



UNIVERSIDAD DE JAÉN

**FACULTAD CIENCIAS
EXPERIMENTALES
DEPARTAMENTO DE
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

TESIS DOCTORAL

**ANÁLISIS DEL PAPEL DEL PIE DE LA RNA
POLIMERASA II DE *SACCHAROMYCES
CEREVISIAE* Y SU IMPORTANCIA EN
MÚLTIPLES ETAPAS DE LA TRANSCRIPCIÓN**

**PRESENTADA POR:
ANA ISABEL GARRIDO GODINO**

**DIRIGIDA POR:
DR. D. FRANCISCO NAVARRO GÓMEZ**

JAÉN, 18 DE MARZO DE 2014

ISBN 978-84-8439-871-4



Área de Genética
Departamento de Biología Experimental
Facultad de Ciencias Experimentales
Universidad de Jaén

**“Análisis del papel del pie de la RNA polimerasa II de
Saccharomyces cerevisiae y su importancia en múltiples etapas
de la transcripción”**

Ana Isabel Garrido Godino
Tesis Doctoral
2014



Área de Genética
Departamento de Biología Experimental
Facultad de Ciencias Experimentales
Universidad de Jaén

El Dr. Francisco Nicolás Navarro Gómez, Profesor Titular del Área de Genética de la Universidad de Jaén, certifica que la Tesis Doctoral titulada: **“Análisis del papel del pie de la RNA polimerasa II de *Saccharomyces cerevisiae* y su importancia en múltiples etapas de la transcripción”**, que presenta Ana Isabel Garrido Godino para optar al Grado de Doctor, ha sido realizada bajo su dirección, reuniendo a su juicio, los requisitos exigidos para la presentación.

Jaén, a 3 de febrero de 2014

Director de la Tesis Doctoral

D. Francisco Nicolás Navarro Gómez

Memoria presentada por la licenciada
Ana Isabel Garrido Godino
Para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas
Febrero de 2014

ÍNDICE

SUMMARY	3
INTRODUCCIÓN	19
1. MAQUINARIA DE TRANSCRIPCIÓN EN ORGANISMOS EUCARIOTAS	19
1.1. Las RNA polimerasas	19
1.1.1. La RNA polimerasa I	23
1.1.2. La RNA polimerasa III	25
1.1.3. La RNA polimerasa II	27
1.1.3.1. El dímero Rpb4/7	30
1.1.3.2. El dominio carboxilo-terminal de Rpb1 (CTD)	33
1.1.4. Ensamblaje y transporte al núcleo de las RNA polimerasas eucariotas	35
1.1.5. Desensamblaje de las RNA polimerasas	39
1.1.6. Degradación de la RNA polimerasa II	40
2. LA TRANSCRIPCIÓN MEDIADA POR LA RNA POLIMERASA II	45
2.1. Formación del complejo de preiniciación e iniciación de la transcripción	46
2.1.1. Papel de los reguladores NC2 y Mot1 en la formación del complejo de preiniciación	50
2.2. Elongación de la transcripción	52
2.3. Terminación de la transcripción y reciclaje de la RNA pol II	56
2.4. La función del CTD en el ciclo de transcripción de la RNA polimerasa II	57
2.4.1. Enzimas responsables de la fosforilación del CTD (quinasas)	58
2.4.2. Enzimas responsables de la defosforilación del CTD (fosfatasas)	59
2.4.3. Ciclo de fosforilación del CTD	61
3. CICLO DE VIDA DEL mRNA	63
3.1. Adición de la caperuza 5' del mRNA	63
3.2. Poliadenilación	64
3.3. Exporte del mRNA	65
3.4. Degradación del mRNA	67
3.5. El papel post-transcripcional del dímero Rpb4/7	70

3.6. El papel post-transcripcional del complejo Ccr4-Not	73
AIMS/OBJETIVOS	79
MATERIALS AND METHODS	85
1. STRAINS, PLASMIDS, OLIGONUCLEOTIDES, ANTIBODIES AND GROWTH MEDIA	85
1.1. Strains	85
1.1.1. <i>Escherichia coli</i> strains	85
1.1.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strains	85
1.2. Plasmids	85
1.3. Oligonucleotides	85
1.4. Antibodies	85
1.5. Growth media	87
1.5.1. <i>E. coli</i> growth media	87
1.5.2. <i>S. cerevisiae</i> growth media	87
1.5.3. Amino acids, vitamins, drugs and antibiotics	87
2. METHODS	89
2.1. Yeast	89
2.1.1. Culture conditions	89
2.1.2. Transformation	89
2.1.2.1. Litium acetate/polyethyleneglycol method	89
2.1.2.2. Rapid transformation method	90
2.1.3. Diploid generation, sporulation and tetrad dissection	90
2.1.3.1. Diploid strains construction	90
2.1.3.2. Sporulation	90
2.1.3.3. Random Spore Analysis	91
2.1.3.4. Tetrad dissection	91
2.1.4. Single gene deletion, protein tagging and promoter replacement in yeast	91
2.2. <i>Escherichia coli</i> culture and electroporation	92
2.3. Molecular biology methods	92
2.3.1. Nucleic acid analysis and manipulation methods	92
2.3.1.1. Plasmid DNA extraction from <i>E. coli</i>	92
2.3.1.2. Genomic DNA extraction from yeast	92

2.3.1.3.	RNA extraction from yeast	93
2.3.1.4.	Nucleic acid quantification and electrophoresis	94
2.3.1.5.	RNA quantification using EXPERION system	94
2.3.1.6.	DNA purification, digestions, ligations and sequencing	94
2.3.1.7.	Polymerase chain reaction (PCR)	95
2.3.1.8.	Reverse transcription	95
2.3.1.9.	Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)	95
2.3.1.10.	Chromatin immunoprecipitation (ChIP)	96
2.3.1.11.	mRNA stability analysis	97
2.3.1.11.1.	Northern-blot	97
2.3.1.11.2.	Real-time PCR	98
2.3.1.12.	Global expression array	99
2.3.1.13.	RNA immunoprecipitation and sequencing (RIP-SEQ)	100
2.3.1.13.1.	3' T-fill protocol	101
2.4.	Protein analysis methods	106
2.4.1.	Whole cell extracts preparation	106
2.4.2.	Protein immunoprecipitation and TAP purification	107
2.4.3.	SDS-PAGE and Western-blot analysis	107
2.4.4.	Chromatin isolation and analysis of associated proteins	108
2.4.5.	mRNA isolation and analysis of associated proteins	109
2.4.6.	Protein TCA-Acetone purification	110
2.4.7.	GLAM assay (gene length-dependent accumulation of mRNA)	110
2.5.	Microscopic methods	112
2.5.1.	Immunolocalization	112
2.5.2.	In vivo fluorescence microscopy	113
	Supplementary tables	114
RESULTADOS		133
1.	ANTECEDENTES: EL DOMINIO CONSERVADO DEL PIE DE LA RNA POLIMERASA II DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	133
2.	GENERACIÓN Y MANIPULACIONES GENÉTICAS DE CEPAS DE <i>S. cerevisiae</i> QUE CONTIENEN LAS MUTACIONES DEL PIE DE LA RNA POLIMERASA II.	136
3.	EL CORRECTO ENSAMBLAJE DE LA RNA POLIMERASA II DEPENDE DEL	

DOMINIO DEL PIE Y SE REQUIERE PARA MÚLTIPLES ETAPAS DE LA TRANSCRIPCIÓN EN <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	138
3.1. Sobreexpresión de genes de subunidades de la RNA polimerasa II en los mutantes del dominio conservado del pie	138
3.2. Análisis de la integridad y/o estabilidad de la RNA polimerasa II en los mutantes del pie.	143
3.3. Análisis de la estabilidad de la RNA polimerasa en los mutantes del pie sobreexpresando <i>RPB6</i>	150
3.4. Localización celular de subunidades de la RNA pol II	151
3.5. Estudio de la transcripción mediada por la RNA polimerasa II y su asociación a los genes en mutantes del dominio del pie	156
3.6. Efecto de las mutaciones en el pie de la RNA polimerasa II sobre los complejos de preiniciación de la transcripción	160
4. EFECTO DE LA ALTERACIÓN DEL PIE DE LA RNA POLIMERASA II EN LA FOSFORILACIÓN DEL CTD	168
4.1. Análisis de las fosfatasas del CTD	173
4.2. Análisis de las quinasas del CTD	180
4.3. Estudio de la elongación de la transcripción en los mutantes del pie de la RNA pol II	182
4.4. Interacciones genéticas de las mutaciones del pie con elementos de la maquinaria de adición del cap	187
5. ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN DE Rpb1 y DESENSAMBLAJE DE LA RNA POLIMERASA II EN LOS MUTANTES DEL PIE	191
5.1. Análisis de la vía de degradación de Rpb1 dependiente de Asr1	192
5.2. Análisis de la vía de degradación de Rpb1 dependiente de Rsp5	194
5.3. Estudio de la relación funcional entre la degradación de Rpb1 y la fosfatasa de CTD-Ser5P, Rtr1	199
6. ESTUDIO GLOBAL DE LA TRANSCRIPCIÓN MEDIADA POR LA RNA POLIMERASA II EN LOS MUTANTES DEL PIE Y SUS CONSECUENCIAS EN EL TRANSCRIPTOMA DE LA CÉLULA	202
6.1. Análisis de expresión global de mRNA en los mutantes del pie	202
6.2. Análisis de la estabilidad de los mRNA	209
6.3. Análisis de la unión de Rpb4 a los mRNA en los mutantes del pie	

como medio para explicar el aumento en la vida media del mRNA	216
6.4. Estudio de la acumulación de p-bodies en los mutantes del dominio conservado del pie de la RNA polimerasa II	219
6.5. Análisis de reguladores transcripcionales relacionados con respuesta a estrés	222
6.6. Interacción entre Mot1 y la enzima de <i>capping</i> en los mutantes del pie de la RNA pol II.	229
7. ESTUDIO GLOBAL DE LA ASOCIACIÓN DE Rpb4 A LOS mRNA MEDIANTE isRIP-Seq	232
DISCUSIÓN	239
CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS	267
BIBLIOGRAFÍA	273
ANEXOS	307
ANEXO I: Abreviaturas	309
ANEXO II: <i>Curriculum Vitae</i>	315
ANEXO III: Publicaciones	323

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I1: Representación de las estructuras de las RNA polimerasas celulares de bacterias, arqueas y eucariotas	19
Figura I2: Estructura cristalográfica de la RNA pol I	24
Figura I3: Modelo de la RNA pol III	26
Figura I4: Modelo de la RNA pol II	27
Figura I5: Estructura de los cuatro módulos de la RNA pol II y modelo del complejo mínimo de preiniciación	28
Figura I6: Diagramas que muestran la estructura del dímero Rpb4/7 en el contexto de la RNA pol II	30
Figura I7: Representación esquemática del dominio carboxi-terminal, CTD, de la subunidad mayor de la RNA pol II	34
Figura I8: Composición y ensamblaje de la RNA pol II	36
Figura I9: Modelo de la biogénesis de la RNA pol II	38
Figura I10: Modelo simplificado del mecanismo de acción de Rad26 tras un daño en el DNA	41
Figura I11: Modelo de la ubiquitinación y degradación de Rpb1	44
Figura I12: Arquitectura del PIC basal	46
Figura I13: Ensamblaje del complejo de preiniciación (PIC)	49
Figura I14: Mecanismo general de regulación génica mediada por Mot1 y NC2, y su asociación con TBP	52
Figura I15: Modelo estructural del complejo RNA pol II-Spt4/5	53
Figura I16: Mecanismos de terminación de la transcripción	57
Figura I17: Perfil de fosforilación de la RNA pol II de <i>S. cerevisiae</i> y enzimas modificadoras implicadas en cada etapa	61
Figura I18: Modelo de la transición de la iniciación a la elongación de la transcripción de la RNA pol II	64
Figura I19: Transporte del mRNA a través del complejo de poro nuclear	67
Figura I20: Mecanismos de degradación del mRNA	70
Figura I21: Ciclo de vida del mRNA: el papel del dímero Rpb4/7	73
Figura I22: El complejo Ccr4-Not regula los productos génicos desde “el	

nacimiento hasta la muerte”	75
Figure M1: 3’ T-Fill protocol for libraries construction	102
Figure M2: Transcriptional units used in GLAM assay	111
Figure M3: GLAM ratio calculation	112
Figura R1: Dominios conservados localizados sobre la RNA pol II de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	133
Figura R2: Organización espacial de los dominios conservados de la RNA pol II	134
Figura R3: Vista esquemática del dominio completo del pie de la RNA pol II	135
Figura R4: Crecimiento de los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre a distintas temperaturas y medios	137
Figura R5: Sobreexpresión de <i>RPB6</i> , <i>RPB4</i> y <i>RPB7</i> en los mutantes del pie y en su cepa isogénica silvestre	140
Figura R6: Sobreexpresión de los genes <i>RPB4</i> y <i>RPB7</i> en los mutantes <i>rpo21-4</i> y <i>rpb1-84</i> así como en su cepa isogénica silvestre	141
Figura R7: Sobreexpresión de <i>RPB6</i> en los mutantes termosensibles de la RNA pol II <i>rpb1-1</i> , <i>rpb1-19</i> y <i>rpb2-6</i>	141
Figura R8: Análisis del crecimiento de dobles mutantes <i>rpo21-4 rpb6-31</i> , <i>rpb1-84 rpb6-31</i> , <i>rpo21-4 rpb4Δ</i> y <i>rpb1-84 rpb4Δ</i>	142
Figura R9: Comprobación del crecimiento de los mutantes del pie con Rpb2::TAP, Rpb3::TAP, Rpb4::Myc, Rpb6::Myc y Rpb6::HA	144
Figura R10: Purificación de Rpb3-TAP en los mutantes <i>rpo21-4</i> y <i>rpb1-84</i> , y en la cepa isogénica silvestre	145
Figura R11: qRT-PCR para medir los niveles de expresión del gen <i>RPB1</i> en los mutantes <i>rpo21-4</i> y <i>rpb1-84</i> y en la cepa isogénica silvestre	146
Figura R12: Inmunoprecipitación de Rpb1 los mutantes <i>rpo21-4</i> y <i>rpb1-84</i> y en su cepa silvestre	147
Figura R13: Inmunoprecipitación de Rpb3 en las cepas que contienen las mutaciones <i>rpo21-4</i> y <i>rpb1-84</i> y Rpb2::TAP	147
Figura R14: Inmunoprecipitación de Rpb1 en las cepas que contienen las mutaciones <i>rpo21-4</i> y <i>rpb1-84</i> y Rpb2::TAP	148
Figura R15: Inmunoprecipitación de Rpb3 de la RNA pol II en las cepas que contienen las mutaciones <i>rpo21-4</i> y <i>rpb1-84</i> y Rpb4::Myc	149

Figura R16: Purificación de Rpb3-TAP en los cepas mutantes <i>rpo21-4</i> y <i>rpb1-84</i> con sobreexpresión de <i>RPB6</i> e inmunoprecipitación de Rpb3 en cepas que contienen Rpb4::Myc con sobreexpresión <i>RPB6</i>	150
Figura R17: Inmunolocalización de Rpb1 en los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre	152
Figura R18: Inmunolocalización de Rpb3 en los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre	152
Figura R19: Inmunolocalización de Rpb2 en los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre	153
Figura R20: Localización celular de Rpb4, <i>in vivo</i> , en cepas silvestre y mutantes	154
Figura R21: Inmunolocalización de Rpb1 en los dobles mutantes <i>rpo21-4 bud27Δ</i> y <i>rpb1-84 bud27Δ</i> y análisis mediante western-blot de la cantidad de proteína Rpb1	155
Figura R22: Análisis mediante qRT-PCR de los niveles de acumulación de mRNA de distintos genes en los mutantes del pie y su cepa silvestre	156
Figura R23: Análisis del reclutamiento de Rpb1 a los genes en los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre	157
Figura R24: Análisis mediante qRT-PCR de los niveles de acumulación de mRNA de distintos genes en los mutantes del pie y su cepa silvestre sobreexpresando <i>RPB6</i>	158
Figura R25: Análisis del reclutamiento de Rpb1 a los genes en los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre sobreexpresando <i>RPB6</i>	159
Figura R26: Reclutamiento de Rpb1 y TBP-HA a los promotores en la cepa silvestre y en los mutantes del dominio conservado del pie	161
Figura R27: Sobreexpresión y mutación del gen <i>SPT15</i> en los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre; y sobreexpresión de <i>RPB6</i> en los dobles mutantes	162
Figura R28: Deleción de los genes de <i>Srb9</i> y <i>Srb10</i> y etiquetado de <i>Srb4</i> -HA en los mutantes del dominio conservado del pie	164
Figura R29: Sobreexpresión de <i>RPB6</i> en los mutantes simples del pie así como en los mutantes dobles <i>rpo21-4 srb9Δ</i> , <i>rpb1-84 srb9Δ</i> , <i>rpo21-4 srb10Δ</i> y <i>rpb1-84 srb10Δ</i>	165

Figura R30: Sobreexpresión de <i>SRB4</i> , <i>SRB9</i> y <i>SRB10</i> en los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre	166
Figura R31: Sobreexpresión del gen <i>SUA7</i> en los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre	167
Figura R32: Purificaciones Rpb3-TAP de los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre transformados con un vector vacío y bajo sobreexpresión de <i>RPB6</i>	169
Figura R33: Western-blot de Rpb1 hipo e hiperfosforilada asociado a la cromatina en los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre, con y sin sobreexpresión de <i>RPB6</i>	170
Figura R34: Reclutamiento de CTD-Ser5P en los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre	171
Figura R35: Ratios de ocupación CTD-Ser5P frente a Rpb1 y ratios 5'/3' calculados a partir de la ocupación de la RNA pol II fosforilada en CTD-Ser5P	172
Figura R36: Sobreexpresión de las fosfatasas de CTD-Ser5P, <i>Rtr1</i> y <i>Ssu72</i> , en los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre	173
Figura R37: Interacciones genéticas entre las mutaciones del pie y la delección del gen <i>RTR1</i> , así como entre las mutaciones del pie y el alelo <i>SSU72::Myc</i>	174
Figura R38: Interacción genética entre los mutantes del pie y la delección del gen <i>RTR1</i> con y sin sobreexpresión de <i>SSU72</i>	175
Figura R39: Purificación de Rpb3-TAP en los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre tras la sobreexpresión de <i>RTR1</i>	176
Figura R40: Inmunolocalizaciones de <i>Rtr1</i> en los mutantes del pie, en un mutante <i>bud27Δ</i> y en la cepa isogénica silvestre	177
Figura R41: Etiquetado <i>Rtr1</i> -TAP en los mutantes del pie e inmunoprecipitación de la proteína Rpb3, en las cepas generadas	178
Figura R42: Sobreexpresión de la fosfatasa de CTD-Ser2P, <i>Fcp1</i> , en los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre	179
Figura R43: Interacciones genéticas entre mutantes del dominio conservado del pie de la RNA pol II y <i>kin28-T16A</i>	180
Figura R44: Interacciones genéticas entre mutantes del dominio	

conservado del pie de la RNA pol II y <i>ctk1Δ</i>	181
Figura R45: Deleción y sobreexpresión del gen <i>DST1</i> en los mutantes del pie, <i>rpo21-4</i> y <i>rpb1-84</i> , y en su cepa isogénica silvestre	183
Figura R46: Sobreexpresión de <i>RPB6</i> en los mutantes simples del pie y en los mutantes dobles <i>rpo21-4 dst1Δ</i> y <i>rpb1-84 dst1Δ</i> , así como en su cepa isogénica silvestre	184
Figura R47: Deleción de <i>CCR4</i> y <i>NOT5</i> en combinación con las mutaciones del pie	185
Figura R48: Ensayo GLAM y qRT-PCR del gen <i>GAL1</i> en los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre	186
Figura R49: Interacciones genéticas entre los mutantes <i>rpo21-4</i> y <i>rpb1-84</i> y mutantes de la maquinaria de <i>capping</i> del mRNA	188
Figura R50: Interacciones genéticas entre los mutantes <i>rpo21-4</i> y <i>rpb1-84</i> y mutantes de la maquinaria de <i>capping</i> del mRNA, sobreexpresando <i>RPB6</i>	189
Figura R51: Sobreexpresión del gen <i>CEG1</i> en los mutantes del pie y en su cepa isogénica silvestre	190
Figura R52: Interacciones genéticas entre los mutantes del pie y <i>asr1Δ</i> . Western-blot para analizar la cantidad de Rpb1 en los mutantes anteriores	193
Figura R53: Western-blot para analizar la fosforilación de Rpb1 en los mutantes del pie y los mutantes dobles con <i>asr1Δ</i>	194
Figura R54: Interacciones genéticas entre los mutantes del pie y <i>rad26Δ</i> . Sobreexpresión de <i>DEF1</i> en los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre. Dobles mutantes que contienen las mutaciones del pie y la deleción de <i>RPB9</i>	196
Figura R55: Interacciones genéticas entre los mutantes del pie y los mutantes <i>rsp5-1</i> y <i>cul3Δ</i>	197
Figura R56: Western-blot para analizar la cantidad de Rpb1 en los mutantes dobles <i>rpo21-4 rsp5-1</i> , <i>rpb1-84 rsp5-1</i> , <i>rpo21-4 cul3Δ</i> y <i>rpb1-84 cul3Δ</i> , así como en los mutantes simples y su cepa isogénica silvestre	198
Figura R57: Purificación de Rpb3-TAP en los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre tras la sobreexpresión de <i>RTR1</i>	200
Figura R58: Interacción genética entre los mutantes del pie y la deleción del gen <i>RTR1</i> con y sin sobreexpresión de <i>RPB6</i>	201

Figura R59: Perfil de expresión de mRNA de los mutantes del pie, <i>rpo21-4</i> y <i>rpb1-84</i> a partir de experimentos de macroarrays	202
Figura R60: Acumulación de mRNA para los genes <i>CIT2</i> , <i>MFα2</i> , <i>URA2</i> , <i>UTP2</i> , <i>SPP2</i> y <i>STE3</i> medidos mediante qRT-PCR en los mutantes del pie y la cepa silvestre	203
Figura R61: Diagramas de Venn comparando los genes alterados en los mutantes <i>rpb1-84</i> y <i>rpo21-4</i> , con la respuesta a estrés térmico	205
Figura R62: Acumulación de mRNA para los genes <i>HSP12</i> , <i>HSP26</i> , <i>HSP104</i> y <i>SSA4</i> medidos mediante qRT-PCR en los mutantes del pie y la cepa silvestre a 30° y 37°	207
Figura R63: Acumulación de mRNA para los genes <i>HSP12</i> , <i>HSP26</i> , <i>HSP104</i> y <i>SSA4</i> medidos mediante qRT-PCR en los mutantes del pie y la cepa silvestre sobreexpresando <i>RPB6</i> , a 30° y a 37°	208
Figura R64: Análisis del reclutamiento de Rpb1 a los genes de estrés en los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre	209
Figura R65: Comparación entre la acumulación de mRNA y el reclutamiento de la RNA pol II a esos genes tanto en los mutantes del pie como en su cepa isogénica silvestre	210
Figura R66: Análisis de las vidas medias de mRNA de los mutantes del pie, mediante northern-blot	212
Figura R67: Análisis del crecimiento de los mutantes del pie con los genes <i>HSP12</i> y <i>HSP26</i> bajo el control del promotor <i>GAL1</i>	214
Figura R68: Acumulación de mRNA de los genes <i>HSP12</i> y <i>HSP26</i> , así como de <i>GAL1</i> , analizados por qRT-PCR, para calcular la vida media de los mismos	215
Figura R69: Prueba para detectar la unión de Rpb4 al mRNA usando la cepa Pub1-TAP	217
Figura R70: Crecimiento de las cepas con mutaciones del pie de la RNA pol II conteniendo la proteína Pub1-TAP	218
Figura R71: Extracción de mRNA y detección por western-blot de proteínas asociadas	219
Figura R72: Localización de Dcp2-GFP en los mutantes del pie y en su cepa isogénica silvestre	220

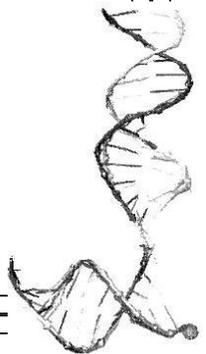
Figura R73: Localización de Dcp2-GFP en los mutantes del pie y en su cepa isogénica silvestre sobreexpresando <i>RPB6</i>	221
Figura R74: Deleción y sobreexpresión del gen <i>SPT8</i> los mutantes <i>rpo21-4</i> y <i>rpb1-84</i> y su cepa isogénica silvestre	223
Figura R75: Análisis del crecimiento de mutantes conteniendo las mutaciones del pie y/o la deleción de <i>SPT8</i> , sobreexpresando <i>RPB6</i>	224
Figura R76: Sobreexpresión de los genes codificantes de los reguladores transcripcionales NC2 y Mot1 en los mutantes del pie	225
Figura R77: Interacciones genéticas existentes entre las mutaciones del dominio conservado del pie y los mutantes <i>bur6-ts</i> y <i>mot1-301</i>	226
Figura R78: Reclutamiento de Mot1-Myc y TBP-HA en los promotores de los genes en la cepa silvestre y en los mutantes del pie	227
Figura R79: Ocupación de Mot1-Myc y TBP-HA en los promotores de los genes en la cepa silvestre y en los mutantes del pie respecto a la ocupación de Rpb1	228
Figura R80: Sobreexpresión de <i>RPB6</i> en los dobles mutantes <i>rpo21-4 mot1-301</i> y <i>rpb1-84 mot1-301</i>	228
Figura R81: Sobreexpresión de <i>MOT1</i> en los dobles mutantes <i>rpo21-4 ceg1-250</i> y <i>rpb1-84 ceg1-250</i> , y sobreexpresión de <i>CEG1</i> en los dobles mutantes <i>rpo21-4 mot1-301</i> y <i>rpb1-84 mot1-301</i>	230
Figura R82: Inmunoprecipitación de la proteína Rpb4-Myc en una cepa silvestre y PCR de cDNA sintetizado a partir del RNA inmunoprecipitado	233
Figura R83: qRT-PCR de los genes <i>ACT1</i> y <i>RPL28</i> medidos frente al rRNA <i>18S</i> en las muestras de RIP y RNA total (INPUT)	234
Figura R84: Comprobación de las librerías de cDNA mediante Bioanalyzer, clonación y secuenciación	235
Figura R85: Control de calidad de la secuenciación masiva	236
Figura D1: Modelo de la ruta de ensamblaje/desensamblaje de la RNA pol II y de la degradación de Rpb1 en los mutantes del pie	247
Figura D2: Degradación de la subunidad mayor de la RNA pol II en los mutantes del pie como consecuencia de un bloqueo en la transcripción	255
Figura D3: Disponibilidad de RNA pol II en los mutantes del pie en relación a la cantidad de transcripción necesaria para cada gen	261

Figura D4: Ciclo de vida del mRNA en los mutantes del pie	265
--	-----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I1: Composición de las RNA pols en los tres dominios de vida	22
Tabla I2: Regiones conservadas de la RNA pol II	29
Tabla I3: Factores generales de transcripción (GTFs) en la transcripción mediada por la RNA pol II de <i>S. cerevisiae</i>	45
Table M1: Antibodies	86
Table M2: Amino acids and vitamins	88
Tabla R1: Supresores del defecto de termosensibilidad a 37°C del mutante <i>rpo21-4</i>	139
Tabla R2: Grupos funcionales de genes sobreexpresados y reprimidos en los mutantes <i>rpo21-4</i> y <i>rpb1-84</i> en relación a su cepa isogénica silvestre	204
Tabla R3: Porcentaje de genes regulados por cada factor de transcripción que se encuentran alterados en los mutantes del pie	206
Tabla R4: Vidas medias de mRNA, a partir de los análisis mediante northern-blot, en los mutantes del pie	213
Tabla R5: Vidas medias de mRNA, a partir de los análisis mediante qRT-PCR, en los mutantes del pie	215
Supplementary Table 1: <i>Escherichia coli</i> strains	114
Supplementary Table 2: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strains	115
Supplementary Table 3: Plasmids used in this study	122
Supplementary Table 4: Primers used	124

Summary



SUMMARY

RNA polymerase II (RNA pol II) produces all mRNAs and many noncoding RNAs but contributes less than 10% of the total RNA present in growing cells (Hahn, 2004). It consists of 12 protein subunits with a heterodimeric subcomplex of subunits Rpb4 and Rpb7 (Rpb4/7) (Figure I4). The RNA pol II transcription machinery is the most complex of those associated with the three RNA pols, with a total of nearly 60 polypeptides, including general transcription factors, coregulators, and specific transcription activators as well as repressors (Hahn, 2004). Many studies have contributed to the knowledge of physical interactions between RNA pol II and transcriptional regulators and have enabled the identification of regions that are important for transcription, from initiation to mRNA export (Armache et al., 2005; Cramer, 2006; Cramer et al., 2001; Garcia-Lopez and Navarro, 2011; Garcia-Lopez et al., 2011; Suh et al., 2010; Zaros et al., 2007). In addition, we have recently reported the existence of five “conserved domains,” located at the surface of the structure of the complex, with poor or no conservation in their paralogs in RNA pols I (Rpa190 and Rpa135) and III (Rpc160 and Rpc128) and in their homologs in archaea and bacteria and demonstrate that all of them make contact with transcriptional regulators (Garcia-Lopez and Navarro, 2011) (Table I2, Figures R1 and R2). One of these regions corresponds to the foot domain (Cramer et al., 2001; Garcia-Lopez and Navarro, 2011), which, in cooperation with the “lower jaw,” the “assembly” domain, and the “cleft” regions, constitutes the “shelf” module of RNA pol II, which might contribute to the rotation of the DNA as it advances toward the active center (Cramer et al., 2001; Zaros et al., 2007) (Figure R3). This domain, conserved among all RNA pol II enzymes from different species, is one of the two regions in the largest subunit that differ the most in sequence among RNA pols I, II, and III (Garcia-Lopez and Navarro, 2011; Garcia-Lopez et al., 2011; Suh et al., 2010). It should be noted that we and others have identified interactions between the foot and proteins involved in transcription initiation and/or early elongation, such as the regulators Mvp1 and Spo14 and the RNA capping enzyme (CE) in *Saccharomyces cerevisiae* (Garcia-Lopez et al., 2011; Suh et al., 2010). In addition, some authors have proposed that the *rpo21-4* mutation in the foot of RNA pol II of *S. cerevisiae* affects the assembly or the

integrity of RNA pol II (Archambault et al., 1992; Archambault et al., 1990; Nouraini et al., 1997). However, whether this effect is specific to this mutation or it is determined by the domain of the foot of RNA pol II remains to be elucidated.

1 ANALYSIS OF THE ROLE OF THE FOOT DOMAIN OF THE RNA POL II ON THE INTEGRITY OF THE COMPLEX AND THE CONSEQUENCES OF ALTERING IT, IN MULTIPLE STEPS OF TRANSCRIPTION

To decipher the role of the foot domain in transcription and to determine whether it mediates the assembly and/or stability of the RNA pol II, we used two different mutants with alterations in the “conserved domain of the foot”. The *rpb1-84* mutant allele was generated by random mutagenesis and the second mutant allele, *rpo21-4* has been previously described (Archambault et al., 1992). Both mutant cells had a temperature sensitive phenotype, although the *rpo21-4* mutant grew more slowly (Figure R4).

It has been proposed that Rpb6 is essential for maintaining the assembly of RNA pol II and the stability of its largest subunit, Rpb1 (Nouraini et al., 1996; Nouraini et al., 1997). In addition, it is known that an *rpb6* mutant lacked the dimer Rpb4/7 (Tan et al., 2003). In concordance with those data, *RPB6* overexpression corrected the growth defects of both the *rpb1-84* and *rpo21-4* mutant strains, and both *RPB4* and *RPB7* overexpression suppressed the temperature sensitivity of mutant strains, although to a different extents (Figure R5 and R6). Those data, as well as, genetic analysis (Figure R8), suggests that the effect of mutating the foot of RNA pol II on the assembly and/or integrity of the complex is not specific to the *rpo21-4* allele but extends to other mutants of this domain and that assembly depends on the correct association of only Rpb6 and the dimer Rpb4/7 with the complex.

Immunoprecipitation and TAP purification experiments demonstrated that mutations in the foot of RNA pol II affect the assembly and stability of RNA pol II, decreasing the amount of Rpb1 and rendering different types of subcomplexes (Figures R10, R12-R15). Furthermore, our data suggest that these mutations affect the association of Rpb6, as well as the association of Rpb6 and the dimer Rpb4/Rpb7, with the rest of the complex, pointing to a lower yield of Rpb4 than of the rest of the

RNA pol II subunits. Notably, an increasing dosage of Rpb6 was sufficient to overcome the observed defect (Figure R16).

Similar Rpb1 localization was observed for the *rpo21-4* and *rpb1-84* mutants than in a wild type strain (Figure R17). In contrast, Rpb3 and Rpb2 clearly displayed cytoplasmic accumulation in the mutant strains (Figures R18 and R19). These data supported the idea that Rpb3 subcomplexes lacking Rpb1 are ejected from the nucleus. Analysis of Rpb4 localization *in vivo* demonstrated that, at least for the *rpb1-84* mutant, Rpb4 accumulates in the cytoplasm (Figure R20). Notably, deletion of *BUD27* (the gene for the Bud27 protein involved in the assembly of the three eukaryotic RNA pols) in *rpo21-4* and *rpb1-84* cells showed similar Rpb1 cytoplasmic accumulation than a *bud27Δ* strain, correlating with increased amounts of Rpb1 (Figure R21). These data indicate that the Rpb1 subunit is not degraded in the cytoplasm but rather that degradation may occur in the nucleus.

Foot mutants showed a decrease in the accumulation of mRNA that correlated with a dramatically reduction of Rpb1 associated to the chromatin, as observed in ChIP assays (Figures R22 and R23). We also analyzed mRNA accumulation and RNA pol II association under conditions in which RNA pol II assembly defects are corrected, i.e., *RPB6* overexpression and concluded that a higher Rpb6 dosage in both mutants restored the amount of mRNA and of the RNA pol II associated to the chromatin to wild-type levels (Figure R24 and R25). Taken together, these data support the view that mutations in the foot of RNA pol II alter the assembly of the complex, lowering the amount of the enzyme associated with the genes and thus causing a transcription defect.

It has been previously established that TBP and RNA pol II recruitment to the promoters correlate strongly with transcriptional output and that this association occurs in concert (Kuras and Struhl, 1999; Lee et al., 2010). Surprisingly, TBP occupancy at the genes tested, in mutant strains, was not significantly different from that in the wild-type strain (Figure R26). In agreement with this finding, overexpression of the *SPT15* gene, coding for TBP, had no effect on the growth of mutant strains (Figure R27). Deletion of *SRB10* (the gene coding for Mediator subunit

Srb10) (Qiu et al., 2004), as well as mutating *SPT15* (Choukrallah et al., 2012), had a greater impact on promoter occupancy by Pol II than on promoter occupancy by TBP. In addition, deletion of *SRB9* or *SRB10* aggravated the growth defect of the *rpo21-4* and *rpb1-84* mutants (Figure R28). Notably, *RPB6* overexpression partially overcame the slow-growth phenotype of double mutants (Figure R29). Since Mediator plays a critical role in preinitiation complex (PIC) assembly, we tested the overexpressing of *SUA7* (coding for TFIIB). Notably, *SUA7* overexpression partially suppressed the slow-growth phenotype of the *rpo21-4* and *rpb1-84* mutants (Figure R31).

All these data, suggest that impairing the correct assembly of RNA pol II affects the concerted association of TBP and RNA pol II to regulate transcription, probably by altering PIC stabilization.

2 ANALYSIS OF THE CTD PHOSPHORYLATION PATTERN UNDER FOOT ALTERATION

We have shown that defects in transcription initiation or early elongation associates with the deletion of genes for proteins interacting with the foot of RNA pol II and are accompanied by increased CTD-Ser5 phosphorylation (Garcia-Lopez et al., 2011). Notably, the relative CTD-Ser5P/Rpb1 ratios were higher in the mutants than in the wild-type strain. The relative CTD-Ser5P/Rpb1 ratio for the *rpo21-4* mutant decreased significantly under *RPB6* overexpression, although it did not decline to the level of the wild-type strain overexpressing *RPB6*. In contrast, the CTD-Ser5P/Rpb1 ratio for the *rpb1-84* mutant did not decrease (Figures R32 and R33). In concordance, mutations in the foot conserved domain of the RNA pol II led to an increase in CTD-Ser5-phosphorylation levels at the 3' region of genes (Figures R34 and R35). This abnormal CTD-Ser5-phosphorylation suggest an increase in the accumulation of stalled RNA pol II, and correlates with the strong genetic interactions between foot mutants and factors such as TFIIS, *CCR4* and *NOT5* and with the reduced GLAM ratio, in the case of *rpo21-4* mutant, suggesting a defect in the transcription elongation process (Figures R45, R47 and R48).

In *S. cerevisiae*, CTD-Ser5 phosphorylation occurs first in the CTD in coordination with the recruitment of Ceg1 (Gu et al., 2010), which binds the foot of

RNA pol II in *S. cerevisiae* (Suh et al., 2010). In agreement, we first tested for conditional synthetic interactions between foot mutants and the *ceg1-250* mutant (Cho et al., 1997), and we showed a synthetic growth defect. Similarly, the *abd1-5* and *abd1-8* mutations (Schwer et al., 2000) aggravated the growth phenotype of the *rpo21-4* and *rpb1-84* mutants, but to a greater extent than the *ceg1-250* mutant (Figure R49). Notably, overexpression of *RPB6* partially suppressed the slow-growth phenotype of the double mutants (Figure R50). However, *CEG1* overexpression did not restore the growth of foot mutants but even stunted it slightly, suggesting that the *rpo21-4* and *rpb1-84* foot mutations do not alter Ceg1 recruitment *in vivo* (Figure R51). These data suggest that correct RNA pol II assembly is important for mRNA capping.

Based on the abnormal CTD-Ser5 phosphorylation we speculated at the possibility that the CTD-Ser5P dephosphorylation process was altered. Then we performed overexpression experiments as well as, double mutants' analysis concluding that abnormal CTD-Ser5 phosphorylation in foot mutants is dependent on Rtr1 (Gibney et al., 2008; Mosley et al., 2009), but not on Ssu72 CTD-Ser5P phosphatase (Krishnamurthy et al., 2004). In addition these data suggest a defect in the transition from the transcription initiation to elongation (Gibney et al., 2008; Mosley et al., 2009) (Figures R36-R38).

In addition, the ratios between Rtr1/Rpb1 and Rtr1/CTD-Ser5P analyzed from RNA pol II immunoprecipitation in foot mutant and wild-type strains containing Rtr1-TAP tagged forms, suggested an abnormal Rtr1-RNA pol II association. In addition, Rtr1 localization in foot mutants showed that there is an abnormal Rtr1 cytoplasmic accumulation with respect to a wild-type strain (Figures R40 and R41).

Overexpression of *FPC1*, the gene coding for the CTD-Ser2P phosphatase responsible for transcription termination, did not suppress the temperature sensitivity phenotype of foot mutants, but contrary, aggravated it, suggesting that the termination process is not impaired in those strains. We also analyzed the genetic interaction between foot mutants and mutants of the CTD-Ser5 kinase Kin28 and CTD-Ser2 kinase Ctk1. While growth of *rpo21-4 kin28-T162A* and *rpb1-84 kin28-*

T162A double mutants were aggravated with respect to the single strains, deletion of *CTK1*, partially suppressed the temperature sensitivity of both foot mutants (Figures R42-R44). These results are in agreement with a defect in the CTD-Ser5 phosphorylation-dephosphorylation processes. However we can't discard a transcriptional termination or reinitiation defect.

All these data together suggest that altering the foot of the RNA pol II affects the transition from the transcription initiation to elongation, leading to an increase in CTD-Ser5P accumulation, probably as a consequence of an abnormal Rtr1 association to the enzyme or an abnormal Rtr1 activity. This defect also leads to an increase in the amount of stalled RNA pol II. In addition, the genetic interactions observed with other elements of the CTD phosphorylation-dephosphorylation machinery, could be indirect effects of the main defect associated to Rtr1.

3 ANALYSIS OF THE MECHANISMS ASSOCIATED TO Rpb1 DEGRADATION UNDER FOOT MUTATIONS

Our work shows that *rpo21-4* and *rpb1-84* mutations alter the RNA pol II stability leading to Rpb1 degradation in the nucleus, probably associated to the increase in the amount of stalled RNA pol II in coding regions. Then we decided to analyze the Rpb1 degradation pathway in foot mutants. Asr1 is an ubiquitin-ligase that interacts with CTD-Ser5-phosphorylated Rpb1 on chromatin, and modulates Rpb4/7 association with pol II *in vivo* (Daulny et al., 2008). Foot mutants show high levels of CTD-Ser5P- Rpb1 and low association of Rpb4/7 to the RNA pol II. Based on the effect of Asr1 on the composition of RNA pol II, we investigated whether an Asr1-dependent mechanism would cause Rpb1 degradation in the RNA pol II foot mutants, considering the abnormal CTD-Ser5 phosphorylation observed. If CTD-Ser5 phosphorylation were indeed the source of Asr1-mediated Rpb1 degradation, then deletion of *ASR1* would at least partially restore the growth defect of the *rpo21-4* and *rpb1-84* mutants. However, *ASR1* deletion even slightly aggravated the growth defect of foot mutants. These results agree with data from Western blotting showing that Asr1 inactivation did not restore the amount of Rpb1 in the mutants. In addition, it should be noted that Asr1 inactivation did not increase CTD-Ser5 phosphorylation

(Figures R52 and R53). These data suggest that the degradation of Rpb1 in RNA pol II foot mutants is mediated by an Asr1- independent mechanism.

Rsp5 is the best described Rpb1 Ub-ligase. Rsp5 can monoubiquitylate Rpb1 when it is CTD-Ser2-phosphorylated (Somesh et al., 2007). Elc1-Cul3 complex and Def1 recognize monoubiquitylated Rpb1, and synthesize a polyubiquitin chain that is target for proteasome recruitment and degradation (Wilson et al., 2012). Rad26 is required to recruit Def1 and antagonize the role of Def1 in promoting Rpb1 destruction. However, the ability of Rad26 to attenuate Def1 function may create a situation in which the preferred response to stalling is either TCR or chromatin remodeling, rather than pol II destruction (Daulny and Tansey, 2009). It has been also described, that Rpb9 has a role in Rpb1 ubiquitylation and degradation, by an Rad26-independent pathway (Chen et al., 2007). Taken together these data, we demonstrated that the combination of mutations in different elements of this ubiquitylation pathway and foot mutants, aggravated the growth of foot mutants (Figures R54 and R55). In addition, Rpb1 accumulated as a consequence of Rsp5 and Cul3 inactivation (Figure R56). These results suggest that stalled RNA pol II is degraded by an Rsp5-dependent pathway. Altering this process by inactivating different element may lead to the increase in the accumulation of stalled RNA pol II in foot mutants, aggravating their growth phenotypes. New experiments are necessary to verify this hypothesis (RUN-ON and others).

In an attempt to uncover novel genes that can suppress the temperature sensitivity phenotype of both foot mutants, we performed a high-copy number suppressor screening with the *rpo21-4* mutant. In this screening we found *RPB1*, *RPB6*, and *RTR1* gene. Based on these data and on the effect of *RPB6* overexpression on RNA pol II assembly and integrity we performed the same kind of experiments under *RTR1* overexpression. Notably *RTR1* overexpression corrected the Rpb1 degradation and the RNA pol II assembly defects in the foot mutants, as shown in purified RNA pol II (Figure R57). Finally, the effect of *RTR1* overexpression was not only dependent on a defect in RNA pol II assembly, since correcting assembly defect by *RPB6* overexpression did not overcome the synthetic lethality produced by deleting *RTR1* in foot mutants (Figure R58).

All these data together show that the degradation of Rpb1 as a consequence of the foot RNA pol II alteration is an Rsp5-dependent pathway directly associate to a defect in the transition from initiation to elongation of transcription involving the action of the Rtr1 phosphatase. We cannot exclude a role for Rtr1 in RNA pol II assembly, as it has been suggested in humans (Boulon et al., 2010; Forget et al., 2013).

4 ANALYSIS OF THE GLOBAL CONSEQUENCES ON TRANSCRIPTION UNDER FOOT ALTERATION

To study also the effect of foot mutations in transcription, we performed a global expression analysis using macroarrays containing all genes of *S. cerevisiae*, in collaboration with José Enrique Pérez Ortín group. As shown, both mutants have a similar response at 30°C (Figure R59).

The analysis of gene functional categories, GO, from those genes differentially expressed in foot mutants with respect to the wild-type strain (more than 2 fold), showed groups of genes related with a stress response, which is characterized by an alteration of more than 700 genes in a wild-type strain (Gasch et al., 2000). We observed a high number of common genes between those that increase or decrease its expression more than 2-fold in both mutants respect to the wild-type strains and those altered in a heat shock response (Gasch et al., 2000), as shown by Venn diagrams. In addition, the analysis of transcription factors associated with altered genes in foot mutants showed that much of them corresponded to those related with stress (Figure R61, Tables R2 and R3). These data suggest that altering the foot of the RNA pol II leads to a stress response at the permissive temperature of 30°C.

As it has been described that p-bodies are important for cellular stress, and that its accumulation increase during stress response (Teixeira et al., 2005), we decided to analyze the p-bodies accumulation in foot mutants using a plasmid expressing the p-bodies marker Dcp2 fused to a GFP protein (Harigaya et al., 2010). Foot mutants showed higher levels of p-bodies than the wild-type strain, at the permissive temperature of 30°C, and this increase is recovered under *RPB6*

overexpression, situation where RNA pol II assembly defect is suppressed (Figures R72 and R73).

Then we analyzed the expression of some stress response genes in those strains by qRT-PCR at 30 and 37°, concluding that mRNA accumulation at 30°C was higher in foot mutants than in the wild-type strain. Contrary, the mRNA accumulation at 37°C was lower in foot mutants. In addition, the 37°/30° ratios were lower in foot mutants than in the wild-type strain suggesting a defect in the activation of the stress response. Notably, *RBP6* overexpression, led to a partial correction of the 37°/30° ratio in the case of *rpo21-4* mutant, with no effect for the *rpb1-84* mutant. This result suggests that correcting assembly of RNA pol II is not enough to suppress the stress response of foot mutants (Figures R62 and R63).

RNA pol II occupancy to stress response genes did not vary in foot mutants respect to the wild-type strain, contrary to the RNA pol II recruitment to non-stress response genes (Figure R64). These data suggest that the global amount of RNA pol II associated to the stress response genes is higher than to other genes in foot mutants. The lower recruitment of RNA pol II to the non-stress genes, in foot mutants with respect to the wild-type strain, could be responsible for the lower mRNA accumulation. Notably, graphical representation of mRNA levels with respect to the recruitment of RNA pol II for both classes of genes suggested an increase in the mRNA stability (Figure R65).

Based on these data, we analyzed by northern-blot the mRNA half-lives of non-stress response gene, in foot mutant and wild-type strains, after the addition of thiolutin to stop transcription. The results clearly showed a general increase in mRNA stability (Figure R66, Table R4). To analyze stress response genes, we could not use thiolutin, since it has been described that thiolutin addition activates a stress response (Adams and Gross, 1991). For this reason, we replaced the promoter of some stress response genes by a *pGAL1* promoter and stopped transcription by adding glucose to the medium. The analysis showed a clear increase in mRNA half-lives (Figure R68, Table R5). Based on these data, we conclude that foot mutations led to a general increase in mRNA stability.

It has been described that Rpb4/7 interacts with RNA pol II transcripts (Goler-Baron et al., 2008; Ujvari and Luse, 2006). Despite the excess of Rpb4/7 over RNA pol II, interaction between Rpb4/7 and mRNAs can occur only in the context of RNA pol II. Specifically, Rpb4/7 remains associated with the mRNAs throughout its life, as well as regulating processes such as export, translation, movement out of P-bodies, 5' to 3' decay and 3' to 5' decay pathways (Choder, 2011; Forget and Chartrand, 2011; Goler-Baron et al., 2008; Lotan et al., 2005; Lotan et al., 2007). Reduced ability to recruit Rpb4/7 to the core RNA pol II results in impaired production and decay for selected genes (Shalem et al., 2011). In addition, Rpb4/7 imprinted mRNAs have increased ability to recruit general decay machinery (Goler-Baron et al., 2008; Lotan et al., 2005; Lotan et al., 2007). These data suggest that RNA pol II assembly defect could be responsible of mRNAs stabilization in foot mutants, by reducing the imprinted mRNAs amount, as it is the case of *rpb6^{Q100R}* and *rpb1^{C67S, C70S}* (Forget and Chartrand, 2011; Goler-Baron et al., 2008). To test this hypothesis more in detail, we analyzed the association of Rpb4 to mRNAs (purified with oligo(dT) beads), by western-blot analysis after mRNA-protein crosslinking by UV irradiation (at 254 nm). As shown, Rpb4 associated to the mRNA is lower in foot mutants than in the wild-type strain, suggesting lower levels of imprinted mRNAs which could lead to the increase in mRNAs stability (Figure R71).

Stress response genes, activated by transcription factors as Msn2/Msn4, are affected by loss of Mediator tail that regulates SAGA and Swi/Snf dependent genes (Ansari and Morse, 2012; Gasch et al., 2000). Under stress induction, Mediator tail subunits interact with coactivators as SAGA and Swi/Snf leading to transcription activation. Under non-stress conditions, Mediator tail interacts with kinase module subunits leading to block the association with RNA pol II and repressing the transcription (Ansari and Morse, 2012). In addition, as we have previously described foot mutants showed strong genetic interactions with Mediator subunits. Then, we analyzed the genetic interactions between foot mutations and deletion of the gene coding for the SAGA subunit Spt8. Double mutants partially suppressed the temperature sensitivity phenotype of both foot mutants. Contrary *SPT8* overexpression had no significant effect on growth of foot mutants (Figure R74).

Spt8 interacts with TBP to transfer it to the TATA box (Sermwittayawong and Tan, 2006) and participates in Mot1 recruitment to activate transcription in a TBP recruitment independent pathway (Topalidou et al., 2004; van Oevelen et al., 2005). NC2 and Mot1 cooperate to regulate the TBP binding to the promoter. Genes with high occupancy of SAGA and stress regulators in the promoter are repressed by NC2 and Mot1. In contrast, genes with a high occupancy of TFIID in the promoter are activated by NC2 and Mot1 (Spedale et al., 2012). We hypothesize that in foot mutants, NC2 and Mot1 doesn't repress the stress response genes transcription in a correct manner. As shown *NC2* (both subunits) and *MOT1* overexpression partially suppressed the growth of foot mutants. In addition, *NC2* and *MOT1* mutations aggravated growth of foot mutant strains. We also analyzed the Mot1 recruitment to the genes, as well as TBP recruitment, concluding that Mot1 and TBP recruitment in foot mutants is similar than in a wild-type strain. Notably, Mot1/Rpb1 and TBP/Rpb1 ratios for non-stress genes, were higher in foot mutants than in wild-type strains (Figure R76-79). These data demonstrate that Mot1 recruitment is not altered in foot mutants although there are lower levels of Mot1 and TBP recruitment respect to Rpb1 occupancy in stress genes than in other genes, suggesting differences in PIC formation. In addition, the analysis of *RPB6* overexpression in *mot1-301 rpo21-4* and *mot1-301 rpb1-84* double mutants suggest that Mot1 defect is not completely dependent on RNA pol II assembly, since *RPB6* overexpression can't restore the growth of *mot1-301 rpb1-84* mutant (Figure R80).

The capping enzyme (CE) machinery contacts with the RNA pol II foot in *S. cerevisiae* (Suh et al., 2010). In addition, the cap binding complex (CBC) stimulates, PIC formation by interaction with Mot1 *in vivo* in those genes that are positively regulated by Mot1. However, in Mot1 repressed genes, CBC inhibits PIC formation (Lahudkar et al., 2011). In addition, foot mutants showed strong genetic interaction with elements of capping machinery. Then, we analyzed the genetic relationship between Mot1 and Ceg1 in foot mutants. *MOT1* overexpression had no significant effect on temperature sensitivity phenotype of double mutants *rpo21-4 ceg1-250* and *rpb1-84 ceg1-250*. Contrary *CEG1* overexpression rescued the synthetic lethality of *rpo21-4 mot1-301* double mutant although the growth of this strain showed a strong

temperature sensitivity phenotype (Figure R81). These results suggest that Mot1-Ceg1 interaction is not mainly altered in foot mutants, but we can't rule out a defect in Mot1-CBC interaction.

Taken all these data together suggest that foot mutations lead to a PIC formation defect deregulating gene expression and inducing a stress response. In addition, lower levels of RNA pol II in foot mutants could be responsible for the expression levels deregulation, since repressed genes need lower levels of RNA pol II than highly transcribed genes.

5 GENOME-WIDE ANALYSIS OF Rpb4 ASSOCIATION TO mRNAs BY isRIP-Seq

Although it is described that Rpb4/7 associate with mRNAs throughout its life and modulate their stability, transport, decay and translation (Goler-Baron et al., 2008), whether the association between Rpb4/7 and mRNAs depends on the gene category and whether it determinates their postranscriptional regulation is still unclear. We decided to investigate whether the association of the dissociable Rpb4/7 heterodimeric subcomplex to the mRNAs was dependent on the gene category, whether mutations that affect Rpb4/7 dissociation from the RNA pol II affected this behavior and whether these mutations could determine different mRNA poly-A species. To clarify these objectives we carried out isoform-specific RNA immunoprecipitation and sequencing (isRIP-seq) analysis at the Lab of Dr. Lars Steinmetz, at the EMBL (Heidelberg; Germany) during a short-stay.

The analysis of some genes, by qRT-PCR, from RIP samples, as well as from RNA input samples before RNA immunoprecipitation, showed that *ACT1* gene was enriched in the RIP samples when compare with INPUT samples, for both wild-type and mutant strains. However no enrichment for *RPL28* gene was observed, suggesting that Rpb4 is only bound to some mRNAs (Figure R83).

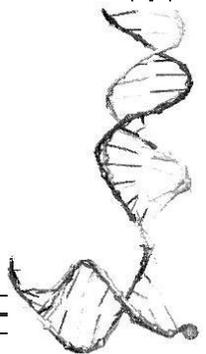
The immunoprecipitated RNA samples were used to perform sequencing libraries using the 3'T-Fill method (Wilkening et al., 2013) and genome-wide sequencing analysis using the Illumina sequencer of Core Facilities Unit of EMBL. As Genome-wide sequencing is a slow procedure we haven't results yet.

We expect that RIP-seq results will allow us to establish the correlation between Rpb4 association to mRNAs and to gene category. In addition, by applying the 3'T-fill method (Wilkening et al., 2013) we will obtain both a genome-wide polyadenylation site mapping and RNA quantification. In addition, the use of a mutant strain will give information about the effect of affecting assembly of the RNA pol II and the Rpb4-mRNA association and alternative polyadenylation sites generation.

We also plan to analyze the correlation between Rpb4 presence and mRNA stability, as both Rpb4/7 presence and alternative polyadenylation sites have been linked to changes in mRNA stability (Lotan et al., 2005; Lotan et al., 2007; Spies et al., 2013). To investigate if those processes are connected we will perform detailed bioinformatic analysis comparing the results obtained in the RIP-seq with mRNA stability data and 3' isoform stability measurements (unpublished, Steinmetz lab). Individual candidate genes will be selected to follow up confirmation experiments.

We speculate that altering the foot of the RNA pol II and the assembly of the complex which leads to the dissociation of Rpb4/7, would decrease the amount of Rpb4/7 associated to the RNA pol II during transcription and increase the pool of nuclear mRNA free of Rpb4/7. Consequently, it would lead to an increase in the stability of mRNA.

Introducción



INTRODUCCIÓN

1 MAQUINARIA DE TRANSCRIPCIÓN EN ORGANISMOS EUCARIOTAS

El proceso por el que se sintetizan las moléculas de RNA desde un molde de DNA se denomina transcripción. El resultado es una molécula de RNA complementaria a la secuencia de DNA de una de las dos cadenas de la doble hélice. La transcripción en eucariotas está regulada por un gran número de proteínas, como las RNA polimerasas, factores de unión al DNA específicos de secuencia, remodeladores de cromatina, reguladores transcripcionales... (revisado en Hahn and Young, 2011; Shandilya and Roberts, 2012; Svetlov and Nudler, 2013; Venters and Pugh, 2009).

1.1 LAS RNA POLIMERASAS

En todos los eucariotas la transcripción se lleva a cabo por RNA polimerasas heteromultiméricas dependientes de DNA, así como en arqueas, bacterias, cloroplastos, mitocondrias y en algunos virus de DNA núcleo-citoplasmáticos. Todas las RNA polimerasas heteromultiméricas están relacionadas evolutivamente (Figura I1, Tabla I1). Las subunidades mayores, equivalentes a β y β' en bacterias forman el sitio activo y aunque presentan diferencias en las secuencias de aminoácidos, poseen homología estructural (Werner and Grohmann, 2011).

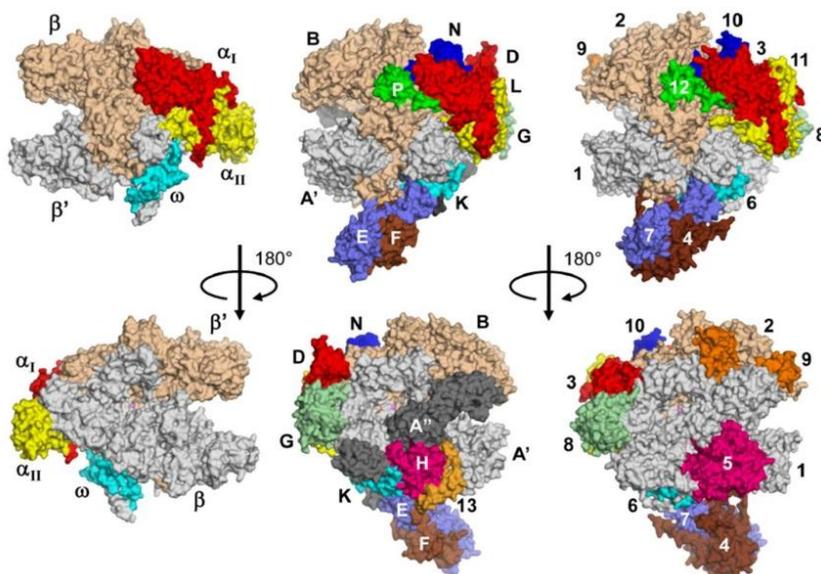


Figura I1: Representación de las estructuras de las RNA polimerasas celulares de bacterias (izquierda, *Thermus aquaticus*), arqueas (centro, *Sulfolobus solfataricus*) y eucariotas (derecha, RNA pol II de *S. cerevisiae*). Cada subunidad muestra un color distinto. Subunidades ortólogas se representan con el mismo color (Hirata and Murakami, 2009).

Todos los organismos eucariotas poseen 3 RNA polimerasas distintas que funcionan asociadas a una compleja maquinaria transcripcional. Además, se ha descrito, que en plantas existen dos RNA polimerasas multiméricas adicionales, las RNA polimerasas IV y V (RNA pol IV y V) (Haag and Pikaard, 2011). Las diferentes enzimas difieren en su localización nuclear, comportamiento cromatográfico, requerimientos salinos, composición en subunidades, sensibilidad a la toxina α -amanitina, y, sobre todo, en la clase de RNA que sintetizan (Archambault and Friesen, 1993).

La RNA polimerasa I (RNA pol I) sintetiza un único transcrito, el RNA policistrónico 35S que codifica tres de los cuatro RNA ribosómicos en eucariotas (rRNA 25S, rRNA 18S y rRNA 5,8S en levaduras) gracias a procesos de maduración complejos en los que intervienen endonucleasas y exonucleasas (revisado en Houseley and Tollervey, 2009).

La transcripción de la RNA polimerasa II (RNA pol II) produce muchas clases diferentes de RNA, incluyendo los mRNA y los precursores de muchos RNAs estables, donde se incluyen los RNAs pequeños nucleares (snRNAs) cuya función es el corte y ensamblaje de los pre-mRNA (*splicing*) y los RNAs pequeños nucleolares (snoRNAs) que funcionan en la síntesis de los ribosomas (revisado en Houseley and Tollervey, 2009). Además, sintetizan otros tipos de RNA no codificantes (ncRNAs) como los pequeños RNAs asociados a los cuerpos de Cajal (scaRNAs) que, al igual que los snoRNAs se generan a partir de los intrones eliminados de los pre-mRNA; y los microRNAs (miRNAs), que controlan la expresión de su mRNA diana y participan en el crecimiento celular, diferenciación y apoptosis (revisado en Pawlicki and Steitz, 2010). Por último, existen RNAs largos no codificantes (lncRNAs, *long non-coding RNAs*), *piwi-interacting RNAs* (piRNAs) y pequeños RNAs de interferencia (siRNAs) (revisado en Kornienko et al., 2013). La fragmentación de algunos de estos tipos de RNAs produce otros tipos de pequeños RNA regulatorios como los sdrRNAs (*snoRNA-derived fragments*) (revisado en Tuck and Tollervey, 2011).

La RNA polimerasa III (RNA pol III) produce muchos RNA pequeños y estables, incluyendo los RNAs transferentes, el RNA ribosómico 5S, el RNA U6 (implicado en el *splicing* de los pre-mRNA), el RNA 7SL (que constituye la plataforma de las partículas de reconocimiento de señal), los componentes de RNA de la RNasa P (requerida entre otras funciones para el procesamiento de los precursores de tRNA), el componente de RNA de la enzima de procesamiento del rRNA (RNase MRP RNA), el snR52 (que metila el RNA ribosómico), el 7SK RNA (involucrado en la regulación de la transcripción de la RNA pol II), los Vault RNAs (forman parte de ribonucleoproteínas citoplasmáticas implicadas en el ensamblaje y transporte de macromoléculas) y los Y RNAs (forman parte de ribonucleoproteínas requeridas para la replicación del DNA en humanos) (Dieci et al., 2012). Además, existen fragmentos regulatorios de tRNA (tRFs) generados a partir del procesamiento de los tRNA (Tuck and Tollervey, 2011).

En plantas se han descrito otras dos RNA polimerasas adicionales (Haag and Pikaard, 2011; Wierzbicki et al., 2008). Las denominadas RNA pol IV y V (o RNA pols nucleares D y E) parecen funcionar específicamente en el silenciamiento génico mediado por RNA de interferencia. Aunque los transcritos de la RNA pol IV no se han observado directamente, se cree que produce precursores de RNAs pequeños de interferencia (siRNA). Los transcritos de la RNA pol V se han detectado *in vivo* y se ha propuesto que funcionan como plataforma para que los siRNA y sus proteínas asociadas puedan reconocer a su locus diana, además de en el reclutamiento de las RNA pol IV y V a las regiones silenciadas (revisado en Wierzbicki, 2012).

Mientras que la RNA pol II transcribe la mayor parte del genoma, su contribución a la cantidad total de RNA presente en la célula es menos del 10%. La transcripción de la RNA pol I da lugar al 75% del total de transcritos, mientras que la transcripción de la RNA pol III representa un 15% del total del RNA de la célula eucariota (Werner et al., 2009).

Las RNA pols eucariotas han sido bien caracterizadas en *S. cerevisiae* aunque están conservadas en organismos superiores. Comprenden 14 subunidades (RNA pol I), 12 subunidades (RNA pol II) y 17 subunidades (RNA pol III) (Tabla I1).

Bacteria	Arquea	Eucariotas				
		RNA pol II	RNA pol I	RNA pol III	RNA pol IV (plantas)	RNA pol V (plantas)
β	Rpo1 (RpoA)	RPB1	A190	C160	NRPD1	NRPE1
β	Rpo2 (RpoB)	RPB2	A135	C128	NRPD/E2	NRPD/E2
α	Rpo3 (RpoD)	RPB3	AC40	AC40	RPB3 [1]	RPB3 [1]
α	Rpo11 (RpoL)	RPB11	AC19	AC19	RPB11	RPB11
ω	Rpo6 (RpoK)	RPB6	RPB6	RPB6	RPB6 [1]	RPB6 [1]
	Rpo5 (RpoH)	RPB5	RPB5	RPB5	RPB5 [3]	NRPE5
	“Rpo8(RpoG)”	RPB8	RPB8	RPB8	RPB8 [1]	RPB8 [1]
	Rpo10(RpoN)	RPB10	RPB10	RPB10	RPB10	RPB10
	Rpo12 (RpoP)	RPB12	RPB12	RPB12	RPB12	RPB12
	Rpo4 (RpoF)	RPB4	A14	C17	NRPD/E4	NRPD/E4
	Rpo7 (RpoE)	RPB7	A43	C25	NRPD7 [1]	NRPE7
		RPB9	A12	C11	NRPD9b	RPB9
	“Rpo13”		A49			
			A34.5			
				C82		
				C53		
				C37		
				C34		
				C31		

Tabla 11: Composición de las RNA pols en los tres dominios de vida. Las subunidades “G” y “Rpo13” solo están presentes en algunas especies de arqueas. Las RNA pol IV y V de plantas tienen una composición similar a la de la RNA pol II. Los números entre corchetes indican el número de ortólogos en las RNA pol IV y V (adaptado de Werner and Grohmann, 2011 con algunas modificaciones).

Las tres RNA pols contienen un esqueleto conservado de 12 polipéptidos, 11 de los cuales tienen sus homólogos en la RNA pol de arqueas (Langer et al., 1995). Se pueden dividir las subunidades de las RNA pols eucariotas en cuatro grupos:

- El esqueleto base, compuesto de 5 polipéptidos de tipo $\beta'\beta\alpha^2\omega$, que asegura la actividad catalítica. Este esqueleto es homólogo a la RNA pol bacteriana y arqueana.
- Seis polipéptidos propios de los eucariotas y de arqueas: Rpb5, Rpb10 y Rpb12, además de Rpb4, Rpb7 y Rpb9 y sus homólogos en las RNA pols I y III (A14 y C17, A43 y C25 y A12 y C11, respectivamente).

- Las subunidades específicas de las RNA pol I y III (2 en el caso de la RNA pol I y 5 en el caso de la RNA pol III) que contribuyen a la especialización transcripcional.
- Una subunidad específica de eucariotas, Rpb8, aunque se ha descrito recientemente una proteína homóloga a Rpb8 en arqueas (en Crenarqueas), denominada proteína G. Esta proteína G se ha propuesto como el eslabón perdido entre el núcleo estructural de las RNA pols de arqueas y de eucariotas (Kwapisz et al., 2008).

De entre estos grupos, 5 subunidades son comunes a las tres RNA pols, Rpb5, Rpb6, Rpb8, Rpb10 y Rpb12, siendo Rpb5 la única no intercambiable entre humanos y levaduras (Zaros et al., 2007).

1.1.1 La RNA polimerasa I

La RNA pol I sintetiza el RNA ribosómico 35S (rRNA 35S). La síntesis del rRNA es la primera etapa en la biogénesis de los ribosomas y es un punto clave para la regulación del crecimiento de la célula (Moss et al., 2007). En levaduras, la actividad de la RNA pol I es más del 60% de toda la transcripción nuclear (Warner, 1999), y el producto (rRNA) es más del 75% de todo el RNA celular (Warner, 1999; Werner et al., 2009).

La RNA pol I tiene un peso molecular de 589 kDa y cuenta con 14 subunidades (Engel et al., 2013; Fernandez-Tornero et al., 2013; Kuhn et al., 2007). Las subunidades A49 y A34.5 forman un heterodímero que está relacionado con el factor de iniciación de la RNA pol II TFIIF y con el subcomplejo de la RNA pol III, C37-C53 (Engel et al., 2013). Además, el dominio “*C-terminal tandem winged hélix*” (tWH) de A49 podría estar relacionado con partes del factor general de transcripción TFIIE (Fernandez-Tornero et al., 2013).

La subunidad A12 es homóloga de las subunidades Rpb9 y C11, pero su dominio carboxilo terminal está también relacionado con el factor de transcripción TFIIIS, que estimula el corte del RNA por la RNA pol II, lo que explica la mayor actividad intrínseca de corte de la RNA pol I (Fernandez-Tornero et al., 2013; Kuhn et al., 2007). Además el subcomplejo A49-A34.5 estabiliza a la subunidad A12,

explicando por qué estimula el corte del RNA dependiente de A12 y por qué se disocia tras la delección de A12 (Fernandez-Tornero et al., 2013).

La estructura cristalina de la RNA pol I revela llamativas características que la diferencian de otras RNA pols (Figura I2). Aunque la forma general del núcleo de la enzima se conserva, la hendidura de unión al DNA adopta la conformación más amplia jamás registrada, aproximadamente 10 Å más abierta (Fernandez-Tornero et al., 2013). Además, se especula que el dominio *clamp* se encuentra siempre en una conformación cerrada (a diferencia de lo que ocurre en la RNA pol II), lo que puede explicar la alta procesividad de esta enzima para transcribir el rRNA 35S sin disociarse (Fernandez-Tornero et al., 2013).

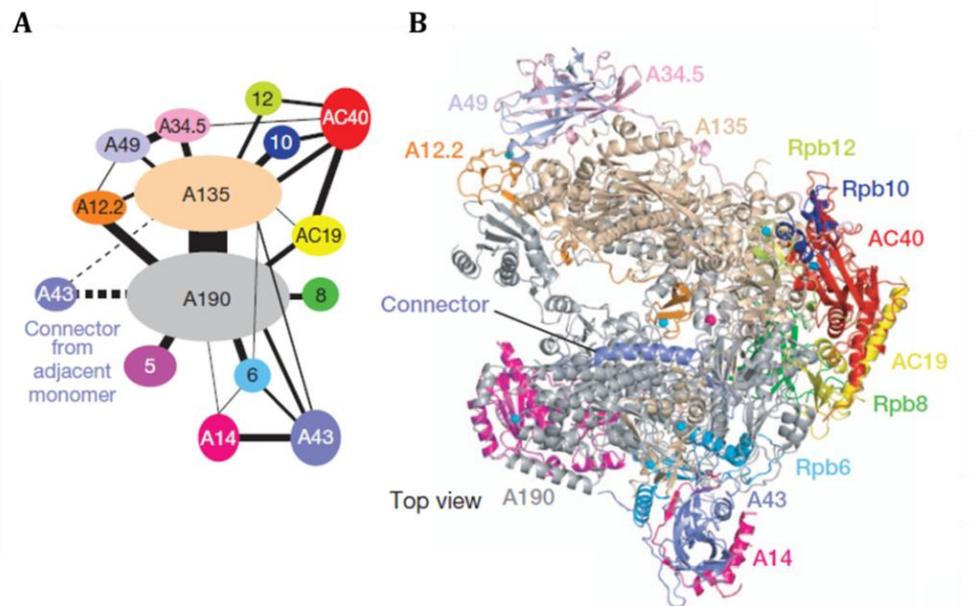


Figura I2: Estructura cristalográfica de la RNA pol I (Engel et al., 2013). A) Interacción entre las distintas subunidades y código de colores. B) Representación de la estructura de la RNA pol I. A12.2 corresponde a la subunidad A12 (Tabla I1).

La RNA pol I solo se dirige al complejo de preiniciación cuando está unida a la proteína Rrn3, formando un complejo competente para la transcripción gracias a la interacción entre Rrn3 y la subunidad A43 (Peyroche et al., 2000). Se ha encontrado una forma dimérica de la RNA pol I que se establece por interacciones del *cleft* expandido de una RNA pol I con el subcomplejo *stalk*, A14-A43, de otra RNA pol I. La

dimerización inhibe el ensamblaje del complejo de iniciación porque ocluye el sitio de unión de los factores de iniciación Rrn3 y Rrn7 (Engel et al., 2013).

La divergencia en la evolución de la RNA pol I es especialmente fuerte en *Trypanosomas* donde la RNA pol I, a parte de su papel en la síntesis del rRNA, también sintetiza mRNA muy abundantes como las prociclinas o las glicoproteínas de superficie. La RNA pol I de *Trypanosoma* se caracteriza por una subunidad específica de la especie (TbRPA31), una gran extensión del dominio N-terminal de su segunda subunidad mayor y por la presencia de formas de Rpb5, Rpb6 y Rpb10 específicas de la RNA pol I (Nguyen et al., 2007). También carece de homólogo detectable de A43, aunque su parálogo Rpb7, parece ser requerido para la transcripción (Penate et al., 2009).

1.1.2 La RNA polimerasa III

La RNA pol III sintetiza un conjunto de pequeños RNA no traducidos que tienen importantes funciones en la regulación de la expresión génica (Dieci et al., 2007).

La RNA pol III tiene una masa molecular de 0,7 MDa, siendo la mayor de las RNA pols eucarióticas (Figura I3). Al igual que en las otras RNA pols, las subunidades mayores del complejo, C160 y C128, forman la hendidura de unión al DNA y albergan el sitio activo de la enzima. La subunidad C11 participa en el corte del transcrito durante la parada y *backtracking* de la enzima y también forma parte del núcleo de la misma (Fernandez-Tornero et al., 2010; Fernandez-Tornero et al., 2007; Jasiak et al., 2006). Unido al núcleo de la enzima, las subunidades C17 y C25, homólogas a Rpb4 y Rpb7 en la RNA pol II, forman un tallo o *stalk*, que proporciona una plataforma para los factores de iniciación y está involucrado en la interacción con el RNA naciente. Sus cinco subunidades específicas (C31, C34, C37, C53 y C82) están organizadas en dos subcomplejos distintos. Un subcomplejo está formado por el heterodímero C37/C53, que es el equivalente al formado por las subunidades A49/A34.5 de la RNA pol I y está relacionado con el factor de iniciación TFIIF (Kuhn et al., 2007). Este dímero interactúa con el DNA dentro del canal y está implicado en la iniciación, elongación y terminación de la transcripción, así como en la reiniciación de la misma. El otro subcomplejo se corresponde con el heterotrímero C31/C82/C34, que presenta cierta

homología con el factor general de transcripción de la RNA pol II, TFIIE y está involucrado en la iniciación de la transcripción (Carter and Drouin, 2010). La subunidad C34 interacciona con la subunidad Brf1, parte del factor general de transcripción específico TFIIB (Fernandez-Tornero et al., 2011). Cada subcomplejo se une a un lado del canal, cerca de su final, aguas abajo, haciendo el canal de unión del DNA mayor que en la RNA pol II (Fernandez-Tornero et al., 2011) (Figura 13).

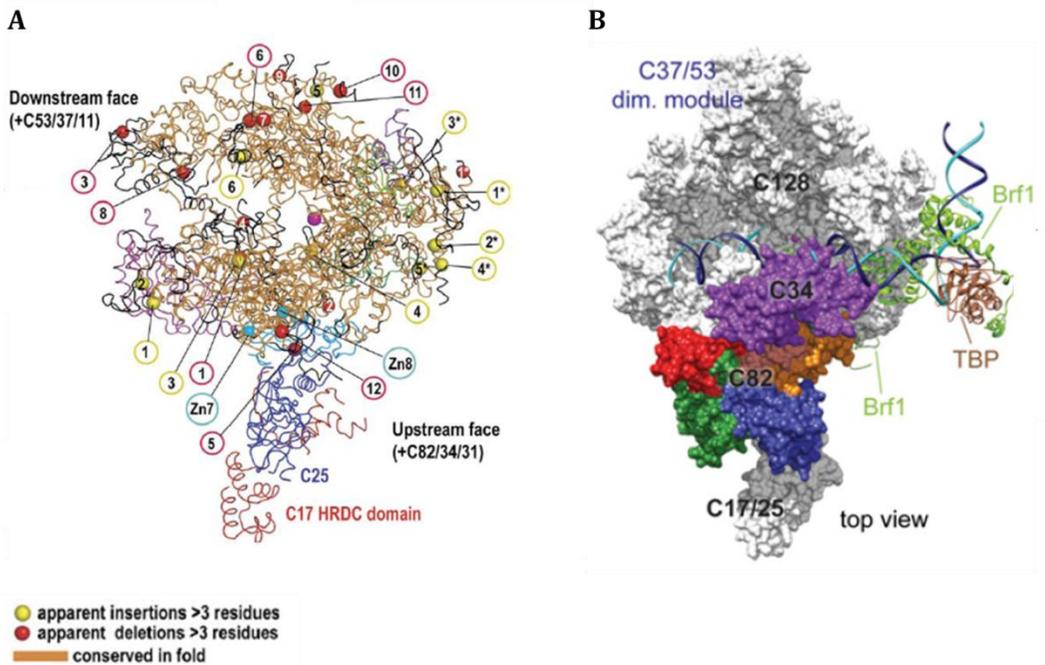


Figura 13: A) Modelo de 11 subunidades de la RNA pol III. El modelo se obtuvo combinando el modelo de homología de las nueve subunidades del núcleo de la RNA pol III con la estructura obtenida mediante rayos X del complejo C17/C25. Las regiones con homología de plegamiento en la RNA pol II se muestran en naranja. Las deleciones e inserciones en la secuencia de aminoácidos de la RNA pol III en comparación con la RNA pol II se muestran como esferas rojas y amarillas, respectivamente si exceden de 3 residuos de aminoácidos de longitud. Se predice la localización de los dos subcomplejos C82/34/31 y C53/37/11, que no están presentes en el modelo (Jasiak et al., 2006). B) Arquitectura de la RNA pol III. Modelo del complejo promotor abierto de la RNA pol III. El modelo del complejo pol III-Brf1-TBP-DNA se construyó basado en el complejo pol II-TFIIB-TBP (Kostrewa et al., 2009) y la estructura de Brf1-TBP-DNA (Juo et al., 2003). Las cadenas de DNA molde y no molde se muestran en azul y cian, respectivamente. El modelo de la RNA pol III-C37/53 se muestra en gris. Los modelos moleculares de Brf1 y TBP están coloreados en verde claro y marrón, respectivamente. Los cuatro dominios de C82 están coloreados en rojo, amarillo, verde y azul, y la subunidad C34 se muestra de color morado (Wu et al., 2012).

1.1.3 La RNA polimerasa II

La RNA pol II es la enzima responsable de la síntesis de todos los mRNA de la célula, además de otros pequeños RNA no codificantes. La maquinaria transcripcional de la RNA pol II es la más compleja de las tres RNA pols y consta de más de 60 polipéptidos incluyendo factores generales de transcripción, co-reguladores, activadores y represores específicos (Hahn, 2004); lo que implica que sea la más estudiada de las tres RNA pols eucariotas.

De todas las subunidades de la RNA pol II (Figura I4 y Tabla I1) solo Rpb4 y Rpb9 son dispensables para la viabilidad celular (Woychik and Young, 1990).

Los cristales de la RNA pol II completa, formada por 12 subunidades, cuya masa molecular es 514 KDa, incluyen el núcleo de la enzima y las dos subunidades dissociables Rpb4 y Rpb7 (Armache et al., 2003; Bushnell et al., 2004) (Cramer et al., 2000; Cramer et al., 2001) (Figura I4A).

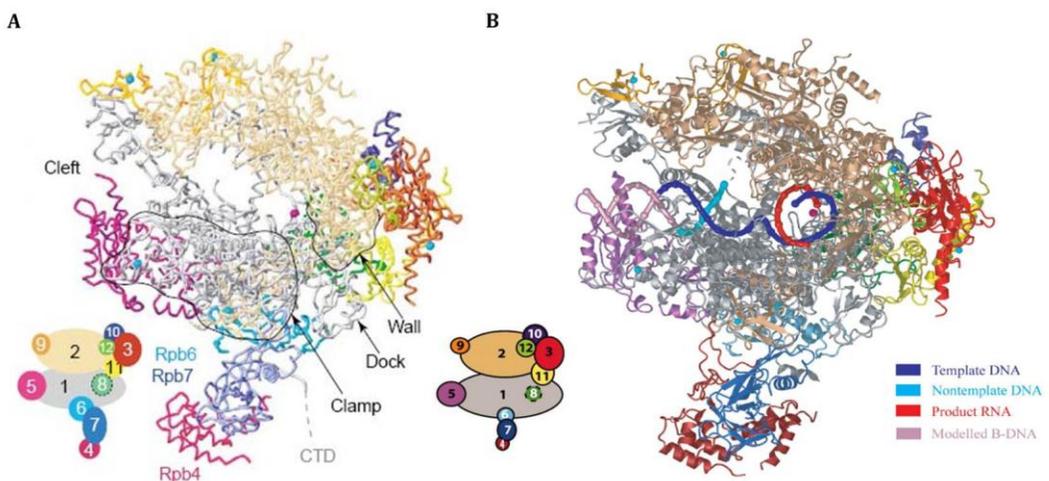


Figura I4: A) Modelo de la RNA pol II completa (Armache et al., 2003). Cada subunidad posee un color distinto (esquema en la parte inferior). Las esferas azules son ocho iones zinc y la esfera rosa es el ión magnesio presente en el sitio activo de la enzima. B) Estructura de la RNA pol II elongante. Se muestran las subunidades de la enzima según el patrón de colores de la parte inferior. El DNA molde así como el RNA sintetizado se muestran de color azul y rojo respectivamente (Kettenberger et al., 2004).

El “núcleo” o “core” de la enzima comprende las subunidades Rpb1 y Rpb2, las cuales forman el centro activo de la enzima, así como las subunidades Rpb3, Rpb10, Rpb11 y Rpb12 que se han implicado en el ensamblaje del complejo (Cramer et al.,

2001) (Figura I5). Otros tres módulos adicionales se encuentran a ambos lados del canal de la enzima, antes del sitio activo. El módulo de la “garra-lóbulo” (*jaw-lobe*), contiene la garra superior, formada por parte de regiones de Rpb1 y Rpb9, y el lóbulo de Rpb2. El módulo “plataforma” (*shelf*), contiene la garra inferior (un dominio de Rpb5), el dominio de ensamblaje de Rpb5, Rpb6 y las regiones del “pie” (*foot*) y “hendidura” (*cleft*) de Rpb1. El módulo restante, denominado “grapa” (*clamp*) está formado por regiones de Rpb1 y regiones de Rpb2 (Cramer et al., 2001).

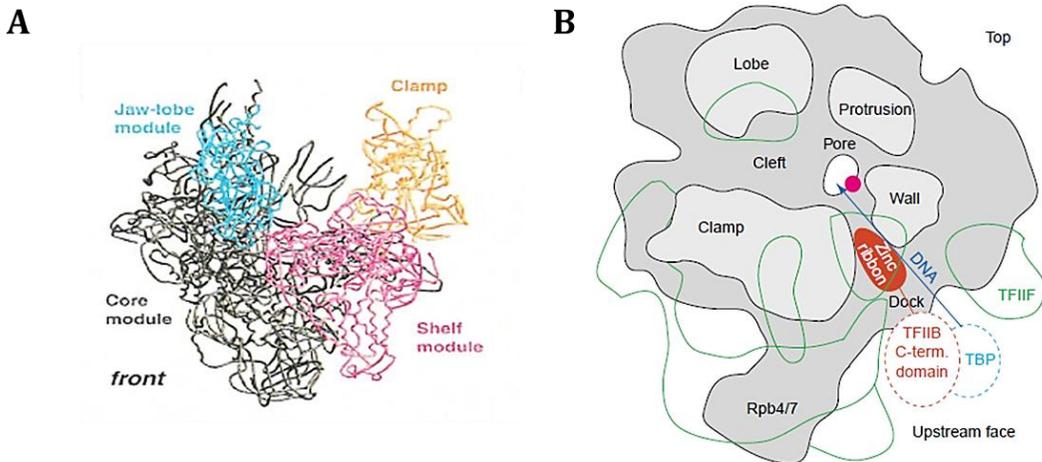


Figura I5: A) Estructura de los cuatro módulos de la RNA pol II (Cramer et al., 2001). Los módulos *core*, *jaw-lobe*, *shelf* y *clamp*, se muestran en negro, azul, rosa y naranja, respectivamente. B) Modelo del complejo mínimo de preiniciación. La estructura de la RNA pol II se muestra de manera esquemática en gris con las localizaciones de los factores generales de transcripción TBP, TFIIB y TFIIF en cian, rojo y verde, respectivamente. La flecha azul indica la presunta dirección del DNA aguas arriba del promotor a través del sitio activo (ión Mg^{2+} , esfera color magenta) (Cramer, 2004).

Las subunidades mayores Rpb1 y Rpb2, forman el núcleo catalítico de la enzima determinando un canal central que culmina en el centro activo de la misma, ocupado por un ión magnesio (Figura I4 e I5). Tras el centro activo, se encuentra una pared que bloquea el final del mismo. Un puente atraviesa el canal y forma un poro debajo del centro activo que permite la salida del RNA de nueva síntesis. En uno de los lados del canal se encuentra el módulo grapa o *clamp* que adopta una configuración abierta en la estructura del núcleo de la enzima cuando no está Rpb4/7, lo que permite la entrada del DNA en el canal. Este dominio cambia su conformación y cierra el canal, gracias a la interacción del dímero Rpb4/7 con el núcleo de la RNA pol II, lo que contribuye a la elongación de la transcripción y a la procesividad de la

enzima (Cramer et al., 2001; Gnatt et al., 2001). Además, se sugiere que el *clamp* está cerrado durante la iniciación de la transcripción (Figura I4B) (Cramer, 2004; Cramer et al., 2001).

Recientemente, nuestro grupo ha descrito la existencia de regiones o dominios conservados en las subunidades mayores de la RNA pol II de todos los eucariotas, sin homología en las RNA pol I y III ni en las RNA pol de arqueas ni de bacterias (García-Lopez and Navarro, 2011). Estos dominios conservados (Tabla I2) que son parte de regiones previamente descritas (Cramer et al., 2001), se encuentran en la superficie del complejo y son potenciales zonas de interacción con moduladores transcripcionales (Tabla I2). Se ha descrito la interacción del dominio conservado de la garra con los factores de transcripción TFIIS (Kettenberger et al., 2003) y TFIIE (Leuther et al., 1996). El dominio conservado del embudo interacciona también con TFIIS (Kettenberger et al., 2003). Los dominios conservados de la pared y *dock* interaccionan con TFIIB (Bushnell et al., 2004; Kostrewa et al., 2009). Finalmente, el dominio conservado del pie de la RNA pol II interacciona físicamente con el componente Ceg1 de la enzima de *capping* del mRNA (Suh et al., 2010), así como con dos nuevos reguladores transcripcionales implicados en la iniciación y/o elongación temprana de la transcripción, Mvp1 y Spo14 (García-Lopez et al., 2011).

Nombre	Dominio*	Aminoácidos**	Subunidad	Interacciones +
Jaw_c (garra)	Jaw	1158–1273	Rpb1	TFIIS (1), TFIIE (2)
Funnel_c (embudo)	Funnel	650–715	Rpb1	TFIIS (1)
Dock_c	Dock	402–430	Rpb1	TFIIB (3, 4)
Wall_c (pared)	Wall	850–891	Rpb2	TFIIB (3, 4)
Foot_c (pie)	Foot	881–1044	Rpb1	CE (5), Mvp1/Spo14 (6)

Tabla I2: Regiones conservadas de la RNA pol II. * Corresponde a los dominios de la RNA pol II definidos por Cramer et al. ** Residuos de los dominios conservados descritos por García-Lopez y Navarro. + Los números indican las referencias de las interacciones descritas entre factores de transcripción u otros reguladores transcripcionales y los dominios conservados de la RNA pol II: 1 (Kettenberger et al., 2003), 2 (Leuther et al., 1996), 3 (Kostrewa et al., 2009), 4 (Bushnell et al., 2004), 5 (Suh et al., 2010) y 6 (García-Lopez et al., 2011).

1.1.3.1 El dímero Rpb4/7

Rpb4/7 corresponde a un subcomplejo de dos subunidades denominadas Rpb4 y Rpb7 que interactúan entre sí, que puede disociarse del núcleo de la enzima y que recibe el nombre de tallo o *stalk*. Rpb7 es esencial para la viabilidad celular (como la mayoría de las subunidades de la RNA pol II) (McKune et al., 1993), mientras que Rpb4 es dispensable bajo condiciones óptimas de crecimiento (Woychik and Young, 1989).

Los datos estructurales obtenidos por microscopía electrónica han localizado a Rpb4/7 en la base del canal de unión del DNA (Figura I4). La estructura cristalográfica revela que Rpb7, a través de su región conservada N-terminal interactúa con Rpb1 (Armache et al., 2005). La estructura revela, además, un enlace de hidrógeno entre el residuo Gly⁶⁶ de Rpb7 y el residuo Gln¹⁰⁰ de Rpb6 en el núcleo de la RNA pol II (Armache et al., 2005). Este puente de hidrógeno explica por qué mutaciones en el residuo Gln¹⁰⁰ de Rpb6 facilitan la disociación de Rpb4/7 y reducen la actividad de la RNA pol II tras un cambio a temperatura no permisiva (Tan et al., 2003). Además la extensión N-terminal de Rpb4 (aminoácidos 1 al 46) interactúa con el resto de la RNA pol II a través de Rpb2 (Figura I6).

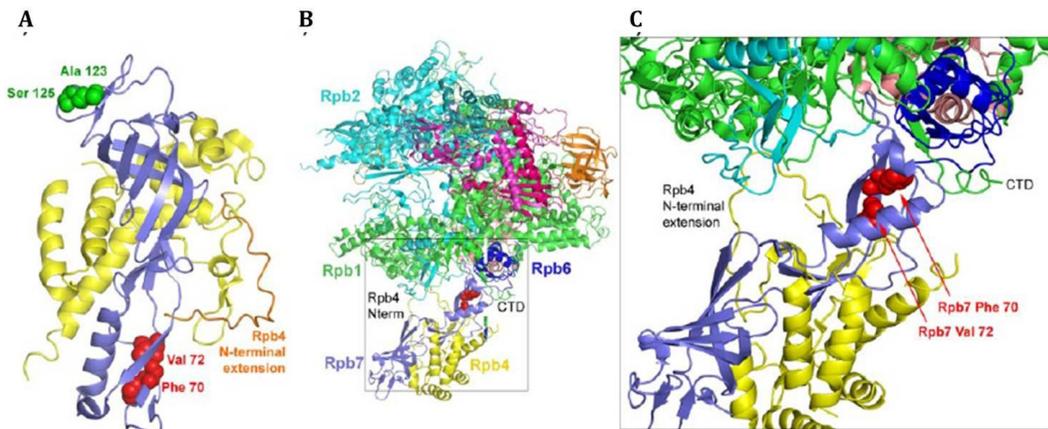


Figura I6: Diagramas que muestran la estructura del dímero Rpb4/7 en el contexto de la RNA pol II. A) Estructura cristalográfica del heterodímero Rpb4/7 de *Saccharomyces cerevisiae*, donde Rpb4 se muestra de color amarillo y Rpb7 de color azul. En verde, la subunidad mayor de la RNA pol II, Rpb1 y en azul oscuro la subunidad Rpb6 que contacta en la estructura con el dímero Rpb4/7. B) Estructura cristalográfica de la RNA pol II completa. C) Ampliación de la zona de unión del dímero Rpb4/7 con el resto de la RNA pol II. Los residuos de Rpb7 Phe⁷⁰ y

Val⁷² están implicados en las interacciones hidrofóbicas entre el dominio N-terminal de Rpb7 y el núcleo de la enzima (Sampath et al., 2008).

Se ha descrito además que Rpb7 podría continuar interactuando débilmente con la RNA pol II en ausencia de Rpb4 (Maillet et al., 1999). Sin embargo, a temperaturas restrictivas, la interacción entre Rpb7 y la RNA pol II sería demasiado débil, conduciendo a la disociación de Rpb7 e inactivación de la enzima. En base a estos datos, se sugiere que la función de Rpb4 podría ser estructural manteniendo a Rpb7 en el complejo (Maillet et al., 1999).

La disociación de Rpb4/7 de la RNA pol II se ha mostrado tanto *in vitro*, como *in vivo* (Daulny et al., 2008; Garrido-Godino et al., 2013; Mosley et al., 2013; Tan et al., 2003). Se ha sugerido que Rpb4/7 estaría ensamblada con la RNA pol II antes de la iniciación de la transcripción, permitiendo una configuración cerrada del *clamp* que podría prevenir la entrada de DNA de doble cadena al sitio activo. Solo después de la separación de las cadenas, el DNA molde podría entrar en el canal debido a su menor tamaño y mayor flexibilidad (Cramer et al., 2001) (Armache et al., 2003; Asturias and Craighead, 2003; Craighead et al., 2002). Esta conformación cerrada del *clamp*, atrapando el DNA en el interior del canal, contribuye a la elongación de la transcripción y a la procesividad de la enzima (Gnatt et al., 2001).

Se ha descrito que Rpb4 está en exceso en las células con respecto a otras subunidades de la RNA pol II (Farago et al., 2003). Aproximadamente el 20% de las RNA pol II contienen el dímero Rpb4/7 cuando se purifican a partir de células creciendo en fase exponencial, mientras que este nivel alcanza el 100% cuando la enzima se purifica de cultivos creciendo en fase estacionaria (Choder and Young, 1993).

Tradicionalmente se ha relacionado la función de la subunidad Rpb4 principalmente con una respuesta de estrés celular, basado en el hecho que de esta proteína parece jugar un pequeño o nulo papel en la transcripción cuando las células se exponen a medios ricos en nutrientes y temperaturas moderadas pero es esencial para la transcripción en condiciones de escasez de nutrientes, y para la supervivencia durante condiciones de estrés (Choder and Young, 1993). Se ha descrito que células carentes de Rpb4 son más sensibles a distintos tipos de estreses, como la

temperatura, etanol o escasez de nutrientes pero no al estrés osmótico u oxidativo (Maillet et al., 1999; Sheffer et al., 1999). Sin embargo, otros autores han descrito un papel para la subunidad Rpb4 en la síntesis del mRNA en condiciones de ausencia de estrés (Bourbonnais et al., 2001) y el análisis de expresión global del mutante nulo *rpb4Δ* muestra una caída global de la transcripción tras un choque térmico, no limitada solo a genes relacionados con estrés (Miyao et al., 2001). Trabajos más recientes han implicado al dímero Rpb4/7 en múltiples procesos de la expresión génica tales como la iniciación, elongación y terminación de la transcripción, transporte al citoplasma del mRNA, traducción y degradación del mismo (Chung et al., 2003; Harel-Sharvit et al., 2010; Hirtreiter et al., 2010; Lotan et al., 2005; Lotan et al., 2007). Se ha propuesto que Rpb4/7, así como sus homólogos en arqueas, el complejo F/E juegan un importante papel durante la iniciación de la transcripción facilitando la separación de la doble hebra de DNA y mediante la interacción funcional de la RNA pol con el factor basal de transcripción TFIIF, en eucariotas, así como el factor TFE en arqueas (Chung et al., 2003; Naji et al., 2007; Ouhammouch et al., 2004). De la misma manera, el parálogo de Rpb4 en la RNA pol III, Rpc17, interacciona con Brf1, homólogo de TFIIB (Ferri et al., 2000) y el parálogo de Rpb7 en la RNA pol I, Rpa43, se une al factor general de iniciación Rrn3 (Peyroche et al., 2000). El dímero Rpb4/7 también participa en la elongación de la transcripción potenciando la procesividad de la RNA pol II *in vitro* (Hirtreiter et al., 2010). Además, la RNA pol II sin el heterodímero Rpb4/7 es incapaz de iniciar la transcripción dependiente de promotor *in vitro* (Edwards et al., 1991). Rpb4/7 interacciona también con subunidades de la cabeza del complejo Mediador, sugiriendo un papel potencial para el heterodímero en la iniciación de la transcripción (Cai et al., 2012). Por otro lado, Rpb7 interacciona con el transcrito tan pronto como emerge del núcleo de la enzima en experimentos de transcripción *in vitro* (Ujvari and Luse, 2006).

