic Proteomic* 5, 179-189.

- Osley, M.A., Fleming, A.B., and Kao, C.F. (2006). Histone ubiquitylation and the regulation of transcription. *Results Probl Cell Differ* 41, 47-75.
- Parker, R., and Sheth, U. (2007). P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell* 25, 635-646.
- Parthun, M.R., Widom, J., and Gottschling, D.E. (1996). The major cytoplasmic histone acetyltransferase in yeast: links to chromatin replication and histone metabolism. *Cell* 87, 85-94.
- Pascual-Garcia, P., and Capelson, M. (2014). Nuclear pores as versatile platforms for gene regulation. *Curr Opin Genet Dev* 25, 110-117.
- Pascual-Garcia, P., Govind, C.K., Queralt, E., Cuenca-Bono, B., Llopis, A., Chavez, S., Hinnebusch, A.G., and Rodriguez-Navarro, S. (2008). Sus1 is recruited to coding regions and functions during transcription elongation in association with SAGA and TREX2. *Genes Dev* 22, 2811-2822.
- Pavri, R., Zhu, B., Li, G., Trojer, P., Mandal, S., Shilatifard, A., and Reinberg, D. (2006). Histone H2B monoubiquitination functions cooperatively with FACT to regulate elongation by RNA polymerase II. *Cell* 125, 703-717.
- Pelechano, V., Chavez, S., and Perez-Ortin, J.E. (2010). A complete set of nascent transcription rates for yeast genes. *PLoS One* 5, e15442.
- Pereira, C., Chaves, S., Alves, S., Salin, B., Camougrand, N., Manon, S., Sousa, M.J., and Corte-Real, M. (2010). Mitochondrial degradation in acetic acid-induced yeast apoptosis: the role of Pep4 and the ADP/ATP carrier. *Mol Microbiol* 76, 1398-1410.
- Peterson, C.L., and Laniel, M.A. (2004). Histones and histone modifications. *Curr Biol* 14, R546-551.
- Peterson, C.L., and Workman, J.L. (2000). Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex. *Curr Opin Genet Dev* 10, 187-192.
- Pijnappel, W.W., Schaft, D., Roguev, A., Shevchenko, A., Tekotte, H., Wilm, M., Rigaut, G., Seraphin, B., Aasland, R., and Stewart, A.F. (2001). The *S. cerevisiae* SET3 complex includes two histone deacetylases, Hos2 and Hst1, and is a meiotic-specific repressor of the sporulation gene program. *Genes Dev* 15, 2991-3004.
- Pokholok, D.K., Harbison, C.T., Levine, S., Cole, M., Hannett, N.M., Lee, T.I., Bell, G.W., Walker, K., Rolfe, P.A., Herbolsheimer, E., *et al.* (2005). Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell* 122, 517-527.
- Pollard, K.J., and Peterson, C.L. (1997). Role for ADA/GCN5 products in antagonizing chromatin-mediated transcriptional repression. *Mol Cell Biol* 17, 6212-6222.
- Prather, D.M., Larschan, E., and Winston, F. (2005). Evidence that the elongation factor TFIIS plays a role in transcription initiation at GAL1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 25, 2650-2659.
- Pray-Grant, M.G., Schieltz, D., McMahon, S.J., Wood, J.M., Kennedy, E.L., Cook, R.G., Workman, J.L., Yates, J.R., 3rd, and Grant, P.A. (2002). The novel SLIK histone

- acetyltransferase complex functions in the yeast retrograde response pathway. *Mol Cell Biol* 22, 8774-8786.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., and Seraphin, B. (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* 24, 218-229.
- Qi, D., Larsson, J., and Mannervik, M. (2004). *Drosophila* Ada2b is required for viability and normal histone H3 acetylation. *Mol Cell Biol* 24, 8080-8089.
- Raab, J.R., Chiu, J., Zhu, J., Katzman, S., Kurukuti, S., Wade, P.A., Haussler, D., and Kamakaka, R.T. (2012). Human tRNA genes function as chromatin insulators. *Embo J* 31, 330-350.
- Radchenko, E., Rogoza, T., Khokhrina, M., Drozdova, P., and Mironova, L. (2011). SUP35 expression is enhanced in yeast containing [ISP+], a prion form of the transcriptional regulator Sfp1. *Prion* 5, 317-322.