Mosley y colaboradores han demostrado *in vivo*, que determinados factores implicados en la elongación de la transcripción copurifican con complejos de RNA pol II carentes del dímero Rpb4/7. La pérdida de Rpb4/7 del resto de la RNA pol II se correlaciona con un incremento en la fosforilación de la misma tanto en CTD-Ser2P como en CTD-Ser5P, sugiriendo que Rpb4/7 puede dissociarse del núcleo de la enzima como consecuencia de la interacción con factores de elongación específicos durante la transcripción (Mosley et al., 2013). Se ha demostrado que Rpb4 se requiere para la

interacción entre la fosfatasa específica de CTD-Ser2P, Fcp1 y la RNA pol II en *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Drosophila melanogaster* (Kamenski et al., 2004; Kimura et al., 2002; Tombacz et al., 2009). Además, La subunidad Rpb7 interacciona, tanto en *S. cerevisiae* como en *S. pombe*, con el factor de terminación Nrd1, que también se une a la RNA pol II fosforilada en CTD-Ser2P (Mitsuzawa et al., 2003). Rpb4 contribuye, además, al reclutamiento co-transcripcional de factores implicados en el procesamiento en 3' del mRNA, como Rna14, estabilizando la interacción entre estos factores, el CTD y las secuencias o sitios de poliadenilación en el transcrito naciente (Runner et al., 2008).

Los estudios más recientes, se centran en el papel post-transcripcional de Rpb4 y Rpb7 (se estudiará más detenidamente en el apartado 3.5). En este sentido, se ha visto que Rpb4/7 interacciona con ciertos transcritos de la RNA pol II *in vivo*, como *ACT1* o mRNA codificantes de proteínas ribosómicas (Goler-Baron et al., 2008; Harel-Sharvit et al., 2010). Además, se ha implicado al dímero Rpb4 y Rpb7 tanto en la traducción (Harel-Sharvit et al., 2010) como en la degradación de los mRNA (Lotan et al., 2005; Lotan et al., 2007).

Por último, se ha relacionado al dímero Rpb4/7 con la respuesta TCR, “reparación acoplada a la transcripción”, reprimiendo la ruta de reparación mediada por Rpb9 y facilitando la ruta mediada por Rad26 en regiones no transcritas (Li and Smerdon, 2002). Por otro lado, Rpb7 está implicada en el mecanismo de reparación del DNA inducido en respuesta a bleomicina, una droga antitumoral que mata células tanto humanas como de levaduras introduciendo lesiones en el DNA que se está replicando (He and Ramotar, 1999).

1.1.3.2 El dominio carboxilo-terminal de Rpb1 (CTD)

A diferencia de las RNA pol I y III, la subunidad mayor de la RNA pol II, Rpb1, contiene un dominio carboxilo terminal (CTD) largo y flexible que presenta una región de repeticiones en tándem de una secuencia consenso (Y₁S₂P₃T₄S₅P₆S₇) (Figura 17). El CTD de *S. cerevisiae* tiene una longitud de 650 Å en una conformación extendida y se localiza cerca del canal de salida del RNA de Rpb1. El CTD es modificado dinámicamente y sirve como plataforma para el reclutamiento de enzimas y proteínas reguladoras que están involucradas en la transcripción y el

procesamiento del RNA (Egloff and Murphy, 2008; Hirose and Ohkuma, 2007; Meinhart et al., 2005; Munoz et al., 2010; Phatnani and Greenleaf, 2006).

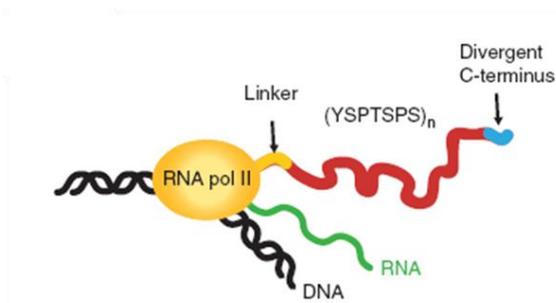


Figura 17: Representación esquemática del dominio carboxi-terminal, CTD, de la subunidad mayor de la RNA pol II con sus tres dominios (Jasnovidova and Stefl, 2013).

El número de repeticiones del heptapéptido consenso y su nivel de conservación varía entre las especies (Chapman et al., 2008; Liu et al., 2010a). Por ejemplo, tanto ratones como humanos poseen 52 repeticiones (Corden et al., 1985), *Drosophila* 45 repeticiones (Allison et al., 1988), levaduras 25-27 repeticiones (Allison et al., 1985) y protozoos 15 repeticiones (Corden, 1990). La conservación de las repeticiones del CTD es también distinta entre especies. Por ejemplo, el CTD de levaduras es el más conservado, ya que solo 6 de las 26 repeticiones difieren de la secuencia consenso. En humanos, solo 21 de las 52 repeticiones poseen la secuencia consenso completa. Por último, el CTD de *Drosophila* es altamente divergente, teniendo solo dos repeticiones del CTD que poseen la secuencia canónica (Chapman et al., 2008; Liu et al., 2010a).

Aunque el CTD no se requiere para la transcripción *in vitro*, es indispensable para el procesamiento del RNA, siendo su delección letal en ratones, *Drosophila* y levaduras y las delecciones parciales y mutaciones provocan fenotipos de termosensibilidad y defectos de crecimiento (Corden, 1990; Hirose and Manley, 2000; McCracken et al., 1997).

Las modificaciones postraduccionales del CTD son la llave para la función del mismo. La fosforilación es la modificación más frecuente y puede ocurrir en cinco de los siete residuos del heptapéptido (Y₁, S₂, T₄, S₅, and S₇). La fosforilación de las serinas ha sido muy estudiada y se sabe que es crucial para la transcripción y

procesamiento de RNAs codificantes y no codificantes (Maniatis and Reed, 2002; Moore and Proudfoot, 2009). La fosforilación de la treonina en posición 4 se ha implicado recientemente en el procesamiento en 3' de los mRNA de las histonas (Hsin et al., 2011), así como en la elongación de la transcripción (Hintermair et al., 2012), aunque su significado aún no está claro. De la misma manera, la tirosina 1 puede ser fosforilada, estimulando así la unión del factor de elongación Spt6 y perjudicando la unión de factores involucrados en el procesamiento del mRNA (Mayer et al., 2012).

Además de fosforilado, el CTD sufre isomerización (Lu et al., 2007) y en eucariotas superiores puede ser glicosilado (Comer and Hart, 2001; Kelly et al., 1993; Ranuncolo et al., 2012), metilado (Sims et al., 2011) y ubiquitinado (Li et al., 2007b).

Las fosforilaciones y otras modificaciones no solo alteran la estructura química del CTD sino que enriquecen o restringen la variabilidad conformacional del dominio, lo que afecta al reconocimiento por otros factores (Jasnovidova and Stefl, 2013).

1.1.4 Ensamblaje y transporte al núcleo de las RNA polimerasas eucariotas

A pesar del amplio conocimiento existente acerca de la estructura y función de las RNA pols, el estudio de la biogénesis de las mismas ha sido poco estudiado. En base a los estudios bioquímicos del ensamblaje de la RNA pol bacteriana y a su homología con las subunidades que forman el núcleo de las RNA pols eucariotas, se ha asumido que el ensamblaje de estas últimas se lleva a cabo de la misma manera que en la enzima bacteriana. Se ha propuesto la formación de tres subcomplejos de ensamblaje referidos como Rpb1 (Rpb1, Rpb5, Rpb6 y Rpb8), Rpb2 (Rpb2 y Rpb9) y Rpb3 (Rpb3, Rpb10, Rpb11 y Rpb12). Además, un cuarto módulo, correspondiente al heterodímero Rpb4/Rpb7, se extiende del núcleo como un tallo o *stalk* (Figura I9A) (Wild and Cramer, 2012).

El ensamblaje de la enzima bacteriana comienza con la formación del dímero $\alpha\alpha$ que interacciona con la subunidad β , dando lugar al intermediario $\alpha\alpha\beta$. Finalmente se añade la subunidad β' , posiblemente con la subunidad ω (Figura I8C) (Ishihama, 1981). Asumiendo un ensamblaje similar en el núcleo de las RNA pols eucariotas (Figura I8), el ensamblaje de la RNA pol II empezaría con la formación del

subcomplejo Rpb3 (que se corresponde con el dímero $\alpha\alpha$), seguido de la unión del subcomplejo Rpb2 (correspondiente a la subunidad β), y finalmente se uniría el subcomplejo Rpb1 (que corresponde con la subunidad β') (Figura 18D) (Wild and Cramer, 2012).

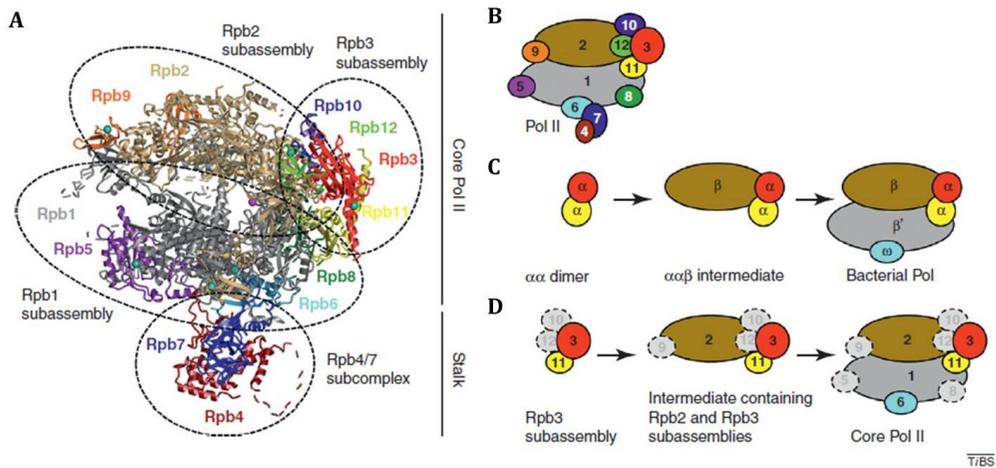


Figura 18: Composición y ensamblaje de la RNA pol II (Wild and Cramer, 2012). A) Estructura cristalográfica de la RNA pol II y composición de los distintos intermediarios de ensamblaje. B) Esquema de la composición de subunidades de la RNA pol II eucariota. C) Ensamblaje de la RNA pol bacteriana. D) Posible vía de ensamblaje del núcleo de la RNA pol II eucariota.

El modelo más aceptado sugiere que la RNA pol II debe ensamblarse en el citoplasma antes de ser importada al núcleo. Este modelo se basa principalmente en la observación de que la depleción de alguna subunidad de la RNA pol II en células humanas conduce a la acumulación de Rpb1 en el citoplasma (Boulon et al., 2010). Además, se ha visto que en levaduras, el importe nuclear de cada una de las subunidades mayores de la RNA pol II (Rpb1 o Rpb2) requiere de la presencia de la otra, sugiriendo que el importe de la RNA pol II requiere complejos completamente ensamblados (Gomez-Navarro et al., 2013).

Recientemente se han identificado varias proteínas implicadas en el ensamblaje y transporte al núcleo de las RNA pols. Estudios proteómicos recientes han permitido analizar el ensamblaje de la RNA pol II en humanos (Boulon et al., 2010; Forget et al., 2010). En estos estudios se ha encontrado diversas proteínas que interactúan con la RNA pol II como el complejo R2TP. Una de las proteínas de este

complejo, hSpagh (RPAP3), cofactor de la chaperona HSP90, interacciona con la subunidad Rpb1 no ensamblada, estabilizándola (Boulon et al., 2010) (Figura I9). hSpagh se purifica también con las subunidades mayores de las RNA pols I y III, sugiriendo que hSpagh y HSP90 participan en el ensamblaje de las tres RNA pols (Boulon et al., 2010; Jeronimo et al., 2007). Rpb1 interacciona también con el complejo R2TP/Prefoldina-like, y con RPAP4/GPN1, que se une también a un intermediario formado por Rpb2, Rpb3 y Rpb10-12 (Boulon et al., 2010). El silenciamiento de RPAP4/GPN1 en células humanas conduce a la acumulación citoplasmática de Rpb1 y Rpb2 (Forget et al., 2010). Por otra parte, las proteínas Gpn2 y Gpn3, de la familia de pequeñas GTPasas, participan en la biogénesis de las RNA pol II y III en levaduras (Minaker et al., 2013) (Minaker et al., 2013). Además, se ha propuesto que las tres proteínas GPN (Gpn1, Gpn2 y Gpn3) se unen a los intermediarios en el ensamblaje y conducen a la formación del complejo de la RNA pol II (Figura I9), posiblemente cooperando con la maquinaria de la chaperona HSP90 (Minaker et al., 2013). En humanos, el complejo R2TP-Prefoldina-like contiene Rpb5 y una proteína que interacciona con Rpb5, URI/RMP (Cloutier et al., 2009; Forget et al., 2010). El homólogo de URI en levaduras, Bud27, es la primera proteína descrita que participa en la biogénesis de las tres RNA pols mediando su ensamblaje (Figura I9) (Miron-Garcia et al., 2013), si bien tendría además funciones en la transcripción (Mirón-García et al, enviado a publicación). Estos estudios sugieren que hay dos intermediarios principales en el ensamblaje, uno que contiene Rpb1 y otro que contiene Rpb2 junto con Rpb3/10/11, que se unirían en última instancia para formar la RNA pol II completa (Figura I9).

La RNA pol II carece de señales NLS, por lo que tiene que asociarse a factores que contengan dichas señales para favorecer su importe al núcleo. Iwr1 es una proteína que posee señales NLS y se une a la RNA pol II entre Rpb1 y Rpb2 favoreciendo el importe al núcleo del complejo. Se ha propuesto que en el núcleo y una vez formado el PIC, Iwr1 se libera de la enzima y regresa al citoplasma por una vía mediada por sus señales NLS (Czeko et al., 2011) (Figura I9). Además, se sugiere que el factor RPAP2, el homólogo de la proteína Rtr1 en levaduras, la fosfatasa de CTD-Ser5P, (Gibney et al., 2008), puede ser un factor de importe al núcleo de la RNA pol II ya que se une a la RNA pol II completamente ensamblada (Jeronimo et al., 2007), se requiere para su importe y su localización cambia entre el núcleo y el

citoplasma en una vía dependiente de LMB (leptomicina-B), un inhibidor de la ruta de exporte nuclear dependiente de Crm1/exportina1 (Boulon et al., 2010). Recientemente se ha descrito que la proteína Rtp1 es también importante para el transporte al núcleo de la RNA pol II. Rtp1 interacciona con componentes del complejo R2TP y con varias subunidades de la RNA pol II (Figura I9), entre ellas con el extremo N-terminal de Rpb2 facilitando además la interacción entre los subcomplejos de ensamblaje Rpb2 y Rpb3 en el citoplasma (Gomez-Navarro et al., 2013). Por último se ha propuesto que en el núcleo, la RNA pol II se libera también de RPAP4/GPN1 que regresaría al citoplasma asociada a RPAP2 (Forget et al., 2013) (Figura I9).

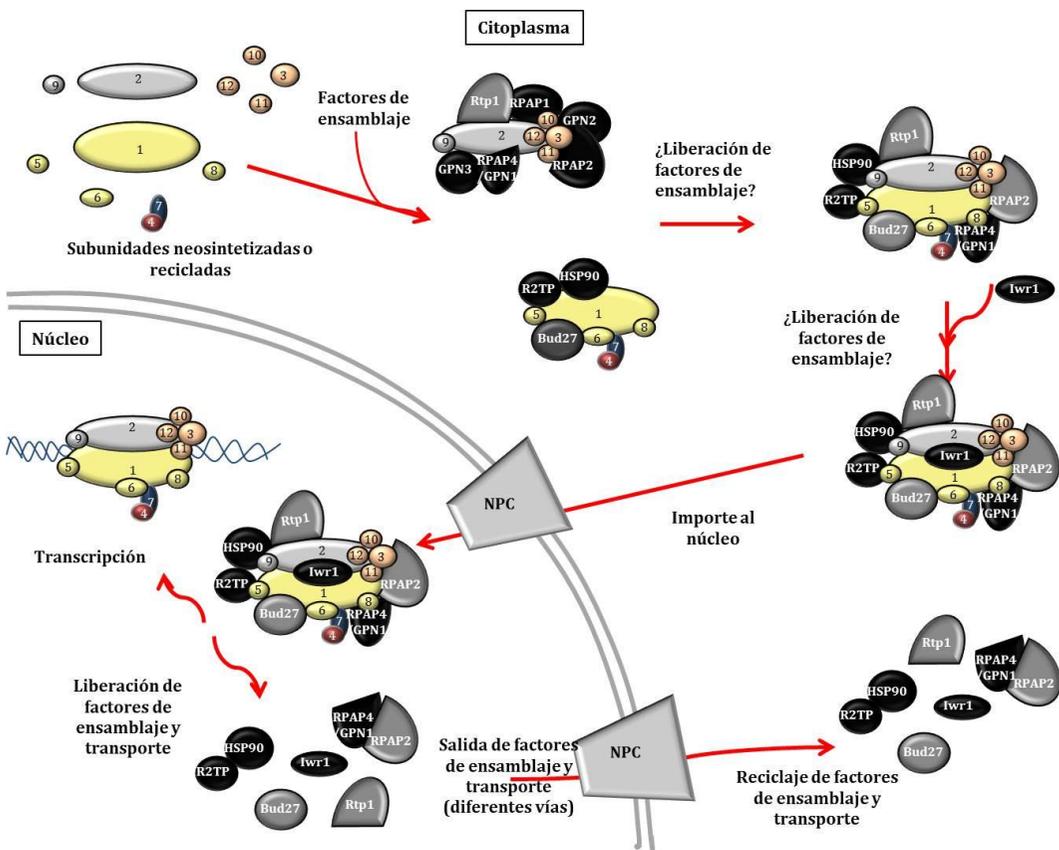


Figura I9: Modelo de la biogénesis de la RNA pol II (adaptado de Wild and Cramer, 2012, con modificaciones). El modelo combina resultados de estudios tanto en levaduras como en humanos. Se postula la existencia de dos intermediarios principales en el ensamblaje de la RNA pol II (las subunidades de color amarillo se corresponden con el subcomplejo de ensamblaje Rpb1, las de color gris con el subcomplejo Rpb2 y las subunidades de color naranja pertenecen al subcomplejo de ensamblaje Rpb3. El dímero Rpb4/7 es independiente y

no se conoce cuando se incorpora al complejo.) Por un lado, se ensambla el subcomplejo Rpb1 y por otro lado, los subcomplejos Rpb2 y Rpb3. El ensamblaje de la enzima se estabiliza por varios factores de ensamblaje (color negro y gris oscuro). Posteriormente ambos subcomplejos se unen. La RNA pol ensamblada, probablemente unida a algunos factores de ensamblaje, se une a Iwr1 que facilita su importe al núcleo por complejo importina α/β a través del poro nuclear (NPC). La liberación de los factores de ensamblaje y transporte puede estar acoplada a la iniciación de la transcripción. La salida del núcleo de los factores del ensamblaje y transporte se puede producir por diferentes vías dependiendo de cada proteína (Crm1, Xpo1...) (adaptado de Wild and Cramer, 2012, con modificaciones). Los factores de ensamblaje representados de color gris se han incorporado a la figura tras datos recientes (Forget et al., 2013; Gomez-Navarro et al., 2013; Miron-Garcia et al., 2013).

1.1.5 Desensamblaje de las RNA polimerasas

La disociación o desensamblaje de las RNA pols ha sido un aspecto poco estudiado. Se ha descrito que la RNA pol II elongante se desensambla tras la degradación de la subunidad mayor Rpb1 en respuesta al daño en el DNA, como última instancia ante un bloqueo en la transcripción (Somesh et al., 2005), o también en situaciones de bloqueo sin daño (vía TRADE: *transcriptional-stalling dependent degradation*) (Karakasili, 2010), pero esa degradación no ocurre en las otras subunidades (Malik et al., 2008) (ver apartado 1.1.6). Sin embargo, poco se sabe acerca del proceso de desensamblaje del complejo y del papel de cada subunidad de la RNA pol en el mismo.

Se ha descrito que Rpb6 se requiere para el ensamblaje de las RNA pols I y II, y para la estabilidad de las subunidades mayores de estas enzimas (Nouraini et al., 1996; Nouraini et al., 1997). La importancia del homólogo bacteriano de Rpb6 en el ensamblaje de la RNA pol también ha sido descrita (Minakhin et al., 2001). Rpb6 contacta en la estructura con el dímero Rpb4/7 (Armache et al., 2003; Armache et al., 2005; Bushnell et al., 2004) y la región N-terminal de Rpb4 contacta con Rpb2. Rpb7 establece un enlace de hidrógeno entre su residuo Gly⁶⁶ con el residuo Gln¹⁰⁰ de Rpb6 (Armache et al., 2005). Además Rpb7 contacta con Rpb1 a través de su región conservada N-terminal (Armache et al., 2005), existiendo interacciones hidrofóbicas entre el núcleo de la enzima y los residuos de Rpb7 Phe⁷⁰ y Val⁷² (Sampath et al., 2008). En concordancia con esto, se ha descrito que mutantes de *RPB6* como el mutante *rpb6^{Q100R}* (en el que el residuo Gln¹⁰⁰ se encuentra mutado), provocan la disociación del dímero Rpb4/7 y la pérdida de actividad de la enzima a altas temperaturas, probablemente debido a la pérdida del enlace de hidrógeno entre Rpb6 y Rpb7

(Armache et al., 2005; Tan et al., 2003). Además, Rpb1, posee un motivo de unión a zinc que se encuentra conservado en las tres RNA pols eucariotas de una gran variedad de organismos, así como en las RNA pols arqueanas y virales (Werner et al., 1992); la sustitución de las cisteínas en posición 67 y 70 de este dominio, por serinas, en el mutante *rpb1^{C67S,C70S}* conlleva la disociación del dímero Rpb4/7 del resto de la RNA pol II, así como la pérdida de viabilidad celular a 37°C (Donaldson and Friesen, 2000; Harel-Sharvit et al., 2010), al igual que ocurre con el mutante *rpb6^{Q100R}*. Curiosamente estos residuos de cisteínas no contactan en la estructura con el dímero Rpb4/7 sino con residuos de Rpb2 y forman parte del dominio *clamp* de la RNA pol II. En concordancia, la asociación de Rpb4/7 con el núcleo de la RNA pol II restringe al *clamp* a una conformación cerrada aumentando la procesividad en la elongación de la transcripción (Armache et al., 2003; Armache et al., 2005; Cramer, 2004; Gnatt et al., 2001).

Finalmente, se ha propuesto que la función de Rpb4 podría ser estructural manteniendo a Rpb7 en el complejo, ya que Rpb7 podría continuar interaccionando débilmente con la RNA pol II en ausencia de Rpb4 (Maillet et al., 1999). Sin embargo, a temperaturas restrictivas, la interacción entre Rpb7 y la RNA pol sería demasiado débil, conduciendo a la disociación de Rpb7 e inactivación de la enzima (Maillet et al., 1999).

1.1.6 Degradación de la RNA polimerasa II

La elongación de la transcripción mediada por la RNA pol II no es un proceso continuo. Normalmente la RNA pol II se para e incluso retrocede, conduciendo a la parada de la transcripción. Las condiciones que conducen a la parada de la RNA pol II son muy diversas, como por ejemplo, secuencias difíciles de transcribir, limitaciones topológicas, estructura de la cromatina, o falta de nucleótidos necesarios para la polimerización (Dedrick et al., 1987; Garcia-Rubio and Aguilera, 2012; Kireeva et al., 2005; Shaw and Reines, 2000). La RNA pol II parada ante un daño en la doble hélice del DNA es doblemente peligrosa ya que no solo se interrumpe la transcripción del gen sino que la enzima bloquea el acceso a los factores de reparación de la lesión (Donahue et al., 1994). Sin embargo, la célula tiene mecanismos para reparar estos daños, que normalmente utilizan la propia enzima como una señal para la maquinaria de reparación. La mayoría de los daños en el DNA encontrados por la RNA pol II se

reparan por una ruta denominada “Reparación por escisión de nucleótidos acoplada a la transcripción” (TC-NER) (Figura I10). En estas condiciones, mientras la RNA pol II intenta retroceder, se recluta la proteína Rad26, que a su vez se encarga de reclutar a Def1 y a la maquinaria TC-NER. La acción inhibitoria de Rad26 sobre Def1 previene la ubiquitinación de Rpb1, creando una oportunidad para la reparación del daño, por el sistema TC-NER (revisado en Daulny and Tansey, 2009).

Cuando la ruta TC-NER es incapaz de hacer que la transcripción continúe se requieren mecanismos alternativos para eliminar la RNA pol II parada y permitir el acceso a los factores de reparación de la lesión. Este bloqueo de la transcripción puede conducir a la poli-ubiquitinación y degradación de la subunidad mayor de la RNA pol II, Rpb1 (Beaudenon et al., 1999; Chen et al., 2007; Daulny et al., 2008; Sogaard and Svejstrup, 2007; Somesh et al., 2005) (Figuras I10 e I11). Tradicionalmente se creía que la degradación de Rpb1 se requería para el acceso de los factores TC-NER (Bregman et al., 1996). Sin embargo, trabajos posteriores han demostrado que la degradación de Rpb1 es una ruta separada, más drástica, que se utiliza como último recurso de manera alternativa al TC-NER (Woudstra et al., 2002).

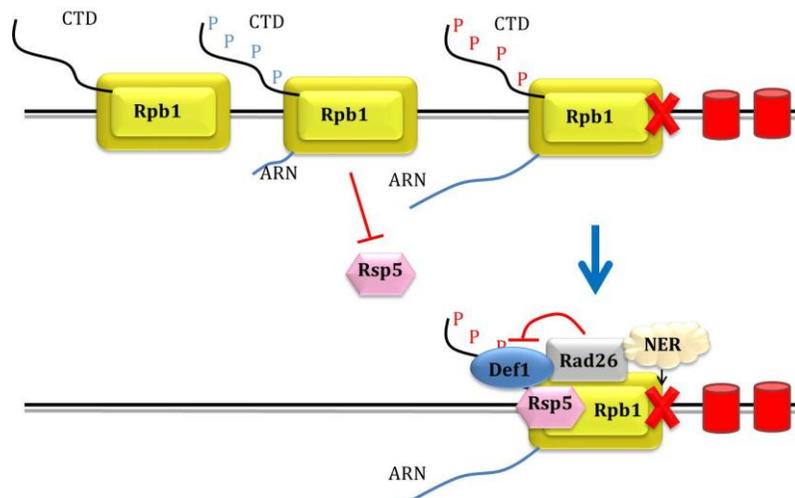


Figura I10: Modelo simplificado del mecanismo de acción de Rad26 tras un daño en el DNA. Rad26 recluta a Def1 y a la maquinaria TC-NER. Inicialmente Rad26 inhibe la acción de Def1 dando una oportunidad al sistema NER de reparar el daño. Def1 recluta a Rsp5 que se encarga de la ubiquitinación de Rpb1. Los grupos fosfatos de color azul del CTD se corresponden con la fosforilación en CTD-Ser5P mientras que los grupos de color rojo se corresponden con la fosforilación en CTD-Ser2P (adaptado de Daulny and Tansey, 2009).

La ubiquitinación y degradación de Rpb1 en respuesta a daño en el DNA ha sido ampliamente estudiada. Sin embargo, la señal para la ubiquitinación de Rpb1 puede ser generada simplemente en RNA pols paradas durante la transcripción sin que exista daño en el DNA. Esta idea se corrobora debido a que agentes que provocan la inhibición de la transcripción como la α -amanitina, o comprometen la elongación de la misma, como el 6-azauracilo, conducen a la ubiquitinación y degradación de Rpb1 (Somesh et al., 2005).

La proteólisis dependiente de ubiquitina engloba la ligación covalente de moléculas de ubiquitina a las proteínas sustrato, que son después reconocidas y degradadas por el proteasoma 26S. Se ha propuesto que, en levaduras, la enzima de conjugación de ubiquitina, E2, Ubc5 se une directamente al dominio *switch 2* de la RNA pol II. Este dominio, solo está bien estructurado en la RNA pol II elongante. Por tanto, se ha implicado a Ubc5 en el reconocimiento de moléculas de RNA pol II paradas o en *backtracking* durante la elongación de la transcripción (Somesh et al., 2007). Rsp5 es ubiquitina ligasa cuya diana son RNA pol II que se encuentran fosforiladas en CTD-Ser2 (Somesh et al., 2007). Rsp5 cataliza tanto la monoubiquitinación de Rpb1 como la formación de cadenas de poliubiquitina unidas a residuos de lisina-63 (K-63) (esta cadena puede eliminarse por la acción de la ubiquitin-proteasa Ubp2, dejando las moléculas de Rpb1 monoubiquitinadas (Kee et al., 2005)) (Figura I10 e I11). El complejo Elongina E3 ligasa, compuesto de Elc1, Ela1 y Cul3, reconoce la RNA pol II monoubiquitinada y crea la cadena de poliubiquitina unida a lisina-48 (K-48) (diana del proteasoma) (Harreman et al., 2009), que puede ser eliminada por la acción de la deubiquitinasa Ubp3, para revertir la degradación innecesaria (revisado en Wilson et al., 2012). Def1 ayuda a reclutar el complejo Elc1-Ela1-Cul3 promoviendo la poliubiquitinación de Rpb1 (Wilson et al., 2013) (Figura I11). Def1, además, es activado por ubiquitinación dependiente de Rsp5, lo que conduce a su procesamiento por el proteasoma y acumulación nuclear (Wilson et al., 2013). Finalmente, la ATPasa Cdc48, junto con la proteína adaptadora Ubx5 (o Ubx4) separan Rpb1 del complejo de elongación, lo que permite el reconocimiento por el proteasoma 26S (Verma et al., 2011) (Figura I11).

Es interesante destacar que la subunidad Rpb9 de la RNA pol II parece también jugar un papel en la ubiquitinación y degradación de Rpb1, así como en la ruta TC-NER independiente de Rad26 (revisado en Wilson et al., 2012) (Figura I11).

Rpb1 parece ser la única subunidad de la RNA pol II que se degrada en respuesta al daño en el DNA, al menos en levaduras, aunque subunidades de la RNA pol II se ubiquitinan de manera independiente al daño y su función no está clara (Daulny et al., 2008; Kim et al., 2011). Tras la degradación de Rpb1 las otras subunidades pueden ser recicladas en otros complejos RNA pol II (Revisado en Wilson et al., 2012).

Recientemente se ha descrito la participación de la proteína Asr1 en la degradación de Rpb1, una Ub-ligasa que se asocia con la RNA pol II fosforilada en CTD-Ser5 en la cromatina, no ubiquitinando Rpb1 libre. Además es capaz de ubiquitinar otras subunidades como Rpb2 y su actividad Ub-ligasa modula la asociación de Rpb4/7 con la RNA pol II *in vivo* (Daulny et al., 2008) (Figura I11).

La ruta TRADE (*transcriptional stalling-dependent degradation of RNA pol II*) se ha propuesto recientemente para explicar la degradación de Rpb1 en respuesta a RNA pol II paradas durante la transcripción sin que exista un daño en el DNA (Karakasili, 2010). Según este modelo, durante la elongación de la transcripción ocurren pausas frecuentes que pueden ser contrarrestadas por determinados factores de elongación (Saunders et al., 2006). Si estos factores fallan en el restablecimiento de la transcripción, la RNA pol II debe ser eliminada mediante la degradación de Rpb1. La primera etapa de esta eliminación viene determinada por la proteína promotora de ubiquitinación Def1, las enzimas E2 de conjugación de ubiquitina Ubc4/Ubc5 y la E3 ubiquitina-ligasa Rsp5. La función de estas proteínas es añadir una cadena de poliubiquitina K-63, a la subunidad Rpb1 de la RNA pol II. Puesto que la parada transcripcional de la RNA pol II es un proceso frecuente, la regulación de este proceso es crucial para impedir la degradación innecesaria de la RNA pol II. La formación de la cadena de poliubiquitina unida a K-63 es un proceso muy lento lo que permite la actuación de los factores de elongación. Si la transcripción continúa, las deubiquitininas Ubp2 y Ubp6 eliminan completamente la cadena de poliubiquitina impidiendo la degradación innecesaria de Rpb1 (Karakasili, 2010) (Figura I11).

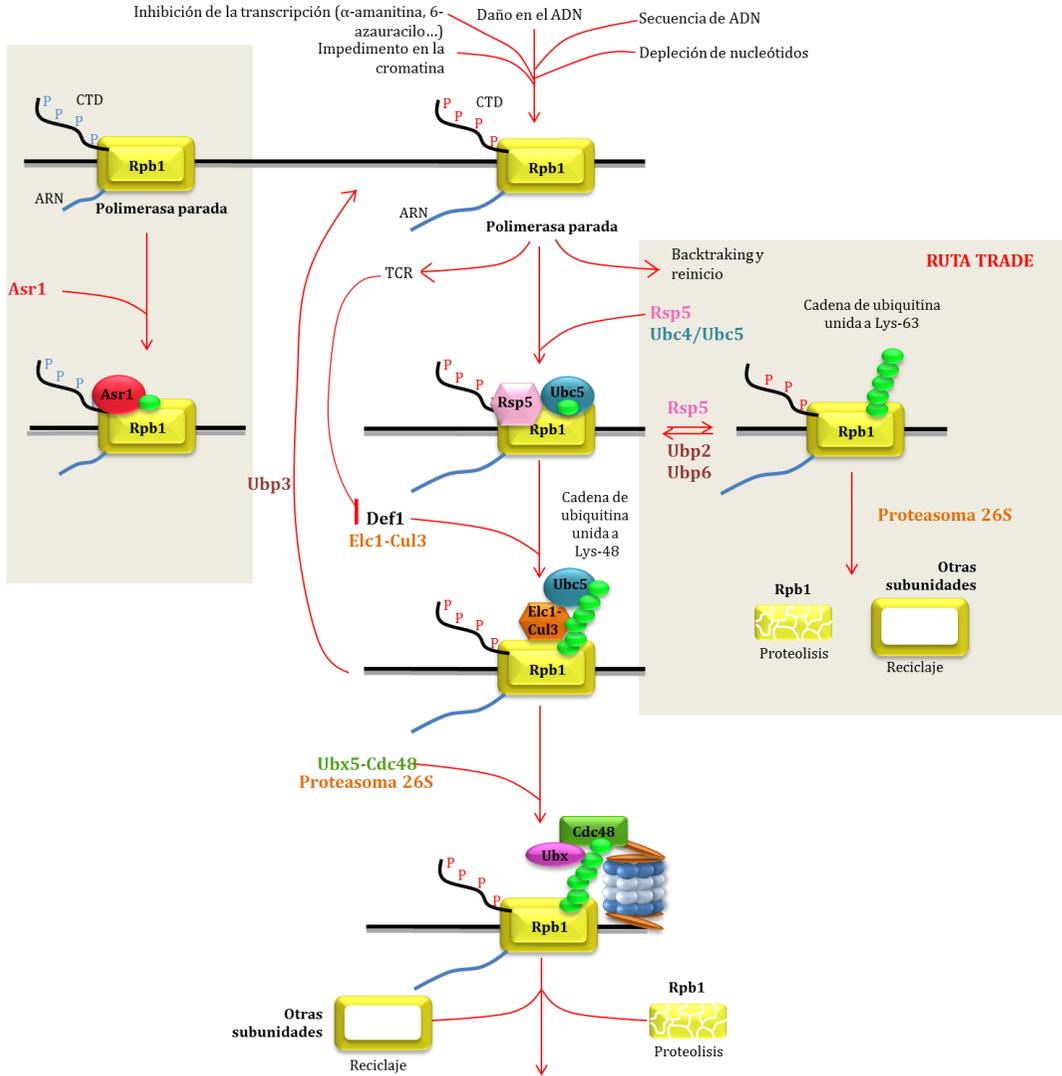


Figura I11: Modelo de la ubiquitinación y degradación de Rpb1. La RNA pol II puede pararse durante la transcripción debido a una gran variedad de situaciones. Este hecho puede desencadenar la ubiquitinación y degradación de Rpb1. El complejo Rsp5-Ubc5 mono-ubiquitinan la RNA pol II parada. Esta mono-ubiquitinación puede extenderse formando una cadena de poliubiquitina unida a K-63 que rápidamente se invierte por la acción de la deubiquitinasa Ubp2. Def1 y el complejo Elc1-Cul3 pueden también reconocer Rpb1 mono-ubiquitinado y crean la cadena de poliubiquitina K-48 (diana del proteasoma). Esta cadena puede eliminarse por la acción de la deubiquitinasa Ubp3. La ATPasa Cdc48-Ubx5 y el proteasoma se reclutan a la RNA pol II poliubiquitinada. El complejo RNA pol II se desensambla y Rpb1 es degradado por el proteasoma 26S (adaptado de Wilson et al., 2012, con modificaciones): la parte sombreada en gris de la izquierda representa el reconocimiento de la RNA pol II fosforilada en CTD-Ser5P por la Ub-ligasa recientemente descrita, Asr1 (Daulny et al., 2008). La parte sombreada derecha representa el modelo TRADE de degradación de RNA pols paradas en la transcripción (Karakasili, 2010).

2 LA TRANSCRIPCIÓN MEDIADA POR LA RNA POLIMERASA II

La transcripción basal de la mayoría, si no de todos los genes codificantes de proteínas, requiere la actividad de la RNA pol II y de los **factores generales de transcripción (GTFs)** TFIIA, -B, -D, -E, -F y -H (Prelich, 1997; Venters and Pugh, 2009) (Tabla I1, Figura I12). El promotor o secuencias de DNA que pueden facilitar la unión de factores de transcripción y permitir la iniciación de la transcripción (Blazek and Alper, 2013) incluyen el elemento TATA, sitio de reconocimiento de TBP (*TATA-binding protein*); y los elementos iniciador (INR), DPE (*downstream promoter element*), MTE (*motif ten element*), reconocidos por los factores asociados a TBP (Taf) y el elemento de reconocimiento de TFIIB (BRE, *TFIIB-recognition element*) (revisado en Hahn and Young, 2011). La combinación de estos elementos varía entre promotores. De estos motivos presentes en metazoos, TATA es el único motivo que está claramente conservado en levaduras (Sugihara et al., 2011).

La presencia o ausencia de caja TATA en los promotores se usa para clasificar los genes en genes con promotores TATA y genes con promotores *TATA-less* (Baumann et al., 2010; Mathis and Chambon, 1981).

GTFs	Función
TFIIA	En levaduras está formado por dos polipéptidos de 32 y 13,5 kDa codificados por los genes <i>TOA1</i> y <i>TOA2</i> esenciales para la célula (revisado en Hampsey, 1998). TFIIA estabiliza la unión de TBP al DNA (Weideman et al., 1997)
TFIIB	En levaduras es un monómero de 38 kDa codificado por el gen <i>SUA7</i> (Pinto et al., 1992) y es responsable de la selección del sitio de inicio de la transcripción. El dominio conservado C-terminal interacciona con TBP. El N-terminal se une al complejo RNA Pol II/TFIIF y lo recluta al complejo de preiniciación (revisado en Reese, 2003).
TFIID	Compuesto por la proteína de unión a TATA (TBP) y 14 factores asociados a TBP (TAFs) (Cler et al., 2009). Los TAFs varían en tamaño desde los 20 a los 250 kDa y TBP es un monómero de 27 kDa codificado por el gen <i>SPT15</i> (Woychik and Hampsey, 2002). TBP es suficiente para promover la transcripción basal de promotores TATA pero la transcripción a partir de promotores sin caja TATA y, en muchos casos, la transcripción en respuesta a activadores, requiere del complejo TFIID (Hahn and Young, 2011).
TFIIE	Se asocia al PIC después de la RNA pol II y recluta a TFIIF regulando su actividad helicasa y quinasa (Revisado en Venters and Pugh, 2009). En <i>S. cerevisiae</i> está formado por las subunidades Tfa1 and Tfa2 (revisado en Grunberg and Hahn, 2013).

TFIIF	Está compuesto por 3 subunidades cuyas masas moleculares son 105, 54 y 30 kDa. Las dos subunidades mayores se denominan Tfg1 y Tfg2 (en <i>S. cerevisiae</i>) y son esenciales para la viabilidad celular (revisado en Hampsey, 1998). Se ha descrito que TFIIF puede participar en la apertura del <i>clamp</i> y colocar el DNA promotor sobre la hendidura (revisado en Grunberg and Hahn, 2013).
TFIIH	Contiene 10 subunidades, de las cuales: CDK7 (en humanos) o Kin28 (en <i>S. cerevisiae</i>) tienen actividad quinasa y fosforilan el CTD durante la transición de la iniciación a la elongación de la transcripción; Rad3/XPD, son helicasas de DNA; y Ssl2/XPB, tienen actividad translocasa de DNA (revisado en Grunberg and Hahn, 2013). TFIIH trabaja junto con TFIIIE para modular la actividad de la RNA pol II y facilitar la salida del promotor (revisado en Venters and Pugh, 2009).

Tabla 13: Factores generales de transcripción (GTFs) en la transcripción mediada por la RNA pol II de *S. cerevisiae*.

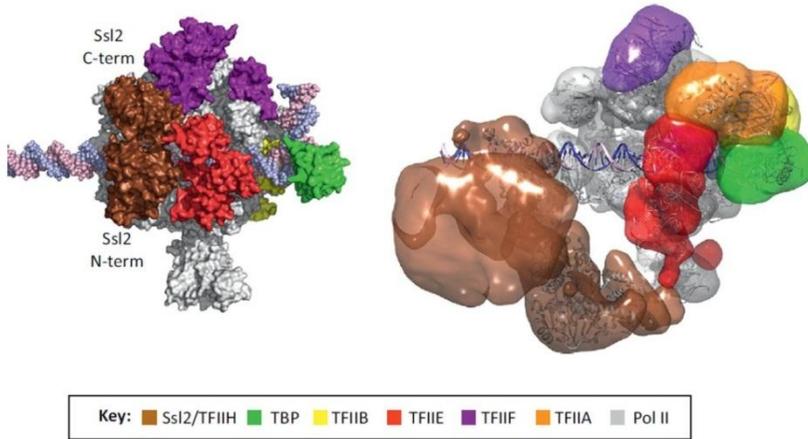


Figura I12: Arquitectura del PIC basal. Los componentes del PIC están coloreados de acuerdo con el esquema inferior. Ambas imágenes muestran diferentes localizaciones de Ssl2 (TFIIH) (Grunberg and Hahn, 2013).

2.1 FORMACIÓN DEL COMPLEJO DE PREINICIACIÓN E INICIACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN

Los factores de transcripción tanto eucariotas como procariontas poseen la capacidad de detectar y unirse a sitios de unión específicos en el DNA libre (Hahn, 2004). El reconocimiento de los promotores comienza con el ensamblaje de un complejo proteico que contiene a la RNA pol II y los GTFs. Sin embargo, cuando los sitios que reconocen están compactados formando la cromatina, los factores de

transcripción eucariotas necesitan de varias estrategias para unirse correctamente que requieren complejos remodeladores de cromatina, enzimas de modificación de histonas y el Mediador, que hacen el DNA más accesible para los GTFs (revisado en Li et al., 2007a).

Los factores **remodeladores de la cromatina** son complejos multiproteicos que usan la energía de la hidrólisis del ATP para movilizar los nucleosomas y eliminarlos del DNA, entre otras actividades. Las células eucariotas contienen cuatro familias de complejos remodeladores de cromatina: Swi/Snf, Iswi, Chd, e Ino80, que generalmente se han descrito como reguladores positivos de la transcripción (Angus-Hill et al., 2001; Sudarsanam and Winston, 2000).

De entre **las enzimas de modificación de histonas**, las chaperonas de histonas son diversas familias de proteínas de unión a histonas que protegen de las interacciones de estas con el DNA cuando no están formando parte de los nucleosomas. Una de estas chaperonas es el complejo **FACT** (*Facilitates chromatin transcription*) que reorganiza los nucleosomas a través de la desestabilización de los contactos dímero-tetrámero y posiblemente libera un dímero H2A-H2B para permitir el paso de la RNA pol cuando está transcribiendo (revisado en Winkler and Luger, 2011).

Las histona-acetil-transferasas (HAT) transfieren enzimáticamente un grupo acetilo desde el acetil-coenzima A (Acetil-CoA) a una cadena lateral de una lisina en el extremo N-terminal de las histonas (revisado en Sterner and Berger, 2000). En levaduras, el complejo multiproteico **SAGA** (Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferasa) y SLIK (SAGA-like)/SALSA (SAGA alterado, sin Spt8) son dos complejos coactivadores relacionados que tienen actividad HAT. Ambos complejos acetilan las histonas H3 y H2B y comparten grupos de proteínas. La unión de SAGA y la consecuente acetilación de histonas ocurren antes de la formación del PIC (Neely et al., 2002). Se ha descrito que SAGA regula la actividad de aproximadamente el 10% de los genes de levaduras, en particular de los genes relacionados con estrés (Huisinga and Pugh, 2004). Las subunidades Spt3 y Spt8 de SAGA activan la transcripción por el reclutamiento de TBP a los promotores (Sermwittayawong and Tan, 2006). Además, Spt3 y Spt8 están implicados en el reclutamiento del regulador Mot1 para activar la transcripción por un mecanismo independiente al reclutamiento de TBP (Topalidou et al., 2004; van

Oevelen et al., 2005). Se ha descrito que Spt8, *in vitro*, y la caja TATA compiten por la unión con TBP, sugiriendo un modelo en dos etapas en el cual SAGA, vía Spt8, se une a TBP para facilitar su transferencia a la caja TATA en condiciones de inducción de la transcripción, (Sermwittayawong and Tan, 2006). Sin embargo, en condiciones de represión, SAGA recluta a TBP fuera del promotor impidiendo su unión con el DNA (Sermwittayawong and Tan, 2006).

El **Mediador** es un gran complejo multiproteico de aproximadamente 1,4 MDa que comprende 25 subunidades en levaduras y 30 o más en eucariotas superiores. Las subunidades del Mediador en levaduras se dividen en cuatro módulos distintos denominados cabeza, medio, cola y quinasa (Bourbon, 2008; Dotson et al., 2000). El Mediador actúa como plataforma en el PIC donde varias subunidades contactan con distintos factores de transcripción incluyendo activadores, coactivadores, GTFs, y subunidades de la RNA pol II. Estas observaciones conducen al clásico modelo por el cual el Mediador actúa como un adaptador que transmite las señales de activadores a la maquinaria general de transcripción para ayudar a iniciar la transcripción por la RNA pol II (Bjorklund and Gustafsson, 2005). El módulo de la cola parece actuar como un coactivador de genes de respuesta a estrés. En condiciones de inducción de la transcripción, la interacción de las subunidades de la cola del Mediador con activadores o co-activadores como SAGA y el complejo Swi/Snf causan activación transcripcional; mientras que bajo condiciones de no inducción, la cola del Mediador interacciona con las subunidades del módulo quinasa, bloqueando su asociación con la RNA pol II y conduciendo a la represión transcripcional (Ansari and Morse, 2012; Knuesel et al., 2009). Además, la inactivación de las subunidades del módulo quinasa del mediador, Srb10 o Srb8 causa la sobreexpresión de muchos de estos genes de respuesta a estrés (Ansari and Morse, 2012).

En la formación del PIC, TBP libre del complejo TFIID, es reclutado a los promotores que contienen secuencia TATA a través del complejo SAGA (Sermwittayawong and Tan, 2006). En los promotores sin secuencia TATA, TBP se recluta formando parte de TFIID (Basehoar et al., 2004). Tras la unión al promotor, TBP facilita el ensamblaje de los otros factores generales de transcripción (GTFs) (Figura I13). TFIIA estabiliza la interacción entre TBP y el DNA y ha sido descrito que, en levaduras, TFIIA interacciona con TFIID (Kraemer et al., 2001). Además, TFIIB

también es crítico para la formación de un complejo terciario estable con TBP unido al DNA (Deng and Roberts, 2007). Por tanto, TFIIA y TFIIB interaccionan con TBP y promueven la formación del PIC estabilizando las interacciones de TBP con el DNA. A continuación la RNA polimerasa II se une al núcleo del promotor junto con TFIIF, estabilizando la formación del PIC (revisado en Shandilya and Roberts, 2012; Venters and Pugh, 2009).

Seguidamente, el complejo Mediador y los factores generales de transcripción TFIIH y TFIIE se reclutan al PIC. TFIIH y TFIIE conjuntamente modulan la actividad de la RNA pol II y facilitan la salida del promotor. Estudios *in vitro* demuestran que TFIIE se asocia al PIC tras la RNA pol II pero antes que TFIIH (Buratowski et al., 1989), aunque otros estudios indican que TFIIE se puede asociar con un complejo de preiniciación parcial en ausencia de la RNA pol II (Yokomori et al., 1998). Se ha sugerido que el Mediador facilita la incorporación de TFIIH al PIC a través de interacciones directas (Esnault et al., 2008). TFIIE también recluta a TFIIH regulando sus actividades quínasa y helicasa. Además, esta actividad helicasa, dependiente de ATP, es importante para la separación de la doble hebra de DNA, formándose un complejo promotor abierto con la RNA pol II (Wang et al., 1992).

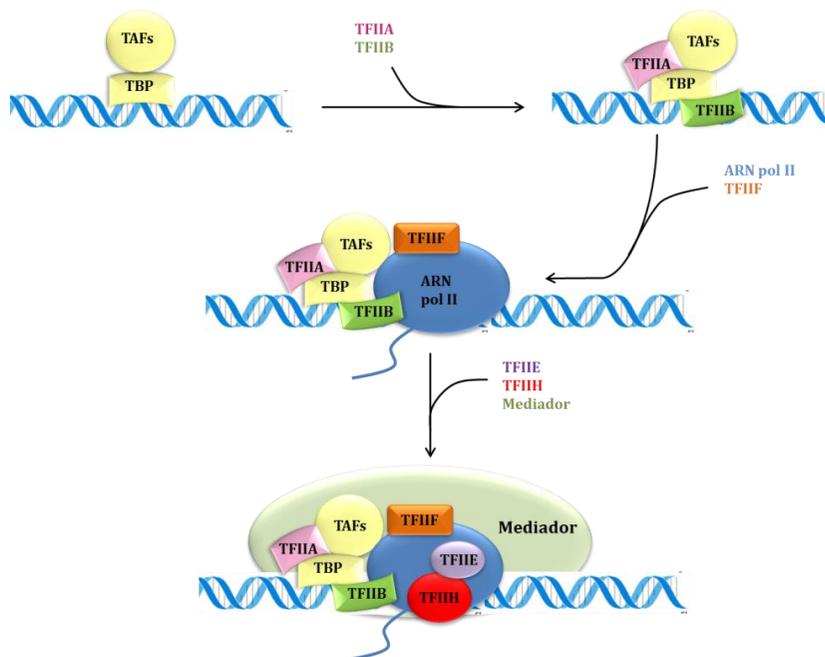


Figura I13: Ensamblaje del complejo de preiniciación (PIC).

En el sitio catalítico de la RNA pol II, la cadena molde de DNA se desliza en la hendidura y es escaneada en busca del correcto sitio de inicio de la transcripción (TSS) con la ayuda de TFIIB. Cuando el transcrito naciente alcanza los 5 residuos de longitud, el transcrito contacta con otra región de TFIIB para formar un complejo estable. Posteriormente, el transcrito de 7 nucleótidos de longitud compite con TFIIB desplazándolo y conduciendo a la formación del complejo de elongación (escape del promotor) (Kostrewa et al., 2009; Liu et al., 2010b). El escape del promotor supone que la RNA pol II rompa sus contactos con la secuencia promotora, se desensamble de al menos algunos de los componentes del PIC, y establezca una unión más fuerte y estable con el RNA naciente. Así, cuando el transcrito alcanza una longitud de 8-9 nucleótidos, establece contactos fuera del canal de salida del RNA provocando la separación RNA-DNA molde y un cambio conformacional en la RNA pol II, que pasará a contener un híbrido DNA-RNA estable en su centro activo (Westover et al., 2004). Además, Rpb7 contacta con el transcrito naciente tan pronto emerge del núcleo de la RNA pol II (Ujvari and Luse, 2006).

Una de las primeras etapas en la iniciación de la transcripción es la fosforilación de CTD-Ser5 por Kin28 (subunidad del factor TFIIH) (Komarnitsky et al., 2000). Estas marcas reclutan un gran número de factores como la enzima de *capping* del mRNA, el complejo de inspección del RNA, Nrd1-Nrd3 (*Nuclear pre-mRNA Down-regulation 1 and Nuclear polyAdenylated RNA-Binding 3*), y el complejo PAF (*Polymerase associated factor*), que actúa como un mediador durante la elongación de la transcripción estimulando la ubiquitinación y metilación de histonas por factores específicos (Hampsey and Reinberg, 2003; Komarnitsky et al., 2000; Krogan et al., 2003a; Krogan et al., 2003b; Ng et al., 2003; Vasiljeva et al., 2008)

2.1.1 Papel de los reguladores NC2 y Mot1 en la formación del complejo de preiniciación.

La eliminación de TBP de los promotores y/o la inhibición de la formación del complejo de preiniciación pueden ser mediados por dos represores distintos: **Mot1** (*Modifier of Transcription 1*) y **NC2** (*Negative Cofactor 2*), que consiste en un heterodímero entre NC2a (también llamado Bur6) y NC2b (también llamado Ydr1) (Figura I14). Mot1 interacciona con TBP o lo redistribuye del promotor por mecanismos tanto dependientes como independiente de ATP (Auble et al., 1994;

Darst et al., 2003; Gumbs et al., 2003; Pereira et al., 2001; Sprouse et al., 2006), mientras que la asociación de NC2 con TBP es dependiente de DNA (Kamada et al., 2001; Schluesche et al., 2007). Los efectos de NC2 y Mot1 son contrarrestados cuando TFIIA y TFIIB interactúan con TBP y promueven la formación del PIC estabilizando las interacciones de TBP con el DNA (revisado en Shandilya and Roberts, 2012; Venters and Pugh, 2009). Además, se ha descrito que Mot1 interactúa con la maquinaria de adición del cap al mRNA para modular la formación del PIC (Lahudkar et al., 2011).

La regulación de NC2 y Mot1 depende intrínsecamente del promotor y de los factores implicados en el reclutamiento de TBP: TFIID o SAGA (Spedale et al., 2012). A pesar de sus papeles establecidos como represores transcripcionales, tanto Mot1 como NC2 han sido implicados en la activación génica, aunque el mecanismo aún no está claro (Andrau et al., 2002; Cang and Prelich, 2002; Dasgupta et al., 2005; Geisberg et al., 2001; Geisberg et al., 2002; Masson et al., 2008; van Oevelen et al., 2005). Sin embargo, se ha descrito que genes reprimidos por Mot1 y NC2 están enriquecidos en cajas TATA, mientras que no lo están los genes activados por ellos (Basehoar et al., 2004). Un reciente trabajo sugiere que la regulación negativa o positiva de NC2 y Mot1 no depende de su ocupación en el promotor sino que depende de la ocupación del promotor por activadores de la transcripción. Genes con una gran ocupación de SAGA en el promotor y de factores de transcripción relacionados con respuesta a estrés se encuentran reprimidos por NC2 y Mot1, mientras que genes con una alta ocupación de TFIID y factores de transcripción de genes constitutivos en el promotor son principalmente activados por NC2 y Mot1 (Spedale et al., 2012).

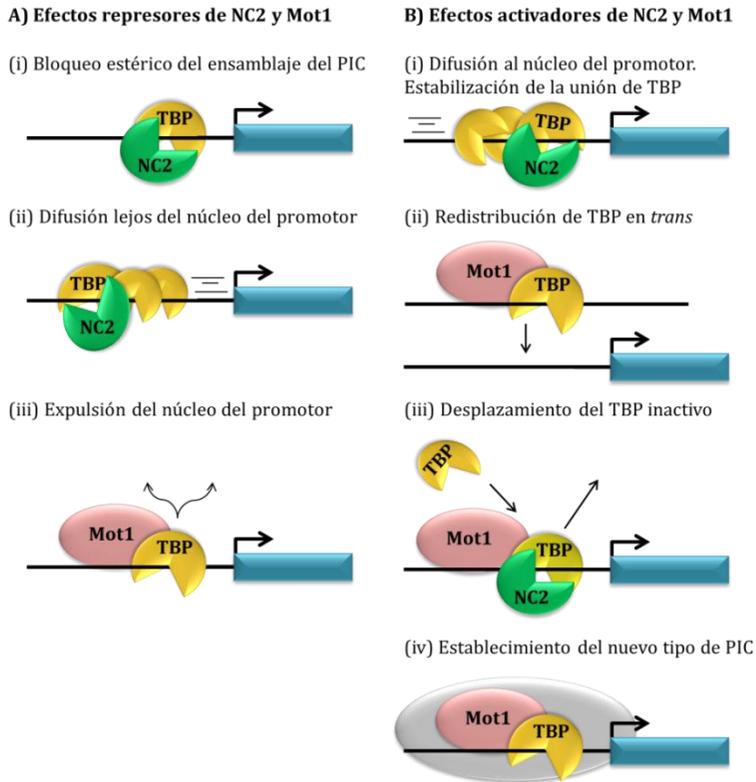


Figura I14: Mecanismo general de regulación génica mediada por Mot1 y NC2, y su asociación con TBP. Las imágenes indican las actividades bioquímicas de Mot1 y NC2 y cómo pueden contribuir a la expresión génica modulando la ocupación del promotor por parte de TBP. A) Mecanismos por los cuales NC2 y Mot1 pueden reprimir la transcripción. B) Mecanismos por los que NC2 y Mot1 pueden activar la transcripción (adaptado de Auble, 2009).

2.2 ELONGACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN

La elongación temprana es un proceso lento e ineficiente. *In vitro*, el complejo de elongación temprana tiene una fuerte tendencia a crear pausas, bloqueos y terminación prematura, con una sustancial fracción de RNA pol II que fallan en su intento de generar un mRNA completo (Marshall and Price, 1992). Estudios genómicos han demostrado que las pausas en la RNA pol II cerca del promotor son un mecanismo importante para regular la transcripción y se da en eucariotas superiores mediado por los factores NELF (*Negative elongation factor*) y DSIF (homólogo de Spt4/5 en levaduras) (revisado en Shandilya and Roberts, 2012; Venters and Pugh, 2009).

La transición de la iniciación de la transcripción a la formación de un complejo de elongación estable ocurre cuando el transcrito alcanza una longitud de 25 residuos aproximadamente. En este punto, la RNA pol II se ha liberado de los GTFs y viaja a la región codificante. Este evento señala el reclutamiento de la maquinaria de elongación, que incluye factores involucrados en la polimerización, procesamiento del mRNA, transporte del mRNA y factores con función en la cromatina (Hahn, 2004). En este punto, el complejo de elongación completo se une a los factores de elongación Spt4/5 (Martinez-Rucobo et al., 2011), encerrando al híbrido DNA-RNA y manteniendo la burbuja de transcripción (Figura I15). La unión de Spt4/5 puede hacer la transición de la iniciación a la elongación irreversible, porque refuerza estéricamente la disposición del ácido nucleico y previene la salida del RNA y la reasociación de las cadenas de DNA. La unión prematura del dímero Spt4/5 durante la iniciación se previene por la unión de factores de iniciación que compiten con él por su unión al *clamp* de la RNA pol II (factor s70 en bacterias, TFE en arqueas y TFIIE en eucariotas) (Martinez-Rucobo et al., 2011).

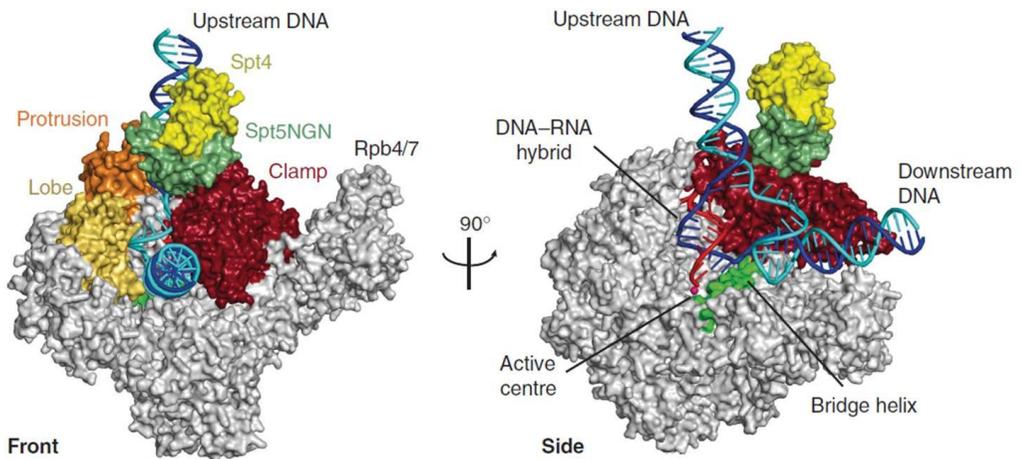


Figura I15: Modelo estructural del complejo RNA pol II-Spt4/5. El modelo muestra la posición de Spt4/5 en el complejo de elongación: el híbrido DNA-RNA y las cadenas de DNA que forman la burbuja de transcripción se encuentran en el centro activo de la RNA pol. El complejo Spt4/5 mantiene separados el DNA aguas arriba y el DNA aguas abajo de la burbuja. Spt5 aparece representado en verde, Spt4 en amarillo, el dominio *clamp* de la RNA pol, con el que interacciona Spt5, en rojo oscuro y el resto de la RNA pol II en gris. La cadena no molde del DNA se muestra en azul claro, la cadena molde en azul oscuro y el RNA en color rojo. Imagen extraída de Martinez-Rucobo et al., 2011.

El paso central en la elongación es la fosforilación del CTD-Ser2, previa defosforilación de residuos CTD-Ser5P. La fosforilación de CTD-Ser2 por el factor P-TEFb en humanos y las quinasas Ctk1 y Bur1 en levaduras, provee una plataforma para el ensamblaje de complejos que viajan con la RNA pol II a través del gen. Esto incluye factores que regulan la elongación de la transcripción, procesamiento del RNA y terminación, así como la remodelación y modificación de histonas (revisado en Nechaev and Adelman, 2011). Tras la transición a la elongación productiva, el complejo RNA pol II maduro es estable y puede transcribir incluso cientos de kilobases sin disociarse del DNA molde (Singh and Padgett, 2009).

La elongación de la transcripción no es un proceso uniforme. La progresión de la RNA pol II a través de un gen es un proceso discontinuo que combina pequeños avances con pausas de tiempo variable (Darzacq et al., 2007). La pausa de la RNA pol II es un fenómeno frecuente e inestable: la enzima puede reanudar la transcripción o permanecer parada de forma estable (Gu and Reines, 1995). La parada de la RNA pol II puede implicar un fenómeno de *backtracking*, un movimiento reverso que provoca la pérdida de contacto entre el extremo 3' del RNA naciente y el sitio activo de la RNA pol II. Como resultado de esta deslocalización, las RNA pols que han dado marcha atrás no pueden reanudar la transcripción inmediatamente. El complejo ternario formado por esta enzima parada, el RNA y el DNA es extremadamente estable (revisado en Gomez-Herreros et al., 2012a).

Hay muchas causas que pueden conducir a la parada de la RNA pol II, como son los obstáculos en el DNA (revisado en Gomez-Herreros et al., 2012a). La parada de la RNA pol II no puede ser permanente, ya que conllevaría la completa represión de la expresión génica y podría afectar seriamente a la replicación del DNA, conduciendo a la inestabilidad del genoma y posiblemente a la muerte celular (Daulny and Tansey, 2009). Se han descrito tres mecanismos para eliminar la parada de la RNA pol: el corte del transcrito que permite que el extremo 3' pueda ser colocado en el sitio activo de la enzima; reversión del estado de *backtracking* por el movimiento de la enzima; y eliminación de la RNA pol II parada mediante la ubiquitinación y degradación de la subunidad mayor (ver apartado 1.1.6) (revisado en Gomez-Herreros et al., 2012a).

La actividad endonucleolítica de la RNA pol II permite el corte de la región 3' del transcrito gracias a la estimulación del factor TFIIS (Izban and Luse, 1992) codificado por el gen *DST1* que no es esencial para la viabilidad celular en *S. cerevisiae* (Fish and Kane, 2002; Nakanishi et al., 1992) y que además de en eucariotas y arqueas tiene homólogos en bacterias (Fish and Kane, 2002). Además, TFIIS juega un importante papel en la elongación de la transcripción (Mason and Struhl, 2005), en la regulación de la iniciación de la transcripción (Guglielmi et al., 2007) y en la transición de la iniciación a la elongación de la transcripción (Malagon et al., 2004). Recientemente se ha descrito que TFIIS se requiere para mantener la actividad transcripcional de la RNA pol II cuando está transcribiendo genes codificantes de proteínas ribosómicas (RP) bajo condiciones de estrés, y que la ausencia de TFIIS desregula el balance de la transcripción de rDNA y genes RP (Gomez-Herreros et al., 2012b). Además, se ha propuesto a TFIIS como un factor general de transcripción de la RNA pol III (Ghavi-Helm et al., 2008).

Un mecanismo alternativo es mediado por el complejo Ccr4-Not. La interacción de Ccr4-Not con el transcrito emergente se requiere para una vía de reactivación de la RNA pol II parada que no requiere el corte del transcrito y que depende de la longitud del transcrito naciente (Kruk et al., 2011) (revisado en Gomez-Herreros et al., 2012a). El complejo Ccr4-Not es un complejo multiproteico, conservado en eucariotas (ver revisiones: Collart and Panasenko, 2011; Miller and Reese, 2012; Reese, 2012) y que en levaduras contiene Not1, Not2, Not3, Not4/Mot2, Not5, Caf130, Caf40, Pop2/Caf1, y Ccr4. Se ha implicado al complejo Ccr4-Not1 en múltiples etapas de la transcripción, como en la iniciación (Badarinarayana et al., 2000; Benson et al., 1998; Deluen et al., 2002; Godon et al., 1998; Lemaire and Collart, 2000; Liu et al., 2001), o la elongación de la transcripción (Kruk et al., 2011). Además, este complejo actúa como deadenilasa en la degradación citoplasmática de los mRNA (Goldstrohm and Wickens, 2008).

Puesto que TFIIS y Ccr4-Not tienen actividades diferentes, es posible que puedan actuar en diferentes estados de la RNA pol II parada y cooperar en el mantenimiento de la elongación a través del genoma. Esto podría explicar la letalidad sintética existente entre TFIIS (*DST1*) y los mutantes del complejo Ccr4-Not en levaduras (revisado en Miller and Reese, 2012).

2.3 TERMINACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN Y RECICLAJE DE LA RNA pol II

Después de completar satisfactoriamente la síntesis del mRNA, la RNA pol II se disocia del DNA molde, lo cual marca el final del ciclo de transcripción. La terminación es la última etapa en la serie de eventos regulados requeridos para la expresión génica. Este evento puede servir también como reciclaje de la RNA pol II para iniciar una nueva ronda de transcripción en el promotor. Hay dos rutas bien establecidas para la terminación de la transcripción, la ruta dependiente de poli(A) (modelo “torpedo”) y la ruta dependiente de Nrd1-Nab3-Sen1.

En eucariotas, la mayoría de los mRNA codificantes de proteínas tienen una señal poli(A) altamente conservada, 5'-AAUAAA-3' que está seguida por una secuencia rica en G/U cerca del extremo 3' (Figura I16A). La ruta de terminación dependiente de poli(A), también denominada **modelo torpedo**, implica que cuando la RNA pol II transcribe la señal poli(A), se reduce marcadamente su procesividad, lo que conduce a una pausa aguas abajo. Esto conlleva el corte endoribonucleolítico del transcrito naciente, por el factor de corte y poliadenilación (CPF en levaduras), seguido de la poliadenilación del producto aguas arriba del sitio de corte y la degradación del producto aguas abajo de dicho sitio (revisado en Shandilya and Roberts, 2012). La maquinaria de procesamiento en 3' es altamente compleja y comprende más de 20 polipéptidos en levaduras y alrededor de 14 proteínas en mamíferos (Mandel et al., 2008; Millevoi and Vagner, 2009). La liberación eficiente de la RNA pol II detenida aguas abajo del sitio poli(A) requiere no solo los factores de procesamiento 3', sino también la proteína exoribunucleasa 5'-3' Rat1 (XRN2 en mamíferos) formando un complejo con el cofactor activador que interacciona con Rat1 (Rai1) y el regulador que interacciona con el CTD, Rtt103 (Kim et al., 2004; West et al., 2004). La creación de un extremo 5' desprotegido permite a Rat1 seguir su camino a través del RNA, degradándolo, hasta colisionar con la RNA pol II, lo que promueve la terminación de la transcripción (Connelly and Manley, 1988; Kim et al., 2004; West et al., 2004).

La **terminación dependiente de Sen1** es una ruta alternativa para los RNAs no codificantes que fue descubierta en *S. cerevisiae* (Figura I16B). A diferencia de los mRNA, el extremo 3' de los snRNAs y snoRNAs en levaduras es generado por corte endoribonucleolítico y/o marcaje exoribonucleolítico producido por el exosoma

nuclear, el complejo TRAMP y no posee cola poli(A) en su forma madura (Houseley and Tollervey, 2009). Para el reconocimiento y transducción de la señal de terminación de la transcripción, se necesitan factores que incluyen las proteínas de unión al RNA, Ndr1, Nab3 y la helicasa de RNA y DNA Sen1 (Kim et al., 1999; Steinmetz and Brow, 1996; Steinmetz et al., 2001; Steinmetz et al., 2006). En esta ruta, se propone que Sen1 termina la transcripción desenrollando el híbrido RNA-DNA en el sitio activo (Steinmetz and Brow, 1996). Sen1 y su homólogo en humanos “*senataxin*”, también contribuyen a la terminación dependiente de poli(A) aunque su función es poco clara (revisado en Kuehner et al., 2011).

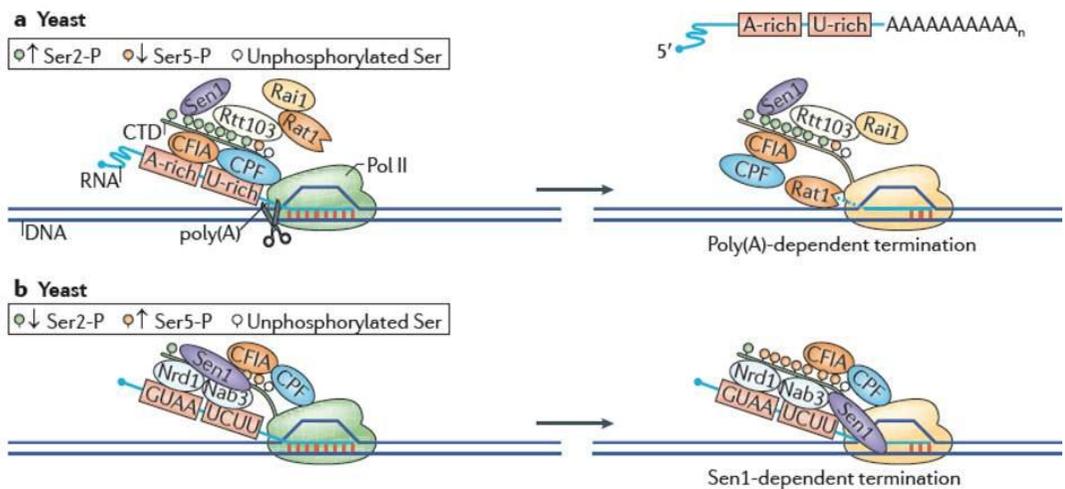


Figura I16: A) Terminación dependiente de poli(A). La exoribonucleasa Rat1 se recluta a la RNA pol II vía otras proteínas que interaccionan con el CTD-Ser2P como Rtt103. Rat1 degrada el RNA, aguas abajo, que resulta del corte y procesamiento en 3' del transcrito (tijeras). B) En la terminación **dependiente de Sen1**, mecanismo que se aplica a la mayoría de RNA no codificantes, Sen1 se recluta por la interacción de proteínas como Ndr1 con el CTD-Ser5P y por secuencias específicas (como las repeticiones GUAA). Sen1 desenrolla el híbrido RNA-DNA gracias a su actividad helicasa dando lugar a la terminación de la transcripción (esquema procedente de Kuehner et al., 2011).

2.4 LA FUNCIÓN DEL CTD EN EL CICLO DE TRANSCRIPCIÓN DE LA RNA POLIMERASA II

Las modificaciones postraduccionales del dominio carboxilo terminal de Rpb1, CTD, son la llave para la función del mismo, siendo la fosforilación la modificación más frecuente y mejor estudiada. De hecho, el patrón de fosforilación del CTD es una

de las principales vías de regulación de la transcripción mediada por la RNA pol II. Además, el CTD puede sufrir isomerización, glicosilación, metilación y ubiquitinación (Comer and Hart, 2001; Li et al., 2007b; Lu et al., 2007; Sims et al., 2011).

2.4.1 Enzimas responsables de la fosforilación del CTD (quinasas)

Las proteínas humanas **Cdk8**/CycC o **Srb10**/Srb11 en levaduras son parte del módulo CDK del mediador (Liao et al., 1995), donde Cdk8 y Srb10 son quinasas dependientes de ciclinas (CycC y Srb11). La importancia de Cdk8/Srb10 *in vivo* aún no se conoce, aunque muchos estudios han descrito que Srb10 posee tanto un papel negativo (Holstege et al., 1998) como un papel positivo (Carlson, 1997) en la expresión génica *in vivo*. Se ha descrito que Srb10 fosforila el CTD de la RNA pol II (en CTD-Ser2 y CTD-Ser5) antes del ensamblaje del complejo de preiniciación (Figura I17), regulando negativamente la iniciación de la transcripción (Hengartner et al., 1998). Sin embargo, Srb10 puede funcionar en asociación con la quinasa Kin28 para promover la reiniciación de la RNA pol II (Liu et al., 2004; Yudkovsky et al., 2000). Se ha descrito además, que Sub1, proteína de unión al DNA de cadena simple, tiene una influencia positiva en la actividad quinasa de Srb10 y en su asociación con la cromatina. Además, Sub1 interacciona con Srb10 ayudando a mantener el PIC en una conformación estable e inactiva (Garcia et al., 2010).

El complejo **Cdk7**/ciclina H en humanos, y su homólogo **Kin28**/Ccl1 en *S. cerevisiae*, son parte del factor general de transcripción TFIIH y son esenciales para la viabilidad celular (Simon et al., 1986). Se ha demostrado que Cdk7/Kin28 fosforilan los residuos CTD-Ser5 y CTD-Ser7 *in vitro* e *in vivo* (Kim et al., 2009; Liu et al., 2004; Rodriguez et al., 2000) (Figura I17).

La quinasa **Cdk9** en eucariotas superiores, subunidad catalítica del factor de elongación positivo b (P-TEFb), controla la elongación de la transcripción en mamíferos y en *Drosophila melanogaster* (Saunders et al., 2006). Cdk9 es una quinasa de CTD-Ser2, aunque también contribuye a la fosforilación de CTD-Ser5 *in vitro* e *in vivo* durante la transición de la iniciación a la elongación (Ramanathan et al., 2001; Wada et al., 1998) (Figura I17). Aunque Cdk9 combina la actividad de las dos quinasas de CTD-Ser2 de *S. cerevisiae*, Ctk1 y Bur1, se han descrito recientemente un homólogo de Ctk1, en *Drosophila*, Cdk12, y 2 en humanos, Cdk12 y Cdk13

(Bartkowiak and Greenleaf, 2011; Bartkowiak et al., 2010). En *S. cerevisiae* **Ctk1** es la quinasa principal responsable de la fosforilación del CTD-Ser2 durante la elongación (Sternner et al., 1995; Cho et al., 2001; Jones et al., 2004). La actividad quinasa de Ctk1 se requiere, además para la asociación de factores de poliadenilación y terminación (Ahn et al., 2004) y factores de modificación de histonas (Xiao et al., 2007). Además Ctk1 interacciona genética y bioquímicamente con el complejo TREX (Hurt et al., 2004), que acopla la elongación de la transcripción con el transporte del mRNA (Jimeno et al., 2002). La quinasa Bur1 (y su ciclina Bur2), en *S. cerevisiae*, fosforila el CTD-Ser2 en moléculas de RNA pol II elongantes que han sido previamente fosforiladas en CTD-Ser5 y que están localizadas cerca del promotor durante la elongación temprana de la transcripción (Keogh et al., 2003; Qiu et al., 2009; Yao et al., 2000). Se ha propuesto que esta fosforilación potencia la fosforilación en CTD-Ser2 producida por Ctk1 (Qiu et al., 2009).

2.4.2 Enzimas responsables de la defosforilación del CTD (fosfatasas)

La proteína **Ssu72** fue descrita como la fosfatasa de CTD-Ser5P y recientemente se ha descrito como fosfatasa de CTD-Ser7P (Bataille et al., 2012; Zhang et al., 2012) (Figura I17). También se le atribuye un papel como fosfatasa potencial de residuos tirosina, basado en su actividad en el corte del análogo de fosfotirosina, pNPP *in vitro* (Meinhart et al., 2003). Ssu72 es esencial, además, para el procesamiento del transcrito en 3' acoplado a la transcripción, y para la terminación de la transcripción en los genes codificantes de proteínas (He et al., 2003; Steinmetz and Brow, 2003; Xiang et al., 2010). Estudios de asociación de Ssu72 al DNA, muestran un pequeño pico en el extremo 5' de los genes y un pico mayor en el sitio de corte y poliadenilación o inmediatamente después de este (Zhang et al., 2012). De acuerdo con esto, Ssu72 defosforila el CTD de la RNA pol II después de la escisión y poliadenilación, dando lugar a polimerasas hipofosforiladas. Se ha propuesto que la inactivación de Ssu72 conduce a la acumulación de CTD-Ser7P, impidiendo el reclutamiento de la RNA pol II al PIC e inhibiendo la iniciación de la transcripción, lo que conduce a la muerte celular (Zhang et al., 2012).

Recientemente se ha identificado la proteína **Rtr1** en levaduras como la fosfatasa del CTD que funciona en la transición de la iniciación de la transcripción a la elongación, promoviendo la defosforilación de CTD-Ser5P en la región 5' de los genes

(Figura I17), lo que conduce a la fosforilación de CTD-Ser2. Rtr1 interacciona genéticamente con elementos de la RNA pol II y su delección provoca la acumulación de CTD-Ser5P en la región codificante de los genes (Gibney et al., 2008; Mosley et al., 2009). Igualmente, la inactivación del homólogo de Rtr1 en eucariotas superiores, RPAP2, incrementa los niveles de CTD-Ser5P *in vivo* y afecta a la expresión de los snRNA (Egloff et al., 2007). Se ha propuesto un modelo por el cual el reclutamiento de RPAP2 al CTD de la RNA pol II en los genes de snRNA tanto *in vivo* como *in vitro*, está acoplado a la fosforilación de CTD-Ser7, que ocurre tras la fosforilación en CTD-Ser5. Esta asociación de RPAP2, recluta al complejo integrador y defosforila los residuos de CTD-Ser5P (Egloff et al., 2012).

Fcp1 defosforila preferentemente el CTD-Ser2P (Figura I17) (Cho et al., 2001; Hausmann and Shuman, 2002). Fue la primera fosfatasa del CTD descrita y está altamente conservada en organismos eucariotas (Archambault et al., 1997; Chambers and Dahmus, 1994; Chambers and Kane, 1996; Kimura and Ishihama, 2004). Su actividad es esencial para la viabilidad celular y para la transcripción en levaduras (Archambault et al., 1997; Kobor et al., 1999) y se ha descrito que *in vitro* se estimula por TFIIF y se inhibe por TFIIB (Archambault et al., 1997; Cho et al., 2001; Kobor et al., 1999). Fcp1 posee también la capacidad de estimular la elongación del transcrito *in vitro* independientemente de su actividad fosfatasa (Mandal et al., 2002). Experimentos de inmunoprecipitación de cromatina han demostrado que Fcp1 se asocia con el promotor y la región codificante de genes activos *in vivo* en levaduras (Cho et al., 2001). Fcp1 es, además, responsable de la defosforilación de CTD-Ser2P de la RNA pol II tras la separación de esta del DNA al finalizar el proceso de transcripción (Kong et al., 2005). Se ha propuesto también que Fcp1 puede defosforilar y reactivar la RNA pol que ha sido bloqueada por la fosforilación de Srb10 (Cho et al., 2001); (revisado en Calvo and Garcia, 2012).

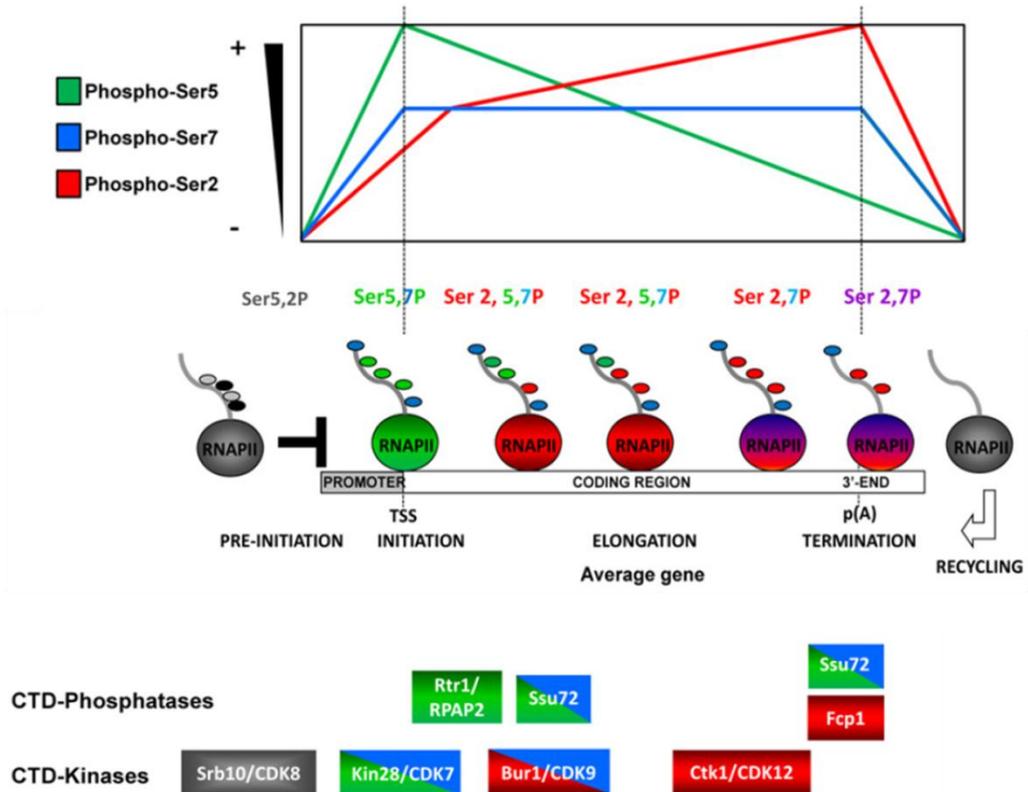


Figura I17: Perfil de fosforilación de la RNA pol II de *S. cerevisiae* y enzimas modificadoras implicadas en cada etapa. Cada color indica la fosforilación de un residuo distinto: verde, fosforilación de CTD-Ser5; azul fosforilación en CTD-Ser7 y rojo fosforilación en CTD-Ser2 (Calvo and Garcia, 2012).

2.4.3 Ciclo de fosforilación del CTD

Durante el proceso de fosforilación/defosforilación del CTD, Srb10 ejerce su papel quinasas antes del ensamblaje del PIC, regulando negativamente la iniciación de la transcripción (Hengartner et al., 1998) (Figura I17).

En el ensamblaje del PIC el mediador conecta, aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción, con activadores con la RNA pol II. Aunque el mediador se une a la RNA pol II defosforilada, cuando se incorpora al PIC, estimula fuertemente la fosforilación del CTD-Ser5 gracias a la subunidad Kin28 del factor basal de transcripción TFIID. En estas condiciones se interrumpe la unión de la RNA pol II con el Mediador (Sogaard and Svejstrup, 2007). Los niveles de CTD-Ser5P se mantienen

altos mientras la RNA pol II transcribe los primeros cientos de nucleótidos (Komarnitsky et al., 2000). Esta modificación está asociada a varios eventos como son el reclutamiento de la enzima de *capping* del mRNA que se une directamente a residuos CTD-Ser5P (Fabrega et al., 2003; Ghosh et al., 2011). Al mismo tiempo, se produce la fosforilación de CTD-Ser7 tanto en genes codificantes de proteínas como en no codificantes, por la quinasa Kin28 (Akhtar et al., 2009; Kim et al., 2009).

A medida que la RNA pol II transcribe aguas abajo, los niveles de fosforilación de CTD-Ser5 van disminuyendo y se incrementa la fosforilación en CTD-Ser2, aunque persisten niveles bajos de CTD-Ser5P durante la elongación. Tanto Rtr1 como Ssu72 han sido descritas como fosfatasas de CTD-Ser5P, si bien es posible que Rtr1 reduzca los niveles de CTD-Ser5P durante una fase muy temprana de la elongación y Ssu72 elimine los restos de CTD-Ser5P aguas abajo durante la terminación (revisado en Buratowski, 2009). En levaduras, la fosforilación de CTD-Ser2 es mediada mayoritariamente por Ctk1, aunque Bur1 parece contribuir a este proceso justo aguas abajo del promotor promoviendo la fosforilación de Ctk1 (Liu et al., 2009; Qiu et al., 2009).

Los niveles de CTD-Ser2P se incrementan a medida que la RNA pol II se aleja del promotor y este evento permite la asociación, entre otros, de Pcf11, factor de poliadenilación esencial (Meinhart and Cramer, 2004) y de Rtt103, factor de procesamiento del mRNA en 3' (Kim et al., 2004).

Al final de la transcripción todas las fosforilaciones del CTD se eliminan por acción de las fosfatasas Fcp1 (para CTD-Ser2P) y Ssu72 (CTD-Ser5P y CTD-Ser7P) y la RNA pol II hipofosforilada puede volver a ensamblarse en el PIC y reiniciar la transcripción (Cho et al., 2001; Krishnamurthy et al., 2004; Svejstrup et al., 1997).

3 CICLO DE VIDA DEL mRNA

3.1 ADICIÓN DE LA CAPERUZA 5' DEL mRNA

Durante la iniciación de la transcripción, el CTD de la RNA pol II se fosforila en los residuos CTD-Ser5 y CTD-Ser7 (Buratowski, 2009; Hsin and Manley, 2012) y de manera cotranscripcional a la fosforilación en CTD-Ser5 se recluta la maquinaria de *capping* (Komarnitsky et al., 2000; Schroeder et al., 2000). El *capping* o adición de la caperuza en 5' del mRNA es un proceso de varias etapas secuenciales realizadas en levaduras por Cet1 (RNA trifosfatasa), Ceg1 (guanililtransferasa) y Abd1 (metiltransferasa) (Ghosh and Lima, 2010). En metazoos, sin embargo, las primeras dos etapas están catalizadas por una sola enzima, que consiste en un dominio N-terminal con actividad trifosfatasa y un dominio C-terminal con actividad guanylyltransferasa (Sonenberg and Hinnebusch, 2009). La caperuza 7-metilguanosina (m7G) resultante, cap, protege al transcrito de la degradación y promueve la iniciación de la traducción (Schwer et al., 1998; Sonenberg and Hinnebusch, 2009). El cap completo se asocia con el complejo de unión al cap (CBC: *cap binding-complex*) que funciona en el corte y empalme del pre-mRNA (*splicing*) y en el transporte del mismo al citoplasma (Lewis and Izaurralde, 1997; Schwer and Shuman, 1996).

Recientemente, Lidschreiber y colaboradores (Lidschreiber et al., 2013) han propuesto un modelo sobre el proceso de transición de la iniciación a la elongación de la transcripción (Figura I18), por el cual, durante la iniciación de la transcripción, el transcrito de RNA creciente provoca la disociación de los factores de iniciación del *clamp* de la RNA pol II, para la posterior unión del factor de elongación Spt5 (Grohmann et al., 2011; Martinez-Rucobo et al., 2011). El CTD fosforilado en CTD-Ser5 estimula el reclutamiento de las enzimas de *capping* a la RNA pol II (Komarnitsky et al., 2000; Schroeder et al., 2000) y esta asociación es posteriormente estabilizada por el CTR (*C-terminal region*) de Spt5. Posteriormente el RNA naciente recibe un GMP inverso por la acción del heterodímero Cet1-Ceg1. La rápida disociación de Cet1-Ceg1 deja camino a la metiltransferasa Abd1, que se recluta aproximadamente 110 pb aguas abajo del sitio de inicio de la transcripción y puede permanecer con la RNA pol II elongante parcialmente fosforilada en CTD-Ser5. Abd1

y el CTD-Ser5P reclutan a Ctk1 y a Bur1, respectivamente (Qiu et al., 2009). El cap se completa con la metilación y se une a CBC, que mantiene el reclutamiento de Ctk1 y Bur1 cuando los niveles de Abd1 y CTD-Ser5P disminuyen en la región 3' del gen. El RNA naciente con estructuras cap sin metilar es eliminado por la ruta de degradación dependiente de Rai1-Rat1 (Jiao et al., 2010).

La fosforilación del CTD-Ser2 cerca del promotor por Bur1, y la liberación de las enzimas de *capping* facilitan el reclutamiento del complejo PAF (Qiu et al., 2012; Qiu et al., 2009), que establece modificaciones de histonas necesarias para la transcripción activa. Ctk1 fosforila los residuos de CTD-Ser2 aguas abajo del sitio de inicio de la transcripción y estimula la asociación de la RNA pol II con factores de elongación, modificadores de cromatina y procesamiento del RNA (Kizer et al., 2005; Meinhart and Cramer, 2004), dando lugar a un complejo de elongación productivo.

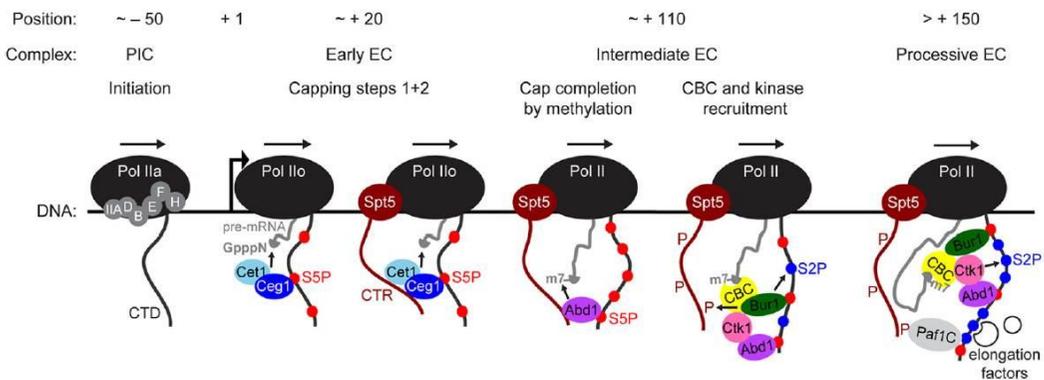


Figura I18: Modelo de la transición de la iniciación a la elongación de la transcripción de la RNA pol II. La RNA pol II y su CTD se muestran en negro, el DNA transcrita como una línea negra horizontal y el mRNA en gris. Abreviaturas: PIC, complejo de preiniciación; EC, complejo de elongación; IIA/B/D/E/F/H, factores de iniciación de la transcripción; S2P/S5P, residuos CTD-Ser2P y CTD-Ser4P; m7, grupo metilo del cap; Paf1C, complejo Paf (Lidschreiber et al., 2013).

3.2 POLIADENILACIÓN

Prácticamente todos los transcritos codificantes de proteínas están sujetos a un procesamiento en el extremo 3' que incluye un corte endonucleolítico del pre-mRNA y la consiguiente síntesis de una cola poli (A) (Colgan and Manley, 1997). Existen señales específicas usadas como guías para la síntesis de la cola de poli (A)

del mRNA. A pesar de las divergencias existentes en las señales de poliadenilación entre levaduras y mamíferos; la mayoría de los factores de procesamiento en 3' del mRNA de mamíferos tienen homólogos en levaduras y plantas (revisado en Chan et al., 2011).

La poliadenilación del mRNA se lleva a cabo por la acción cooperativa de varios complejos proteicos que interactúan entre sí. A pesar de que algunos de estos complejos están conservados en mamíferos, parecen tener una organización diferente. Los subcomplejos de la maquinaria de levaduras incluyen el factor de corte y poliadenilación (CPF) que contiene a la poli (A) polimerasa Pap1, el factor de corte IA (CF IA), y el factor de corte IB (CF IB) (revisado en Mandel et al., 2008; Tian and Graber, 2012). Además, algunos elementos de esta maquinaria median la iniciación transcripcional, la terminación transcripcional, el *splicing* y otros eventos (Maniatis and Reed, 2002; Proudfoot et al., 2002) (revisado en Mandel et al., 2008).

El procesamiento del pre-mRNA en 3' tiene funciones importantes en eucariotas, y la interrupción de este proceso tiene efectos catastróficos en el crecimiento y viabilidad celular (Zhao et al., 1999). Este procesamiento promueve el transporte de los mRNA desde el núcleo al citoplasma (Vinciguerra and Stutz, 2004), la estabilidad de los mRNA (Wilusz et al., 2001) y potencia la traducción de los mRNA a proteínas (Preiss and Hentze, 1998).

3.3 EXPORTE DEL mRNA

Los complejos de poro nuclear (NPCs) son pasajes a través de los cuales las moléculas viajan entre el núcleo y el citoplasma. La mayoría de los RNA y proteínas estudiados pasan a través de los NPCs por mecanismos activos que requieren receptores de transporte para atravesar la barrera (Strambio-De-Castillia et al., 2010). La mayoría de los RNAs, como los tRNA, miRNA y snRNA, requieren receptores de transporte del tipo importina/karioferina- β para el transporte del núcleo al citoplasma. Por el contrario, el transporte del mRNA necesita un receptor heterodimérico llamado Tap-p15 en metazoos y Mex67-Mtr2 en *Saccharomyces cerevisiae* (Figura I19) (Kohler and Hurt, 2007; Stewart, 2010).

Los receptores de transporte del mRNA deben adoptar diferentes estrategias para reconocer el mRNA. Aunque tanto Tap-p15 como Mex67-Mtr2 son capaces de

unirse directamente al RNA *in vitro*, necesitan otras proteínas de unión al mRNA como “adaptadores”, *in vivo*; estos adaptadores permanecen asociados con los mRNA en varias etapas durante la biogénesis de estos mRNA (revisado en Katahira, 2012).

El receptor de transporte facilita el paso de los mRNA unidos a través de interacciones directas con nucleoporinas que contienen secuencias repetidas de fenilalanina-glicina (FG) y se localizan en el interior de los NPCs (Katahira et al., 2002; Strasser et al., 2000). Durante o inmediatamente después de la translocación al citoplasma, el mRNA cambia drásticamente su estructura, liberando los receptores de transporte (ver revisión (Bjork and Wieslander, 2011)). Trabajos recientes indican que la proteína de exporte de mRNA Gle1, la nucleoporina Nup159, la helicasa de RNA Dbp5, y la pequeña molécula de señalización inositol hexafosfato (InsP₆) desempeñan papeles esenciales en esta etapa final del exporte del mRNA en levaduras (Bolger et al., 2008; Wentz and Rout, 2010). De hecho, la dirección del exporte es dirigida por la helicasa Dbp5, que se recluta cotranscripcionalmente al mRNA naciente y se activa en el lado citoplasmático del poro por la acción de Gle1 y la molécula InsP₆, conduciendo al desplazamiento del receptor Mex67-Mtr2 del mRNP (complejo proteínas-mRNA) (Röther and Strässer, 2009).

El exporte nuclear está acoplado con otras etapas de la biogénesis del mRNA. El complejo TREX (*Transcription-export*), juega un papel central en el acoplamiento de la transcripción y el exporte. Durante la elongación de la transcripción, el complejo TREX viaja con la maquinaria de la RNA pol II a través del gen e interacciona con varios factores facilitando el acoplamiento de los factores asociados al mRNA y el empaquetamiento de los complejos proteínas-mRNA (mRNPs) funcionales para el exporte nuclear (Strasser et al., 2002; Zenklusen et al., 2002). Este proceso se divide en dos etapas consecutivas de manera que inicialmente el complejo THO recluta otros componentes para ensamblar el complejo TREX activo en el gen y a continuación, esos componentes, como son los complejos Yra1-Aly y Sub2-Uap56 se transfieren al mRNA (Abruzzi et al., 2004) para el reconocimiento del receptor de exporte del mRNA. En levaduras el factor Pcf11 participa en el reclutamiento de Yra1 al complejo THO a través de interacciones físicas (Johnson et al., 2009). Además el complejo TREX está asociado a la formación del extremo 3' del mRNA (revisado en Katahira, 2012). Es interesante destacar que el mismo dominio de Yra1 media la interacción de Yra1

con Sub2 o con Pcf11, y por tanto los complejos Pcf11-Yra1 y Sub2-Yra1 son excluyentes entre sí (Johnson et al., 2009).

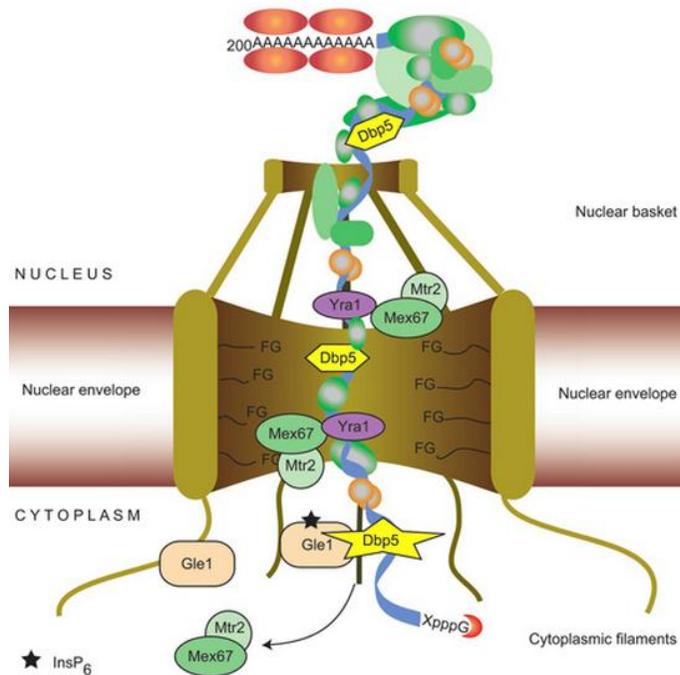


Figura I19: Transporte del mRNA a través del complejo de poro nuclear. Los mRNA maduros y procesados son transportados activamente a través del canal interior del complejo de poro nuclear por la interacción del receptor de exporte del mRNA Mex67-Mtr2 con las repeticiones de fenilalanina/glicina (FG) de las proteínas del poro nuclear. La dirección del transporte es dirigida por la helicasa Dbp5, que se recluta cotranscripcionalmente al mRNA naciente y se activa en el lado citoplasmático del poro por la acción de Gle1 y la molécula de señalización InsP₆, conduciendo al desplazamiento del receptor Mex67-Mtr2 del mRNP (Röther and Strässer, 2009).

3.4 DEGRADACIÓN DEL mRNA

El mRNA puede ser degradado tanto en el núcleo como en el citoplasma. Defectos en el procesamiento nuclear del mRNA y en la formación de un complejo de exporte competente pueden conducir a la degradación del mRNA por rutas de vigilancia. Estas rutas están mediadas por el exosoma nuclear, que contiene varias subunidades incluyendo la exonucleasa 3'-5' conservada Rrp6 (LaCava et al., 2005), o por Rat1 (5'-3') (Bousquet-Antonelli et al., 2000). Otra vía para impedir el transporte de mRNA defectivos es la retención nuclear activa, que proporciona tiempo para

completar el procesamiento del mRNA o degradar el transcrito erróneo (Hilleren et al., 2001; Jensen et al., 2001).

Tras su exporte al citoplasma, los mRNA pueden ser traducidos a proteínas, degradados o almacenados como mRNPs no traducidos en los cuerpos de procesamiento (*p-bodies* o *processing bodies*, PBs) y los gránulos de estrés (SGs), estando ambos conservados desde organismos unicelulares hasta humanos (revisado en Anderson and Kedersha, 2009).

Muchos de los constituyentes de los PBs son factores de degradación del mRNA (como Dcp1/Dcp2), activadores del *decapping* (como Dhh1, Pat1, Scd6, Edc3 y el complejo Lsm1-7), la exonucleasa Xrn1 y proteínas de la ruta NMD (*non-sense mediated mRNA decay*) entre otros (Balagopal and Parker, 2009; Sheth and Parker, 2003; Zheng et al., 2008). En concordancia con esto, la degradación del mRNA puede ocurrir en los PBs (Sheth and Parker, 2003) aunque también puede tener lugar fuera de ellos. Los PBs pueden observarse en condiciones normales de crecimiento pero su formación es directamente proporcional a la concentración citoplasmática de mRNPs traducionalmente reprimidos, lo que hace que en situaciones como el estrés se incremente el número de PBs (Franks and Lykke-Andersen, 2008). Cuando las células regresan a las condiciones favorables, los mRNA almacenados en los PBs pueden salir y volver a ser usados para la traducción (Harel-Sharvit et al., 2010). Además, el modelo actual de la dinámica de los mRNA en el citoplasma indica que los mRNA pueden moverse entre los sitios de traducción activa (polisomas), los PBs, y los SGs (Harel-Sharvit et al., 2010).

La degradación de los mRNA maduros ocurre principalmente en el citoplasma por diferentes vías (Figura I20). En la **degradación dependiente de deadenilación** de la cola poli (A) del extremo 3' (Figura I20A), esta puede ser acortada, dependiendo del mRNP, por los complejos de deadenilación Pan2- Pan3, el complejo Ccr4-Not y PRNA (*poly(A)-specific ribonuclease*), (Goldstrohm and Wickens, 2008). Al acortamiento de las colas poli (A) puede seguirle la eliminación de la caperuza 5' por el complejo de *decapping* Dcp1/Dcp2, y posteriormente la degradación en sentido 5'-3' llevada a cabo por la exoribonucleasa Xrn1 (Muhlrad et al., 1994). La cola poli (A) y la proteína de unión a poli (A), Pab1, son reguladores negativos del propio *decapping* (Tharun, 2009). Además, este proceso de eliminación de la caperuza, requiere el

reemplazo del complejo de inicio de la traducción, eIF4F, por el complejo de *decapping* Dcp1/Dcp2. Por tanto, el *decapping* compete con la iniciación de la traducción (Li and Kiledjian, 2010). El mRNA deadenilado puede ser también degradado exonucleolíticamente desde el extremo 3' al 5' por el exosoma citoplasmático (Anderson and Parker, 1998). Para algunos mRNA, la degradación empieza con un corte endonucleolítico que es seguido por la degradación mediada por el exosoma y Xrn1 tanto aguas arriba como aguas abajo del sitio de corte (Bracken et al., 2011).

La ruta independiente de deadenilación (Figura I20B), requiere el reclutamiento de la maquinaria de *decapping* (Badis et al., 2004; Muhlrud and Parker, 2005) que en *S. cerevisiae*, interacciona con la proteína Rps28B y con el potenciador de *decapping* 3 (Edc3). Tras la eliminación de la caperuza en 5', el mRNA es degradado por Xrn1. Por último, la degradación del mRNA mediada por endonucleasa (Figura I20C), se inicia con un corte interno del mRNA que puede ser producido por distintas endonucleasas como Pmr1, Ire1 o RNasa MRP. Este corte genera dos fragmentos con un extremo desprotegido. Estos fragmentos son degradados por Xrn1 y el exosoma (Garneau et al., 2007).

Todas las enzimas y factores involucrados en modular las rutas de degradación del mRNA son posibles dianas para regular la expresión génica, conectando la degradación del mRNA con otros procesos como la traducción, transcripción o exporte nuclear del mRNA (revisado en Perez-Ortin et al., 2013).

Datos recientes en *S. cerevisiae*, revelan que la degradación 5'-3' del mRNA puede llevarse a cabo en mRNA asociados a los polisomas (Hu et al., 2009).

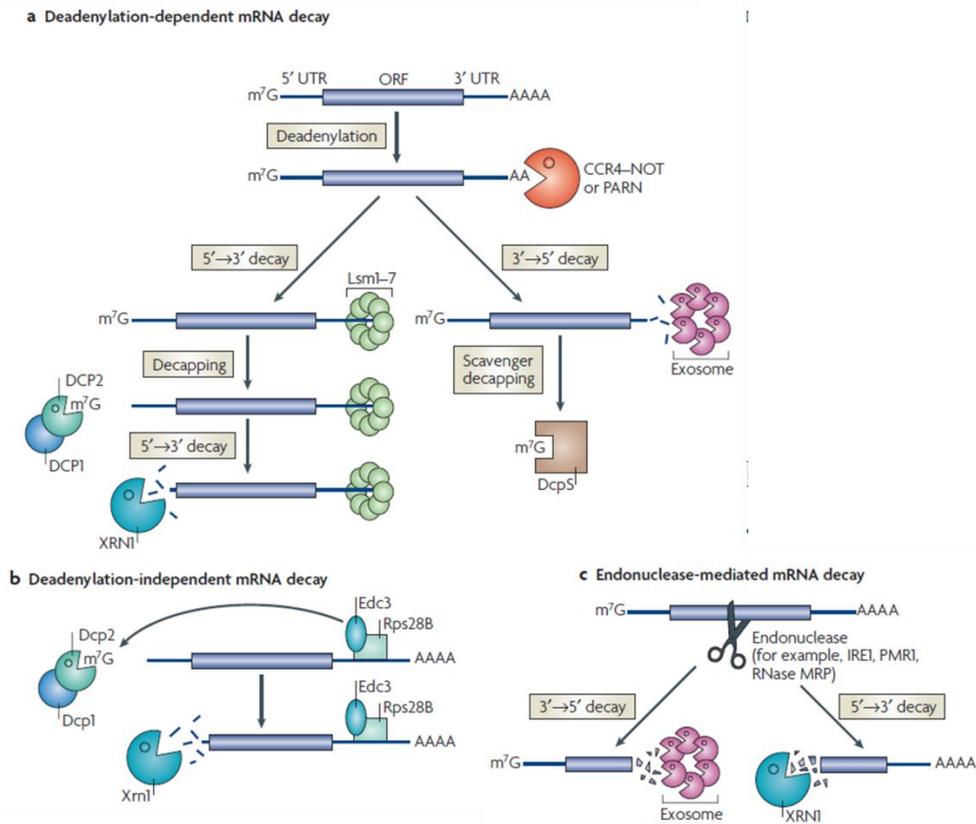


Figura I20: Mecanismos de degradación del mRNA. A) La mayoría de los mRNA se degradan por una ruta dependiente de deadenilación. La cola de poli (A) es eliminada por la actividad deadenilasa de complejos como Ccr4-Not o PARN. Tras la deadenilación, dos mecanismos pueden degradar el mRNA: *decapping* seguido de degradación en sentido 5'-3' o degradación en sentido 3'-5'. En la ruta de *decapping*, el complejo Lsm1-7 se asocia con el extremo 3' del mRNA e induce el *decapping* por el complejo Dcp1-Dcp2. Este deja el mRNA susceptible de ser degradado por la exoribonucleasa Xrn1 (5'-3'). Alternativamente, el mRNA deadenilado puede ser degradado en dirección 3'-5' por el exosoma. B) En *S. cerevisiae*, la ruta independiente de deadenilación, requiere el reclutamiento de la maquinaria de *decapping*. En esta vía, Rps28B interacciona con el potenciador del *decapping* 3' (Edc3) para reclutar la enzima de *decapping*. Tras la eliminación de la caperuza en 5', el mRNA es degradado por Xrn1. C) La degradación del mRNA mediada por endonucleasa, se inicia con un corte interno del mRNA que genera dos fragmentos con un extremo desprotegido. Estos fragmentos son degradados por Xrn1 y el exosoma (Garneau et al., 2007).

3.5 EL PAPEL POST-TRANSCRIPCIONAL DEL DÍMERO Rpb4/7

Además del papel del heterodímero Rpb4/7 en la iniciación y elongación de la transcripción (Chung et al., 2003; Edwards et al., 1991; Hirtreiter et al., 2010; Naji et al., 2007; Ouhammouch et al., 2004) existen importante datos en la literatura sobre el

papel post-transcripcional de Rpb4 y Rpb7. Rpb7 interacciona con el transcrito durante la transcripción *in vitro* tan pronto como emerge del núcleo de la enzima (Ujvari and Luse, 2006). Por otro lado, se ha mostrado que Rpb4/7 interaccionan con transcritos de la RNA pol II *in vivo* (Goler-Baron et al., 2008; Harel-Sharvit et al., 2010) probablemente en la región 3' no traducida (UTR) (Datos no publicados de Guterman y Choder). Además se ha propuesto que Rpb4 participa en la respuesta celular a estrés mediando el transporte de mRNA de genes de choque térmico (Farago et al., 2003) y que interacciona también con Npl3, un componente del complejo de transporte de ribonucleoproteínas (Lotan et al., 2005).

El dímero Rpb4/7 ha sido también implicado en la traducción y en la degradación de los mRNA (Figura I21). Rpb4/7 interacciona con componentes del factor de iniciación eucariota 3 (eIF3), como Nip1p y Hcr1p, y estimula la iniciación de la traducción. Además mutaciones en *RPB4* y *RPB7* afectan negativamente al movimiento del mRNA desde los PBs a los polisomas (Harel-Sharvit et al., 2010). Mutantes con capacidad reducida para reclutar el dímero Rpb4/7 al núcleo de la RNA pol II (como *rpb6^{Q100R}* y *rpb1^{C67S,C70S}*) poseen un perfil de polisomas defectivo en condiciones óptimas lo que sugiere que la asociación de Rpb4/7 con los polisomas requiere la previa asociación del dímero con los mRNA en el núcleo (Harel-Sharvit et al., 2010).

Rpb4 se requiere para la degradación de clases específicas de mRNA como los mRNA que codifican las proteínas ribosómicas o factores de traducción. Por un lado, se requiere para la correcta deadenilación y por otro lado, influye en el *deccapping* (Lotan et al., 2005). Se ha mostrado en un estudio a escala genómica, que en un mutante *rpb4Δ*, tras un choque térmico de 30 minutos, la mayoría de mRNA disminuyen en el mutante con respecto a la cepa silvestre, aunque algunas clases de mRNA aumentan con respecto al silvestre, como son los genes de los codificantes de 97 proteínas ribosómicas, factores de iniciación de la traducción, aminoacil-tRNA sintetasas y proteínas Ribi (Pillai et al., 2003). A pesar de que las funciones de Rpb4 en la transcripción y transporte del mRNA parecen estar asociadas principalmente a condiciones de estrés (Choder, 2004) el papel de Rpb4 en la degradación de los mRNA puede darse tanto en condiciones de estrés como en condiciones óptimas (Lotan et al., 2005).

Rpb4 se localiza en los PBs junto con los factores de degradación del mRNA Lsm1 y Dcp2 y se ha sugerido que está involucrado en la función de los p-bodies, ya que la delección de *RPB4* conlleva un incremento del número de PBs de la célula al igual que ocurre con otros componentes de los PBs (Lotan et al., 2005). Rpb4, además, interacciona física y genéticamente con componentes del complejo Pat1/Lsm1-7 (Lotan et al., 2005). Rpb7 se localiza también en PBs e interacciona también física y genéticamente con el complejo Pat1/Lsm1-7 (Lotan et al., 2007). A diferencia de Rpb4, el papel de Rpb7 en la degradación de los mRNA es más general, no afectando solo a ciertas clases de mRNA. Rpb7 también favorece la deadenilación y estimula la etapa posterior a la deadenilación requiriéndose para la eficiente degradación 3'-5' de los mRNA (Lotan et al., 2007).

A pesar del exceso de cantidad de proteínas Rpb4 y Rpb7 respecto al resto de componentes de la RNA pol II, la interacción entre Rpb4/7 y el mRNA solo parece ocurrir en el contexto de la RNA pol II (Goler-Baron et al., 2008). El mutante *rpb6^{Q100R}* que altera la correcta asociación del dímero Rpb4/7 al resto de la RNA pol II, es defectivo en la degradación de varios mRNA, probablemente por disminución de la asociación del subcomplejo Rpb4/7 con los mRNA (Goler-Baron et al., 2008). Los mRNA marcados con Rpb4/7 tienen una habilidad mayor para reclutar la maquinaria de degradación del mRNA (Figura I21). Se ha sugerido que la distribución de esta maquinaria general de degradación a lo largo de los diferentes mRNA parece estar en proporción al número de copias de cada mRNA que lleven unido Rpb4/7 (Shalem et al., 2011).

Se ha propuesto que tras la degradación del mRNA en el citoplasma, el dímero Rpb4/7 vuelve al núcleo (Selitrennik et al., 2006) donde pueden comenzar un nuevo ciclo de transcripción. Además, Rpb4 se requiere para el importe al núcleo de Rpb7, y viceversa (Selitrennik et al., 2006).

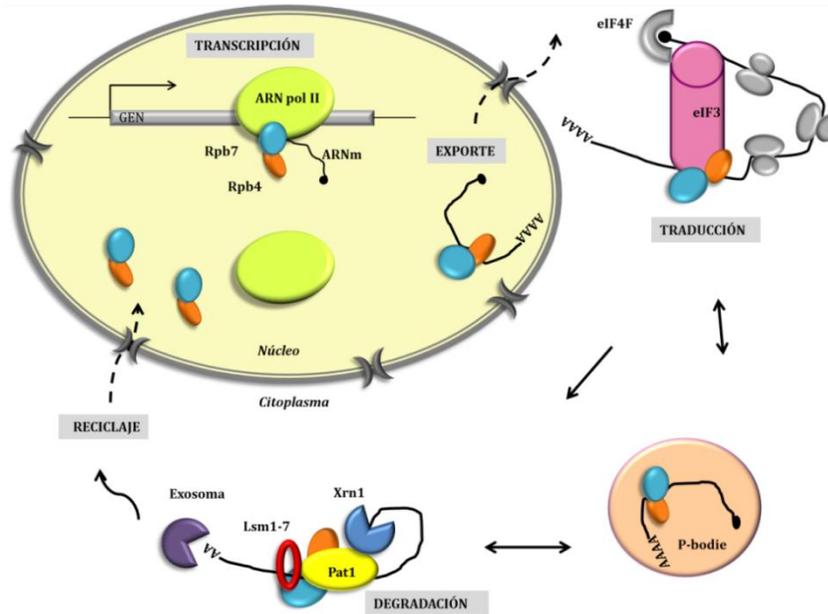


Figura I21: Ciclo de vida del mRNA: Rpb4/7 están implicados en la transcripción, exporte, traducción y degradación del mRNA. El dímero Rpb4/7 se asocia con el núcleo de la RNA pol II durante la transcripción y permanece unido a los transcritos de nueva síntesis, con los que se exporta al citoplasma. En el citoplasma, Rpb4/7 interaccionan con eIF3, favoreciendo la iniciación de la traducción de los mRNA. En condiciones de estrés, Rpb4/7 siguen a los mRNA a los p-bodies, favoreciendo el retorno a los polisomas cuando cesa el estrés. Además, Rpb4/7 pueden promover la degradación de sus mRNA diana, vía acortamiento de la cola de poli (A), seguido de la degradación por exonucleasas. Después de completar el ciclo, Rpb4/7 puede ser reimportado al núcleo y reciclado para la transcripción (adaptado de Forget and Chartrand, 2011; Dahan and Choder, 2013).

3.6 EL PAPEL POST-TRANSCRIPCIONAL DEL COMPLEJO Ccr4-Not

Al igual que el dímero Rpb4/7, el complejo Ccr4-Not participa en la regulación de múltiples etapas de la expresión génica (Figura I22). Como se ha visto en el apartado 2.2, el complejo Ccr4-Not participa tanto en la iniciación como en la elongación de la transcripción. Se ha propuesto que Ccr4-Not está implicado en la regulación de genes de respuesta a estrés regulados por TATA y el complejo SAGA. Además, se ha considerado el complejo Ccr4-Not como un regulador tanto positivo como negativo de la transcripción (revisado en Miller and Reese, 2012). Como se ha explicado en el apartado 3.4, este complejo actúa como deadenilasa en la degradación citoplasmática de los mRNA (Goldstrohm and Wickens, 2008). Sin embargo, muchos

estudios extienden el papel del complejo Ccr4-Not a otras etapas del ciclo de vida del mRNA como el transporte del mismo. En este sentido, se han observado interacciones físicas y funcionales con subunidades de la maquinaria de transporte del mRNA (Kerr et al., 2011). Además, se ha descrito una conexión entre Ccr4-Not y la degradación nuclear del RNA, existiendo interacciones con subunidades del exosoma o del complejo TRAMP (Azzouz et al., 2009). De hecho, la interacción entre Ccr4-Not1 y el exosoma puede ser necesaria para la correcta función del exosoma nuclear *in vivo* (Azzouz et al., 2009). Además, el complejo Ccr4-Not puede controlar los niveles de metilación de histonas mediante ubiquitinación y degradación de la histona dimetilasa Jhd2 en el núcleo (Miller and Reese, 2012). Por otro lado, existen hipótesis que implican al complejo Ccr4-Not en la inhibición de la traducción, probablemente debida a su actividad como deadenilasa de mRNA, aunque existen hipótesis que sugieren que este complejo puede inhibir la traducción de manera independiente a la deadenilación (Coller and Parker, 2005; Cooke et al., 2010; Chekulaeva et al., 2011).

Al igual que Rpb4/7, las subunidades de Ccr4-Not se localizan en p-bodies en situaciones de estrés (Teixeira and Parker, 2007; Tucker et al., 2002). No se sabe cómo el complejo Ccr4-Not y el dímero Rpb4/7 cooperan en la coordinación de la síntesis y degradación del mRNA, aunque se ha propuesto un modelo por el cual, Rpb4/7 recluta al complejo Ccr4-Not a los mRNA durante el proceso de transcripción para marcarlos para la futura deadenilación (Miller and Reese, 2012).

Por tanto, el complejo Ccr4-Not, al igual que el dímero Rpb4/7 se ha propuesto como un coordinador del ciclo de vida del mRNA (revisado en Perez-Ortin et al., 2013).

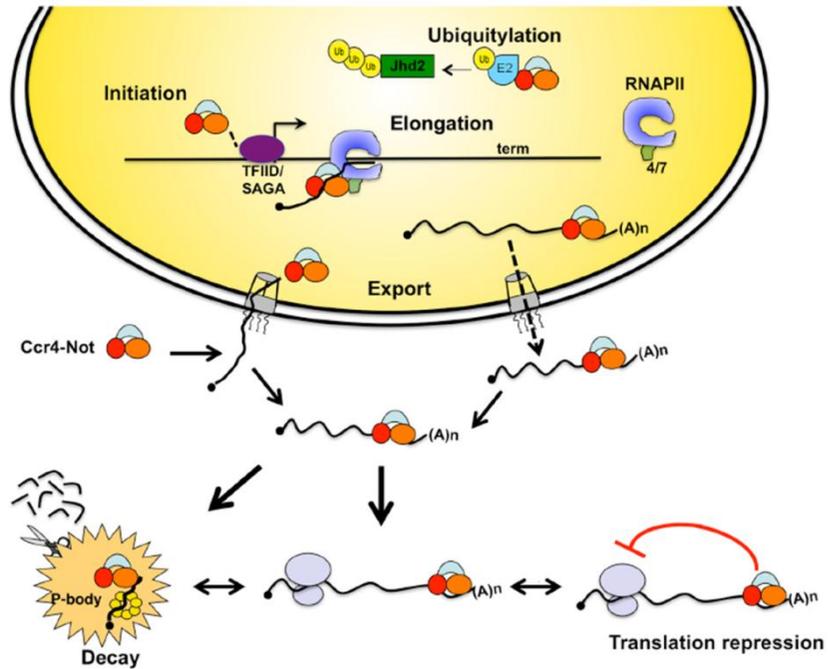
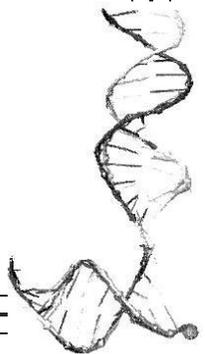


Figura I22: El complejo Ccr4-Not regula los productos génicos desde “el nacimiento hasta la muerte”. Ccr4-Not interacciona con promotores que contienen complejos TFIID o SAGA para regular la iniciación y el ensamblaje del complejo de preiniciación. Ccr4-Not se une al dímero Rpb4/7 (verde) de la RNA pol II y viaja con él a lo largo de la transcripción del gen. Ccr4-Not se asocia con el transcritor nascente para promover la elongación. Durante el proceso de terminación y liberación de la RNA pol II, Ccr4-Not permanece asociado con el transcritor y lo dirige al complejo del poro nuclear (NPC). Una vez en el citoplasma, el complejo RNA-proteínas se dirige a la traducción, degradación (deadenilación) o represión traduccional. Existen además proteínas reguladas por la actividad ubiquitina ligasa de Not4 (en el citoplasma) (no mostrado). Finalmente, el complejo Ccr4-Not puede controlar los niveles de metilación de histonas destruyendo la histona demetilasa Jhd2 en el núcleo (Miller and Reese, 2012).

***Aims/
Objetivos***



AIMS

In eukaryotic cells transcription is carried out by three different heteromultimeric RNA polymerases. Specifically, RNA polymerase II (RNA pol II) is responsible for the transcription of all mRNAs in the cell. Although RNA pol II mediated transcription and its coupled processes are extensively studied little is known about the assembly, disassembly and degradation of this enzyme, as well as, about the effects in transcription and mRNA life cycle produced as a consequence of altering these processes.

The aims of this work are:

- To analyze the role of the foot conserved domain of the RNA pol II on the integrity of the complex and the consequences of mutating the foot in multiple steps of transcription.
- To study the foot mutations' effect in CTD phosphorylation.
- To investigate the mechanisms associated to Rpb1 degradation under foot mutations.
- To analyze the global consequences on transcription under foot alteration.
- To analyze the association of Rpb4 and mRNAs.

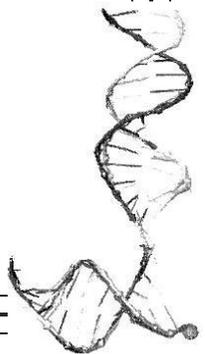
OBJETIVOS

En células eucariotas, la transcripción es llevada a cabo por tres RNA polimerasas heteromultiméricas distintas. Específicamente, la RNA polimerasa II (RNA pol II) es responsable de la transcripción de todos los mRNA de la célula. Aunque la transcripción mediada por la RNA pol II y sus procesos acoplados han sido ampliamente estudiados, poco se conoce acerca del ensamblaje, desensamblaje y degradación de esta enzima, así como de los efectos que produce la alteración de estos procesos en la transcripción y en el ciclo de vida del mRNA.

Los objetivos de este trabajo son:

- Analizar el papel del dominio del pie de la RNA pol II en la integridad del complejo y las consecuencias de alterar este dominio en múltiples etapas de la transcripción.
- Estudiar el efecto de las mutaciones del pie en la fosforilación del CTD.
- Investigar los mecanismos asociados a la degradación de Rpb1 en los mutantes del pie.
- Analizar las consecuencias globales en la transcripción tras alteración del pie de la RNA pol II.
- Analizar la asociación de Rpb4 a los mRNA.

***Materials
and Methods***



MATERIALS AND METHODS

1 STRAINS, PLASMIDS, OLIGONUCLEOTIDES, ANTIBODIES AND GROWTH MEDIA

1.1 STRAINS

1.1.1 *Escherichia coli* strains

Escherichia coli was used as a tool in molecular biology experiments (cloning and plasmid amplification). The *E. coli* strains used in this work are described in Supplementary Table 1.

1.1.2 *Saccharomyces cerevisiae* strains

Saccharomyces cerevisiae was used as a model organism for this study. Strains used in this work, their genetic features and origin are described in Supplementary Table 2.

1.2 PLASMIDS

Plasmids used in this work for overexpression experiments, cloning, protein tagging, promoter replacement and GLAM assay are listed in Supplementary Table 3.

1.3 OLIGONUCLEOTIDES

Primers used in real-time PCR, as well as primers used for gene deletion, cloning and other molecular biology techniques are detailed in Supplementary Table 4.

1.4 ANTIBODIES

Antibodies used in chromatin and protein immunoprecipitation, western-blot and immunolocalization experiments are detailed in Table M1.

Protein	Antibody	Concentration	
Rpb1	8WG16 (<i>Santa Cruz Biotechnology</i>)	1:1000 for Western-blotting 5µl/sample for ChIP and CoIP 1:100 for immunolocalization	Monoclonal (mouse)
Rpb1	Y-80 (<i>Santa Cruz Biotechnology</i>)	1:1000 for Western-blotting 5µl/sample for ChIP	Polyclonal (rabbit)
Ser5P-CTD	CTD4H8 (<i>Millipore</i>)	1:50000 for Western-blotting 1µl/sample for ChIP	Monoclonal (mouse)
Ser2P-CTD	ab5095 (<i>Abcam</i>)	1:20000 for Western-blotting	Polyclonal (rabbit)
Rpb3	Anti-POLR2C (anti-Rpb3; 1Y26; <i>Abcam</i>)	1:1000 for Western-blotting 1µl/sample for ChIP and CoIP	Monoclonal (mouse)
Rpb4	Pol II RPB4 Antibody (2Y14) (<i>Santa Cruz Biotechnology</i>)	1:1000 for Western-blotting	Monoclonal (mouse)
Rpb6	Gift from M. Werner	1:1000 for Western-blotting	Polyclonal (rabbit)
TAP	PAP (<i>Sigma</i>)	1:7000 for Western-blotting	
c-Myc	9E10 (<i>Santa Cruz Biotechnology</i>)	1:3000 for Western-blotting 1µl/sample for ChIP	Monoclonal (mouse)
HA	Anti-HA; 12CA5; (Roche)	1:1000 for Western-blotting 2µl/sample for ChIP 1:100 for immunolocalization	Monoclonal (mouse)
α-Tubulin	T5168 (<i>Sigma-Aldrich</i>)	1:1000 for Western-blotting	Monoclonal (mouse)
Nop1	28F2 (<i>Abcam</i>)	1:1000 for Western-blotting	Monoclonal (mouse)
H3	ab1791 (<i>Abcam</i>)	1:1000 for Western-blotting	Polyclonal (rabbit)
Mouse IgG (H+L)	Goat Anti-mouse IgG (H+L) Peroxidase Conjugate (<i>BioRad</i>)	1:10000 for Western-blotting	Secondary antibody
Rabbit IgG	Anti-Rabbit IgG (whole molecule-peroxidase antibody produce in goat) (<i>Sigma</i>).	1:10000 for Western-blotting	Secondary antibody
Fluorescent Mouse IgG (H&L)	Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG [H&L] (<i>Invitrogen</i>)	1:100 for immunolocalization	Secondary antibody

Table M1: Antibodies

1.5 GROWTH MEDIA

1.5.1 *E. coli* growth media

For *E. coli* growth, LB (Luria-Bertani) medium was used. The LB media composition is 1% (w/v) tryptone; 0.5% (w/v) yeast extract; 0.5% (w/v) NaCl, supplemented with 1.5% (w/v) agar when necessary. Antibiotics used were ampicillin (100 µg/ml) or kanamycin (25 µg/ml).

1.5.2 *S. cerevisiae* growth media

- **Yeast complete medium (YPD):** 2% (w/v) peptone; 2% (w/v) glucose (or galactose); 1% (w/v) yeast extract. For solid media, 2% (w/v) agar was added.
- **Synthetic dropout medium (SD):** 0.17% (w/v) yeast nitrogen base; 0.5% (w/v) ammonium sulphate, 2% (w/v) glucose (or galactose). For solid media 2% (w/v) agar was added. This medium must be supplemented with amino acids and vitamins (1.5.3) for growth of auxotrophic strains.
- **Sporulation medium (SPO):** 1% (w/v) potassium acetate, 0.1% (w/v) yeast extract, 0.05% (w/v) glucose, 2% (w/v) agar. This medium must be supplemented with ¼ of each required amino acid or vitamin. Spo medium is a nutrient-poor medium that stimulates the sporulation of yeast strains after several divisions.

1.5.3 Amino acids, vitamins, drugs and antibiotics

Amino acids and vitamins used for *S.s cerevisiae* growth media are detailed in Table M2.

Amino acid and vitamin	Final concentration
Histidine	20 mg/l
Lysine	30 mg/l
Leucine	150 mg/l
Methionine	20 mg/l
Tryptophan	20 mg/l
Adenine	50 mg/l
Uracil	20 mg/l

Table M2: Amino acids and vitamins.

- YPD complete medium can be supplemented with the antibiotic Geneticin (G418) at a 200 µg/ml final concentration.
- 5-fluoro-orotic acid (FOA) is a drug that has been used for many years as a selection system (Boeke et al., 1984). *URA3* gene encodes the orotidine 5-phosphate decarboxylase that converts fluoro-orotic acid in 5-fluoro-UMP that is toxic for cells. Strains with a wild-type *URA3* gene (or strains containing a plasmid-borne *URA3* gene) are unable to grow on media containing 5-fluoro-orotic acid, whereas *ura3* mutants grow normally. FOA is used as a tool to eliminate non-essential *URA3* plasmid in yeast. FOA was added to SD media (supplemented with required amino acids and vitamins) to a 0.5 mg/ml final concentration. This drug must be added to hot molten media.

2 METHODS

2.1 YEAST

2.1.1 Culture conditions

S. cerevisiae was grown at the permissive temperature of 30°C or at the restrictive temperature of 33°C, 35°C and 37°C, when required.

2.1.2 Transformation

2.1.2.1 *Litium acetate/polyethyleneglycol method*

S. cerevisiae transformation was carried out by the lithium acetate/polyethyleneglycol method (based on Schiestl and Gietz, 1989, with some modifications). 10 ml of the appropriate cells growing exponentially ($O.D_{600}$ 0.5-0.8) in YPD or SD liquid medium (with requirements) at 30°C were harvested by centrifugation (5.000 rpm for 4 min at room temperature), washed twice with one volume of sterile miliQ H₂O and then with one volume of TE/LiAc solution (TE [10 mM TrisHCl, 1 mM EDTA, pH=7,5]; LiAc [0.1 M LiAc, pH=7,5]). Cells, resuspended in 50 µl of TE/LiAc solution, were incubated at 30°C during 1 hour in the presence of 300 µl of 40% (w/v) PEG₄₀₀₀/TE/LiAc, containing 50 µg of freshly denatured salmon testes DNA and 1µg of the desired DNA. After a shift to 42°C for 20 minutes, cells were harvested by centrifugation (5.000 rpm for 4 min at room temperature), washed twice with 1 ml of sterile miliQ H₂O, resuspended in 1 ml miliQ H₂O, plated onto appropriated media, and incubated at the desired temperature. When selection with G418 antibiotic is required, cells must be incubated at 30°C for 2 hours, in YPD rich media, after heat shock (42°C), in order to allow expression of the kanamycin resistance gene.

For highly efficiency transformation, incubation at 30°C was performed during 2 hours and 2-3 µg of the desired DNA was used.

2.1.2.2 Rapid transformation method

For plasmid transformation in yeast, a short transformation protocol was used (Chen et al., 1992). A cells pellet (from 5 ml liquid culture or from a standard plate) was resuspended in 150 μ l of 40% (w/v) PEG₄₀₀₀, 0.2 M LiAc, 0.05 M DTT and 1.5-3 μ g of DNA was added. Cells were incubated at 45°C for 45 minutes. Then cells were pelleted, washed with 1 ml sterile miliQ H₂O, resuspended again in 200 μ l sterile miliQ H₂O, plated onto appropriated media, and incubated at the desired temperature.

2.1.3 Diploid generation, sporulation and tetrad dissection

2.1.3.1 Diploid strains construction

Diploid strains were constructed by mating strains of opposite mating types (*MAT α* , *MAT α*) on the surface of agar plates. Cells from freshly grown colonies of each haploid parental strain were mixed in a small circle of 0.5 cm in diameter, on YPD-containing plate and incubated for 4 h at 30°C to allow mating to occur (this time frame will allow mating of two strains containing plasmids without significant loss of the plasmid). Then, the mating mixture was streaked or replicated onto a plate to allow selection for the genotype of the diploid cells.

2.1.3.2 Sporulation

Starvation of diploid cells for nitrogen and carbon sources induces meiosis and the spores' formation. Sporulation can be induced in cells growing on solid or in liquid medium. On plates, cells that have been grown on YPD or selective media are patched onto a sporulation plate and incubated for 3–5 days at 30°C. Formation of spores is monitored microscopically by looking for the presence of tetrads (clusters of four small spheres within a small sac or ascus). The proportion of cells that undergoes sporulation as well as the fraction of four-spore asci varies from one strain to another (some strains sporulate better in liquid culture.)

2.1.3.3 *Random Spore Analysis*

Haploid spores can be released from the ascus and plated directly onto agar plates. Cells were collected from either the sporulation plate and treated with 1 mg/ml zymoliase 20T (*US Biological*) at 37°C during 30 minutes and then plated directly onto YPD or selective plates. It is always necessary to test individual colonies obtained in this procedure to ensure that the cells are haploid by mating the selected cells with a pair of mating-type tester strains for the ability of the selected cells to form diploids (a property of haploid cells).

2.1.3.4 *Tetrad dissection*

Other method used to obtain haploid cells was tetrad dissection using a micromanipulator microscopy Axio Scope A1 (*ZEISS*). To do that, cells from sporulation plate were treated with 1 mg/ml zymoliase 20T at 30°C for 5 minutes. A 5 µl cells aliquot was plated onto a 15 ml YPD plate. Meiotic products were separated using a 25 µm needle in columns in the same plate. After 2 o 3 days of growth at 30°C, these colonies were analyzed for different markers and conjugated with a pair of mating-type tester strains to analyzing their mating type.

2.1.4 **Single gene deletion, protein tagging and promoter replacement in yeast**

Deletion of some genes was carried out by chromosomal recombination with a PCR product amplified using specific primers up and downstream of gene sequence from strains with the corresponded deleted gene (*Euroscarf*).

Change of selectable marker *HIS3* by *his3::TRP1* was performed by integrative transformation with a disrupting cassette from plasmid pHT6 as described in Cross, 1997.

Protein tagging and promoter replacement were performed as described in Longtine et al., 1998, using specific plasmids and primers to amplify the transformation modules.

Specific strains, plasmid and primers used in these constructions are described in RESULTS.

2.2 *Escherichia coli* CULTURE CONDITIONS AND ELECTROPORATION

E.coli was grown at 37°C.

E. coli strain MC1066 was transformed by electroporation (Sambrook and Russell, 2006). Briefly, electrocompetent bacteria were prepared by growing cultures to mid-log phase, washing the bacteria extensively at 4°C with sterile miliQ H₂O, and then resuspending them in a solution of low ionic strength (10% glycerol) to a concentration of 2×10^{10} to 3×10^{10} cells/ml. Mix 40 µl of suspension with DNA and transfer to an ice-cold electroporation cuvette (0.2 cm gap). Deliver a pulse of electricity to the cells a time constant of 4-5 milliseconds with a field strength of 12.5 kV/cm. Resuspend cells in 1 ml of SOC medium and incubate them at 37°C during 1 hour. After that, plate different volumes in LB plates supplemented with antibiotics and let them grow at 37°C.

2.3 MOLECULAR BIOLOGY METHODS

2.3.1 Nucleic acid analysis and manipulation methods

2.3.1.1 Plasmid DNA extraction from *E. coli*

For extraction of plasmid DNA from *E. coli* cultures some commercial kits were used following the manufacturer's protocols. For small quantities of plasmids two kits were used: Spin miniprep kit (*Quiagen*) and PureYield™ Plasmid Miniprep System (*Promega*). For higher quantities of plasmids, the Pureyield plasmid midiprep system (*Promega*) was used.

2.3.1.2 Genomic DNA extraction from yeast

For yeast genomic DNA extraction 10 ml of the appropriate cells growing exponentially (O.D₆₀₀ of 0.8-1) (or a pellet of cells grown onto a plate) were used. Cells were centrifuged at 4000 rpm 4°C during 3 minutes, washed with 5 ml of miliQ H₂O and resuspended in 200 µl of lysis buffer (2% (v/v) Triton, 1% (w/v) dodecyl sodium sulfate (SDS), 100 mM NaCl). In addition, 300 µl of glass beads (425-600 µm, *SIGMA*) and 200 µl of phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) were added. Then mixture was vortexed during 4 minutes at 4°C using the highest speed. 200µl of TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8) were added and the mixture was

centrifuged at 12000 rpm and 4°C during 5 minutes. Then, aqueous upper phase was transferred to another tube and 1ml of cold absolute ethanol was added, mixing by inversion and centrifuging in the same conditions. Pellet was resuspended in 400 µl TE pH 8 and 4 µl of RNasa A (20 mg/ml) was added. Then, the mixture was incubated at 37°C until the pellet was dissolved. DNA was washed using 70% (v/v) cold ethanol. Upper phase was discarded; pellet was dried and finally resuspended in 50 µl of miliQ H₂O.

2.3.1.3 RNA extraction from yeast

Total RNA from yeast cells was prepared as previously described (Nonet et al., 1987). Briefly, 10 ml of the appropriate cells growing exponentially (O.D₆₀₀ 0.5-0.6), were centrifuged at 4000 rpm 4°C during 3 minutes and washed using 5 ml of miliQ H₂O (for higher RNA extractions, a higher volume of culture must be used). Upper phase was discarded and cells were resuspended in 100 µl LETs (5 M LiCl, 0.5 M EDTA pH 8, 10% (w/v) SDS, 1 M Tris-HCl pH 7.5). 100 µl phenol: chloroform: isoamyl alcohol (125:24:1) pH 4.7 and 100 µl of glass beads (425-600 µm, SIGMA) were added. Cells were broken by vortexing during 12 minutes at 4°C at highest speed. Then, mixture was centrifuged during 5 minutes at 12000 rpm and 4°C. The upper phase was transferred to a new tube and one volume of phenol: chloroform: isoamyl alcohol (125:24:1) pH 4.7 was added. After vortexing mixture was centrifuged in the same conditions. Upper phase was recuperated and a volume of chloroform: isoamyl alcohol (24:1) pH 4.7 was added, mixed gently and centrifuged during 5 minutes at 12000 rpm and 4°C. Upper phase was recuperated and precipitated with one volume of 5 M LiCl at -20°C during 3 hours (or overnight). Then, mixture was centrifuged during 15 minutes at 14000 rpm and 4°C, pellet was washed using 70% (v/v) cold ethanol and resuspended in 300 µl of miliQ H₂O. RNA was then precipitated using 1/10 volume of 3 M sodium acetate and 2 volumes of cold absolute ethanol at -20°C during at least 1 hour. After centrifugation during 15 minutes at 14000 rpm and 4°C, pellet was washed with 70% (v/v) cold ethanol, dried and resuspended in 50 µl of miliQ H₂O.

2.3.1.4 Nucleic acid quantification and electrophoresis

Nucleic acid quantification was carried out using a spectrophotometric method with a quartz cuvette or using a NanoVue Plus Spectrophotometer (*GE Healthcare*). For nucleic acid quantification optical density at 260 nm and 280 nm was determined. Quantification was calculated as:

DNA concentration ($\mu\text{g/ml}$): $\text{O.D}_{260} \times 50 \times \text{Dilution factor}$

RNA concentration ($\mu\text{g/ml}$): $\text{O.D}_{260} \times 40 \times \text{Dilution factor}$

For correct purity the $\text{O.D}_{260} / \text{O.D}_{280}$ ratio must range between 1.8-2.

DNA and RNA were verified by agarose gel electrophoresis and visualized using a gel documentation system (*UViDoc*).

2.3.1.5 RNA quantification using EXPERION system

EXPERION (*BioRad*) is an electrophoretic system that was used to analyze the quality and quantity of RNA. 5 ng/ μl of total RNA was used with the Experion RNA HighSens Chips using manufacturer's guidelines.

2.3.1.6 DNA purification, digestions, ligations and sequencing

PCR and restrictions products were purified using the commercial kit NucleoSpin® Extract II (*MACHEREY-NAGEL*) using the manufacturer's guidelines.

Digestions were carried out using different restriction enzymes from different providers using the manufacturer's protocols.

DNA ligation experiments were performed using a T4 DNA ligase (*Promega*) using the manufacturer's protocols.

DNA sequencing was carried out in "Centro de Investigación Científico-Técnica, CICT" from the University of Jaén or in the Sequencing Service of "Sistemas Genómicos (Valencia).

2.3.1.7 Polymerase chain reaction (PCR)

PCR were performed in 20 μ l final volume using two different Taq DNA polymerases according to manufacturer's guidelines. For high fidelity or for long fragments (up to 3 Kb), iProof High Fidelity Polymerase (*BioRad*) was used. For short fragments or checkout PCR, *Biotoools* DNA polymerase was used. PCR were carried out using a *Biometra* (*Cultek*) thermocycler.

For PCR from freshly growing yeast cells, cells from a freshly growing colony were transferred to 2.4 μ l 0.02 N NaOH with a pipetman tip, freezed in liquid N₂, and boiled during 10 minutes. Then, PCR reaction mix was added and PCR was performed.

2.3.1.8 Reverse transcription

For cDNA generation, 1 μ g total RNA was used with iScript cDNA synthesis kit (*BioRad*) and indicated Manufacturer. The reaction was performed in 20 μ l final volume. Once reaction is finished, 80 μ l sterile miliQ H₂O was added.

When PrimeScript™ RT Enzyme (*Takara*) was used; reaction was performed with 0.5 μ g total RNA in 10 μ l final volume using the manufacturer's protocol. Once reaction is finished, 40 μ l sterile miliQ H₂O was added.

For Real-time PCR a 1:100 cDNA dilution was used.

2.3.1.9 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) was performed in CFX96 and CFX384 Real-time PCR detection systems (*BioRad*). Real-time PCR were performed using 10 pmoles of each primer and 5 μ l of master mix in 10 μ l final volume.

Quantitative Real-time PCR from cDNA, was performed using SsoFast EvaGreen Supermix (*BioRad*) and 1:100 cDNA dilution.

Quantitative Real-time PCR from ChIP products was performed using SYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time, (*Takara*)).

2.3.1.10 Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

Chromatin immunoprecipitations were performed as previously described in Rodriguez-Gil et al., 2010, with some modifications.

Specifically, 50 ml of the appropriate cells growing exponentially (OD_{600} 0.5-0.7) were used. Crosslinking was performed by adding formaldehyde to 1% (v/v) to the cells and incubating at room temperature for 15 min with some agitation each 3 minutes. Then 2.5 ml 2.5 M glycine was added and cells were incubated for 5 min at room temperature. Cells were then harvested and washed four times with 25 ml Tris-saline buffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.5) at 4°C. Cell breakage was performed in 300 μ l of lysis buffer (50 mM HEPES, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8, 1% (v/v) Triton-X-100, 0.1% (w/v) Sodium deoxycholate, 1 mM PMSF, 0.15% (w/v) Benzamidine, protease inhibitor cocktail (Complete, Roche)) with glass beads (425-600 μ m, SIGMA). Cells extracts were sonicated in a Bioruptor sonicator (Diagenode) for 30 min in 3 cycles of 10 min (30 s on/30 s off cycles) using the highest power and adding ice between each cycle (under these conditions, chromatin is sheared into an average size of 300 bp). Extracts were centrifuged at 12000 rpm during 5 minutes at 4°C and stored at -80°C.

To analyze the size of the chromatin, 40 μ l of the extracts were supplemented with 105 μ l elution buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8, 1% (w/v) SDS) and 5 μ l of RNase A (10 mg/ml). Mixture was incubated overnight at 65°C in heatblock shaking at 600 rpm. Then, proteinase K treatment and purification was carried out as describe below. 5 μ l chromatin solutions were analyzed in 1.5% (w/v) agarose gel electrophoresis, using loading buffer without bromophenol blue.

For chromatin immunoprecipitation, 35 μ l Dynabeads M280 sheep anti-mouse or anti-rabbit (Invitrogen) ($2 \cdot 10^7$ beads) per sample were used. Beads were washed twice with 1 ml of BSA/PBS (5 mg/ml serum albumin bovine in PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4)) and finally resuspended in 50 μ l antibody solution, diluted in BSA/PBS (conditions depends on each antibody: see table M2). Mixture was incubated 3-4 hours at 10°C with shacking at 600 rpm. Then, magnetic beads were washed 4 times with 600 μ l BSA/PBS and incubated with the chromatin (except 10 μ l that were kept as INPUT) during 90 minutes at 10°C with

shacking at 600 rpm. After incubation, beads were washed twice with 1 ml lysis buffer, twice with 1 ml lysis buffer supplemented with 360 mM NaCl, twice with 1 ml washing buffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 250 mM LiCl, 0.5% (v/v) NP-40, 0.5% (w/v) sodium deoxycholate, 1 mM EDTA pH 8), and once with elution buffer. Then, chromatin was eluted using 50 μ l elution buffer, vortexed and incubated at 65°C during 10 min. Upper phase was transferred to a new tube and elution step was repeated with lower phase (beads). Finally, 90 μ l elution buffer were added to the eluted chromatin (and 140 μ l to the INPUT) and samples incubated overnight at 65°C in heatblock shaking at 600 rpm for decrosslinking. Then 142.5 μ l elution buffer and 7.5 μ l 20 mg/ml Proteinase K (*Novagen*) were added to the samples and were incubated at 37°C during 90 min with shacking (600 rpm). Chromatin was purified using the commercial kit NucleoSpin® Extract II (*MACHEREY-NAGEL*) with NTB buffer (for samples containing SDS).

For quantitative real-time PCR (qRT-PCR), a 1:100 dilution for the INPUT sample and a 1:2 for immunoprecipitated samples were used. Genes were analyzed by qRT-PCR in triplicate with at least three independent biological replicates using SYBR Premix Ex Taq (*TaKaRa*). The values found for the immunoprecipitated PCR products were compared to those of the total INPUT, and the ratio of the value of each PCR product of a transcribed gene to the value of a nontranscribed region of chromosome V (see Supplementary Table 3) was calculated.

2.3.1.11 mRNA stability analysis

To analyse mRNA stability two different approaches were used depending on the genes: northern-blot based technique and a qRT-PCR based method.

2.3.1.11.1 Northern-blot

To analyze mRNA stability, cells were growth in SD (with requeriments) and recovered by centrifugation at O.D.₆₀₀ of 0.5. Cells were treated with 5 μ g/ml thiolutin and cells samples were taken at different times after thiolutin adition (0 min, 7 min, 12 min, 25 min, 45 min, 60 min, 90 min and 120 min) and freezed in liquid N₂. Total RNA was isolated from those samples. mRNA stability was analyzed by northern-blot as described in Pelechano and Perez-Ortin, 2008. Briefly, electrophoresis was done in

1% agarose in 1× MOPS (3-[N-morpholino] propanesulfonic acid) and 6.4% formaldehyde. The samples were transferred to a nylon membrane (Hybond N+, *Amersham*) by capillarity with 6× SSC overnight and UV crosslinked. Then the filter was hybridized for 16 h at 42°C in 50% formamide, 5× SSPE (0,75 M Sodium Chloride, 0.05 M Sodium Phosphate, 0.005 M EDTA) 5% dextran sulphate, 0.5% SDS, 5× Denhardt's solution (0,1% Ficoll (type 400), 0,1% polyvinylpyrrolidone, and 0,1% bovine serum albumin) and 200 µg/ml salmon sperm DNA. DNA probes for *RPB6*, *YKE2*, *HHF1*, *HHT1*, *ACT1* and *RPL27* were obtained by PCR. The probes cover fragments or the entire ORF and were labelled by random priming using ³³P-dCTP and Ready-to-Go kit (*Amersham*). The filters were washed twice during 10 min at 42°C (2× SSPE and 0.1% SDS) and once during 15 min at 65°C (1× SSPE and 0.1% SDS) and exposed to an imaging plate (BAS-MP, *Fujifilm*).

2.3.1.11.2 Real-time PCR

To analyze heat shock genes mRNA stability, thiolutin cannot be used since it activates a heat shock response. Then, the promoter of some heat shock genes were replaced by a *GAL1* promoter as described (Longtine et al., 1998) (see Results section 6.2) and mRNA stability analyzed as indicated.

60 ml of the appropriate cells growing exponentially (O.D₆₀₀ 0.5-0.6) in SD-galactose medium (with requirements) were used. Then, 15 ml cells were harvested, washed with 5 ml of miliQ H₂O, centrifuged at 4000 rpm during 5 minutes at 4°C and kept at -20°C (time 0). Cells from the remaining culture were washed twice with SD-glucose (to stop *GAL1* promoter activation) by centrifugation at 2000 rpm during 3 minutes at room temperature, resuspended in 50 ml SD-glucose and incubated at 30°C. 15 ml aliquots of the cultures were collected at different times (10 min, 20 min, 30 min, 45 min) and manipulated as indicated for time 0. RNA extraction from each sample was carried out as described above (apartado 2.3.1.3). mRNA stability was analyzed by qRT-PCR with specific primers for the corresponding heat shock genes (see Supplementary Table 4).

2.3.1.12 Global expression array

The global expression analysis, were carried out at the DNA chips service (SCSIE) of the University of Valencia in collaboration with José Enrique Perez-Ortín's group. *S. cerevisiae* DNA chips were prepared in a nylon membrane of 7x11 cm containing 6144 dots corresponding to probes of the coding regions of all yeast genes, including polymerase II transcribed genes, ARNr *18S* and *25S* (ARN polymerase I) and ARNt and *SCR1* (polymerase III). In addition, they contain some potential non coding regions (Alberola et al., 2004).

100 ml of the appropriate cells growing exponentially (OD₆₀₀ 0.5-0.6) in YPD at 30°C were used. 50 ml of the culture were harvested at 4000 rpm during 5 minutes at 4°C. Total RNA extraction was carried out as described in section 2.2.1.3.

After RNA quantification, 40 µg of total RNA were used to synthesize radiolabelled cDNA using 500 ng of Oligo dT (T15/VN) and 1µl of RNase out in 20 µl of total volume. Mixture was incubated 10 min at 70°C and then chilled on ice. A second reaction was performed using 1X first strand buffer, 10 mM DTT, 0.2 mM dNTP, 1.3 mCi/ml ³³P-α-dCTP and 1U of SuperScript II RT (*Invitrogen*) in a 30 µl final volume. Mixture was incubated at 43°C during 1 hour and reaction was stopped by adding 1 µl of 0.5 M EDTA pH 8. MiliQ H₂O was added to reach 100 µl total volume. Samples were purified using molecular exclusion columns (S-300 HR; *GE- healthcare*).

Radioactivity was quantified using 1 µl of probe in 5 ml of scintillation solution (Cocktail 22 Normascint (CO0135); Scharlau), with a Wallac 1409 Liquid Scintillation Counter. 15x10⁶ DPM (3x10⁶ DPM of hybridization solution) were used for hybridization. Probes were denatured at 95°C during 5 min and then chilled on ice.

DNA chips were prehybridized with 5 ml of hybridization solution (5x SCC, 5x Denhart's solution, 0.5% SDS, 100 µg/ml salmon testes DNA) during 1 hour at 65°C. Then, 5 ml of freshly-prepared hybridization solution, incubated at 65°C, with the appropriate volume of probe were added and chips were incubated at 65°C in an oven during 40-42 hours. Chips were washed once with washing solution I (2X SSC, 0.1X SDS) during 20 min and twice with washing solution II (0.2X SSC, 0.1X SDS)

during 30 min. Finally, chips were stamped and exposed to IP Fosforimager screens (BAS-MP; *FujiFilm*).

Three replicates of each strain were used. To analyze the data, ArrayStat program (*Imaging Research*) was used.

2.3.1.13 RNA immunoprecipitation and sequencing (RIP-SEQ)

This protocol was performed in Dr. Steimmetz Lab in the European Molecular Biology Laboratory (EMBL) in Heidelberg, Germany.

For RNA immunoprecipitation 1 l of the appropriate cells growing exponentially (OD₆₀₀ 0.9-1) in YPD were used. Cultures were harvested at 5000 rpm during 5 minutes at 4° C and cells pellets were washed twice with 25 ml of cold buffer A (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 140 mM KCl, 1.8 mM MgCl₂, 0.1% NP-4, 0.02 mg/ml Heparin), transferred to 50 ml tubes, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

Cells were resuspended in 2 ml of cold buffer B (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 140 mM KCl, 1.8 mM MgCl₂, 0.1% NP-4, 0.02 mg/ml Heparin, 0.5 mM DTT, 1 mM PMSF, 50 U/ml RNasin plus) with protease inhibitor cocktail (Complete Ultra, *Roche*), transferred to 15 ml tubes and lysed with 2 ml of glass beads in FastPrep, in 4 cycles of 30 seconds at speed 5.5 and 2 cycles of 20 seconds at speed 6.0, afterwards with 1 min break between each step. Beads were removed by centrifugation at 5000 rpm during 5 minutes and 4°C and extracts were transferred to eppendorf tubes. Then extracts were clarified by centrifuging twice at 14000 rpm for 5 minutes and 4°C, adjusted to 3 ml final volume with buffer B. A 100 µl aliquot was kept for reference RNA isolation.

For RNA immunoprecipitation, 400 µl of Dynabeads M-280 sheep anti rabbit IgG beads were washed twice with buffer A and mixed with 3 ml extracts. Mixture was incubated in 15 ml tubes for 2 h with gentle rotation at 4°C and washed with 2 ml buffer B for 15 min at 4°C and 3 times with 5 ml buffer C (20 mM Tris-HCl pH 8, 140 mM KCl, 1.8 mM MgCl₂, 0.1% NP-4, 10% Glycerol, 0.5 mM DTT, 1 mM PMSF, 50 U/ml RNasin plus) with protease inhibitor cocktail (Complete Ultra, *Roche*), for 15 min at 4°C with gentle rotation. Beads were then resuspended in 400 µl TEV buffer (*Invitrogen*) and TAP tagged proteins were cleaved by incubating with 10 µl of 10

U/μl acTEV protease (*Invitrogen*) for 1h at 21 °C in heatblock shaking at 700 rpm. Eluent was collected and RNA was isolated by extracting with one volume of phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) pH 4.7. Mixture was vortexed and centrifuged at 13000 rpm during 1 min at room temperature. The upper phase was transferred to a new tube and one volume of phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) pH 4.7 was added. After vortexing mixture was centrifuged in the same conditions. Upper phase was recovered and an equal volume of chloroform: isoamyl alcohol (24:1) pH 4.7 was added, mixed gently and centrifuged during 1 minute at 13000 rpm and room temperature. Upper phase was recovered and precipitated with two volumes of 100% ethanol, 1/10 volume of NaAc 3M and 3μl of linear acrylamide as a carrier, by incubating 20 minutes on ice. After that, RNA was pelleted by centrifugation at 14000 rpm for 20 minutes at 4°C and washed with 500 μl 70% ethanol. After centrifugation at 13000 rpm for 1 min at room temperature, pellet was dried and resuspended in 15 μl of miliQ H₂O. Isolation of reference RNA was performed using RNeasy Mini Kit (*Quiagen*).

Reference and immunoprecipitated RNA samples were treated with Turbo DNase (Turbo DNA-free kit, *Ambion*) by incubating for 25 minutes at 37°C. Then, enzyme was inactivated by incubating with inactivation beads during 5 minutes. Samples were centrifuged for 2 min at 13.000 rpm at room temperature and supernatant was recovered without touching the beads. RNA concentration of supernatant was quantified using Qubit (*Invitrogen, Life Technologies*).

2.3.1.13.1 3' T-fill protocol

3' T-fill protocol was used to construct the libraries for sequencing the RNA (Pelechano et al., 2012; Wilkening et al., 2013) (Figure M1).

3'T-fill

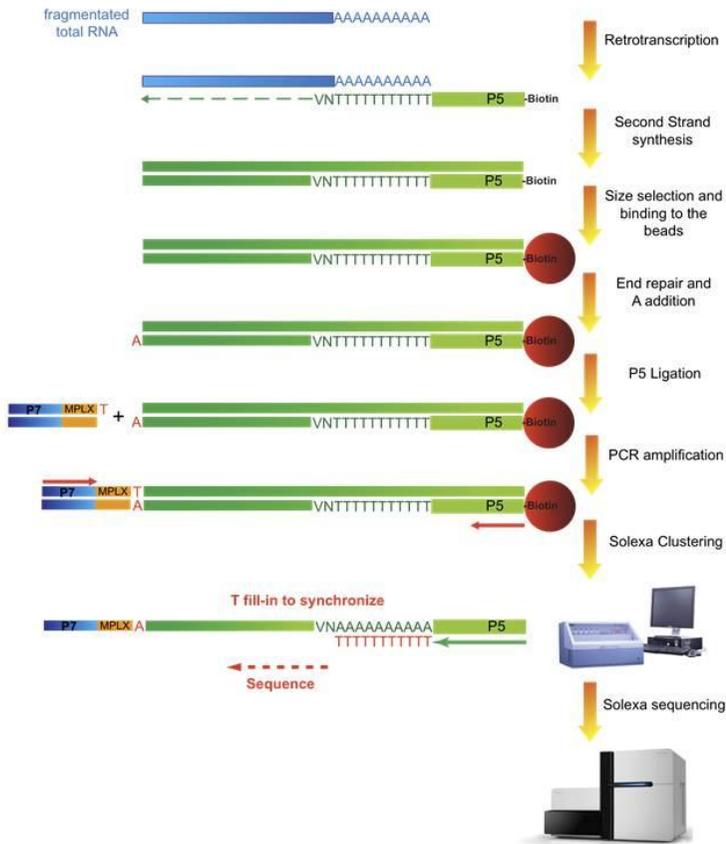


Figure M1: 3' T-Fill protocol for libraries construction (Steimmetz lab).

i. Fragmentation of total RNA.

To sequence the terminal fragments of the RNA molecules, the first step involves the fragmentation of the total RNA, from which the 3' terminal mRNA fragments are selected at later steps. 1 µg of DNA-free total RNA was used for input samples. For RIP samples, 150 ng of RNA were used. RNA was mixed with 4 µL of 5X RNA fragmentation buffer (200 mM Tris-acetate, pH 8.1, 500 mM KOAc, 150 mM MgOAc) in 0.2 mL PCR strips and 4µL of Spike-in IVT stock solution for quality control were added. Volume was adjusted to 20 µL with RNase-free water and sample was incubated at 80°C for 5 min. After that, the sample was transferred to ice immediately

and purified with 1.5X Agencourt Ampure XP (*Beckman Coulter Genomics*) following the manufacturer protocol. Briefly, 30 μL of Ampure beads were added to the 20 μL fragmented RNA, mixed and incubated during 5 minutes at room temperature for binding. Tubes were put on magnet stand and were let stand 2 min. After that, supernatant was taken of and beads were washed with 200 μL of 70% ethanol twice. After dry the beads, RNA was eluted in 12.8 μL of elution buffer (EB: 10 mM Tris-HCl, pH 8).

ii. Reverse transcription

The first step of the library preparation protocol consists of synthesizing biotinylated cDNA molecules by priming the poly(A) tail with a sequencing-compatible oligo dT primer (compatible with the PE 1.0, Illumina). 11.2 μL of the fragmented RNA were mixed with 1 μL biotinylated oligo dT primer (P5_dT16VN (1 μM) = 2.5 pmol) and 1 μL 10mM dNTP Mix, and samples were incubated for 5 min at 65°C to disrupt secondary structures and placed on ice. 4 μL 5X First Strand Buffer (*Invitrogen*), 2 μL DTT (0.1M), 0.32 μL Actinomycin D (1.25 mg/mL) and 0.5 μL RNasin Plus (*Promega*) were added to each sample. Mixtures were incubated in a thermocycler at 42°C. After 2 min, 0.5 μL Superscript II (200U/ μL , *Invitrogen*) were added to each tube. It is critical to do so at 42°C to prevent mispriming of the anchored oligo(dT) primer. Samples were incubated at 42°C for 50 min, and then the enzyme was inactivated by incubating the samples at 72°C for 15 min. cDNA was cleaned with 1.5X Ampure XP beads and eluted in 40 μL EB (10 mM Tris-HCl, pH 8). This will clean the excess of unused biotinilated oligo.

iii. Second strand synthesis

To generate the second strand of cDNA, RNase H, which nicks the RNA in the cDNA/RNA hybrid, and DNA polymerase I, which produces the second strand of the cDNA by nick translation, were used. 40 μL cDNA from the previous step were mixed with 5 μL 10X DNA polymerase I buffer (*Fermentas*) and 2.5 μL dNTPs (10mM) on ice. 0.5 μL RNaseH (5U/ μL , NEB) and 2 μL DNA polymerase I (10U/ μL , *Fermentas*) were added and samples were incubated at 16°C for 2.5 hours. After incubation, cDNA was purified with 0.9X Ampure XP beads and eluted in 20 μL EB.

iv. Capture of the 3' terminal cDNA fragments

Once the cDNA fragments have been produced, it is necessary to select those molecules that contain the biotinylated sequencing primer at their 3' ends. This is accomplished by using magnetic beads coated with streptavidin. It is important to remember that from this step until the enrichment PCR, the sample is bound to the magnetic beads. 20 μ L Dynabeads M-280 Streptavidin (*Invitrogen*) were used for each sample (good for binding 4 pmol of biotinylated oligo(dT)). Beads were washed twice with 200 μ L 1X bind and wash buffer (1X B&W buffer, containing 5 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 mM EDTA and 1 M NaCl) and were resuspended in 20 μ L 2X B&W-buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA and 2 M NaCl). 20 μ L of cDNA were added to the prepared beads, mixed and put on a rotator wheel at room temperature for 15 min to allow the capture of the ds-cDNA. Using a magnet stand, beads with cDNA were washed 2 times with 200 μ L 1x B&W-buffer and once with 200 μ L EB. Finally, beads were resuspended in 21 μ L of EB.

v. End repair

Once the 3' terminal cDNA molecules have been captured, it is necessary to add a common sequencing adapter to the unbiotinylated end. For this, procedure used is the same that in standard library constructions by Illumina, while making use of the fact that our samples are bound to the magnetic beads. The first step of this process is to produce blunt end molecules. For that, sample containing Dynabeads from the previous step was mixed with 2.5 μ L 10X End repair buffer and 1.25 End repair enzyme mix (NEB Next DNA Sample Prep Master Mix Set 1, NEB). Tubes were incubated for 30 min at 20°C. Then, beads were washed twice with 200 μ L 1X B&W buffer, once with 200 μ L EB and resuspended in 21 μ L EB.

vi. A tailing

In order to produce common sticky ends for the ligation of the sequencing adapter, it is necessary to introduce a common 3' adenine overhang. Sample containing Dynabeads from the previous step was mixed with 2.5 μ L of dA tailing buffer (10X NEBuffer 2 from NEB, supplemented with 0.2mM dATP) and 115 μ L Klenow Fragment (3'→5' exo-) (5U/ μ L, NEB), and incubated for 30 min at 37°C. Then

beads were washed twice with 200 μ L 1X B&W buffer, once with 200 μ L EB and resuspended in 8 μ L EB.

vii. Ligation

The 3' A-overhang produced in the previous step is now used to ligate the sequencing adapter (compatible with the PE 2.0 from Illumina) having a 3' T-overhang. This sequencing adapter contains a barcode to allow sample multiplexing. Sample containing Dynabeads from the previous step was mixed with 12.5 μ L 2X Quick Ligation buffer (NEB), 1 μ L P7_Mpx double-stranded linker (2.5 μ M) and 2.5 μ L T4 DNA ligase (2000 U/ μ L, NEB), and mixture was incubated for 15 to 30 min at 20°C. Beads were washed 4 times with 200 μ L 1X B&W buffer and once with 200 μ L EB and resuspended in 50 μ L EB.

viii. Enrichment PCR

To enrich for molecules that contain the correct combination of sequencing adapters and to obtain fragments that are not bound to beads, the samples were amplified by PCR. Since an excess of input DNA inhibits PCR amplification, only part of the beads (usually $\frac{1}{2}$) were used for the PCR amplification. 24 μ L beads with DNA were mixed with 25 μ L 2X Phusion Master Mix with HF buffer (*Finnzymes*) and 0.5 μ L each of oligo PE1.0 and PE2.0 (10 μ M, Illumina). Sample was incubated in a thermocycler with the following program: 30 seconds at 98°C, 18 cycles (10 seconds at 98°C, 10 seconds at 65°C and 10 seconds at 72°C) and a final extension of 5 min at 72°C. PCR product was transferred to a magnetic stand and the 50 μ L supernatant containing the PCR product was recovered. The beads used for the PCR should be kept at 4°C in case a re-amplification is needed.

ix. Size selection

Since a homogeneous population will increase the number of reads, size selection of DNA was performed. It is possible to select for a certain bp range using Ampure XP beads. Adding 0.6x the volume catches sizes >500 bp. The supernatant of this selection can then be used to add another 0.2x of beads for a final 0.8x selection. This should result in a ~200-500 bp range. So, samples were mixed with 0.6x the volume of Ampure beads. After 5 min of incubation, supernatant was recovered and

mixed with 0.2x beads, during 5 minutes. Then, tubes were put on a magnet and supernatant was taken off. Beads were washed twice with 70% ethanol and resuspended in 20 μ l of EB. Then samples concentration was calculated using Qubit dsDNA High-Sensitivity reagent (*Invitrogen, Life technologies*).

Since multiplexing sequence was used, similar amounts of RNA from each sample were mixed. After library generation, we need to confirm that the resulting libraries have the proper structure and that the cDNA fragments are sufficiently long to allow gene identification. For that, 30 ng of the final pooled library were cloned using the TOPO TA cloning kit (*Invitrogen*). Some of the cloned plasmid inserts (5-10) were sequenced by standard Sanger sequencing using P7 short primer. Note that the Phusion enzyme used for the PCR amplification has proofreading activity and thus does not incorporate the 3' A-overhang necessary for T/A cloning. So before cloning, a A-tailing step is needed.

After sequence confirmation, the final pooled library was run in an E-Gel 2% SizeSelect (*Invitrogen*). E-Gel electrophoresis was performed with 240 ng of sample and different sized DNAs were recovered. Samples recovered were purified with 1.8X Ampure beads and eluted in 13 μ l of EB. Then samples concentration was calculated using Qubit dsDNA High-Sensitivity reagent (*Invitrogen, Life technologies*) and DNA fragments size was measured using Agilent Bioanalyzer. A sample with DNA size of 300-350 bp was used to Illumina sequencing.

2.4 PROTEIN ANALYSIS METHODS

2.4.1 Whole cell extracts preparation

Whole cell extracts were prepared from 100 ml cell cultures O.D₆₀₀ 0.6-0.8. Cells were harvested by centrifugation at 4000 rpm during 5 minutes at 4°C and washed with miliQ H₂O and lysis buffer (50 mM HEPES pH 7.5, 120 mM NaCl, 0.5 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.3% (w/v) 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS)) and resuspended in 300 μ l lysis buffer supplemented with a protease inhibitors cocktail (Complete, *Roche*) and 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 2 mM sodium orthovanadate, and 1 mM sodium fluoride. Lysis was carried out by adding 200 μ l glass beads (425-600 μ m,

SIGMA) and by vortering three cycles of 10 minutes at 4°C using the highest power. Extracts were clarified by two centrifugations at 4°C during 15 minutes at 14000 rpm. Supernatant was the whole cell extract that can be stored at -80°C.

To quantify the protein concentration, a Bradford assay was performed using a standard curve of different BSA concentrations (Bradford, 1976).

2.4.2 Protein immunoprecipitation and TAP purification

Protein immunoprecipitation was performed as described in Soutourina et al., 2006, with modifications. 35 µl of Dynabeads (M280 sheep anti-mouse IgG or M280 sheep anti-rabbit (*Invitrogen*)) ($2 \cdot 10^7$ beads) were used for each sample. Beads were washed with 150 µl 0.1% (w/v) BSA/PBS during 5 minutes at 10°C with gentle agitation. Then beads were incubated with 50 µl 0.1% (w/v) BSA/PBS during 30 minutes and later were incubated with 0.1-1 µg antibody diluted in BSA/PBS during 1 hour. After incubation, three washes of 5 minutes with 50 µl of incubation buffer (50 mM HEPES pH 7.5, 120 mM NaCl, 0.5 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.3% (w/v) 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS)) were carried out. Then, beads-antibody complexes were incubated with 2 mg of protein extracts at 10°C with agitation during 3 hours. After incubation, beads were washed 5 times for 5 minutes with incubation buffer. The affinity-purified proteins were released from the beads by addition of 19 µl of incubation buffer and 6 µl of 4x sample buffer (10 mM Tris, 2% SDS, 10% glycerol, 0.02% bromophenol blue, 0.77M β-mercaptoethanol), and boiling during 10 minutes.

For tandem affinity purification (TAP), the same protocol was used with Dynabeads Pan Mouse IgG (*Invitrogen*) without antibody incubation step.

2.4.3 SDS-PAGE and Western-blot analysis

Western-blot analysis was performed in denaturing conditions using 6-15% polyacrylamide gels with SDS (SDS-PAGE). 30 µl of protein whole cell extracts or the result of protein immunoprecipitation experiments were denatured by adding sample buffer (10 mM Tris, 2% SDS, 10% glycerol, 0.02% bromophenol blue, 0.77 M β-mercaptoethanol) and boiling 5 min. Electrophoresis was carry out with a constant

voltage (200 V) using electrophoresis buffer (50 mM Tris, 0.38 M glycine, 0.1% (w/v) SDS). Proteins were transferred to PVDF membranes Immobilon-P (*Millipore*) previously activated during 15 sec in methanol, in a Trans-Blot Semidry Transfer Cell (*BioRad*). For transfer, three different buffers were used: anode buffer I (0.3 M Tris pH 10.4, 10% (v/v) methanol), anode buffer II (25 mM Tris pH 10.4, 10% (v/v) methanol) and cathode buffer (25 mM Tris pH 9.4, 10% (v/v) methanol, 40 mM glycine). To assemble the transfer stack for a semidry system, three sheets of filter paper wet on anode buffer I and two sheets of filter paper wet on anode buffer II were put on the anode of transfer system. Over them, PVDF membrane and electrophoresis gel were assembled and three sheets of filter paper wet on cathode buffer. Transfer was carried out with 2.5 mA/cm² of gel during 45 minutes. Membranes were stained with Ponceau red (0.5% (w/v) Ponceau red, 1% (v/v) glacial acetic acid) to visualize the transferred proteins.

For western-blot analysis membranes were blocked with 5% (w/v) skimmed milk powder diluted in PBST (PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄) with 0.05% (v/v) Tween20) during 30-40 min at room temperature or overnight at 4°C. Then, membranes were incubated with primary antibody (concentration depending of antibody: see table M1) diluted in 2% (w/v) skimmed milk powder/PBST during 90 min and washed three times, 10 minutes each, with the same solution without antibody. Then, membranes were incubated with secondary antibody (peroxidase conjugates) diluted in PBST during 30 min and washed three times, 10 minutes each, with PBST. Proteins were detected by using the ECL-prime kit (*Amersham*) according to manufacturer's instructions and Amersham Hyperfilm ECL sheets.

2.4.4 Chromatin isolation and analysis of associated proteins

Chromatin was isolated as previously described (Liang and Stillman, 1997) with some modifications. Briefly, about 5·10⁸ exponentially growing cells (O.D₆₀₀ 0.6 to 0.8) were resuspended in 3 ml of 100 mM PIPES [piperazine-*N,N*-bis(2 ethanesulfonic acid)]-KOH pH 9.4 containing 10 mM dithiothreitol (DTT) and 0.1% sodium azide and were then incubated at room temperature for 10 min. Cells were spun down during 2 minutes at 2000 rpm at room temperature, resuspended in 2 ml

of 50 mM phosphate buffer pH 7.5 containing 0.6 M sorbitol, 10 mM DTT, and 4 μ l of 20 mg/ml Zymolyase, and incubated 10 min at 37°C in a water bath until spheroplasts formation. Spheroplasts were then pelleted at 800 rpm and 4°C during 5 minutes, washed with 50 mM HEPES-KOH buffer (pH 7.5) containing 100 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, and 0.4 M sorbitol, resuspended in an equal volume (~80 μ l) of EBX buffer (50 mM HEPES-KOH pH 7.5, 100 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.25% (v/v) Triton X-100, 0.5 mM PMSF, 0.5 mM DTT, and 1x protease inhibitor cocktail (Complete; Roche)), and incubated for 3 min on ice. This whole-cell extract was laid onto 400 μ l of EBX-S buffer (EBX with 30% sucrose) and was spun at 12.000 rpm for 10 min at 4°C. After the sucrose gradient, a chromatin pellet became visible; supernatant was discarded and pellet was washed with 400 μ l of EBX buffer and finally resuspended in 100 μ l of the same solution. A 1/10 dilution of the chromatin pellet was used for SDS-PAGE and Western-blotting.

2.4.5 mRNA isolation and analysis of associated proteins

Cells were grown in 500 ml of SD media (with requirements) until reaching an OD₆₀₀ of 0.6-0.8, harvested by centrifugation at 4000 rpm during 5 minutes at room temperature, resuspended in 25 ml PBS supplemented with 0.005% (v/v) NP-40 and incubated at room temperature for 30 minutes. Then, cells were transferred to a 75 ml plate and exposed to 1,2 mJ/cm² of 254 nm UV light in 3 cycles of 3 minutes, with 3 min break between each step (on ice). This step produced the crosslinking between the proteins and RNA. Then, cells were harvested by centrifugation at 4000 rpm during 5 minutes at 4°C and resuspended in 400 μ l lysis buffer (10 mM Tris pH 7.4, 600 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.2% SDS, 2 mM DTT, 1x protease inhibitor cocktail (Complete; Roche)). After addition of 300 μ l glass beads (425-600 μ m, Sigma), cells were broken by vortexing during 15 min at 4°C using the highest power. Lysate was clarified by 15 min centrifugation at 14000 rpm and 4°C.

Lysate was used with the Absolutely mRNA purification kit (Agilent Technologies) using the manufacturer's instruction with some modifications. Briefly, 200 μ l of particles were washed twice with 200 μ l of hybridization buffer and resuspended in 200 μ l of the same solution. Lysate was added (20 μ l of lysate were kept as control in the western-blot) to the particles and mixture was incubated during 20 min at room temperature with gentle agitation. Magnetic particles were

collected and washed 4 times with 200 μ l of washing buffer. Elution was carried out by addition of 100 μ l of elution buffer and 5 min incubation at room temperature. Then, 20 μ l were kept for mRNA quantification, gel electrophoresis and retrotranscription; rest was precipitated with TCA (trichloroacetic acid)-acetone to concentrate the proteins and resuspended in 20 μ l H₂O. Hybridization, washing and elution buffer were provided in the kit.

2.4.6 Protein TCA-Acetone purification

To concentrate proteins, 100% TCA was added to the samples to get a final concentration of 10% TCA, and mixture was incubated on ice during 30 min. Then, samples were centrifuged 15 min at 4°C and 14000 rpm. Pellet was washed with cold acetone twice, centrifuged in the same conditions and dried at 60°C during some minutes. Finally, pellet of precipitated proteins was resuspended in sample buffer and boiled during 5 min for SDS-PAGE and/or western-blot.

2.4.7 GLAM assay (gene length-dependent accumulation of mRNA)

GLAM assay is a measure of the mRNA biogenesis efficiency *in vivo*, using an assay of acid phosphatase activity. This method allows the analysis of the efficiency of transcription of transcriptional units with different lengths fused to the *PHO5* gene of *S. cerevisiae* (encoding the acid phosphatase enzyme), that have the same promoter and terminator (Morillo-Huesca et al., 2006) (Figure M2).

The assay use a short transcriptional unit ($P_{GAL1}::PHO5$) and two different long transcription units: the one containing *E. coli lacZ* ($P_{GAL1}::PHO5-lacZ$) and the other containing *Kluyveromyces lactis LAC4* ($P_{GAL1}::PHO5-LAC4$). These two genes share the same length, but display different G + C content. In addition, their chromatin structure in *S. cerevisiae* is also completely different: random nucleosome positioning in *lacZ* but transcriptionally positioned nucleosomes in *LAC4*.

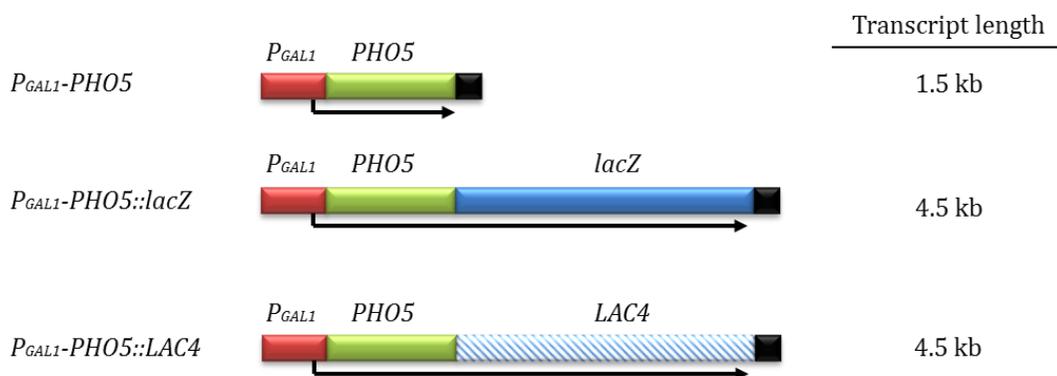


Figure M2: Transcriptional units used in GLAM assay (adapted from Morillo-Huesca et al, 2006).

The GLAM ratios were calculated as ratio of acid phosphatase activity of the long transcription unit compared to the short one, giving a value for the mRNA biogenesis efficiency.

The GLAM ratios were calculated for the two different long transcription units. Similar GLAM ratios with both long transcription units would indicate a gene length-dependent effect, whereas differences between the GLAM ratios calculated with each long transcript might involve sequence-dependent or chromatin-dependent phenomena.

To perform the assay, yeast strains were transformed with plasmid containing the different transcription units or an empty vector to analyze the endogenous *PHO5* expression. Cells were cultured in 5 ml of SD-galactose media without uracil at 30°C with agitation. When culture reached an O.D₆₀₀ 0.4-0.6, cells were harvested by centrifugation during 5 minutes at 2500 rpm at 4°C, the supernatant was discarded and the pellet was used for the enzymatic activity assay.

Then, cells were resuspended in 1.5 ml of miliQ H₂O and used to measure O.D₆₀₀ or to analyze Pho5 activity. For this purpose, 30 µl cells were diluted adding 70 µl of miliQ H₂O. Reaction started adding 50 µl of 5 mg/ml pNPP (4 Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate) and incubating during 10 min at 37°C. To stop the reaction, 120 µl of 25% TCA (trichloroacetic acid) was added and then, addition of

600 µl of saturated Na₂CO₃ was used (yellow colour appears as a consequence of Pho5 activity). Reaction optical density at 405 nm was measured.

GLAM ratio was calculated as follows (Figure M3).

$$\text{GLAM Ratio} = \frac{\text{O.D.}_{405} \times 0.066}{\text{O.D.}_{600} \times \text{Reaction time (min)} \times \text{Volume of cell used (ml)}}$$

Figure M3: GLAM ratio calculation. 0,066 is a correction factor.

2.5 MICROSCOPIC METHODS

2.5.1 Immunolocalization

Immunolocalization was performed as previously described (Miron-Garcia et al., 2013 with some modifications). Cells were grown at 30°C in SD medium (O.D₆₀₀ 0.5-0.7), fixed with 37% (w/v) formaldehyde at room temperature for 2 h with slow shaking, and then centrifuged at 2000 rpm during 5 minutes at room temperature and washed twice with phosphate-buffered saline (PBS). Cells were resuspended in spheroplasting buffer (1.2 M sorbitol, 0.1 M K-phosphate buffer pH 6.5), and the cell wall was digested with 125 µg /ml Zymolyase 20T (*US Biological*) and 22.7 mM 2-mercaptoethanol (*Sigma*) by incubation for 1 h at 37°C without shaking. The spheroplasts were washed twice with PBST (PBS with 0.05% (v/v) Tween 20) and were then resuspended in the same solution. The cell suspension was added to an 3-aminopropyltriethoxysilane (AAS; *Sigma*) slide, incubated at room temperature until the slide was dry, and washed twice with PBST. Then 50 µl of PBS-bovine serum albumin (BSA; 1 mg/ml) was added. After incubation for 30 min in a humid chamber, slides were washed three times with PBS. Next, 50 µl of a 1:100 dilution of the primary antibody in PBS-BSA was added, and the slides were incubated for 2 h at room temperature (or overnight at 4°C) in a humid chamber. The slides were then washed three times with PBS and were incubated for 1 h in the dark at room temperature in a humid chamber with 50 µl of a 1:100 dilution of the secondary antibody (Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG [H&L], *Invitrogen*). The slides were washed three times with PBS and incubated for 5 min with 50 µl of 1-

$\mu\text{g/ml}$ 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (in PBS). After three washes with PBS, the slides were finally covered with Vectashield (*Vector Laboratories*) mounting solution. Fluorescence intensity was scored with a fluorescence microscope (*Olympus BX51*).

2.5.2 *In vivo* fluorescence microscopy

For p-bodies accumulation strains were transformed with the centromeric pDCP2-GFP plasmid expressing a Dcp2-gfp fusion protein (Bregues and Parker, 2007). For Rpb4 localization, strains were transformed with the centromeric vector expressing a Gfp-Rpb4 fusion protein ((Lotan et al., 2005)). Cells were grown at 30°C in SD medium with requirements (O.D₆₀₀ 0.5-0.7). To observe the nuclei of the cells a DAPI staining (1.25 $\mu\text{g / ml}$ in PBS) was performed for 5 minutes. The fluorescence intensity was scored with a fluorescence microscope (*Olympus BX51*).