- Rando, O.J., and Winston, F. (2012). Chromatin and transcription in yeast. *Genetics* 190, 351-387.
- Reed, R. (2003). Coupling transcription, splicing and mRNA export. *Curr Opin Cell Biol* 15, 326-331.
- Reifsnyder, C., Lowell, J., Clarke, A., and Pillus, L. (1996). Yeast SAS silencing genes and human genes associated with AML and HIV-1 Tat interactions are homologous with acetyltransferases. *Nat Genet* 14, 42-49.
- Reinke, A., Anderson, S., McCaffery, J.M., Yates, J., 3rd, Aronova, S., Chu, S., Fairclough, S., Iverson, C., Wedaman, K.P., and Powers, T. (2004). TOR complex 1 includes a novel component, Tco89p (YPL180w), and cooperates with Ssd1p to maintain cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 279, 14752-14762.
- Reiter, A., Steinbauer, R., Philippi, A., Gerber, J., Tschochner, H., Milkereit, P., and Griesenbeck, J. (2011). Reduction in ribosomal protein synthesis is sufficient to explain major effects on ribosome production after short-term TOR inactivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 31, 803-817.
- Rhee, H.S., and Pugh, B.F. (2012). ChIP-exo method for identifying genomic location of DNA-binding proteins with near-single-nucleotide accuracy. *Curr Protoc Mol Biol Chapter 21*, Unit 21 24.
- Ricci, A.R., Genereaux, J., and Brandl, C.J. (2002). Components of the SAGA histone acetyltransferase complex are required for repressed transcription of ARG1 in rich medium. *Mol Cell Biol* 22, 4033-4042.
- Rice, J.C., and Allis, C.D. (2001). Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr Opin Cell Biol* 13, 263-273.
- Robert, F., Pokholok, D.K., Hannett, N.M., Rinaldi, N.J., Chandy, M., Rolfe, A., Workman, J.L., Gifford, D.K., and Young, R.A. (2004). Global position and recruitment of HATs and HDACs in the yeast genome. *Mol Cell* 16, 199-209.

- Roberts, S.M., and Winston, F. (1997). Essential functional interactions of SAGA, a *Saccharomyces cerevisiae* complex of Spt, Ada, and Gcn5 proteins, with the Snf/Swi and Srb/mediator complexes. *Genetics* 147, 451-465.
- Rodriguez-Navarro, S., Fischer, T., Luo, M.J., Antunez, O., Brettschneider, S., Lechner, J., Perez-Ortin, J.E., Reed, R., and Hurt, E. (2004). Sus1, a functional component of the SAGA histone acetylase complex and the nuclear pore-associated mRNA export machinery. *Cell* 116, 75-86.
- Rogoza, T., Goginashvili, A., Rodionova, S., Ivanov, M., Viktorovskaya, O., Rubel, A., Volkov, K., and Mironova, L. (2010). Non-Mendelian determinant [ISP+] in yeast is a nuclear-residing prion form of the global transcriptional regulator Sfp1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 10573-10577.
- Rogoza, T.M., Viktorovskaia, O.V., Rodionova, S.A., Ivanov, M.S., Volkov, K.V., and Mironova, L.N. (2009). [Search for the genes critical for propagation of the prion-like antisuppressor determinant [ISP+] in yeast using insertion library]. *Molekuliarnaia biologii* 43, 392-399.
- Rondon, A.G., Jimeno, S., and Aguilera, A. (2010). The interface between transcription and mRNP export: from THO to THSC/TREX-2. *Biochim Biophys Acta* 1799, 533-538.
- Rosonina, E., Kaneko, S., and Manley, J.L. (2006). Terminating the transcript: breaking up is hard to do. *Genes Dev* 20, 1050-1056.
- Saleh, A., Collart, M., Martens, J.A., Genereaux, J., Allard, S., Cote, J., and Brandl, C.J. (1998). TOM1p, a yeast hect-domain protein which mediates transcriptional regulation through the ADA/SAGA coactivator complexes. *J Mol Biol* 282, 933-946.
- Saleh, A., Lang, V., Cook, R., and Brandl, C.J. (1997). Identification of native complexes containing the yeast coactivator/repressor proteins NGG1/ADA3 and ADA2. *J Biol Chem* 272, 5571-5578.
- Samara, N.L., Datta, A.B., Berndsen, C.E., Zhang, X., Yao, T., Cohen, R.E., and Wolberger, C. (2010). Structural insights into the assembly and function of the SAGA deubiquitinating module. *Science* 328, 1025-1029.
- Samara, N.L., Ringel, A.E., and Wolberger, C. (2012). A role for intersubunit interactions in maintaining SAGA deubiquitinating module structure and activity. *Structure* 20, 1414-1424.
- Sambrook, J., and Rusell, D.W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. .
- Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A.J., Sherriff, J., Bernstein, B.E., Emre, N.C., Schreiber, S.L., Mellor, J., and Kouzarides, T. (2002). Active genes are trimethylated at K4 of histone H3. *Nature* 419, 407-411.
- Schmid, M., Arib, G., Laemmli, C., Nishikawa, J., Durussel, T., and Laemmli, U.K. (2006). Nup-PI: the nucleopore-promoter interaction of genes in yeast. *Mol Cell* 21, 379-391.

- Schmid, M., and Jensen, T.H. (2008). Quality control of mRNP in the nucleus. *Chromosoma* 117, 419-429.
- Schmitt, C., von Kobbe, C., Bachi, A., Pante, N., Rodrigues, J.P., Boscheron, C., Rigaut, G., Wilm, M., Seraphin, B., Carmo-Fonseca, M., *et al.* (1999). Dbp5, a DEAD-box protein required for mRNA export, is recruited to the cytoplasmic fibrils of nuclear pore complex via a conserved interaction with CAN/Nup159p. *Embo J* 18, 4332-4347.
- Schoenfelder, S., Sexton, T., Chakalova, L., Cope, N.F., Horton, A., Andrews, S., Kurukuti, S., Mitchell, J.A., Umlauf, D., Dimitrova, D.S., *et al.* (2010). Preferential associations between co-regulated genes reveal a transcriptional interactome in erythroid cells. *Nat Genet* 42, 53-61.
- Schramm, L., and Hernandez, N. (2002). Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes Dev* 16, 2593-2620.
- Schreiber, S.L. (1991). Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science* 251, 283-287.
- Schulze, J.M., Hentrich, T., Nakanishi, S., Gupta, A., Emberly, E., Shilatifard, A., and Kobor, M.S. (2011). Splitting the task: Ubp8 and Ubp10 deubiquitinate different cellular pools of H2BK123. *Genes Dev* 25, 2242-2247.
- Segref, A., Sharma, K., Doye, V., Hellwig, A., Huber, J., Luhrmann, R., and Hurt, E. (1997). Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly(A)<sup>+</sup> RNA and nuclear pores. *Embo J* 16, 3256-3271.
- Sekito, T., Thornton, J., and Butow, R.A. (2000). Mitochondria-to-nuclear signaling is regulated by the subcellular localization of the transcription factors Rtg1p and Rtg3p. *Mol Biol Cell* 11, 2103-2115.
- Senay, C., Ferrari, P., Rocher, C., Rieger, K.J., Winter, J., Platel, D., and Bourne, Y. (2003). The Mtr2-Mex67 NTF2-like domain complex. Structural insights into a dual role of Mtr2 for yeast nuclear export. *J Biol Chem* 278, 48395-48403.
- Sermwittayawong, D., and Tan, S. (2006). SAGA binds TBP via its Spt8 subunit in competition with DNA: implications for TBP recruitment. *Embo J* 25, 3791-3800.
- Shandilya, J., and Roberts, S.G. (2012). The transcription cycle in eukaryotes: from productive initiation to RNA polymerase II recycling. *Biochim Biophys Acta* 1819, 391-400.
- Sharma, R.P., Grayson, D.R., and Gavin, D.P. (2007). Histone deacetylase 1 expression is increased in the prefrontal cortex of schizophrenia subjects: analysis of the National Brain Databank microarray collection. *Schizophr Res* 98, 111-117.
- Shevchenko, A., Schaft, D., Roguev, A., Pijnappel, W.W., Stewart, A.F., and Shevchenko, A. (2002). Deciphering protein complexes and protein interaction networks by tandem affinity purification and mass spectrometry: analytical perspective. *Mol Cell Proteomics* 1, 204-212.