Supplementary Table 1: *Escherichia coli* strains

<i>E. coli</i> strain	Genetic features	Reference
XL-1Blue	F' ::Tn10 proA ⁺ B ⁺ lacI ^q Δ(lacZ)M15/ recA1 endA1 gyrA96 (Nal ^R) thi hsdR17 (rK- mK ⁺) glnV44 relA1 lac	(Bullock, 1987)
GM2163	F- araC14, leuB6(Am), fhuA13, lacY1, tsx-78, glnV44(AS), galk2(Oc), galT22, λ, mcrA0, dcm-6, hisG4(Oc), rfbC1, rpsL136(strR), dam-13::Tn9, xylA5, mtl-1, thiE1, mcrB9999, hsdR2	(Woodcock et al., 1989)
MC1066	K-12 leuB6 A(lacIPOZY)X74 trpC9830 pyrF74::Tn5 (Kmi) strA	(Martinez-Arias and Casadaban, 1983)

Supplementary Table 2: *Saccharomyces cerevisiae* strains

Strain	Genotype	Origin
<i>abd1-5</i> strain	<i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3 ura3-1 trp1-1 abd1::hisG abd1-5-TRP1</i>	(Schroeder et al., 2000)
<i>abd1-8</i> strain	<i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3 ura3-1 trp1-1 abd1::hisG abd1-8-TRP1</i>	(Schroeder et al., 2000)
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Euroscarf
CS41-4.3	<i>MATα ura3-52 leu2-3 his3-11 trp1-1 ade2-1 bur6::HIS3 + pbur6-ts (CEN LEU2)</i>	Gift from D. Reinberg
D439-4d	<i>MATα ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ63 rpb1-1</i>	Gift from P. Thuriaux
FW1808	<i>MATα rsp5-1 his4912d lys2-128d ura3-52</i>	(Huibregtse et al., 1997)
GR21-2d	<i>MATα ura3-52 his3Δ200 leu2-3,112 trp1Δ63 rpb1-Δ187::HIS3 + pFL44-RPB1 (2μm URA3 RPB1)</i>	(Garcia-Lopez et al., 2010)
GY236	<i>MATα ura3-52 leu2D1 his 4-912d lys2-128d mot1-301</i>	(Prelich and Winston, 1993)
LMY3.1	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 trp1(YDR007w)::kanMX4; RPB4::Myc18-TRP1</i>	Gift from S. Chávez
MGSC102	<i>MATα ura3-1 trp1-1 ade2-1 leu2-3,112 his3-11,15 rad26Δ::HIS3</i>	(van Gool et al., 1994)
PAY586	<i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 PUB1::TAP::HIS</i>	Gift from P. Alepuz
<i>RPB2</i> :TAP strain	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 RPB2 ::TAP ::HIS3Mx6</i>	Open Biosystems
<i>RPB3</i> :TAP strain	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 RPB3 ::TAP ::HIS3Mx6</i>	Open Biosystems
<i>RPB6</i> :MYC strain	<i>MATα ura3-52 his3-Δ200 ade2-101uaa trp1-Δ63 lys2-801uag leu2-Δ1 RPB6 ::13MYC::kanMX</i>	Gift from M.Werner
<i>RTR1</i> :TAP strain	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 RTR1::TAP::HIS3MX6</i>	Open Biosystems
SNY103	<i>MATα can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 rpb6Δ::LEU2 + pSN266 (TRP1 CEN6 ARS1 rpb6-31)</i>	(Nouraini et al., 1996)
Srb4-HA strain	<i>MATa ura3-Δ0 his3-Δ1 leu2-Δ0 lys2-Δ0 SRB4:3HA::his3Mx6</i>	Gift from B. Guglielmi
Ssu72-13MYC strain	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 SSU72-13MYC::HIS</i>	Gift from O. Calvo
W303	<i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1</i>	(Fan et al., 1996)

Materials and Methods

	<i>ura3-1</i>	
Y00387	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YAL021c (ccr4Δ)::kanMX4</i>	Euroscarf
Y04279	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YDR443c (srb9Δ)::kanMX4</i>	Euroscarf
Y02786	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YPL042c (srb10Δ)::kanMX4</i>	Euroscarf
Y04411	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YGL043w (dst1Δ)::kanMX4</i>	Euroscarf
Y04633	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YGR003w (cul3Δ)::kanMX4</i>	Euroscarf
Y07028	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YKL139w (ctk1Δ)::kanMX4</i>	Euroscarf (Gift from O. Calvo)
Y02666	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YLR055c (spt8)::kanMX4</i>	Euroscarf
Y15510	<i>MATα his3Δ1 l leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 YPR093c (asr1Δ)::kanMX4</i>	Euroscarf
Y17005	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 YJL140w (rpb4Δ)::kanMX4</i>	Euroscarf
Y223	<i>MATa pep4::HIS3/prb1::LEU2 prc1::HISG can1 ade2 trp1 ura3 his3 leu2-3,112 RPB4::TAP::TRP1</i>	Gift from M. Choder
Y23805	<i>MATa/α his3Δ1/ his3Δ1 leu2Δ0/ leu2Δ0 lys2Δ0/LYS2 MET15/ met15Δ0 ura3Δ0/ ura3Δ0 YDL108w (kin28Δ)::kanMX4/YDL108w</i>	Euroscarf
Y23838	<i>MATa/α his3Δ1/ his3Δ1 leu2Δ0/ leu2Δ0 lys2Δ0/LYS2 MET15/ met15Δ0 ura3Δ0/ ura3Δ0 YDL140c (rpb1Δ)::kanMX4/YDL140c</i>	Euroscarf
Y25491	<i>MATa/α his3Δ1/ his3Δ1 leu2Δ0/ leu2Δ0 lys2Δ0/LYS2 MET15/ met15Δ0 ura3Δ0/ ura3Δ0 YPR072w (not5Δ)::kanMX4/YPR072w</i>	Euroscarf
Y26137	<i>MATa/α his3Δ1/ his3Δ1 leu2Δ0/ leu2Δ0 lys2Δ0/LYS2 MET15/ met15Δ0 ura3Δ0/ ura3Δ0 YER139c (rtr1 Δ)::kanMX4/YER139c</i>	Euroscarf
Y26145	<i>MATa/α his3Δ1/ his3Δ1 leu2Δ0/ leu2Δ0 lys2Δ0/LYS2 MET15/ met15Δ0 ura3Δ0/ ura3Δ0 YER148w (spt15Δ)::kanMX4/YER148w</i>	Euroscarf
YLK25	<i>MATa leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 3xHA TBP Mot1-Myc9-KLTRP1</i>	(Geisberg et al., 2001)

YFN116	<i>MATα ura3-52 his3Δ200 leu2-3,112 trp1Δ63 rpb1-Δ187::HIS3 + pYEB220 (2μm LEU2 RPB1)</i>	This work (plasmid shuffling in GR21-2d)
YFN117	<i>MATα ura3-52 his3Δ200 leu2-3,112 trp1Δ63 rpb1-Δ187::HIS3 + pYEB220-rpo21-4 (2μm LEU2 RPB1)</i>	This work (plasmid shuffling in GR21-2d)
YFN104	<i>MATα ura3-52 his3Δ200 leu2-3,112 trp1Δ63 rpb1-Δ187::HIS3 + pYEB220-rpb1-84 (2μm LEU2 RPB1)</i>	This work (plasmid shuffling in GR21-2d)
YFN105	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 trp1-Δ63 YFL023W(bud27Δ)::kanMX4</i>	(Miron-Garcia et al., 2013)
YFN161	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 YER139c(rtr1Δ)::kanMX4</i>	From Y26137 diploid Euroscarf
YFN166	<i>MATα his3Δ1 leu2-3,112 trp1Δ63 ura3Δ0 rtr1Δ::kanMX4 rpb1-Δ187::HIS3 + pFL44-RPB1 (2mm URA3 RPB1)</i>	This work (GR21-2d x YFN161)
YFN167	<i>MATα his3Δ200 leu2Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0 rpb1-Δ187::HIS3 + pFL44-RPB1 (2μm URA3 RPB1)</i>	This work (GR21-2d x BY4741)
YFN183	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 rpb6Δ::kanMX4 + PFL44L-Rpb6 (2μm URA3)</i>	From Y25602 diploid. Euroscarf
YFN184	<i>MATα his3Δ200 leu2-3,112 met15Δ0 trp1Δ63 ura3-52 srb9Δ::kanMX4 rpb1-Δ187::HIS3 + pFL44-RPB1 (2μm URA3 RPB1)</i>	This work (GR21-2d x Y04279)
YFN191	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0 rpb4Δ::kanMX4 rpb1-Δ187::HIS3 + pFL44-RPB1 (2μm URA3 RPB1)</i>	This work (YFN167 x Y17005)
YFN193	<i>MATα his3Δ200 leu2Δ0 met15Δ0 ura3-52 spt8Δ::KanMx4 rpb1-Δ187::HIS3 + pFL44-RPB1 (2mm URA3 RPB1)</i>	This work (GR21-2d x Y02666)
YFN207	<i>MATα ade2-101 his3Δ200 leu2Δ0 met15Δ0 trp1Δ63 ura3-52 rpb1-Δ187::HIS3 + pFL44-RPB1 (2mm URA3 RPB1) RPB6::13MYC::kanMX</i>	This work (YFN167 x Rpb6:Myc)
YFN218	<i>MATα ade2-1 his3Δ1 leu2Δ0 trp1-1 ura3Δ0 rpb6Δ::KanMX4 + pSN266 (TRP1 CEN6 ARS1 rpb6-31)</i>	This work (YFN183 x w303. Transformed with pSN266 plasmid from SNY103 strain)
YFN219	<i>MATα ura3-52 leu2-3 his3-11 trp1-1 ade2-1 bur6::HIS (p_{gen}-bur6-ts TRP1 2mm)</i>	This work (YMH202 + p _{gen} -bu6-ts)
YFN220	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 trp1Δ63 ura3-52 RPB4::Myc18-TRP1 rpb1-Δ187::HIS3 + pFL44-RPB1 (2μm URA3 RPB1)</i>	This work (GR21-2d x LMY3.1)
YFN221	<i>MATα ade2-1 his3Δ200 leu2Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0</i>	This work (GR21-2d x

Materials and Methods

	<i>rpb6Δ::KanMX4 + pSN266 (TRP1 CEN6 ARS1 rpb6-31) rpb1-Δ187::HIS3 + pFL44-RPB1 (2μm URA3 RPB1)</i>	YFN218)
YFN234	<i>MATα ura3-52 his3Δ200 leu2-3,112 trp1Δ63 rpb1Δ::KanMX4 + pFL44-RPB1 (2μm URA3 RPB1)</i>	This work
YFN236	<i>MATα ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 rpb1-Δ187:: HIS3 + pFL44-RPB1 (2μm URA3 RPB1) ceg1-250</i>	This work (GR21-2d x YSB517)
YFN237	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0 RPB2::TAP::HIS3Mx6 rpb1-Δ187:: HIS3 + pFL44-RPB1 (2μm URA3 RPB1)</i>	This work (GR21-2d x RPB2:TAP)
YFN247	<i>MATα his3Δ200 leu2Δ0 trp1Δ63 ura3-52 rpb1Δ:: kanMX4 + pFL44-RPB1 (2mm URA3 RPB1)</i>	This work (YFN234 x BY4741)
YFN249	<i>MATα his3Δ200 leu2-3,112 trp1Δ63 ura3Δ0 ctk1Δ::kanMX4 rpb1-Δ187::HIS3 + pFL44-RPB1 (2mm URA3 RPB1)</i>	This work (GR21-2d x Y07028)
YFN250	<i>MATα ade2-1 his3Δ200 leu2-3,112 trp1Δ63 ura3-52 abd1::hisG abd1-8-TRP1 rpb1Δ::KanMX4 + pFL44-RPB1 (2μm URA3 RPB1)</i>	This work (YFN234 x abd1-8)
YFN251	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 trp1Δ63 ura3-52 abd1::hisG abd1-5-TRP1 rpb1Δ::KanMX4 + pFL44-RPB1 (2μm URA3 RPB1)</i>	This work (YFN234 x abd1-5)
YFN271	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0 RPB3::TAP::HIS3Mx6 rpb1Δ:: KanMX4 + PFL44L-RPB1 (2μm URA3 RPB1)</i>	This work (YFN234 x RPB3:TAP)
YFN287	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 trp1Δ63 ura3-52 RPB4::Myc18-Trp1 RPB6::HA::KanMX6 rpb1-Δ187::HIS3 + pFL44-RPB1 (2 mm URA3 RPB1)</i>	This work
YFN304	<i>MATα his3-Δ200 leu2Δ0 trp1-Δ63 ura3-52 bud27Δ::KanMX4 rpb1-Δ187::HIS3 + pFL44-RPB1 (2mm URA3 RPB1)</i>	This work (GR21-2d x YFN105)
YFN307	<i>MATα ade2-101 his3Δ200 leu2Δ1 lys2-801 trp1Δ63 ura3-52 RPB3-HA::KanMX4 rpb1-Δ187::HIS3 + pFL44-RPB1 (2μm URA3 RPB1)</i>	This work (GR21.2d x YVV50-4c)
YFN332	<i>MATα his3Δ200 leu2-3,112 trp1Δ63 ura3-52 RTR1::TAP::HIS3MX6 rpb1Δ:: KanMX4 + pFL44-RPB1 (2mm URA3 RPB1)</i>	This work (YFN234 x RTR1::TAP)
YFN339	<i>MATα ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 rpb1-Δ187::HIS3 + pFL44-RPB1 (2μm URA3 RPB1)</i>	This work (GR21-2d x YLK25)

	<i>3xHATBP Mot1-Myc9-KLTRP1</i>	
YFN342	<i>MATα ura3-52 his3Δ200 leu2-3,112 trp1Δ63 rpb1-Δ187::HIS3 + pFL44-RPB1 (2μm URA3 RPB1) srb10::KanMX4</i>	This work
YFN358	<i>MATα ura3-52 his3Δ200 leu2-3,112 trp1Δ63 asr1Δ::kanMX4 rpb1-Δ187::HIS3 + pFL44-RPB1 (2μm URA3 RPB1)</i>	This work
YFN428	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0 rpb4Δ::kanMX4 rpb1-Δ187::his3::TRP1 + pFL44-RPB1 (2μm URA3 RPB1)</i>	This work
YFN438	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 ura3-52 met15Δ0 trp1Δ63 dst1Δ::KanMX4 rpb1-Δ187::HIS3 + pFL44-RPB1 (2μm URA3 RPB1)</i>	This work (GR21-2d x Y04411)
YFN441	<i>MATα ura3-52 leu2Δ0 his3Δ200 trp1-1 ade2-1 bur6::HIS (p_{gen-bur6-ts} TRP 2micras) rpb1-Δ187:: kanMX4 + pFL44-RPB1 (2mm URA3 RPB1)</i>	This work (YFN247 x YFN219)
YFN442	<i>MATα ura3Δ0 his3* leu22-3,112 met15Δ0 trp1-Δ63 rpb1Δ::KanMX4 + pFL44-RPB1 (2mm URA3 RPB1) SSU72-13MYC::HIS</i>	This work (YFN234 x Ssu72-13MYC)
YFN451	<i>MATα ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 rpb1-Δ187::HIS3 + pFL44-RPB1 (2mm URA3 RPB1) not5Δ::KanMX4</i>	This work
YFN452	<i>MATα ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 rpb1-Δ187::HIS3 + pFL44-RPB1 (2mm URA3 RPB1) ccr4Δ::KanMX4</i>	This work
YFN453	<i>MATα ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 rpb1Δ::KanMX4 + pFL44-RPB1 (2mm URA3 RPB1) rad26Δ::HIS3</i>	This work
YFN454	<i>MATα ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 rpb1Δ::KanMX4 + pFL44-RPB1 (2mm URA3 RPB1) SRB4::HA::HIS3</i>	This work
YFN467	<i>MATα ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 rpb1-Δ187::HIS3 + pFL44-RPB1 (2mm URA3 RPB1) pGAL::HSP26::KANMX6</i>	This work
YFN469	<i>MATα ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 rpb1-Δ187::HIS3 + pFL44-RPB1 (2mm URA3 RPB1) pGAL::HSP26::KANMX6 pGAL::HSP12::TRP1</i>	This work
YFN471	<i>MATα his3Δ1 leu2-3,112 trp1Δ63 ura3Δ0</i>	This work

Materials and Methods

	<i>rtr1Δ::kanMX4 rpb1-Δ187::TRP + pFL44-RPB1 (2mm URA3 RPB1)</i>	
YFN472	<i>MATα ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 rpb1-Δ187::HIS3 + pFL44-RPB1 (2mm URA3 RPB1) cul3Δ::KanMX4</i>	This work
YFN473	<i>MATα ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 Lys2-801 rpb1-Δ187::HIS3 + pFL44-RPB1 (2mm URA3 RPB1) spt15::KanMX4 (pYCI spt15-601 TRP CEN)</i>	This work
YFN474	<i>MATα ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 lys2-Δ201 ade2 rpb9-Δ1::HIS3 trp1-Δ63 rpb1Δ::KanMX4 + pFL44-RPB1 (2mm URA3 RPB1)</i>	This work (YFN247 x Yvv9)
YFN475	<i>MATα ura3-52 leu2Δ0 lys2-128d trp1Δ63 mot1-301 rpb1-Δ187::kanMX4 + pFL44-RPB1 (2mm URA3 RPB1)</i>	This work (YFN247 x GY236)
YFN486	<i>MATα ura3-52 his3Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 lys2-128d rpb1Δ::kanMX4 + pFL44-RPB1 (2mm URA3 RPB1) rsp5-1</i>	This work (YFN247 x FW1808)
YFN501	<i>MATα ura3-52 his3-Δ200 leu2Δ1 trp1-Δ63 ade2-101 rpb1-Δ187::HIS3 + pFL44-RPB1 (2mm URA3 RPB1) YDL108w (kin28)::kanMX4 + pRS314-hakin28 (T162A)</i>	This work
YFN502	<i>MATα ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 rpb1Δ::KanMX4 + pFL44-RPB1 (2mm URA3 RPB1) PUB1::TAP::HIS</i>	This work
YFN518	<i>MATα ura3-52 his3Δ200 leu2-3,112 trp1Δ63 RPB4::TAP::TRP rpb1-Δ187::HIS3 + pYEB220 (2μm LEU2 RPB1)</i>	This work
YFN519	<i>MATα ura3-52 his3Δ200 leu2-3,112 trp1Δ63 RPB4::TAP::TRP rpb1-Δ187::HIS3 + pYEB220-rpb1-84 (2μm LEU2 RPB1)</i>	This work
YMH202	<i>MATα ura3-52 leu2-3 his3-11 trp1-1 ade2-1 bur6::HIS3 (pBur6 URA3 CEN)</i>	D. Reinberg
Yvv9	<i>MATα ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 lys2-Δ201 ade2 trp1-Δ63 rpb9-Δ1::HIS3</i>	(Van Mullem et al., 2002)
YSB517	<i>MATα his3-11,15 leu2,3-112 ura3-1 trp1-1 can1-100 ade3::hisG ade2-1 ceg1-250</i>	(Cho et al., 1997)
YSB595	<i>MATα ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11,15 ade2-1 ade3-22 can1-100 kin28Δ::LEU2 + pRS314-hakin28 (T162A)</i>	(Rodriguez et al., 2000)

YVV50-4c	<i>MATa ade2-101 ura3-52 lys2-801 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 Rpb3-HA::KanMX4</i>	(Van Mullem et al., 2002)
Z102	<i>MATα ura3-52 his3Δ200 leu2-3,112 rpb2Δ297::HIS3 /CEN LEU2 rpb2-6 (rpb2-R857K)</i>	(Scafe et al., 1990)
Z318	<i>MATα ura3-52 his3Δ200 leu2-3,112 rpb1Δ187::HIS3 GAL+ (LEU2 CEN rpb1-19)</i>	(Scafe et al., 1990)

Supplementary Table 3: Plasmids used in this study.

Plasmid	Features	Origin
pCM185	ORI (CEN) <i>TRP1</i>	(Gari et al., 1997)
pCM185- <i>RPB6</i>	ORI (CEN) <i>TRP1</i>	This work
pCM185- <i>CEG1</i>	ORI (CEN) <i>TRP1</i>	This work
pCM189	ORI (CEN) <i>URA3</i>	(Gari et al., 1997)
pCM189- <i>RPB6</i>	ORI (CEN) <i>URA3</i>	This work
pCM190	ORI (2 μ m) <i>URA3</i>	(Gari et al., 1997)
pCM190- <i>RPB4</i>	ORI (2 μ m) <i>URA3</i>	This work
pCM190- <i>RPB6</i>	ORI (2 μ m) <i>URA3</i>	This work
pCM190- <i>CEG1</i>	ORI (2 μ m) <i>URA3</i>	This work
pCM190- <i>TBP</i>	ORI (2 μ m) <i>URA3</i>	This work
pDCP2-GFP	ORI (CEN) <i>URA3</i>	(Bregues and Parker, 2007)
pFA6a-3HA-KanMX6	Yeast genomic targeting (<i>AMP</i>)	(Longtine et al., 1998)
pFA6a-KanMX6-pGAL1	Yeast genomic targeting (<i>AMP</i>)	(Longtine et al., 1998)
pFA6a- <i>TRP1</i> -pGAL1	Yeast genomic targeting (<i>AMP</i>)	(Longtine et al., 1998)
pFL44L	ORI (2 μ m) <i>URA3</i>	(Bonneaud et al., 1991)
pFL44L- <i>RPB1</i>	ORI (2 μ m) <i>URA3</i>	(Garcia-Lopez et al., 2010)
pFL44L- <i>RPB6</i>	ORI (2 μ m) <i>URA3</i>	This work
pFL44L- <i>RTR1</i>	ORI (2 μ m) <i>URA3</i>	This work
pGAL:: <i>FCP1</i>	<i>URA3</i>	Gift from Olga Calvo
pGAL:: <i>SRB10</i>	<i>URA3</i>	Gift from Olga Calvo
pGEN	ORI (2 μ m) <i>TRP1</i>	(Shpakovski et al., 1995)
pGEN- <i>bur6-ts</i>	ORI (2 μ m) <i>TRP1</i>	This work
pGEN- <i>RPB7</i>	ORI (2 μ m) <i>TRP1</i>	(Zaros and Thuriaux, 2005)
pGENU- <i>SUA7</i>	ORI (2 μ m) <i>URA3</i>	Gift from Pierre Thuriaux
pGEM-T	pGEM-T Vector System I	<i>PROMEGA</i>
pHT6	Yeast genomic targeting (<i>KAN</i>)	(Cross, 1997)
pM647 [pRS423- <i>SSU72</i>]	ORI (2 μ m) <i>HIS3</i>	(Krishnamurthy et al., 2009)
pMAC81 [<i>MOT1</i>]	ORI (2 μ m) <i>URA3</i>	Gift from M. Collart
pMK86 [pRS316- <i>FCP1</i>]	ORI (CEN) <i>URA3</i>	(Kobor et al., 1999)
pML27 [pRS416- <i>NC2</i>]	ORI (CEN) <i>URA3</i>	Gift from M. Collart
pRS313- <i>GFP-RPB4</i>	ORI (CEN) <i>HIS3</i>	(Lotan et al., 2005)
pRS314- <i>hakin28</i> (<i>T162A</i>)	ORI (CEN) <i>TRP1</i>	(Rodriguez et al., 2000)
pRS316	ORI (CEN) <i>URA3</i>	(Sikorski and Hieter, 1989)

pRS316- <i>DEF1</i>	ORI (CEN) <i>URA3</i>	Gift from Helene Gaillard
pSL15-Sc (<i>RPB4</i>)	ORI (2 μ m) <i>TRP1</i>	Gift from Pierre Thuriaux
pVV200- <i>SRB9</i>	ORI (2 μ m) <i>TRP1</i>	Gift from Pierre Thuriaux
pVV200-Med17	ORI (2 μ m) <i>TRP1</i>	Gift from Michel Werner
pVV208- <i>SPT8</i>	ORI (CEN) <i>URA3</i>	Gift from Vicent Van Mullem
pVV214	ORI (2 μ m) <i>URA3</i>	(Van Mullem et al., 2003)
pVV214- <i>DST1</i>	ORI (2 μ m) <i>URA3</i>	Gift from Pierre Thuriaux
pYCI- <i>spt15-601</i>	ORI (CEN) <i>TRP1</i>	(Cang et al., 1999)
YCplac33	YCp vector based on the <i>URA3</i> gene	(Morillo-Huesca et al., 2006)
pSch202	pRS416 containing the <i>PHO5</i> region fused to the <i>GAL1</i> promoter	(Morillo-Huesca et al., 2006)
pSch212	pSch202 with <i>lacZ</i> transcriptionally fused to the 3'-end UTR of <i>PHO5</i>	(Morillo-Huesca et al., 2006)
PSch209Lac4	pSch202 with <i>K. lactis LAC4</i> transcriptionally fused to the 3'-end UTR of <i>PHO5</i>	(Morillo-Huesca et al., 2006)
pYEB220	ORI (2 μ m) <i>LEU2</i>	Gift from Pierre Thuriaux
pYEB220- <i>rpo21-4</i>	ORI (2 μ m) <i>LEU2</i>	This work
pYEB220-84	ORI (2 μ m) <i>LEU2</i>	This work

Supplementary Table 4: Primers used.

Primer	Sequence	Region
Primers for qRT-PCR		
5S-501	GCGGCCATATCTACCAGAAA	ORF
5S-301	CTGAGTTTCGCGTATGGTCA	ORF
18S-501	CATGGCCGTTCTTAGTTGGT	ORF
18S-301	ATTGCCTCAAACCTCCATCG	ORF
ACT1-501	GCCTTCTACGTTTCCATCCA	ORF
ACT1-301	GGCCAAATCGATTCTCAAAA	ORF
CIT2-501	AGATGGCAAAAATGGGTGAAG	ORF
CIT2-301	GATTAGCAGGCCCATGAAGT	ORF
CIT2-502	AAAAGGGCCATTATTCTCG	Promoter region
CIT2-303	CTTAATAATGAGGAACGAACACCA	Promoter region
GAL1-501	TGGTGTTAACAATGGCGGTA	ORF
GAL1-301	GGGCGTTTCAAACCTTGTTA	ORF
HSP12-503	GAATCTTTGGCAGACCAAGC	ORF
HSP12-301	TTGGTTGGGTCTTCTTCACC	ORF
HSP12p-503	CCTGGAAAATCGTTTGGTCA	Promoter region
HSP12p-304	ACGCAATTCACCGTCCTATT	Promoter region
HSP26-503	AAGACAAGGTCAAGGTCAAGGA	ORF
HSP26-301	TGTTGTCTGCATCCACACCT	ORF
HSP26p-503	CAACGGTTCTTTTTACCCCTTA	Promoter region
HSP26p-304	AGAGAGTAGAATGAAAGGTGAATGG	Promoter region
HSP104-502	TCGTGGATATTCGTTTGAAGG	ORF
HSP104-302	GAAGTCCTTGGCCTCTTGAGT	ORF
HSP104p-501	ACCCTTGAATCGAATCAGCA	Promoter region
HSP104p-301	AATTGCGTTTGGTCGTTTCAT	Promoter region
IntergChrV-F	TGTTCCTTTTAAGAGGTGATGGTGAT	Intergenic region
IntergChrV-R	TGTTCCTTTTAAGAGGTGATGGTGAT	Intergenic region
MF α 2-501	CTACCGCCAGTGGGCTATT	ORF
MF α 2-301	CTACCGCCAGTGGGCTATT	ORF
PMA1p-503	AAAGGCCAAATATTGTATTATTTCAA	Promoter region
PMA1p-302	TTGGTGTTATAGGAAAGAAAGAGAAAA	Promoter region
PMA1-6 (forw)	ATATTGTTACTGTGTCGTCCTGTCTGGAT	ORF
PMA1-6 (rev)	ATTAGGTTTCTTTTCGTGTTGAGTAGA	ORF
PYK1p-502	ACAAGACACCAATCAAAACAAA	Promoter region
PYK1p-301	AGTCAGAACCAGCAACAACG	Promoter region

<i>PYK1-4</i> (forw)	CTATGGCTGAAACCGCTGTCATTG	ORF
<i>PYK1-4</i> (rev)	CAGCTCTTGGGCATCTGGTAAC	ORF
<i>RPB1-501</i>	GGTAAGCGTGTGGATTTTTTCGG	ORF
<i>RPB1-301</i>	GGAATAACTTTTACTCTGTGGGC	ORF
<i>RPP1B-Forw</i>	AAGGCCGCTGGTGCTAATGTCTG	ORF
<i>RPP1B-Rev</i>	CAGCAACAGGGCCAGCGTTATG	ORF
<i>RPL28-501</i>	TCCCAGAAGACAAGAGAGACCA	ORF
<i>RPL28-301</i>	CAACAACACCACCAGCAGC	ORF
<i>RPL3-501</i>	AAGAAGGCTCATTTGGCTGA	ORF
<i>RPL3-301</i>	AACACCTTCGAAACCGTGAC	ORF
<i>RPL3p-501</i>	CGCACAACTGTTTTCCATTTT	Promoter region
<i>RPL3p-301</i>	CCAGGAAGCACGAAAGAGAC	Promoter region
<i>RPS2-501</i>	TGGTAAGTGTGGTTCGGTCA	ORF
<i>RPS2-301</i>	AATGGAGAAACTGGCAATGG	ORF
<i>RPS2p-501</i>	TTCCAATTTCTTCCTTACTGC	Promoter region
<i>RPS2p-301</i>	TGGAACACGGAAAGTTGATG	Promoter region
<i>RPSOA-Forw</i>	CCTTACCAGCTACTTTTACTTGACTCC	ORF
<i>RPSOA-Rev</i>	GCAGCGATGATTCTGGCAGC	ORF
<i>SCR1-501</i>	CGGCCGGGATAGCACATAT	ORF
<i>SCR1-301</i>	GACACACTCCATCCCCGAG	ORF
<i>SPP2-501</i>	TGCTTTACTTCGGGGTATGG	ORF
<i>SPP2-301</i>	TGAAGCCTCCTCCACGTTTA	ORF
<i>SSA4p-501</i>	CCACAACTTTCGAATAAAAACCA	Promoter region
<i>SSA4p-301</i>	TCGTTTGCAAAATGAGCAAC	Promoter region
<i>SSA4-502</i>	GTGAAGAGGATGCCAGGAAA	ORF
<i>SSA4-302</i>	GGGGTTTGCAACACCTTCTA	ORF
<i>STE3-501</i>	AAATTCCTGCGTTCCATCAA	ORF
<i>STE3-301</i>	TCGACATAGAAATGCGCTTG	ORF
<i>STE3p-501</i>	CCCAAGTATTCATTTTGTGCAG	Promoter region
<i>STE3p-301</i>	TGGTATGTGAATGCCATGCT	Promoter region
<i>URA2-501</i>	CGAATTTGATTGGTGTGCTG	ORF
<i>URA2-301</i>	GGCGATGTTGTTGGAAGTTT	ORF
<i>UTP2-501</i>	TCCGTTGGCTTTACAGAACC	ORF
<i>UTP2-301</i>	TTGGCGTCTTTACGGATTTT	ORF
Primers for genomic DNA recombination		
<i>ASR1-501</i>	CTTAGTAAGTGAGAAATATGGCAAGTAAT	Upstream of START codon
<i>ASR1-301</i>	CTATATTTGAGTTTGTTCAACTGTTTTCTAT	Downstream of STOP codon
<i>CCR4-501</i>	GGCCAATACTCTGGAAAACC	Upstream of START codon

Materials and Methods

<i>CCR4-301</i>	GCCGTAACGTAAATCATTTCATC	Downstream of STOP codon
<i>CCR4-302</i>	AAATATTGCGAGGCACTGAG	Downstream of STOP codon
<i>CUL3-501</i>	TTGGACTTCTGGATTTTTGC	Upstream of START codon
<i>CUL3-301</i>	TCGATTACCCACTCCACATT	Downstream of STOP codon
<i>CUL3-302</i>	CAGGTCTGAAAGGCTCGTAA	Downstream of STOP codon
<i>F4HSP12</i>	TTAAAACGTATAAATAGGACGGTGAATTGC GTTCTACTTCTCAATTGCGGAATTCGAGCT CGTTTAAAC	50nt before START codon and F4 sequence of (Longtine et al., 1998)
<i>R2HSP12</i>	AAAGCTTCAGAAGCTTTTTACCGAATCCTT TTCTACCTGCGTCAGACATTTTGAGATCCGG GTTTT	50nt after START codon and R2 sequence of (Longtine et al., 1998)
<i>HSP12-301</i>	TTGGTTGGGTCTTCTTCACC	ORF
<i>F4HSP26</i>	ATAGGACCTCCATTAGTTAGAGATCTGTTTT TAATCCATTACCTTTCATGAATTCGAGCTC GTTTAAAC	50nt before START codon and F4 sequence of (Longtine et al., 1998)
<i>R2HSP26</i>	TCGTTGTTGATGTTGTCAAAGAAATCAAAA AATGGACTGTTAAATGACATTTTGAGATCC GGGTTTT	50nt after START codon and R2 sequence of (Longtine et al., 1998)
<i>HSP26-301</i>	TGTTGTCTGCATCCACACCT	ORF
<i>KIN28-501</i>	GCCTTAAGAAAGATTCGTCCA	Upstream of START codon
<i>KIN28-301</i>	ACTTTTTGGGTACTGGTGGT	Downstream of STOP codon
<i>KIN28-302</i>	CTCAGCCATGACTTTTCTGC	Downstream of STOP codon
<i>NOT5-501</i>	CACATTTTTGGTGCAATGAA	Upstream of START codon
<i>NOT5-301</i>	GGCACTGTGACAGACCATTATT	Downstream of STOP codon
<i>NOT5-302</i>	CATGAAGTCGAAAAGGCTAATC	Downstream of STOP codon
<i>PUB1-501</i>	TCAAATTTTATGCCACAGCA	Upstream of START codon
<i>PUB1-301</i>	GGGATTTGTAGGTTGCCTCT	Downstream of STOP codon
<i>PUB1-302</i>	AGGCCCTTTATTTTTTCGAG	Downstream of STOP codon
<i>RAD26-501</i>	TAAGGGCGATGCAATAAAAAG	Upstream of START codon
<i>RAD26-301</i>	TGCTAGGGTCGCATGATAGT	Downstream of STOP codon
<i>RAD26-302</i>	CAATTCGTAACGGCATCTG	Downstream of STOP codon
<i>RPB1-507</i>	GATGCTGACAACGACACTGAAG	Upstream of START codon
<i>RPB1-310</i>	CGCAAGCCATGATTACTGG	Downstream of STOP codon
<i>RPB4-502</i>	TGCTTGCAATGGTTCAGAAG	Upstream of START codon
<i>RPB4-503</i>	CAGACGATGAGTTGGAAAGGA	Upstream of STOP codon
<i>RPB4-301</i>	CCATTTTTGGTTCGAATTTTG	Downstream of STOP codon
<i>RPB4-302</i>	TCCCGTTGTTGAAGCAAAC	Downstream of STOP codon
<i>RPB6HA-502</i>	CAGATGGTTCCTTTGAGGACTGGAGTGTGG	50nt before STOP codon and

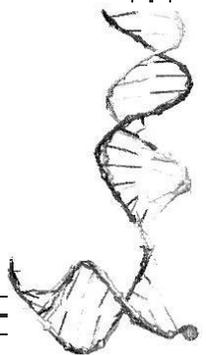
	AGGAACTCATTGTGGATTTGCGGATCCCCGG GTTAATTAA	F2 sequence of (Longtine et al., 1998)
<i>RPB6HA-302</i>	TCGTTCTTTATAGTTATAATAATATACAAA CAAAGCAAATACACATAAAG GAATTCGAGCTCGTTTAAAC	50nt after STOP codon and R1 sequence of (Longtine et al., 1998)
<i>SPT15-501</i>	GCGGAAGAAGCAAGGAAGTA	Upstream of START codon
<i>SPT15-301</i>	AAAATGCAGAGGCAAACACC	Downstream of STOP codon
<i>SRB4-501</i>	TGAGCACAAAAGCCCTAATC	Upstream of STOP codon
<i>SRB4-301</i>	AGCATTATAAATGGCGGAAA	Downstream of STOP codon
<i>SRB4-302</i>	TCACGTTGTGACCGTAAGTG	Downstream of STOP codon
<i>SRB10-501</i>	AAGGGTATACTGAAGTTAGTAATTTTGCTT C	Upstream of START codon
<i>SRB10-301</i>	AAAAAGTTTAATGAATATAATAGTGACAGT GCT	Downstream of STOP codon
<i>KANB</i>	CTGCAGCGAGGAGCCGTAAT	KAN reverse primer
<i>KANC</i>	TGATTTTGTATGACGAGCGTAAT	KAN forward primer
Primers for plasmid construction		
<i>BUR6-501</i>	CCCGGATCCATGGCAGATCAAGTACCAG	START of <i>BUR6</i> gene with a BamHI target sequence
<i>BUR6-301</i>	GTCGACTCAGGCACTCTCTTCCTC	END of <i>BUR6</i> gene with a SalI target sequence
<i>CEG1-pCM-501</i>	ACTAAATTACCGGATCAATTCGGGGGATCCG TTTAAACAGGCCTGTTAACATGGTTTTAGCA ATGGAAAG	50 nt of pCM vector with 20 nt after START codon of <i>CEG1</i>
<i>CEG1-pCM-301</i>	ACATAACTAATTACATGATGCGGCCCTCCTG CAGGGCCCTAGCGGCCGCTCTAATCCGACCA ATCATCCT	20 nt before STOP codon of <i>CEG1</i> with 50 nt of pCM vector
<i>pCM-Deb</i>	CCTTATACATTAGGTCCTTTGTAG	Antes del sitio de clonación de los plásmidos pCM
<i>pCM-Fin</i>	CGGTTAGAGCGGATGTGGGGG	Tras el sitio de clonación de los plásmidos pCM
<i>RPB6-pCM-501</i>	ACTAAATTACCGGATCAATTCGGGGGATCCG TTTAAACAGGCCTGTTAACATGTCAGACTAC GAGGAGGC	50 nt of pCM vector with 20 nt after START codon of <i>RPB6</i>
<i>RPB6-pCM-301</i>	ACATAACTAATTACATGATGCGGCCCTCCTG CAGGGCCCTAGCGGCCGCTTCACAAATCCAC AATGAG	20 nt before STOP codon of <i>RPB6</i> with 50 nt of pCM vector
<i>TBP-501</i>	GGGGGATCCATGGCCGATGAGGAAC	START of <i>SPT15</i> gene with a

Materials and Methods

		BamHI target sequence
<i>TBP</i> -301	CCCCTGCAGTCACATTTTTCTAAATTCAC	START of <i>SPT15</i> gene with a Pst1 target sequence
Primers for alleles verification		
<i>URA3</i> -503	CGCCAATTGATGACAATACA	Upstream of START codon
<i>URA3</i> -302	TGTGCCCGTAAAATACTGT	Downstream of STOP codon
<i>HIS3</i> -502	TCAACGTTTCCATTGTTTT	Upstream of START codon
<i>HIS3</i> -302	ACCATTCTCGTTGTTGTCGT	Downstream of STOP codon
<i>LEU2</i> -502	GGGAGAAAAAGGAAAGGTGA	Upstream of START codon
<i>LEU2</i> -302	CCTTATCACGTTGAGCCATT	Downstream of STOP codon
<i>TRP1</i> -502	AATCTTGATCCGGAGCTTTT	Upstream of START codon
<i>TRP1</i> -302	CTTGACGACTTGAGGCTGAT	Downstream of STOP codon
Primers used to generate probes for Northern blots		
<i>RPB6</i> -pCM-501	ACTAAATTACGGATCAATTCGGGGATCCG TTTAAACAGGCCTGTTAACATGTCAGACTAC GAGGAGGC	50 nt of pCM vector with 20 nt of <i>RPB6</i> START
<i>RPB6</i> -pCM-301	ACATAACTAATTACATGATGCGGCCCTCCTG CAGGGCCCTAGCGCCGCTTCACAAATCCAC AATGAG	20 nt of <i>RPB6</i> END with 50 nt of pCM vector
<i>YKE2</i> -501	CGTCATCTATAAATAATCCCACTTCAG	Upstream of STOP codon
<i>YKE2</i> -301	GGACAGTGAAATGCGTAGG	Downstream of STOP codon
<i>H3</i> -L	GGCTGCCATTACGCCAAGCG	Downstream of START codon of <i>HHT1</i> gene
<i>H3</i> -R	CTGTAAAGAACCCAGTAAACC	Downstream of STOP codon of <i>HHT1</i> gene
<i>H4</i> -L	CCGTTTCATCAGAGACTCTGTTACC	Downstream of START codon of <i>HHF1</i> gene
<i>H4</i> -R	CTTAAACCCGCTATAATACT	Downstream of STOP codon of <i>HHF1</i> gene
<i>ACT1</i> -R	TTGGTCTACCGACGATAGATG	Downstream of START codon
<i>ACT1</i> -D2	GTATTTTCACGCTTACTGC	Downstream of STOP codon
<i>RPL17A</i> -1	TAGAGCTTCAACGGCTAG	Upstream of START codon
<i>RPL17A</i> -2	ATGTGATATGACGGGGAG	Downstream of STOP codon
Primers used in 3' T-Fill libraries		
BioP5_dT16VN	[Btn]AATGATACGGCGACCACCGAGATCTAC ACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT TTTTTTTTTTTTTTTTVN	[Btn] biotinylated nucleotide

P7_T1_for_Mpx_01	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGGTCTC GGCATTTCCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCTC GTGAT*T		
P7_T1_for_Mpx_02	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGGTCTC GGCATTTCCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCTA AGCTA*T		
P7_T1_for_Mpx_03	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGGTCTC GGCATTTCCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCTG TAGCC*T		
P7_T1_for_Mpx_04	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGGTCTC GGCATTTCCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCTT ACAAG*T	6 nt barcodes are colored * s-linkage between the two bases	
P7_T1_for_Mpx_05	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGGTCTC GGCATTTCCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCTA CATCG*T		
P7_T1_for_Mpx_06	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGGTCTC GGCATTTCCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCTG CCTAA*T		
P7_T1_for_Mpx_07	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGGTCTC GGCATTTCCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCTT GGTCA*T		
P7_T1_for_Mpx_08	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGGTCTC GGCATTTCCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCTC ACTGT*T		
PE 1.0	5'AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT		Illumina PE PCR primer
PE 2.0	5'CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGGTCT CGGCATTTCCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCT		Illumina PE PCR primer

Resultados



RESULTADOS

1 ANTECEDENTES: EL DOMINIO CONSERVADO DEL PIE DE LA RNA POLIMERASA II DE *Saccharomyces cerevisiae*

Este trabajo se basa en la hipótesis de estudio de nuestro grupo que propone la existencia de regiones específicas de la RNA pol II que por su localización en la superficie del complejo podrían mediar el contacto con reguladores transcripcionales y ejercer funciones específicas en el proceso de transcripción mediado por dicha enzima, desde la iniciación al transporte o maduración de los RNA mensajeros.

En concreto, en nuestro grupo se han identificado 5 regiones conservadas en las RNA pol II de *S. cerevisiae* y otros eucariotas, localizadas en la superficie de este complejo, pero sin conservación en la RNA pol I ni en la RNA pol III, así como tampoco en la RNA pol de arqueas ni en la de bacterias (Garcia-Lopez and Navarro, 2011) (Figura R1).

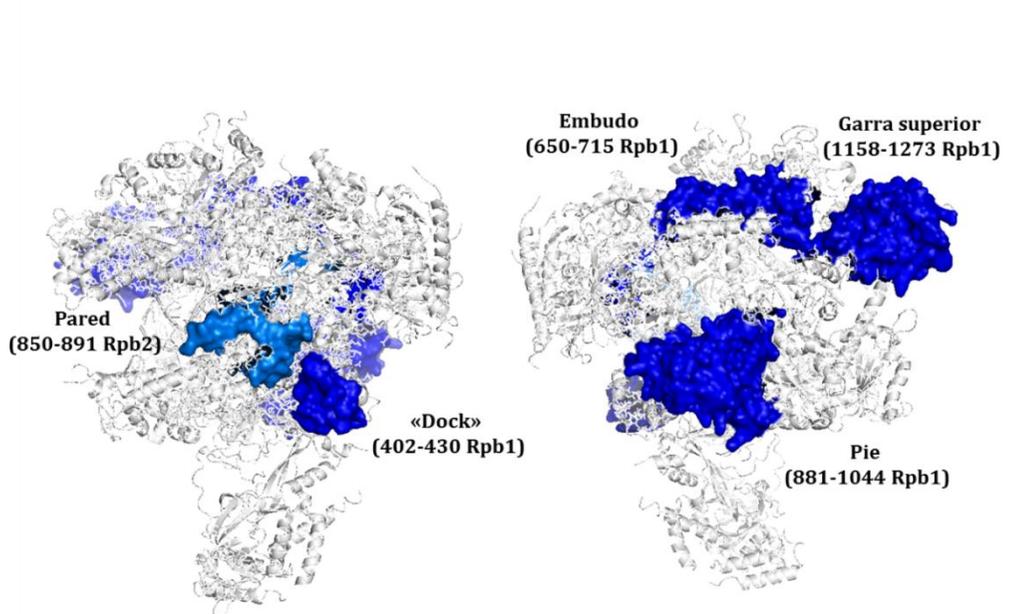


Figura R1: Las zonas en azul representan los dominios conservados localizados, sobre la RNA pol II de *Saccharomyces cerevisiae* (Garcia-Lopez and Navarro, 2011). Los números se corresponden con los aminoácidos de la subunidad indicada. Figura realizada con el software Pymol (DeLano Scientific LLC).

Datos recientes de cristalografía así como datos bioquímicos y de análisis de interacción proteína-proteína han demostrado que las regiones de la garra superior, embudo, pared y “dock” están directamente implicadas en la interacción con los factores de transcripción TFIIS y TFIIB (Bushnell et al., 2004; Kettenberger et al., 2003; Kostrewa et al., 2009). Nosotros hemos demostrado que el dominio conservado del pie de la RNA pol II contacta con 2 nuevos reguladores transcripcionales, Mvp1 y Spo14 (Garcia-Lopez et al., 2011) y tanto nosotros como otros (Suh et al., 2010) hemos identificado interacciones de este dominio con la maquinaria de *capping* del mRNA en *S. cerevisiae* (Figura R2). Estos datos demuestran la importancia de estos dominios durante el proceso de transcripción.

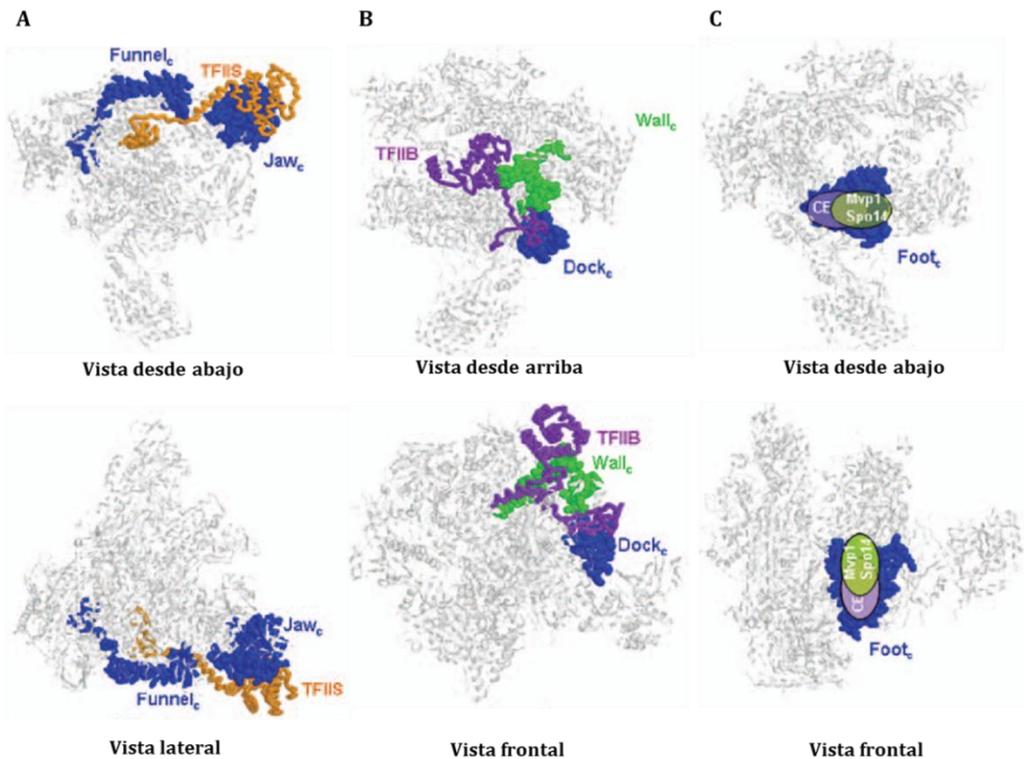


Figura R2: A) Organización espacial de los dominios conservados del embudo (Funnel_c) y de la garra (Jaw_c) de la RNA pol II y TFIIS (PDB 1Y1V). B) Organización espacial de los dominios conservados de la pared (Wall_c) y dock (Dock_c) y TFIIB (PDB 3K1F). C) Localización de la enzima de *capping* y los reguladores Mvp1 y Spo14 sobre la estructura de la RNA pol II (PDB 1WCM), mostrando también el dominio conservado del pie (Foot_c) de la enzima (Garcia-Lopez and Navarro, 2011).

En concreto, este trabajo se centra en descifrar el posible papel del dominio conservado del pie de la RNA pol II durante el proceso de transcripción. Este dominio comprende los residuos 881-1044 de la subunidad mayor de la RNA pol II de *Saccharomyces cerevisiae*, Rpb1 (Garcia-Lopez and Navarro, 2011; Garcia-Lopez et al., 2011) y se corresponde con la mayor parte del “pie” de la RNA pol II (Cramer et al., 2001).

Para analizar la función de este dominio se utilizaron dos cepas distintas con mutaciones en el dominio del pie. El alelo mutante *rpb1-84* fue generado por mutagénesis aleatoria en nuestro grupo (Garrido-Godino et al., 2013) y contiene cambios en tres nucleótidos distintos (A2956G, T3077C, and A3096G) lo que da lugar a la sustitución de los aminoácidos I986V y L1026S, siendo el cambio A3096G una mutación silenciosa. El segundo alelo mutante, *rpo21-4*, previamente descrito (Archambault et al., 1990) contiene una inserción (LELE) entre las posiciones W954 y P955 de Rpb1. Como se muestra en la Figura R3, ninguno de los residuos alterados están expuestos en la superficie de la estructura del complejo de la RNA pol II. Los residuos I986 y L1026 corresponden a las hélices $\alpha 31$ y $\alpha 33$, respectivamente, mientras que los residuos W954 y P955 se encuentran en la región entre $\alpha 29$ y $\alpha 30$ (Figura R3).

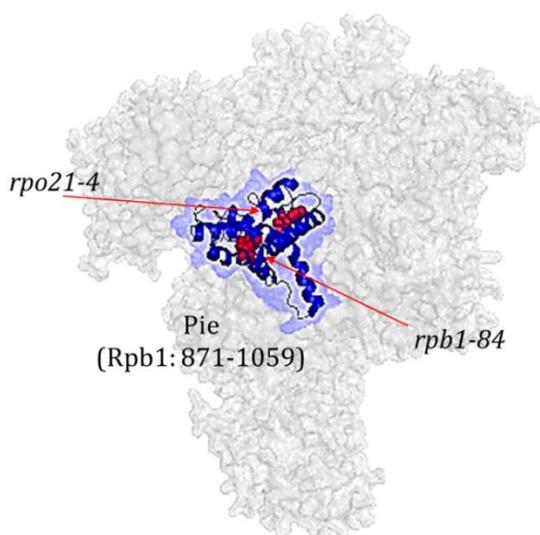


Figura R3: Vista esquemática del dominio completo del pie (azul) de la RNA pol II (gris). Se muestra la estructura del dominio conservado del pie (azul oscuro) y la localización de las mutaciones de los mutantes *rpo21-4* y *rpb1-84* (rojo). Figura realizada con el software Pymol (DeLano Scientific LLC).

2 GENERACIÓN Y MANIPULACIONES GENÉTICAS DE CEPAS DE *S. cerevisiae* QUE CONTIENEN LAS MUTACIONES DEL PIE DE LA RNA POLIMERASA II

La cepa con la mutación *rpo21-4* originalmente descrita, JAY212 (Archambault et al., 1990), contiene el alelo mutante del gen *RPB1* en su genoma. Trabajos de nuestro grupo han demostrado que dicha mutación conlleva la acumulación de aneuploidías en distintos cromosomas, probablemente para compensar los efectos provocados por la mutación. Con objeto de generar cepas mutantes en las cuales dichas mutaciones no provoquen aneuploidías, tanto el alelo mutante *rpo21-4* como el *rpb1-84* (generado por nosotros) se utilizaron para reemplazar el alelo silvestre *RPB1* contenido en el plásmido multicopia pYEB220 (marcador *LEU2*, 2 μ) conteniendo el gen silvestre, ya que, como hemos demostrado, el alto número de copias del gen dentro de la célula no provoca las alteraciones cromosómicas indeseadas.

Posteriormente, el plásmido pYEB220 conteniendo el alelo *RPB1* silvestre y los plásmidos pYEB220-*rpo21-4* y pYEB220-*rpb1-84* con los alelos mutantes se introdujeron por transformación en la cepa madre Gr21-2d, que poseía una copia cromosómica *rpb1 Δ 187::HIS3* y un plásmido pFL44L-*RPB1* (*URA3*, 2 μ) con el alelo *RPB1* silvestre. Tras un tratamiento con ácido fluoroorótico (FOA), se consiguió la eliminación del plásmido pFL44L-*RPB1* y, por tanto, la generación de las cepas de estudio en este trabajo: YFN116 (*rpb1 Δ 187::HIS3* + pYEB220), YFN117 (*rpb1 Δ 187::HIS3* + pYEB220-*rpo21-4*) e YFN104 (*rpb1 Δ 187::HIS3* + pYEB220-*rpb1-84*). Para la generación de la cepa YFN234 que posee el alelo *RPB1* deletado con *KANMX4*, se amplificó el módulo a partir de una cepa diploide conteniendo a la vez una copia silvestre de *RPB1* y otra *rpb1::KANMX4* (Euroscarf), usando los oligonucleótidos específicos Rpb1-507 y Rpb1-310. Posteriormente, el producto de PCR se purificó y se utilizó para reemplazar, por recombinación homóloga, el alelo *rpb1 Δ 187::HIS3* en la cepa Gr21-2d.

Esta estrategia será usada a lo largo de todo el trabajo para la creación de nuevas cepas conteniendo las mutaciones del pie. Los cruces o recombinaciones tendrán siempre lugar con una de las cepas madre (en función del sexo y los marcadores de selección requeridos): Gr21-2d (*MAT α* *rpb1 Δ 187::HIS3* + pFL44L-

RPB1), YFN167 (*MATa rpb1Δ187::HIS3 + pFL44L-RPB1*), YFN234 (*MATα rpb1Δ::KANMX4 + pFL44L-RPB1*) e YFN247 (*MATa rpb1Δ::KANMX4 + pFL44L-RPB1*). De este modo, el fondo genético de ambos mutantes y su cepa isogénica silvestre es siempre el mismo, lo que permite la correcta comparación de fenotipos. Las cepas YFN167 e YFN247 se generaron al cruzar las cepas Gr21-2d e YFN234 por una cepa BY4741.

Para estudiar los efectos de las mutaciones del pie, se analizó el crecimiento de ambas cepas mutantes y de la cepa isogénica silvestre, a diferentes temperaturas, tanto en medio rico YPD como en medio mínimo SD (suplementado con los aminoácidos correspondientes), usando diluciones seriadas. Como se observa en la Figura R4, las mutaciones *rpo21-4* y *rpb1-84* muestran termosensibilidad, si bien a distinto grado, mostrando la cepa con la mutación *rpo21-4* un fenotipo más acusado. En concordancia con estos resultados, otros efectos pleiotrópicos habían sido descritos previamente para el mutante *rpo21-4* (Archambault et al., 1992).

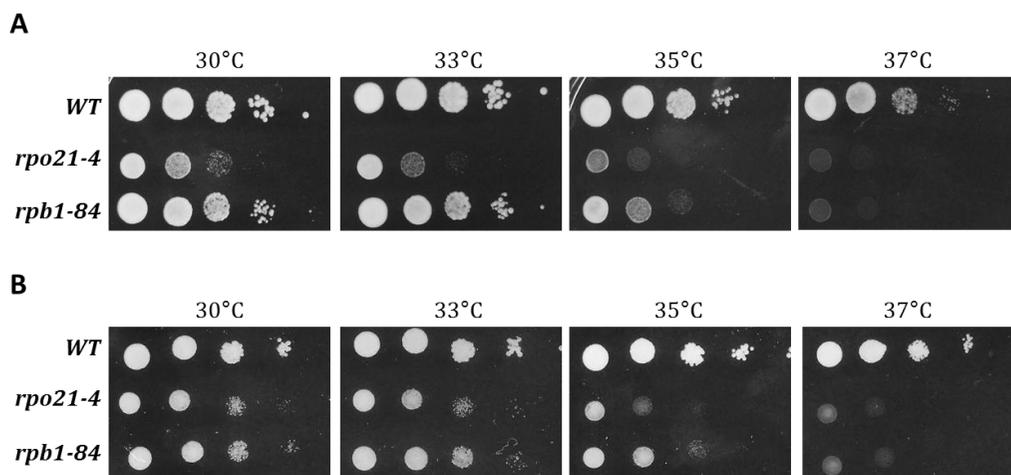


Figura R4: A) Crecimiento de los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre a distintas temperaturas en medio rico YPD. B) Crecimiento de los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre en medio mínimo SD.

3 EL CORRECTO ENSAMBLAJE DE LA RNA POLIMERASA II DEPENDE DEL DOMINIO DEL PIE Y SE REQUIERE PARA MÚLTIPLES ETAPAS DE LA TRANSCRIPCIÓN EN *Saccharomyces cerevisiae*

Se ha descrito que la mutación *rpo21-4* posee una RNA pol II inestable y que dicha inestabilidad es suprimida por la sobreexpresión de *RPB6*, debido a que dicha sobreexpresión corrige la termosensibilidad así como el requerimiento de inositol que presenta dicho mutante (Archambault et al., 1990). Además, se ha establecido que Rpb6 participa en el ensamblaje de las RNA pol I y II, y en la estabilidad de la subunidad mayor de dichas enzimas (Nouraini et al., 1996). Por tanto, nos propusimos analizar si el dominio conservado del pie de la RNA pol II podría participar en el ensamblaje del complejo.

3.1 SOBREEXPRESIÓN DE GENES DE SUBUNIDADES DE LA RNA POLIMERASA II EN LOS MUTANTES DEL DOMINIO CONSERVADO DEL PIE

Puesto que se ha descrito que *RPB6* es un supresor del defecto de termosensibilidad del mutante *rpo21-4* y se ha relacionado a dicha subunidad con el ensamblaje del complejo (Archambault et al., 1990; Nouraini et al., 1996), decidimos buscar otros supresores de dicho defecto para profundizar en la función del pie de la RNA pol II.

Con objeto de identificar genes cuya sobreexpresión pueda suprimir el defecto de sensibilidad a la temperatura que presentan los mutantes del pie de la RNA pol II, se llevó a cabo un análisis de supresión génica con el mutante *rpo21-4* mediante la transformación con una genoteca construida en el plásmido de alto número de copias pFL44L (Stettler et al., 1993) y se seleccionó la capacidad de crecimiento a 37°C. De los aproximadamente 8000 transformantes, se obtuvieron 3 supresores. Uno de ellos, correspondió al gen *RPB1* silvestre, como era de esperar. Un segundo supresor, correspondía a un plásmido que contenía un fragmento de 5902 pb que incluía el gen *RPB6* que codifica una subunidad común a las 3 de la RNA polimerasas, además de los genes *PZF1* y *NLC2* (Tabla R1). Es importante destacar

que la subunidad Rpb6 se localiza próxima al pie de la RNA pol II de *S. cerevisiae* en la estructura global del complejo.

Supresor	Cromosoma	Posición	Genes	Tamaño inserto (pb)
Sup1	XVI	913261-907359	<i>ATG13-PZF1-RPO26-MLC2-SKI3</i>	5902
Sup6	V	450235-452841	<i>RTR1-YER140W</i>	2606
Sup13	IV	205127-210881	<i>RPO21</i>	5754

Tabla R1: Supresores del defecto de termosensibilidad a 37°C del mutante *rpo21-4*. Se muestra el tamaño del inserto, los genes que contiene así como el cromosoma al que pertenecen y la posición en el plásmido pFL44L. En rojo genes incompletos en los insertos contenidos en los plásmidos.

Con objeto de confirmar que la sobreexpresión de *RPB6* pudiera ser responsable de la corrección del defecto de termosensibilidad del mutante *rpo21-4*, se generó un plásmido de bajo número de copias en el que el gen *RPB6* se expresa a partir del promotor regulable por tetraciclina, pCM185-*RPB6*. Para ello, se amplificó *RPB6* a partir del plásmido extraído de las colonias transformantes (PFL44L-*RPB6*) usando los oligonucleótidos *RPB6*-pCM-501 Y *RPB6*-pCM-301, que poseen zonas homólogas al inicio y final de *RPB6* unidas a regiones homólogas del plásmido pCM185 a ambos lados de la diana *ClaI*; y se introdujo dentro del plásmido pCM185 (Gari et al., 1997), previamente digerido con la enzima de restricción *ClaI*, mediante recombinación homóloga en *S. cerevisiae*. Una vez generado el plásmido pCM185-*RPB6* se transformaron con él las cepas conteniendo las mutaciones *rpo21-4* y *rpb1-84* así como su cepa isogénica silvestre y se demostró que la sobreexpresión de *RPB6* corregía el defecto de crecimiento provocado por ambas mutaciones (Figura R5). En concordancia con nuestros resultados, la sobreexpresión de *RPB6* corrige también la auxotrofia a inositol del mutante *rpo21-4* (Archambault et al., 1990; Nouraini et al., 1996).

Se ha propuesto que Rpb6 es esencial para el mantenimiento del ensamblaje de la RNA pol II participando en la estabilidad de la subunidad mayor Rpb1, ya que la mutación *rpb6-31* de *RPB6* disminuye los niveles de Rpb1 *in vivo* (Nouraini et al.,

1996; Nouraini et al., 1997). Además, se ha descrito que el mutante *rpb6^{Q100R}* provoca la disociación del dímero Rpb4/Rpb7 del resto del complejo (Tan et al., 2003).

Para comprobar si el pie de la RNA pol II tiene un papel en este proceso de ensamblaje, se sobreexpresaron los genes *RPB4* y *RPB7* que codifican las subunidades Rpb4 y Rpb7, en los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre. Para ello, se transformaron las mismas con los plásmidos de alto número de copias pCM190-*RPB4* y pGEN-*RPB7* y se analizó el crecimiento a distintas temperaturas (Figura R5).

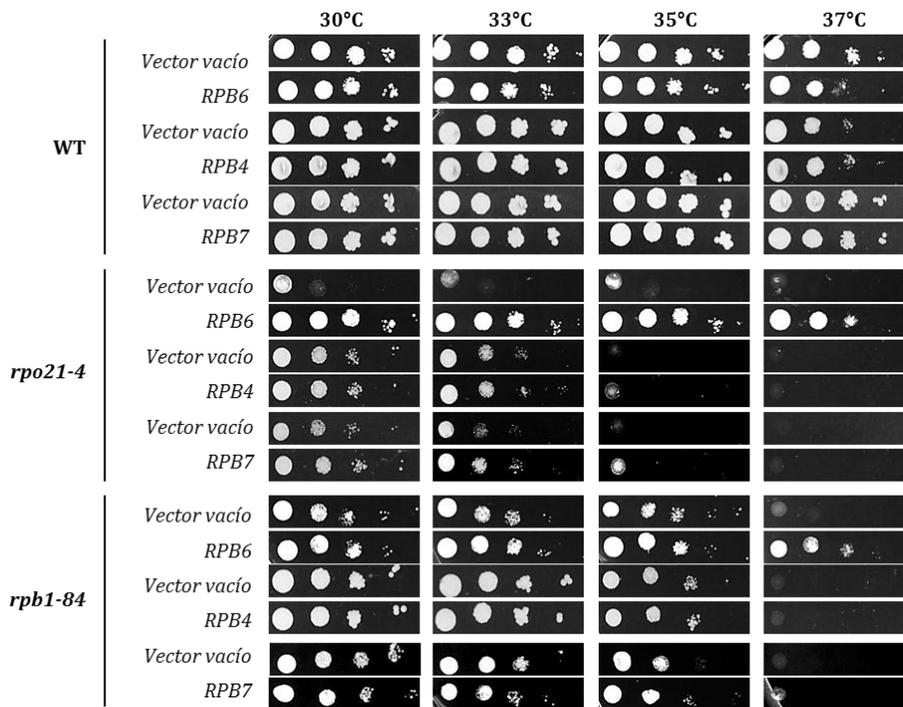


Figura R5: Sobrexpresión de los genes codificantes de las subunidades de la RNA pol II Rpb6, Rpb4 y Rpb7 en los mutantes del pie y en su cepa isogénica silvestre. Se compara el crecimiento con las mismas cepas conteniendo vectores vacíos, mediante diluciones seriadas a distintas temperaturas en medio mínimo SD (con los requerimientos apropiados).

Como muestra la Figura R5, tanto la sobreexpresión de *RPB4* como la de *RPB7* suprimen parcialmente la termosensibilidad de las cepas mutantes aunque en distinta medida, y en menor grado que la corrección producida por sobreexpresión de *RPB6*. Para confirmar si la corrección parcial por sobreexpresión de *RPB4* y *RPB7* era significativa, se analizó la sobreexpresión de los genes codificantes de ambas subunidades del dímero conjuntamente. Como muestra la Figura R6, la

sobreexpresión de los genes codificantes de ambas subunidades que forman el dímero suprime parcialmente la termosensibilidad provocada por ambas mutaciones, siendo esta corrección especialmente patente en el mutante *rpo21-4*.

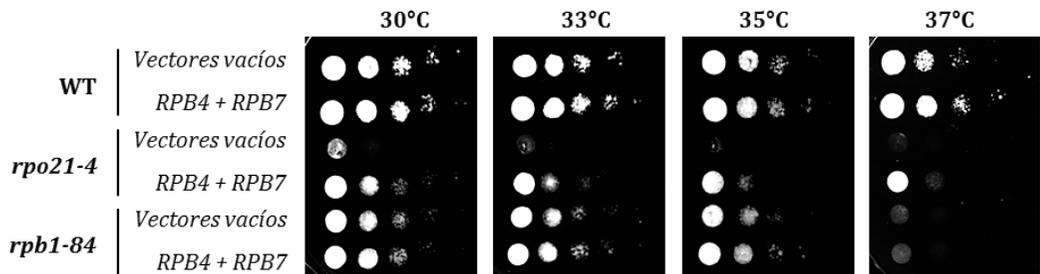


Figura R6: Sobreexpresión de los genes *RPB4* y *RPB7* en los mutantes *rpo21-4* y *rpb1-84* así como en su cepa isogénica silvestre. Se compara el crecimiento de las cepas transformadas con los plásmidos pCM190-*RPB4* y pGEN-*RPB7* con el crecimiento de las mismas conteniendo plásmidos vacíos (pCM190 y pGEN), mediante diluciones seriadas a distintas temperaturas en medio mínimo SD (con los requerimientos apropiados).

Nuestros datos sugieren que las mutaciones del pie podrían alterar el ensamblaje de la RNA pol II. Sin embargo, era necesario comprobar que la supresión del defecto de crecimiento por sobreexpresión de *RPB6* era específica de los mutantes del pie y no un efecto global sobre cualquier mutación de la RNA pol II que provocase termosensibilidad. Para ello, se analizó el crecimiento de distintos mutantes termosensibles de la RNA pol II, *rpb1-1*, *rpb1-19* y *rpb2-6*, a distintas temperaturas, tras la sobreexpresión de *RPB6*. Como se concluye de la Figura R7 y los datos anteriores, la corrección de la termosensibilidad por sobreexpresión de *RPB6* solo se observa en el caso de las mutaciones que afectan al pie de la enzima.

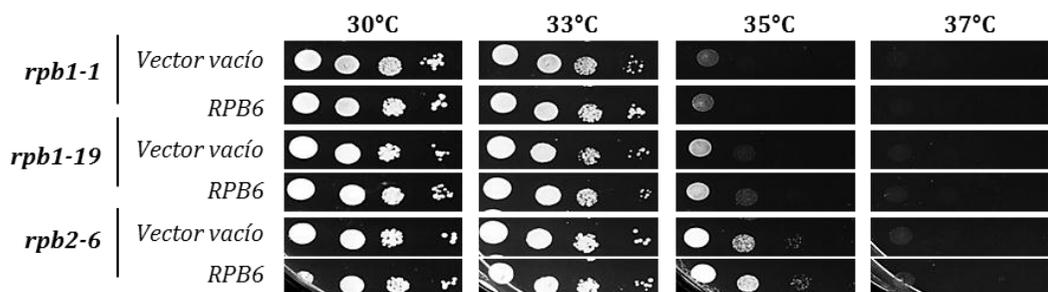


Figura R7: Sobreexpresión de *RPB6* en los mutantes termosensibles de la RNA pol II *rpb1-1*, *rpb1-19* y *rpb2-6* y comparación con el crecimiento de las mismas cepas transformadas con un

plásmido vacío. Se comprueba el crecimiento mediante la siembra de diluciones seriadas a distintas temperaturas en medio mínimo SD (con requerimientos).

Se ha descrito que el mutante *rpo21-4* es letal en combinación con la mutación *rpb6-31* (Nouraini et al., 1996). Para comprobar si este efecto era también algo asociado a los mutantes del pie, se analizó la combinación de ambas mutaciones del dominio conservado del pie con la mutación *rpb6-31*, mediante el cruce de la cepa madre Gr21-2d con la cepa YFN218 que contenía el alelo mutante de *RPB6*. La cepa YFN221 resultante se transformó con los plásmidos que contienen las mutaciones del pie y se eliminó el plásmido original mediante el uso de 5-FOA, demostrándose el agravamiento del fenotipo de los dobles mutantes, más acusado en el caso del mutante *rpo21-4* (Figura R8A).

De la misma manera, se estudió el defecto de la delección del gen que codifica la subunidad Rpb4 en los mutantes del pie. Para ello, se cruzó la cepa madre YFN167 con la cepa Y17005 (Euroscarf) que contenía el gen *RPB4* delecionado, dando lugar a la cepa YFN191. Posteriormente, se transformó dicha cepa con los plásmidos conteniendo las mutaciones del pie y se sembró en medio mínimo suplementado con 5-FOA y los correspondientes requerimientos. Como podemos observar en la imagen, el plásmido original que contiene la copia silvestre de *RPB1* no pudo ser eliminado, demostrándose la existencia de letalidad sintética entre ambas mutaciones (Figura R8B).

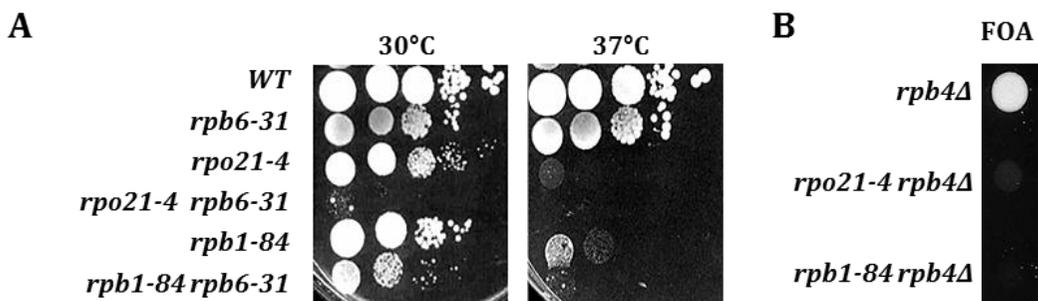


Figura R8: A) Análisis del crecimiento de dobles mutantes *rpo21-4 rpb6-31* y *rpb1-84 rpb6-31*, así como su cepa isogénica silvestre, mediante el crecimiento de diluciones seriadas de las cepas a distintas temperaturas en medio rico YPD. B) Análisis de la combinación de las mutaciones del pie y la delección de *RPB4*, mediante la siembra de las cepas en medio SD con 5-FOA.

Todos estos datos sugieren que el pie de la RNA pol II puede tener un papel crucial en el ensamblaje y/o estabilidad de la RNA pol II mediante el mantenimiento del correcto ensamblaje de la subunidad Rpb6 y el dímero Rpb4/7.

3.2 ANÁLISIS DE LA INTEGRIDAD Y/O ESTABILIDAD DE LA RNA POLIMERASA II EN LOS MUTANTES DEL PIE

Para comprobar la hipótesis anterior según la cual el pie de la RNA pol II participa en el ensamblaje del complejo, se procedió a etiquetar distintas subunidades de la enzima para poder analizar la composición de subunidades de esta mediante inmunoprecipitación de proteínas y western-blot. Para ello, se cruzó la cepa madre Gr21-2d (o alguna de sus derivadas) con cepas conteniendo alguna subunidad de la RNA pol II etiquetada. De esta manera se generaron las cepas YFN237, YFN271, YFN220 e YFN207, que posteriormente se transformaron con los plásmidos que contenían los alelos mutantes del pie y se trató con 5-FOA para eliminar el plásmido con marcador *URA3* conteniendo el alelo *RPB1* silvestre.

La cepa YFN287, que contiene *rpb1Δ187::HIS3* (pFL44L-*RPB1*) *RPB4::Myc18::TRP1* y *RPB6::HA::KanMX6*, se generó mediante etiquetado de Rpb6 con el epítipo HA, a partir del plásmido pFA6a-3HA-KanMX6 (Longtine et al., 1998) con los oligonucleótidos específicos *RPB6HA-502/302* y mediante recombinación homóloga en la cepa YFN220 (*rpb1Δ187::HIS3* (pFL44L-*RPB1*) *RPB4::Myc18::TRP1*).

Con objeto de determinar si el etiquetado de distintas subunidades de la RNA pol II provocaba algún tipo de defecto en el crecimiento de las cepas correspondientes, se analizó el crecimiento de las cepas a distintas temperaturas. Como puede observarse, el etiquetado de las subunidades Rpb2 y Rpb3 con una etiqueta TAP en el extremo carboxilo terminal, así como la etiqueta Myc en el extremo carboxilo terminal de la subunidad Rpb4, no provocaban un defecto en el crecimiento cuando se combinaban con la mutación *rpb1-84* (Figura R9A). En el caso del mutante *rpo21-4*, la adición de la etiqueta TAP a Rpb2 no provocó alteración del crecimiento, mientras que la adición de la etiqueta TAP a Rpb3 y de Myc a Rpb4, afectó ligeramente el crecimiento (Figura R8A). Por otro lado, el intento de etiquetar la subunidad Rpb6 en el extremo carboxilo terminal con una etiqueta Myc resultó ser

letal en el mutante *rpo21-4* y agravaba el fenotipo del mutante *rpb1-84* (Figura R9B). Resultados similares se obtuvieron al intentar etiquetar Rpb6 con una etiqueta HA (de menor tamaño) en cepas que contenían Rpb4::Myc, siendo letal en el mutante *rpo21-4* y de fenotipo agravado en el mutante *rpb1-84* (Figura R9C).

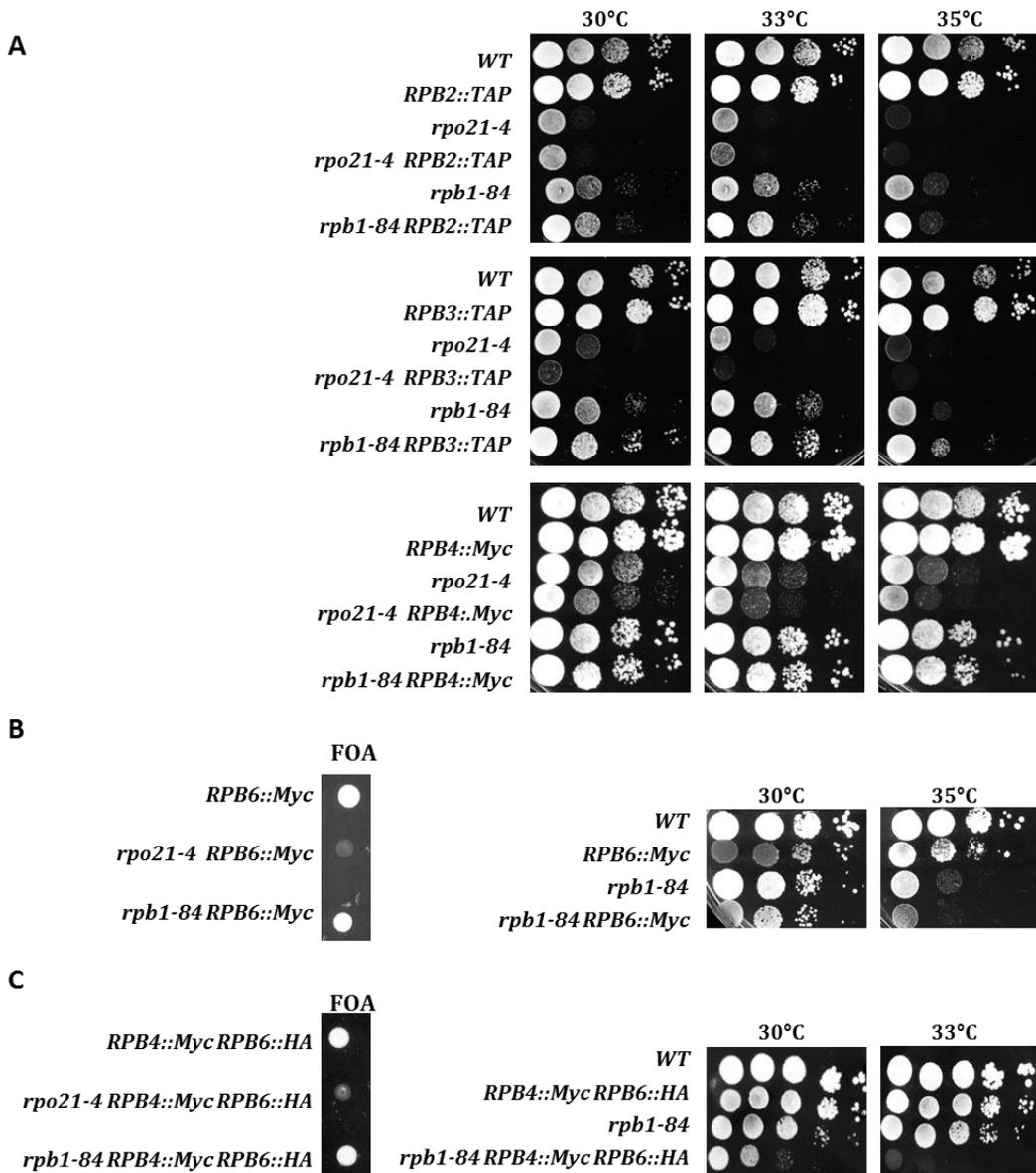


Figura R9: A) Comprobación del crecimiento, a distintas temperaturas, de los mutantes del pie con Rpb2::TAP (cepa madre YFN237), Rpb3::TAP (cepa madre YFN271) o Rpb4::Myc (cepa madre YFN220). B) Análisis del fenotipo provocado por la etiqueta Myc en el extremo carboxilo terminal de Rpb6 en combinación con las mutaciones del pie (cepa madre YFN207).

Se muestra el crecimiento en SD-FOA así como el crecimiento en medio rico YPD. C) Análisis del fenotipo provocado por el etiquetado de Rpb6 y Rpb4 en los mutantes del pie (cepa madre YFN287). En todos los casos se compara el fenotipo con el de los mutantes simples. Se muestra el crecimiento en SD-FOA así como el crecimiento en medio rico YPD.

Todos estos datos sugieren de nuevo el papel del dominio conservado del pie de la RNA pol II de *S. cerevisiae* en el ensamblaje del complejo y su implicación en el mantenimiento de la correcta asociación de Rpb6 y el dímero Rpb4/7. Para comprobar esta hipótesis, se purificó la RNA pol II a partir de las cepas conteniendo Rpb3::TAP y se analizó la cantidad de Rpb1 y Rpb6 asociadas. El western-blot de la subunidad Rpb1 se llevó a cabo usando dos anticuerpos distintos, uno del dominio CTD de la proteína (8WG16) y otro de la región amino terminal (γ -80). Por otro lado, el western-blot de Rpb3::TAP se llevó a cabo usando un anticuerpo PAP que reconoce la etiqueta. Debido a que la subunidad Rpb6 fue imposible de etiquetar, los western se llevaron a cabo usando un anticuerpo policlonal frente a Rpb6 (cedido por el Dr. M. Werner).

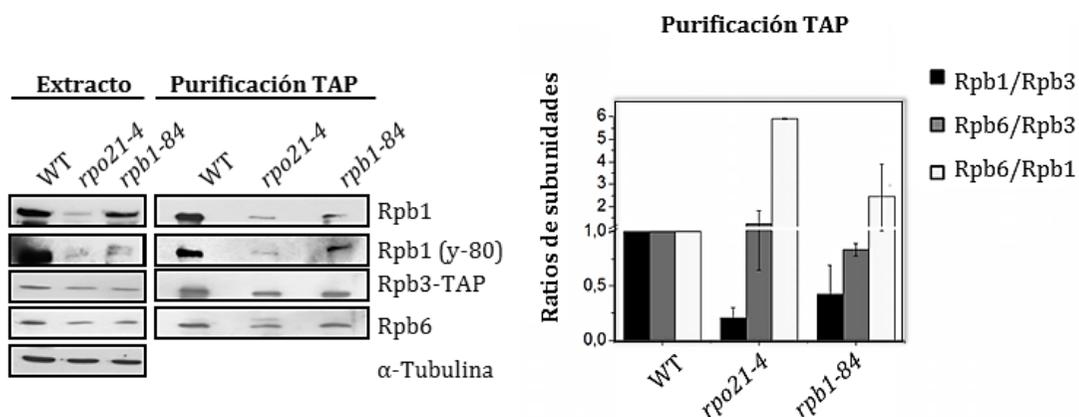


Figura R10: Purificación de Rpb3::TAP en las cepas que contienen las mutaciones *rpo21-4* y *rpb1-84* y comparación con la cepa isogénica silvestre. Análisis de subunidades de la RNA pol II mediante western-blot y cuantificaciones de los mismos. Los ratios entre las subunidades se comparan con los presentados por la cepa isogénica silvestre.

Como muestra la Figura R10, en el western-blot de extractos totales de proteínas, la cantidad de Rpb1 (medida con ambos anticuerpos) en los mutantes del pie es menor que en la cepa silvestre, si comparamos con la cantidad de Rpb3 o de la proteína constitutiva α -tubulina. Esto se correlaciona con el hecho de que al purificar

los complejos que contienen Rpb3::TAP la cantidad de Rpb1 asociada a Rpb3 es menor en los mutantes del pie (siendo esta caída más pronunciada en el mutante *rpo21-4*). Sin embargo, la cantidad de Rpb6 unida a Rpb3 no varía con respecto a la cepa silvestre, mientras que el ratio Rpb6/Rpb1 es mucho mayor en los mutantes. Estos resultados sugieren la existencia de subcomplejos proteicos que contienen las subunidades Rpb3 y Rpb6 pero no contienen la subunidad mayor Rpb1.

Dado los bajos niveles de Rpb1 que poseen estas cepas, se analizó por PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) la cantidad de mRNA del gen *RPB1* con objeto de determinar si el defecto era causado por una pérdida de la expresión de dicho gen. Como se observa en la Figura R11, usando como normalizador el gen *18S* transcrito por la RNA pol I, la expresión del gen *RPB1* no varía en los mutantes *rpo21-4* y *rpb1-84* con respecto a su cepa isogénica silvestre.

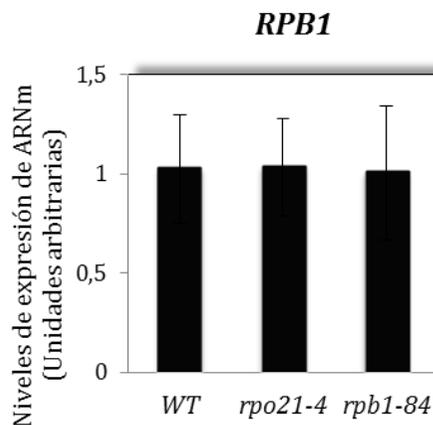


Figura R11: qRT-PCR para medir los niveles de expresión del gen *RPB1* en los mutantes *rpo21-4* y *rpb1-84* y en la cepa isogénica silvestre. Los valores fueron normalizados a los niveles del rRNA *18S*. Los resultados son la media de al menos 3 réplicas independientes para cada cepa.

A continuación, se procedió a analizar la composición de subunidades de la RNA pol II tras inmunoprecipitar la subunidad mayor Rpb1 (usando el anticuerpo 8WG16 como se describe en Materiales y Métodos). Como podemos ver en la Figura R12, la cantidad de complejos Rpb3/Rpb1 no varía significativamente en los mutantes del pie con respecto a su cepa isogénica silvestre. Sin embargo, podemos ver que el ratio Rpb6/Rpb1 es menor en los mutantes del pie, indicando la existencia de complejos que contienen Rpb1/Rpb3 pero pierden la subunidad Rpb6.

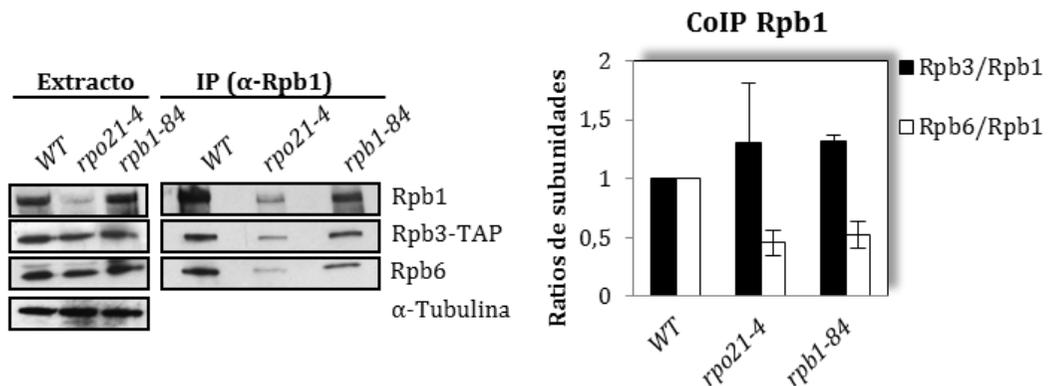


Figura R12: Inmunoprecipitación de la subunidad mayor Rpb1 de la RNA pol II en las cepas que contienen las mutaciones *rpo21-4* y *rpb1-84* y comparación con una cepa silvestre. Análisis de subunidades de la RNA pol II mediante western-blot y cuantificaciones de los mismos. Los ratios entre las subunidades se comparan con los presentados por la cepa isogénica silvestre.

El siguiente paso fue analizar la estequiometría de las dos subunidades mayores de la RNA pol II. Para ello, se llevó a cabo una inmunoprecipitación de la subunidad Rpb3 en cepas que contenían la construcción Rpb2::TAP. Según muestra la imagen R13, los ratios Rpb2/Rpb3 permanecen similares, mientras que la cantidad de Rpb1 es menor a la de esas dos subunidades en los mutantes del pie. Esto indica la presencia de complejos que contienen Rpb2 y Rpb3 pero que carecen de Rpb1.

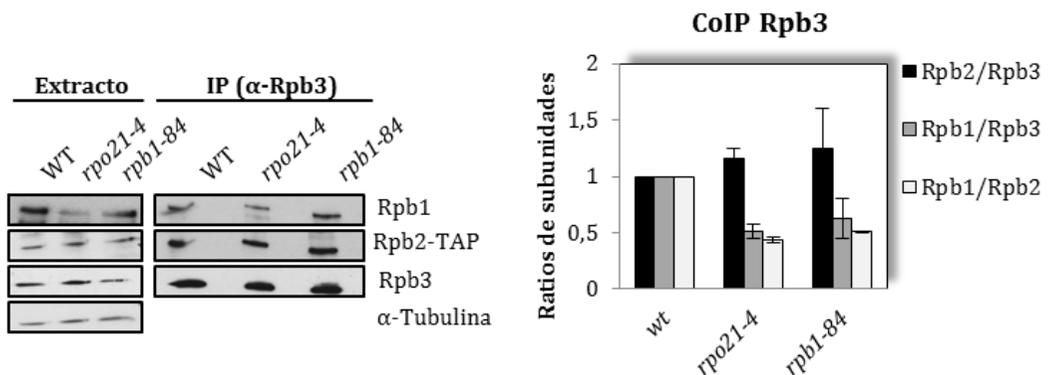


Figura R13: Inmunoprecipitación de la subunidad Rpb3 de la RNA pol II en las cepas que contienen las mutaciones *rpo21-4* y *rpb1-84* y Rpb2::TAP. Análisis de subunidades de la RNA

pol II mediante western-blot y cuantificaciones de los mismos. Los ratios entre las subunidades se comparan con los presentados por la cepa isogénica silvestre.

Por el contrario, al inmunoprecipitar la subunidad mayor Rpb1 en estas mismas cepas, vemos que la cantidad de Rpb2 con respecto a Rpb1 no varía significativamente en los mutantes del pie con respecto a su cepa isogénica silvestre (Figura R14). Sin embargo, el ratio Rpb6/Rpb1 es mucho menor en los mutantes, como se ha visto previamente, sugiriendo la existencia de subcomplejos con Rpb1/Rpb2 que carecen de Rpb6.

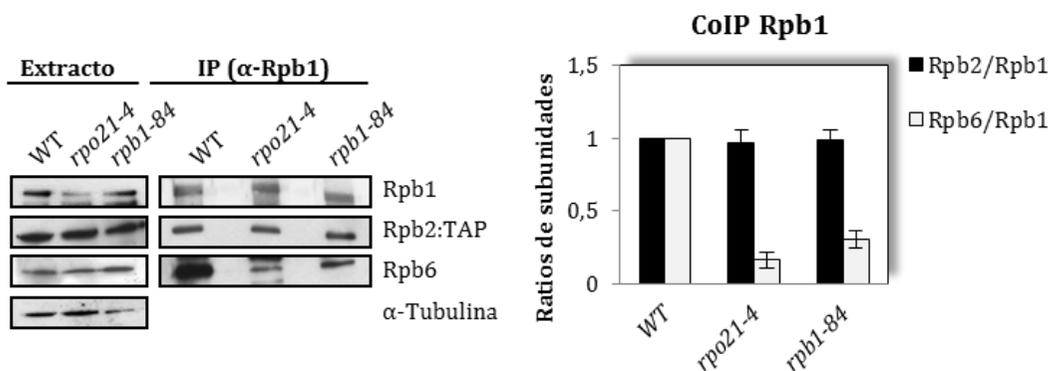


Figura R14: Inmunoprecipitación de la subunidad mayor Rpb1 de la RNA pol II en las cepas que contienen las mutaciones *rpo21-4* y *rpb1-84* y Rpb2::TAP. Análisis de subunidades de la RNA pol II mediante western-blot y cuantificaciones de los mismos. Los ratios entre las subunidades se comparan con los presentados por la cepa isogénica silvestre.

Estos resultados sugieren la existencia de distintos subcomplejos en la RNA pol II en cepas que contienen mutaciones en el pie de la enzima: subcomplejos que contienen Rpb3 y Rpb2 pero que carecen de Rpb1, así como subcomplejos que contienen Rpb1, Rpb2 y Rpb3 pero que carecen de Rpb6.

Con objeto de analizar la estequiometría de la subunidad Rpb4 que contacta en la estructura de la RNA pol II con Rpb6, llevamos a cabo la inmunoprecipitación de Rpb3 en cepas conteniendo Rpb4::Myc. Como se observa en la Figura R15, el ratio Rpb4/Rpb1 es menor en los mutantes del pie que en su cepa isogénica silvestre. Además, el ratio Rpb4/Rpb6 también es menor, sugiriendo la existencia de

subcomplejos conteniendo Rpb1 en los que se disocia Rpb6 y Rpb4, así como subcomplejos que contienen Rpb1 y Rpb6 pero en los que se disocia Rpb4.

De la misma manera que ocurre para Rpb2, Rpb3 y Rpb6, la cantidad de Rpb4 en extractos de proteínas totales no varía en los mutantes respecto a la cepa silvestre.

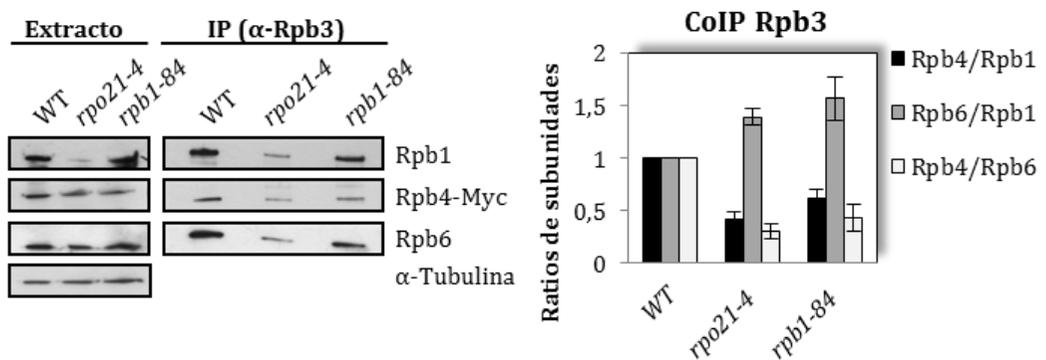


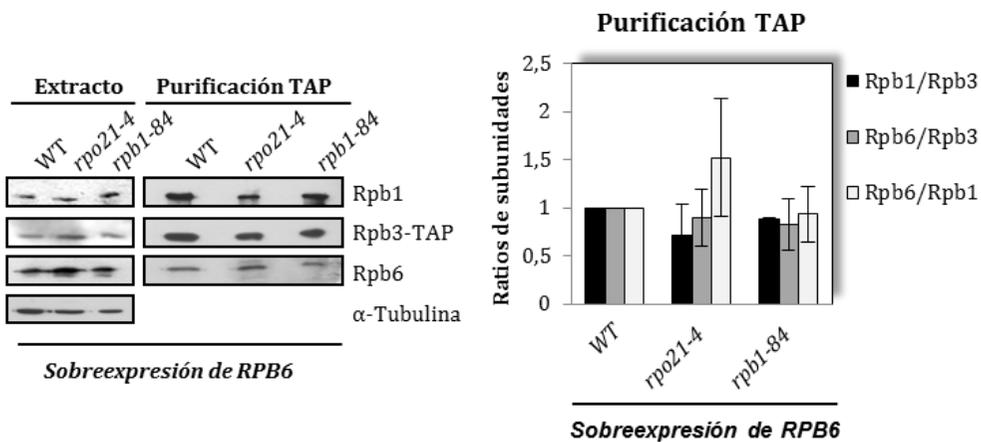
Figura R15: Inmunoprecipitación de la subunidad Rpb3 de la RNA pol II en las cepas que contienen las mutaciones *rpo21-4* y *rpb1-84* y Rpb4::Myc. Análisis de subunidades de la RNA pol II mediante western-blot y cuantificaciones de los mismos. Se comparan los resultados con los presentados por la cepa isogénica silvestre.

Todos estos datos demuestran que las mutaciones del pie de la RNA pol II afectan el ensamblaje y/o estabilidad de la enzima dando lugar a distintos tipos de subcomplejos. Nuestros resultados sugieren que todos los subcomplejos contienen las subunidades Rpb2 y Rpb3. Sin embargo, existen subcomplejos que contienen estas dos subunidades pero carecen de la subunidad mayor Rpb1. Además, el pie parece participar en el ensamblaje de la subunidad Rpb6 así como del dímero Rpb4/7. Nuestros datos sugieren la existencia de complejos conteniendo Rpb2-Rpb3-Rpb6 que carecen de Rpb1, así como subcomplejos Rpb1-Rpb2-Rpb3 que carecen de Rpb6. De la misma manera, las mutaciones del pie afectan a la asociación de Rpb4 (y probablemente del dímero Rpb4/7) con el resto de la RNA pol II, existiendo subcomplejos que contienen al menos Rpb1-Rpb2-Rpb3-Rpb6 pero que carecen de Rpb4 (y probablemente de Rpb4/7).

3.3 ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD DE LA RNA POLIMERASA EN LOS MUTANTES DEL PIE SOBREENPRESANDO *RPB6*

Nuestros datos sobre el efecto de *RPB6* como supresor del defecto de crecimiento de los mutantes *rpo21-4* y *rpb1-84* y los de otros autores (Archambault et al., 1990), sugieren que la sobreexpresión de este gen podría mediar su efecto corrigiendo la estabilidad de la RNA pol II de estos mutantes. Con objeto de profundizar en esta hipótesis, se realizó la purificación de la RNA pol II en cepas conteniendo las mutaciones del pie y *Rpb3::TAP*, transformadas con el plásmido *pCM185-RPB6* para sobreexpresar este gen. Como se observa en la Figura R16A, los niveles de *Rpb1* y *Rpb6* son similares a los de la cepa silvestre, al igual que los niveles de *Rpb4*, analizados en cepas que contenían *Rpb4::Myc* (Figura R16B).

A



B

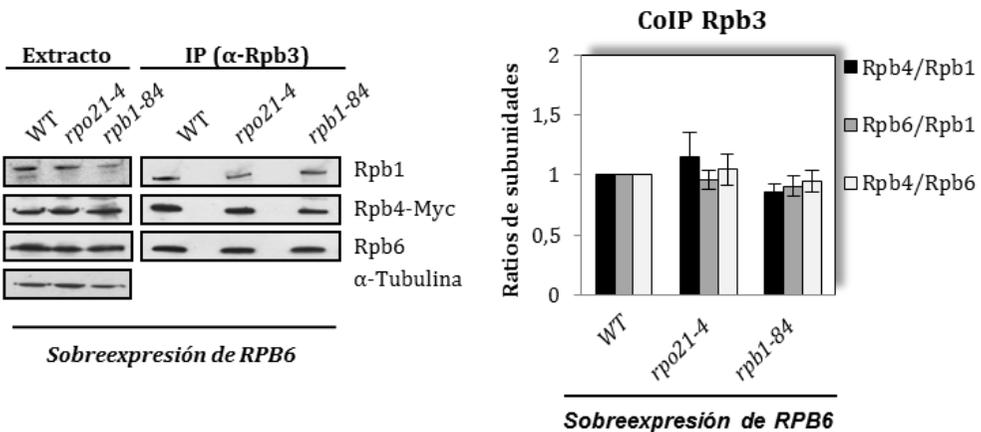


Figura R16: A) Purificación de Rpb3::TAP en las cepas que contienen las mutaciones *rpo21-4* y *rpb1-84* con sobreexpresión de *RPB6* (plásmido pCM185-*RPB6*). B) Inmunoprecipitación de la subunidad Rpb3 de la RNA pol II en cepas que contienen Rpb4::Myc con sobreexpresión *RPB6*. Se muestran los análisis por western-blot y las cuantificaciones de los resultados. En cada caso se normalizaron los datos usando como referencia la cepa isogénica silvestre.

Basándonos en los datos de interacciones genéticas entre las mutaciones del pie y mutantes de *rpb6* y *rpb4*, así como las producidas al intentar etiquetar estas subunidades; en los datos de sobreexpresión de *RPB6*, *RPB4* y *RPB7* y en los análisis mediante purificación e inmunoprecipitación de proteínas y western-blot; podemos concluir que el pie de la RNA pol II de *Saccharomyces cerevisiae* participa en el ensamblaje y/o estabilidad de la RNA pol II. Mutaciones en este dominio dan lugar a distintos subcomplejos intermediarios cuya formación se inhibe bajo la sobreexpresión de *RPB6*, lo que sugiere que el pie de la enzima participa manteniendo el correcto ensamblaje de la RNA pol II mediante la correcta asociación de la subunidad Rpb6 y el dímero Rpb4/7.

3.4 LOCALIZACIÓN CELULAR DE SUBUNIDADES DE LA RNA POL II

Puesto que el pie de la RNA pol II parece estar implicado en el ensamblaje y/o estabilidad de la enzima, se hizo necesario determinar si su implicación se debía a defectos en procesos de ensamblaje de la RNA pol II o, por el contrario, se debía a una degradación inusual de la misma o de alguna de sus subunidades, tal y como sugieren los bajos niveles de Rpb1 que presentan los mutantes *rpo21-4* y *rpb1-84*.

Para determinar si la baja acumulación de Rpb1 en las cepas mutantes era una consecuencia de la degradación de esta subunidad cuando no estaba ensamblada correctamente en el complejo, se llevaron a cabo experimentos de inmunolocalización de Rpb1 en los mutantes *rpo21-4* y *rpb1-84* así como en su cepa isogénica silvestre, usando un anticuerpo anti-Rpb1. Según muestra la Figura R17, Rpb1 posee una localización nuclear en la cepa silvestre como era de esperar. De la misma manera, en las cepas mutantes la señal fluorescente correspondiente a Rpb1 se restringe al núcleo.

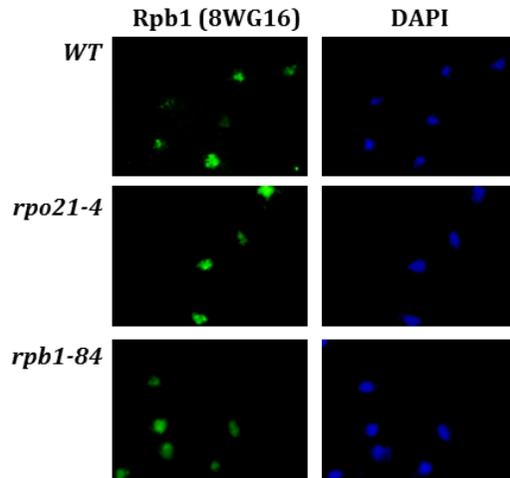


Figura R17: Izquierda: inmunolocalización de Rpb1 usando el anticuerpo 8WG16 en los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre. Derecha: marcaje nuclear con DAPI.

En los experimentos de inmunoprecipitación de proteínas, se había determinado la existencia de distintos subcomplejos de la RNA pol II, algunos de los cuales carecían de la presencia de la subunidad mayor Rpb1. Por tanto, se analizó la localización celular de la subunidad Rpb3 usando un anticuerpo frente a una etiqueta HA acoplada a la proteína, para determinar si los subcomplejos se localizaban en el núcleo o en el citoplasma (Figura R18).

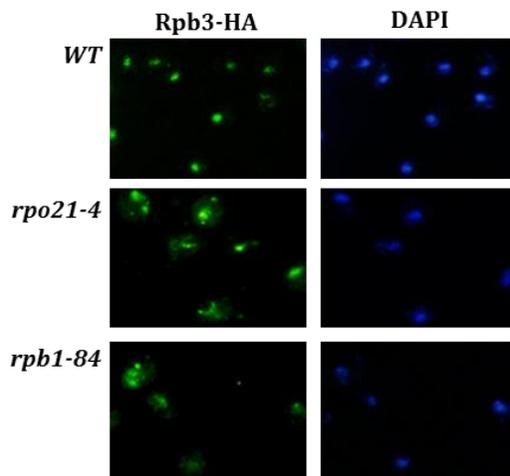


Figura R18: Izquierda: inmunolocalización de Rpb3 usando el anticuerpo anti-HA en los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre (cepa YFN307). Derecha: marcaje nuclear con DAPI.

Como se aprecia en la Figura R18, la señal de Rpb3 se restringe al núcleo en una cepa silvestre. Sin embargo, en el mutante *rpo21-4* y *rpb1-84*, se observa señal nuclear y también una clara acumulación citoplasmática, sugiriendo que Rpb3 libre, o bien, los complejos que carecen de Rpb1, por lo menos en parte se localizan en el citoplasma. De la misma manera, la localización celular de Rpb2, analizada en cepas conteniendo Rpb2-TAP, es principalmente nuclear en la cepa silvestre y tanto nuclear como citoplasmática en las cepas mutantes (Figura R19).

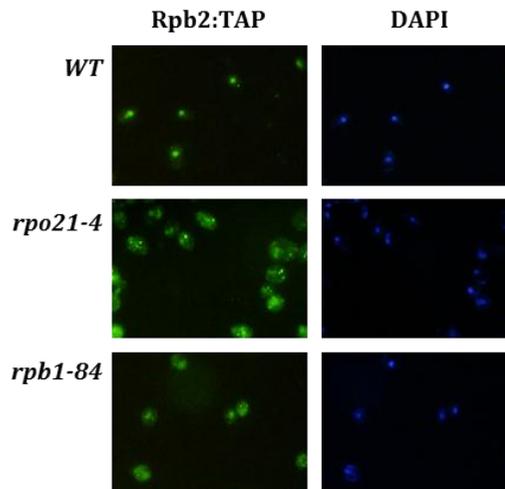


Figura R19: Izquierda: inmunolocalización de Rpb2 usando un anticuerpo que reconoce la etiqueta TAP en los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre. Derecha: marcaje nuclear con DAPI.

Como sugieren nuestros datos, en los mutantes del pie Rpb4 se disocia de la RNA pol II, aunque los niveles totales de Rpb4 en la célula no varían, sugiriendo que Rpb4 puede entrar y salir del núcleo como ha sido descrito también con anterioridad (Forget and Chartrand, 2011; Lotan et al., 2005). Por tanto, se usó una construcción GFP-Rpb4 (pRS313-GFP-RPB4 [HIS3]) (Lotan et al., 2005), para analizar la localización *in vivo* de esta subunidad en los mutantes del pie respecto a la cepa silvestre. Para ello, reemplazamos el alelo *rpb1Δ187::HIS3* por *rpb1Δ187::his3::TRP1* mediante una transformación integrativa con el alelo *his3::TRP1* obtenido mediante la digestión del plásmido pHT6 (Cross, 1997) con las enzimas de restricción *SmaI* y *XhoI*. La inserción se comprobó mediante PCR usando los oligonucleótidos RPB1-507 y RPB1-310. La visualización de la fluorescencia tuvo lugar tras la transformación de la nueva cepa resultante (YFN428) con el plásmido pRS313-GFP-RPB4 y los

plásmidos que contenían las mutaciones del pie y una etapa de eliminación del plásmido *RPB1* silvestre mediante el uso de ácido fluoroorótico (FOA).

Como se aprecia en la Figura R20, al menos en el mutante *rpb1-84*, Rpb4 se acumula en el citoplasma sugiriendo que Rpb4 no asociado al complejo de la RNA pol II se encuentran en el citoplasma (no pudiendo descartar que haya una parte en el núcleo). Este mecanismo probablemente implica también a Rpb7.

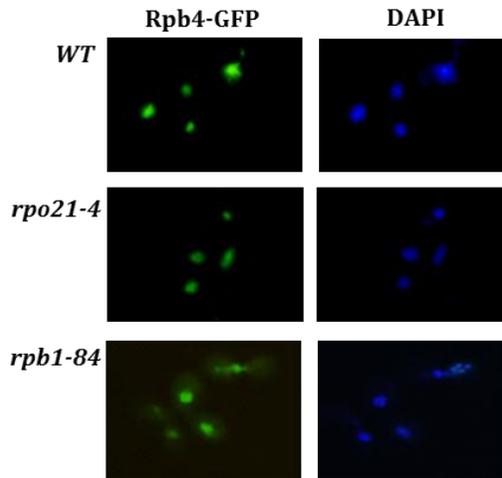


Figura R20: Izquierda, localización celular de Rpb4, *in vivo*, en cepas silvestre y mutantes conteniendo una construcción GFP-Rpb4. Derecha: marcaje nuclear con DAPI.

Puesto que la localización celular de Rpb1 es predominantemente nuclear en los mutantes del pie y las subunidades Rpb2, Rpb3 y Rpb4 poseen cierta acumulación citoplasmática en dichas cepas, decidimos analizar si esta acumulación citoplasmática se debía a un defecto en el ensamblaje de la RNA pol II o bien, a una degradación nuclear y salida de las subunidades al citosol. Observaciones recientes tanto en humanos como en levaduras proponen que la RNA pol II debe ser ensamblada en el citoplasma como un requisito previo a su importe al núcleo (Boulon et al., 2010; Daulny and Tansey, 2009; Forget et al., 2010; Miron-Garcia et al., 2013). Nuestros datos no descartan la posibilidad de que las mutaciones del pie afecten al correcto ensamblaje de Rpb1 con el resto del complejo y que las subunidades Rpb1 no asociadas se degraden en el citoplasma. Para aclarar esta posibilidad, se generaron cepas que contenían las mutaciones del pie y la delección del gen *BUD27* (cepa

YFN304), una prefoldina cuya inactivación altera el ensamblaje de las 3 RNA polimerasas en *S. cerevisiae*, dando lugar a una acumulación citoplasmática de las mismas (Miron-Garcia et al., 2013). Los experimentos de inmunolocalización de Rpb1 en el mutante *bud27Δ* (Figura R21A), muestran una clara acumulación citoplasmática aunque también se observa localización nuclear, indicando que la RNA pol II se encuentra deslocalizada (como había sido previamente descrito). La delección del gen de esta prefoldina en los mutantes *rpo21-4* y *rpb1-84* provoca una acumulación de Rpb1 citoplasmática similar a la observada para el mutante simple *bud27Δ*, sugiriendo que Rpb1 no se degradaba en el citoplasma en estos mutantes. Por tanto, se analizó si esta acumulación citoplasmática de Rpb1 se correlacionaba con un incremento en la cantidad de proteína por western-blot. Como podemos observar en la Figura R21B, los dobles mutantes *rpo21-4 bud27Δ* y *rpb1-84 bud27Δ* muestran un incremento en la cantidad de Rpb1 si los comparamos con los mutantes simples del pie. Todos estos datos indican que la degradación de Rpb1 no ocurre en el citoplasma, sino que esa degradación ocurre probablemente a nivel nuclear.

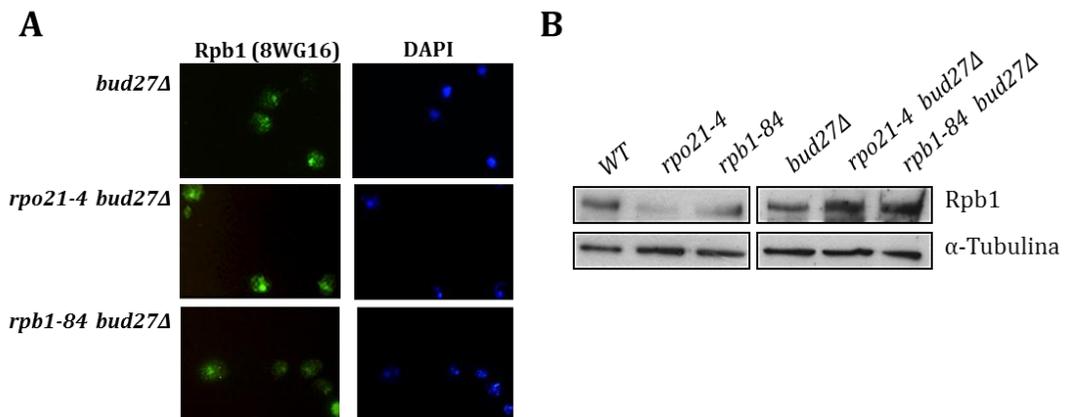


Figura R21: A) Inmunolocalización de Rpb1 en los dobles mutantes *rpo21-4 bud27Δ* y *rpb1-84 bud27Δ* en comparación con la cepa mutante simple *bud27Δ*, y marcaje nuclear con DAPI. B) Análisis mediante western-blot de la cantidad de proteína Rpb1 en comparación con la proteína constitutiva α -tubulina en los mutantes simples y dobles, así como en la cepa silvestre.

3.5 ESTUDIO DE LA TRANSCRIPCIÓN MEDIADA POR LA RNA POLIMERASA II Y SU ASOCIACIÓN A LOS GENES EN MUTANTES DEL DOMINIO DEL PIE

Tras determinar el papel que el dominio del pie de la RNA pol II tiene en la estabilidad y/o ensamblaje del complejo proteico, se hace necesario establecer las implicaciones transcripcionales que conlleva la alteración de dicho dominio. Tanto nosotros como otros hemos visto que el pie de la RNA pol II se asocia con proteínas implicadas en la iniciación y/o elongación temprana de la transcripción (García-Lopez et al., 2011; Suh et al., 2010). Sin embargo, el papel de esta región en la transcripción está aún poco claro.

Para determinar las consecuencias de alterar el pie de la RNA pol II en el proceso de transcripción, se analizó la acumulación de mRNA para varios genes escogidos al azar usando RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Como muestra la Figura R22, la acumulación de mRNA para la mayoría de los genes analizados (excepto el gen constitutivo *ACT1* y *SPP2*) cae aproximadamente un 50% en los mutantes *rpo21-4* y *rpb1-84* con respecto a su cepa isogénica silvestre. Es interesante indicar que en el gen *MF α 2* estos niveles caen dramáticamente en el mutante *rpo21-4*.

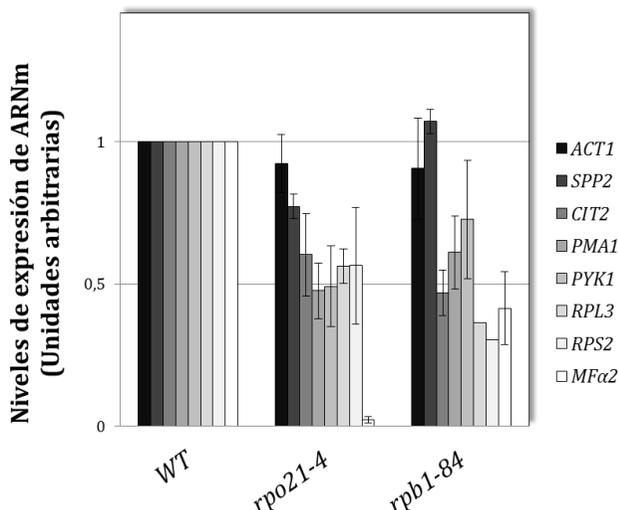


Figura R22: Análisis mediante RT-PCR a tiempo real de los niveles de acumulación de mRNA de distintos genes en los mutantes del pie y su cepa silvestre transformados con un vector vacío. Los valores fueron normalizados a los niveles del rRNA *18S*. Los oligonucleótidos específicos usados se recogen en la tabla suplementaria 4 de Materiales y Métodos.

Sabiendo que las mutaciones en el pie de la RNA pol II provocan una disminución de la cantidad de enzima correctamente ensamblada, nos propusimos analizar si esta era la causa de la disminución de los niveles de mRNA. Para ello, se realizaron experimentos de inmunoprecipitación de cromatina en la cepa silvestre y en los mutantes *rpo21-4* y *rpb1-84* transformados con un plásmido vacío. Se usaron dos anticuerpos distintos: el anticuerpo 8WG16 que reconoce la zona carboxilo terminal (CTD) de la subunidad mayor Rpb1 (Figura R23A) y el anticuerpo y-80 que reconoce la región amino terminal de la misma (Figura R23B), descartando posibles interferencias por la especificidad del anticuerpo. En ambas inmunoprecipitaciones se analizó el reclutamiento de Rpb1 en las zonas promotora y 3' de los genes *PMA1*, *PYK1* y *CIT2*.

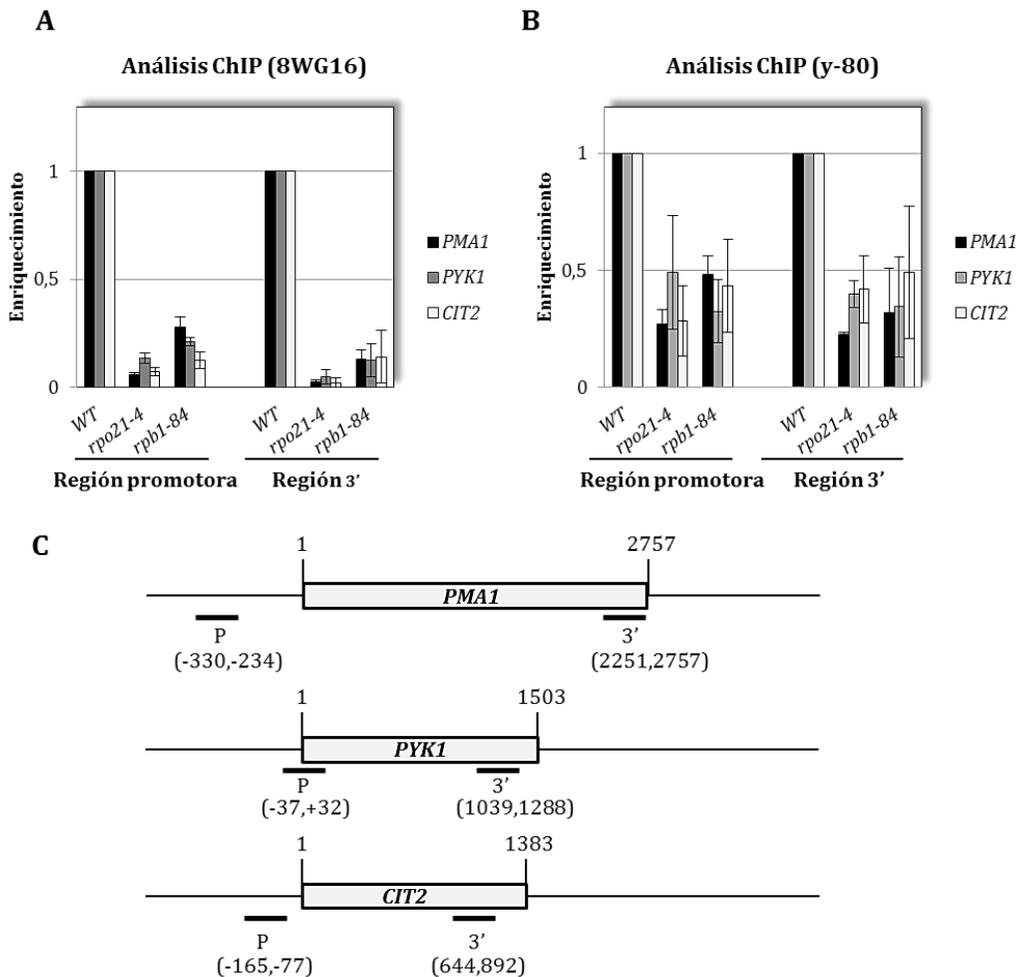


Figura R23: Análisis del reclutamiento de Rpb1 a los genes (ChIP) en los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre transformados con un vector vacío, usando A) el anticuerpo 8WG16 (reconoce la región carboxilo terminal de Rpb1) y B) el anticuerpo γ -80 (reconoce la región amino terminal de Rpb1). C) Posición de los oligonucleótidos específicos usados. La secuencia de los mismos se describe en la tabla suplementaria 4 de Materiales y Métodos.

Como podemos ver en la Figura R23, la ocupación de Rpb1 en los genes analizados muestra una dramática caída tanto en las zonas promotoras como en las zonas 3' de las fases de lectura abierta (ORFs) en ambos mutantes y con ambos anticuerpos (aunque en distinto grado). Estos datos se correlacionan con los bajos niveles de mRNA que presentan los mutantes del pie, aunque la caída en ocupación de Rpb1 es mayor que la observada a nivel de acumulación de mRNA.

Estos datos sugieren que el problema de integridad/ensamblaje de la RNA pol II provocada por la mutación del dominio conservado del pie, conduce a la degradación de los complejos proteicos que están incorrectamente ensamblados, lo que conduce a un menor reclutamiento de la RNA pol II a los genes y, por tanto, la disminución en la expresión de los mismos. Para demostrar esto, se analizó la acumulación de mRNA en condiciones en las que el ensamblaje de la enzima se recupera, es decir, bajo la sobreexpresión de *RPB6* (Figura R24).

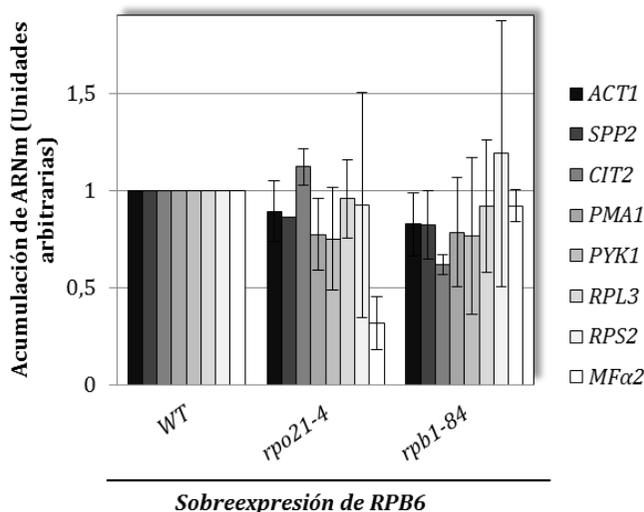


Figura R24: Análisis mediante PCR a tiempo real de los niveles de acumulación de mRNA para distintos genes en los mutantes del pie y su cepa silvestre sobreexpresando *RPB6*. Los valores fueron normalizados a los niveles del rRNA *18S*. Los oligonucleótidos específicos usados se recogen en la tabla suplementaria 4 de Materiales y Métodos.

El incremento en la dosis de *RPB6* restaura la cantidad de mRNA a nivel de la cepa silvestre para la mayoría de los genes. De nuevo el gen *MFa2* presenta diferencias en el mutante *rpo21-4* con respecto al *rpb1-84*, aunque su nivel aumenta más de 13 veces. En concordancia con estos resultados, la cantidad de Rpb1 unido tanto a los promotores como a la región 3' de los genes analizados, mediante experimentos de ChIP, no muestra diferencias significativas entre las cepas mutantes y la silvestre cuando se sobreexpresa *RPB6*, (Figura R25); en este caso, el experimento se hizo solo usando el anticuerpo 8WG16.

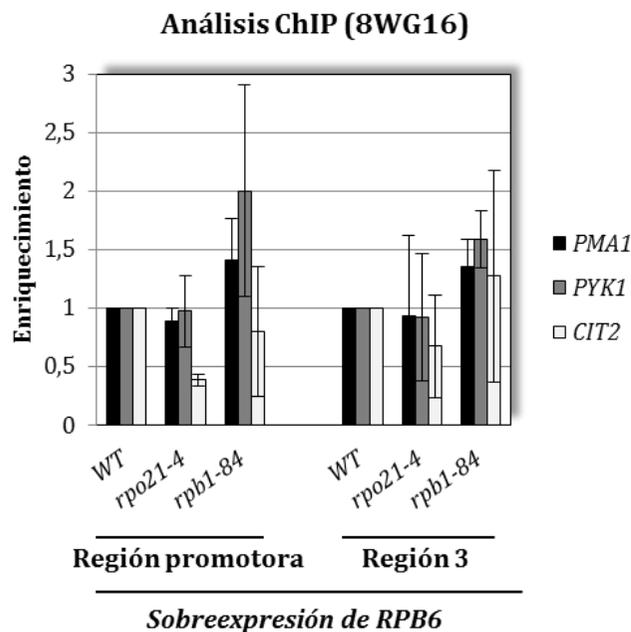


Figura R25: Análisis del reclutamiento de Rpb1 a los genes (ChIP) en los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre sobreexpresando *RPB6*, usando el anticuerpo 8WG16.

Todos estos datos concuerdan con el hecho de que mutaciones en el dominio conservado del pie alteran el proceso de ensamblaje de la RNA pol II, lo que conduce a una menor cantidad de enzima asociada a los genes provocando un defecto de transcripción. Sin embargo, este efecto no es un efecto global consecuencia de alterar el pie de la enzima ya que los niveles de *ACT1* no se ven alterados. Esto, junto con el hecho de que los niveles de mRNA detectado superan al nivel de RNA pol II reclutada (Figuras R22 y R23) nos lleva a pensar que existe algún otro mecanismo implicado en

la biogénesis, transporte o degradación del mRNA que se encuentra alterado en los mutantes *rpo21-4* y *rpb1-84*, lo que se estudiará en el apartado 6.

3.6 EFECTO DE LAS MUTACIONES EN EL PIE DE LA RNA POLIMERASA II SOBRE LOS COMPLEJOS DE PREINICIACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN

Puesto que el reclutamiento de la RNA pol II en los genes decrece drásticamente en los mutantes del pie, quisimos comprobar qué ocurría con el complejo de preiniciación (PIC). Se ha descrito previamente que el reclutamiento y ocupación de la proteína de unión a TATA (TBP) y de la RNA pol II en los promotores se produce de manera concertada (Kuras and Struhl, 1999; Lee et al., 2010). Para analizar si la caída en la ocupación de la RNA pol II en la región promotora se correlacionaba con una pérdida de la ocupación de TBP, se llevó a cabo una inmunoprecipitación de cromatina para TBP y RNA pol II en la cepa silvestre y en los mutantes *rpo21-4* y *rpb1-84*, usando cepas que contienen TBP::HA (cepa YFN339). Como se observa en la Figura R26, mientras que la ocupación de la RNA pol II decrece en los mutantes del pie (como se había visto previamente), la ocupación de TBP permanece constante, siendo el ratio TBP/Rpb1 mayor en los mutantes que en su cepa isogénica silvestre. Esto se correlaciona con datos previamente publicados que establecen la existencia de promotores donde TBP se ensambla con un complejo de preiniciación parcial que comprende TFIID, TFIIB y Mediador pero que carece de TFIID, TFIIE y RNA pol II (Choukrallah et al., 2012). Además, se ha descrito que la delección del gen codificante de la subunidad Srb10 del mediador, *srb10Δ*, reduce el reclutamiento de la RNA pol II sin reducir la unión de TBP a los promotores (Qiu et al., 2004).

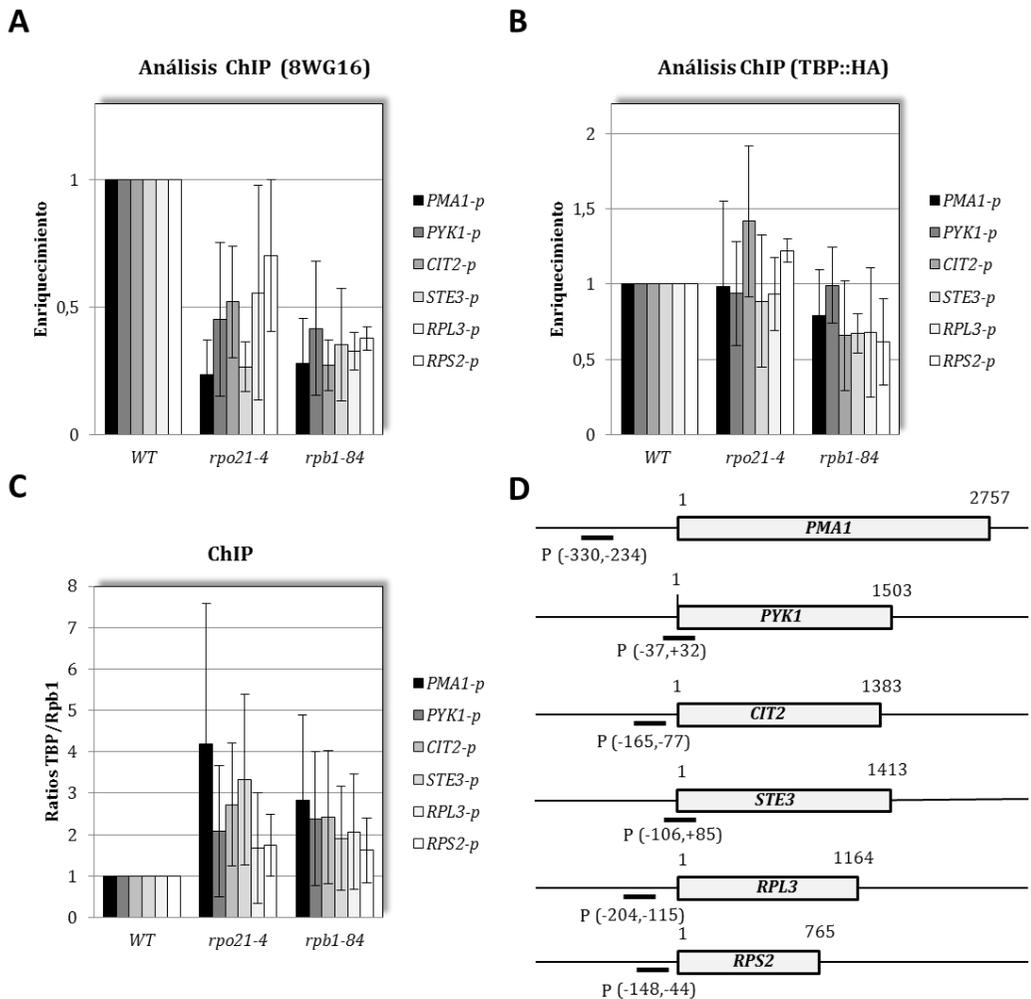


Figura R26: A) Análisis mediante inmunoprecipitación de cromatina del reclutamiento de Rpb1 a los promotores en la cepa silvestre y en los mutantes del dominio conservado del pie. B) Inmunoprecipitación de cromatina con TBP-HA usando las mismas cepas. C) Ratio de ocupación TBP frente a ocupación Rpb1. D) Posición de los oligonucleótidos usados. La secuencia y nombre de los mismos se recoge en la tabla suplementaria 4 de Materiales y Métodos.

Aunque no parece haber un defecto evidente en el reclutamiento de TBP, se generó un plásmido pCM190-TBP para analizar el efecto de la sobreexpresión del gen correspondiente, *SPT15*. Para ello, se amplificó el gen a partir de DNA genómico usando los oligonucleótidos específicos TBP-501/301 y se insertó en el plásmido pCM190 en los sitios *Bam*HI y *Pst*I, tras ser previamente clonado en el vector de clonación pGEM-T.

De la misma manera, para analizar el efecto de la mutación de *SPT15* se amplificó el módulo *spt15Δ::KanMX4* a partir de una cepa diploide que contenía dicho alelo (Euroscarf) con los oligonucleótidos *SPT15-501/301* y se introdujo por recombinación homóloga en una cepa diploide generada mediante el cruce de las cepas Gr21-2d e YPH499. Tras la transformación con un plásmido conteniendo un alelo mutante de *SPT15*, pYCI-*spt15-601* (Cang et al., 1999), se procedió a la obtención de una cepa haploide, YFN473, mediante esporulación de la cepa diploide. Esta cepa se utilizó para generar las cepas silvestre y mutantes del pie, mediante transformación con los plásmidos que contenían las mutaciones *rpo21-4* y *rpb1-84* (así como con el plásmido silvestre) y selección en medio conteniendo FOA.

En concordancia con los datos de ChIP, la sobreexpresión del gen *SPT15* no tiene un efecto significativo en el crecimiento de los mutantes del pie, aunque provoca un ligero agravamiento del mismo (Figura R27A). Además, la mutación de dicho gen, *spt15-601*, agrava ligeramente el fenotipo del mutante *rpb1-84* y este agravamiento no se corrige por sobreexpresión de *RPB6* (Figura R27B y C).

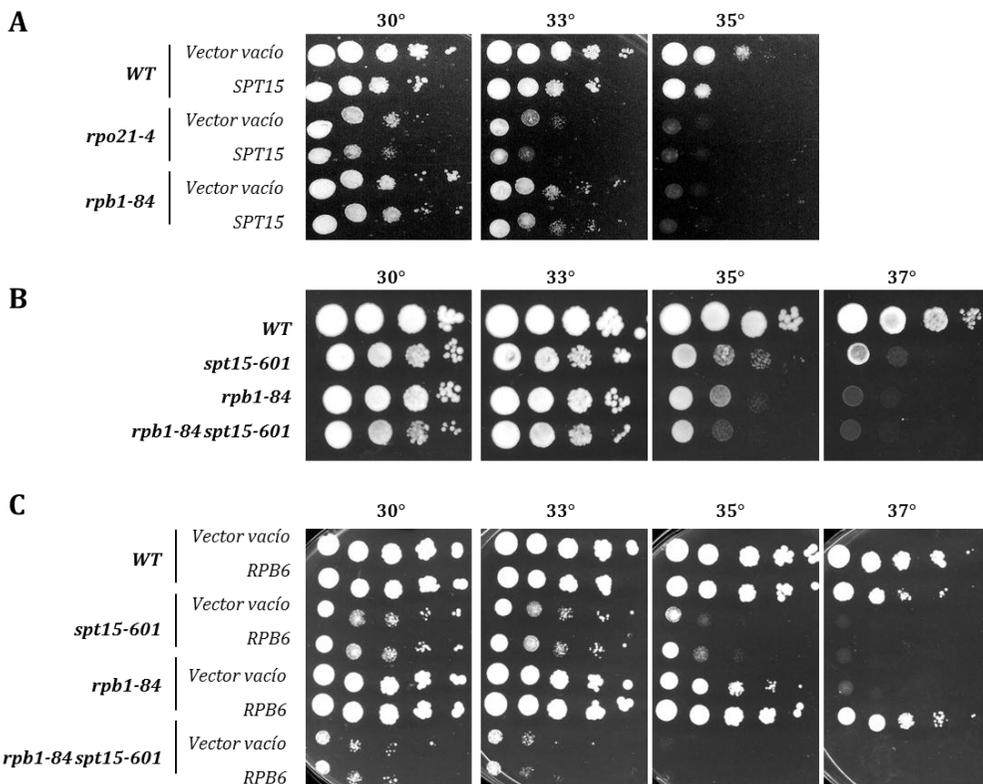


Figura R27: A) Sobreexpresión del gen *SPT15* que codifica la proteína TBP en los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre. Se compara el crecimiento con las mismas cepas transformadas con un vector vacío, mediante la siembra de diluciones seriadas en medio mínimo SD con requerimientos a distintas temperaturas B) Análisis genético entre la mutación *spt15-601* y la mutación *rpb1-84*. Se compara el crecimiento con el de los mutantes simples mediante la siembra de diluciones seriadas en medio rico YPD a distintas temperaturas. C) Sobreexpresión de *RPB6* en los mutantes simples, así como en los dobles mutantes anteriores. Se compara el crecimiento con el de las cepas transformadas con un vector vacío, mediante la siembra en medio mínimo SD con requerimientos a distintas temperaturas.

Como se ha comentado previamente, se ha descrito que la delección del gen *SRB10* (que codifica la subunidad Srb10 del mediador) (Qiu et al., 2004), así como mutaciones en *SPT15* (Choukrallah et al., 2012), tienen un gran impacto en la ocupación del promotor tanto por la RNA pol II como por TBP. Además, el módulo de la cabeza del Mediador interacciona con las subunidades Rpb4/7 de la RNA pol II, así como con el *clamp*, dando lugar a cambios estructurales en la enzima que dejan el sitio activo accesible al DNA de la región promotora (Cai et al., 2012). Se ha descrito también una interacción física directa entre la subunidad Rpb3 de la RNA pol II y la subunidad Srb4 del Mediador que es esencial para el reclutamiento global de la RNA pol II *in vivo* (Soutourina et al., 2011), siendo la función de la subunidad Srb4 central para la formación del complejo de preiniciación.

En base a estos datos se procedió al estudio de las interacciones genéticas entre los mutantes *rpo21-4* y *rpb1-84* y mutaciones de genes de distintas subunidades del mediador. La cepa YFN184 conteniendo la delección de *RPB1* (y un plásmido pFL44L-*RPB1*) así como la delección de *SRB9* se generó mediante cruce de dos cepas portadoras de sendas mutaciones. La cepa YFN342 conteniendo el gen *SRB10* delecionado así como la delección de *RPB1* (y un plásmido pFL44L-*RPB1*) se generó por amplificación del módulo *srb10::KanMX4* desde una cepa conteniendo la mutación, con los oligonucleótidos *SRB10-501/301* y posterior inserción en la cepa madre Gr21-2d por recombinación homóloga. La cepa YFN454 conteniendo el gen *RPB1* delecionado (y un plásmido pFL44L-*RPB1*), así como una etiqueta HA en la subunidad Srb4 del Mediador, se generó mediante la amplificación del módulo *SRB4::HA::HIS3* desde una cepa conteniendo la construcción (B. Guglielmi), usando los oligonucleótidos *SRB4-501/301*, y posterior recombinación homóloga en YFN234.

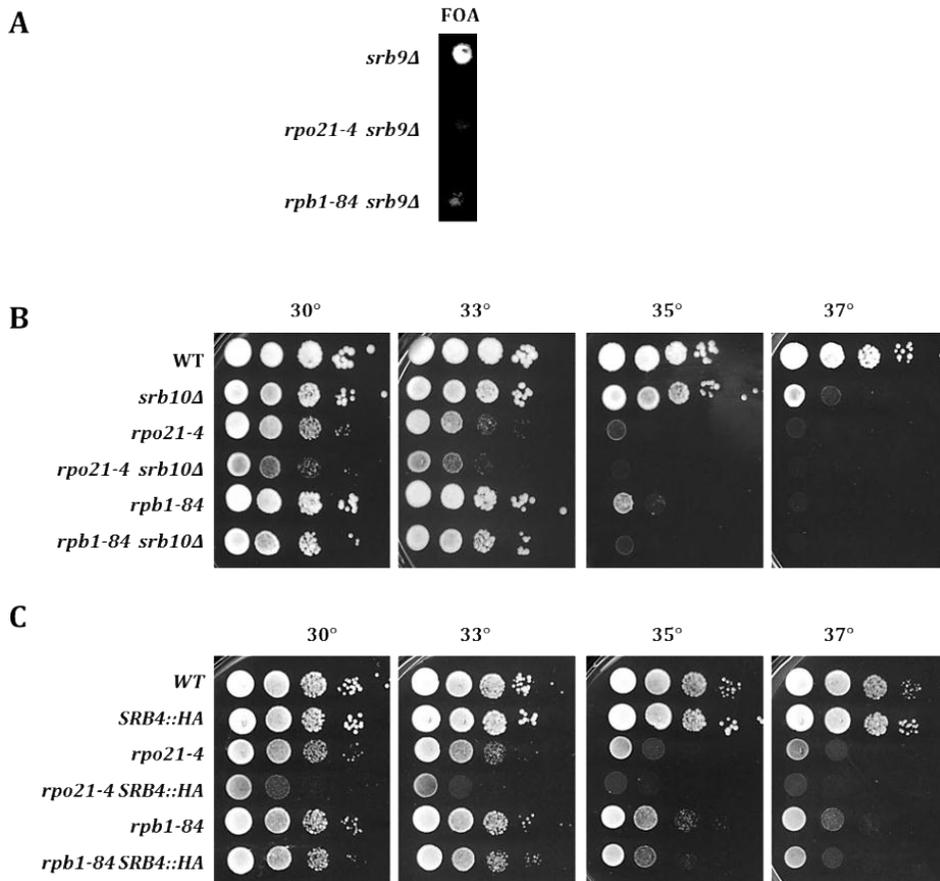


Figura R28: A) Delección del gen de la subunidad Srb9 del mediador en los mutantes del dominio conservado del pie. Se muestra el crecimiento en SD-FOA. B) Delección del gen de la subunidad Srb10 del mediador en los mutantes *rpo21-4* y *rpb1-84*. Se compara con el crecimiento de los mutantes simples mediante la siembra de diluciones seriadas de las cepas en medio rico YPD a distintas temperaturas. C) Etiquetado de Srb4-HA en los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre. Se compara el crecimiento con los mutantes simples y su cepa silvestre, mediante la siembra de diluciones seriadas a distintas temperaturas en medio rico YPD.

Como podemos ver en la Figura R28A, la delección del gen de la subunidad Srb9 del mediador resultó ser letal en el mutante *rpo21-4*, y dio un fenotipo agravado en el mutante *rpb1-84* (Figura R28A), mientras que la delección de Srb10 agrava el fenotipo tanto del mutante *rpo21-4* como del *rpb1-84* (Figura R28B). Además, en la Figura R28C podemos comprobar que una etiqueta HA en el extremo carboxilo terminal de Srb4 agrava también el crecimiento de ambos mutantes. Estos datos muestran una interacción genética clara entre mutantes del mediador y los mutantes

del pie. Con objeto de determinar si estas interacciones podrían estar relacionadas con el incorrecto ensamblaje de la RNA pol II nos propusimos comprobar si la sobreexpresión de *RPB6* era suficiente para restaurar el defecto de los mutantes del pie cuando se combinan con mutaciones del mediador (Figura R29).

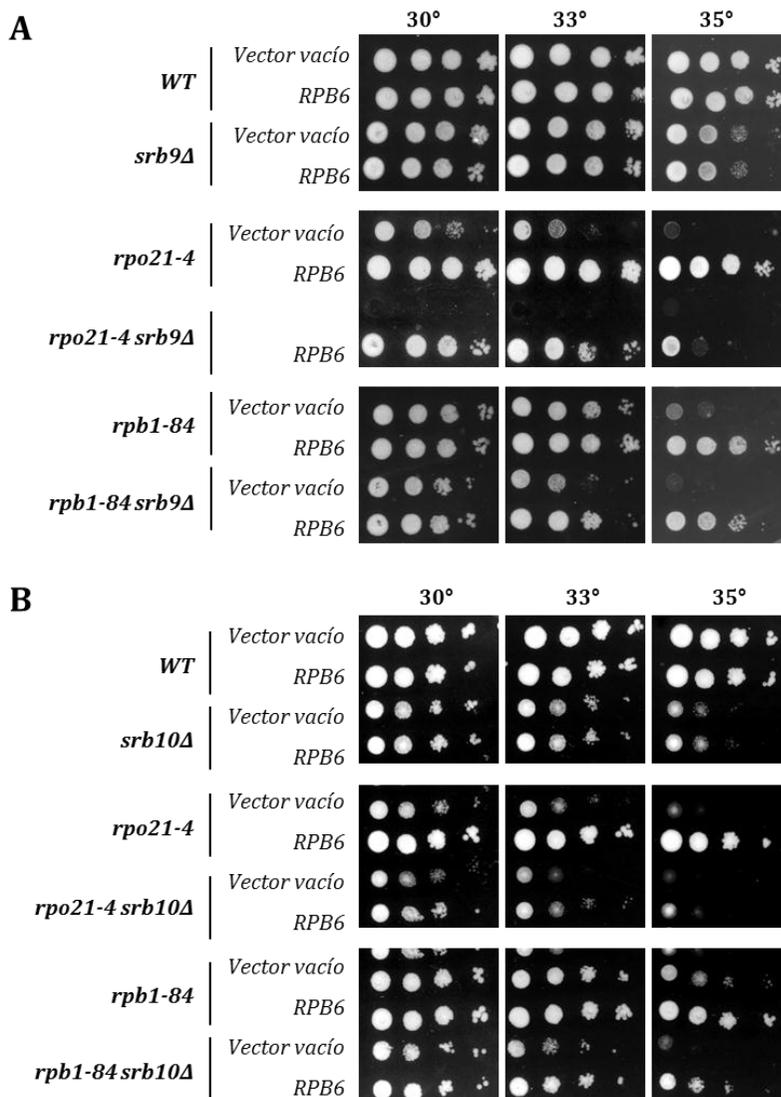


Figura R29: A) Sobreexpresión de *RPB6* en los mutantes simples del pie así como en los mutantes dobles *rpo21-4 srb9Δ* y *rpb1-84 srb9Δ*. B) Sobreexpresión de *RPB6* en los mutantes simples del pie así como en los mutantes dobles *rpo21-4 srb10Δ* y *rpb1-84 srb10Δ*. En ambos casos se compara el crecimiento mediante la siembra en gota de diluciones seriadas de las cepas mutantes simples y dobles en comparación con su cepa isogénica silvestre, a distintas temperaturas en medio mínimo SD con requerimientos. Se compara con las cepas transformadas con un vector vacío.

Como se observa, la sobreexpresión de *RPB6* suprime parcialmente el fenotipo de crecimiento lento de los dobles mutantes *rpb1-84 srb9Δ* (Figura R29A), *rpo21-4 srb10Δ* y *rpb1-84 srb10Δ* (Figura R29B). Igualmente, la sobreexpresión de *RPB6* suprime la letalidad sintética entre los mutantes *rpo21-4* y *srb9Δ*. Sin embargo, esta corrección no es completa, como la que ocurre en los mutantes simples del pie. En concordancia con estos resultados, la sobreexpresión de *SRB4* suprime parcialmente el defecto de crecimiento de los mutantes del pie (Figura R30A), aunque dicha supresión no ocurre por la sobreexpresión de *SRB9* ni *SRB10* (Figura R30B y C).

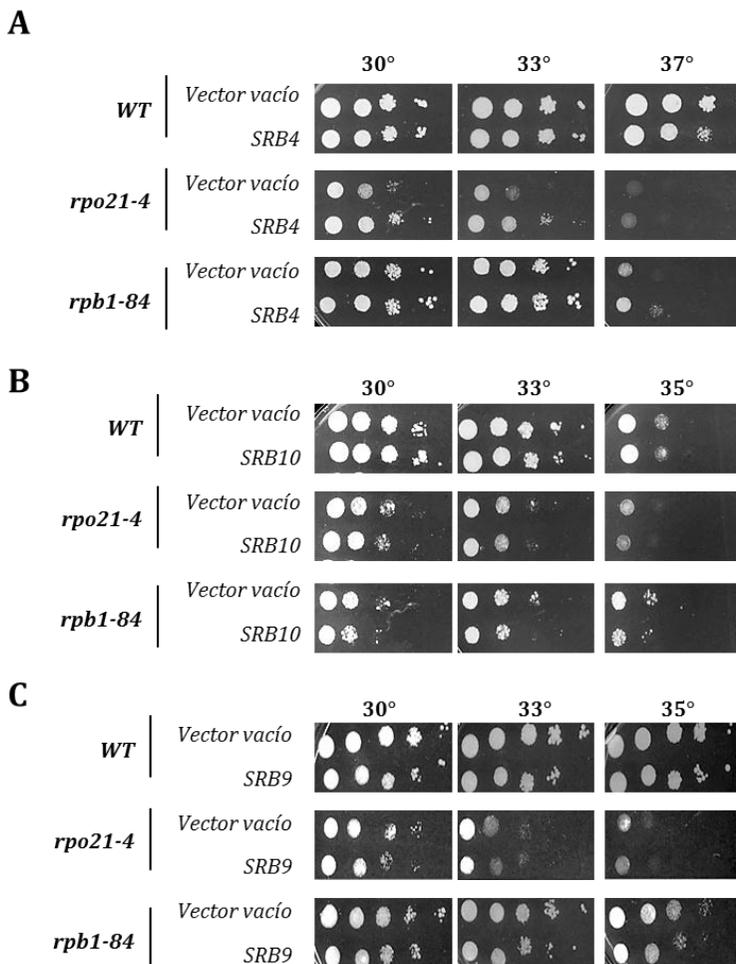


Figura R30: A) Sobreexpresión de *SRB4* en los mutantes del pie usando un plásmido pVV200-Med17. B) Sobreexpresión de *SRB10* usando el plásmido pGAL-*SRB10* en las mismas cepas. C) Sobreexpresión de *SRB9* usando el plásmido pVV200-*SRB9*. En todos los casos se compara el fenotipo con el presentado por las mismas cepas conteniendo vectores vacíos, así como con el fenotipo de la cepa isogénica silvestre. Se muestra el crecimiento de diluciones seriadas de las cepas a distintas temperaturas en medio mínimo SD con requerimientos.

Para ayudar a esclarecer la relación entre TBP, la RNA pol II y el Mediador, se analizó la sobreexpresión del gen *SUA7* (que codifica la proteína TFIIB) en los mutantes del pie, ya que el Mediador juega un papel crítico en el ensamblaje del complejo de preiniciación (PIC) y el Mediador y TFIID se estabilizan el uno al otro en el PIC y estimulan el ensamblaje de TFIIB (Esnault et al., 2008). Como muestra la Figura R31, la sobreexpresión de *SUA7* recupera parcialmente el crecimiento lento de los mutantes *rpo21-4* y *rpb1-84*.

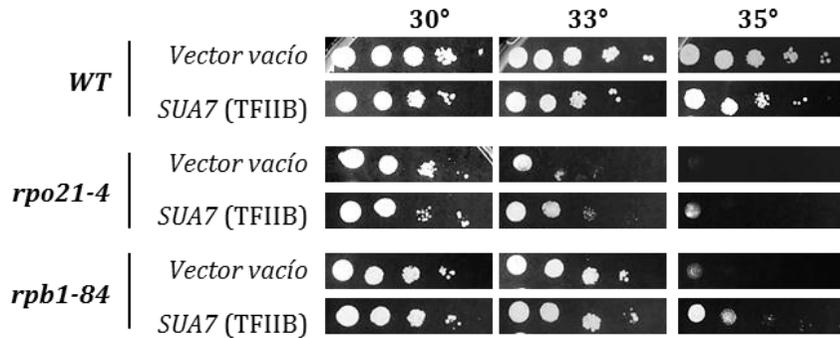


Figura R31: Sobreexpresión del gen *SUA7* (plásmido pGENU-*SUA7*) que codifica la proteína TFIIB en los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre. Se compara el crecimiento con las mismas cepas transformadas con un vector vacío. Se muestra el crecimiento de diluciones seriadas de las cepas a distintas temperaturas en medio mínimo SD con requerimientos.

Todos estos datos sugieren que la alteración del correcto ensamblaje de la RNA pol II afecta a la asociación concertada de TBP y la RNA pol II para regular la transcripción, probablemente alterando la estabilización del complejo de preiniciación.

4 EFECTO DE LA ALTERACIÓN DEL PIE DE LA RNA POLIMERASA II EN LA FOSFORILACIÓN DEL CTD

Nuestro grupo ha descrito la interacción entre el pie de la RNA pol II y las proteínas Mvp1 y Spo14, implicadas en la iniciación y/o elongación temprana de la transcripción. La delección de los genes correspondientes a estas proteínas provoca un incremento en la fosforilación del CTD de la RNA pol II en las serinas en posición 5 (CTD-Ser5P) (García-Lopez et al., 2011). Por tanto, nos propusimos investigar si las mutaciones en el pie de la RNA pol II podrían conducir también a este fenotipo. Para ello, se usó la construcción Rpb3-TAP, tanto en la cepa silvestre como en las cepas mutantes para llevar a cabo una purificación de la enzima. Mediante western-blot, se analizó la cantidad de Rpb1 asociado a Rpb3 así como el nivel de fosforilación en CTD-Ser5P y CTD-Ser2P usando el anticuerpo CTD4H8 (Millipore) y ab5095 (Abcam), respectivamente. Como se observa en la Figura R32, los ratios relativos de CTD-Ser5P/Rpb1 son más elevados en los mutantes que en su cepa isogénica silvestre. Sin embargo, los niveles de fosforilación en CTD-Ser2P no muestran diferencias significativas entre la cepa silvestre y los mutantes del pie. Para comprobar si el ensamblaje correcto del complejo es importante para la modulación de la fosforilación del CTD, se llevó a cabo la sobreexpresión de *RPB6* en dichas cepas y una purificación (con TAP) de la RNA pol II tanto en la cepa silvestre como en los mutantes *rpo21-4* y *rpb1-84*. Como se observa en la Figura R32, el ratio relativo CTD-Ser5P/Rpb1 decrece significativamente en el mutante *rpo21-4*. Por el contrario, en el mutante *rpb1-84* no hay variaciones significativas respecto a los del mismo mutante conteniendo el plásmido vacío.

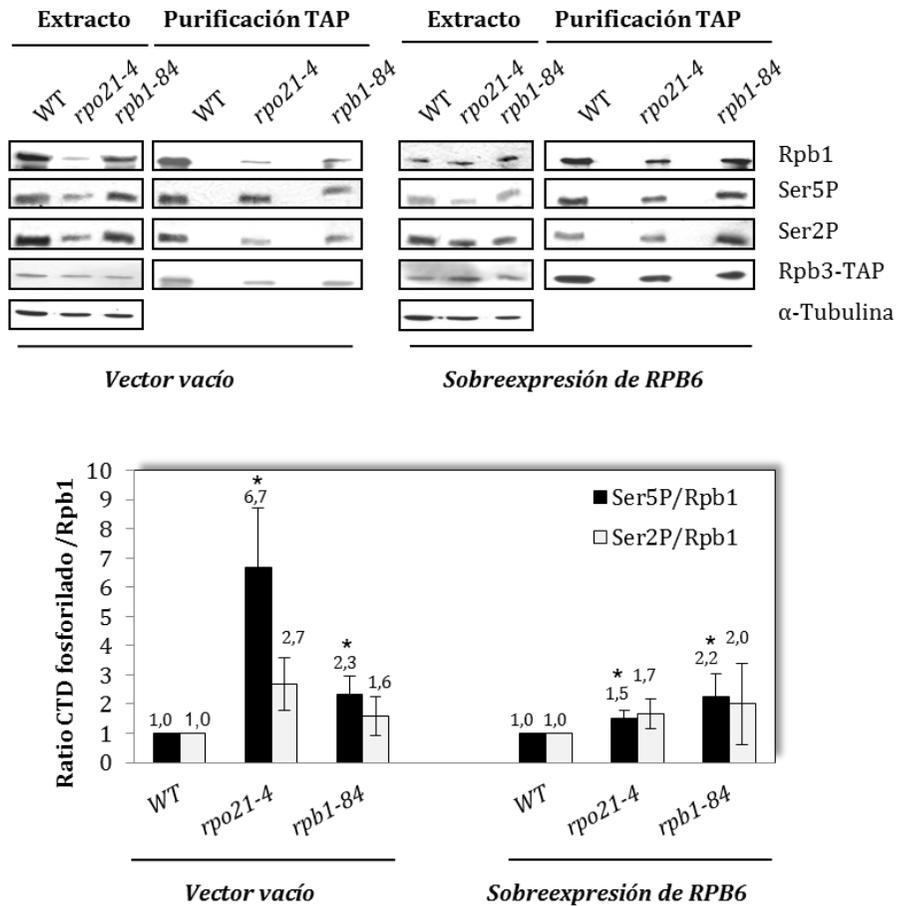


Figura R32: En la parte superior izquierda se muestran los western-blot de extractos proteicos totales y purificaciones Rpb3-TAP de los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre transformados con un vector vacío. En la parte superior derecha se muestran los western-blot de extractos proteicos y purificaciones Rpb3-TAP en las mismas cepas bajo sobreexpresión de *RPB6*. En la parte inferior se muestran las cuantificaciones de las purificaciones anteriores. Las barras con asterisco son estadísticamente significativas (* $P < 0.05$).

Con objeto de analizar la posibilidad de que la caída en la cantidad de RNA pol II libre hipofosforilada pudiese influir en el incremento en los ratios CTD-Ser5P/Rpb1 en los mutantes del pie, analizamos esos mismos ratios usando fracciones cromatínicas. De esta manera, aislamos cromatina de las distintas cepas, y analizamos por western-blot las proteínas asociadas a ella. Como podemos ver en la Figura R33, la cantidad de RNA pol II fosforilada en CTD-Ser5P es también más alta en ambos mutantes, aunque estos ratios son más bajos que los encontrados en la enzima purificada. De la misma manera, los niveles de CTD-Ser2P no muestran diferencias

significativas entre la cepa silvestre y los mutantes. De nuevo la sobreexpresión de *RPB6* da lugar a resultados similares a los obtenidos para la enzima purificada.

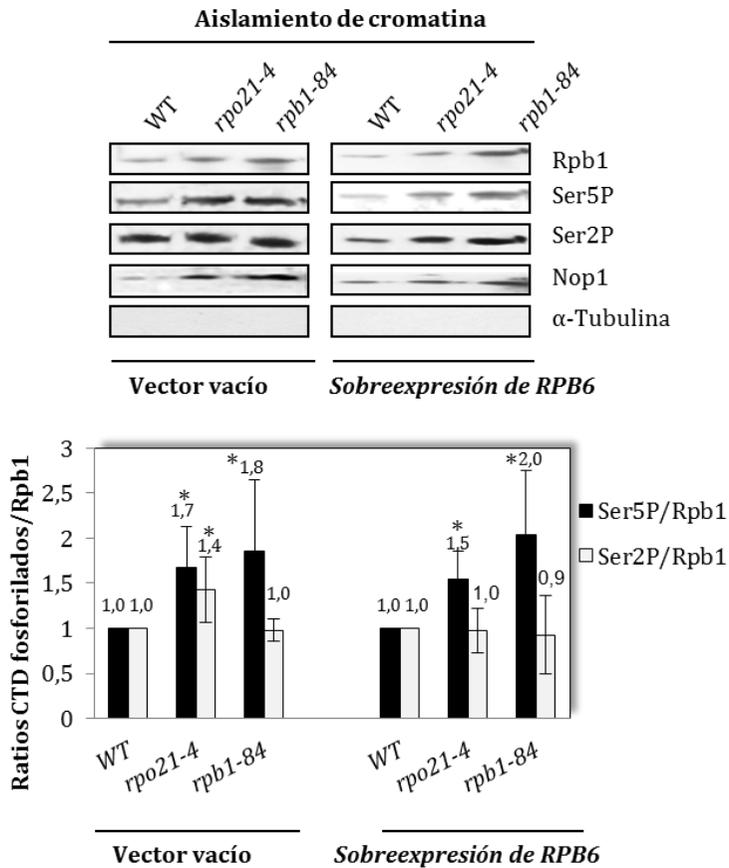


Figura R33: En la parte superior se muestran los western-blot de Rpb1 hipo e hiperfosforilada asociado a la cromatina en los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre, con y sin sobreexpresión de *RPB6*. Nop1 es una proteína nuclear usada como control positivo. Tubulina es una proteína citoplasmática usada como control negativo. En la parte inferior se muestran las cuantificaciones de los western-blot anteriores. Barras con asterisco son estadísticamente significativas (* $P < 0.05$).

Todos estos datos indican que el correcto ensamblaje de la RNA pol II es importante para mantener una correcta fosforilación del CTD, al menos en CTD-Ser5P. Sin embargo, el pie de la RNA pol II es importante por sí mismo para la modulación de la fosforilación del CTD, ya que la sobreexpresión de *RPB6* no es suficiente para restaurar totalmente el defecto de fosforilación de ambos mutantes.

De la misma manera, quisimos analizar la ocupación de la RNA pol II fosforilada en CTD-Ser5P en distintos genes mediante inmunoprecipitación de cromatina usando el anticuerpo CTD4H8 (Figura R34).

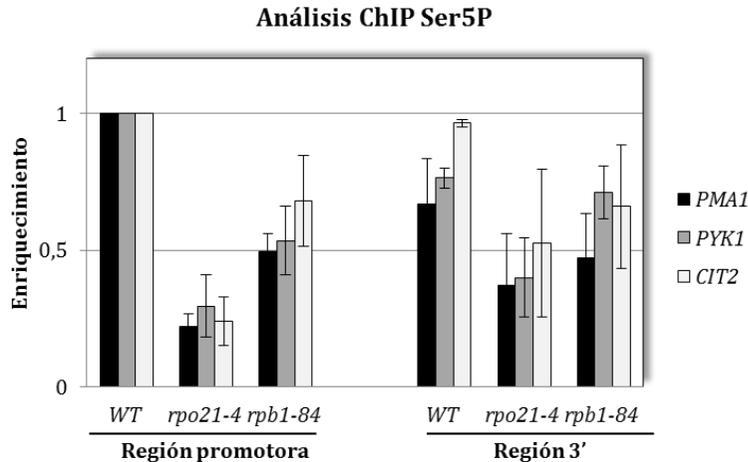


Figura R34: Inmunoprecipitación de cromatina en los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre usando el anticuerpo CTD4H8 frente a CTD-Ser5P. Los oligonucleótidos usados son los mismos que los usados en experimentos anteriores de ChIP.

Como muestra la Figura R34, la ocupación de la RNA pol II fosforilada en CTD-Ser5P es menor en los mutantes del pie que en la cepa isogénica silvestre, lo que concuerda con el hecho de que hay menos cantidad de Rpb1 en la célula. Por otro lado, el análisis de los ratios de fosforilación en CTD-Ser5P frente a Rpb1, analizado tanto con el anticuerpo 8WG16 como y-80, muestra resultados similares (Figura R35A y B). Como podemos observar, los ratios CTD-Ser5P/Rpb1 son mayores en los mutantes *rpo21-4* y *rpb1-84* en las regiones 3' de las ORFs de los genes *PMA1*, *PYK1* y *CIT2* que en las zonas promotoras, indicando una caída en los ratios de fosforilación CTD-Ser5P/Rpb1 en 5'/3' (R35C). Este dato es interesante ya que en la región 3' de los genes, los niveles de CTD-Ser5P son normalmente muy bajos.

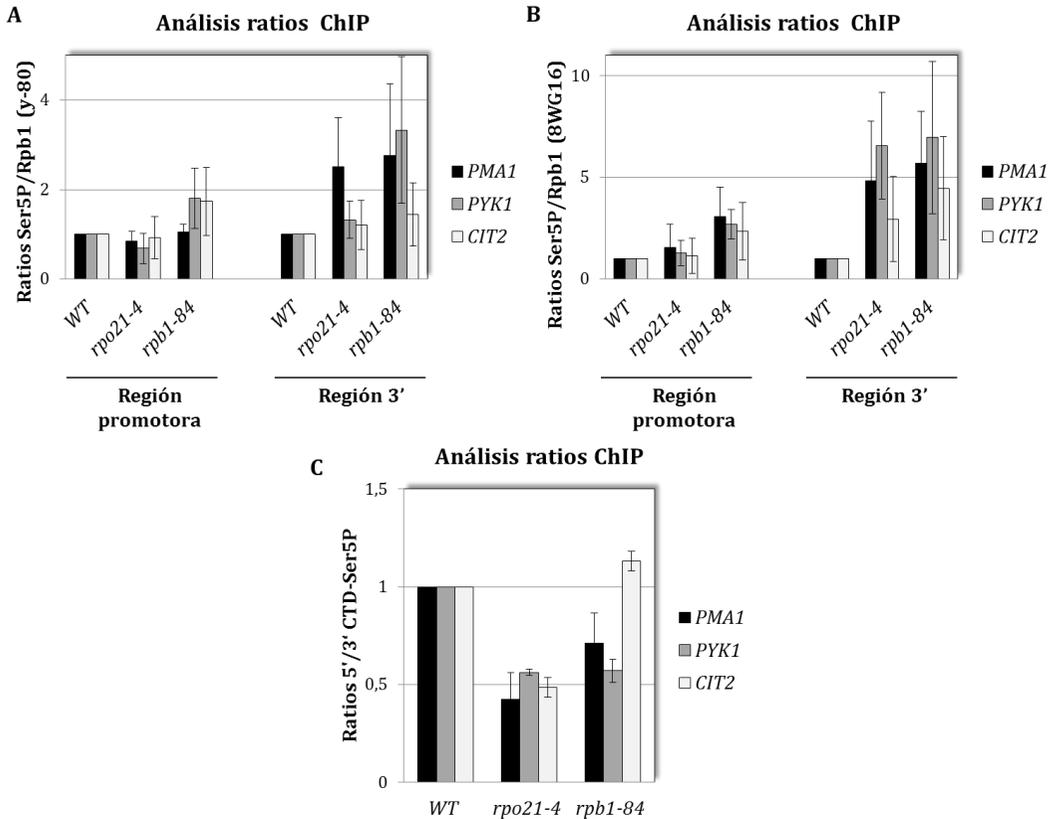


Figura R35: A) Ratios de ocupación CTD-Ser5P (anticuerpo CTD4H8) frente a Rpb1 (calculado usando el anticuerpo y-80). B) Ratios de ocupación CTD-Ser5P frente a Rpb1 (calculado usando el anticuerpo 8WG16). C) Ratios calculados a partir de la ocupación de la RNA pol II fosforilada en CTD-Ser5P en los promotores de los genes frente a la ocupación en la zona 3' de los mismos. Se usaron los datos de ChIP usando el anticuerpo CTD4H8.

Todos estos datos sugieren un incremento en la cantidad de RNA pol II parada, probablemente como consecuencia de un defecto en la transición de la iniciación a la elongación de la transcripción.

Para seguir profundizando en la parada de la RNA pol II en los mutantes del pie, decidimos estudiar el ciclo de fosforilación del CTD en dichas cepas. Además, en un análisis de supresión génica con el mutante *rpo21-4* mediante la transformación con una genoteca construida en el plásmido de alto número de copias (pFL44L) (Stettler et al., 1993) se encontró un plásmido que contenía el gen *RTR1* que codifica la fosfatasa de CTD-Ser5P recientemente descrita necesaria para el paso de la iniciación a la elongación de la transcripción. (Gibney et al., 2008; Mosley et al., 2009).

El hecho de que al sobreexpresar una fosfatasa de CTD-Ser5P se corrija parcialmente el fenotipo de termosensibilidad de la cepa, está en concordancia con nuestros datos mostrando acumulación de CTD-Ser5P.

4.1 ANÁLISIS DE LAS FOSFATASAS DEL CTD

En primer lugar, se analizó el efecto de la sobreexpresión de *RTR1* en ambos mutantes del pie usando el plásmido extraído de la genoteca pFL44L-*RTR1* (Figura R36A). Puesto que *Rtr1* no es la única fosfatasa de CTD-Ser5P descrita, decidimos analizar también la sobreexpresión de *Ssu72*, la clásica fosfatasa de CTD-Ser5P, mediante el uso del plásmido pM647 [pRS423-*SSU72*] (Krishnamurthy et al., 2004) (Figura R36B).

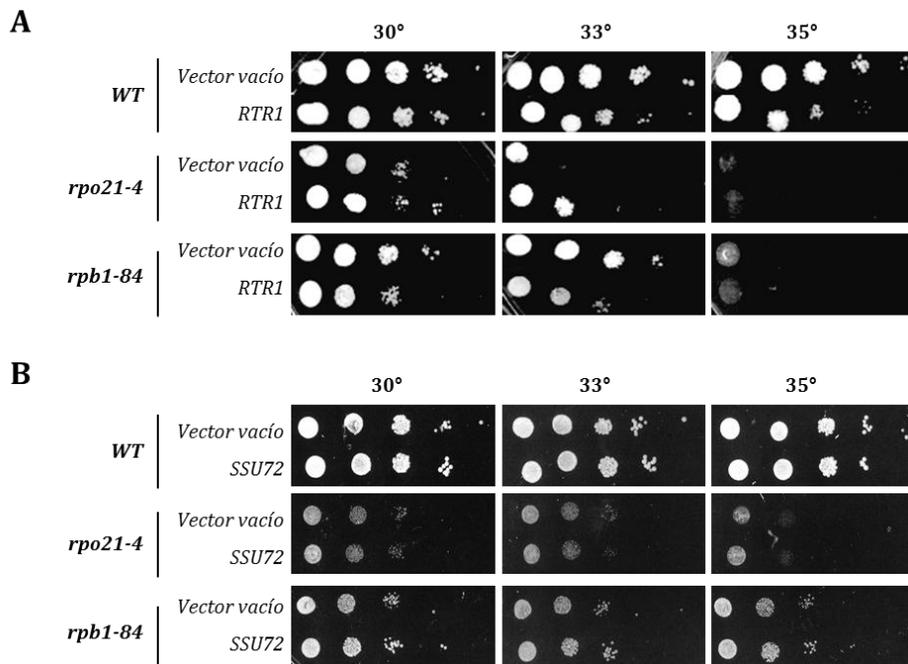


Figura R36: A) Sobreexpresión de la fosfatasa de CTD-Ser5P, *Rtr1*, en los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre. B) Sobreexpresión de la fosfatasa de CTD-Ser5P, *Ssu72*, en los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre. Se compara el crecimiento con el de las mismas cepas transformadas con un vector vacío, mediante la siembra de diluciones seriadas en medio mínimo SD con requerimientos a distintas temperaturas.

La sobreexpresión de *RTR1* corrige parcialmente la termosensibilidad del mutante *rpo21-4*, agravando ligeramente el crecimiento del mutante *rpb1-84*. Este

agravamiento se observa también en la cepa silvestre y ha sido previamente del descrito (Gibney et al., 2008). Por otro lado, la sobreexpresión de Ssu72 no corrige el defecto de crecimiento de los mutantes, sugiriendo que es un efecto específico de Rtr1 y no de todas las fosfatasa de CTD-Ser5P.

Por otro lado, quisimos comprobar el efecto de la delección de *RTR1* en combinación con las mutaciones del pie. Para ello generamos la cepa YFN166 mediante el cruce de la cepa madre Gr21-2d y una cepa conteniendo *rtr1Δ* (Euroscarf). Además, generamos la cepa YFN442 mediante el cruce de YFN234 y una cepa que contenía la construcción *SSU72::13MYC*. Ambas cepas se transformaron con los plásmidos conteniendo las mutaciones del pie y se sembraron en SD suplementado con 5-FOA para eliminar el plásmido con marcador *URA3* conteniendo *RPB1* silvestre. Como podemos ver en la Figura R37A y B, tanto la delección de *RTR1* como el etiquetado de Ssu72 con Myc presentan letalidad sintética con las mutaciones del pie, lo que sugiere que el proceso de defosforilación de residuos de CTD-Ser5P se encuentra alterado en estos mutantes.

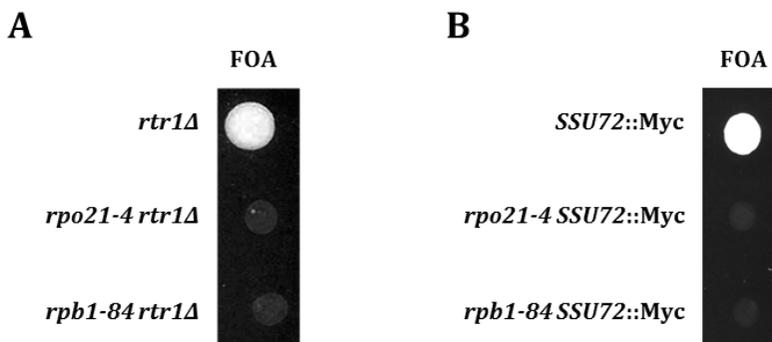


Figura R37: A) Interacción genética entre las mutaciones del pie y la delección del gen *RTR1* (cepa YFN166). B) Interacción genéticas entre las mutaciones del pie y el alelo *SSU72::Myc* (cepa YFN442). En ambos casos se muestra el crecimiento en medio mínimo SD suplementado con 5-FOA.

Por tanto, es posible que los mutantes del pie presenten un defecto en la fosforilación temprana de CTD-Ser5P dando unos niveles anormalmente elevados y que, dicho defecto solo pueda ser revertido por la sobreexpresión de Rtr1. Sin embargo, en base a las interacciones genéticas es posible que el reclutamiento de la fosfatasa esencial Ssu72 esté comprometido en estas cepas, y, por tanto, los mutantes

no puedan prescindir de la otra fosfatasa Rtr1 (que en condiciones normales no es esencial). Para probar esta hipótesis, decidimos analizar el fenotipo de los dobles mutantes del pie con *rtr1Δ* en condiciones de sobreexpresión de *SSU72*. Para ello se amplificó el módulo *rpb1Δ::TRP1* de la cepa YFN428 con los oligonucleótidos específicos *RPB1-507/310* y se recombinó en YFN166, para cambiar el alelo *rpb1-Δ187::HIS3* por *rpb1Δ::TRP1*, dando lugar a la cepa YFN471. Esta cepa se transformó con los plásmidos que contenían las mutaciones del pie y con el plásmido pM647 [*SSU72 HIS3* 2 μ] y se sembró en SD suplementado con 5-FOA (Figura R38).

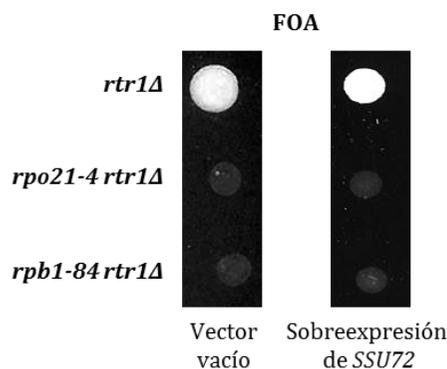


Figura R38: Interacción genética entre los mutantes del pie y la delección del gen *RTR1* (cepa YFN471) con y sin sobreexpresión de *SSU72*. Se muestra el crecimiento en medio mínimo SD suplementado con 5-FOA.

Como muestra la imagen R38, la sobreexpresión de *SSU72* no es suficiente para recuperar el fenotipo de los dobles mutantes *rpo21-4 rtr1Δ* y *rpb1-84 rtr1Δ*. Por tanto, no podemos afirmar que el papel de Rtr1 sea compensar la falta de interacción entre la RNA pol II y Ssu72, sugiriendo un papel más específico para Rtr1. Según esta hipótesis, la letalidad sintética que presentan los mutantes del pie con el alelo *SSU72::MYC*, se podría explicar como una consecuencia de entorpecer la defosforilación de las altas cantidades de CTD-Ser5P de la célula.

Para comprobar el efecto de la sobreexpresión de *RTR1* sobre la fosforilación del CTD en los mutantes del pie, se llevó a cabo una purificación de Rpb3-TAP en los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre tras la sobreexpresión de *RTR1* (Figura R39A), concluyendo que dicha sobreexpresión conduce a la reducción de los niveles de fosforilación de las cepas (Figura R39B). El efecto de Rtr1 sobre los niveles de Rpb1 observados será tratado en el apartado 5.3.

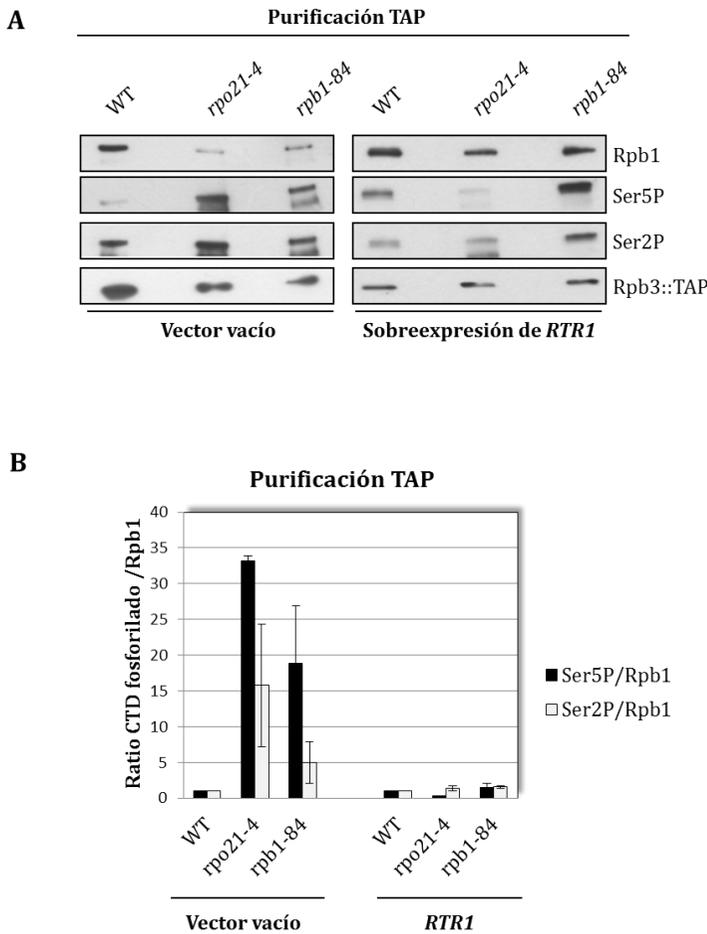


Figura R39: A) Purificación de Rpb3-TAP en los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre tras la sobreexpresión de *RTR1*. Se comparan los datos con los obtenidos en las mismas cepas transformadas con un vector vacío (cepa YFN290). B) Ratios CTD-Ser5P/Rpb1 y CTD-Ser2P/Rpb1 en dichas purificaciones.

Se ha descrito que Rtr1 viaja entre el núcleo y el citoplasma (Gibney et al., 2008) y se ha propuesto que puede desempeñar un papel en el ensamblaje de la enzima en el citoplasma (Boulon et al., 2010 ; Corden, 2011). Por tanto, nos planteamos estudiar la localización de Rtr1 en los mutantes del pie, mediante inmunolocalización usando un anticuerpo secundario fluorescente que reconoce la proteína A de la etiqueta TAP (unida a Rtr1) (Figura R40).

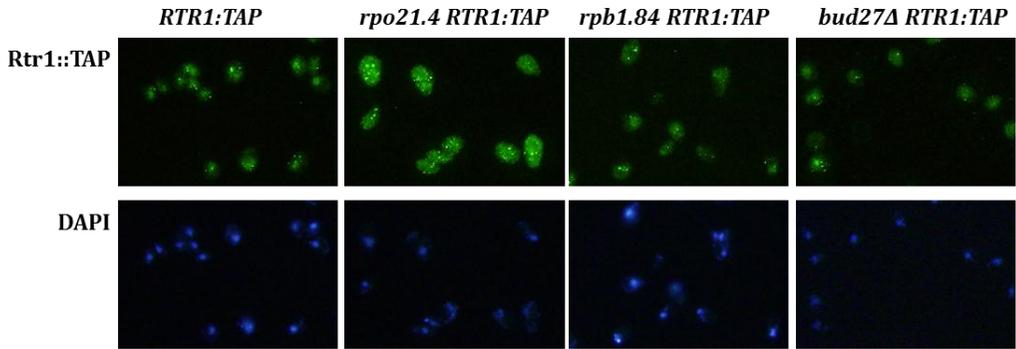


Figura R40: En la parte superior se muestran las inmunolocalizaciones de Rtr1 en los mutantes del pie así como en un mutante *bud27Δ* y en la cepa isogénica silvestre, usando un anticuerpo secundario frente a la etiqueta TAP. En la parte inferior se muestran las tinciones nucleares con DAPI.

En la Figura R40 se observa cierta deslocalización de Rtr1 en los mutantes del pie si los comparamos con la cepa isogénica silvestre. En la cepa silvestre, la señal de Rtr1 es predominantemente nuclear, mientras que en los mutantes del pie, la señal es similar en toda la célula. De la misma manera analizamos la localización de Rtr1 en el mutante *bud27Δ*, que conlleva deslocalización de las tres RNA polimerasas por problemas de ensamblaje de las mismas (Miron-Garcia et al., 2013), observando también cierta deslocalización de Rtr1.

Por tanto, nos planteamos analizar si la corrección del fenotipo de crecimiento de los mutantes del pie y la disminución de la acumulación de los niveles de CTD-Ser5P se debía a un defecto de interacción entre la RNA pol II y Rtr1 que pudiese afectar su correcto funcionamiento. En la Figura R41A, podemos comprobar que el fenotipo de las cepas no se agrava de manera significativa al añadir la etiqueta TAP a la proteína Rtr1. Por tanto, se llevó a cabo una inmunoprecipitación de proteínas usando un anticuerpo frente a la subunidad Rpb3 de la RNA pol II, en estas cepas, y se estudió la unión de Rtr1 a la misma (Figura R41B).

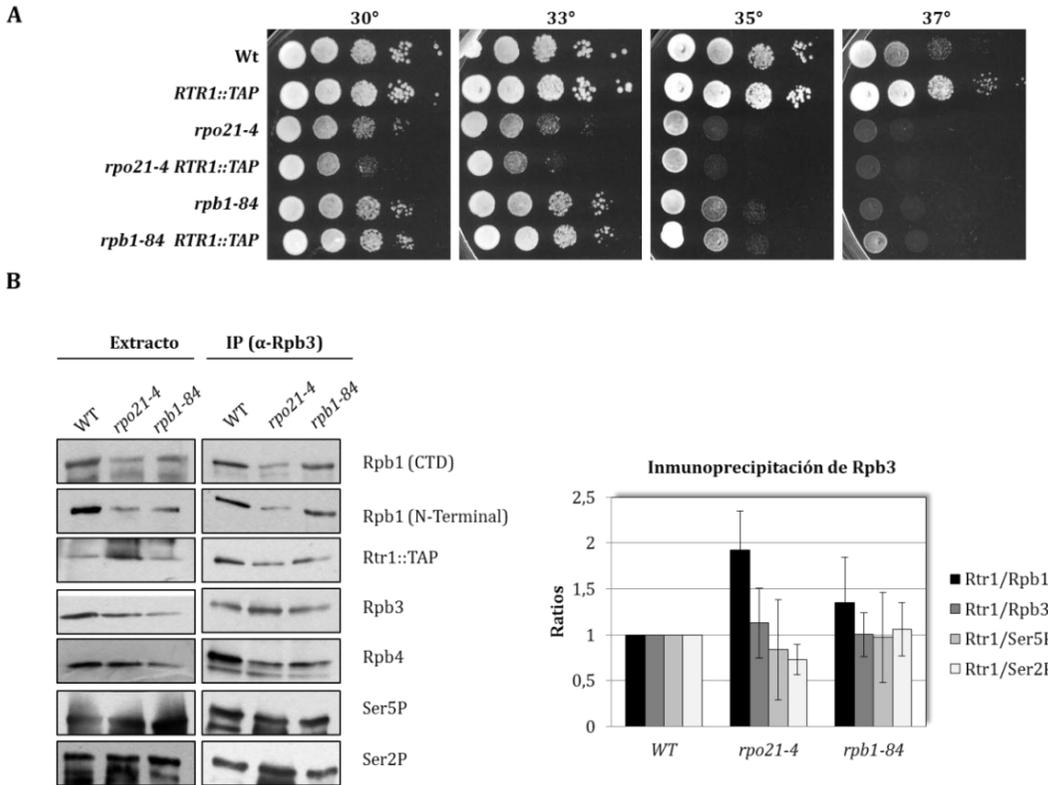


Figura R41: A) Etiquetado Rtr1-TAP en los mutantes del pie (cepa YFN332). Se compara el crecimiento de los mutantes con el de las cepas sin etiqueta y la cepa isogénica silvestre mediante el crecimiento en medio rico YPD a distintas temperaturas. B) Inmunoprecipitación de proteínas usando un anticuerpo frente a Rpb3, en las cepas generadas. Se muestran los resultados de los western-blot tanto en extractos de proteínas totales como en las inmunoprecipitaciones. A la derecha podemos ver las cuantificaciones de dichos western-blot.

Como se observa, hay menor cantidad de Rpb1 en los mutantes del pie que en su cepa isogénica silvestre, como habíamos descrito previamente. Además, hay más cantidad de Rtr1 asociada a Rpb1 en los mutantes, especialmente en el mutante *rpo21-4*. Sin embargo, si comparamos Rtr1 con su sustrato, es decir, Rpb1 fosforilado en CTD-Ser5P, los ratios son similares tanto en la cepa silvestre como en los mutantes del pie, al igual que ocurre con los ratios Rtr1/Rpb3, lo que sugiere una asociación anormal entre Rtr1 y la RNA pol II. Estos datos sugieren, además, que Rtr1 podrían unirse a subcomplejos carentes de Rpb1.

Por otro lado, quisimos analizar también la sobreexpresión de la fosfatasa de CTD-Ser2P del CTD, Fcp1, para descartar un posible defecto en la terminación de la

transcripción. Para ello usamos un plásmido centromérico pMGK86 [pRS316-*Fcp1*]. Como muestra la imagen R42A, el incremento en la dosis de *Fcp1* tiene un efecto negativo en el crecimiento de los mutantes del pie. Para confirmarlo, decidimos usar un plásmido que expresa el gen *Fcp1* bajo el control de un promotor *GAL1*. Tras la inducción del promotor con galactosa, seguimos viendo un defecto en el crecimiento de las cepas (Figura R42B). Por tanto, podemos concluir que el aumento en la dosis de *Fcp1* tiene un efecto negativo en el crecimiento de los mutantes del pie, lo que sugiere que estos mutantes no están mayoritariamente afectados en la terminación de la transcripción.

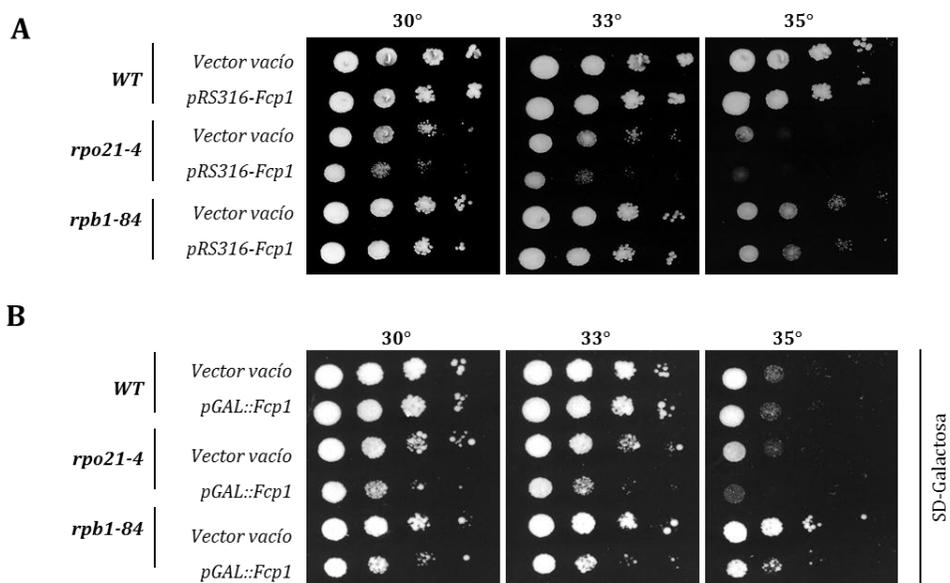


Figura R42: A) Sobreexpresión de la fosfatasa de CTD-Ser2P, *Fcp1*, en los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre usando un plásmido de bajo número de copias pRS316-*Fcp1*. B) Expresión de *Fcp1* inducido desde el promotor *GAL1* a partir del plásmido pGAL::*Fcp1* en los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre en SD con requerimientos-. Se compara el crecimiento con el de las mismas cepas transformadas con un vector vacío, mediante la siembra de diluciones seriadas a distintas temperaturas.

Todos estos datos sugieren que mutaciones en el pie de la RNA pol II causan un incremento en los niveles de CTD-Ser5P alterando la transición de la iniciación a la elongación de la transcripción, probablemente como consecuencia de una asociación anormal entre Rtr1 y la enzima, como sugieren los datos de inmunoprecipitación de proteínas, o una actividad anormal de Rtr1.

4.2 ANÁLISIS DE LAS QUINASAS DEL CTD

Como vimos en el apartado 3.6, los mutantes del pie poseen fuertes interacciones genéticas con la subunidad Srb10 del Mediador. Srb10 fosforila tanto el CTD-Ser5 como el CTD-Ser2 antes de la formación del complejo de preiniciación, regulando negativamente la iniciación de la transcripción (Hengartner et al., 1998). Además, se ha descrito que Srb10 coopera con la quinasa Kin28 para promover la reiniciación de la transcripción por parte de la RNA pol II (Liu et al., 2004). Por tanto, si Srb10 facilita la reiniciación de la transcripción, es lógico pensar que su papel pueda ser esencial en los mutantes del pie donde existe limitación en la cantidad de RNA pol II.

Kin28, es la quinasa responsable de la fosforilación del CTD-Ser5P y CTD-Ser7P, tanto *in vivo* como *in vitro* (Kim et al., 2009). La fosforilación en CTD-Ser5P permite a la RNA pol II salir del promotor y comenzar la elongación de la transcripción. Puesto que los mutantes del pie poseen unos elevados niveles de fosforilación en CTD-Ser5P, nos planteamos analizar si mutaciones en *KIN28* podrían reducir dichos niveles, mejorando el defecto de crecimiento de las cepas. Para generar las cepas conteniendo las mutaciones del pie y mutaciones en *KIN28*, se amplificó el módulo *kin28Δ:Kan* de una cepa diploide conteniendo también una copia silvestre de *KIN28*, con los oligos *KIN28-501/302* y se llevó a cabo recombinación homóloga en un diploide Gr21-2d/YPH499. Posteriormente se transformó con el plásmido mutante pRS314-*hakin28* (*T162A*), sacado de la cepa YSB595 (Rodriguez et al., 2000) y se esporuló. La cepa YFN501, haploide, resultante se transformó con los plásmidos que contenían las mutaciones del pie y se eliminó el plásmido conteniendo *RPB1* silvestre mediante el tratamiento con 5-FOA (Figura R43).

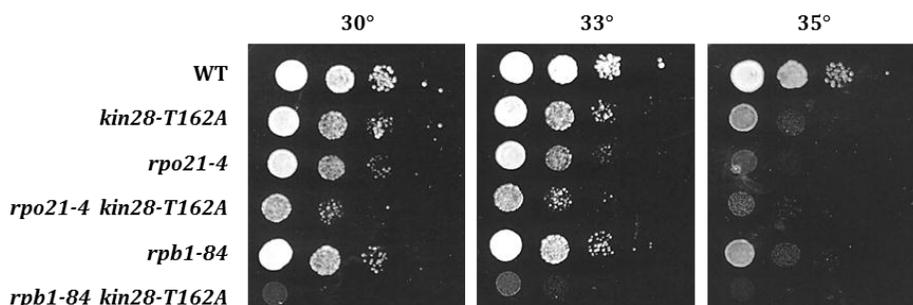


Figura R43: Interacciones genéticas entre mutantes del dominio conservado del pie de la RNA pol II y una mutación en el gen codificante de la quinasa Kin28. Se compara el crecimiento con

el de los mutantes simples y la cepa isogénica silvestre mediante la siembra de diluciones seriadas en medio rico YPD a distintas temperaturas.

Al contrario de lo que planteábamos, la mutación *kin28-T162A*, que impide la fosforilación del residuo Thr-162 de Kin28 reduciendo su activación sin afectar a su actividad catalítica (Kimmelman et al., 1999; Rodriguez et al., 2000), agrava el fenotipo de termosensibilidad de los mutantes del pie. Estos datos sugieren un defecto en el reciclaje de la RNA pol II y reiniciación de la transcripción, así como en la formación del complejo de preiniciación, ya que se ha implicado a la quinasa Kin28 (y su homólogo CDK7) en la formación del complejo *scaffold* y en la reiniciación de la transcripción (revisado en Calvo and Garcia, 2012; Shandilya and Roberts, 2012).

El siguiente paso fue analizar la quinasa de CTD-Ser2P, Ctk1. Ctk1 es la principal quinasa responsable de la fosforilación en CTD-Ser2P durante la elongación de la transcripción (Cho et al., 2001) aunque existen otras quinastas que también fosforilan dichos residuos. Además, la actividad quinasa de Ctk1 se requiere para la asociación de los factores de terminación y poliadenilación (Ahn et al., 2004). La combinación de las mutaciones del dominio conservado del pie de la RNA pol II con la delección del gen de la quinasa Ctk1, mejoró el crecimiento de los mutantes (Figura R44).

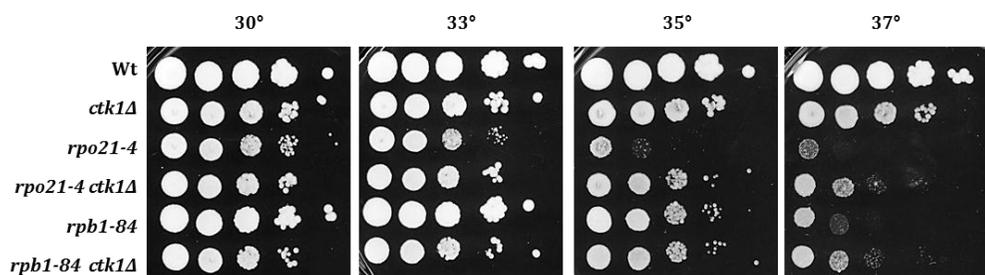


Figura R44: Interacciones genéticas entre mutantes del dominio conservado del pie de la RNA pol II y *ctk1Δ* (cepa YFN249). Se compara el crecimiento con el de los mutantes simples y la cepa isogénica silvestre mediante la siembra de diluciones seriadas en medio rico YPD a distintas temperaturas.

Si nuestra hipótesis es cierta y los mutantes del pie poseen una acumulación de RNA pol II estancadas, fosforiladas en CTD-Ser5P, la fosforilación en CTD-Ser2P estaría forzando a continuar el ciclo a RNA polimerasas que son inestables. Por tanto,

la delección de *CTK1*, al reducir la fosforilación de la RNA pol II en CTD-Ser2P, podría aliviar el fenotipo de termosensibilidad de la célula.

Todos estos datos sugieren que mutaciones en el pie de la RNA pol II afectan a la transición de la iniciación a la elongación de la transcripción, conduciendo a un incremento en la acumulación de CTD-Ser5P, probablemente como consecuencia de una asociación anormal de Rtr1 a la enzima o una actividad anormal de Rtr1. Este defecto también conduce a un incremento en la cantidad de RNA pol II parada. Además, las interacciones genéticas observadas con otros elementos de la maquinaria de fosforilación-defosforilación podrían ser efectos indirectos del principal defecto asociado a Rtr1.

4.3 ESTUDIO DE LA ELONGACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN EN LOS MUTANTES DEL PIE DE LA RNA POL II

Nuestros datos sugieren que las mutaciones en el pie de la RNA pol II llevan a una parada prematura de la enzima durante el proceso de transcripción. Para profundizar en el estudio del mecanismo implicado en este defecto en los mutantes del pie, analizamos las interacciones genéticas existentes entre los mutantes del pie y el gen *DST1* que codifica el factor de elongación TFIIS, responsable de la estimulación de la salida en los sitios de parada de la RNA pol II para la continuación de la transcripción. Para ello, se cruzó la cepa madre Gr21-2d con una cepa que contenía la delección *dst1Δ* (Euroscarf) dando lugar a la cepa YFN438, que se transformó con los plásmidos conteniendo las mutaciones del pie así como con el plásmido conteniendo *RPB1* silvestre y se trató con 5-FOA para eliminar el plásmido pFL44L-*RPB1*. Según se observa en la Figura R45A, existe una clara interacción genética entre los mutantes del pie y la delección del gen *DST1*. Por el contrario, la sobreexpresión de dicho gen en los mutantes del pie, usando un plásmido pVV214-*DST1*, no provoca ningún cambio en el fenotipo de termosensibilidad de las cepas (Figura R45B).

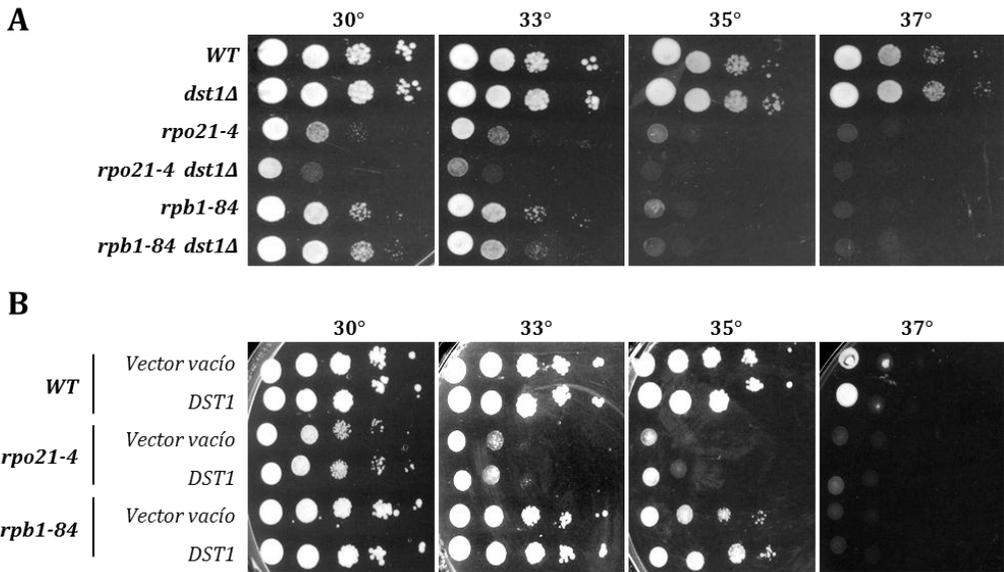


Figura R45: A) Delección del gen *DST1* en los mutantes del pie, *rpo21-4* y *rpb1-84*, y en su cepa isogénica silvestre (cepa YFN438). Se compara el crecimiento con el de los mutantes simples y su cepa isogénica silvestre mediante la siembra de diluciones seriadas en medio rico YPD a distintas temperaturas. B) Sobreexpresión de *DST1* en los mutantes *rpo21-4* y *rpb1-84* y en su cepa isogénica silvestre, usando el plásmido pVV214-*DST1*. Se compara el crecimiento con las mismas cepas conteniendo un vector vacío mediante la siembra en medio mínimo SD con requerimientos a distintas temperaturas.