- Shieh, G.S., Pan, C.H., Wu, J.H., Sun, Y.J., Wang, C.C., Hsiao, W.C., Lin, C.Y., Tung, L., Chang, T.H., Fleming, A.B., *et al.* (2011). H2B ubiquitylation is part of chromatin architecture that marks exon-intron structure in budding yeast. *BMC Genomics* 12, 627.
- Shiio, Y., and Eisenman, R.N. (2003). Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13225-13230.
- Shukla, A., and Bhaumik, S.R. (2007). H2B-K123 ubiquitination stimulates RNAPII elongation independent of H3-K4 methylation. *Biochem Biophys Res Commun* 359, 214-220.
- Shukla, A., Stanojevic, N., Duan, Z., Sen, P., and Bhaumik, S.R. (2006). Ubp8p, a histone deubiquitinase whose association with SAGA is mediated by Sgf11p, differentially regulates lysine 4 methylation of histone H3 in vivo. *Mol Cell Biol* 26, 3339-3352.
- Sikorski, R.S., and Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27.
- Singer, M.S., Kahana, A., Wolf, A.J., Meisinger, L.L., Peterson, S.E., Goggin, C., Mahowald, M., and Gottschling, D.E. (1998). Identification of high-copy disruptors of telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 150, 613-632.
- Singh, B.N., and Hampsey, M. (2007). A transcription-independent role for TFIIB in gene looping. *Mol Cell* 27, 806-816.
- Smale, S.T., and Kadonaga, J.T. (2003). The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem* 72, 449-479.
- Smith, E., and Shilatifard, A. (2010). The chromatin signaling pathway: diverse mechanisms of recruitment of histone-modifying enzymes and varied biological outcomes. *Mol Cell* 40, 689-701.
- Smith, E.R., Eisen, A., Gu, W., Sattah, M., Pannuti, A., Zhou, J., Cook, R.G., Lucchesi, J.C., and Allis, C.D. (1998). ESA1 is a histone acetyltransferase that is essential for growth in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3561-3565.
- Snay-Hodge, C.A., Colot, H.V., Goldstein, A.L., and Cole, C.N. (1998). Dbp5p/Rat8p is a yeast nuclear pore-associated DEAD-box protein essential for RNA export. *Embo J* 17, 2663-2676.
- Spedale, G., Mischerikow, N., Heck, A.J., Timmers, H.T., and Pijnappel, W.W. (2010). Identification of Pep4p as the protease responsible for formation of the SAGA-related SLIK protein complex. *J Biol Chem* 285, 22793-22799.
- Spingola, M., Grate, L., Haussler, D., and Ares, M., Jr. (1999). Genome-wide bioinformatic and molecular analysis of introns in *Saccharomyces cerevisiae*. *Rna* 5, 221-234.
- St John, T.P., Scherer, S., McDonnell, M.W., and Davis, R.W. (1981). Deletion analysis of the *Saccharomyces GAL* gene cluster. Transcription from three promoters. *J Mol Biol* 152, 317-334.

- Sterner, D.E., Belotserkovskaya, R., and Berger, S.L. (2002). SALSA, a variant of yeast SAGA, contains truncated Spt7, which correlates with activated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11622-11627.
- Sterner, D.E., Grant, P.A., Roberts, S.M., Duggan, L.J., Belotserkovskaya, R., Pacella, L.A., Winston, F., Workman, J.L., and Berger, S.L. (1999). Functional organization of the yeast SAGA complex: distinct components involved in structural integrity, nucleosome acetylation, and TATA-binding protein interaction. *Mol Cell Biol* 19, 86-98.
- Strasser, K., Bassler, J., and Hurt, E. (2000). Binding of the Mex67p/Mtr2p heterodimer to FXFG, GLFG, and FG repeat nucleoporins is essential for nuclear mRNA export. *J Cell Biol* 150, 695-706.
- Strasser, K., and Hurt, E. (2000). Yra1p, a conserved nuclear RNA-binding protein, interacts directly with Mex67p and is required for mRNA export. *Embo J* 19, 410-420.
- Strasser, K., and Hurt, E. (2001). Splicing factor Sub2p is required for nuclear mRNA export through its interaction with Yra1p. *Nature* 413, 648-652.