Las mutaciones del dominio conservado del pie, provocan la desestabilización de la RNA pol II y dicha inestabilidad se suprime bajo la sobreexpresión de *RPB6*, aliviando la mayor parte de los fenotipos provocados por dichas mutaciones. Por tanto, nos propusimos analizar si la sobreexpresión de *RPB6* y corrección del ensamblaje de la enzima, era suficiente para restaurar el bloqueo de la RNA pol II. Como podemos observar en la Figura R46, la sobreexpresión de *RPB6* en los dobles mutantes, suprime de nuevo el fenotipo de estos, aunque no completamente, sugiriendo que el ensamblaje incorrecto de la RNA pol II afecta, en parte, a la cantidad de enzima parada.

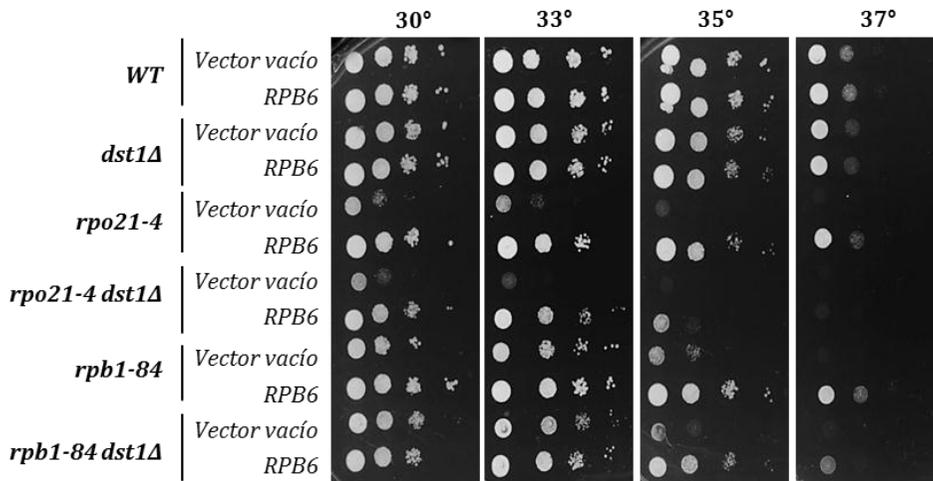


Figura R46: Sobreexpresión de *RPB6* en los mutantes simples del pie y en los mutantes dobles *rpo21-4 dst1Δ* y *rpb1-84 dst1Δ*, así como en su cepa isogénica silvestre. Se compara el fenotipo con el presentado por las mismas cepas transformadas con un plásmido vacío. Se sembraron las cepas en medio mínimo SD con requerimientos a distintas temperaturas.

TFIIS no es el único factor implicado en la salida de la RNA pol II estancada. En este sentido, el complejo Ccr4-Not estimula la reanudación de la elongación de la transcripción por RNA pols II que se encuentran detenidas (Kruk et al., 2011). Por tanto, nos planteamos analizar las interacciones genéticas entre los mutantes del pie y mutantes del complejo Ccr4-Not. Para ello, se amplificaron los alelos *ccr4Δ::KanMX4* y *not5Δ::KanMX4* a partir de cepas conteniendo sendos alelos (Euroscarf), usando los oligonucleótidos específicos *CCR4-501/301* y *NOT5-501/301* respectivamente, tras lo cual se integraron en la cepa Gr21-2d por recombinación homóloga, dando lugar a las cepas YFN452 e YFN451 respectivamente. Estas cepas fueron posteriormente transformadas con los plásmidos que contienen las mutaciones del pie y tratadas con 5-FOA para eliminar el plásmido conteniendo el gen *RPB1* silvestre.

Como se observa en la Figura R47A y B, tanto la delección de *CCR4* como la delección de *NOT5* agravan el fenotipo de termosensibilidad de ambos mutantes del dominio conservado del pie, apoyando nuestra hipótesis de que las mutaciones en el pie de la RNA pol II conlleva un incremento de polimerasas paradas.

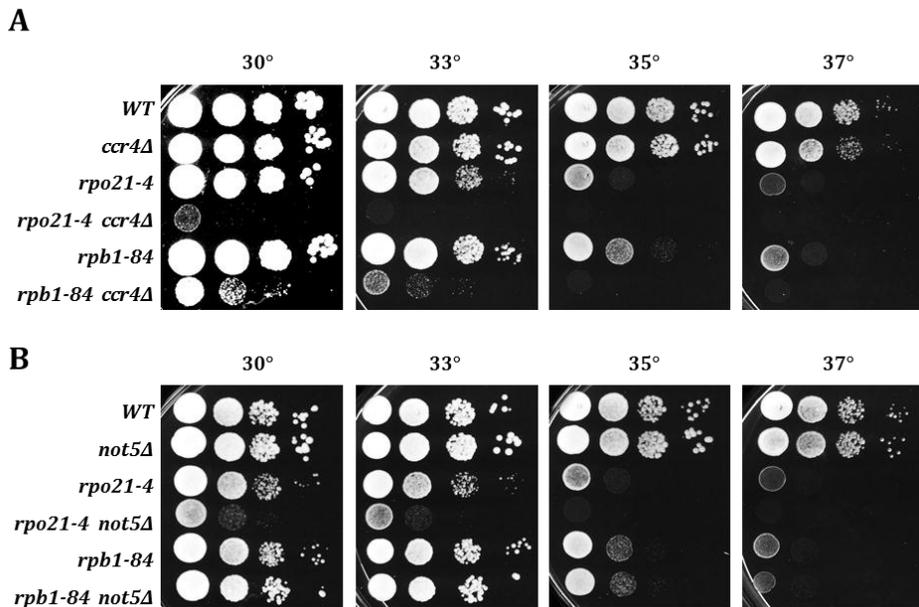


Figura R47: A) Delección de *CCR4* en combinación con las mutaciones del pie. Se compara el crecimiento con el de los mutantes simples y su cepa isogénica silvestre. B) Delección de *NOT5* en combinación con las mutaciones del pie. Se compara el crecimiento con el de los mutantes simples y su cepa isogénica silvestre. En ambos caso se sembraron las cepas en medio rico YPD a distintas temperaturas.

Los datos de incremento en fosforilación en CTD-Ser5P en la región 3' de los genes, así como las interacciones genéticas que presentan los mutantes del pie con los elementos que alivian la parada de la RNA pol II, están en concordancia con la existencia de polimerasas paradas en el DNA. Para comprobar si este defecto se correlaciona con defectos en la elongación de la transcripción, se llevó a cabo un ensayo GLAM que mide la eficiencia en la biogénesis del RNA mensajero, en los mutantes *rpo21-4* y *rpb1-84* y la comparamos con la eficiencia en la cepa silvestre. Para ello, se transformaron las cepas con distintos plásmidos que contenían unidades transcripcionales de distinta longitud y composición cromatínica, fusionadas al gen *PHO5* de levaduras, todo ello bajo el control de un promotor *GAL1* inducible por galactosa (ver Materiales y Métodos apartado 2.4.7). Tras la inducción del promotor se mide la actividad fosfatasa ácida (enzima codificada por el gen *PHO5*) de las células que contienen las distintas unidades transcripcionales. Los resultados, que indican eficiencia de transcripción, se muestran como ratios de la actividad fosfatasa ácida de

las unidades transcripcionales largas frente a las cortas. Según muestra la Figura R48A, existe una caída en los ratios GLAM en el mutante *rpo21-4*, lo que sugiere un defecto en la elongación de la transcripción. Hay que destacar que, aunque la expresión neta del gen *GAL1*, cae en ambos mutantes (al igual que otros genes anteriormente descritos) (Figura R48B), la activación del promotor *GAL1* en los mutantes del pie no varía con respecto a su cepa isogénica silvestre (Figura R48C).

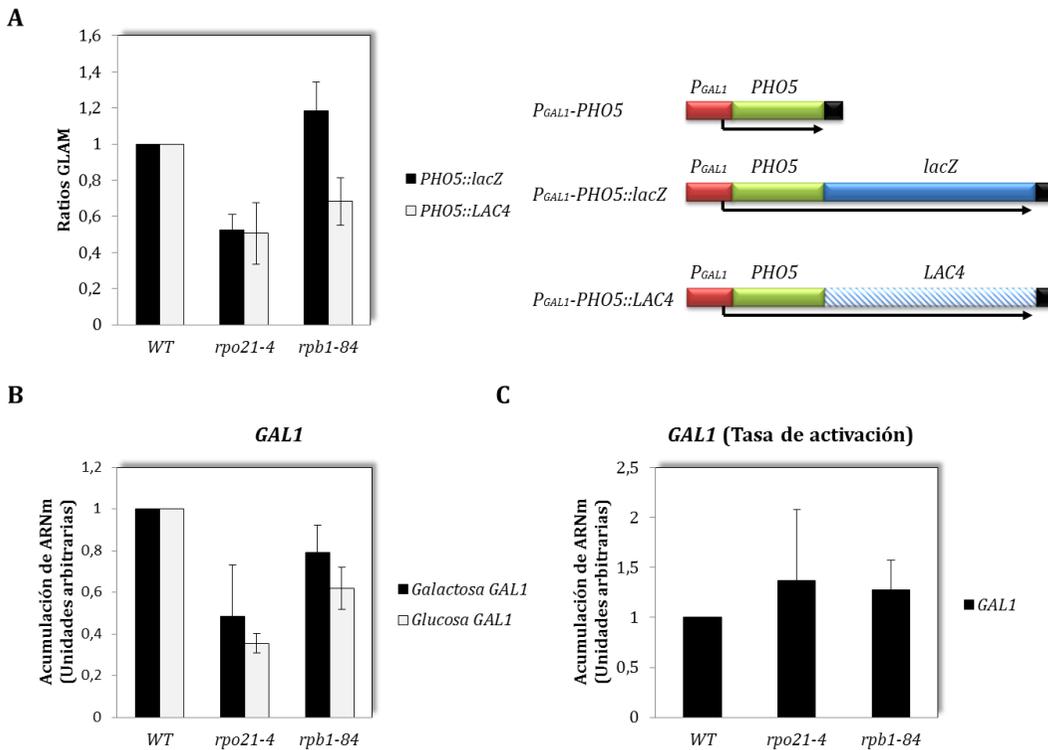


Figura R48: A) Izquierda: ensayo GLAM en los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre. Se mide la expresión de unidades transcripcionales largas frente a la expresión de una unidad transcripcional corta. Derecha: esquema de las unidades transcripcionales usadas para el ensayo. B) Análisis mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real para analizar los niveles de mRNA del gen *GAL1* en cultivos crecidos en galactosa (donde el promotor está activado) y en glucosa (donde el promotor está reprimido). Los valores fueron normalizados a los niveles del rRNA *18S*. C) Tasa de activación del promotor *GAL1* medida como expresión del gen *GAL1* activado (galactosa) entre la expresión del gen reprimido (glucosa).

Según los datos de GLAM podemos deducir que el defecto de elongación no es un efecto general de las mutaciones del pie, pudiendo ser específico del mutante *rpo21-4*, siendo necesarios experimentos de run-on para confirmarlo. Sin embargo, la

caída de los ratios GLAM en el mutante *rpo21-4*, junto con los resultados obtenidos para ambos mutantes en las interacciones genéticas con *DST1*, *CCR4* y *NOT5*, así como el incremento en la fosforilación del CTD-Ser5P sugieren la alteración de la iniciación o elongación temprana de la transcripción cuando el dominio conservado del pie se encuentra alterado.

4.4 INTERACCIONES GENÉTICAS DE LAS MUTACIONES DEL PIE CON ELEMENTOS DE LA MAQUINARIA DE ADICIÓN DEL CAP

En *S. cerevisiae*, la fosforilación en CTD-Ser5P ocurre en coordinación con el reclutamiento de Ceg1 (Gu et al., 2010), guanililtransferasa que junto con la trifosfatasa Cet1 forman la enzima de *capping* (CE) del mRNA. Se ha visto que Ceg1 se une al pie de la RNA pol II en *S. cerevisiae* (Suh et al., 2010). Además, nuestro grupo ha demostrado la existencia de proteínas que interactúan con el pie de la RNA pol II, que participan en la iniciación y/o elongación temprana de la transcripción y, cuya inactivación provoca un incremento en la fosforilación en CTD-Ser5P (García-Lopez et al., 2011). Además, los genes codificantes de estas proteínas interactúan genéticamente con *CEG1* (García-Lopez et al., 2011). Por otro lado, Abd1, proteína que metila el cap para formar m7GpppRNA, uniéndose directamente al CTD fosforilado, causa un incremento en la fosforilación de CTD-Ser5P cuando es inactivada (Schroeder et al., 2004).

Basado en estos datos y en un intento de profundizar en la relación funcional entre el ensamblaje de la RNA pol II, el dominio del pie y la maquinaria de adición del cap al mRNA, se analizaron las interacciones genéticas entre los mutantes del pie y el mutante *ceg1-250* (Cho et al., 1997). Las cepas dobles mutantes se generaron por cruce de la cepa madre Gr21-2d o YFN234 por las cepas que contenían las mutaciones simples de la maquinaria de adición del cap, generando las cepas YFN236, YFN250 e YFN251 que se transformaron con los plásmidos que contenían las mutaciones del pie y se eliminó el plásmido *RPB1* silvestre mediante el tratamiento con 5-FOA. Como muestra la Figura R49A, existe un defecto de crecimiento en los dobles mutantes mayor que el presentado por los mutantes simples. De la misma manera, las mutaciones *abd1-5* y *abd1-8* (Schwer et al., 2000) agravan el fenotipo de crecimiento

de los mutantes *rpo21-4* y *rpb1-84* (Figura R49B) pero en un mayor grado que el mutante *ceg1-250*.

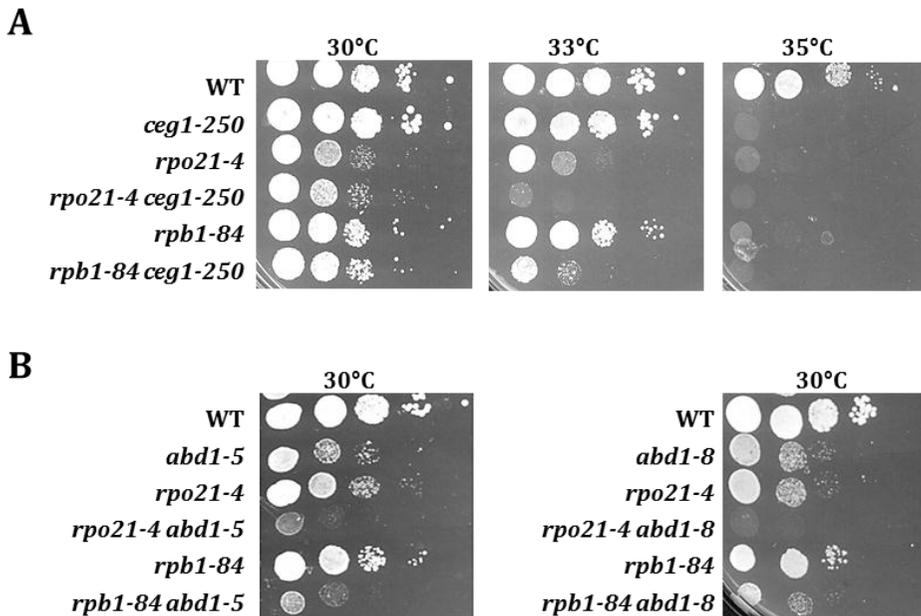


Figura R49: A) Interacciones genéticas entre los mutantes *rpo21-4* y *rpb1-84* y la mutación *ceg1-250* de el gen que codifica la proteína Ceg1 de la enzima de *capping* del mRNA (cepa YFN236). B) Interacciones genéticas entre los mutantes del pie y los mutantes *abd1-5* y *abd1-8* (cepas YFN251 e YFN250). Se compara con el crecimiento de los mutantes simples y su cepa isogénica silvestre mediante la siembra de diluciones seriadas en medio rico YPD a distinta temperatura.

Con objeto de esclarecer si la estabilidad del complejo está relacionada con estos defectos, se analizó si la sobreexpresión de *RPB6* suprimía los defectos de crecimiento de los dobles mutantes mostrados en la Figura R49. Como se observa en la Figura R50, la sobreexpresión de *RPB6* corrige parcialmente el defecto de crecimiento de los dobles mutantes sugiriendo que la estabilidad de la enzima juega un papel esencial en el reclutamiento de la maquinaria de *capping*.

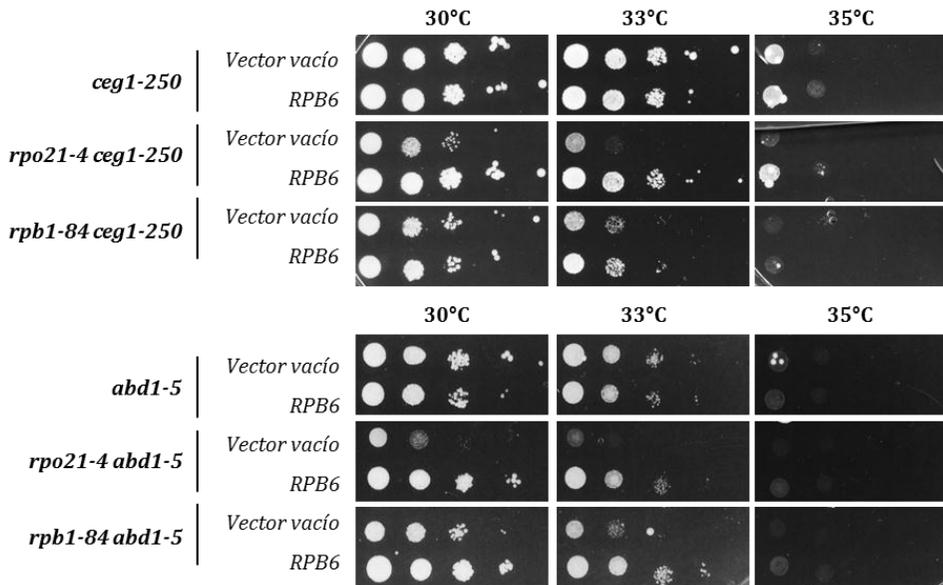


Figura R50: Dobles mutantes conteniendo las mutaciones del pie y mutaciones en genes de la maquinaria de adición del cap al mRNA, sobreexpresando *RPB6*. Se compara el crecimiento con las cepas transformadas con un vector vacío, mediante la siembra en medio mínimo SD con requerimientos a distintas temperaturas.

Se ha descrito previamente que mutaciones en el dominio del pie de la RNA pol II reducen significativamente la cantidad de enzima de *capping* (CE) asociada con la RNA pol II en *S. cerevisiae* (Suh et al., 2010). Por tanto, si el defecto en la interacción física entre Ceg1 y la RNA pol II es responsable del fenotipo de termosensibilidad de los mutantes *rpo21-4* y *rpb1-84*, la sobreexpresión de *CEG1* podría compensar estos defectos. Para analizarlo, se generó un plásmido pCM190-*CEG1* mediante amplificación del gen *CEG1* desde DNA genómico usando los oligonucleótidos *CEG1*-pCM-501/301 (poseen secuencias complementarias al inicio y final de *CEG1* con colas complementarias al plásmido pCM a ambos lados de la diana de restricción *ClaI*) y se insertó en el plásmido pCM190 previamente digerido con la enzima de restricción *ClaI*, por recombinación homóloga en *S. cerevisiae*. La sobreexpresión de *CEG1* no recupera el fenotipo de defecto de crecimiento de los mutantes del pie (Figura R51) sino que los agrava ligeramente, sugiriendo que las mutaciones *rpo21-4* y *rpb1-84* no alteran el reclutamiento de Ceg1 *in vivo*, aunque no podemos descartar que exista ese defecto en asociación a la RNA pol II o al DNA.

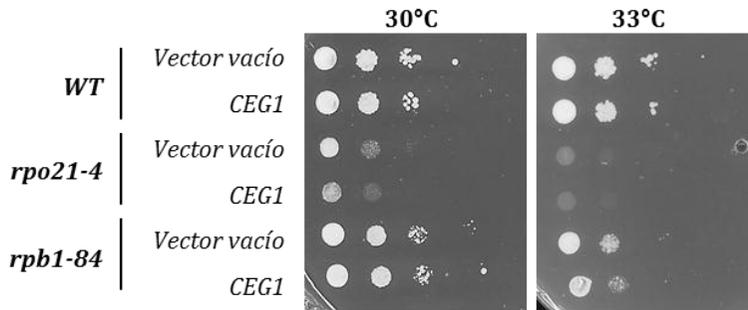


Figura R51: Sobreexpresión del gen *CEG1* en los mutantes del pie y en su cepa isogénica silvestre usando el plásmido pCM190-*CEG1*. Se compara el crecimiento con las mismas cepas transformadas con un vector vacío, mediante la siembra de diluciones seriadas en medio mínimo SD con requerimientos, a distintas temperaturas.

Todos estos datos sugieren que el correcto ensamblaje de la RNA pol II es importante para la adición de la caperuza en la zona 5' de los mRNA. Sin embargo, se necesitan más estudios para demostrar el papel exacto del dominio del pie en esta función. No podemos descartar que esta fenómeno incluya al regulador transcripcional Mot1 como se ha descrito previamente (Lahudkar et al., 2011) y como revisaremos en el apartado 6.6.

5 ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN DE Rpb1 Y DESENSAMBLAJE DE LA RNA POLIMERASA II EN LOS MUTANTES DEL PIE

Basado en nuestros datos previos y en los obtenidos en este trabajo que muestran una disminución importante de los niveles de Rpb1 en los mutantes del pie de la RNA pol II, nos propusimos estudiar si esta disminución estaba mediada por procesos de degradación de Rpb1 y determinar cómo se regulaba. Además, como hemos visto, los mutantes del pie poseen un defecto en la estabilidad de la RNA pol II que se traduce en la aparición de distintos subcomplejos, algunos de los cuales carecen de la subunidad mayor Rpb1, otros de Rpb6 y otros del dímero Rpb4/7 (apartado 3.2). Por otro lado, los estudios de inmunolocalización en estos mutantes demuestran que, mientras la señal de Rpb1 se restringe al núcleo de la célula, las subunidades Rpb2, Rpb3 y Rpb4 muestran cierta acumulación citoplasmática, a diferencia de lo que ocurre en una cepa silvestre, dónde la señal es nuclear. La combinación de las mutaciones del pie con la delección del gen de la prefoldina Bud27, demuestran que Rpb1 no se degrada en el citoplasma, ya que al bloquear su entrada al núcleo se produce su acumulación citoplasmática (apartado 3.4). Las mutaciones en el pie de la RNA pol II provocan, además, un incremento en la cantidad de enzima fosforilada en CTD-Ser5P, especialmente evidente en la región 3' de los genes, lo que sugiere un incremento de enzimas paradas o estancadas en el DNA (apartado 4). Estos datos están además, en concordancia con las fuertes interacciones genéticas que presentan los mutantes del pie con *dst1Δ*, *ccr4Δ* y *not5Δ*, genes codificantes de proteínas implicadas en la salida de la RNA pol II del bloqueo (apartado 4.3).

Todos estos datos, sugieren que la RNA pol II en los mutantes del pie podría estar parada o estancada en la región codificante de los genes. Este estancamiento podría conducir a la degradación de las RNA polimerasas que no continúen el ciclo, mediante la degradación nuclear de Rpb1 y acumulación citoplasmática del resto de subunidades. Para comprobar dicha hipótesis nos planteamos analizar la vía de degradación de Rpb1 en los mutantes del dominio conservado del pie.

5.1 ANÁLISIS DE LA VÍA DE DEGRADACIÓN DE Rpb1 DEPENDIENTE DE Asr1

La ubiquitinación y degradación de Rpb1 mediada por el proteasoma cuando la RNA pol II está estancada en una unidad transcripcional, se ha descrito tanto en humanos como en levaduras (Daulny and Tansey, 2009; Somesh et al., 2005). En levaduras, se han encontrado principalmente dos proteínas implicadas en este proceso, Rsp5 y Asr1. Asr1 es una ubiquitina ligasa que se asocia con el CTD en la cromatina, por un mecanismo dependiente de la fosforilación de CTD-Ser5P (Daulny et al., 2008). Además, la ubiquitinación mediada por Asr1 altera la composición de la RNA pol II, favoreciendo la disociación de Rpb4/7 del núcleo de la enzima y conduciendo a la inactivación de la función de la RNA pol II (Daulny et al., 2008).

Basados en estos efectos provocados por Asr1 y considerando la fosforilación anormal del CTD-Ser5P que presentan los mutantes del pie así como la pérdida del dímero Rpb4/7 que manifiestan estos mutantes, nos planteamos analizar si Rpb1 se degrada por un mecanismo dependiente de Asr1 en los mutantes del pie. De ser así, la inactivación de Asr1 debería corregir el fenotipo de crecimiento lento de los mutantes del pie y llevar a un incremento de los niveles de Rpb1. Para comprobarlo, se analizaron las interacciones genéticas que presentan las mutaciones del pie con la delección de *ASR1*, mediante amplificación de dicha delección usando los oligonucleótidos específicos *ASR1*-501/301 y posterior recombinación homóloga en la cepa Gr21-2d (dando lugar a la cepa YFN358). Como muestra la Figura R52A, la delección de *ASR1* agrava ligeramente el defecto de crecimiento de los mutantes del pie. Además los datos de western-blot muestran que la inactivación de Asr1 no recupera la cantidad de Rpb1 en los mutantes del pie (Figura R52B).

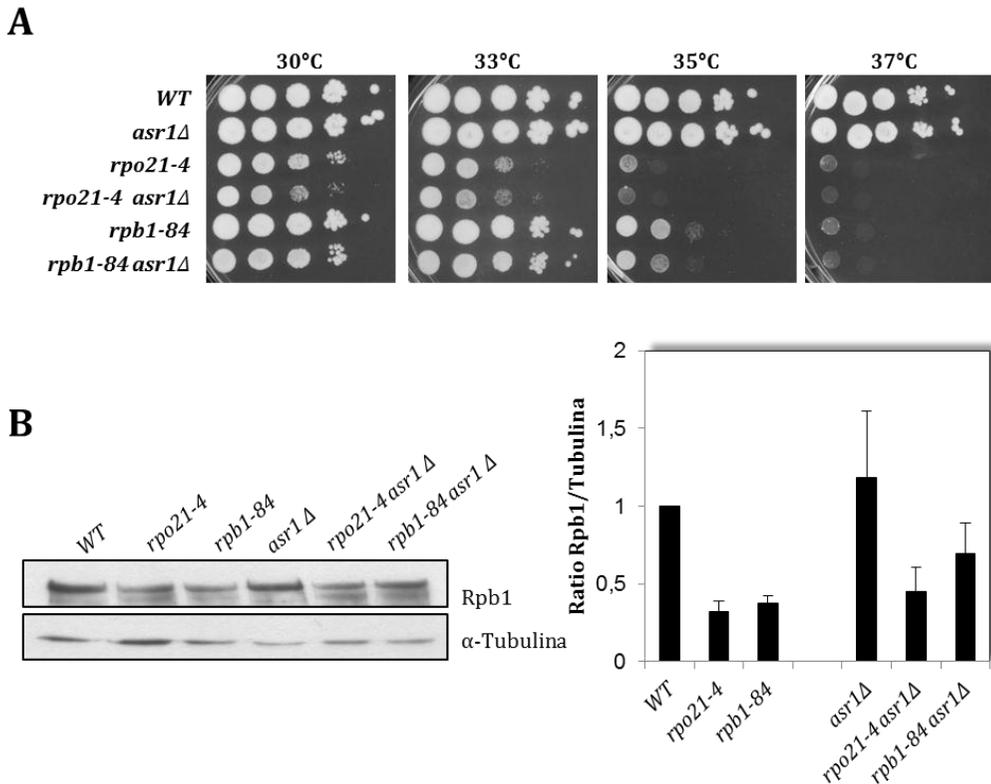


Figura R52: A) Interacciones genéticas entre los mutantes del pie y *asr1Δ*. Se compara el crecimiento con el de los mutantes simples y la cepa isogénica silvestre mediante la siembra de diluciones seriadas en medio rico YPD a distintas temperaturas. B) Western-blot para analizar la cantidad de Rpb1 en los mutantes anteriores y comparación con la proteína constitutiva α -tubulina como control interno. Se muestra también la cuantificación de dichos western-blot.

De la misma manera, analizamos la fosforilación de la RNA pol II en los dobles mutantes mediante western-blot, concluyendo que la inactivación de *Asr1* no incrementa los niveles de fosforilación en CTD-Ser5P (Figura R53).

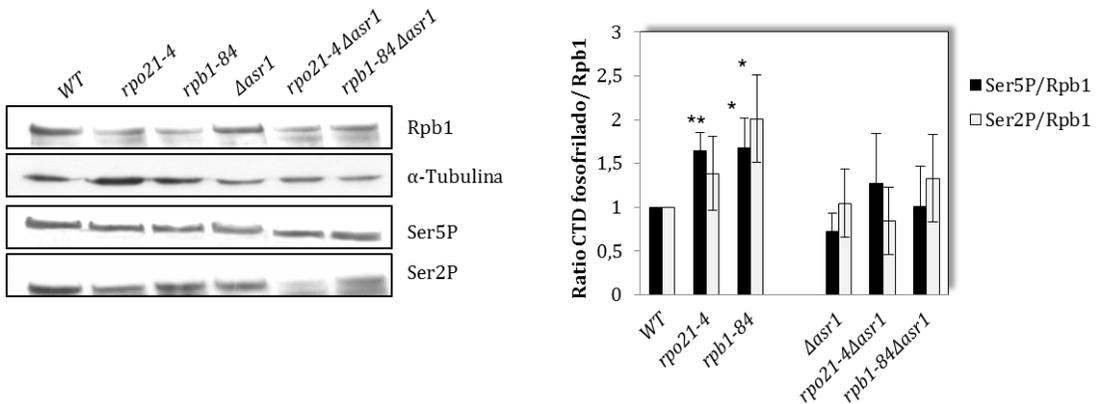


Figura R53: Western-blot para analizar la fosforilación de Rpb1 en los mutantes del pie y los mutantes dobles con *asr1Δ*. A la derecha se muestra la cuantificación de dichos western-blot.

Estos datos sugieren que la degradación de Rpb1 en los mutantes del pie de la RNA pol II no está mediada por un mecanismo dependiente de *Asr1*.

5.2 ANÁLISIS DE LA VÍA DE DEGRADACIÓN DE Rpb1 DEPENDIENTE DE Rsp5

Tradicionalmente, se ha estudiado la ubiquitinación y degradación de Rpb1 en respuesta a un daño en el DNA (Chen et al., 2007; Daulny and Tansey, 2009). Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que la señal para la ubiquitinación de Rpb1 es la propia enzima, concluyendo que la ubiquitinación y degradación de Rpb1 se produce ante RNA pols paradas, ya sea por daño en el DNA, o por un bloqueo asociado al proceso transcripcional (inhibidores de la transcripción, delección de factores de elongación, depleción de nucleótidos...), sugiriendo que la misma ruta participa en los dos procesos (revisado en Daulny and Tansey, 2009). Esta vía para la degradación de Rpb1 está mediada por la ubiquitina ligasa Rps5 cuya diana son RNA pol II que se encuentran fosforiladas en CTD-Ser2P (Somesh et al., 2007), lo que conduce al reclutamiento del complejo Rad26/Def1 y probablemente de Rsp5. Inicialmente, la acción inhibitoria de Rad26 sobre Def1 previene la ubiquitinación de Rpb1 creando una oportunidad para reparar los complejos estancados. Al mismo tiempo, Rsp5 monoubiquitina a Rpb1. Este proceso puede revertirse si se revierte el daño (Daulny and Tansey, 2009). En caso contrario, el complejo Elc1-Cul3 y Def1 reconocen la forma monoubiquitinada de Rpb1 y crean una cadena de poliubiquitina

(unida a la lisina K-48 de la ubiquitina) que es la diana de reclutamiento del proteasoma (Wilson et al., 2012). Recientemente, se ha propuesto un modelo para la degradación de RNA pol II transcripcionalmente paradas, denominada ruta TRADE (*transcriptional-stalling dependent degradation*), que implica a algunos elementos de esta vía. Según este modelo, la ubiquitinación de Rpb1 en RNA pol II paradas es dependiente de Rsp5 e independiente del complejo Elc1-Cul3. De esta forma, Rsp5 crea cadenas de poliubiquitina unidas a K-63, que son directamente reconocidas por el proteasoma (Karakasili, 2010).

Por tanto, nos planteamos analizar las interacciones genéticas existentes entre los mutantes del pie y algunos elementos de la ruta de degradación mediada por Rsp5. En primer lugar, generamos la cepa YFN453 mediante la amplificación de *rad26Δ::HIS3* con los oligonucleótidos específicos *RAD26-501/301* y recombinación en la cepa madre YFN234. Rad26 se encarga de inhibir a Def1 momentáneamente para que el bloqueo de la enzima pueda ser corregido. Esto nos condujo a pensar que, al deletar *rad26*, aumentaría la ubiquitinación y degradación de Rpb1, lo cual empeoraría el fenotipo de las cepas (Figura R54A). Por la misma razón, la sobreexpresión de Def1 agravaría el crecimiento de los mutantes del pie al aumentar la ubiquitinación y degradación de Rpb1 (Figura R54B). Además, puesto que se ha descrito que la subunidad de la RNA pol II Rpb9 tiene un papel fundamental en la ubiquitinación y degradación de Rpb1 cuando hay un daño en el DNA (Chen et al., 2007), por una vía independiente de Rad26, nos propusimos analizar las interacciones genéticas entre las mutaciones del pie y una cepa *rpb9Δ* (Figura R54C), encontrando letalidad sintética entre ambas mutaciones del pie y *rpb9Δ*.

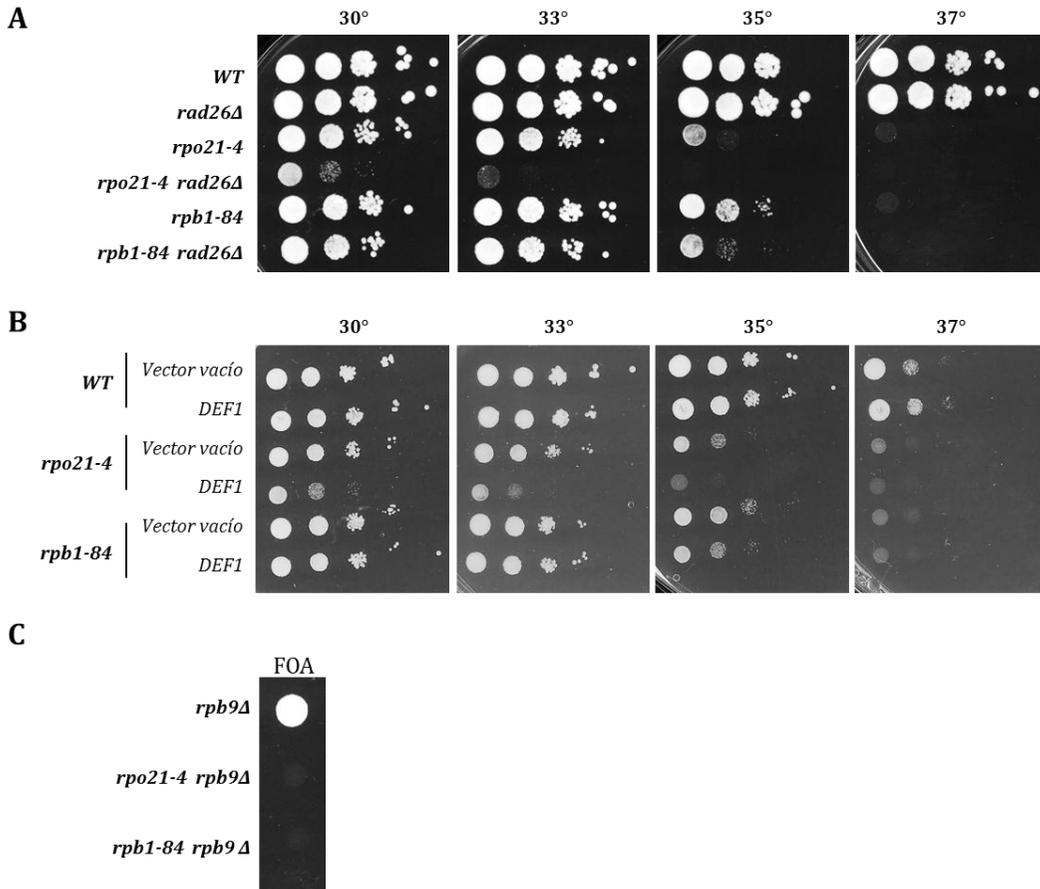


Figura R54: A) Interacciones genéticas entre los mutantes del pie y *rad26Δ*. Se compara el crecimiento con el de los mutantes simples y la cepa isogénica silvestre mediante la siembra de diluciones seriadas de las cepas en medio rico YPD a distintas temperaturas. B) Sobreexpresión de *DEF1* usando el plásmido pRS316-*DEF1* en los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre. Se compara el crecimiento con las mismas cepas transformadas con un plásmido vacío mediante la siembra de diluciones seriadas de las mismas en medio mínimo SD a distintas temperaturas. C) Dobles mutantes que contienen las mutaciones del pie y la delección de *RPB9* (cepa YFN474). Se muestra el crecimiento en SD suplementado con ácido fluororótico.

Como podemos observar en la Figura R54A, la delección de Rad26 agrava el fenotipo de termosensibilidad de los mutantes del pie, probablemente al aumentar la degradación de Rpb1. De la misma manera, la sobreexpresión de Def1 incrementa dicha degradación provocando también un empeoramiento del fenotipo de los mutantes del dominio conservado del pie.

Rsp5 es una ubiquitina ligasa que monoubiquitina Rpb1. Posteriormente, el complejo Elc1-Cul3 reconoce la forma monoubiquitinada de Rpb1 y crean una cadena de poliubiquitina que es reconocida por el proteasoma (Wilson et al., 2012). El reclutamiento de Elc1-Cul3 está mediado por Def1 (Wilson et al., 2013). Por tanto, la inactivación de Rsp5 y Cul3, conlleva la reducción de la degradación de Rpb1, lo que podría aliviar el fenotipo de termosensibilidad de los mutantes del pie. Para comprobar esta hipótesis, se generó una cepa (YFN486) mediante el cruce de una cepa conteniendo la mutación *rps5-1* y la cepa madre Gr21-2d. La cepa YFN472 se generó por amplificación del fragmento *cul3Δ::Kan* a partir de una cepa que contenía esa delección (Euroscarf), usando los oligonucleótidos específicos *CUL3-501/301* y se recombinó en Gr21-2d. Estas cepas resultantes se transformaron con los plásmidos que contienen las mutaciones del pie y se eliminó el plásmido *RPB1* silvestre mediante el tratamiento con ácido fluororótico. Las interacciones genéticas se muestran en Figura R55.

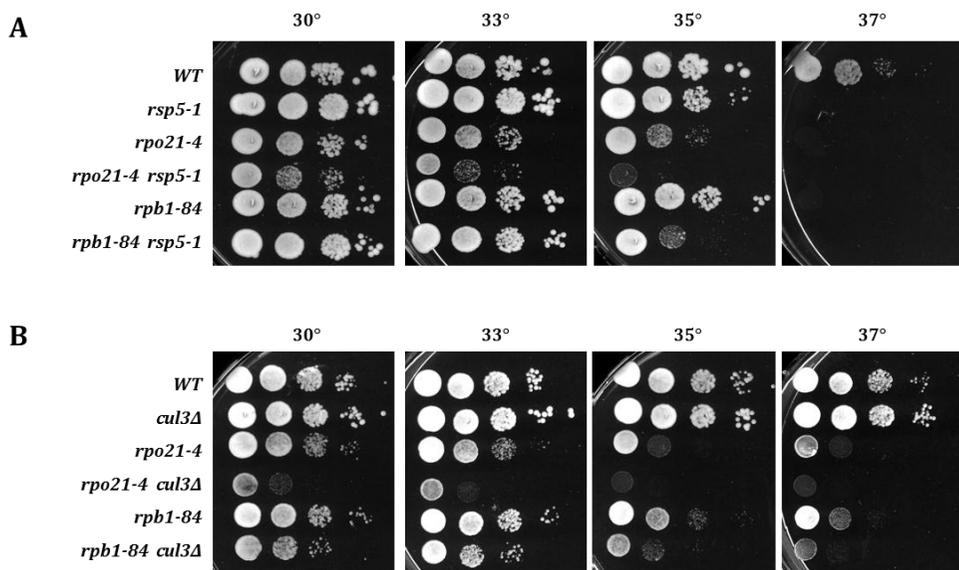


Figura R55: A) Interacciones genéticas entre los mutantes del pie y el mutante *rps5-1*. B) Interacciones genéticas entre los mutantes del pie y *cul3Δ*. En ambos casos se compara el crecimiento con el de los mutantes simples y la cepa isogénica silvestre mediante la siembra de diluciones seriadas de las cepas en medio rico YPD a distintas temperaturas.

Sin embargo, como podemos ver en la imagen R55, tanto la delección *cul3Δ*, como la mutación *rps5-1*, provocan un agravamiento del fenotipo de las cepas en

combinación con las mutaciones del pie. Estos datos, indican que la alteración de la maquinaria de ubiquitinación y degradación de Rpb1 en los mutantes del pie provoca un agravamiento severo del crecimiento de las cepas, indicando que la vía de degradación de Rpb1 en los mutantes del pie es dependiente de Rsp5. Por tanto, podemos deducir que la degradación de Rpb1 y consiguiente desensamblaje de la RNA pol II es un mecanismo que funciona en última instancia cuando el bloqueo de la misma no puede ser eliminado. La ubiquitinación y degradación de RNA polimerasas bloqueadas permite el reciclaje de las subunidades y deja libre la región codificante de los genes para nuevas enzimas. Es de esperar que, la inactivación de este mecanismo de escape agrave severamente el fenotipo de termosensibilidad de los mutantes del pie.

Si nuestra hipótesis es cierta y la vía de degradación de Rpb1 en los mutantes del pie es dependiente de Rsp5, estos dobles mutantes deberían tener más cantidad de Rpb1, al inactivar la vía de ubiquitinación. Por tanto, analizamos por western-blot los dobles mutantes *rpo21-4 rsp5-1*, *rpb1-84 rsp5-1*, *rpo21-4 cul3Δ* y *rpb1-84 cul3Δ*; y los comparamos con los mutantes simples. Como podemos observar en la Figura R56, la cantidad de Rpb1 frente a la proteína constitutiva α -tubulina, es mayor en los dobles mutantes.

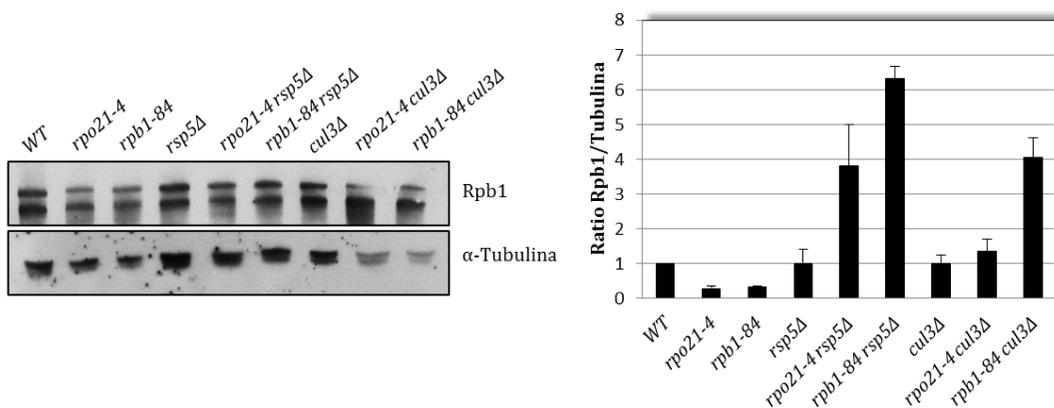


Figura R56: Western-blot para analizar la cantidad de Rpb1 en los mutantes dobles *rpo21-4 rsp5-1*, *rpb1-84 rsp5-1*, *rpo21-4 cul3Δ* y *rpb1-84 cul3Δ*, así como en los mutantes simples y su cepa isogénica silvestre; y comparación con la proteína constitutiva α -tubulina. Se muestra también la cuantificación de dichos western-blot.

Por tanto, según muestra la Figura R56, las mutaciones en *RSP5* y *CUL3* en los mutantes del pie, conducen a un aumento en los niveles de Rpb1, lo que sugiere que la degradación de Rpb1 en estos mutantes se produce por un mecanismo dependiente de Rsp5 y probablemente de ubiquitinación. Sin embargo, a pesar del aumento en la cantidad de Rpb1 se produce un agravamiento del fenotipo de termosensibilidad en los dobles mutantes, sugiriendo que la alteración de la vía de degradación de Rpb1 llevaría a una mayor acumulación de RNA pol II paradas.

5.3 ESTUDIO DE LA RELACIÓN FUNCIONAL ENTRE LA DEGRADACIÓN DE Rpb1 Y LA FOSFATASA DE CTD-Ser5P, Rtr1

En un intento de descubrir genes que puedan suprimir el defecto de termosensibilidad de los mutantes del pie, se llevó a cabo un análisis de supresión génica con el mutante *rpo21-4* mediante la transformación con una genoteca basada en un plásmido de alto número de copias, como se comentó en el apartado 3.1. En este estudio se encontraron los genes *RPB1*, *RPB6* y *RTR1* como supresores del defecto de termosensibilidad del mutante *rpo21-4*. Como se ha indicado previamente, *RTR1* codifica la recientemente descrita fosfatasa de Ser5P-CTD necesaria para la transición de la iniciación a la elongación de la transcripción (Gibney et al., 2008; Mosley et al., 2009).

Basado en estos datos y en el efecto de la sobreexpresión de *RPB6* en el ensamblaje e integridad de la RNA pol II, quisimos analizar si la sobreexpresión de *RTR1* era también suficiente para restaurar el defecto de estabilidad de la RNA pol II. Para ello, llevamos a cabo el mismo tipo de experimento que en el caso de la sobreexpresión de *RPB6*. Realizamos una purificación de Rpb3-TAP en los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre tras la sobreexpresión de *RTR1* (Figura R57A). Como podemos observar en la Figura R57B, la sobreexpresión de *RTR1* corrige la cantidad de Rpb1 asociado a Rpb3 en los mutantes del pie. De la misma manera, recupera los defectos de ensamblaje de Rpb1-Rpb6-Rpb4. Además los niveles de Rpb1 en extractos se encuentran a nivel de la cepa silvestre (datos no mostrados).

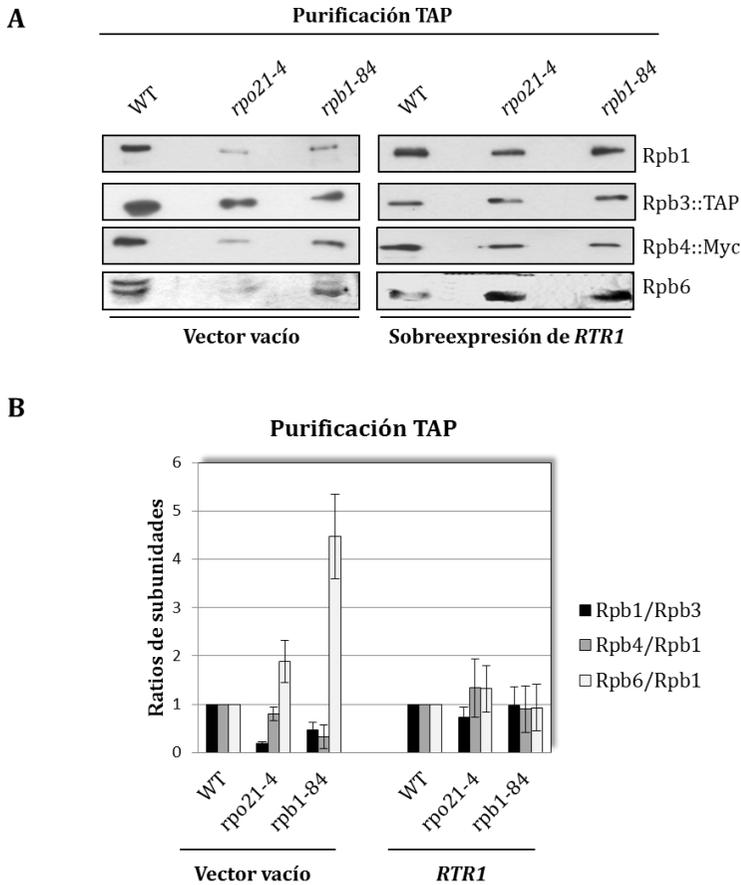


Figura R57: A) Purificación de Rpb3-TAP en los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre tras la sobreexpresión de *RTR1*. Se comparan los datos con los obtenidos en las mismas cepas transformadas con un vector vacío (cepa YFN290). B) Ratios Rpb1/Rpb3, Rpb4/Rpb1 y Rpb6/Rpb1 en las purificaciones anteriores.

Se ha propuesto que RPAP2, el homólogo en humanos de Rtr1, participa en el ensamblaje y/o transporte al núcleo de la RNA pol II (Boulon et al., 2010; Forget et al., 2013; Jeronimo et al., 2007). Es posible, por tanto, que la corrección provocada por la sobreexpresión de *RTR1* en el fenotipo del mutante *rpo21-4*, se deba a su papel en el proceso de ensamblaje de la RNA pol II y no sea debido a su actividad fosfatasa. Por tanto, decidimos comprobar si la corrección del ensamblaje de la RNA pol II era suficiente para restaurar la letalidad sintética existente entre las mutaciones del pie y *rtr1Δ*. Para ello, se sobreexpresó *RPB6* en los dobles mutantes del pie conteniendo la delección *rtr1Δ* incapaces de crecer en medio 5-FOA porque la combinación de las

mutaciones del pie y *rtr1Δ* son letales y no pueden eliminar el plásmido con marcador *URA3* conteniendo el gen *RPB1* silvestre (Ver apartado 4.1). Como se observa en la Figura R58A, la corrección del ensamblaje de la RNA pol II por sobreexpresión de *RPB6* no es suficiente para eliminar la letalidad sintética presentada por los mutantes del pie y *rtr1Δ*. Estos datos sugieren que el papel de Rtr1 en los defectos provocados por las mutaciones del pie de la RNA pol II no parece estar mediado, por lo menos únicamente, por su actividad en el ensamblaje de la enzima.

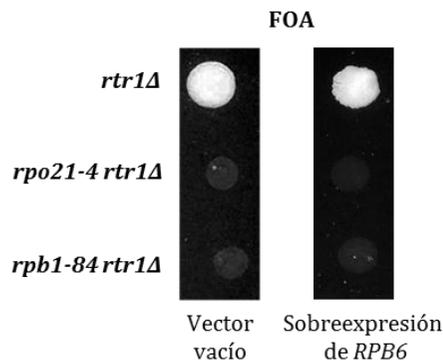


Figura R58: Interacción genética entre los mutantes del pie y la delección del gen *RTR1* (cepa YFN166) con y sin sobreexpresión de *RPB6*. Se muestra el crecimiento en medio mínimo SD suplementado con ácido 5-FOA.

Todos estos datos muestran que la degradación nuclear de Rpb1, mediada por Rsp5, es una consecuencia de la alteración del pie de la RNA pol II, que produce, probablemente, un defecto en la transición de la iniciación a la elongación de la transcripción. El incremento en los niveles de RNA pol II fosforilada en CTD-Ser5 así como las interacciones genéticas con *DST1*, *CCR4* y *NOT5*, avalan esta hipótesis. El hecho de que la sobreexpresión de *RTR1* sea suficiente para corregir el ensamblaje del complejo, está en concordancia con nuestros datos, ya que el aumentar la dosis de *RTR1* promovería la defosforilación de CTD-Ser5P, permitiendo el avance de RNA pols II previamente bloqueadas. No podemos descartar, sin embargo, que Rtr1 pueda tener un efecto en el ensamblaje de la enzima como se ha sugerido en el caso de células humanas (Boulon et al., 2010; Forget et al., 2013).

6 ESTUDIO GLOBAL DE LA TRANSCRIPCIÓN MEDIADA POR LA RNA POLIMERASA II EN LOS MUTANTES DEL PIE Y SUS CONSECUENCIAS EN EL TRANSCRIPTOMA DE LA CÉLULA

6.1 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GLOBAL DE mRNA EN LOS MUTANTES DEL PIE

Para analizar más en detalle el papel que el dominio del pie juega durante el proceso de transcripción, se realizó un análisis de acumulación global de mRNA mediante el uso de macroarrays conteniendo sondas del genoma completo de *S. cerevisiae*, en colaboración con el grupo del Dr José Enrique Pérez-Ortín, en la Universidad de Valencia. Para ello, distintas réplicas de los mutantes del pie, *rpo21-4* y *rpb1-84*, así como de la cepa isogénica silvestre, crecidos a la temperatura permisiva de 30 °C en medio rico YPD hasta alcanzar la D.O. de 0,5-0,6, se utilizaron para llevar a cabo extracción de RNA total y análisis mediante macroarray (ver materiales y métodos, apartado 2.2.1.12).

Como muestran los resultados de este estudio, ambos mutantes muestran un perfil similar, a 30°C para aquellos genes cuyos mRNA varían más de 2 veces respecto a la cepa silvestre en las mismas condiciones (Figura R59).

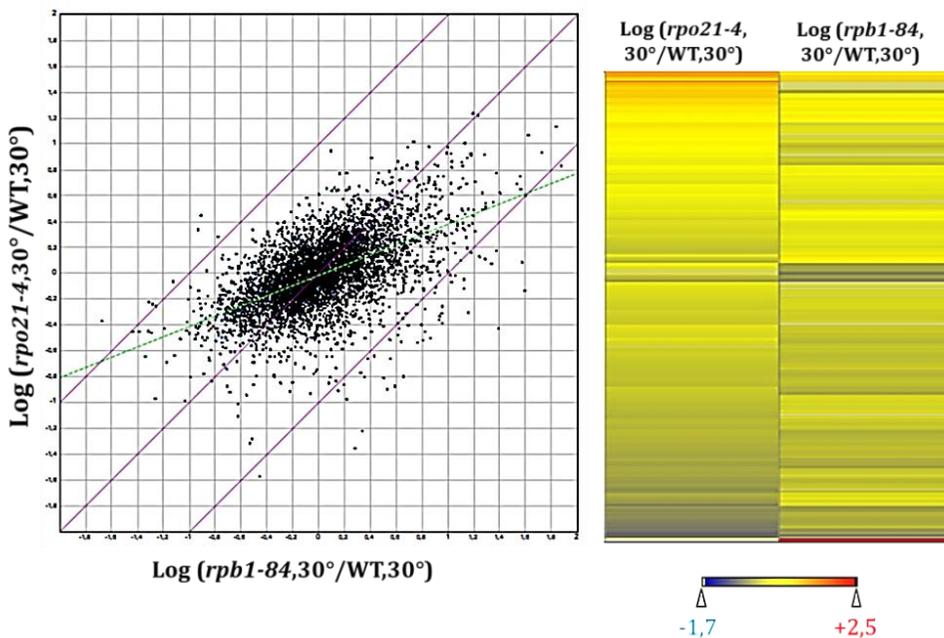


Figura R59: Perfil de expresión de mRNA de los mutantes del pie, *rpo21-4* y *rpb1-84*, en comparación con la cepa isogénica silvestre a partir de experimentos de macroarrays en membranas conteniendo sondas para todos los genes de la levadura *S. cerevisiae*. Análisis realizado con el programa DNAsar (Cannon, 1987) mostrando los datos de genes que varían más de 2 veces.

Con objeto de confirmar los datos de expresión global obtenidos mediante macroarrays analizamos la expresión de algunos genes alterados en los mutantes del pie mediante qRT-PCR a tiempo real. Como se observa en la Figura R60A, la acumulación de mRNA del gen *CIT2*, que se encontraba aumentada en los datos de array y la expresión de *MFa2*, *URA2*, *UTP2* y *STE3* que se encontraba reducida, se correlacionan con los datos obtenidos por qRT-PCR, aunque los niveles globales varían entre ambos experimentos. El gen *SPP2*, que se encontraba aumentado en datos de macroarrays no pudo confirmarse por qRT-PCR. Como normalizador de las qRT-PCR se usó el rRNA *18S*, que no se encuentra alterado en los mutantes del pie como muestran las cuantificaciones obtenidas mediante análisis de los perfiles de RNA de los mutantes y su cepa silvestre obtenidos mediante el uso del quipo Experion (Figura R60B).

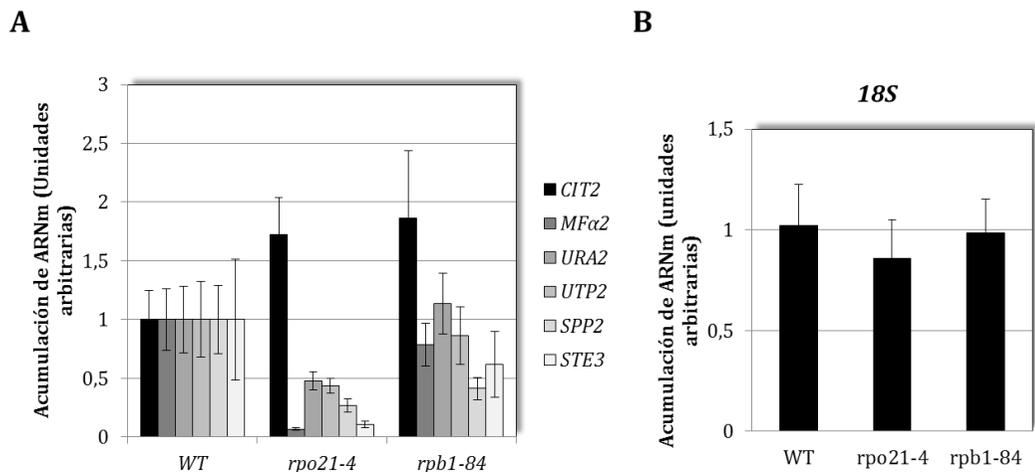


Figura R60: A) Acumulación de mRNA para los genes *CIT2*, *MFa2*, *URA2*, *UTP2*, *SPP2* y *STE3* medidos mediante qRT-PCR en los mutantes del pie y la cepa silvestre, a partir de cultivos crecidos en medio rico YPD a 30°C. Los valores fueron normalizados a los niveles del rRNA *18S*. Los datos son la media de tres experimentos independientes. B) Niveles de rRNA *18S* de los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre calculados como la media de 3 réplicas de RNA distintas analizadas con el equipo EXPERION.

El análisis de las categorías funcionales de los genes para los que la acumulación de mRNA aumenta o disminuye más de 2 veces con respecto a la cepa isogénica silvestre a la temperatura permisiva de 30°, sugieren que ambos mutantes presentan una respuesta de estrés, ESR, que se caracteriza por la alteración de más de 700 genes en una cepa silvestre (Gasch et al., 2000) (Tabla R2).

		<i>rpo21-4</i>	<i>rpb1-84</i>	
	Categorías funcionales	p-value	Categorías funcionales	p-value
>Mutantes/WT	Citoplasma	5.0e ⁻¹⁰	Proteínas con actividad en choque térmico	6.8e ⁻¹²
	Proteínas con actividad en choque térmico	3.3e ⁻⁵	Actividad catalíticas	1.0e ⁻¹⁰
	Complejo proteasoma Eukarya)	4.7e ⁻⁵	Metabolismo de carbohidratos Metabolismo alcohólico Plegamiento de proteínas Célula	1.6e ⁻⁸ 3.6e ⁻⁷ 3.1e ⁻⁶ 4.7e ⁻⁵
<Mutantes/WT	Metabolismo de nucleobases, nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos	5.0e ⁻⁵	Subunidad pequeña del ribosoma citosólico (sensu Eukarya)	5.0e ⁻⁵
	Componentes estructurales de los ribosomas	8.2e ⁻⁶	Componentes celulares desconocidos	5.0e ⁻⁵
	Ribosoma	1.8e ⁻⁶	Subunidad pequeña del ribosoma	2.0e ⁻⁵
	Nucleolo	1.1e ⁻⁶	Biosíntesis de proteínas	1.8e ⁻⁵
	Metabolismo del rRNA	6.1e ⁻⁷	Actividad estructural de moléculas	8.2e ⁻¹¹
	Procesamiento de rRNA	3.9e ⁻⁷	Subunidad grande del ribosoma	1.5e ⁻¹¹
	Biogénesis de ribosomas	3.4e ⁻⁷	Subunidad grande del ribosoma citosólico (sensu Eukarya)	3.2e ⁻¹²
	Biogénesis y ensamblaje de ribosomas	3.8e ⁻⁸	Ribosoma	< 1.0e ⁻¹⁵
	Complejo de ribonucleoproteína	3.1e ⁻⁸	Complejo de ribonucleoproteína	< 1.0e ⁻¹⁵
	Subunidad grande del ribosoma citosólico (sensu Eukarya)	1.1e ⁻⁹	Ribosoma citosólico (sensu Eukarya)	< 1.0e ⁻¹⁵
	Ribosoma citosólico (sensu Eukarya)	< 1.0e ⁻¹⁵	Componentes estructurales de los ribosomas	< 1.0e ⁻¹⁵

Tabla R2: Grupos funcionales de genes sobreexpresados y reprimidos en los mutantes *rpo21-4* y *rpb1-84* en relación a su cepa isogénica silvestre. Análisis realizado con el programa “fatiscan” (Al-Shahrour et al., 2006).

Basados en estos datos, comparamos los datos obtenidos con los publicados para un estrés térmico en una cepa silvestre, tras 60 minutos a 37° (Gasch et al., 2000). Analizamos aquellos genes que varían más de 2 veces con respecto a la cepa isogénica silvestre, con objeto de limitar el estudio a cambios que se consideran, en general, significativos. Para estrés térmico se analizan genes activados o reprimidos más de 2 veces, según se describe en el trabajo (Gasch et al., 2000). Como se muestra en la imagen R61 mediante diagramas de Venn, existen numerosos genes en común entre la respuesta presentada por los mutantes del pie y una respuesta general de estrés térmico.

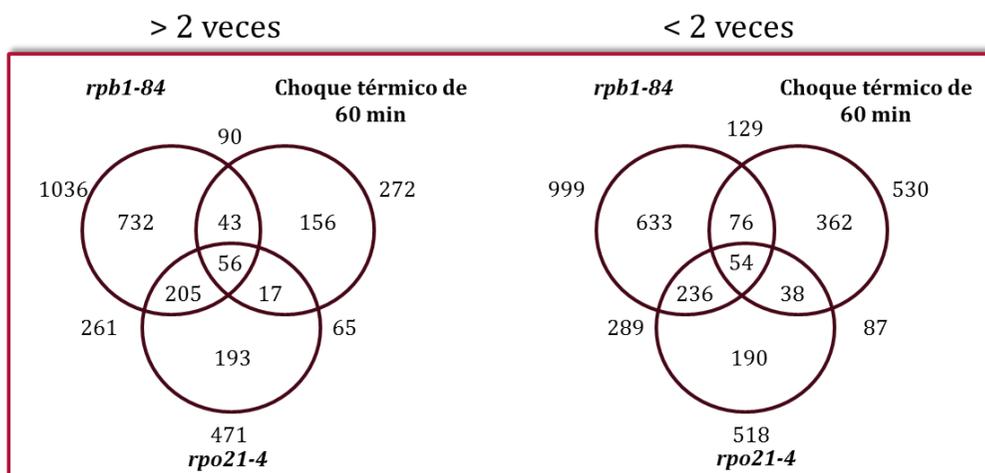


Figura R61: Diagramas de Venn representando número de genes cuya acumulación de mRNA está alterada más de 2 veces en los mutantes *rpb1-84* y *rpo21-4*, con respecto a una cepa silvestre, a 30 °C y su comparación con la respuesta a estrés térmico (genes sobreexpresados o reprimidos más de 1,5 veces), en una cepa silvestre, tras 60 minutos a 37°C, (Gasch et al., 2000).

Todos estos datos sugieren que los mutantes del pie presentan activada la respuesta celular ante estrés, a temperatura permisiva.

Además, se analizaron los factores de transcripción que regulan los genes alterados, a la vez, más de 2 veces en los mutantes *rpo21-4* y *rpb1-84* con respecto a

su cepa isogénica silvestre y se compararon con los factores de transcripción implicados en una respuesta a estrés tras un choque térmico de 60 min (Tabla R3).

Factores de transcripción	Genes > o < 2 Mutantes del pie / WT (30 °C)	Genes > o < 2 WT Heat shock 60 min
Ste12	61.86	38.9
Yap1	40.17	47.3
Sfp1	71.47	62.9
Rpn4	38.14	36.7
Rap1	48.33	35.0
Msn2	60.12	37.1
Aft1	26.49	22.1
Met4	11.6	45.7
Gcn4	45.27	29.0
Sok2	39.88	19.3
Msn4	47.31	18.7
Arr1	29.99	22.4
Hsf1	35.66	14.6
Gln3	18.05	32.7
Fhl1	21.83	25.6
Pdr3	20.38	24.0

Tabla R3: Izquierda: Porcentaje de genes regulados por cada factor de transcripción que se encuentran alterados en los mutantes del pie con respecto a su cepa isogénica silvestre más de 2 veces. Derecha: Porcentaje de genes regulados por cada factor de transcripción que se sobreexpresan o se reprimen más de dos veces durante un choque térmico de 60 min en una cepa silvestre. Análisis realizado con el programa YEASTRACT (Teixeira et al., 2006).

Como podemos observar en la tabla R3, muchos de los factores de transcripción implicados en la expresión de los genes diferentemente expresados en los mutantes del pie con respecto a la cepa silvestre, se corresponden con los factores implicados en una respuesta celular a estrés.

Con objeto de profundizar en la respuesta a estrés mostrada por los mutantes del pie se analizó por qRT-PCR la expresión de ciertos genes de estrés, a 30°C y tras el estrés térmico a 37° durante 30 minutos. Se analizaron los genes *HSP12* y *HSP26* que se expresan en condiciones de estrés por temperatura y se regulan por los reguladores transcripcionales NC2 y Mot1 (Peiro-Chova and Estruch, 2007). Además, se analizaron el gen *HSP104* que se requiere para la tolerancia de distintos tipos de estrés (Sanchez et al., 1992) y *SSA4*, altamente inducido en diversas condiciones de estrés (Boorstein and Craig, 1990; Kandror et al., 2004; Quan et al., 2004; Werner-Washburne et al., 1989). Como muestran los datos de qRT-PCR cuantitativa a tiempo real (Figura R62A), la acumulación de mRNA para estos genes está aumentada a 30°C en los mutantes mientras que su inducción a 37°C, respecto a 30°C, es menor que en la cepa isogénica silvestre (Figura R62B). Estos resultados sugieren que las mutaciones en el pie de la RNA pol II llevan a una respuesta a estrés ya activada a la temperatura permisiva de 30°C.

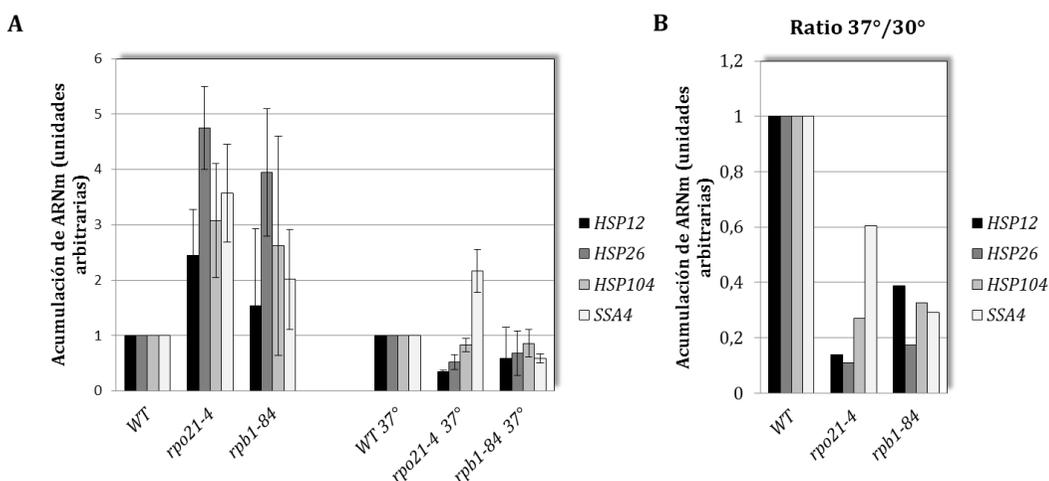


Figura R62: A) Acumulación de mRNA para los genes *HSP12*, *HSP26*, *HSP104* y *SSA4* medidos mediante qRT-PCR en los mutantes del pie y la cepa silvestre conteniendo un plásmido vacío, en medio mínimo SD a 30° y tras un choque térmico de 30 min a 37°. Los valores fueron normalizados a los niveles del rRNA 18S. B) Ratios mostrando la acumulación de mRNA de los genes analizados en el apartado A, entre 37° y 30°C, lo que representa la activación en la expresión de dichos genes tras un estrés térmico.

Puesto que como hemos mostrado anteriormente, la corrección del ensamblaje de la RNA pol II es suficiente para restaurar significativamente la mayoría de los fenotipos que presentan los mutantes del dominio del pie, nos propusimos

analizar el efecto de la sobreexpresión de *RPB6* sobre la expresión de estos genes. Como se observa en la Figura R63A, la sobreexpresión de *RPB6* solo corrige parcialmente los niveles de expresión de algunos de los genes analizados en el caso del mutante *rpo21-4*, mientras que no se observan variaciones en el caso del mutante *rpb1-84*, siendo este efecto exclusivo de genes de estrés (véanse las Figuras R22 y R24 dónde se demuestra la corrección de la acumulación de mRNA de otros tipos de genes tras la sobreexpresión de *RPB6*). De igual manera, si analizamos los ratios de expresión entre 37°/ 30° (Figura R63B) la activación de los genes de estrés se ve restaurada en el mutante *rpo21-4*, para algunos genes, a niveles similares al silvestre, mientras que esto no ocurre para el mutante *rpb1-84*.

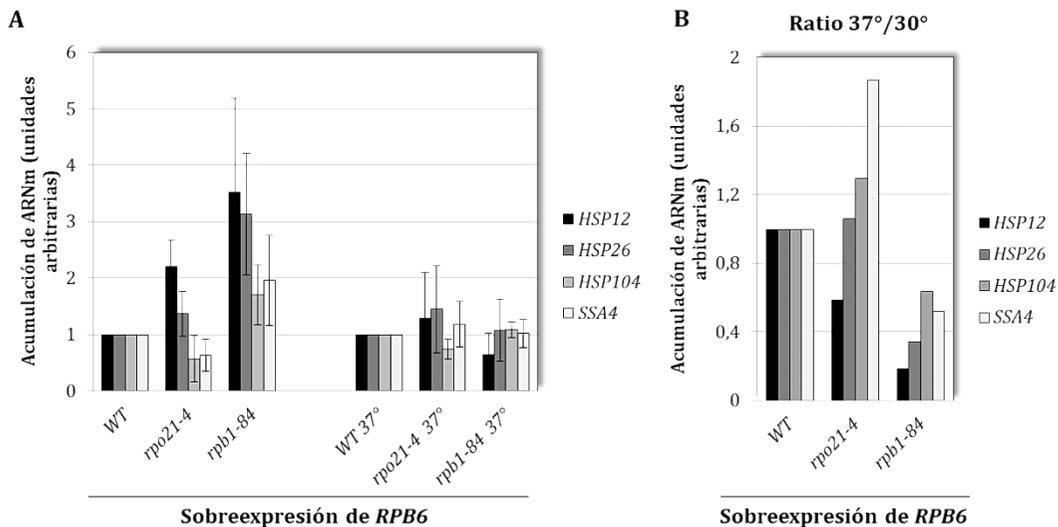


Figura R63: A) Acumulación de mRNA para los genes *HSP12*, *HSP26*, *HSP104* y *SSA4* medidos mediante qRT-PCR en los mutantes del pie y la cepa silvestre sobreexpresando *RPB6*, en medio mínimo SD a 30° y tras un choque térmico de 30 min a 37°. Los valores fueron normalizados a los niveles del rRNA *18S*. B) Ratios mostrando la acumulación de mRNA de los genes analizados en el apartado A, entre 37° y 30°C, lo que representa la activación en la expresión de dichos genes tras un estrés térmico en condiciones de sobreexpresión de *RPB6*.

Todos estos datos, sugieren que la respuesta a estrés provocada por las mutaciones en el pie de la RNA pol II, es por lo menos parcialmente, independiente del defecto provocado por tales mutaciones sobre el ensamblaje del complejo.

Puesto que este defecto en el ensamblaje se correlaciona con un menor reclutamiento de la RNA pol II a los genes, se llevó a cabo un ensayo de

inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) usando el anticuerpo frente a Rpb1, 8WG16, para analizar qué ocurría con la asociación de la RNA pol II a los genes de respuesta a estrés analizados. Como observamos en la Figura R64, no hay diferencias significativas en la ocupación de la RNA pol II a los genes de estrés entre las cepas mutantes y la cepa silvestre, siendo este nivel de ocupación muy bajo en todos los casos, debido a la baja expresión basal de dichos genes a la temperatura permisiva de 30 °C. Estos datos contrastan con la drástica caída en ocupación de RNA pol II en otros genes no implicados en estrés (Figura R22), lo que sugiere que la transcripción puede ser mayor en los genes de estrés que en el resto de genes en las cepas mutantes del pie de la RNA pol II.

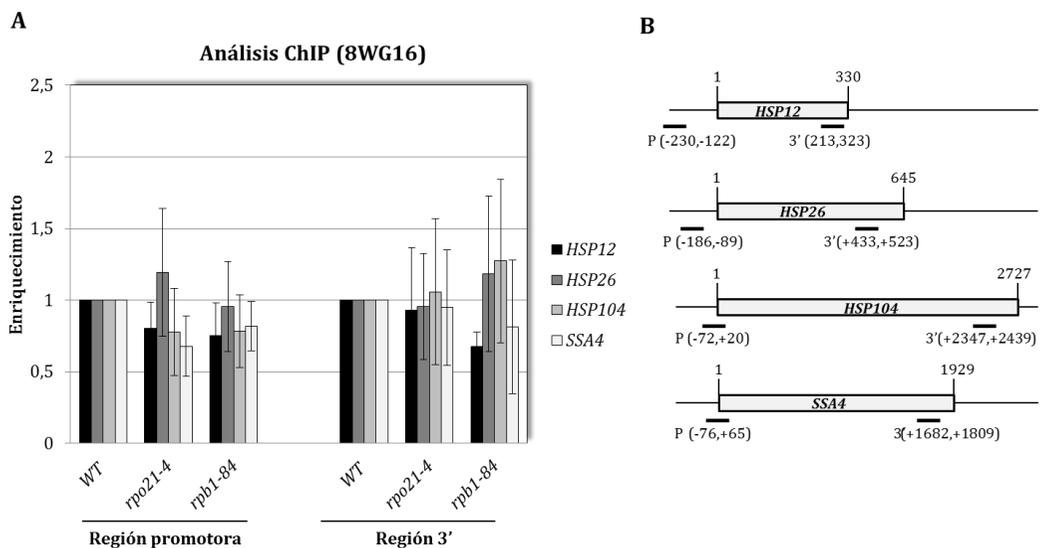


Figura R64: A) Análisis del reclutamiento de Rpb1 a los genes de estrés (ChIP) en los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre transformados con un vector vacío, usando el anticuerpo 8WG16. B) Posición de los oligonucleótidos usados. La secuencia completa y el nombre de los mismos se describen en la tabla suplementaria 4 de Materiales y Métodos.

6.2 ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD DE LOS mRNA

A pesar de que nuestros datos de reclutamiento de RNA pol II a los genes, se correlacionan con los niveles de acumulación de mRNA, los datos mostrados en las Figuras R22, R23, R62 y R64 y representados de manera conjunta en la Figura R65, muestran claramente que los niveles globales de acumulación de mRNA son mayores

que los de ocupación de RNA pol II a los genes. Estos datos sugieren un aumento en la estabilidad de los mRNA como consecuencia de las mutaciones en el pie de la RNA pol II.

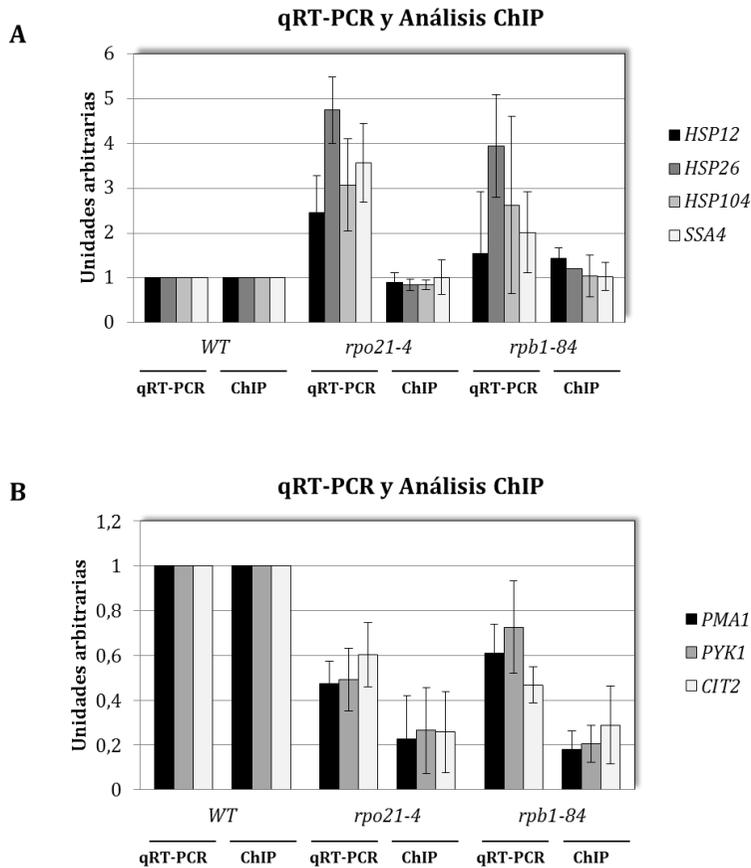


Figura R65: A) Comparación entre la acumulación de mRNA en genes de estrés y el reclutamiento de la RNA pol II a esos genes (usando el anticuerpo 8WG16) tanto en los mutantes del pie como en su cepa isogénica silvestre. B) Comparación entre la acumulación de mRNA y el reclutamiento de la RNA pol II a genes independientes de estrés. Los resultados de ChIP se muestran sólo en el promotor del gen siendo los resultados similares en la región codificante. Los datos proceden de los experimentos mostrados en las Figuras R22, R23A, R62A y R64A.

Como hemos comentado anteriormente, las mutaciones *rpo21-4* y *rpb1-84* afectan a la integridad de la RNA pol II alterando el correcto ensamblaje de la subunidad Rpb6 y la asociación del dímero Rpb4/7. Se ha descrito que tanto Rpb4 como Rpb7 estimulan la iniciación de la traducción (Harel-Sharvit et al., 2010) y median la degradación de los mRNA mediante la unión de Rpb4/7 a los transcritos

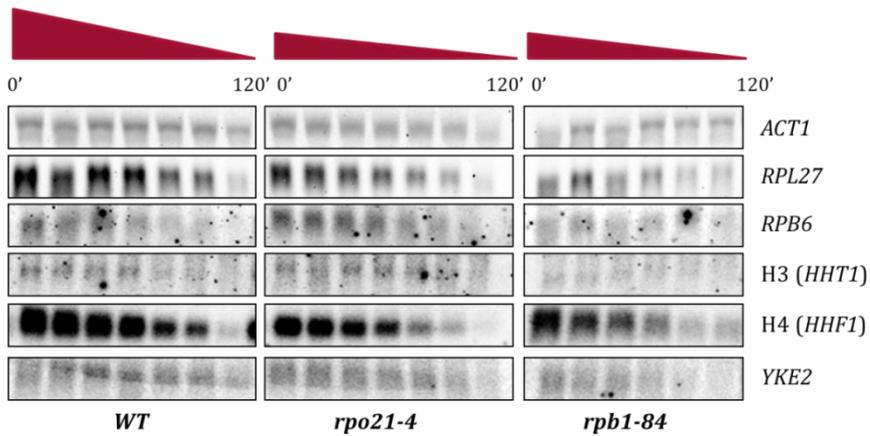
que viajan al citoplasma (Lotan et al., 2005; Lotan et al., 2007). Rpb4/7 permanece unido al mRNA durante todo su ciclo de vida, regulando procesos como el exporte, traducción, movimiento a p-bodies y las vías de degradación de mRNA 5'-3' y 3'-5', de tal manera que los transcritos que poseen Rpb4/7 unido, tienen una mayor habilidad para reclutar la maquinaria de degradación (Choder, 2011).

A pesar del exceso de Rpb4/7 en la célula, su interacción con el mRNA puede ocurrir solo en el contexto de la RNA pol II completa. Mutantes como *rpb6^{Q100R}* y *rpb1^{C67S, C70S}* poseen una capacidad reducida para reclutar el dímero Rpb4/7 al núcleo de la RNA pol II dando lugar a un defecto en la degradación de los mRNA (Forget and Chartrand, 2011; Goler-Baron et al., 2008). Además, el mutante *rpb6^{Q100R}* es defectivo tanto en la síntesis del mRNA como en su degradación y posee una capacidad reducida para modular la degradación del mRNA en condiciones de estrés (Shalem et al., 2011).

Teniendo en cuenta todos estos datos, las diferencias entre la acumulación de mRNA en los mutantes del pie y el reclutamiento de la RNA pol II a esos genes, podría deberse a un defecto en la asociación de Rpb4/7 al núcleo de la enzima. Esto conllevaría una menor cantidad de moléculas de mRNA asociadas con Rpb4/7, induciendo un defecto en el transporte de los mRNA al citoplasma y en el reclutamiento de la maquinaria de degradación a los mismos, alterando por tanto, su estabilidad.

Para comprobar dicha hipótesis se analizó la estabilidad de los mRNA en los mutantes del pie. Para ello, se trataron las células con tiolutina (5µg/ml) durante 0-120 min, para inhibir la transcripción de nuevas moléculas de mRNA y se analizó mediante northern-blot la vida media de las moléculas de mRNA usando sondas específicas (Figura R66).

A



B

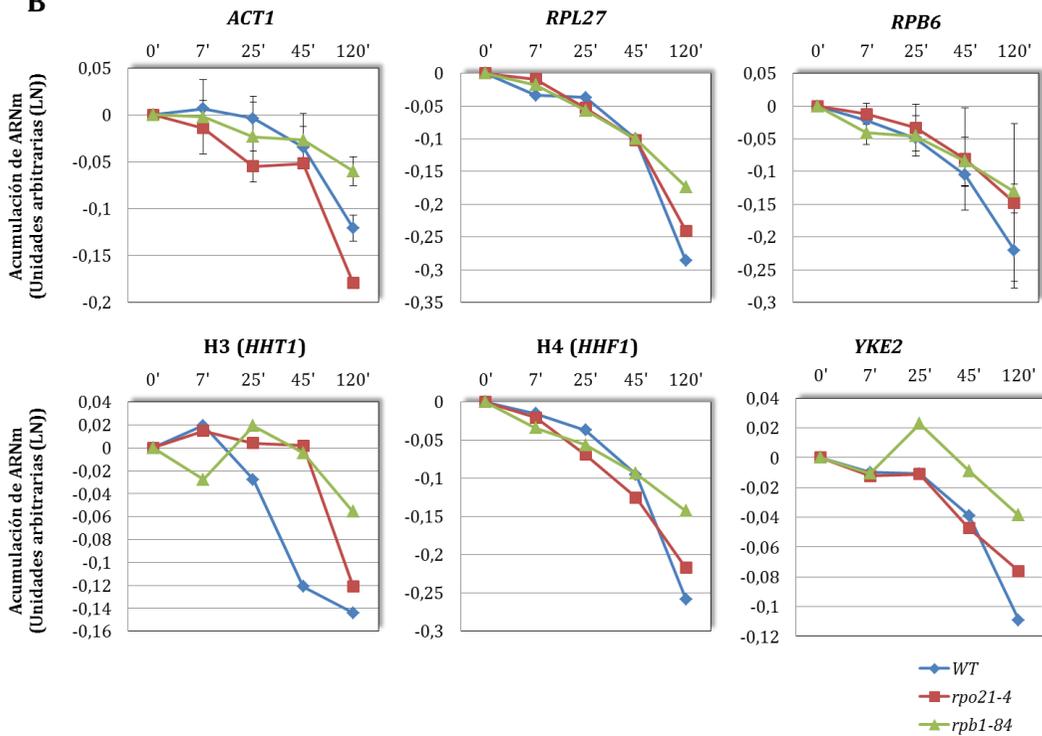


Figura R66: A) Análisis de las vidas medias de mRNA, mediante northern-blot, usando sondas específicas para distintos genes. La transcripción de mRNA se detuvo mediante la adición de tiotoluita a una concentración de 5µg/ml y se tomaron muestras a distintos tiempos (0, 7, 12, 25, 45, 60, 90 y 120 min). La pendiente de los triángulos es indicativa de la velocidad de degradación del mRNA en cada cepa. El análisis mediante northern-blot se hizo en colaboración con el grupo del Dr. José Enrique Pérez Ortín, de la Universidad de Valencia. B) Representación gráfica de la degradación del mRNA calculada mediante northern-blot en el apartado A). Se muestra la caída en escala logarítmica (logaritmo neperiano).

Como se observa en la imagen R66 y en la Tabla R4, la vida media de todos los mRNA analizados se ve incrementada, de manera general, como consecuencia de las mutaciones en el pie de la RNA pol II, con respecto a la cepa isogénica silvestre, excepto en el caso del mutante *rpo21-4* para el gen *ACT1*.

	<i>WT</i>	<i>rpo21-4</i>	<i>rpb1-84</i>
<i>ACT1</i>	1	0,76	1,73
<i>RPL27</i>	1	1,19	1,51
<i>RPB6</i>	1	1,76	1,69
<i>HHT1 (H3)</i>	1	1,56	2,63
<i>HHF1 (H4)</i>	1	1,17	1,75
<i>YKE2</i>	1	1,17	2

Tabla R4: Vidas medias de mRNA, a partir de los análisis mediante northern-blot de la Figura R66, en los mutantes del pie. Se comparan los datos con los de las vidas medias de dichos mRNA en la cepa isogénica silvestre (consideradas como 1).

Se ha descrito que el antibiótico tiolutina, que inhibe la actividad de las tres RNA polimerasas tanto *in vivo* como *in vitro*, incrementa los niveles de mRNA de genes de estrés, tales como *HSP82* (entre 5 y 10 veces), *SSA4* (más de 25 veces) y *HSP26* (más de 50 veces), en condiciones en las que la transcripción de los genes no implicados en respuesta a estrés está bloqueada (Adams and Gross, 1991).

Por tanto, para analizar las vidas medias de mRNA de genes de estrés, no pudimos utilizar la aproximación anterior. Para poder realizar estos análisis se reemplazaron los promotores de los genes *HSP26* y *HSP12* por el promotor *GAL1* regulable por galactosa, mediante amplificación del mismo a partir del plásmido pFA6a-KanMX6-p*GAL1* con los oligonucleótidos F4-*HSP26* y R2-*HSP26* y del plásmido pFA6a-*TRP1*-p*GAL1* con los oligonucleótidos F4-*HSP12* y R2-*HSP12* y posterior recombinación homóloga en *S. cerevisiae* (Longtine et al., 1998). A partir de la cepa Gr21-2d se generó la cepa YFN467 conteniendo el gen *HSP26* bajo el control del promotor *GAL1* y a partir de esta, la cepa YFN469 que poseía tanto el gen *HSP26* como el gen *HSP12* bajo el control de dicho promotor. Esta última cepa se transformó con los plásmidos que contenían los alelos con las mutaciones del pie de la RNA pol II y se eliminó el plásmido conteniendo el gen silvestre mediante un tratamiento con 5-

FOA. Puesto que los mutantes del pie muestran activada la respuesta a estrés, comprobamos si el cambio de promotor de los genes *HSP26* y *HSP12* afectaba negativamente al crecimiento de las cepas generadas en condiciones de represión del promotor *GAL1*, en presencia de glucosa y ausencia de galactosa. Como se observa en la Figura R67, el crecimiento de las cepas, a temperatura permisiva, se ve alterado en condiciones de represión del promotor *GAL1*, probablemente por la represión de la expresión de los genes de estrés *HSP12* y *HSP26*.

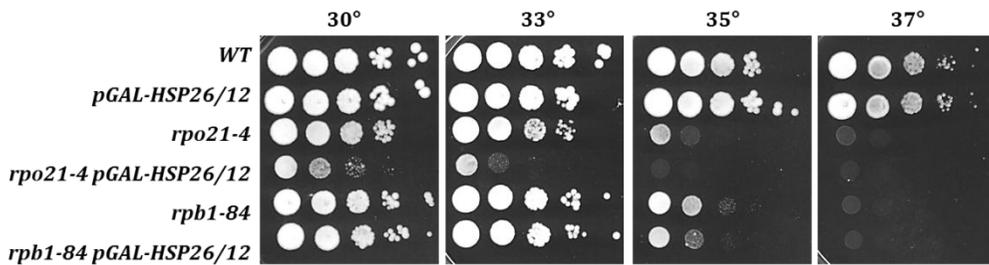


Figura R67: Análisis del crecimiento de los mutantes del pie y la cepa isogénica silvestre, así como de las cepas derivadas con los genes *HSP12* y *HSP26* bajo el control del promotor *GAL1*, en ausencia de galactosa. Se muestran diluciones seriadas de las cepas, en medio rico YPD a distintas temperaturas.

Para llevar a cabo el análisis de las vidas medias de los mRNA de los genes *HSP12* y *HSP26*, las cepas se crecieron en SD-galactosa. A DO_{600} 0,4-0,5 se tomó una muestra que representa el tiempo 0 y el resto del cultivo se lavó y se incubó en SD-glucosa, para parar la transcripción de dichos genes debido a la represión del promotor *GAL1*. Se tomaron muestras tras 10 min, 20 min, 30 min y 45 min de incubación, y la acumulación de mRNA de los genes *HSP12* y *HSP26*, así como del gen *GAL1* como control, se analizó mediante qRT-PCR (Figura 68).

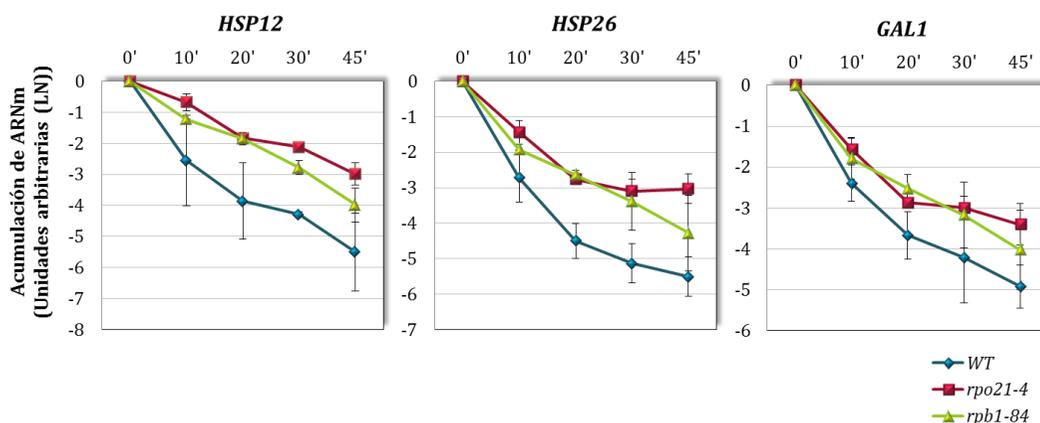


Figura R68: Representación de la acumulación de mRNA de los genes *HSP12* y *HSP26*, así como de *GAL1* como control, analizados por qRT-PCR, para calcular la vida media de los mismos. Los valores fueron normalizados a los niveles del rRNA *18S*. Se muestra el descenso en la cantidad de mRNA tanto de la cepa silvestre como de los mutantes del pie a lo largo del tiempo. Se muestra la caída en escala logarítmica (logaritmo neperiano).

Como se observa, la disminución en la acumulación de los mRNA de los genes de estrés *HSP12* y *HSP26* a lo largo del tiempo, así como del mRNA del gen *GAL1*, es más lenta en el caso de los mutantes del pie que en la cepa silvestre, indicando un aumento en las vidas medias de estos transcritos. En concreto, las vidas medias calculadas a partir de estos ensayos, se representan en la tabla R5.

	<i>WT</i>	<i>rpo21-4</i>	<i>rpb1-84</i>
<i>HSP12</i>	1	1,71	1,32
<i>HSP26</i>	1	1,77	1,38
<i>GAL1</i>	1	1,42	1,25

Tabla R5: Vidas medias de mRNA, a partir de los análisis mediante qRT-PCR de la Figura R68, en los mutantes del pie. Se comparan los datos con los de las vidas medias de dichos mRNA en la cepa isogénica silvestre (consideradas como 1).

Estos datos, junto con los obtenidos mediante análisis por northern-blot, demuestran un claro aumento de la estabilidad de los mRNA cuando el pie de la RNA pol II se encuentra alterado. Estos resultados apuntan a la posibilidad de una disminución en la cantidad de mRNA asociados a Rpb4, y probablemente también a Rpb7, posiblemente por el incorrecto ensamblaje de la RNA pol II provocado al

alterar el pie de la enzima, lo que dificultaría la interacción con la maquinaria de degradación de los mRNA.

6.3 ANÁLISIS DE LA UNIÓN DE Rpb4 A LOS mRNA EN LOS MUTANTES DEL PIE COMO MEDIO PARA EXPLICAR EL AUMENTO EN LA VIDA MEDIA DEL mRNA

Como hemos visto anteriormente, Rpb4 se une al mRNA naciente en el entorno de la RNA pol II y lo acompaña durante todo su ciclo de vida, influyendo en su vida media mediante la interacción con la maquinaria de degradación del mRNA (Choder, 2011; Forget and Chartrand, 2011; Goler-Baron et al., 2008; Lotan et al., 2005; Lotan et al., 2007). Los mutantes del pie, al igual que ocurre con los mutantes *rpb6^{Q100R}* y *rpb1^{C67S, C70S}* (Forget and Chartrand, 2011; Goler-Baron et al., 2008), poseen una capacidad reducida para reclutar el dímero Rpb4/7 a la RNA pol II. Por tanto, podemos suponer que el aumento en la vida media de los mRNA en los mutantes del pie se debe a la presencia de un mayor porcentaje de mRNA que carecen de Rpb4/7 unido, lo que dificultaría la interacción con la maquinaria de degradación del mRNA.

Para profundizar en esta hipótesis, se diseñó un procedimiento experimental consistente en unir las proteínas al RNA de forma estable (*crosslinking*) mediante el uso de luz UV a 254 nm con una potencia de 1,200 mJ/cm² (Ver materiales y métodos, apartado 2.4.5). Tras la incubación, y la rotura celular, se extrajeron los mRNA usando bolas magnéticas unidas a oligodT (complementario a la cola poli(A) del mRNA; *Agilent Technologies*). El mRNA extraído se utilizó para llevar a cabo análisis de qRT-PCR y análisis de western-blot de las proteínas de interés asociadas a los mRNA. Para establecer el tiempo óptimo de *crosslinking*, se realizó un primer experimento usando una cepa control que contenía la proteína Pub1 etiquetada con TAP, proteína de unión al mRNA que participa en su estabilidad así como en el ensamblaje de p-bodies (Buchan et al., 2008; Duttagupta et al., 2005; Matunis et al., 1993). Como se observa en la Figura R69A, el análisis de la acumulación de mRNA del gen *ACT1*, utilizando como control interno una región intergénica no transcrita del cromosoma V de *S. cerevisiae*, muestra un enriquecimiento de la cantidad de mRNA de *ACT1*, a medida que aumenta el tiempo de *crosslinking*. El hecho de que a tiempo 0

se observe la mayor acumulación sugiere que se favorece la extracción de mRNA sin incubación con luz UV, probablemente debido a que la luz UV daña los mRNA.

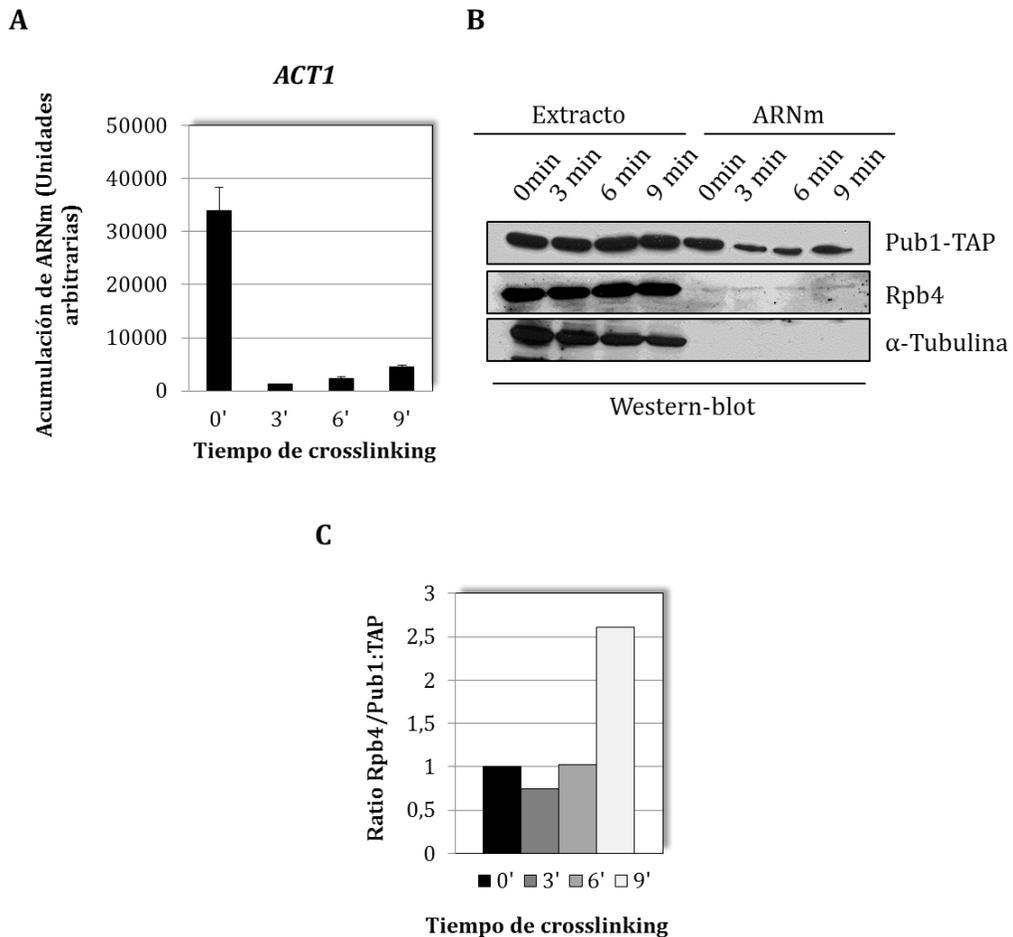


Figura R69: Prueba para detectar la unión de Rpb4 al mRNA usando la cepa Pub1-TAP. A) Análisis mediante RT-PCR en tiempo real para detectar el enriquecimiento en mRNA del gen *ACT1* frente a una región intergénica de DNA genómico. B) Western-blot en extracto total así como en el mRNA purificado. Se detectó la proteína control Pub1 mediante el uso del anticuerpo PAP que reconoce la etiqueta; también se detectó la proteína Rpb4 mediante el uso de un anticuerpo específico. El western-blot usando un anticuerpo frente a la proteína α -tubulina, dio un resultado negativo en la purificación de mRNA como era de esperar. C) Cuantificación de los western-blot. Se muestra la cantidad de Rpb4 unida al mRNA frente a la cantidad de Pub1-TAP.

Cuando analizamos las proteínas asociadas al mRNA por western-blot, detectamos la proteína control Pub1 en gran cantidad (Figura R69B). De la misma manera podemos detectar la proteína de interés Rpb4 sin encontrar contaminación

con proteínas citoplasmáticas tales como α -tubulina. Además, como observamos en la Figura R69C, a 9 min de crosslinking obtenemos la mayor cantidad de Rpb4 unido al mRNA si lo comparamos con la proteína Pub1-TAP. Por tanto, en base a estos datos, decidimos utilizar 9 min como tiempo óptimo de crosslinking para detectar Rpb4 unido al mRNA (3 ciclos de 3 min con UV, 254 nm y 1,200 mJ/cm² potencia, con 3 min en hielo entre cada ciclo).

Para analizar la cantidad de Rpb4 unido al mRNA en los mutantes del pie, decidimos generar cepas que contuviesen las mutaciones del pie de la RNA pol II y la proteína Pub1-TAP como control positivo. Para ello se introdujo el alelo correspondiente mediante recombinación homóloga en la cepa YFN234, a partir de la amplificación con los oligonucleótidos específicos *PUB1*-501/301 desde la cepa PAY586, dando lugar a la cepa YFN502. Tras ser transformada esta con los plásmidos conteniendo los alelos con mutaciones del pie, así como el alelo *RPB1* silvestre, se incubaron en FOA para eliminar el plásmido original conteniendo el alelo *RPB1* silvestre, y se analizó si la etiqueta en Pub1 afectaba al crecimiento de las cepas generadas, respecto a sus controles (Figura R70).

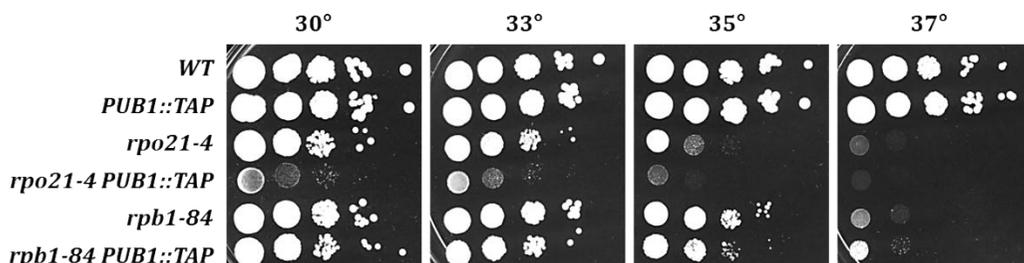


Figura R70: Crecimiento de las cepas con mutaciones del pie de la RNA pol II conteniendo la proteína Pub1-TAP, así como de la cepa silvestre y mutantes simples correspondientes. Diluciones seriadas de las cepas en medio rico YPD a distintas temperaturas.

El etiquetado de la proteína Pub1 con TAP tiene un efecto negativo en el crecimiento de los mutantes del pie, pero no de la cepa isogénica silvestre. Por tanto, se decidió descartar el uso de esas cepas y se procedió a detectar la proteína Rpb4 unida al mRNA en las cepas mutantes simples del pie (Figura R71).

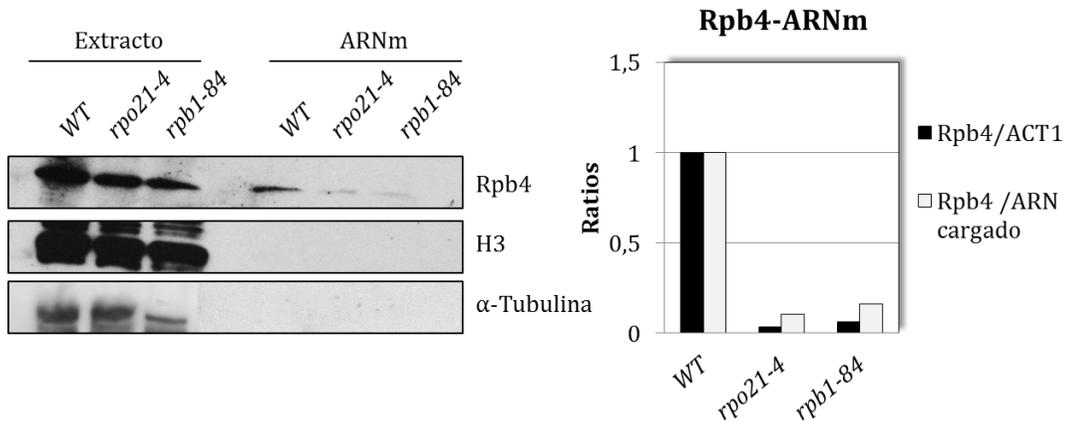


Figura R71: Extracción de mRNA y detección por western-blot de proteínas asociadas. Se muestran las imágenes del western-blot con distintos anticuerpos así como las cuantificaciones de los mismos. Para las cuantificaciones de la cantidad de Rpb4 medida por western-blot se usó como normalizador la cantidad de mRNA del gen *ACT1* medido mediante qPCR-RT así como la cantidad total de mRNA cargado, obteniendo resultados similares con ambas normalizaciones.

Como podemos apreciar en la Figura R71, las cuantificaciones de estos resultados de western-blot sobre la cantidad total de mRNA utilizado, así como sobre la acumulación de mRNA del gen *ACT1* (medido por qRT-PCR), muestran una menor cantidad de Rpb4 unido al mRNA en los mutantes del pie que en su cepa isogénica silvestre. De igual manera, no se observa proteína histona H3 (control de presencia DNA genómico), ni de α -tubulina (control de proteínas citoplasmáticas). Puestos que estos resultados son preliminares, se necesitan más datos para confirmar la menor unión de Rpb4 al mRNA en los mutantes del pie.

6.4 ESTUDIO DE LA ACUMULACIÓN DE P-BODIES EN LOS MUTANTES DEL DOMINIO CONSERVADO DEL PIE DE LA RNA POLIMERASA II

Rpb4 se localiza en p-bodies, sitios donde se elimina la caperuzas de los mRNA y se degradan (Forget and Chartrand, 2011; Lotan et al., 2005). Se ha descrito que en respuesta a escasez de nutrientes, el número de p-bodies que contienen Rpb4 aumenta gradualmente (Farago et al., 2003). Además, se sabe que la cantidad de p-bodies se incrementa en el mutante *rpb7-26* (Harel-Sharvit et al., 2010) y en el mutante *rpb4Δ* (Lotan et al., 2005). Se ha descrito además, que los p-bodies son

importantes en la respuesta celular a estrés incrementando su número durante esta (Teixeira et al., 2005). Se ha descrito también una correlación entre una caída en los ratios de traducción y un incremento en la concentración de p-bodies (Teixeira et al., 2005).

Debido a que los mutantes del pie presentan activada una respuesta a estrés a temperatura permisiva, decidimos analizar si se correspondía con un incremento en la cantidad de p-bodies. Para ello, transformamos los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre con un plásmido que expresaba la proteína Dcp2, proteína constitutiva de los p-bodies (Harigaya et al., 2010), con una etiqueta GFP fluorescente y analizamos su localización *in vivo* (Figura R72).

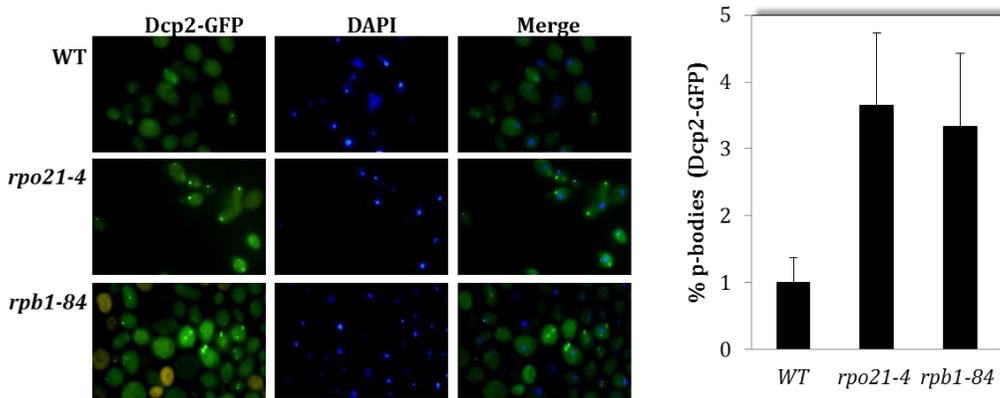


Figura R72: Localización de Dcp2-GFP en los mutantes del pie y en su cepa isogénica silvestre. Se analizó el porcentaje de p-bodies en relación al número de células en ambos mutantes y se comparó con el de la cepa isogénica silvestre. Se analizaron aproximadamente 200 células totales en 3 experimentos independientes.

Como se observa, los mutantes del pie presentan una acumulación p-bodies con respecto a la cepa isogénica silvestre, a temperatura permisiva. Para comprobar si este defecto se compensaba con la sobreexpresión de *RPB6*, se analizó la localización de Dcp2-GFP *in vivo*, en células transformadas con el plásmido pCM185-*RPB6* (Figura R73).

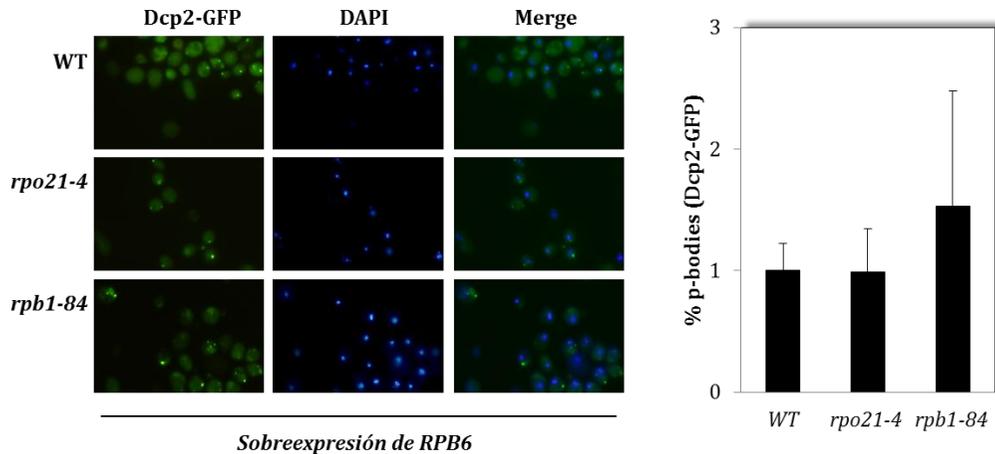


Figura R73: Localización de Dcp2-GFP en los mutantes del pie y en su cepa isogénica silvestre transformadas con pCM185-*RPB6*. Se analizó el porcentaje de p-bodies en relación al número de células en ambos mutantes y se comparó con el de la cepa isogénica silvestre. Se analizaron aproximadamente 200 células totales en 3 experimentos independientes.

El análisis de la localización de Dcp2-GFP, *in vivo*, en los mutantes del pie sobreexpresando *RPB6* muestra que el número de p-bodies en los mutantes es similar al silvestre, indicando una correlación directa con el correcto ensamblaje de la enzima. Es interesante destacar que los niveles de p-bodies en la cepa silvestre son más elevados bajo sobreexpresión de *RPB6*, que cuando contienen un plásmido vacío (Figuras R73 y R72).

El incremento en la cantidad de p-bodies que presentan los mutantes del pie, puede estar relacionado con la respuesta celular a estrés que presentan dichos mutantes, ya que se ha visto que estos cuerpos de degradación aumentan en condiciones de estrés (Teixeira et al., 2005), en las que la iniciación de la traducción se interrumpe y los mRNA pasan desde los polisomas a acumularse en los p-bodies (Harel-Sharvit et al., 2010). Además, el hecho de que el número de p-bodies aumente en mutantes *rpb7-26* y *rpb4Δ* (Harel-Sharvit et al., 2010; Lotan et al., 2005), puede estar en concordancia con nuestros datos en los mutantes del pie, los cuales poseen un menor reclutamiento del dímero Rpb4/7, lo que altera el ciclo de vida del mRNA. Hay que destacar que en los mutantes del pie, el exceso de Rpb4 libre se acumula en el citoplasma y no formando parte de los p-bodies (Figura R20).

6.5 ANÁLISIS DE REGULADORES TRANSCRIPCIONALES RELACIONADOS CON RESPUESTA A ESTRÉS

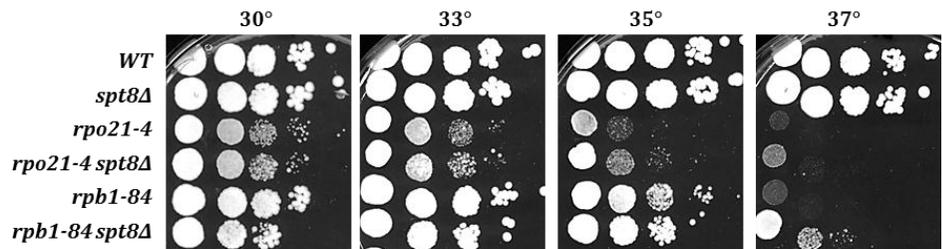
La alteración del dominio conservado del pie de la RNA pol II, conlleva una serie de defectos transcripcionales como son un menor reclutamiento de la RNA pol II al DNA y una reducida capacidad de la enzima para mantener asociado el dímero Rpb4/7, lo que podría traducirse en el aumento observado en la vida media de los mRNA. Sin embargo, ninguno de estos efectos es suficiente para explicar la inducción de la respuesta de estrés que presentan los mutantes del pie a temperatura permisiva. Hemos observado también, que en los genes de estrés la asociación de la RNA pol II al DNA es mayor que en el resto de genes. Por otro lado, el aumento en la estabilidad de los mRNA podría influir en el aumento en la acumulación de mRNA de los genes de estrés en los mutantes del pie. Además, la acumulación de p-bodies en estas cepas, sugieren también el hecho de que los mutantes del pie poseen un fenotipo de respuesta a estrés. Sin embargo, la respuesta de estrés no es mayoritariamente dependiente del defecto de ensamblaje del complejo, debido a que la expresión alterada de los genes de estrés no se corrige totalmente al aumentar la dosis de Rpb6.

Los genes generales de respuesta a estrés, se activan por factores de transcripción específicos como Msn2/Msn4 (Amoros and Estruch, 2001). Además, el complejo SAGA actúa como activador de la transcripción de estos genes mediante el reclutamiento de TBP a la caja TATA (Sermwittayawong and Tan, 2006). En condiciones de inducción de estrés, la interacción de las subunidades de la cola del Mediador con activadores o co-activadores como SAGA y el complejo Swi/Snf causa activación transcripcional, mientras que bajo condiciones de no inducción, la cola del Mediador interacciona con las subunidades del módulo quinasa, bloqueando su asociación con la RNA pol II y conduciendo a la represión transcripcional (Ansari and Morse, 2012; Knuesel et al., 2009).

Como hemos visto anteriormente, la interacción del Mediador con la RNA pol II se ve alterada en los mutantes del pie, lo que puede influir en la respuesta a estrés que presentan dichos mutantes. Como se ha descrito, el complejo SAGA es un regulador positivo de genes de estrés. Por tanto, nos planteamos analizar las interacciones genéticas existentes entre las mutaciones del pie de la RNA pol II y el gen codificante

de la subunidad Spt8 de SAGA, responsable del reclutamiento de TBP a la caja TATA (Sermwittayawong and Tan, 2006) (Figura R74A), así como la sobreexpresión dicho gen en las cepas conteniendo las mutaciones del pie, mediante el uso del plásmido pVV208-*SPT8* (Figura R74B).

A



B

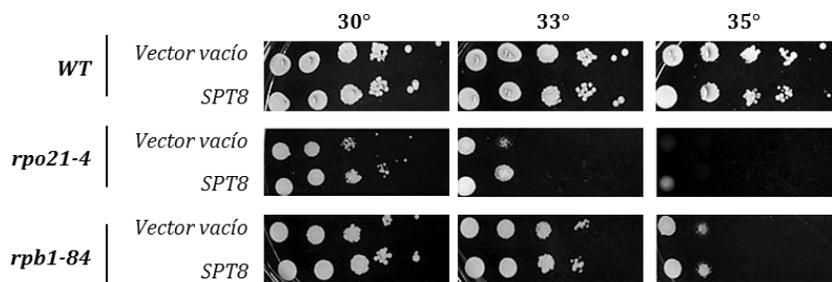


Figura R74: A) Interacciones genéticas entre los mutantes *rpo21-4* y *rpb1-84* y la delección del gen *SPT8* (cepa YFN193). Se compara el crecimiento con el de los mutantes simples y con la cepa isogénica silvestre mediante la siembra de diluciones seriadas en medio rico YPD a distintas temperaturas. B) Sobreexpresión del gen *SPT8* en los mutantes del pie y su cepa isogénica silvestre mediante transformación con el plásmido pVV208-*SPT8*. Se compara con el crecimiento de las mismas cepas conteniendo un vector vacío mediante la siembra de diluciones seriadas a distintas temperaturas en medio mínimo SD con los requerimientos adecuados.

Como se observa en la Figura R74A, la delección del gen *SPT8*, recupera parcialmente el fenotipo de crecimiento de los mutantes del pie. Esto podría estar en concordancia con el hecho de que SAGA activa la respuesta a estrés, por lo que, al alterar este complejo, los genes de respuesta a estrés podrían estar menos activados. En relación con esto, la sobreexpresión de *SPT8* no produce ningún fenotipo en estas cepas (Figura R74B). Por otro lado, la sobreexpresión de *RPB6* en los dobles

mutantes, recupera el fenotipo de crecimiento de la cepa *rpo21-4 spt8Δ* a nivel similar al mutante simple *rpo21-4* y algo menos para el doble mutante *rpb1-84 spt8Δ*, sugiriendo que la corrección del ensamblaje de la RNA pol II no es suficiente para restaurar completamente el crecimiento de los dobles mutantes (Figura R75).

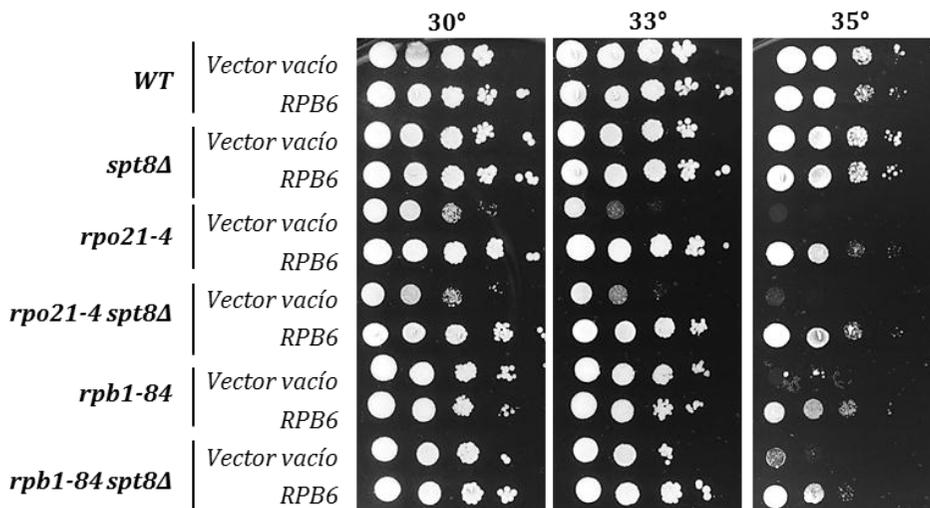


Figura R75: Análisis del crecimiento de mutantes conteniendo las mutaciones del pie y/o la delección de *SPT8*, sobreexpresando *RPB6*. Se compara el crecimiento con las cepas transformadas con un vector vacío, mediante la siembra en medio mínimo SD con requerimientos a distintas temperaturas.

Los reguladores transcripcionales NC2 y Mot1 cooperan también para regular la unión de TBP al promotor y la expresión génica. Ambos están implicados en la represión transcripcional y en menor medida en la activación de la transcripción (Spedale et al., 2012). Sorprendentemente, la regulación negativa o positiva de NC2 y Mot1 no parece depender de su ocupación en el promotor sino de la ocupación del promotor por activadores de la transcripción. Genes con una gran ocupación de SAGA en el promotor y de factores de transcripción relacionados con respuesta a estrés, se encuentran reprimidos por NC2 y Mot1, mientras que genes con una alta ocupación en el promotor de TFIID y factores de transcripción de genes constitutivos, son principalmente activados por NC2 y Mot1 (Spedale et al., 2012). Además, la expresión basal de genes como *HSP26* o *ARO10* se incrementa tras la depleción de NC2 o Mot1 (Spedale et al., 2012).

Por tanto, puesto que NC2 y Mot1 participan en la represión de los genes de respuesta a estrés en condiciones de ausencia del mismo, podríamos sugerir que dicha represión no se esté dando de manera correcta en los mutantes del pie, provocando la inducción de la respuesta de estrés a temperatura permisiva. Para comprobar esta hipótesis nos planteamos sobreexpresar los genes para estos reguladores transcripcionales en las cepas que contienen las mutaciones del pie de la RNA pol II (Figura R76).

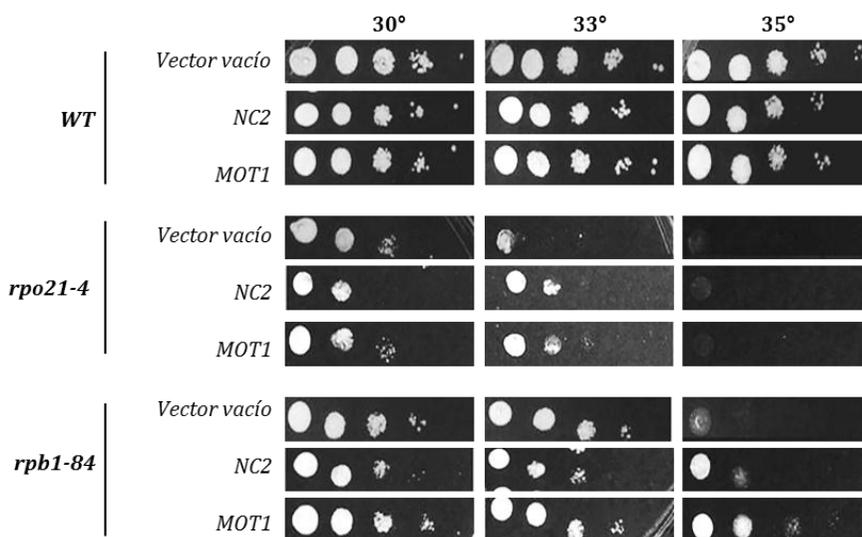


Figura R76: Sobreexpresión de los genes codificantes de los reguladores transcripcionales NC2 y Mot1 en los mutantes del pie. Los mutantes y su cepa isogénica silvestre se transformaron con los plásmidos pML27 y pMAC81 así como con un vector vacío. Se compara el crecimiento mediante siembra de diluciones seriadas en medio mínimo SD con requerimientos a distintas temperaturas.

Según muestra la imagen R76, la sobreexpresión tanto de NC2 (ambas subunidades del dímero, codificadas por los genes *BUR6* y *NC2 β*) como de *MOT1* en los mutantes del pie, corrige parcialmente el defecto de crecimiento presentado por dichos mutantes. Podríamos especular que un aumento en la dosis de estos factores de transcripción, corregiría el defecto de crecimiento de los mutantes del pie al reprimir la expresión de genes de respuesta a estrés. Para completar el estudio se analizaron las interacciones genéticas existentes entre mutantes de *NC2* y *MOT1* y las mutaciones del dominio conservado del pie, *rpo21-4* y *rpb1-84* (Figura R77). Para ello

se construyó la cepa YFN441 mediante el cruce de la cepa madre YFN247 y la cepa YFN219 que contenía el gen *BUR6* delecionado y un plásmido pGEN-*bur6-ts* (*TRP*, 2 μ). El plásmido pGEN-*bur6-ts* se construyó a partir del plásmido *pbur6-ts* (*LEU2*, *CEN*) desde la cepa CS41-4.3. El alelo *bur6-ts* se amplificó a partir de este plásmido con los oligonucleótidos específicos *BUR6*-501/301, se cortó con *Bam*HI y *Sal*I y se clonó en el plásmido pGEN. La cepa YFN475 se generó a partir del cruce de la cepa madre YFN247 y la cepa GY236 que contenía el alelo mutante *mot1-301*. Las cepas YFN441 e YFN475 se transformaron con los plásmidos conteniendo las mutaciones del pie y se sembraron en SD suplementado con 5-FOA para eliminar el plásmido con *RPB1* silvestre. Las interacciones genéticas se muestran en la Figura R77.

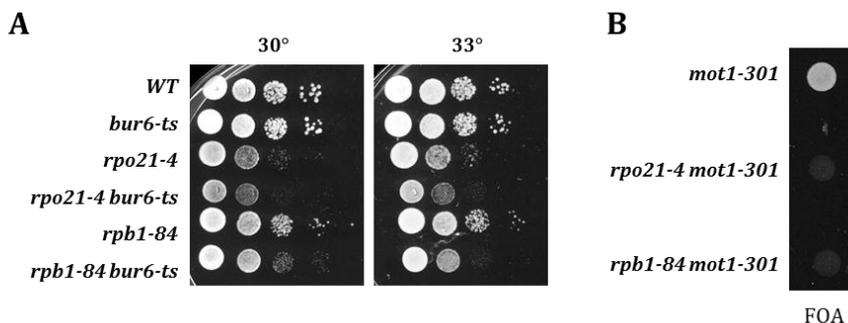


Figura R77: A) Interacciones genéticas existentes entre las mutaciones del dominio conservado del pie y el mutante *bur6-ts* (cepa YFN441). Se compara el crecimiento con los mutantes simples y con la cepa isogénica silvestre mediante el crecimiento de diluciones seriadas de las cepas en medio rico YPD a distintas temperaturas. B) Letalidad sintética existentes entre las mutaciones del pie y el mutante *mot1-301* (cepa YFN475). Se muestra el crecimiento en SD suplementado con ácido 5-FOA.

Como se observa en la Figura R77A existe una interacción genética negativa entre el mutante *bur6-ts* (correspondiente a la subunidad Bur6 de NC2) y las mutaciones del pie de la RNA pol II. De la misma manera, la mutación *mot1-301* (Prelich, 1997) provoca letalidad sintética en combinación con mutaciones en el pie de la enzima (Figura R77B). Estos datos están en concordancia con nuestro modelo, según el cual NC2 y Mot1 podrían no ejercer correctamente su función como represores de la transcripción de genes de estrés en los mutantes del pie y la mutación de estos reguladores no haría sino empeorar el fenotipo de dichos mutantes.

Debido al aumento en mRNA de genes de respuesta a estrés en condiciones permisivas y a las interacciones genéticas demostradas entre los genes codificantes de los reguladores transcripcionales NC2, Mot1 y los mutantes del pie, nos propusimos analizar la ocupación de Mot1 en los promotores de los genes, para comprobar si un reclutamiento alterado de Mot1 podría contribuir la desregulación de la respuesta a estrés en los mutantes del pie. Para ello, se usó la cepa YFN339 que posee la etiqueta Mot1-Myc para llevar a cabo experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (Figura R78).

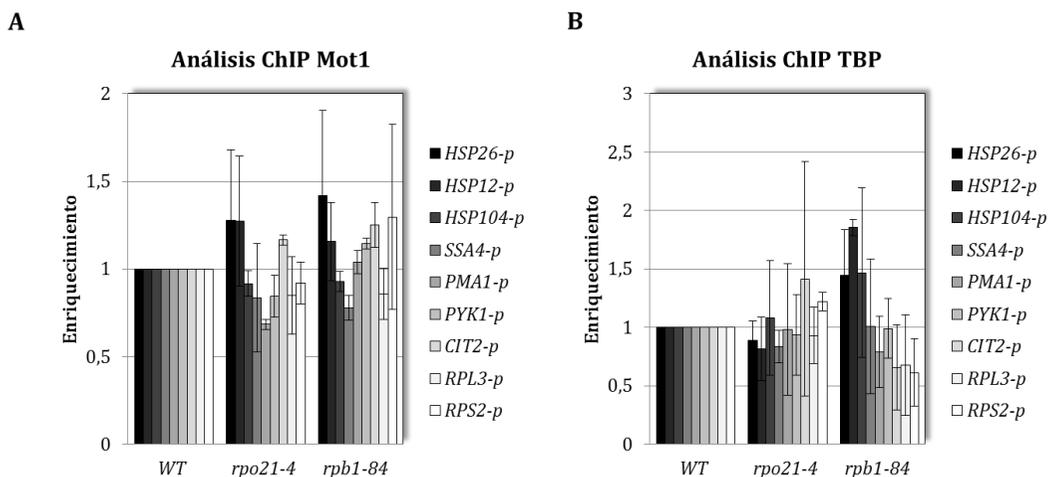


Figura R78: A) Análisis mediante inmunoprecipitación de cromatina de la ocupación de Mot1 (Mot1-Myc) en los promotores de los genes en la cepa silvestre y en los mutantes del dominio conservado del pie. B) Inmunoprecipitación de cromatina usando TBP::HA.

El reclutamiento de Mot1 en los mutantes del pie es similar al de la cepa silvestre (Figura R78A). De la misma manera ocurre con el reclutamiento de TBP, al igual que habíamos visto anteriormente (Figura R78B). En la Figura R79A se muestran los ratios entre el reclutamiento de Mot1 y Rpb1 (extraídos del experimento presentado en la Figura R78A), así como los ratios entre el reclutamiento de TBP y Rpb1 (Figura R79B), demostrando que no existen diferencias significativas en dichos ratios en los genes de estrés en los mutantes respecto a la cepa silvestre. Por el contrario, el reclutamiento de Mot1 y TBP es mayor que el de Rpb1 para el resto de genes, debido a la poca ocupación de RNA pol II que presentan dichos genes, como se había mostrado previamente. Estos datos indican, que de manera global en las células mutantes, el ratio Mot1/Rpb1 y TBP/Rpb1 es menor en

los genes de estrés que en el resto, Por tanto, es posible que se trate de un problema en la asociación de estos factores con el resto de la maquinaria de transcripción el responsable de la respuesta diferencial para genes de estrés respecto al resto.

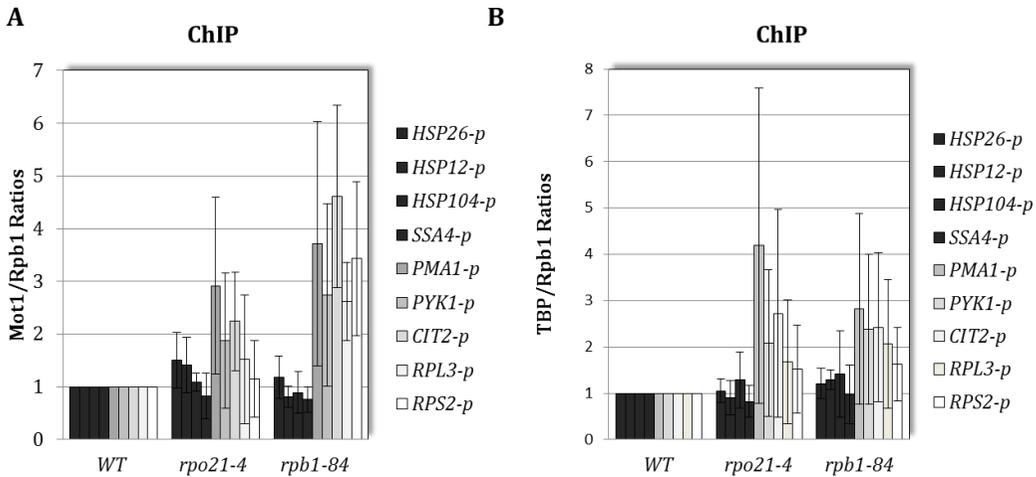


Figura R79: A) Análisis mediante inmunoprecipitación de cromatina de la ocupación de Mot1 (Mot1-Myc) en los promotores de los genes en la cepa silvestre y en los mutantes del dominio conservado del pie respecto a la ocupación de Rpb1. B) Análisis de la ocupación de TBP (TBP-HA) en los promotores de los genes en la cepa silvestre y en los mutantes del dominio conservado del pie respecto a la ocupación de Rpb1. En ambos casos se muestran los genes de estrés en color negro y los genes independientes de estrés en escala de grises.

Para comprobar si la corrección del ensamblaje de la enzima es suficiente para restaurar el fenotipo de los dobles mutantes *rpo21-4 mot1-301* y *rpb1-84 mot1-301*, sobreexpresamos *RPB6* en estas cepas (Figura R80).

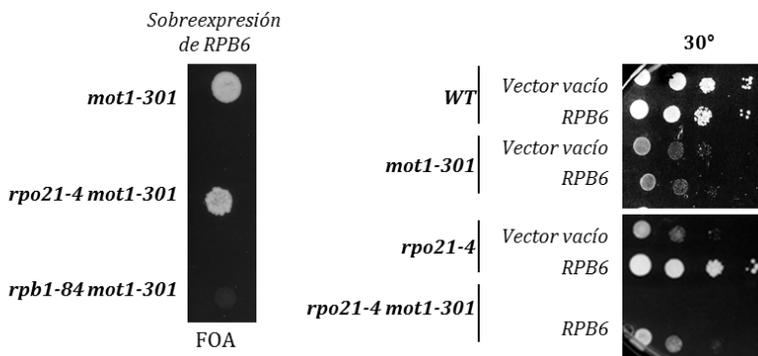


Figura R80: Sobreexpresión de *RPB6* en los dobles mutantes *rpo21-4 mot1-301* y *rpb1-84 mot1-301*. Se muestra el crecimiento en SD suplementado con 5-FOA (izquierda). El panel de

la derecha muestra el crecimiento del mutante doble *rpo21-4 mot1-301* tras la sobreexpresión de *RPB6* en comparación con las cepas mutantes simples y su cepa isogénica silvestre, sobreexpresando *RPB6* o transformadas con un vector vacío que se usa como control, en SD con requerimientos.

La sobreexpresión de *RPB6* permite el crecimiento en FOA del mutante *rpo21-4 mot1-301* no ocurriendo lo mismo en el caso del mutante *rpb1-84 mot1-301*.

Todos estos datos sugieren que las mutaciones en el pie de la RNA pol II causan un defecto en la formación del complejo de preiniciación que podría conllevar una alteración en la represión de la expresión de genes de respuesta a estrés por parte de reguladores transcripcionales como NC2, Mot1 y, sin descartar, además la participación de otros reguladores transcripcionales, como el Mediador y el complejo SAGA. Esto se correlaciona con las interacciones genéticas previas encontrados entre los mutantes del pie y las subunidades del mediador, concretamente *Srb10* así como con *SPT15*, y con datos previos que indican mutaciones en genes de ambos factores alteran la ocupación del promotor tanto por la RNA pol II como por TBP (Choukrallah et al., 2012; Qiu et al., 2004). El hecho de que la corrección del ensamblaje por sobreexpresión de *RPB6* no sea capaz de corregir completamente la expresión de genes de estrés, así como el crecimiento de los dobles mutantes generados, sugiere que el efecto de las mutaciones del pie sobre la expresión de los genes de estrés no es producido exclusivamente por la alteración del ensamblaje de la enzima.

6.6 INTERACCIÓN ENTRE Mot1 Y LA ENZIMA DE CAPPING EN LOS MUTANTES DEL PIE DE LA RNA POL II

Se ha descrito que la subunidad Ceg1 de la enzima de *capping* de mRNA (CE) contacta con el pie de la RNA pol II en *S. cerevisiae* (Suh et al., 2010). Además, la fosforilación en CTD-Ser5P media el reclutamiento de Ceg1 (Gu et al., 2010). También, se ha descrito que el complejo de unión al cap (CBC, *cap binding complex*) estimula la formación del complejo de preiniciación en el promotor mediante su interacción con Mot1 *in vivo* en aquellos genes que son regulados positivamente por Mot1, mientras que en los genes que se reprimen por Mot1, tales como *HSP26*, *SSA3* y *SSA4*, el complejo de unión al cap juega un papel inhibitorio en la formación del complejo de preiniciación en el núcleo del promotor (Lahudkar et al., 2011).

Los mutantes del pie, muestran un incremento en la fosforilación del CTD-Ser5P y fuertes interacciones genéticas con la maquinaria de *capping*. Es probable, por tanto, que la asociación de la maquinaria de *capping* a la RNA pol II esté alterada en estos mutantes, lo que podría conducir a un defecto en el *capping* del mRNA que reduciría la unión de CBC y, por tanto, su interacción con Mot1, dando lugar a una desrepresión de la expresión de los genes reprimidos por Mot1, por alteración en la formación del complejo de preiniciación.

En base a estos datos, decidimos analizar los efectos de la sobreexpresión de *MOT1* en los dobles mutantes *rpo21-4 ceg1-250* y *rpb1-84 ceg1-250* (Figura R81A). De la misma manera, se estudió la sobreexpresión de *CEG1* en los dobles mutantes *rpo21-4 mot1-301* y *rpb1-84 mot1-301* (Figura R81B). Para ello, se generó un plásmido pCM185-*CEG1* (*TRP1*) a partir del plásmido pCM190-*CEG1* (*URA3*), mediante PCR con los oligonucleótidos pCM-Debut y pCM-Fin del inserto y posterior recombinación homóloga en levaduras, ya que el plásmido con marcador *URA3* no puede utilizarse en tratamientos con 5-FOA.

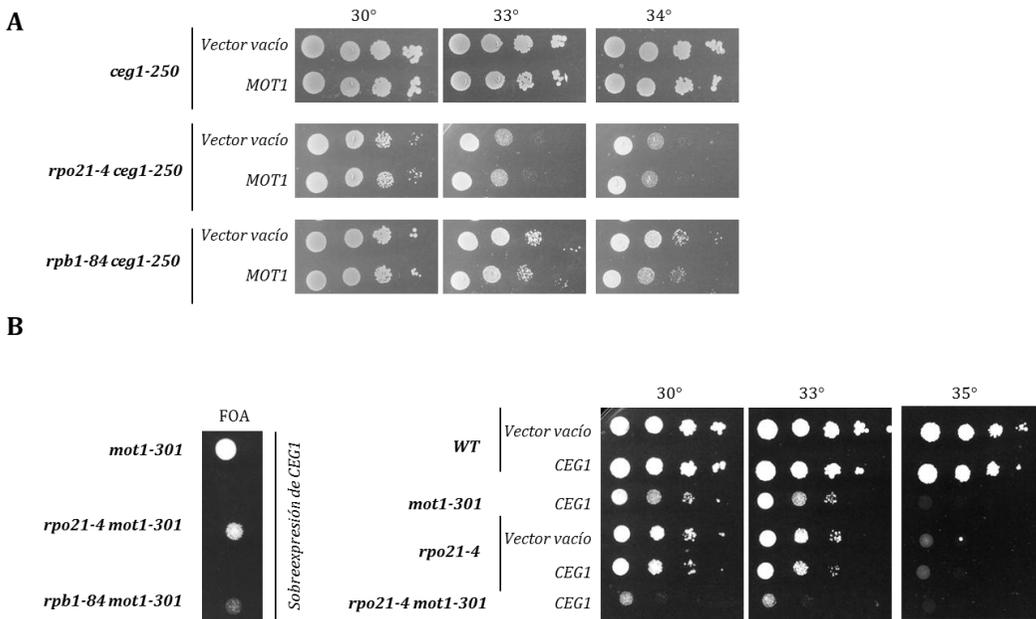


Figura R81: A) Sobreexpresión de *MOT1* en los dobles mutantes *rpo21-4 ceg1-250* y *rpb1-84 ceg1-250*. Se compara el crecimiento con las mismas cepas transformadas con un vector vacío mediante la siembra de diluciones seriadas en medio mínimo SD con requerimientos a distintas temperaturas. B) Sobreexpresión de *CEG1* en los dobles mutantes *rpo21-4 mot1-301* y *rpb1-84 mot1-301*. En la imagen de la izquierda se muestra el crecimiento en SD

suplementado con 5-FOA. En la imagen de la derecha, se compara el crecimiento con los mutantes simples mediante la siembra de diluciones seriadas en medio mínimo SD con requerimientos a distintas temperaturas.

Como se aprecia en la imagen R81A, la sobreexpresión de *MOT1* no cambia el fenotipo de crecimiento de los dobles mutantes *rpo21-4 ceg1-250* y *rpb1-84 ceg1-250*. En la Figura R81B vemos que la sobreexpresión de *CEG1* es suficiente para rescatar la letalidad sintética del doble mutante *rpo21-4 mot1-301* pero no la del doble mutante *rpb1-84 mot1-301*. Sin embargo, el crecimiento de la cepa *rpo21-4 mot1-301* está muy agravado, sugiriendo que la sobreexpresión de *CEG1* no es suficiente para restaurar el defecto provocado por la doble mutación.

Por tanto, estos datos sugieren que la desrepresión de la respuesta a estrés que presentan los mutantes del pie no se debe mayoritariamente a una alteración en el *capping* del mRNA. Sin embargo, no podemos descartar que exista una interacción defectuosa entre CBC y Mot1 o entre estos y otros elementos de la maquinaria de transcripción, incluida la RNA pol II.

Tomando todos estos datos en conjunto, podemos sugerir que la respuesta a estrés en los mutantes del pie de la RNA pol II es posiblemente debida a los defectos provocados por las mutaciones del pie en la formación del complejo de preiniciación. En este sentido, hemos identificado numerosas interacciones genéticas entre las mutaciones del dominio conservado del pie y elementos del Mediador, SAGA, NC2, Mot1 y la maquinaria de *capping*, elementos implicados en la represión de genes de estrés en condiciones permisivas, así como con otros elementos del complejo de preiniciación como TFIIB o *SPT15*. Es de destacar que la activación de la expresión de genes de estrés no se corrige completamente al aumentar la dosis de Rpb6, al menos en el mutante *rpb1-84*, lo que sugiere que la corrección del ensamblaje no es suficiente para restaurar el defecto transcripcional en estos mutantes.

7 ESTUDIO GLOBAL DE LA ASOCIACIÓN DE Rpb4 A LOS mRNA MEDIANTE isRIP-Seq

Se ha descrito que Rpb4 se une a los mRNA en el núcleo y viaja con ellos a lo largo de todo su ciclo de vida, influyendo en el transporte, traducción y degradación de los mismos (Goler-Baron et al., 2008; Harel-Sharvit et al., 2010; Lotan et al., 2005). Además, se ha descrito que durante condiciones de estrés térmico en una cepa que carece de Rpb4 disminuyen los niveles de expresión de la mayoría de los genes, aunque aumentan algunas clases de mRNA como los codificantes de proteínas ribosómicas, factores de iniciación de la traducción, aminoacil-tRNA sintetasas y proteínas Ribi (Pillai et al., 2003). Sin embargo, no se sabe si este es un efecto directo en la estabilidad de los mRNA o un efecto indirecto causado por las condiciones de estrés. Además, no se conocen los genes que sufren *imprinting* con Rpb4 en condiciones óptimas de crecimiento.

En relación con esto, los mutantes del dominio conservado del pie poseen un menor reclutamiento de Rpb4 a la RNA pol II, lo que podrían sugerir una disminución del *imprinting* de los mRNA, dando lugar a un aumento de la estabilidad y, por tanto, de la vida media de los mismos. En base a ello, nos propusimos investigar si la asociación del subcomplejo disociable de la RNA pol II Rpb4/7 a los mRNA era dependiente de la categoría del gen, si una mutación del dominio del pie que provoca la disociación de Rpb4/7 de la RNA pol II afectaba a este comportamiento y si la asociación de Rpb4/7 a los mRNA era específica del sitio de poliadenilación de los mRNA. Para ello, se llevó a cabo un experimento de isRIP-Seq (*isoform-specific RNA immunoprecipitation*) en colaboración con el grupo del Dr. Lars Steinmetz en el European Molecular Biology Laboratory (EMBL), en Heidelberg (Alemania).

En primer lugar, se llevó a cabo una inmunoprecipitación de RNA (RIP) en la cepa silvestre y en el mutante *rpb1-84* usando cepas que contenían *RPB4::Myc* (cepa YFN220). Como se observa en la Figura R82A, en un control de la inmunoprecipitación observamos, por western-blot, la proteína Rpb4-Myc en extracto proteico total y en la muestra inmunoprecipitada. Puesto que se había descrito que Rpb4 se asociaba a mRNA codificantes de proteínas ribosómicas (Goler-Baron et al., 2008), para

comprobar si el RNA recuperado poseía contaminación con DNA, se realizó una retrotranscripción y PCR usando oligonucleótidos específicos para los genes *RPSOA* y *RPP1B*, diseñados a ambos lados de un intrón, de tal manera que la banda obtenida en una PCR desde DNA genómico fuese mayor que la obtenida en el cDNA (Figura R83B). Puesto que la banda obtenida en la PCR realizada con el cDNA procedente del RIP de la cepa conteniendo Rpb4-myc es menor que la obtenida usando DNA genómico, pudimos confirmar la recuperación de RNA unido a Rpb4 en la cepa WT, siendo imposible su detección en el mutante *rpb1-84*, debido a la poca cantidad de RNA recuperado. La obtención de RNA unido a Rpb4 fue también muy baja en la cepa silvestre haciendo imposible su uso para la generación de librerías y posterior secuenciación.

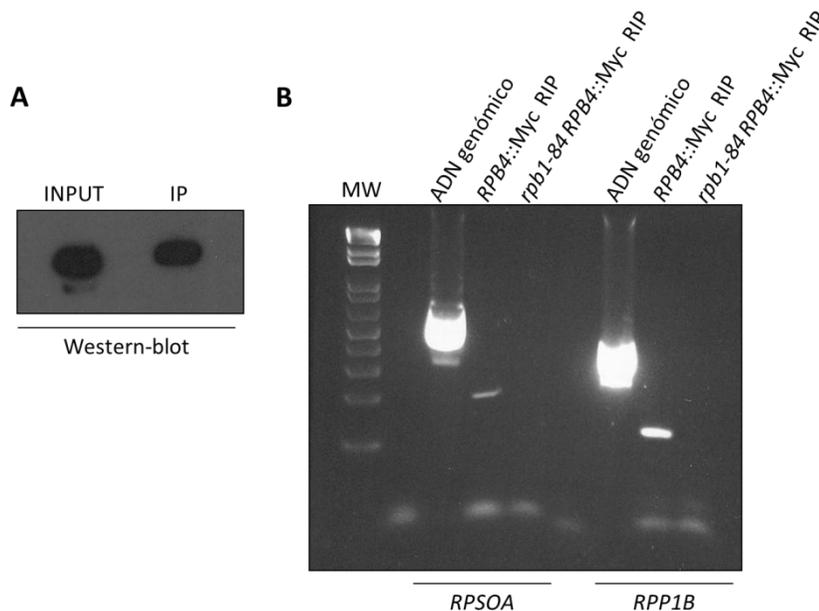


Figura R82: A) Western-blot con anticuerpo anti-cMyc en extractos proteicos totales, así como en la muestra inmunoprecipitada, procedente de una cepa silvestre con la construcción *RPB4::Myc*. B) PCR de cDNA sintetizado a partir del RNA inmunoprecipitado usando primers específicos de los genes *RPSOA* y *RPP1B*. La secuencia de los primers se detalla en la Tabla Suplementaria 4 de Materiales y métodos.

Para solventar este problema, se generaron nuevas cepas amplificando el módulo *RPB4::TAP* de la cepa Y223 con los oligonucleótidos específicos *RPB4-*

502/301 y su posterior recombinación homóloga en las cepas YFN116 e YFN104. Tras la comprobación de la inserción por PCR usando los oligonucleótidos específicos *RPB4-503/302* y por western-blot usando un anticuerpo PAP específico de la etiqueta, se seleccionaron dos colonias positivas de cada cepa, denominadas YFN518a y b, para la cepa WT e YFN519a y b, conteniendo la mutación *rpb1-84*. Con las nuevas cepas generadas, se pudo mejorar la elución en la inmunoprecipitación mediante el uso de una proteasa específica del sitio de corte incluido con la etiqueta TAP, obteniendo cantidades suficientes de RNA en ambos casos. De la misma manera, la calidad del RNA purificado se comprobó mediante PCR con los oligonucleótidos específicos del gen *RPSOA* (no mostrado). En este caso, el RIP se llevó a cabo usando dos réplicas biológicas de cada cepa.

Puesto que se había descrito que Rpb4 se unía a mRNA codificantes de proteínas ribosómicas así como de *ACT1* (Goler-Baron et al., 2008), decidimos comprobar el enriquecimiento de dichos genes en nuestro experimento. Para ello, analizamos por qRT-PCR los genes *ACT1* y *RPL28* frente al rRNA *18S* en las muestras de cDNA obtenidas a partir de extracciones de RNA totales (usadas como control) así como de las muestras de RNA inmunoprecipitado. Como podemos ver en la Figura R83, solo encontramos enriquecimiento en el gen *ACT1* medido frente a los niveles de rRNA *18S* (resultados similares se obtuvieron usando el RNA *SCR1* como normalizador), no pudiendo reproducirse los resultados obtenidos por Goler-Baron para el gen *RPL28* (Figura R83).

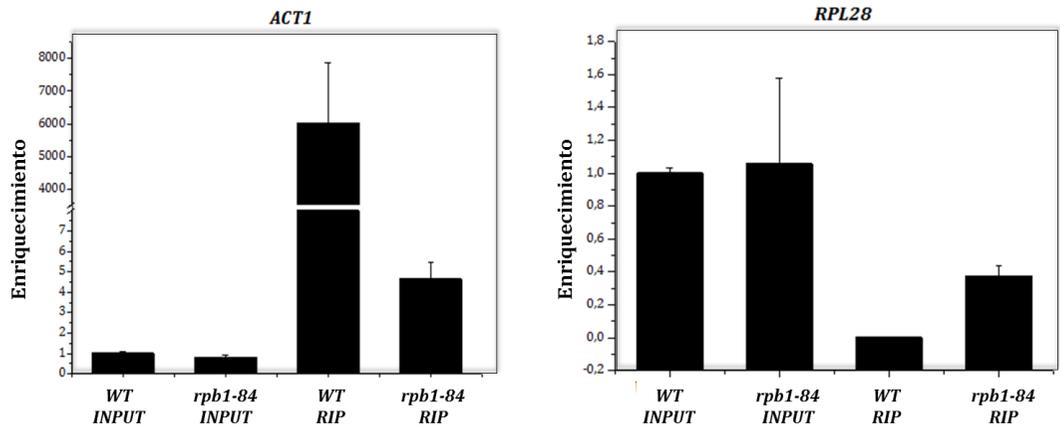


Figura R83: qRT-PCR de los genes *ACT1* y *RPL28* medidos frente al rRNA *18S* en las muestras de RIP y RNA total (INPUT). Las secuencias de los oligonucleótidos específicos se detallan en la Tabla suplementaria 4 de Materiales y métodos.

Tras la comprobación del enriquecimiento del gen *ACT1*, se usó el RNA inmunoprecipitado así como el RNA control para la generación de librerías mediante el uso del método 3'T-Fill (Pelechano et al., 2012; Wilkening et al., 2013) (ver materiales y métodos 2.3.1.13.1). La utilización de dicho método da lugar a librerías de cDNA que contienen la región 3' de los mRNA incluyendo la región 3'-UTR y la cola de poli(A) flanqueadas por las secuencias específicas de los oligonucleótidos utilizados para la secuenciación. Los oligonucleótidos usados para sintetizar las librerías poseían una secuencia denominada *barcode* que permite la realización de la secuenciación múltiple. Para ello, la librería de cada muestra se realizó utilizando un *barcode* distinto y se unieron al final para utilizar un solo chip de secuenciación. Tras la secuenciación, los *barcodes* permiten diferenciar qué secuencias pertenecen a cada muestra. Para comprobar la correcta realización de la librería de cDNA se clonó una cierta cantidad de la misma en el vector de clonación "TOPO TAP cloning vector" (Invitrogen). Algunas colonias positivas se analizaron por PCR y se secuenciaron para comprobar si los insertos correspondían a la región 3' de los genes (Figura R84).

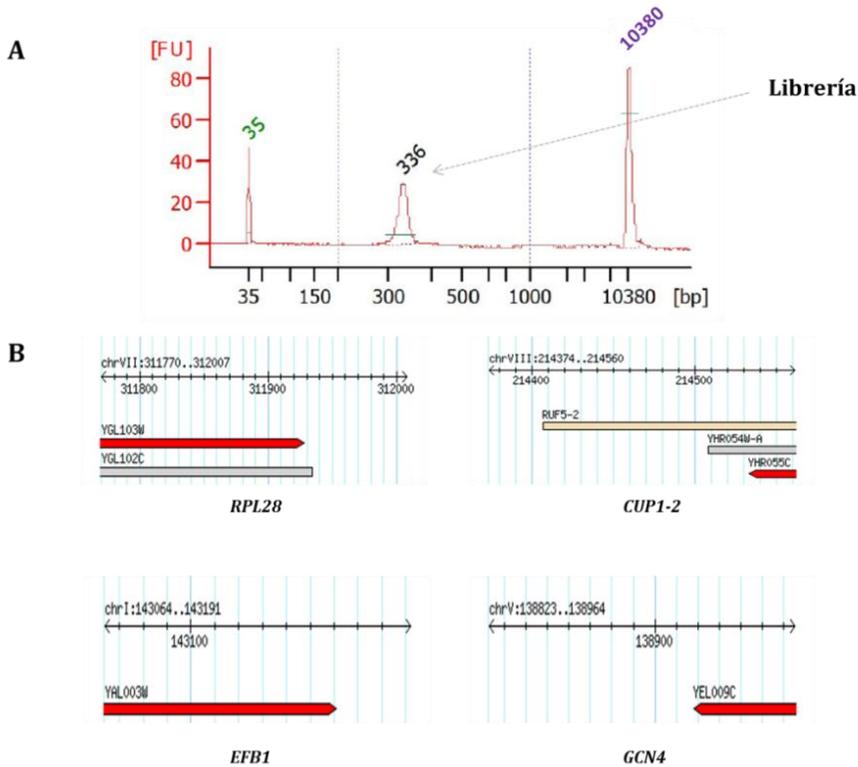


Figura R84: A) Tamaño final de los fragmentos de DNA de la librería medidos usando Bioanalyzer. B) Secuencias obtenidas tras la clonación de la librería de DNA generada por el método 3'T-fill, en "TOPO TAP cloning vector" (*Invitrogen*) y posterior secuenciación.

Como se observa, los fragmentos utilizados para la librerías, purificados mediante el uso de E-Gel 2% SizeSelect (*Invitrogen*) y confirmados mediante Bioanalyzer (Figura R84A) eran de aproximadamente 350 pb, y los insertos contienen la región final de algunos genes incluyendo la región 3'-UTR de los mismos (Figura R84B). Las librerías se usaron para la secuenciación masiva con un secuenciador Illumina de las instalaciones del EMBL.

De los resultados preliminares se deduce que la calidad de la secuenciación fue satisfactoria en cuanto a número de lecturas (*reads*) y proporción de bases (Figura R85). Sin embargo, no se ha podido analizar a tiempo para discutir los resultados en este estudio.

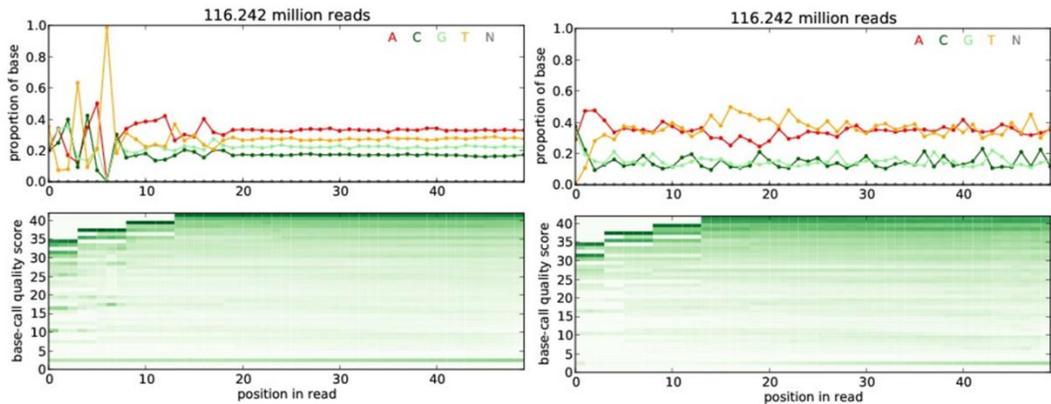
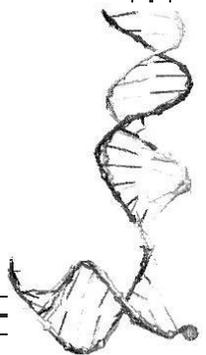


Figura R85: Control de calidad de la secuenciación masiva. El panel superior indica la frecuencia de cada base en cada ciclo de la lectura (ciclo de lectura en el eje X). En esta muestra, las secuencias alineadas muestran un balance entre bases complementarias. Las secuencias están enriquecidas en adenina-timina (AT). El panel inferior muestra la densidad y calidad de lecturas en cada ciclo de secuenciación. El ciclo de secuenciación se representa en el eje X y la calidad de la lectura en el eje Y. En tono verde se muestra la densidad de lecturas; a mayor intensidad de color, mayor densidad de lecturas. En este caso, la mayoría de las muestras alineadas tienen una calidad de 40 en toda su longitud. Las gráficas de la izquierda corresponden con la secuenciación a partir del oligonucleótido P7, que incluye el *barcode*, la timina usada para la ligación y el cDNA en sentido 5'→3'. Las gráficas de la derecha se corresponden con las lecturas realizadas desde el oligonucleótido P5 a partir de la cola poli(A) del mRNA. Análisis realizado con el programa HTSeq v0.5.4p2 (Simmon Anders).

Se espera que los resultados de RIP-seq puedan ayudarnos a establecer una correlación entre la asociación de Rpb4 a los mRNA y la categoría del gen. Además, mediante el uso del método 3'T-fill (Wilkening et al., 2013) obtendremos un mapeo del sitio de poliadenilación de los mRNA en estas cepas. La secuenciación de las muestras de RNA total (previas a la inmunoprecipitación) nos informarán del efecto que la mutación de la RNA pol II puede ocasionar en la generación de sitios alternativos de poliadenilación. Adicionalmente, el análisis de las muestras de RIP nos permitirá analizar la unión de Rpb4 a las isoformas específicas del mRNA en una cepa silvestre, así como determinar el efecto de la disociación del dímero Rpb4/7 de la RNA pol II en la elección del sitio de poliadenilación en el mutante *rpb1-84*. Además, planeamos estudiar la correlación entre la presencia de Rpb4 y la estabilidad del mRNA, ya que la presencia de Rpb4/7 y los sitios alternativos de poliadenilación han sido vinculados a cambios en la estabilidad de los mRNA (Lotan et al., 2005; Lotan et

al., 2007; Spies et al., 2013). Para investigar si estos procesos están conectados realizaremos análisis bioinformáticos comparando los resultados obtenidos en la secuenciación masiva con datos de estabilidad de mRNA y datos de estabilidad de las distintas isoformas en 3' de estos mRNA (datos no publicados del laboratorio del Dr. Steimmetz).

Discusión



DISCUSIÓN

El pie de la RNA pol II es un dominio conservado en las RNA polimerasas, que corresponde con parte de la subunidad mayor del complejo, Rpb1, (Garcia-Lopez and Navarro, 2011; Soutourina et al., 2011; Suh et al., 2010), y que en cooperación con otras regiones, constituye el módulo *shelf* de la enzima. Este módulo puede contribuir a la rotación del DNA mientras avanza hacia el centro activo (Cramer et al., 2001; Zaros et al., 2007). Nuestros datos, además, aportan nueva información sobre los mecanismos que gobiernan el desensamblaje nuclear de la RNA pol II. En este trabajo, demostramos que el pie de la RNA pol II es esencial para el mantenimiento de la integridad o estabilidad del complejo, en coordinación con Rpb6 y el dímero Rpb4/7. También demostramos que el correcto ensamblaje es crucial para mantener una adecuada actividad transcripcional. De hecho, alterar el ensamblaje/integridad de la RNA pol II afecta a la cantidad de enzima asociada a los genes, a la cantidad de RNA pol II parada y afecta a la fosforilación del CTD. Además, esta alteración conduce a la degradación de Rpb1 por una vía dependiente de Rsp5. Por otra parte, las interacciones genéticas entre las mutaciones del dominio conservado del pie y elementos de la maquinaria transcripcional como TPB, el Mediador, SAGA, NC2 y Mot1, así como con la maquinaria de *capping* sugieren defectos en la formación del complejo de preiniciación. La reducción de los niveles de RNA pol II completa, la cantidad de enzima asociada al DNA, así como los defectos en la formación del PIC, conducen a un perfil de expresión alterado, que sugiere una respuesta de estrés en condiciones permisivas de crecimiento. Además, la disociación del dímero Rpb4/7 del resto de la RNA pol II como consecuencia del defecto en el ensamblaje del complejo, podrían estar provocando una reducción del *imprinting* del mRNA y ser la consecuencia del aumento de la estabilidad del mismo.

EL DOMINIO DEL PIE DE LA RNA POL II ES ESENCIAL PARA MANTENER EL CORRECTO ENSAMBLAJE DE LA ENZIMA

El dominio del pie de la RNA pol II, la asociación entre Rpb1 y Rpb6, y la correcta asociación del dímero Rpb4/7 son importantes para mantener el ensamblaje del complejo

Nuestros datos demuestran que el pie de la RNA pol II es importante para mantener el correcto ensamblaje del complejo y que la asociación entre Rpb1 y Rpb6 es un requisito necesario que permite, además, la correcta asociación del dímero Rpb4/7. De hecho, la sobreexpresión de *RPB6* en los mutantes *rpo21-4* y *rpb1-84* (en el gen *RPB1*) suprime su defecto de crecimiento, , conlleva un incremento en la cantidad de Rpb1 a niveles similares a los de la cepa silvestre y rescata el defecto de ensamblaje de la RNA pol II. En concordancia con esto, mutaciones en *RPB6* agravan severamente el fenotipo de termosensibilidad de los mutantes del pie y el etiquetado de Rpb6 en su extremo C-terminal es letal en combinación con la mutación *rpo21-4*. Hay que destacar que la importancia de la asociación de Rpb1 y Rpb6 para el ensamblaje de la RNA pol II ha sido propuesta previamente, tanto en levaduras (Archambault et al., 1992; Archambault et al., 1990; Nouraini et al., 1996; Nouraini et al., 1997; Tan et al., 2003) como en sus homólogos bacterianos (Minakhin et al., 2001). En este sentido, se ha descrito que Rpb6 participa en el ensamblaje de las RNA pols I y II y en la estabilidad de las subunidades mayores de dichas enzimas (Nouraini et al., 1996). Además, el pie de la RNA pol II contacta físicamente con Rpb6 en la estructura de la enzima (Cramer et al., 2001).

Los efectos de la sobreexpresión de *RPB4* y *RPB7*, las interacciones genéticas analizadas entre *rpb4Δ* y los mutantes del pie y el contacto en la estructura de Rpb6, Rpb7 y Rpb4 son también consistentes con los defectos de ensamblaje provocados por las mutaciones del pie de la RNA pol II (Armache et al., 2003; Armache et al., 2005; Bushnell et al., 2004; Cramer et al., 2001). En concordancia, se ha sugerido que algunos efectos descritos en mutantes de *RPB6* son causados por la inestabilidad del dímero Rpb4/7 (Tan et al., 2003). De manera interesante, Rpb4/7 puede disociarse del núcleo de la RNA pol II en solución (Edwards et al., 1991) y el subcomplejo

equivalente de la RNA pol III, C25/C17, puede también disociarse del núcleo de la enzima en experimentos de espectrometría de masas nativa (Lorenzen et al., 2007). Aunque se ha involucrado a Rpb4 en la actividad de la enzima y en su estabilidad pero no en el ensamblaje de la misma (Maillet et al., 1999; Pillai et al., 2003; Woychik and Young, 1989), se ha sugerido que la función de Rpb4 podría ser estructural manteniendo a Rpb7 en el complejo, de manera que en ausencia de Rpb4, a temperaturas restrictivas, la interacción entre Rpb7 y la RNA pol II sería demasiado débil, conduciendo a la disociación de Rpb7 e inactivación de la enzima (Maillet et al., 1999). En el mutante *rpb1^{C67S, C70S}*, que provocan la disociación del dímero Rpb4/7 del núcleo de la RNA pol II, los residuos de cisteínas alterados no contactan en la estructura con el dímero Rpb4/7 sino con residuos de Rpb2 y forman parte del dominio *clamp* de la enzima. En concordancia, Rpb4/7 participa en mantener una conformación cerrada del *clamp* lo que contribuye a la elongación de la transcripción y a la procesividad de la enzima (Gnatt et al., 2001). En este sentido, la pérdida del dímero Rpb4/7 de la RNA pol II en los mutantes del pie, podría ser responsable de la pérdida de procesividad y bloqueo de la RNA pol II, conduciendo a la degradación de Rpb1. Por lo tanto, no podemos descartar la posibilidad de que la disociación de Rpb4/7 en los mutantes del pie conlleve la menor cantidad de Rpb1, el descenso en la actividad de la RNA pol II y la reducción en la cantidad de RNA pol II asociada con el DNA. De hecho, la RNA pol II sin el dímero Rpb4/7 interacciona menos establemente con el DNA (Daulny et al., 2008; Jensen et al., 1998).

Las mutaciones del pie de la RNA pol II causan la disociación de la enzima y la acumulación de subcomplejos intermediarios

Se ha propuesto que el ensamblaje de las RNA pols, tanto en humanos como en levaduras, ocurre en el citoplasma como un requisito previo a su importe al núcleo con la acción de numerosos factores (Czeko et al., 2011; Forget et al., 2010; Miron-Garcia et al., 2013; Staresincic et al., 2011; Wild and Cramer, 2012). Sin embargo, se conoce poco acerca del desensamblaje, la degradación y el reciclaje de las RNA pols.

La mutación del pie de la RNA pol II afecta el correcto ensamblaje de la enzima, conduciendo a la acumulación de subcomplejos intermediarios a temperatura permisiva, en contraste con otras mutaciones que afectan al ensamblaje solo en condiciones no permisivas (Kawakami and Ishihama, 1980; Kolodziej and Young, 1991; Nouraini et al., 1996; Rubbi et al., 1999). La acumulación de esos intermediarios en los mutantes del pie resulta de la disociación de la enzima, acompañada por una importante reducción en los niveles de Rpb1. Todos los subcomplejos contienen el dímero Rpb2-Rpb3, lo que está en acuerdo con experimentos que identifican subcomplejos Rpb1/2/3, Rpb2/3, o Rpb2/3/10/11/12 en los procesos de biogénesis de la RNA pol II (Boulon et al., 2010; Corden, 2011; Kimura et al., 1997; Kolodziej and Young, 1991; Wild and Cramer, 2012). Hay que señalar que los subcomplejos que contienen Rpb1 incluyen aquellos que pierden el dímero Rpb4/7, así como los que pierden Rpb6-Rpb4/7. Sin embargo, al contrario que Rpb6, Rpb4 no parece ser determinante para el ensamblaje de la RNA pol II (Woychik and Young, 1989). Nuestros datos sugieren la formación de subcomplejos conteniendo Rpb2/3/6, pero no Rpb1, a diferencia de lo descrito hasta el momento en los análisis de complejos de ensamblaje de la RNA pol II. Esto sugiere la acción de un factor de ensamblaje, como podría ser la prefoldina Bud27, que participa en el ensamblaje de Rpb5 y Rpb6 en las tres RNA pols (Miron-Garcia et al., 2013), ya que Rpb6 se asocia mayoritariamente a Rpb1 en la estructura del complejo, aunque existen algunos contactos menores con Rpb2 (Cramer et al., 2001).

Nuestros datos de inmunolocalización muestran que al contrario que Rpb1, que se encuentra solo en el núcleo en los mutantes del pie, Rpb3 y Rpb2 se acumulan en el citoplasma, sugiriendo que mientras que Rpb2 y Rpb3 (y otras subunidades de la RNA pol II) se transportan al citoplasma cuando la enzima se desensambla, Rpb1 debe degradarse en el núcleo. Resultados similares se han descrito en células de mamíferos tratadas con α -amanitina en las que el bloqueo de la transcripción conduce a la degradación de Rpb1 mientras que las otras subunidades permanecen intactas, sugiriendo que la enzima se desensambla tras la degradación de Rpb1 (Boulon et al., 2010). Por otra parte, observamos que Rpb4 (y probablemente Rpb7) también se translocan al citoplasma, como se ha descrito previamente (Selitrennik et

al., 2006), aunque, el mecanismo involucrado en el transporte tras el desensamblaje no se conoce. Nuestros datos sugieren también que una fracción de Rpb4 (y probablemente de Rpb7) permanece en el núcleo tras la disociación, al menos en el mutante *rpo21-4*.

En este trabajo sugerimos, además, que Rpb1 se degrada en el núcleo y proponemos que en los mutantes del pie su ensamblaje con el resto de la RNA pol II no es debido a un problema de inestabilidad de esta subunidad. Estas asunciones están basadas en el hecho de que la alteración del ensamblaje citoplasmático de la RNA pol II en los mutantes del pie, por la delección de *BUD27* (Miron-Garcia et al., 2013), causa la acumulación citoplasmática de Rpb1, que alcanza niveles similares a los de la cepa silvestre. En concordancia con este hecho, en células humanas tratadas con α -amanitina y leptomicina B, Rpb1 se acumula en el citoplasma y se asocia con componentes del complejo R2TP (Boulon et al., 2010). No obstante, otras subunidades desensambladas (Rpb2, Rpb3, Rpb4 y Rpb6) permanecen inalteradas, sugiriendo que no se degradan.

La alteración del correcto ensamblaje de la RNA pol II afecta a la asociación concertada de TBP y la RNA pol II para regular la transcripción, probablemente alterando la estabilización del complejo de preiniciación

El defecto en el ensamblaje/integridad de la RNA pol II, que está acompañado por una drástica reducción en los niveles de Rpb1, se correlaciona con una disminución de la actividad de la RNA pol II y con una reducción en la cantidad de RNA pol II asociada con el DNA. Sin embargo, la ocupación de TBP no se correlaciona con la cantidad de RNA pol II en regiones próximas al promotor. Estos datos son importantes ya que se ha establecido que el reclutamiento y ocupación de TBP y la RNA pol II a los promotores están fuertemente correlacionadas con la transcripción y que la asociación de TBP y la RNA pol II ocurren de manera concertada (Kuras and Struhl, 1999; Lee et al., 2010). Nuestros datos también están de acuerdo con los resultados de la delección del gen *SRB10* para la subunidad del Mediador Srb10 (Qiu et al., 2004), que provoca la reducción de la ocupación de la RNA pol II sin afectar el

reclutamiento de TBP, y apuntan a una relación funcional entre el correcto ensamblaje, la formación del PIC y la asociación del Mediador. De acuerdo con el papel del Mediador en la estabilización del PIC y el ensamblaje de TFIIB (Esnault et al., 2008), la sobreexpresión de *SUA7* (el gen codificante de TFIIB) recupera ligeramente el fenotipo de crecimiento lento de los mutantes del pie. Además, el dominio *B-linker hélix* de TFIIB contacta con el *clamp* de la RNA pol II, lo que concuerda con nuestros datos (Kandiah et al., 2014). Podemos también especular que los defectos de ensamblaje influyen en la asociación entre la RNA pol II y el Mediador, en acuerdo con la interacción del módulo de la cabeza del Mediador con las subunidades de la RNA pol II, Rpb4/7, con el *clamp* y con el CTD (Cai et al., 2012; Cai et al., 2009; Cai et al., 2010; Mehta et al., 2009; Robinson et al., 2012) y en concordancia con la ligera supresión del fenotipo de termosensibilidad de los mutantes por la sobreexpresión de *SRB4* (gen codificante de la subunidad Rpb4 de la cabeza del Mediador). Por el contrario esta supresión no ocurre por la sobreexpresión de *SRB9* ni *SRB10* (genes codificantes de subunidades del módulo quinasa del Mediador). Sin embargo, la reducción en la ocupación de la RNA pol II no es generalizada y no se observa para genes relacionados con estrés, probablemente reflejando un defecto en la formación del PIC. De todas formas, no podemos descartar la posibilidad de que esto refleje una formación correcta del PIC con una RNA pol II estructuralmente alterada.

En base a todos estos datos proponemos el modelo mostrado en la Figura D1. Las mutaciones del pie de la RNA pol II afectan a la asociación de Rpb1 con Rpb6, conduciendo a la disociación de esta subunidad y del dímero Rpb4/7, que es translocado al citoplasma, aunque no podemos descartar la posibilidad de que una fracción permanezca siendo nuclear. La enzima estancada y/o ocupando el PIC puede desensamblarse y disociarse, conduciendo a la formación de diferentes subcomplejos intermediarios y a la degradación nuclear de Rpb1. Los subcomplejos desensamblados, o subunidades libres, se mueven hacia el citoplasma por un mecanismo desconocido que puede involucrar a Crm1. Rpb2/Rpb3 permanecen asociados y Rpb6 puede asociarse con este complejo intermediario, a través de la acción de un factor de ensamblaje que podría ser la prefoldina Bud27. La reasociación

de las diferentes subunidades en el citoplasma con moléculas de Rpb1 neosintetizadas ocurriría de manera secuencial involucrando diferentes factores de ensamblaje y transporte (Czeko et al., 2011; Forget et al., 2010; Miron-Garcia et al., 2013; Staresincic et al., 2011; Wild and Cramer, 2012); en este sentido se ha sugerido que Bud27 actúa en una etapa final para el correcto ensamblaje de Rpb5 y Rpb6 (Miron-Garcia et al., 2013). La RNA pol II completa asociada con factores de ensamblaje y transporte entra en el núcleo y estos factores se translocan posteriormente al citoplasma, algunos de ellos por un mecanismo dependiente de Crm1 y otros como Bud27, por un mecanismo independiente de Crm1 (Miron-Garcia et al., 2013). Finalmente, basado en nuestros datos, no podemos descartar la posibilidad de que subcomplejos de la RNA pol II fosforilados puedan permanecer libres en el núcleo como ha sido sugerido previamente (Fuda et al., 2012).

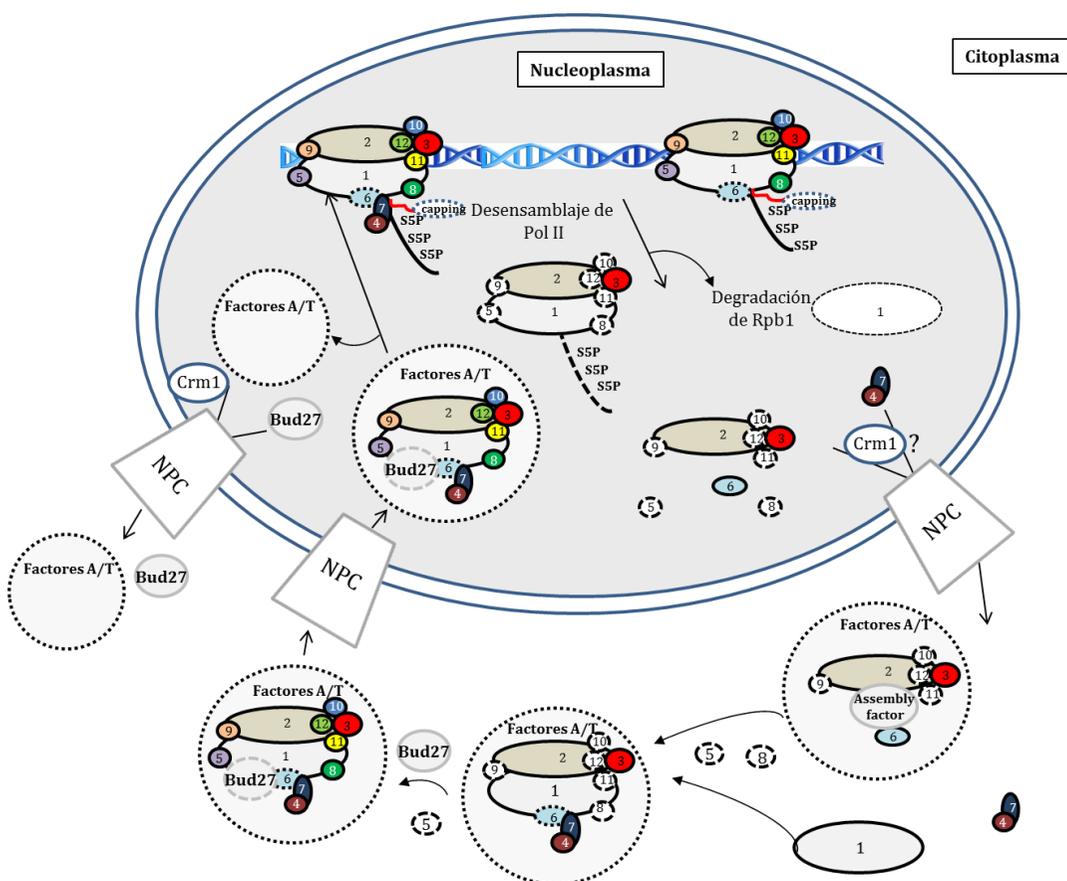


Figura D1: Modelo de la ruta de ensamblaje/desensamblaje de la RNA pol II y de la degradación de Rpb1. El contorno de Rpb6 se muestra discontinuo indicando su incorrecta asociación. Este modelo está basado en el modelo propuesto por Wild and Cramer, 2012.

LA ALTERACIÓN DEL PIE DE LA RNA POL II CAUSA UN DEFECTO EN LA CORRECTA FOSFORILACIÓN DEL CTD Y UN AUMENTO EN LA CANTIDAD DE RNA POL II PARADA

Mutaciones en el pie de la RNA pol II conducen a una acumulación de CTD-Ser5P en la región 3' de los genes, que se correlaciona con un bloqueo de la enzima

Las cepas mutantes del dominio conservado del pie de la RNA pol II presentan un incremento en la fosforilación de CTD-Ser5P que se correlaciona con nuestros datos previos de proteínas asociadas con el pie, cuya inactivación provoca también una acumulación de CTD-Ser5P (Garcia-Lopez et al., 2011). De manera interesante, el incremento en los niveles de CTD-Ser5P en los mutantes del pie ocurre a lo largo del gen y es especialmente evidente en el extremo 3' de la región codificante, donde los niveles de CTD-Ser5P son normalmente muy bajos (Komarnitsky et al., 2000), lo que sugiere un bloqueo de la RNA pol II fosforilada en CTD-Ser5P a lo largo de la ORF. Esta parada se correlaciona con las fuertes interacciones genéticas observadas con *DST1*, *CCR4* y *NOT5* implicadas en la eliminación del bloqueo de la RNA pol II (Adelman et al., 2005; Gomez-Herreros et al., 2012b). Se ha descrito que el choque térmico no inducido en *Drosophila* conlleva un incremento en complejos de elongación pausados y enriquecidos en CTD-Ser5P (Nechaev and Adelman, 2011), lo que está en concordancia con la respuesta a estrés que presentan los mutantes del pie, así como con la posibilidad de RNA pol II pausadas. Todos estos datos, junto con la degradación de Rpb1 que se produce en los mutantes del pie, se correlacionan con un estancamiento de la RNA pol II en la región codificante de los genes (Daulny and Tansey, 2009; Wilson et al., 2012), ya que se ha descrito la ubiquitinación y degradación de Rpb1 como un mecanismo para eliminar la RNA pol II parada (Daulny and Tansey, 2009; Wilson et al., 2012).

El aumento de CTD-Ser5P en los mutantes del pie se correlaciona con la corrección del fenotipo de termosensibilidad del mutante *rpo21-4* por sobreexpresión del gen *RTR1* que codifica la fosfatasa de CTD-Ser5P, Rtr1, encargada de disminuir los niveles de CTD-Ser5P en la transición de la iniciación a la elongación de la transcripción (Mosley et al., 2009). Esto sugiere que esta sobreexpresión podría disminuir la cantidad de CTD-Ser5P y aliviar a las células del bloqueo por RNA pol II paradas. Existe cierta controversia sobre la capacidad fosfatasa de Rtr1, ya que recientes estudios estructurales argumentan que Rtr1 carece de sitio catalítico para esta actividad (Xiang et al., 2012). Sin embargo, el homólogo de Rtr1 en humanos, RPAP2, actúa como fosfatasa de CTD-Ser5P *in vitro* y, tanto RPAP2 como Rtr1 disminuyen los niveles de CTD-Ser5P *in vivo* (Egloff et al., 2012; Mosley et al., 2009). El hecho de que la sobreexpresión de *RTR1* y no de la fosfatasa de CTD-Ser5P, *SSU72*, suprima el fenotipo de termosensibilidad del mutante *rpo21-4*, así como el defecto de fosforilación, indica que el defecto de estos mutantes parece estar relacionado con Rtr1 y no con las fosfatasas de CTD-Ser5P en general. Además nuestros datos sugieren que dicho defecto implica la transición de la iniciación a la elongación de la transcripción, puesto que se ha implicado a Rtr1 como la responsable de dicho proceso en el que se produce un descenso parcial de los niveles de CTD-Ser5P de aproximadamente un 50% (Egloff et al., 2012; Mosley et al., 2009).

En relación con esto, el pie de la RNA pol II contacta con el componente guanililtransferasa Ceg1 de la enzima de *capping* del mRNA (CE) en *S. cerevisiae* (Suh et al., 2010), que se recluta al CTD fosforilado en CTD-Ser5P (Gu et al., 2010) durante el paso de la iniciación a la elongación de la transcripción (Lidschreiber et al., 2013). Además, Ceg1 se estabiliza por su interacción con el CTD-Ser5P (Rodriguez et al., 2000). Estos datos concuerdan con las interacciones genéticas existentes entre los mutantes del pie y mutantes de *CEG1* y *ABD1* (metiltransferasa) de la maquinaria de adición del cap (Cho et al., 1997; Schroeder et al., 2004), lo que también apunta a una correlación entre el correcto ensamblaje de la RNA pol II, la fosforilación del CTD y el *capping* del mRNA. Cabe señalar, además, que la inactivación de Abd1 causa un defecto en la salida del promotor y/o en la elongación temprana de la transcripción, acompañado por un fallo en la defosforilación normal de residuos CTD-Ser5P

(Schroeder et al., 2004), lo que concuerda con nuestros datos, que sugieren un problema en el paso de la iniciación a la elongación de la transcripción en los mutantes del pie.

Se ha propuesto que RPAP2 en humanos (el homólogo de Rtr1) se recluta a los snRNA mediante su interacción directa con CTD-Ser7P aunque no se conoce el mecanismo por el cual se recluta a los genes codificantes de proteínas (Egloff et al., 2012). Teniendo en cuenta que la fosforilación en CTD-Ser5P parece ser un prerrequisito para la fosforilación en CTD-Ser7P, como sugieren experimentos *in vitro* en levaduras (Akhtar et al., 2009), podríamos especular que el incremento en los niveles de CTD-Ser5P en los mutantes del pie, podría implicar un aumento en los niveles de CTD-Ser7P. Además, no podemos descartar que también en levaduras la asociación de Rtr1 al CTD dependa de la fosforilación en CTD-Ser5P y/o CTD-Ser7P, puesto que esta asociación se encuentra alterada en los mutantes del pie de la RNA pol II.

Se ha propuesto que Rtr1 y Ssu72 participan en la terminación de la transcripción (Mosley et al., 2009; Zhang et al., 2012) y se ha descrito que la inactivación de Ssu72 conduce a la acumulación de CTD-Ser7P, impidiendo el reclutamiento de la RNA pol II al PIC e inhibiendo la iniciación de la transcripción, lo que conduce a la muerte celular (Zhang et al., 2012). Además, Ssu72 es la principal responsable del *gene looping* (Ansari and Hampsey, 2005; Dichtl et al., 2002). En este sentido, se ha descrito que el factor de transcripción TFIIB interacciona directamente con Ssu72 y con el componente CstF-64 de la maquinaria de corte y poliadenilación del mRNA (Dichtl et al., 2002; El Kaderi et al., 2009; Wu et al., 1999) y que el *gene looping*, que yuxtapone los promotores y terminadores de la transcripción, es dependiente tanto de TFIIB como de Ssu72 y los componentes de la maquinaria de corte y poliadenilación (Ansari and Hampsey, 2005; El Kaderi et al., 2009; O'Sullivan et al., 2004; Singh and Hampsey, 2007; Wang et al., 2010). En base a estos datos, no podemos descartar que el incremento en la fosforilación de CTD-Ser5P en los mutantes del pie, conlleve un defecto en la terminación de la transcripción, inhibiendo la reiniciación, impidiendo el consiguiente ensamblaje del complejo de preiniciación y, por tanto, conduciendo a bajos niveles de RNA pol II en la ORF (Zhang

et al., 2012). En concordancia con esto, la alteración de *Ssu72* es letal en combinación con las mutaciones del pie. Además, la corrección parcial del fenotipo de crecimiento lento de los mutantes del pie por la sobreexpresión de *SUA7* (TFIIB) avala esta hipótesis. Sin embargo, el hecho de que la sobreexpresión de *SSU72*, así como de la sobreexpresión de *Fcp1*, la clásica fosfatasa de CTD-Ser2P responsable de la terminación de la transcripción (Cho et al., 2001; Hausmann and Shuman, 2002; Kong et al., 2005), no alivien el fenotipo de termosensibilidad de los mutantes del pie, e incluso lo agraven ligeramente, parece contradecir dicha posibilidad. Puesto que *Fcp1* se asocia a *Rpb4* (Kimura et al., 2002), no podemos descartar que la disociación de *Rpb4* de la RNA pol II conlleve el incorrecto reclutamiento de *Fcp1* y que la sobreexpresión de *Fcp1* no sea suficiente para rescatar este defecto. De la misma manera, las fuertes interacciones genéticas que presentan los mutantes del pie con los mutantes *srb10Δ* y *kin28-T16A* de las quinasas *Srb10* y *Kin28* respectivamente, están en concordancia con el defecto que presentan los mutantes del pie en la formación del PIC, así como con un problema en la reiniciación de la transcripción, ya que se ha descrito que *Srb10* y *Kin28* cooperan para promover la transcripción así como la disociación del PIC y formación del complejo *scaffold* (Liu et al., 2004). Además, nuevos datos sugieren un papel esencial para el homólogo humano de *Kin28* (la subunidad quinasa de TFIIF, CDK7), en la formación de *gene loops* (revisado en Shandilya and Roberts, 2012), lo que está en concordancia con las interacciones genéticas entre los mutantes del pie y el mutante *kin28-T16A* y con la hipótesis que sugiere que los mutantes del pie podrían tener un defecto en la reiniciación de la transcripción.

A pesar de que se ha propuesto que *RPAP2*, el homólogo en humanos de *Rtr1*, participa en el ensamblaje y/o transporte al núcleo de la RNA pol II (Boulon et al., 2010; Forget et al., 2013; Jeronimo et al., 2007), no parece que la corrección provocada por la sobreexpresión de *RTR1* en el fenotipo del mutante *rpo21-4* se deba a su papel en el proceso de ensamblaje de la RNA pol II, ya que la sobreexpresión de *RPB6*, que corrige dichos defectos, no es suficiente para restaurar la letalidad sintética de los dobles mutantes *rpo21-4 rtr1Δ* y *rpb1-84 rtr1Δ*. Sin embargo, no podemos descartar completamente este papel debido a la deslocalización citoplasmática de

Rtr1 observada en los mutantes del pie, así como a la alteración de la asociación entre Rtr1 y la RNA pol II. Además, la corrección del ensamblaje de la enzima por la sobreexpresión de *RTR1* apoyaría esta hipótesis aunque también está en concordancia con un alivio del bloqueo de la RNA pol II, por reducción de los niveles de CTD-Ser5P al favorecer el paso de la iniciación a la elongación de la transcripción, con la consiguiente disminución de la degradación de Rpb1.

Aunque los datos obtenidos apuntan a la importancia del correcto ensamblaje de la RNA pol II en el mantenimiento de la correcta fosforilación del CTD, el pie de la RNA pol II es importante por sí mismo para la modulación de la fosforilación del CTD, ya que la sobreexpresión de *RPB6* no es suficiente para restaurar totalmente el defecto de fosforilación de los mutantes del pie de la enzima, ni la letalidad sintética que presentan en combinación con la delección *rtr1Δ*. Nuestros datos sugieren además, que como consecuencia de la alteración en el pie de la RNA pol II, se afecta la correcta actividad o asociación de Rtr1 a la enzima, lo que conllevaría un incremento en los niveles de fosforilación en CTD-Ser5P y en la parada de la RNA pol II. Por otro lado, la sobreexpresión de *RPB6* tampoco recupera totalmente el defecto de termosensibilidad del doble mutante *rpb1-84 ceg1-250*, sugiriendo que la propia mutación *rpb1-84* afecta a la interacción con la maquinaria de *capping*, sin descartar que la incorrecta fosforilación del CTD juegue un papel en dicho defecto.