- Strasser, K., Masuda, S., Mason, P., Pfannstiel, J., Oppizzi, M., Rodriguez-Navarro, S., Rondon, A.G., Aguilera, A., Struhl, K., Reed, R., *et al.* (2002). TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature* 417, 304-308.
- Struhl, K., and Moqtaderi, Z. (1998). The TAFs in the HAT. *Cell* 94, 1-4.
- Sturgill, T.W., Cohen, A., Diefenbacher, M., Trautwein, M., Martin, D.E., and Hall, M.N. (2008). TOR1 and TOR2 have distinct locations in live cells. *Eukaryot Cell* 7, 1819-1830.
- Suganuma, T., and Workman, J.L. (2008). Crosstalk among Histone Modifications. *Cell* 135, 604-607.
- Suka, N., Luo, K., and Grunstein, M. (2002). Sir2p and Sas2p opposingly regulate acetylation of yeast histone H4 lysine16 and spreading of heterochromatin. *Nat Genet* 32, 378-383.
- Sun, Z.W., and Allis, C.D. (2002). Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* 418, 104-108.
- Sussman, R.T., Stanek, T.J., Estes, P., Gearhart, J.D., Knudsen, K.E., and McMahon, S.B. (2013). The epigenetic modifier ubiquitin-specific protease 22 (USP22) regulates embryonic stem cell differentiation via transcriptional repression of sex-determining region Y-box 2 (SOX2). *J Biol Chem* 288, 24234-24246.
- Taatjes, D.J. (2010). The human Mediator complex: a versatile, genome-wide regulator of transcription. *Trends Biochem Sci* 35, 315-322.
- Taddei, A., Schober, H., and Gasser, S.M. (2010). The budding yeast nucleus. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a000612.

- Taddei, A., Van Houwe, G., Hediger, F., Kalck, V., Cubizolles, F., Schober, H., and Gasser, S.M. (2006). Nuclear pore association confers optimal expression levels for an inducible yeast gene. *Nature* 441, 774-778.
- Taddei, A., Van Houwe, G., Nagai, S., Erb, I., van Nimwegen, E., and Gasser, S.M. (2009). The functional importance of telomere clustering: global changes in gene expression result from SIR factor dispersion. *Genome Res* 19, 611-625.
- Tan-Wong, S.M., Wijayatilake, H.D., and Proudfoot, N.J. (2009). Gene loops function to maintain transcriptional memory through interaction with the nuclear pore complex. *Genes Dev* 23, 2610-2624.
- Tanny, J.C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Allis, C.D. (2007). Ubiquitylation of histone H2B controls RNA polymerase II transcription elongation independently of histone H3 methylation. *Genes Dev* 21, 835-847.
- Taunton, J., Hassig, C.A., and Schreiber, S.L. (1996). A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* 272, 408-411.
- Tavenet, A., Suleau, A., Dubreuil, G., Ferrari, R., Ducrot, C., Michaut, M., Aude, J.C., Dieci, G., Lefebvre, O., Conesa, C., *et al.* (2009). Genome-wide location analysis reveals a role for Sub1 in RNA polymerase III transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 14265-14270.
- Teichert, U., Mechler, B., Muller, H., and Wolf, D.H. (1989). Lysosomal (vacuolar) proteinases of yeast are essential catalysts for protein degradation, differentiation, and cell survival. *J Biol Chem* 264, 16037-16045.
- Teytelman, L., Thurtle, D.M., Rine, J., and van Oudenaarden, A. (2013). Highly expressed loci are vulnerable to misleading ChIP localization of multiple unrelated proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 18602-18607.
- Tjong, H., Gong, K., Chen, L., and Alber, F. (2012). Physical tethering and volume exclusion determine higher-order genome organization in budding yeast. *Genome Res* 22, 1295-1305.
- Tomko, R.J., Jr., and Hochstrasser, M. (2014). The intrinsically disordered Sem1 protein functions as a molecular tether during proteasome lid biogenesis. *Mol Cell* 53, 433-443.
- Travis, G.H., Colavito-Shepanski, M., and Grunstein, M. (1984). Extensive purification and characterization of chromatin-bound histone acetyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 259, 14406-14412.
- Tu, S., Bulloch, E.M., Yang, L., Ren, C., Huang, W.C., Hsu, P.H., Chen, C.H., Liao, C.L., Yu, H.M., Lo, W.S., *et al.* (2007). Identification of histone demethylases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 282, 14262-14271.
- Umlauf, D., Bonnet, J., Waharte, F., Fournier, M., Stierle, M., Fischer, B., Brino, L., Devys, D., and Tora, L. (2013). The human TREX-2 complex is stably associated with the nuclear pore basket. *J Cell Sci* 126, 2656-2667.

- Urban, J., Soulard, A., Huber, A., Lippman, S., Mukhopadhyay, D., Deloche, O., Wanke, V., Anrather, D., Ammerer, G., Riezman, H., *et al.* (2007). Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* 26, 663-674.
- Valenzuela, P., Hager, G.L., Weinberg, F., and Rutter, W.J. (1976). Molecular structure of yeast RNA polymerase III: demonstration of the tripartite transcriptive system in lower eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 1024-1028.
- van Leeuwen, F., Gafken, P.R., and Gottschling, D.E. (2002). Dot1p modulates silencing in yeast by methylation of the nucleosome core. *Cell* 109, 745-756.
- VanDemark, A.P., Kasten, M.M., Ferris, E., Heroux, A., Hill, C.P., and Cairns, B.R. (2007). Autoregulation of the rsc4 tandem bromodomain by gcn5 acetylation. *Mol Cell* 27, 817-828.
- Vannini, A., and Cramer, P. (2012). Conservation between the RNA polymerase I, II, and III transcription initiation machineries. *Mol Cell* 45, 439-446.
- Varenne, S., Buc, J., Lloubes, R., and Lazdunski, C. (1984). Translation is a non-uniform process. Effect of tRNA availability on the rate of elongation of nascent polypeptide chains. *J Mol Biol* 180, 549-576.
- Venkatesh, S., Smolle, M., Li, H., Gogol, M.M., Saint, M., Kumar, S., Natarajan, K., and Workman, J.L. (2012). Set2 methylation of histone H3 lysine 36 suppresses histone exchange on transcribed genes. *Nature* 489, 452-455.
- Venters, B.J., and Pugh, B.F. (2009). A canonical promoter organization of the transcription machinery and its regulators in the *Saccharomyces* genome. *Genome Res* 19, 360-371.
- Venters, B.J., Wachi, S., Mavrich, T.N., Andersen, B.E., Jena, P., Sinnamon, A.J., Jain, P., Roller, N.S., Jiang, C., Hemeryck-Walsh, C., *et al.* (2011). A comprehensive genomic binding map of gene and chromatin regulatory proteins in *Saccharomyces*. *Mol Cell* 41, 480-492.
- Verger, A., Perdomo, J., and Crossley, M. (2003). Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO Rep* 4, 137-142.
- Vincent, O., Townley, R., Kuchin, S., and Carlson, M. (2001). Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific beta subunits and a novel glucose signaling mechanism. *Genes Dev* 15, 1104-1114.
- Vitaliano-Prunier, A., Babour, A., Herissant, L., Apponi, L., Margaritis, T., Holstege, F.C., Corbett, A.H., Gwizdek, C., and Dargemont, C. (2012). H2B ubiquitylation controls the formation of export-competent mRNP. *Mol Cell* 45, 132-139.
- Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R., and Philippsen, P. (1994). New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10, 1793-1808.
- Wang, L., Charroux, B., Kerridge, S., and Tsai, C.C. (2008). Atrophin recruits HDAC1/2 and G9a to modify histone H3K9 and to determine cell fates. *EMBO Rep* 9, 555-562.

- Wang, L., Haeusler, R.A., Good, P.D., Thompson, M., Nagar, S., and Engelke, D.R. (2005). Silencing near tRNA genes requires nucleolar localization. *J Biol Chem* 280, 8637-8639.
- Wang, L.K., and Shuman, S. (2005). Structure-function analysis of yeast tRNA ligase. *Rna* 11, 966-975.
- Wang, X., Chang, Y., Li, Y., Zhang, X., and Goodrich, D.W. (2006). Thoc1/Hpr1/p84 is essential for early embryonic development in the mouse. *Mol Cell Biol* 26, 4362-4367.
- Wang, X., Chinnam, M., Wang, J., Wang, Y., Zhang, X., Marcon, E., Moens, P., and Goodrich, D.W. (2009). Thoc1 deficiency compromises gene expression necessary for normal testis development in the mouse. *Mol Cell Biol* 29, 2794-2803.
- Warfield, L., Ranish, J.A., and Hahn, S. (2004). Positive and negative functions of the SAGA complex mediated through interaction of Spt8 with TBP and the N-terminal domain of TFIIA. *Genes Dev* 18, 1022-1034.
- Warner, J.R. (1999). The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci* 24, 437-440.
- Weake, V.M., Lee, K.K., Guelman, S., Lin, C.H., Seidel, C., Abmayr, S.M., and Workman, J.L. (2008). SAGA-mediated H2B deubiquitination controls the development of neuronal connectivity in the *Drosophila* visual system. *Embo J* 27, 394-405.
- Weake, V.M., and Workman, J.L. (2008). Histone ubiquitination: triggering gene activity. *Mol Cell* 29, 653-663.
- Wedaman, K.P., Reinke, A., Anderson, S., Yates, J., 3rd, McCaffery, J.M., and Powers, T. (2003). Tor kinases are in distinct membrane-associated protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 14, 1204-1220.
- Werner, M., Hermann-Le Denmat, S., Treich, I., Sentenac, A., and Thuriaux, P. (1992). Effect of mutations in a zinc-binding domain of yeast RNA polymerase C (III) on enzyme function and subunit association. *Mol Cell Biol* 12, 1087-1095.
- Whitehouse, I., Rando, O.J., Delrow, J., and Tsukiyama, T. (2007). Chromatin remodelling at promoters suppresses antisense transcription. *Nature* 450, 1031-1035.
- Wichtowska, D., Turowski, T.W., and Boguta, M. (2013). An interplay between transcription, processing, and degradation determines tRNA levels in yeast. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 4, 709-722.
- Wickramasinghe, V.O., Stewart, M., and Laskey, R.A. (2010). GANP enhances the efficiency of mRNA nuclear export in mammalian cells. *Nucleus* 1, 393-396.
- Widom, J. (1998). Structure, dynamics, and function of chromatin in vitro. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 27, 285-327.
- Wild, T., and Cramer, P. (2012). Biogenesis of multisubunit RNA polymerases. *Trends Biochem Sci* 37, 99-105.
- Wilmes, G.M., Bergkessel, M., Bandyopadhyay, S., Shales, M., Braberg, H., Cagney, G., Collins, S.R., Whitworth, G.B., Kress, T.L., Weissman, J.S., *et al.* (2008). A genetic

- interaction map of RNA-processing factors reveals links between Sem1/Dss1-containing complexes and mRNA export and splicing. *Mol Cell* 32, 735-746.
- Wilson, M.A., Koutelou, E., Hirsch, C., Akdemir, K., Schibler, A., Barton, M.C., and Dent, S.Y. (2011). Ubp8 and SAGA regulate Snf1 AMP kinase activity. *Mol Cell Biol* 31, 3126-3135.
- Wondrak, G.T., Cervantes-Laurean, D., Jacobson, E.L., and Jacobson, M.K. (2000). Histone carbonylation in vivo and in vitro. *Biochem J* 351 Pt 3, 769-777.
- Wood, A., Krogan, N.J., Dover, J., Schneider, J., Heidt, J., Boateng, M.A., Dean, K., Golshani, A., Zhang, Y., Greenblatt, J.F., *et al.* (2003a). Bre1, an E3 ubiquitin ligase required for recruitment and substrate selection of Rad6 at a promoter. *Mol Cell* 11, 267-274.
- Wood, A., Schneider, J., Dover, J., Johnston, M., and Shilatifard, A. (2003b). The Paf1 complex is essential for histone monoubiquitination by the Rad6-Bre1 complex, which signals for histone methylation by COMPASS and Dot1p. *J Biol Chem* 278, 34739-34742.
- Wood, A., Schneider, J., and Shilatifard, A. (2005). Cross-talking histones: implications for the regulation of gene expression and DNA repair. *Biochem Cell Biol* 83, 460-467.
- Wu, P.Y., Ruhlmann, C., Winston, F., and Schultz, P. (2004). Molecular architecture of the *S. cerevisiae* SAGA complex. *Mol Cell* 15, 199-208.
- Wu, P.Y., and Winston, F. (2002). Analysis of Spt7 function in the *Saccharomyces cerevisiae* SAGA coactivator complex. *Mol Cell Biol* 22, 5367-5379.
- Wullschleger, S., Loewith, R., and Hall, M.N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124, 471-484.
- Wullschleger, S., Loewith, R., Oppliger, W., and Hall, M.N. (2005). Molecular organization of target of rapamycin complex 2. *J Biol Chem* 280, 30697-30704.
- Wyce, A., Xiao, T., Whelan, K.A., Kosman, C., Walter, W., Eick, D., Hughes, T.R., Krogan, N.J., Strahl, B.D., and Berger, S.L. (2007). H2B ubiquitylation acts as a barrier to Ctk1 nucleosomal recruitment prior to removal by Ubp8 within a SAGA-related complex. *Mol Cell* 27, 275-288.
- Xiao, T., Kao, C.F., Krogan, N.J., Sun, Z.W., Greenblatt, J.F., Osley, M.A., and Strahl, B.D. (2005). Histone H2B ubiquitylation is associated with elongating RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 25, 637-651.
- Xin, H., Takahata, S., Blanksma, M., McCullough, L., Stillman, D.J., and Formosa, T. (2009).  $\gamma$ FACT induces global accessibility of nucleosomal DNA without H2A-H2B displacement. *Mol Cell* 35, 365-376.
- Xu, Q., Li, M., Adams, J., and Cai, H.N. (2004). Nuclear location of a chromatin insulator in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Sci* 117, 1025-1032.
- Xu, Z., and Norris, D. (1998). The SFP1 gene product of *Saccharomyces cerevisiae* regulates G2/M transitions during the mitotic cell cycle and DNA-damage response. *Genetics* 150, 1419-1428.

- Young, E.T., Zhang, C., Shokat, K.M., Parua, P.K., and Braun, K.A. (2012). The AMP-activated protein kinase Snf1 regulates transcription factor binding, RNA polymerase II activity, and mRNA stability of glucose-repressed genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 287, 29021-29034.
- Yu, Y., Eriksson, P., Bhoite, L.T., and Stillman, D.J. (2003). Regulation of TATA-binding protein binding by the SAGA complex and the Nhp6 high-mobility group protein. *Mol Cell Biol* 23, 1910-1921.
- Yuan, G.C., Liu, Y.J., Dion, M.F., Slack, M.D., Wu, L.F., Altschuler, S.J., and Rando, O.J. (2005). Genome-scale identification of nucleosome positions in *S. cerevisiae*. *Science* 309, 626-630.
- Zacharioudakis, I., Gligoris, T., and Tzamarias, D. (2007). A yeast catabolic enzyme controls transcriptional memory. *Curr Biol* 17, 2041-2046.
- Zee, B.M., Young, N.L., and Garcia, B.A. (2011). Quantitative proteomic approaches to studying histone modifications. *Curr Chem Genomics* 5, 106-114.
- Zhang, H., Roberts, D.N., and Cairns, B.R. (2005). Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss. *Cell* 123, 219-231.
- Zhang, M., Wang, Q., and Huang, Y. (2007). Fragile X mental retardation protein FMRP and the RNA export factor NXF2 associate with and destabilize Nxf1 mRNA in neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 10057-10062.
- Zhang, Z., Wippo, C.J., Wal, M., Ward, E., Korber, P., and Pugh, B.F. (2011). A packing mechanism for nucleosome organization reconstituted across a eukaryotic genome. *Science* 332, 977-980.
- Zhao, Y., Lang, G., Ito, S., Bonnet, J., Metzger, E., Sawatsubashi, S., Suzuki, E., Le Guezennec, X., Stunnenberg, H.G., Krasnov, A., *et al.* (2008). A TFTC/STAGA module mediates histone H2A and H2B deubiquitination, coactivates nuclear receptors, and counteracts heterochromatin silencing. *Mol Cell* 29, 92-101.
- Zheng, J., Benschop, J.J., Shales, M., Kemmeren, P., Greenblatt, J., Cagney, G., Holstege, F., Li, H., and Krogan, N.J. (2010). Epistatic relationships reveal the functional organization of yeast transcription factors. *Mol Syst Biol* 6, 420.