LA DEGRADACIÓN NUCLEAR DE Rpb1 EN LOS MUTANTES DEL PIE ESTÁ RELACIONADA CON LA UBIQUITINA-LIGASA Rsp5 Y SE CORRIGE POR SOBREEXPRESIÓN DE RTR1

Rpb1 se degrada en los mutantes del pie por una ruta dependiente de Rsp5, como consecuencia de un bloqueo en la transcripción

La ubiquitinación de Rpb1 y la degradación mediada por el proteasoma han sido descritas tanto en humanos como en levaduras (Daulny and Tansey, 2009; Somesh et al., 2005). La degradación de Rpb1 en ambos mutantes del pie es independiente de Asr1, una ubiquitina-ligasa que reconoce complejos con CTD-Ser5P en el contexto de la cromatina y que altera la composición de la RNA pol II,

favoreciendo la disociación de Rpb4/7 del núcleo de la enzima (Daulny et al., 2008), a pesar de que mutaciones en el pie de la RNA pol II están acompañadas por una mayor fosforilación en CTD-Ser5 y por la disociación del dímero Rpb4/7. Nuestros datos sugieren que la degradación de Rpb1 está mediada por una ruta dependiente de Rsp5, una E3 ubiquitina-ligasa (Huibregtse et al., 1997) responsable de la ubiquitinación de Rpb1 cuando está fosforilada en CTD-Ser2. Aunque algunos autores han propuesto que Rsp5 no puede asociarse con RNA pol II fosforiladas en CTD-Ser5 (Somesh et al., 2005), los mutantes del pie presentan fuertes interacciones genéticas con distintos elementos de la ruta de ubiquitinación dependiente de Rsp5.

A pesar de que la recientemente descrita ruta TRADE para la degradación de Rpb1 de RNA pol II transcripcionalmente paradas postula que este proceso es dependiente de la Ub-ligasa Rsp5 e independiente del complejo Ecl1-Ela1-Cul3 (Karakasili, 2010), nuestros datos contradicen esta hipótesis, debido a las interacciones genéticas así como al incremento en los niveles de Rpb1 encontrados en los dobles mutantes *rpo21-4 rsp5-1*, *rpb1-84 rsp5-1*, *rpo21-4 cul3Δ* y *rpb1-84 cul3Δ*. Estos resultados están en concordancia con datos que demuestran que la inactivación de Rsp5 y Cul3 conllevan aumentos en los niveles de Rpb1 (Beaudenon et al., 1999; Ribar et al., 2007). Además, algunos autores han sugerido que la misma maquinaria participa en la ubiquitinación de Rpb1 en respuesta al daño en el DNA y al bloqueo transcripcional (Somesh et al., 2007; Woudstra et al., 2002), proponiéndose una misma ruta para la degradación de la RNA pol II parada, independientemente de la causa del bloqueo, en la que la señal para la ubiquitinación de Rpb1 es la propia enzima parada (Daulny and Tansey, 2009).

La mutación de varios elementos de la ruta de ubiquitinación y degradación de Rpb1, dependiente de Rsp5, en los mutantes del pie, conlleva un agravamiento del fenotipo de termosensibilidad, a pesar de la disminución en la degradación de Rpb1, lo que sugiere que en estas condiciones se produciría un incremento en la cantidad de RNA pol II paradas, afectando a la reanudación de la transcripción. En concordancia, se ha descrito que la ubiquitinación y degradación de Rpb1 en RNA pol II estancadas se lleva a cabo como último recurso cuando fallan los sistemas de

reanudación de la transcripción y los sistemas TCR (Daulny and Tansey, 2009; Gomez-Herreros et al., 2012a; Wilson et al., 2012).

La sobreexpresión de RTR1 recupera el ensamblaje de la RNA pol II probablemente reduciendo la degradación de Rpb1 al permitir el avance de la transcripción

En base a nuestros datos, podemos proponer un modelo (Figura D2) en el cual la degradación de Rpb1 en los mutantes del pie se produce como un mecanismo para eliminar las RNA pol II estancadas en las regiones codificantes de los genes. La sobreexpresión de la fosfatasa de CTD-Ser5P, Rtr1 (Mosley et al., 2009), en los mutantes del pie, probablemente compensando el defecto en su asociación con la enzima o en su actividad, suprime el fenotipo de termosensibilidad del mutante *rpo21-4*, recupera los defectos de ensamblaje de la enzima en ambos mutantes, incrementa los niveles de Rpb1 y reduce la fosforilación en CTD-Ser5P. La defosforilación de CTD-Ser5P en los mutantes del pie por parte de Rtr1 y su papel en el paso de la iniciación a la elongación de la transcripción, permitiría la salida de la RNA pol II del bloqueo reduciendo los niveles de degradación de Rpb1 y corrigiendo el ensamblaje del complejo.

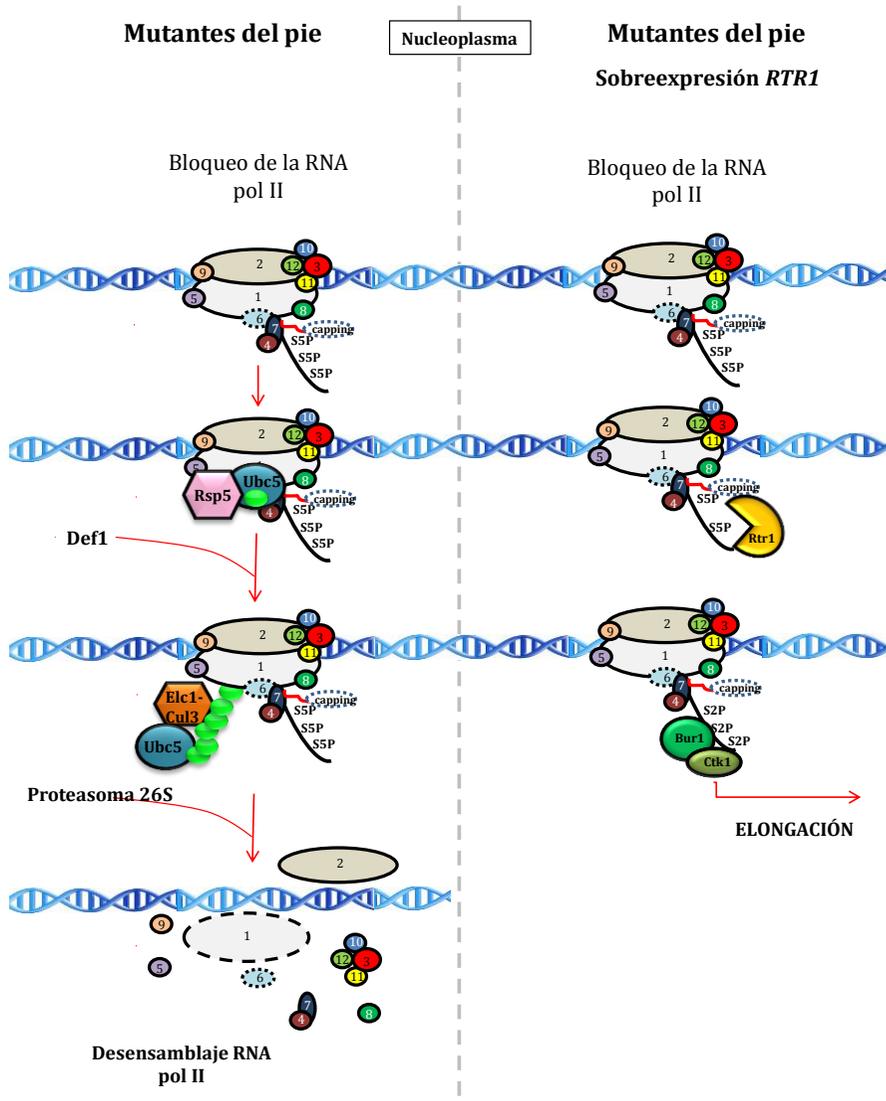


Figura D2: Degradación de la subunidad mayor de la RNA pol II, Rpb1, en los mutantes del pie, como consecuencia de un bloqueo en la transcripción. La acumulación de los niveles de CTD-Ser5P en los mutantes del pie provoca una alteración de la transición de la iniciación a la elongación de la transcripción, conduciendo a la parada y bloqueo de la enzima en la región codificante. La RNA pol II parada sirve como señal para el reclutamiento de la maquinaria de ubiquitinación y degradación de Rpb1. La sobreexpresión de *RTR1* permite a la RNA pol II salir del bloqueo y continuar el ciclo de transcripción, reduciendo los niveles de degradación de Rpb1. Este modelo está basado en el modelo de degradación y ubiquitinación propuesto por (Wilson et al., 2012).

LA ALTERACIÓN DEL PIE DE LA RNA POL II PROVOCA UNA RESPUESTA CELULAR DE ESTRÉS

Los mutantes del pie de la RNA pol II presentan unos perfiles de expresión de mRNA alterados que se correlacionan con una respuesta celular de estrés

Los datos de expresión global de los mutantes del pie muestran un perfil que correlaciona con una respuesta celular de estrés (Gasch et al., 2000), como se observa por los análisis de las categorías funcionales de los genes diferencialmente expresados en los mutantes respecto al silvestre, así como por los factores de transcripción asociados a los mismos. El incremento en los niveles de expresión de los genes de estrés térmico como *HSP12* y *HSP26* (Peiro-Chova and Estruch, 2007), el gen *HSP104* que se requiere para la tolerancia de distintos tipos de estrés (Sanchez et al., 1992) y *SSA4*, altamente inducido en diversas condiciones de estrés (Boorstein and Craig, 1990; Kandrór et al., 2004; Quan et al., 2004; Werner-Washburne et al., 1989), avalan dichos resultados. El aumento en el número de p-bodies que presentan los mutantes del pie se correlaciona también con la respuesta celular a estrés (Teixeira et al., 2005), en la que la iniciación de la traducción se interrumpe y los mRNA pasan desde los polisomas a acumularse en los p-bodies (Harel-Sharvit et al., 2010). Esta acumulación de p-bodies se produce también en mutantes *rpb7-26* y *rpb4Δ* (Harel-Sharvit et al., 2010; Lotan et al., 2005), lo que puede estar en concordancia con el hecho de que los mutantes del pie conllevan una disociación del dímero Rpb4/7 del núcleo de la RNA pol II. Datos de localización de Rpb4 *in vivo*, muestran sin embargo, que el exceso de Rpb4 libre se acumula en el citoplasma de los mutantes del pie, sin que se observe una clara acumulación en p-bodies. En relación con esto, se ha descrito que la detección de p-bodies conteniendo Rpb4-GFP en células creciendo exponencialmente es muy rara (<1%) y esta detección solo se ha detectado en cepas *rpb4Δ* y *rpb4-26* en condiciones de escasez de nutrientes (Lotan et al., 2005), lo que podría explicar la ausencia de p-bodies en los mutantes del pie cuando analizamos la localización de Rpb4 en condiciones óptimas de crecimiento.

La respuesta de estrés de las cepas mutantes del pie no se corrige completamente al restaurar el ensamblaje de la RNA pol II por sobreexpresión de

RPB6, sugiriendo que las propias mutaciones, y no solo el ensamblaje del complejo, son responsables de este defecto.

Como hemos indicado anteriormente, existe una caída en la cantidad total de RNA pol II activa en la célula cuando el dominio del pie se encuentra mutado. Sin embargo, la caída en la asociación de RNA pol II a los genes no es generalizada, como muestran los datos de genes de estrés analizados, en los que el reclutamiento de la RNA pol II es similar al de una cepa silvestre. Estos datos indican que a nivel global en los mutantes del pie, hay mayor reclutamiento de RNA pol II en los genes de estrés respecto al resto de genes. Una posibilidad para explicar los resultados de acumulación de mRNAs es que, al haber menos cantidad de RNA pol II en la célula, exista una caída generalizada en los niveles de estos. Los genes de estrés, al ser genes inducibles por factores externos, tienen una expresión muy reducida en condiciones permisivas (Amoros and Estruch, 2001), con bajo requerimiento de RNA pol II y por tanto, su expresión basal no se afectaría significativamente por la baja disponibilidad de RNA pol II. La caída en la acumulación de mRNA de genes de estrés cuando se induce su expresión a 37°C, con respecto a 30°C, en los mutantes del pie, apoya esta hipótesis. En este sentido, la tasa de transcripción de genes como *CIT2* y *RPS2* que muestran un bajo reclutamiento de RNA pol II en los mutantes del pie, es mucho mayor que la que presentan genes como *HSP26* y *SSA4*, en los que el reclutamiento de la RNA pol II no parece significativamente afectado en los mutantes del pie (datos de tasa de transcripción extraídos de (Pelechano et al., 2010)).

Mutaciones en el pie de la RNA pol II parecen provocar un defecto en la estabilización del PIC y conducir a una alteración en la expresión de genes de estrés

Nuestros datos sugieren que la respuesta celular de estrés, podría deberse a un fallo en la formación del PIC, lo que se correlaciona con las interacciones genéticas descritas entre dichos mutantes y elementos de la formación del PIC. En este sentido, se ha descrito que la cabeza del Mediador interacciona con las subunidades Rpb4/7 de la RNA pol II, que se disocian parcialmente en los mutantes del pie, y con el *clamp*

de la RNA pol II (Cai et al., 2012). Además, el factor de transcripción TFIIF que contacta físicamente con Rpb4 (Chung et al., 2003), se requiere para una interacción estable del Mediador con la RNA pol II, lo que concuerda con la estabilización del PIC por parte del Mediador (Cai et al., 2009; Cai et al., 2010). En este sentido, la sobreexpresión del gen *SUA7* para el factor de transcripción TFIIB que es estabilizado por el Mediador y contacta con el *clamp* a través de su dominio *B-linker helix* (Esnault et al., 2008; Kandiah et al., 2014), suprime parcialmente el defecto de termosensibilidad de los mutantes del pie. Además, se ha descrito que la cola del Mediador regula preferentemente genes de estrés (Ansari and Morse, 2012; Gasch et al., 2000), interaccionando con activadores o co-activadores como SAGA y el complejo Swi/Snf que causan activación transcripcional (Ansari and Morse, 2012).

La corrección de la termosensibilidad de los mutantes del pie al inactivar la subunidad Spt8 de SAGA, las fuertes interacciones genéticas entre las mutaciones *rpo21-4*, *rpb1-84* y mutantes de NC2 y Mot1 así como la corrección del crecimiento de los mutantes del pie, que se produce al sobreexpresar estos factores, se correlacionan también con un defecto en la formación del PIC. SAGA, vía Spt8, se une a TBP para facilitar la transferencia de este a la caja TATA y promover la transcripción (Sermwittayawong and Tan, 2006). Además, tanto NC2 como Mot1 cooperan para reprimir genes con una alta ocupación de SAGA en el promotor, como son los genes de respuesta a estrés (Spedale et al., 2012). En relación a esto, la expresión basal de *HSP26* o *ARO10* se incrementa tras la depleción de NC2 o Mot1 y este hecho va acompañado de un incremento de la ocupación de TBP y de la RNA pol II en el promotor (Spedale et al., 2012). Recientemente se ha descrito que el papel de Mot1 *in vivo* es secuestrar a TBP de los promotores favorecidos intrínsecamente (con cajas TATA), para asegurar suficiente cantidad de TBP soluble para unirse a los promotores desfavorables intrínsecamente (sin cajas TATA), asegurando un balance en los niveles de TBP entre los promotores TATA y TATA-less (Zentner and Henikoff, 2013). Este modelo está en concordancia con el propuesto por Spedale et al, que sugiere que la acción positiva o negativa de Mot1 en la activación génica depende intrínsecamente del promotor y de los factores asociados al él, SAGA o TFIID (Spedale et al., 2012).

A pesar de esto, los perfiles de expresión de los mutantes del pie medidos mediante macroarrays, no muestran una correlación clara entre genes TATA y genes alterados en los mutantes del pie, aunque sí que existe mayor proporción de genes dependientes de SAGA para los genes de estrés cuya acumulación de mRNA está aumentada en los mutantes. Además, existe un ratio Mot1/Rpb1 menor en los genes de estrés que en el resto de genes, lo que podría sugerir una deficiencia en el efecto represor ejercido por Mot1 en ese tipo de genes y por tanto, un aumento en su expresión.

Las mutaciones en el pie de la RNA pol II causan un incremento en la fosforilación en CTD-Ser5P así como fuertes interacciones genéticas con mutantes de *CEG1* y *ABD1*. En este sentido, se ha descrito que la maquinaria de *capping* de mRNA (CE) contacta con el pie de la RNA pol II en *S. cerevisiae* (Suh et al., 2010) y que la fosforilación en CTD-Ser5P media el reclutamiento de Ceg1 (Gu et al., 2010). Además, se ha descrito que el complejo de unión al cap (CBC) interacciona con Mot1 *in vivo* para la formación del PIC (Lahudkar et al., 2011). El reclutamiento de Mot1 a los genes regulados positivamente por Mot1, como *GAL1*, se ve potenciado en las siguientes rondas de iniciación de la transcripción por CBC unido a la estructura cap del mRNA. La estimulación en el reclutamiento de Mot1 se pierde cuando CBC no está unida al cap del mRNA. Sin embargo, en los genes que se reprimen por Mot1, tales como *HSP26*, *SSA3* y *SSA4*, CBC interacciona con Mot1 inhibiendo la formación del PIC en el núcleo del promotor en condiciones de represión (Lahudkar et al., 2011). Puesto que los mutantes del pie interaccionan física y genéticamente con la maquinaria de *capping*, podemos sugerir un defecto en la formación del cap, que conduciría a un defecto en el reclutamiento de CBC y por tanto, de Mot1. A pesar de que la sobreexpresión de *CEG1* no es suficiente para restaurar la letalidad sintética existente entre las mutaciones del pie y el mutante *mot1-301* y la sobreexpresión de *MOT1* tampoco suprime el defecto de crecimiento de los dobles mutantes *rpo21-4 ceg1-250* y *rpb1-84-ceg1-250*, no podemos descartar que la inducción de la respuesta a estrés en los mutantes del pie se deba a una mala interacción entre CBC y Mot1, que llevaría a una represión incorrecta de la transcripción de los genes de estrés que deban inducirse, en concordancia con el efecto represor de Mot1 en la regulación de este

tipo de genes (Huisinga and Pugh, 2004). Alternativamente o además de lo anterior, CBC, Mot1 y otros elementos del PIC podrían no asociarse adecuadamente, como consecuencia del defecto de ensamblaje de la RNA pol II provocado por mutaciones en el pie de la enzima.

Por tanto, podemos proponer que la alteración de los perfiles de acumulación de mRNA en los mutantes del pie de la RNA pol II se debe en parte, al defecto de ensamblaje de la enzima, que provoca el bloqueo y degradación de la misma en la región codificante de los genes, reduciendo la cantidad de RNA pol II ensamblada disponible (Figura D3). Esta reducción en los niveles de RNA pol II podría provocar la reducción de la transcripción de genes activamente transcritos, mientras que no afectaría significativamente a la transcripción de genes reprimidos o inducibles por condiciones externas que, en condiciones permisivas, se transcriben poco. Esto produciría una alteración de los niveles de expresión del mRNA en los mutantes del pie, que se correlaciona con una respuesta de estrés celular. Además, la estabilización de los mRNAs en los mutantes del pie (que discutiremos posteriormente) podría ser un proceso diferencial entre distintos tipos de genes, pudiendo alterar también los niveles de acumulación del mRNA. Por último, no podemos descartar que el posible defecto en la formación del PIC que presentan los mutantes del pie, pueda alterar la transcripción de determinados genes así como la reiniciación de la transcripción, a través de elementos implicados en el *gene looping* como TFIIB.

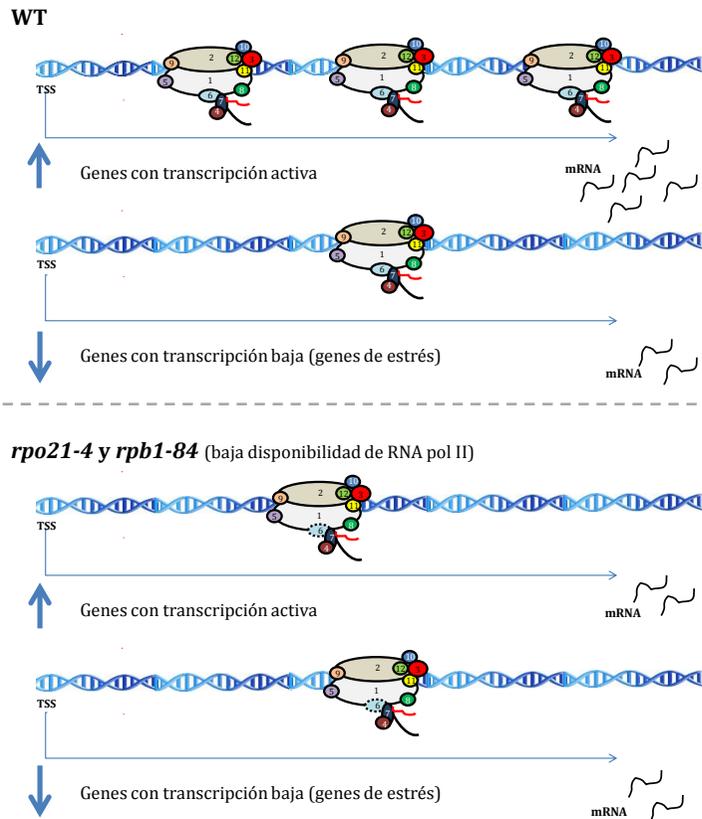


Figura D3: Disponibilidad de RNA pol II en los mutantes del pie en relación a la cantidad de transcripción para cada gen.

EL INCREMENTO EN LA VIDA MEDIA DEL mRNA EN LOS MUTANTES DEL PIE PODRÍA DEBERSE A UNA REDUCCIÓN DEL *IMPRINTING* DE LOS MISMOS POR Rpb4 (Y PROBABLEMENTE Rpb7)

Los mutantes del dominio conservado del pie de la RNA pol II muestran un problema en la estabilidad de la RNA pol II que conduce al desensamblaje de la enzima y a la aparición de distintos subcomplejos. La interacción de Rpb1 y Rpb6 es importante para el mantenimiento del ensamblaje de la RNA pol II, de manera que, las mutaciones en el pie de la RNA pol II conducen a una disociación del dímero Rpb4/7. En concordancia, Rpb4 y Rpb7 han sido implicados en una gran variedad de eventos

post-transcripcionales, tales como la estimulación de la iniciación de la traducción (Harel-Sharvit et al., 2010) y la degradación de los mRNA (Lotan et al., 2005; Lotan et al., 2007). La estructura cristalográfica de la RNA pol II demuestra que Rpb7 interacciona con el transcrito naciente tan pronto emerge del núcleo de la enzima (Bushnell and Kornberg, 2003). Además, estudios *in vitro*, usando proteínas extraídas de células humanas, demuestran también esta interacción (Ujvari and Luse, 2006). Rpb4 ejerce un papel co-transcripcional mediante el reclutamiento de Rna14 y Rna15 de la maquinaria de procesamiento en 3' del mRNA y poliadenilación (Runner et al., 2008). Rpb4/7 permanece unido al mRNA durante todo su ciclo de vida, regulando procesos como el transporte, traducción, movimiento a p-bodies y las vías de degradación de mRNA 5'-3' y 3'-5', de tal manera que los transcritos que poseen Rpb4/7 unidos, tienen una mayor habilidad para reclutar la maquinaria de degradación (revisado en Choder, 2011). Por tanto, estas dos subunidades producen un acoplamiento entre la transcripción y la degradación del mRNA.

En relación con esto, los análisis de qRT-PCR y de CHIP en los mutantes del *pie*, a temperatura permisiva, son indicativos de una estabilización de los mRNA, debido a que las cantidades relativas de mRNA son mayores que las cantidades de RNA pol II reclutadas al DNA respecto a la cepa silvestre. Estos datos fueron confirmados mediante northern-blot y qRT-PCR tras el bloqueo de la transcripción, demostrando un aumento generalizado de la vida media de los transcritos en las cepas mutantes a temperatura permisiva. Al igual que ocurre con los mutantes del *pie*, se ha descrito que mutantes como *rpb6^{Q100R}* y *rpb1^{C67S, C70S}* tienen una capacidad reducida para reclutar al dímero Rpb4/7 al núcleo de la RNA pol II (Forget and Chartrand, 2011; Goler-Baron et al., 2008) y provocan un aumento en la estabilidad del mRNA tanto en condiciones óptimas como en condiciones de estrés térmico (Forget and Chartrand, 2011; Goler-Baron et al., 2008). Además, se ha descrito que el mutante *rpb6^{Q100R}* posee una capacidad reducida para modular la estabilidad de los mRNA en respuesta a estrés oxidativo (Shalem et al., 2011) y que los genes más afectados por la mutación son aquellos relacionados con la biogénesis de ribosomas entre otras categorías funcionales (Shalem et al., 2011). En este sentido, se ha descrito que durante condiciones de estrés térmico en una cepa que carece de Rpb4

disminuyen la mayoría de los transcritos, aunque aumentan algunas clases de mRNA como los codificantes de proteínas ribosómicas, factores de iniciación de la traducción, aminoacil-tRNA sintetasas y proteínas Ribi (Pillai et al., 2003), lo que sugiere que Rpb4 podría controlar la degradación de estas clases de genes durante estrés térmico. Contrariamente a lo indicado para otros mutantes y de manera interesante, en el caso de los mutantes *rpo21-4* y *rpb1-84*, el aumento en la estabilidad de los mRNA es generalizada y aumenta a temperatura permisiva, aunque las cepas poseen un fenotipo de estrés constitutivo.

Estos datos, sugieren que la estabilización del mRNA en los mutantes del pie es posiblemente debida a los defectos de ensamblaje de la RNA pol II en estos mutantes, lo cual provoca la disociación de Rpb4 (y probablemente también Rpb7). Esto se traduciría en un aumento en el porcentaje de mRNA que carece de Rpb4 (y probablemente de Rpb7) unido, lo que dificultaría su transporte al citoplasma y la interacción del mRNA con la maquinaria de degradación del mismo, en concordancia con datos de interacción de Rpb4 con el componente de exporte Npl3 (Lotan et al., 2005) y los datos de interacciones de Rpb4 y Rpb7 con proteínas implicadas en la degradación del mRNA como Pat1 y Lsm2 (Lotan et al., 2005; Lotan et al., 2007). Además, existen datos que sugieren que Rpb4 participa en el exporte del mRNA en condiciones de estrés (Farago et al., 2003). Experimentos de *crosslinking* de Rpb4 al mRNA y análisis por western-blot muestran una disminución en la asociación de Rpb4 al mRNA en los mutantes del pie. Además, experimentos de RIP-seq demuestran que la cantidad de mRNA del gen *ACT1* unido a Rpb4 en el mutante *rpb1-84* es 1500 veces menor que en la cepa silvestre, lo que está en concordancia con los experimentos en el mutante *rpb6^{Q100R}*, cuyos niveles de *ACT1* unidos a Rpb4 son 5 veces menores que los de la cepa silvestre (Goler-Baron et al., 2008). Todos estos datos sugieren que la pérdida del dímero Rpb4/7 del núcleo de la pol II en los mutantes del pie, provoca una reducción del *imprinting* del mRNA, lo que dificultaría la interacción con la maquinaria de degradación provocando un incremento en la vida media de los transcritos (Figura D4).

En relación con esto, los experimentos de RIP-seq en el mutante *rpb1-84* así como en la cepa isogénica silvestre, muestran enriquecimiento en el gen *ACT1* pero

no en el gen *RPL28*, a pesar de que se ha descrito que Rpb4 se une a mRNAs codificantes de proteínas ribosómicas así como de *ACT1* (Goler-Baron et al., 2008), sugiriendo que Rpb4 se une solo a determinados mRNAs. Con los experimentos de RIP-Seq podremos analizar los transcritos que se unen específicamente a Rpb4 en condiciones permisivas en una cepa silvestre y en el mutante *rpb1-84* donde se disocia el dímero Rpb4/7 y tiene un fenotipo de estrés constitutivo. Además, nos planteamos estudiar si la asociación de Rpb4/7 a los mRNAs es específica del sitio de poliadenilación de los mismos y el efecto que la mutación *rpb1-84* puede provocar en la elección de dicho sitio de poliadenilación. Debido a que los sitios alternativos de poliadenilación han sido vinculados a cambios en la estabilidad de los mRNAs, nos planteamos correlacionar los datos de RIP-seq con datos de estabilidad de las distintas isoformas en 3' (Lotan et al., 2005; Lotan et al., 2007; Spies et al., 2013).

Puesto que tanto nosotros como otros autores (Goler-Baron et al., 2008), hemos encontrado evidencias a favor de la unión específica de Rpb4 a determinadas clases de mRNA, y puesto que la estabilización del mRNA en los mutantes del pie se ha detectado en la totalidad de genes analizados, podemos suponer que la falta de interacción de Rpb4 y el mRNA en los mutantes del pie no es la única causa de dicha estabilización. En este sentido, se ha sugerido un papel más general para Rpb7 en la degradación del mRNA, no siendo específico de ciertas clases de mRNA (Lotan et al., 2007). De la misma manera, las fuertes interacciones genéticas de los mutantes del pie y los mutantes *ccr4Δ* y *not5Δ*, están en concordancia con la función del complejo Ccr4-Not en la deadenilación del mRNA. Se ha descrito que numerosas proteínas de unión al mRNA reclutan al complejo Ccr4-Not a mRNAs específicos para mediar su degradación (revisado en Miller and Reese, 2012). Además, se ha propuesto al complejo Ccr4-Not como un coordinador del ciclo de vida del mRNA conectando la transcripción y la degradación del mismo, de la misma manera que el dímero Rpb4/7 (Miller and Reese, 2012; Perez-Ortin et al., 2013). Por tanto, no podemos descartar que exista un defecto en la interacción del complejo Ccr4-Not con la RNA pol II en los mutantes del pie, que reduzca su asociación con proteínas de unión a los mRNAs, reduciendo la degradación de los mismos.

Por último, no podemos descartar que el aumento en la estabilidad de los mRNA de los mutantes del pie, por pérdida del *imprinting* con Rpb4/7, sea diferencial entre unos genes y otros, alterando los perfiles de acumulación de mRNA. Experimentos de CHIP-seq serían necesarios para demostrar esta hipótesis aunque los experimentos de RIP-Seq en marcha nos pueden dar una idea de si la degradación de los genes sobreexpresados en los mutantes del pie es dependiente del *imprinting* por Rpb4.

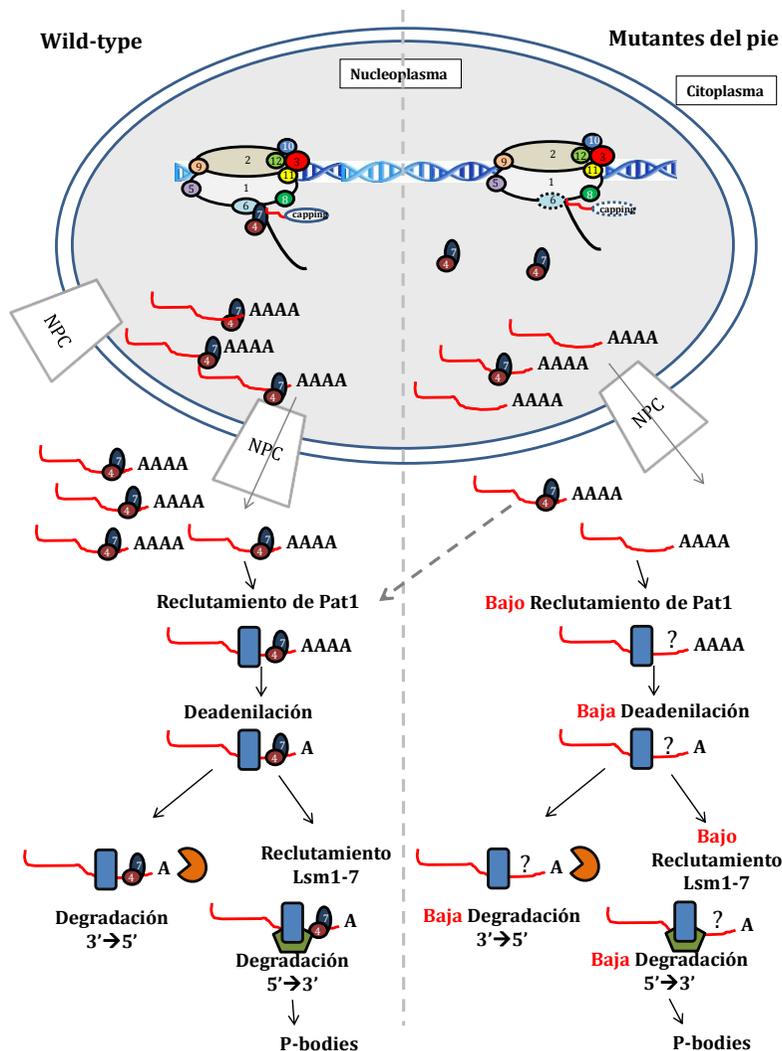
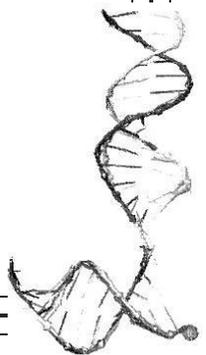


Figura D4: El dímero Rpb4/7 se une a los mRNA en el entorno de la RNA pol II y viaja con ellos al citoplasma donde interacciona con la maquinaria de degradación del mRNA,

favoreciendo su reclutamiento y la consiguiente degradación de los transcritos. Se ha involucrado a Rpb4/7 en el reclutamiento del complejo Pat1-Lsm1-7, o en la estimulación de su función (Lotan et al., 2005; Lotan et al., 2007). En los mutantes del dominio conservado del pie, la inestabilidad de la RNA pol II provoca la disociación del dímero Rpb4/7 con la consiguiente reducción del *imprinting* de los mRNA. Los transcritos que poseen Rpb4/7 unidos se exportarían al citoplasma y reclutarían correctamente la maquinaria de degradación (flecha discontinua) mientras que los que carecen de *imprinting* tendrían una reducida capacidad para exportarse y reclutar dicha maquinaria, con el consiguiente aumento en la estabilidad de los mRNAs. Imagen adaptada de Garrido-Godino et al., 2013 y Goler-Baron et al., 2008.

Del resumen de todos estos datos se deduce la importancia del pie y del correcto ensamblaje de la RNA pol II para la modulación de distintas etapas de la transcripción y del ciclo de vida del mRNA, como la formación del complejo de preiniciación, la interacción con la maquinaria de *capping* del mRNA, la correcta fosforilación del CTD y la estabilidad del mRNA, entre otros. Sin embargo, aunque algunos defectos de los mutantes del pie se corrigen al restaurar el ensamblaje de la RNA pol II por sobreexpresión de *RPB6*, existen efectos específicos de estas mutaciones que no son completamente dependientes del ensamblaje del complejo y que implican a este dominio en distintas etapas de la expresión génica, como la fosforilación del CTD, la interacción con la maquinaria de *capping* y la formación correcta del complejo de preiniciación.

***Conclusions/
Conclusiones***



CONCLUSIONS

First conclusion

The foot of the RNA polymerase II is necessary to maintain the assembly/stability of the complex by allowing the correct association of Rpb6 and of the dimer Rpb4/Rpb7 with the rest of the enzyme. Mutating the foot of RNA pol II affects the assembly and stability of RNA pol II, decreasing the amount of Rpb1 and rendering different types of subcomplexes. All of these defects are overcome by overexpressing *RPB6*, demonstrating the importance of this domain maintaining the association of this subunit.

Second conclusion

The defect in assembly of the RNA pol II affects multiple steps of transcription probably by altering the transition from the transcription initiation to elongation, leading to an increase in CTD-Ser5P accumulation, probably as a consequence of an abnormal Rtr1 association to the enzyme or an abnormal Rtr1 activity. This defect also leads to an increase in the amount of stalled RNA pol II, although we cannot rule out a defect in transcription termination or reinitiation.

Third conclusion

The Rpb1 degradation under foot mutation and the enzyme dissociation and destabilization occurs in the nucleus by an Rsp5-dependent pathway and seems to be associated to a defect in the transition from the initiation to the elongation of transcription involving the action of the Rtr1 phosphatase. In addition, we cannot exclude a role for Rtr1 in RNA pol II assembly, as it has been suggested in humans.

Fourth conclusion

Impairing the correct assembly of RNA pol II affects the concerted association of TBP and RNA pol II, as well as the association of transcriptional regulators such as Mot1, probably altering the preinitiation complex stabilization. The genetic interaction between foot mutants and elements of the preinitiation complex

machinery as Mediator, SAGA, NC2, Mot1 and CE reinforce this hypothesis. We cannot exclude the importance for mRNA cap binding complex, CBC, in this process.

Fifth conclusion

The global expression analysis suggests that altering the foot of the RNA pol II leads to a stress response at permissive temperature. This feature could be a consequence of assembly defects of RNA pol II that reduce the levels of RNA pol II, altering transcription of highly transcribed genes. Contrary transcription of induced genes, in non-induced conditions, must not be significantly altered. This response is probably related with a defect in PIC formation.

Sixth conclusion

Altering the foot of RNA pol II increases mRNA stabilization, probably by affecting the amount of imprinted mRNAs as a consequence of the dissociation of Rpb4/7 from the RNA pol II. We speculate that altering the foot of the RNA pol II and the assembly of the complex which leads to the dissociation of Rpb4/7, would decrease the amount of Rpb4/7 associated to the RNA pol II during transcription and would increase the pool of nuclear mRNA free of Rpb4/7. Consequently, it would lead to a decrease in the pool of mRNA exported to the cytoplasm and to an alteration of the mRNA decay.

Seventh conclusion

Rpb4 associates with mRNAs and this association seems to be altered by mutating the foot of the RNA pol II. In addition, our preliminary data suggest that the association between Rpb4 and mRNA is gene-specific.

CONCLUSIONES

Conclusión Primera

El pie de la RNA polimerasa II es necesario para mantener el ensamblaje y/o estabilidad del complejo permitiendo la correcta asociación de Rpb6 y del dímero Rpb4/7 con el resto de la enzima. Mutar el pie de la RNA pol II afecta el ensamblaje y estabilidad de la RNA pol II, reduciendo la cantidad de Rpb1 y produciendo diferentes tipos de subcomplejos. Todos estos defectos son corregidos por la sobreexpresión de *RPB6*, lo que demuestra la importancia de este dominio en mantener la asociación de esta subunidad.

Conclusión segunda

El defecto en el ensamblaje de la RNA pol II afecta a múltiples etapas de la transcripción alterando probablemente la transición de la iniciación a la elongación y conduciendo a un incremento en la acumulación de CTD-Ser5P, probablemente como consecuencia de una asociación anormal de Rtr1 a la enzima o una actividad anormal de esta fosfatasa. Este defecto conduce a un incremento en la cantidad de RNA pol II parada, aunque no podemos descartar un defecto en la terminación o reiniciación de la transcripción.

Conclusión tercera

La degradación de Rpb1 en los mutantes del pie de la enzima y la disociación y desestabilización de la misma, ocurre en el núcleo por una ruta mediada por Rsp5 y parece estar asociada a un defecto en la transición de la iniciación a la elongación de la transcripción que implica la acción de la fosfatasa Rtr1. Además, no podemos descartar un papel para Rtr1 en el ensamblaje de la RNA pol II, como ha sido sugerido en humanos.

Conclusión cuarta

Alterar el correcto ensamblaje de la RNA pol II afecta a la asociación concertada de TBP y la RNA pol II, así como a la asociación de reguladores

transcripcionales como Mot1, probablemente alterando la estabilización del complejo de preiniciación. Las interacciones genéticas entre los mutantes del pie y elementos de la maquinaria del complejo de preiniciación como el Mediador, SAGA, NC2, Mot1 y CE refuerza esta hipótesis. No podemos excluir la importancia de la maquinaria de unión al cap del mRNA, CBC, en este proceso.

Conclusión quinta

Los análisis de expresión global sugieren que alterar el pie de la RNA pol II conduce a una respuesta de estrés a temperatura permisiva. Este hecho puede ser una consecuencia de los defectos de ensamblaje que llevan a niveles reducidos de RNA pol II, alterando la transcripción de genes altamente transcritos, sin afectar significativamente a la transcripción de genes inducibles en condiciones de ausencia de inducción. Esta respuesta está probablemente relacionada también con un defecto en la formación del PIC.

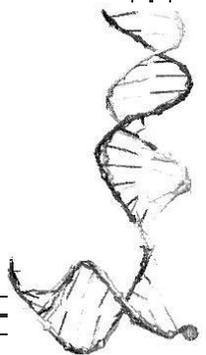
Conclusión sexta

Alterar el pie de la RNA pol II incrementa la estabilidad de los mRNA de manera general, probablemente por la alteración en la cantidad de mRNAs unidos a Rpb4/7, como consecuencia de la disociación del dímero de la RNA pol II. Especulamos que alterar el pie de la RNA pol II y el ensamblaje del complejo, conduce a la disociación de Rpb4/7, lo que podría reducir la cantidad de Rpb4/7 asociado a la RNA pol II durante la transcripción incrementando el conjunto de mRNA nucleares libres de Rpb4/7. Consecuentemente, esto podría conducir a la reducción en la cantidad de mRNA que se exportan al citoplasma y a la alteración de la degradación de los mismos.

Conclusión séptima

Rpb4 se asocia a los mRNAs y esta asociación parece alterarse al mutar el pie de la RNA pol II. Además, nuestros datos preliminares sugieren que la asociación de Rpb4 al mRNA es específica de ciertos genes.

Bibliografía



BIBLIOGRAPHY

Abruzzi, K. C., Lacadie, S., and Rosbash, M. (2004). Biochemical analysis of TREX complex recruitment to intronless and intron-containing yeast genes. *Embo J* 23, 2620-2631.

Adams, C. C., and Gross, D. S. (1991). The yeast heat shock response is induced by conversion of cells to spheroplasts and by potent transcriptional inhibitors. *J Bacteriol* 173, 7429-7435.

Adelman, K., Marr, M. T., Werner, J., Saunders, A., Ni, Z., Andrusis, E. D., and Lis, J. T. (2005). Efficient release from promoter-proximal stall sites requires transcript cleavage factor TFIIS. *Mol Cell* 17, 103-112.

Ahn, S. H., Kim, M., and Buratowski, S. (2004). Phosphorylation of serine 2 within the RNA polymerase II C-terminal domain couples transcription and 3' end processing. *Mol Cell* 13, 67-76.

Akhtar, M. S., Heidemann, M., Tietjen, J. R., Zhang, D. W., Chapman, R. D., Eick, D., and Ansari, A. Z. (2009). TFIIF kinase places bivalent marks on the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Mol Cell* 34, 387-393.

Al-Shahrour, F., Minguéz, P., Tarraga, J., Montaner, D., Alloza, E., Vaquerizas, J. M., Conde, L., Blaschke, C., Vera, J., and Dopazo, J. (2006). BABELOMICS: a systems biology perspective in the functional annotation of genome-scale experiments. *Nucleic Acids Res* 34, W472-476.

Alberola, T. M., Garcia-Martinez, J., Antunez, O., Viladevall, L., Barcelo, A., Arino, J., and Perez-Ortin, J. E. (2004). A new set of DNA macrochips for the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: features and uses. *Int Microbiol* 7, 199-206.

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

Allison, L. A., Wong, J. K., Fitzpatrick, V. D., Moyle, M., and Ingles, C. J. (1988). The C-terminal domain of the largest subunit of RNA polymerase II of *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, and mammals: a conserved structure with an essential function. *Mol Cell Biol* 8, 321-329.

Amoros, M., and Estruch, F. (2001). Hsf1p and Msn2/4p cooperate in the expression of *Saccharomyces cerevisiae* genes HSP26 and HSP104 in a gene- and stress type-dependent manner. *Mol Microbiol* 39, 1523-1532.

Anderson, J. S., and Parker, R. P. (1998). The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *Embo J* 17, 1497-1506.

Anderson, P., and Kedersha, N. (2009). RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 430-436.

Andrau, J. C., Van Oevelen, C. J., Van Teeffelen, H. A., Weil, P. A., Holstege, F. C., and Timmers, H. T. (2002). Mot1p is essential for TBP recruitment to selected promoters during in vivo gene activation. *Embo J* 21, 5173-5183.

Angus-Hill, M. L., Schlichter, A., Roberts, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Cairns, B. R. (2001). A Rsc3/Rsc30 zinc cluster dimer reveals novel roles for the chromatin remodeler RSC in gene expression and cell cycle control. *Mol Cell* 7, 741-751.

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.

Ansari, S. A., and Morse, R. H. (2012). Selective role of Mediator tail module in the transcription of highly regulated genes in yeast. *Transcription* 3, 110-114.

Archambault, J., Chambers, R. S., Kobor, M. S., Ho, Y., Cartier, M., Bolotin, D., Andrews, B., Kane, C. M., and Greenblatt, J. (1997). An essential component of a C-terminal domain phosphatase that interacts with transcription factor IIF in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 14300-14305.

Archambault, J., Drebot, M. A., Stone, J. C., and Friesen, J. D. (1992). Isolation and phenotypic analysis of conditional-lethal, linker-insertion mutations in the gene encoding the largest subunit of RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 232, 408-414.

Archambault, J., and Friesen, J. D. (1993). Genetics of eukaryotic RNA polymerases I, II, and III. *Microbiol Rev* 57, 703-724.

Archambault, J., Schappert, K. T., and Friesen, J. D. (1990). A suppressor of an RNA polymerase II mutation of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a subunit common to RNA polymerases I, II, and III. *Mol Cell Biol* 10, 6123-6131.

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

Armache, K. J., Mitterweger, S., Meinhart, A., and Cramer, P. (2005). Structures of complete RNA polymerase II and its subcomplex, Rpb4/7. *J Biol Chem* 280, 7131-7134.

Asturias, F. J., and Craighead, J. L. (2003). RNA polymerase II at initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6893-6895.

Auble, D. T. (2009). The dynamic personality of TATA-binding protein. *Trends Biochem Sci* 34, 49-52.

Auble, D. T., Hansen, K. E., Mueller, C. G., Lane, W. S., Thorner, J., and Hahn, S. (1994). Mot1, a global repressor of RNA polymerase II transcription, inhibits TBP binding to DNA by an ATP-dependent mechanism. *Genes Dev* 8, 1920-1934.

Azzouz, N., Panasencko, O. O., Colau, G., and Collart, M. A. (2009). The CCR4-NOT complex physically and functionally interacts with TRAMP and the nuclear exosome. *PLoS One* 4, e6760.

- Badarinarayana, V.,** Chiang, Y. C., and Denis, C. L. (2000). Functional interaction of CCR4-NOT proteins with TATAA-binding protein (TBP) and its associated factors in yeast. *Genetics* *155*, 1045-1054.
- Badis, G.,** Saveanu, C., Fromont-Racine, M., and Jacquier, A. (2004). Targeted mRNA degradation by deadenylation-independent decapping. *Mol Cell* *15*, 5-15.
- Balagopal, V., and Parker, R.** (2009). Polysomes, P bodies and stress granules: states and fates of eukaryotic mRNAs. *Curr Opin Cell Biol* *21*, 403-408.
- Bartkowiak, B., and Greenleaf, A. L.** (2011). Phosphorylation of RNAPII: To P-TEFb or not to P-TEFb? *Transcription* *2*, 115-119.
- Bartkowiak, B.,** Liu, P., Phatnani, H. P., Fuda, N. J., Cooper, J. J., Price, D. H., Adelman, K., Lis, J. T., and Greenleaf, A. L. (2010). CDK12 is a transcription elongation-associated CTD kinase, the metazoan ortholog of yeast Ctk1. *Genes Dev* *24*, 2303-2316.
- Basehoar, A. D.,** Zanton, S. J., and Pugh, B. F. (2004). Identification and distinct regulation of yeast TATA box-containing genes. *Cell* *116*, 699-709.
- Bataille, A. R.,** Jeronimo, C., Jacques, P. 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.
- Baumann, M.,** Pontiller, J., and Ernst, W. (2010). Structure and basal transcription complex of RNA polymerase II core promoters in the mammalian genome: an overview. *Mol Biotechnol* *45*, 241-247.
- Beaudenon, S. L.,** Huacani, M. R., Wang, G., McDonnell, D. P., and Huibregtse, J. M. (1999). Rsp5 ubiquitin-protein ligase mediates DNA damage-induced degradation of the large subunit of RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* *19*, 6972-6979.
- Benson, J. D.,** Benson, M., Howley, P. M., and Struhl, K. (1998). Association of distinct yeast Not2 functional domains with components of Gcn5 histone acetylase and Ccr4 transcriptional regulatory complexes. *Embo J* *17*, 6714-6722.
- Bjork, P.,** and Wieslander, L. (2011). Nucleocytoplasmic mRNP export is an integral part of mRNP biogenesis. *Chromosoma* *120*, 23-38.
- Bjorklund, S., and Gustafsson, C. M.** (2005). The yeast Mediator complex and its regulation. *Trends Biochem Sci* *30*, 240-244.
- Blazek, J., and Alper, H. S.** (2013). Promoter engineering: recent advances in controlling transcription at the most fundamental level. *Biotechnol J* *8*, 46-58.
- Boeke, J. D.,** LaCroute, F., and Fink, G. R. (1984). A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol Gen Genet* *197*, 345-346.
- Bolger, T. A.,** Folkmann, A. W., Tran, E. J., and Wenthe, S. R. (2008). The mRNA export factor Gle1 and inositol hexakisphosphate regulate distinct stages of translation. *Cell* *134*, 624-633.

Bonneaud, N., Ozier-Kalogeropoulos, O., Li, G. Y., Labouesse, M., Minvielle-Sebastia, L., and Lacroute, F. (1991). A family of low and high copy replicative, integrative and single-stranded *S. cerevisiae*/*E. coli* shuttle vectors. *Yeast* 7, 609-615.

Boorstein, W. R., and Craig, E. A. (1990). Structure and regulation of the SSA4 HSP70 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 265, 18912-18921.

Boulon, S., Pradet-Balade, B., Verheggen, C., Molle, D., Boireau, S., Georgieva, M., Azzag, K., Robert, M. C., Ahmad, Y., Neel, H., *et al.* (2010). HSP90 and its R2TP/Prefoldin-like cochaperone are involved in the cytoplasmic assembly of RNA polymerase II. *Mol Cell* 39, 912-924.

Bourbon, H. M. (2008). Comparative genomics supports a deep evolutionary origin for the large, four-module transcriptional mediator complex. *Nucleic Acids Res* 36, 3993-4008.

Bourbonnais, Y., Faucher, N., Pallotta, D., and Larouche, C. (2001). Multiple cellular processes affected by the absence of the Rpb4 subunit of RNA polymerase II contribute to the deficiency in the stress response of the yeast *rpb4(delta)* mutant. *Mol Gen Genet* 264, 763-772.

Bousquet-Antonelli, C., Presutti, C., and Tollervey, D. (2000). Identification of a regulated pathway for nuclear pre-mRNA turnover. *Cell* 102, 765-775.

Bracken, C. P., Szubert, J. M., Mercer, T. R., Dinger, M. E., Thomson, D. W., Mattick, J. S., Michael, M. Z., and Goodall, G. J. (2011). Global analysis of the mammalian RNA degradome reveals widespread miRNA-dependent and miRNA-independent endonucleolytic cleavage. *Nucleic Acids Res* 39, 5658-5668.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

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

Bregues, M., and Parker, R. (2007). Accumulation of polyadenylated mRNA, Pab1p, eIF4E, and eIF4G with P-bodies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 18, 2592-2602.

Buchan, J. R., Muhlrads, D., and Parker, R. (2008). P bodies promote stress granule assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 183, 441-455.

Bullock, W. O., Fernandez, J.M. and Stuart, J.M. (1987). XL 1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* 5, 376-379.

Buratowski, S. (2009). Progression through the RNA polymerase II CTD cycle. *Mol Cell* 36, 541-546.

Buratowski, S., Hahn, S., Guarente, L., and Sharp, P. A. (1989). Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. *Cell* 56, 549-561.

- Bushnell, D. A., and Kornberg, R. D.** (2003). Complete, 12-subunit RNA polymerase II at 4.1-Å resolution: implications for the initiation of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 6969-6973.
- Bushnell, D. A.,** Westover, K. D., Davis, R. E., and Kornberg, R. D. (2004). Structural basis of transcription: an RNA polymerase II-TFIIB cocrystal at 4.5 Å. *Science* *303*, 983-988.
- Cai, G.,** Chaban, Y. L., Imasaki, T., Kovacs, J. A., Calero, G., Penczek, P. A., Takagi, Y., and Asturias, F. J. (2012). Interaction of the mediator head module with RNA polymerase II. *Structure* *20*, 899-910.
- Cai, G.,** Imasaki, T., Takagi, Y., and Asturias, F. J. (2009). Mediator structural conservation and implications for the regulation mechanism. *Structure* *17*, 559-567.
- Cai, G.,** Imasaki, T., Yamada, K., Cardelli, F., Takagi, Y., and Asturias, F. J. (2010). Mediator head module structure and functional interactions. *Nat Struct Mol Biol* *17*, 273-279.
- Calvo, O., and Garcia, A.** (2012). Chapter 5: RNA Polymerase II Phosphorylation and Gene Expression Regulation. "Protein Phosphorylation in Human Health".
- Cang, Y.,** Auble, D. T., and Prelich, G. (1999). A new regulatory domain on the TATA-binding protein. *Embo J* *18*, 6662-6671.
- Cang, Y., and Prelich, G.** (2002). Direct stimulation of transcription by negative cofactor 2 (NC2) through TATA-binding protein (TBP). *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 12727-12732.
- Cannon, G. C.** (1987). Sequence analysis on microcomputers. *Science* *238*, 97-103.
- Carlson, M.** (1997). Genetics of transcriptional regulation in yeast: connections to the RNA polymerase II CTD. *Annu Rev Cell Dev Biol* *13*, 1-23.
- 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.
- Cler, E.,** Papai, G., Schultz, P., and Davidson, I. (2009). Recent advances in understanding the structure and function of general transcription factor TFIID. *Cell Mol Life Sci* *66*, 2123-2134.
- Cloutier, P.,** Al-Khoury, R., Lavalley-Adam, M., Faubert, D., Jiang, H., Poitras, C., Bouchard, A., Forget, D., Blanchette, M., and Coulombe, B. (2009). High-resolution mapping of the protein interaction network for the human transcription machinery and affinity purification of RNA polymerase II-associated complexes. *Methods* *48*, 381-386.
- Colgan, D. F., and Manley, J. L.** (1997). Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes Dev* *11*, 2755-2766.
- Collart, M. A., and Panasenko, O. O.** (2011). The Ccr4--not complex. *Gene* *492*, 42-53.
- Coller, J., and Parker, R.** (2005). General translational repression by activators of mRNA decapping. *Cell* *122*, 875-886.

Comer, F. I., and Hart, G. W. (2001). Reciprocity between O-GlcNAc and O-phosphate on the carboxyl terminal domain of RNA polymerase II. *Biochemistry* *40*, 7845-7852.

Connelly, S., and Manley, J. L. (1988). A functional mRNA polyadenylation signal is required for transcription termination by RNA polymerase II. *Genes Dev* *2*, 440-452.

Cooke, A., Prigge, A., and Wickens, M. (2010). Translational repression by deadenylases. *J Biol Chem* *285*, 28506-28513.

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

Corden, J. L. (1990). Tails of RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* *15*, 383-387.

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

Craighead, J. L., Chang, W. H., and Asturias, F. J. (2002). Structure of yeast RNA polymerase II in solution: implications for enzyme regulation and interaction with promoter DNA. *Structure* *10*, 1117-1125.

Cramer, P. (2004). RNA polymerase II structure: from core to functional complexes. *Curr Opin Genet Dev* *14*, 218-226.

Cramer, P. (2006). Mechanistic studies of the mRNA transcription cycle. *Biochem Soc Symp*, 41-47.

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

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

Cross, F. R. (1997). 'Marker swap' plasmids: convenient tools for budding yeast molecular genetics. *Yeast* *13*, 647-653.

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

Chambers, R. S., and Dahmus, M. E. (1994). Purification and characterization of a phosphatase from HeLa cells which dephosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II. *J Biol Chem* *269*, 26243-26248.

Chambers, R. S., and Kane, C. M. (1996). Purification and characterization of an RNA polymerase II phosphatase from yeast. *J Biol Chem* *271*, 24498-24504.

Chan, S., Choi, E. A., and Shi, Y. (2011). Pre-mRNA 3'-end processing complex assembly and function. *Wiley Interdiscip Rev RNA* *2*, 321-335.

Chapman, R. D., Heidemann, M., Hintermair, C., and Eick, D. (2008). Molecular evolution of the RNA polymerase II CTD. *Trends Genet* *24*, 289-296.

Chekulaeva, M., Mathys, H., Zipprich, J. T., Attig, J., Colic, M., Parker, R., and Filipowicz, W. (2011). miRNA repression involves GW182-mediated recruitment of CCR4-NOT through conserved W-containing motifs. *Nat Struct Mol Biol* *18*, 1218-1226.

Chen, D. C., Yang, B. C., and Kuo, T. T. (1992). One-step transformation of yeast in stationary phase. *Curr Genet* *21*, 83-84.

Chen, X., Ruggiero, C., and Li, S. (2007). Yeast Rpb9 plays an important role in ubiquitylation and degradation of Rpb1 in response to UV-induced DNA damage. *Mol Cell Biol* *27*, 4617-4625.

Cho, E. J., Kobor, M. S., Kim, M., Greenblatt, J., and Buratowski, S. (2001). Opposing effects of Ctk1 kinase and Fcp1 phosphatase at Ser 2 of the RNA polymerase II C-terminal domain. *Genes Dev* *15*, 3319-3329.

Cho, E. J., Takagi, T., Moore, C. R., and Buratowski, S. (1997). mRNA capping enzyme is recruited to the transcription complex by phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev* *11*, 3319-3326.

Choder, M. (2004). Rpb4 and Rpb7: subunits of RNA polymerase II and beyond. *Trends Biochem Sci* *29*, 674-681.

Choder, M. (2011). mRNA imprinting: Additional level in the regulation of gene expression. *Cell Logist* *1*, 37-40.

Choder, M., and Young, R. A. (1993). A portion of RNA polymerase II molecules has a component essential for stress responses and stress survival. *Mol Cell Biol* *13*, 6984-6991.

Choukrallah, M. A., Kobi, D., Martianov, I., Pijnappel, W. W., Mischerikow, N., Ye, T., Heck, A. J., Timmers, H. T., and Davidson, I. (2012). Interconversion between active and inactive TATA-binding protein transcription complexes in the mouse genome. *Nucleic Acids Res* *40*, 1446-1459.

Chung, W. H., Craighead, J. L., Chang, W. H., Ezeokonkwo, C., Bareket-Samish, A., Kornberg, R. D., and Asturias, F. J. (2003). RNA polymerase II/TFIIF structure and conserved organization of the initiation complex. *Mol Cell* *12*, 1003-1013.

Dahan, N., and Choder, M. (2013). The eukaryotic transcriptional machinery regulates mRNA translation and decay in the cytoplasm. *Biochim Biophys Acta* *1829*, 169-173.

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

Darzacq, X., Shav-Tal, Y., de Turris, V., Brody, Y., Shenoy, S. M., Phair, R. D., and Singer, R. H. (2007). In vivo dynamics of RNA polymerase II transcription. *Nat Struct Mol Biol* *14*, 796-806.

Dasgupta, A., Juedes, S. A., Sprouse, R. O., and Auble, D. T. (2005). Mot1-mediated control of transcription complex assembly and activity. *Embo J* *24*, 1717-1729.

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

Daulny, A., and Tansey, W. P. (2009). Damage control: DNA repair, transcription, and the ubiquitin-proteasome system. *DNA Repair (Amst)* *8*, 444-448.

Dedrick, R. L., Kane, C. M., and Chamberlin, M. J. (1987). Purified RNA polymerase II recognizes specific termination sites during transcription in vitro. *J Biol Chem* 262, 9098-9108.

Deluen, C., James, N., Maillet, L., Molinete, M., Theiler, G., Lemaire, M., Paquet, N., and Collart, M. A. (2002). The Ccr4-not complex and yTAF1 (yTaf(II)130p/yTaf(II)145p) show physical and functional interactions. *Mol Cell Biol* 22, 6735-6749.

Deng, W., and Roberts, S. G. (2007). TFIIB and the regulation of transcription by RNA polymerase II. *Chromosoma* 116, 417-429.

Dichtl, B., Blank, D., Ohnacker, M., Friedlein, A., Roeder, D., Langen, H., and Keller, W. (2002). A role for SSU72 in balancing RNA polymerase II transcription elongation and termination. *Mol Cell* 10, 1139-1150.

Dieci, G., Conti, A., Pagano, A., and Carnevali, D. (2012). Identification of RNA polymerase III-transcribed genes in eukaryotic genomes. *Biochim Biophys Acta* 1829, 296-305.

Dieci, G., Fiorino, G., Castelnuovo, M., Teichmann, M., and Pagano, A. (2007). The expanding RNA polymerase III transcriptome. *Trends Genet* 23, 614-622.

Donahue, B. A., Yin, S., Taylor, J. S., Reines, D., and Hanawalt, P. C. (1994). Transcript cleavage by RNA polymerase II arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the DNA template. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8502-8506.

Donaldson, I. M., and Friesen, J. D. (2000). Zinc stoichiometry of yeast RNA polymerase II and characterization of mutations in the zinc-binding domain of the largest subunit. *J Biol Chem* 275, 13780-13788.

Dotson, M. R., Yuan, C. X., Roeder, R. G., Myers, L. C., Gustafsson, C. M., Jiang, Y. W., Li, Y., Kornberg, R. D., and Asturias, F. J. (2000). Structural organization of yeast and mammalian mediator complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14307-14310.

Duttagupta, R., Tian, B., Wilusz, C. J., Khounh, D. T., Soteropoulos, P., Ouyang, M., Dougherty, J. P., and Peltz, S. W. (2005). Global analysis of Pub1p targets reveals a coordinate control of gene expression through modulation of binding and stability. *Mol Cell Biol* 25, 5499-5513.

Edwards, A. M., Kane, C. M., Young, R. A., and Kornberg, R. D. (1991). Two dissociable subunits of yeast RNA polymerase II stimulate the initiation of transcription at a promoter in vitro. *J Biol Chem* 266, 71-75.

Egloff, S., and Murphy, S. (2008). Role of the C-terminal domain of RNA polymerase II in expression of small nuclear RNA genes. *Biochem Soc Trans* 36, 537-539.

Egloff, S., O'Reilly, D., Chapman, R. D., Taylor, A., Tanzhaus, K., Pitts, L., Eick, D., and Murphy, S. (2007). Serine-7 of the RNA polymerase II CTD is specifically required for snRNA gene expression. *Science* 318, 1777-1779.

- Egloff, S.,** Zaborowska, J., Laitem, C., Kiss, T., and Murphy, S. (2012). Ser7 phosphorylation of the CTD recruits the RPAP2 Ser5 phosphatase to snRNA genes. *Mol Cell* *45*, 111-122.
- El Kaderi, B.,** Medler, S., Raghunayakula, S., and Ansari, A. (2009). Gene looping is conferred by activator-dependent interaction of transcription initiation and termination machineries. *J Biol Chem* *284*, 25015-25025.
- Engel, C.,** Sainsbury, S., Cheung, A. C., Kostrewa, D., and Cramer, P. (2013). RNA polymerase I structure and transcription regulation. *Nature* *502*, 650-655.
- Esnault, C.,** Ghavi-Helm, Y., Brun, S., Soutourina, J., Van Berkum, N., Boschiero, C., Holstege, F., and Werner, M. (2008). Mediator-dependent recruitment of TFIIF modules in preinitiation complex. *Mol Cell* *31*, 337-346.
- Fabrega, C.,** Shen, V., Shuman, S., and Lima, C. D. (2003). Structure of an mRNA capping enzyme bound to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Mol Cell* *11*, 1549-1561.
- Fan, H. Y.,** Cheng, K. K., and Klein, H. L. (1996). Mutations in the RNA polymerase II transcription machinery suppress the hyperrecombination mutant *hpr1 delta* of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *142*, 749-759.
- Farago, M.,** Nahari, T., Hammel, C., Cole, C. N., and Choder, M. (2003). Rpb4p, a subunit of RNA polymerase II, mediates mRNA export during stress. *Mol Biol Cell* *14*, 2744-2755.
- 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.
- Fernandez-Tornero, C.,** Moreno-Morcillo, M., Rashid, U. J., Taylor, N. M., Ruiz, F. M., Gruene, T., Legrand, P., Steuerwald, U., and Muller, C. W. (2013). Crystal structure of the 14-subunit RNA polymerase I. *Nature* *502*, 644-649.
- Ferri, M. L.,** Peyroche, G., Siaux, M., Lefebvre, O., Carles, C., Conesa, C., and Sentenac, A. (2000). A novel subunit of yeast RNA polymerase III interacts with the TFIIB-related domain of TFIIB70. *Mol Cell Biol* *20*, 488-495.
- Fish, R. N., and Kane, C. M.** (2002). Promoting elongation with transcript cleavage stimulatory factors. *Biochim Biophys Acta* *1577*, 287-307.
- Forget, A., and Chartrand, P.** (2011). Cotranscriptional assembly of mRNP complexes that determine the cytoplasmic fate of mRNA. *Transcription* *2*, 86-90.

Forget, D., Lacombe, A. A., Cloutier, P., Al-Khoury, R., Bouchard, A., Lavallee-Adam, M., Faubert, D., Jeronimo, C., Blanchette, M., and Coulombe, B. (2010). The protein interaction network of the human transcription machinery reveals a role for the conserved GTPase RPA4/GPN1 and microtubule assembly in nuclear import and biogenesis of RNA polymerase II. *Mol Cell Proteomics* 9, 2827-2839.

Forget, D., Lacombe, A. A., Cloutier, P., Lavallee-Adam, M., Blanchette, M., and Coulombe, B. (2013). Nuclear import of RNA polymerase II is coupled with nucleocytoplasmic shuttling of the RNA polymerase II-associated protein 2. *Nucleic Acids Res* 41, 6881-6891.

Franks, T. M., and Lykke-Andersen, J. (2008). The control of mRNA decapping and P-body formation. *Mol Cell* 32, 605-615.

Fuda, N. J., Buckley, M. S., Wei, W., Core, L. J., Waters, C. T., Reinberg, D., and Lis, J. T. (2012). Fcp1 dephosphorylation of the RNA polymerase II C-terminal domain is required for efficient transcription of heat shock genes. *Mol Cell Biol* 32, 3428-3437.

Garcia-Lopez, M. C., Miron-Garcia, M. C., Garrido-Godino, A. I., Mingorance, C., and Navarro, F. (2010). Overexpression of SNG1 causes 6-azauracil resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 56, 251-263.

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

Garcia-Lopez, M. C., Pelechano, V., Miron-Garcia, M. C., Garrido-Godino, A. I., Garcia, A., Calvo, O., Werner, M., Perez-Ortin, J. E., and Navarro, F. (2011). The conserved foot domain of RNA pol II associates with proteins involved in transcriptional initiation and/or early elongation. *Genetics* 189, 1235-1248.

Garcia-Rubio, M. L., and Aguilera, A. (2012). Topological constraints impair RNA polymerase II transcription and causes instability of plasmid-borne convergent genes. *Nucleic Acids Res* 40, 1050-1064.

Garcia, A., Rosonina, E., Manley, J. L., and Calvo, O. (2010). Sub1 globally regulates RNA polymerase II C-terminal domain phosphorylation. *Mol Cell Biol* 30, 5180-5193.

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

Garneau, N. L., Wilusz, J., and Wilusz, C. J. (2007). The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 113-126.

Garrido-Godino, A. I., Garcia-Lopez, M. C., and Navarro, F. (2013). Correct Assembly of RNA Polymerase II Depends on the Foot Domain and Is Required for Multiple Steps of Transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 33, 3611-3626.

Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D., and Brown, P. O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* 11, 4241-4257.

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

Geisberg, J. V., Moqtaderi, Z., Kuras, L., and Struhl, K. (2002). Mot1 associates with transcriptionally active promoters and inhibits association of NC2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 22, 8122-8134.

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

Ghosh, A., and Lima, C. D. (2010). Enzymology of RNA cap synthesis. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 1, 152-172.

Ghosh, A., Shuman, S., and Lima, C. D. (2011). Structural insights to how mammalian capping enzyme reads the CTD code. *Mol Cell* 43, 299-310.

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

Gnatt, A. L., Cramer, P., Fu, J., Bushnell, D. A., and Kornberg, R. D. (2001). Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution. *Science* 292, 1876-1882.

Godon, C., Lagniel, G., Lee, J., Buhler, J. M., Kieffer, S., Perrot, M., Boucherie, H., Toledano, M. B., and Labarre, J. (1998). The H2O2 stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273, 22480-22489.

Goldstrohm, A. C., and Wickens, M. (2008). Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 337-344.

Goler-Baron, V., Selitrennik, M., Barkai, O., Haimovich, G., Lotan, R., and Choder, M. (2008). Transcription in the nucleus and mRNA decay in the cytoplasm are coupled processes. *Genes Dev* 22, 2022-2027.

Gomez-Herreros, F., de Miguel-Jimenez, L., Millan-Zambrano, G., Penate, X., Delgado-Ramos, L., Munoz-Centeno, M. C., and Chavez, S. (2012a). One step back before moving forward: regulation of transcription elongation by arrest and backtracking. *FEBS Lett* 586, 2820-2825.

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

Gomez-Navarro, N., Peiro-Chova, L., Rodriguez-Navarro, S., Polaina, J., and Estruch, F. (2013). Rtp1p is a karyopherin-like protein required for RNA polymerase II biogenesis. *Mol Cell Biol* 33, 1756-1767.

Grohmann, D., Nagy, J., Chakraborty, A., Klose, D., Fielden, D., Ebright, R. H., Michaelis, J., and Werner, F. (2011). The initiation factor TFE and the elongation factor Spt4/5 compete for the RNAP clamp during transcription initiation and elongation. *Mol Cell* **43**, 263-274.

Grunberg, S., and Hahn, S. (2013). Structural insights into transcription initiation by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci*.

Gu, M., Rajashankar, K. R., and Lima, C. D. (2010). Structure of the *Saccharomyces cerevisiae* Cet1-Ceg1 mRNA capping apparatus. *Structure* **18**, 216-227.

Gu, W., and Reines, D. (1995). Identification of a decay in transcription potential that results in elongation factor dependence of RNA polymerase II. *J Biol Chem* **270**, 11238-11244.

Guglielmi, B., Soutourina, J., Esnault, C., and Werner, M. (2007). TFIIS elongation factor and Mediator act in conjunction during transcription initiation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 16062-16067.

Gumbs, O. H., Campbell, A. M., and Weil, P. A. (2003). High-affinity DNA binding by a Mot1p-TBP complex: implications for TAF-independent transcription. *Embo J* **22**, 3131-3141.

Haag, J. R., and Pikaard, C. S. (2011). Multisubunit RNA polymerases IV and V: purveyors of non-coding RNA for plant gene silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 483-492.

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

Hahn, S., and Young, E. T. (2011). Transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: transcription factor regulation and function, mechanisms of initiation, and roles of activators and coactivators. *Genetics* **189**, 705-736.

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

Hampsey, M., and Reinberg, D. (2003). Tails of intrigue: phosphorylation of RNA polymerase II mediates histone methylation. *Cell* **113**, 429-432.

Harel-Sharvit, L., Eldad, N., Haimovich, G., Barkai, O., Duek, L., and Choder, M. (2010). RNA polymerase II subunits link transcription and mRNA decay to translation. *Cell* **143**, 552-563.

Harigaya, Y., Jones, B. N., Muhrad, D., Gross, J. D., and Parker, R. (2010). Identification and analysis of the interaction between Edc3 and Dcp2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **30**, 1446-1456.

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

Hausmann, S., and Shuman, S. (2002). Characterization of the CTD phosphatase Fcp1 from fission yeast. Preferential dephosphorylation of serine 2 versus serine 5. *J Biol Chem* **277**, 21213-21220.

He, C. H., and Ramotar, D. (1999). An allele of the yeast RPB7 gene, encoding an essential subunit of RNA polymerase II, reduces cellular resistance to the antitumor drug bleomycin. *Biochem Cell Biol* 77, 375-382.

He, X., Khan, A. U., Cheng, H., Pappas, D. L., Jr., Hampsey, M., and Moore, C. L. (2003). Functional interactions between the transcription and mRNA 3' end processing machineries mediated by Ssu72 and Sub1. *Genes Dev* 17, 1030-1042.

Hengartner, C. J., Myer, V. E., Liao, S. M., Wilson, C. J., Koh, S. S., and Young, R. A. (1998). Temporal regulation of RNA polymerase II by Srb10 and Kin28 cyclin-dependent kinases. *Mol Cell* 2, 43-53.

Hilleren, P., McCarthy, T., Rosbash, M., Parker, R., and Jensen, T. H. (2001). Quality control of mRNA 3'-end processing is linked to the nuclear exosome. *Nature* 413, 538-542.

Hintermair, C., Heidemann, M., Koch, F., Descostes, N., Gut, M., Gut, I., Fenouil, R., Ferrier, P., Flatley, A., Kremmer, E., et al. (2012). Threonine-4 of mammalian RNA polymerase II CTD is targeted by Polo-like kinase 3 and required for transcriptional elongation. *Embo J* 31, 2784-2797.

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

Hirose, Y., and Manley, J. L. (2000). RNA polymerase II and the integration of nuclear events. *Genes Dev* 14, 1415-1429.

Hirose, Y., and Ohkuma, Y. (2007). Phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II plays central roles in the integrated events of eucaryotic gene expression. *J Biochem* 141, 601-608.

Hirtreiter, A., Grohmann, D., and Werner, F. (2010). Molecular mechanisms of RNA polymerase--the F/E (RPB4/7) complex is required for high processivity in vitro. *Nucleic Acids Res* 38, 585-596.

Holstege, F. C., Jennings, E. G., Wyrick, J. J., Lee, T. I., Hengartner, C. J., Green, M. R., Golub, T. R., Lander, E. S., and Young, R. A. (1998). Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell* 95, 717-728.

Houseley, J., and Tollervey, D. (2009). The many pathways of RNA degradation. *Cell* 136, 763-776.

Hsin, J. P., and Manley, J. L. (2012). The RNA polymerase II CTD coordinates transcription and RNA processing. *Genes Dev* 26, 2119-2137.

Hsin, J. P., Sheth, A., and Manley, J. L. (2011). RNAP II CTD phosphorylated on threonine-4 is required for histone mRNA 3' end processing. *Science* 334, 683-686.

Hu, W., Sweet, T. J., Chamnongpol, S., Baker, K. E., and Collier, J. (2009). Co-translational mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 461, 225-229.

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

Huisinga, K. L., and Pugh, B. F. (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.

Hurt, E., Luo, M. J., Rother, S., Reed, R., and Strasser, K. (2004). Cotranscriptional recruitment of the serine-arginine-rich (SR)-like proteins Gbp2 and Hrb1 to nascent mRNA via the TREX complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 1858-1862.

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

Izban, M. G., and Luse, D. S. (1992). The RNA polymerase II ternary complex cleaves the nascent transcript in a 3'----5' direction in the presence of elongation factor SII. *Genes Dev* *6*, 1342-1356.

Jasiak, A. J., Armache, K. J., Martens, B., Jansen, R. P., and Cramer, P. (2006). Structural biology of RNA polymerase III: subcomplex C17/25 X-ray structure and 11 subunit enzyme model. *Mol Cell* *23*, 71-81.

Jasnovidova, O., and Stefl, R. (2013). The CTD code of RNA polymerase II: a structural view. *Wiley Interdiscip Rev RNA* *4*, 1-16.

Jensen, G. J., Meredith, G., Bushnell, D. A., and Kornberg, R. D. (1998). Structure of wild-type yeast RNA polymerase II and location of Rpb4 and Rpb7. *Embo J* *17*, 2353-2358.

Jensen, T. H., Patricio, K., McCarthy, T., and Rosbash, M. (2001). A block to mRNA nuclear export in *S. cerevisiae* leads to hyperadenylation of transcripts that accumulate at the site of transcription. *Mol Cell* *7*, 887-898.

Jeronimo, C., Forget, D., Bouchard, A., Li, Q., Chua, G., Poitras, C., Therien, C., Bergeron, D., Bourassa, S., Greenblatt, J., et al. (2007). Systematic analysis of the protein interaction network for the human transcription machinery reveals the identity of the 7SK capping enzyme. *Mol Cell* *27*, 262-274.

Jiao, X., Xiang, S., Oh, C., Martin, C. E., Tong, L., and Kiledjian, M. (2010). Identification of a quality-control mechanism for mRNA 5'-end capping. *Nature* *467*, 608-611.

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.

Johnson, S. A., Cubberley, G., and Bentley, D. L. (2009). Cotranscriptional recruitment of the mRNA export factor Yra1 by direct interaction with the 3' end processing factor Pcf11. *Mol Cell* *33*, 215-226.

Jones, J. C., Phatnani, H. P., Haystead, T. A., MacDonald, J. A., Alam, S. M., and Greenleaf, A. L. (2004). C-terminal repeat domain kinase I phosphorylates Ser2 and Ser5 of RNA polymerase II C-terminal domain repeats. *J Biol Chem* *279*, 24957-24964.

Juo, Z. S., Kassavetis, G. A., Wang, J., Geiduschek, E. P., and Sigler, P. B. (2003). Crystal structure of a transcription factor IIIB core interface ternary complex. *Nature* *422*, 534-539.

- Kamada, K.**, Shu, F., Chen, H., Malik, S., Stelzer, G., Roeder, R. G., Meisterernst, M., and Burley, S. K. (2001). Crystal structure of negative cofactor 2 recognizing the TBP-DNA transcription complex. *Cell* *106*, 71-81.
- Kamenski, T.**, Heilmeier, S., Meinhart, A., and Cramer, P. (2004). Structure and mechanism of RNA polymerase II CTD phosphatases. *Mol Cell* *15*, 399-407.
- Kandiah, E.**, Trowitzsch, S., Gupta, K., Haffke, M., and Berger, I. (2014). More pieces to the puzzle: recent structural insights into class II transcription initiation. *Curr Opin Struct Biol* *24C*, 91-97.
- Kandror, O.**, Bretschneider, N., Kreydin, E., Cavalieri, D., and Goldberg, A. L. (2004). Yeast adapt to near-freezing temperatures by *STRE/Msn2,4*-dependent induction of trehalose synthesis and certain molecular chaperones. *Mol Cell* *13*, 771-781.
- Karakasili, E.** (2010). Molecular Mechanism for Degradation of Transcriptionally Stalled RNA Polymerase II in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. PhD Dissertation.
- Katahira, J.** (2012). mRNA export and the TREX complex. *Biochim Biophys Acta* *1819*, 507-513.
- Katahira, J.**, Straesser, K., Saiwaki, T., Yoneda, Y., and Hurt, E. (2002). Complex formation between Tap and p15 affects binding to FG-repeat nucleoporins and nucleocytoplasmic shuttling. *J Biol Chem* *277*, 9242-9246.
- Kawakami, K., and Ishihama, A.** (1980). Defective assembly of ribonucleic acid polymerase subunits in a temperature-sensitive alpha-subunit mutant of *Escherichia coli*. *Biochemistry* *19*, 3491-3495.
- Kee, Y.**, Lyon, N., and Huibregtse, J. M. (2005). The Rsp5 ubiquitin ligase is coupled to and antagonized by the Ubp2 deubiquitinating enzyme. *Embo J* *24*, 2414-2424.
- Kelly, W. G.**, Dahmus, M. E., and Hart, G. W. (1993). RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc. *J Biol Chem* *268*, 10416-10424.
- Keogh, M. C.**, Podolny, V., and Buratowski, S. (2003). Bur1 kinase is required for efficient transcription elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* *23*, 7005-7018.
- Kerr, S. C.**, Azzouz, N., Fuchs, S. M., Collart, M. A., Strahl, B. D., Corbett, A. H., and Larabee, R. N. (2011). The Ccr4-Not complex interacts with the mRNA export machinery. *PLoS One* *6*, e18302.
- Kettenberger, H.**, Armache, K. J., and Cramer, P. (2003). Architecture of the RNA polymerase II-TFIIS complex and implications for mRNA cleavage. *Cell* *114*, 347-357.
- Kettenberger, H.**, Armache, K. J., and Cramer, P. (2004). Complete RNA polymerase II elongation complex structure and its interactions with NTP and TFIIS. *Mol Cell* *16*, 955-965.
- Kim, H. D.**, Choe, J., and Seo, Y. S. (1999). The *sen1(+)* gene of *Schizosaccharomyces pombe*, a homologue of budding yeast *SEN1*, encodes an RNA and DNA helicase. *Biochemistry* *38*, 14697-14710.

Kim, M., Krogan, N. J., Vasiljeva, L., Rando, O. J., Nedeá, E., Greenblatt, J. F., and Buratowski, S. (2004). The yeast Rat1 exonuclease promotes transcription termination by RNA polymerase II. *Nature* 432, 517-522.

Kim, M., Suh, H., Cho, E. J., and Buratowski, S. (2009). Phosphorylation of the yeast Rpb1 C-terminal domain at serines 2, 5, and 7. *J Biol Chem* 284, 26421-26426.

Kim, W., Bennett, E. J., Huttlin, E. L., Guo, A., Li, J., Possemato, A., Sowa, M. E., Rad, R., Rush, J., Comb, M. J., *et al.* (2011). Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome. *Mol Cell* 44, 325-340.

Kimmelman, J., Kaldis, P., Hengartner, C. J., Laff, G. M., Koh, S. S., Young, R. A., and Solomon, M. J. (1999). Activating phosphorylation of the Kin28p subunit of yeast TFIIF by Cak1p. *Mol Cell Biol* 19, 4774-4787.

Kimura, M., Ishiguro, A., and Ishihama, A. (1997). RNA polymerase II subunits 2, 3, and 11 form a core subassembly with DNA binding activity. *J Biol Chem* 272, 25851-25855.

Kimura, M., and Ishihama, A. (2004). Tfg3, a subunit of the general transcription factor TFIIF in *Schizosaccharomyces pombe*, functions under stress conditions. *Nucleic Acids Res* 32, 6706-6715.

Kimura, M., Suzuki, H., and Ishihama, A. (2002). Formation of a carboxy-terminal domain phosphatase (Fcp1)/TFIIF/RNA polymerase II (pol II) complex in *Schizosaccharomyces pombe* involves direct interaction between Fcp1 and the Rpb4 subunit of pol II. *Mol Cell Biol* 22, 1577-1588.

Kireeva, M. L., Hancock, B., Cremona, G. H., Walter, W., Studitsky, V. M., and Kashlev, M. (2005). Nature of the nucleosomal barrier to RNA polymerase II. *Mol Cell* 18, 97-108.

Kizer, K. O., Phatnani, H. P., Shibata, Y., Hall, H., Greenleaf, A. L., and Strahl, B. D. (2005). A novel domain in Set2 mediates RNA polymerase II interaction and couples histone H3 K36 methylation with transcript elongation. *Mol Cell Biol* 25, 3305-3316.

Knuesel, M. T., Meyer, K. D., Bernecky, C., and Taatjes, D. J. (2009). The human CDK8 subcomplex is a molecular switch that controls Mediator coactivator function. *Genes Dev* 23, 439-451.

Kobor, M. S., Archambault, J., Lester, W., Holstege, F. C., Gileadi, O., Jansma, D. B., Jennings, E. G., Kouyoumdjian, F., Davidson, A. R., Young, R. A., and Greenblatt, J. (1999). An unusual eukaryotic protein phosphatase required for transcription by RNA polymerase II and CTD dephosphorylation in *S. cerevisiae*. *Mol Cell* 4, 55-62.

Kohler, A., and Hurt, E. (2007). Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 761-773.

Kolodziej, P. A., and Young, R. A. (1991). Mutations in the three largest subunits of yeast RNA polymerase II that affect enzyme assembly. *Mol Cell Biol* 11, 4669-4678.

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

Kong, S. E., Kobor, M. S., Krogan, N. J., Somesh, B. P., Sogaard, T. M., Greenblatt, J. F., and Svejstrup, J. Q. (2005). Interaction of Fcp1 phosphatase with elongating RNA polymerase II holoenzyme, enzymatic mechanism of action, and genetic interaction with elongator. *J Biol Chem* *280*, 4299-4306.

Kornienko, A. E., Guenzl, P. M., Barlow, D. P., and Pauler, F. M. (2013). Gene regulation by the act of long non-coding RNA transcription. *BMC Biol* *11*, 59.

Kostrewa, D., Zeller, M. E., Armache, K. J., Seizl, M., Leike, K., Thomm, M., and Cramer, P. (2009). RNA polymerase II-TFIIB structure and mechanism of transcription initiation. *Nature* *462*, 323-330.

Kraemer, S. M., Ranallo, R. T., Ogg, R. C., and Stargell, L. A. (2001). TFIIA interacts with TFIID via association with TATA-binding protein and TAF40. *Mol Cell Biol* *21*, 1737-1746.

Krishnamurthy, S., Ghazy, M. A., Moore, C., and Hampsey, M. (2009). Functional interaction of the Ess1 prolyl isomerase with components of the RNA polymerase II initiation and termination machineries. *Mol Cell Biol* *29*, 2925-2934.

Krishnamurthy, S., He, X., Reyes-Reyes, M., Moore, C., and Hampsey, M. (2004). Ssu72 Is an RNA polymerase II CTD phosphatase. *Mol Cell* *14*, 387-394.

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., 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.

Kruk, J. A., Dutta, A., Fu, J., Gilmour, D. S., and Reese, J. C. (2011). The multifunctional Ccr4-Not complex directly promotes transcription elongation. *Genes Dev* *25*, 581-593.

Kuehner, J. N., Pearson, E. L., and Moore, C. (2011). Unravelling the means to an end: RNA polymerase II transcription termination. *Nat Rev Mol Cell Biol* *12*, 283-294.

Kuhn, C. D., Geiger, S. R., Baumli, S., Gartmann, M., Gerber, J., Jennebach, S., Mielke, T., Tschochner, H., Beckmann, R., and Cramer, P. (2007). Functional architecture of RNA polymerase I. *Cell* *131*, 1260-1272.

Kuras, L., and Struhl, K. (1999). Binding of TBP to promoters in vivo is stimulated by activators and requires Pol II holoenzyme. *Nature* *399*, 609-613.

Kwapisz, M., Beckouet, F., and Thuriaux, P. (2008). Early evolution of eukaryotic DNA-dependent RNA polymerases. *Trends Genet* *24*, 211-215.

LaCava, J., Houseley, J., Saveanu, C., Petfalski, E., Thompson, E., Jacquier, A., and Tollervy, D. (2005). RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. *Cell* *121*, 713-724.

Lahudkar, S., Shukla, A., Bajwa, P., Durairaj, G., Stanojevic, N., and Bhaumik, S. R. (2011). The mRNA cap-binding complex stimulates the formation of pre-initiation complex at the promoter via its interaction with Mot1p in vivo. *Nucleic Acids Res* 39, 2188-2209.

Langer, D., Hain, J., Thuriaux, P., and Zillig, W. (1995). Transcription in archaea: similarity to that in eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5768-5772.

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.

Lemaire, M., and Collart, M. A. (2000). The TATA-binding protein-associated factor yTafII19p functionally interacts with components of the global transcriptional regulator Ccr4-Not complex and physically interacts with the Not5 subunit. *J Biol Chem* 275, 26925-26934.

Leuther, K. K., Bushnell, D. A., and Kornberg, R. D. (1996). Two-dimensional crystallography of TFIIB- and IIE-RNA polymerase II complexes: implications for start site selection and initiation complex formation. *Cell* 85, 773-779.

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

Li, H., Zhang, Z., Wang, B., Zhang, J., Zhao, Y., and Jin, Y. (2007b). Wwp2-mediated ubiquitination of the RNA polymerase II large subunit in mouse embryonic pluripotent stem cells. *Mol Cell Biol* 27, 5296-5305.

Li, S., and Smerdon, M. J. (2002). Rpb4 and Rpb9 mediate subpathways of transcription-coupled DNA repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 21, 5921-5929.

Li, Y., and Kiledjian, M. (2010). Regulation of mRNA decapping. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 1, 253-265.

Liang, C., and Stillman, B. (1997). Persistent initiation of DNA replication and chromatin-bound MCM proteins during the cell cycle in *cdc6* mutants. *Genes Dev* 11, 3375-3386.

Liao, S. M., Zhang, J., Jeffery, D. A., Koleske, A. J., Thompson, C. M., Chao, D. M., Viljoen, M., van Vuuren, H. J., and Young, R. A. (1995). A kinase-cyclin pair in the RNA polymerase II holoenzyme. *Nature* 374, 193-196.

Lidschreiber, M., Leike, K., and Cramer, P. (2013). Cap completion and C-terminal repeat domain kinase recruitment underlie the initiation-elongation transition of RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 33, 3805-3816.

Liu, H. Y., Chiang, Y. C., Pan, J., Chen, J., Salvatore, C., Audino, D. C., Badarinarayana, V., Palaniswamy, V., Anderson, B., and Denis, C. L. (2001). Characterization of CAF4 and CAF16 reveals a functional connection between the CCR4-NOT complex and a subset of SRB proteins of the RNA polymerase II holoenzyme. *J Biol Chem* 276, 7541-7548.

Liu, P., Kenney, J. M., Stiller, J. W., and Greenleaf, A. L. (2010a). Genetic organization, length conservation, and evolution of RNA polymerase II carboxyl-terminal domain. *Mol Biol Evol* 27, 2628-2641.

Liu, X., Bushnell, D. A., Wang, D., Calero, G., and Kornberg, R. D. (2010b). Structure of an RNA polymerase II-TFIIB complex and the transcription initiation mechanism. *Science* 327, 206-209.

Liu, Y., Kung, C., Fishburn, J., Ansari, A. Z., Shokat, K. M., and Hahn, S. (2004). Two cyclin-dependent kinases promote RNA polymerase II transcription and formation of the scaffold complex. *Mol Cell Biol* 24, 1721-1735.

Liu, Y., Warfield, L., Zhang, C., Luo, J., Allen, J., Lang, W. H., Ranish, J., Shokat, K. M., and Hahn, S. (2009). Phosphorylation of the transcription elongation factor Spt5 by yeast Bur1 kinase stimulates recruitment of the PAF complex. *Mol Cell Biol* 29, 4852-4863.

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.

Lorenzen, K., Vannini, A., Cramer, P., and Heck, A. J. (2007). Structural biology of RNA polymerase III: mass spectrometry elucidates subcomplex architecture. *Structure* 15, 1237-1245.

Lotan, R., Bar-On, V. G., Harel-Sharvit, L., Duek, L., Melamed, D., and Choder, M. (2005). The RNA polymerase II subunit Rpb4p mediates decay of a specific class of mRNAs. *Genes Dev* 19, 3004-3016.

Lotan, R., Goler-Baron, V., Duek, L., Haimovich, G., and Choder, M. (2007). The Rpb7p subunit of yeast RNA polymerase II plays roles in the two major cytoplasmic mRNA decay mechanisms. *J Cell Biol* 178, 1133-1143.

Lu, K. P., Finn, G., Lee, T. H., and Nicholson, L. K. (2007). Prolyl cis-trans isomerization as a molecular timer. *Nat Chem Biol* 3, 619-629.

Maillet, I., Buhler, J. M., Sentenac, A., and Labarre, J. (1999). Rpb4p is necessary for RNA polymerase II activity at high temperature. *J Biol Chem* 274, 22586-22590.

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.

Malik, S., Bagla, S., Chaurasia, P., Duan, Z., and Bhaumik, S. R. (2008). Elongating RNA polymerase II is disassembled through specific degradation of its largest but not other subunits in response to DNA damage in vivo. *J Biol Chem* 283, 6897-6905.

Mandal, S. S., Cho, H., Kim, S., Cabane, K., and Reinberg, D. (2002). FCP1, a phosphatase specific for the heptapeptide repeat of the largest subunit of RNA polymerase II, stimulates transcription elongation. *Mol Cell Biol* 22, 7543-7552.

Mandel, C. R., Bai, Y., and Tong, L. (2008). Protein factors in pre-mRNA 3'-end processing. *Cell Mol Life Sci* 65, 1099-1122.

Maniatis, T., and Reed, R. (2002). An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* *416*, 499-506.

Marshall, N. F., and Price, D. H. (1992). Control of formation of two distinct classes of RNA polymerase II elongation complexes. *Mol Cell Biol* *12*, 2078-2090.

Martinez-Arias, A. E., and Casadaban, M. J. (1983). Fusion of the *Saccharomyces cerevisiae* leu2 gene to an *Escherichia coli* beta-galactosidase gene. *Mol Cell Biol* *3*, 580-586.

Martinez-Rucobo, F. W., Sainsbury, S., Cheung, A. C., and Cramer, P. (2011). Architecture of the RNA polymerase-Spt4/5 complex and basis of universal transcription processivity. *Embo J* *30*, 1302-1310.

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.

Masson, P., Leimgruber, E., Creton, S., and Collart, M. A. (2008). The dual control of TFIIB recruitment by NC2 is gene specific. *Nucleic Acids Res* *36*, 539-549.

Mathis, D. J., and Chambon, P. (1981). The SV40 early region TATA box is required for accurate in vitro initiation of transcription. *Nature* *290*, 310-315.

Matunis, M. J., Matunis, E. L., and Dreyfuss, G. (1993). PUB1: a major yeast poly(A)+ RNA-binding protein. *Mol Cell Biol* *13*, 6114-6123.

Mayer, A., Heidemann, M., Lidschreiber, M., Schrieck, A., Sun, M., Hintermair, C., Kremmer, E., Eick, D., and Cramer, P. (2012). CTD tyrosine phosphorylation impairs termination factor recruitment to RNA polymerase II. *Science* *336*, 1723-1725.

McCracken, S., Fong, N., Yankulov, K., Ballantyne, S., Pan, G., Greenblatt, J., Patterson, S. D., Wickens, M., and Bentley, D. L. (1997). The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature* *385*, 357-361.

McKune, K., Richards, K. L., Edwards, A. M., Young, R. A., and Woychik, N. A. (1993). RPB7, one of two dissociable subunits of yeast RNA polymerase II, is essential for cell viability. *Yeast* *9*, 295-299.

Mehta, S., Miklos, I., Sipiczki, M., Sengupta, S., and Sharma, N. (2009). The Med8 mediator subunit interacts with the Rpb4 subunit of RNA polymerase II and Ace2 transcriptional activator in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Lett* *583*, 3115-3120.

Meinhart, A., and Cramer, P. (2004). Recognition of RNA polymerase II carboxy-terminal domain by 3'-RNA-processing factors. *Nature* *430*, 223-226.

Meinhart, A., Kamenski, T., Hoepfner, S., Baumli, S., and Cramer, P. (2005). A structural perspective of CTD function. *Genes Dev* *19*, 1401-1415.

Meinhart, A., Silberzahn, T., and Cramer, P. (2003). The mRNA transcription/processing factor Ssu72 is a potential tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* *278*, 15917-15921.

Miller, J. E., and Reese, J. C. (2012). Ccr4-Not complex: the control freak of eukaryotic cells. *Crit Rev Biochem Mol Biol* *47*, 315-333.

Millevoi, S., and Vagner, S. (2009). Molecular mechanisms of eukaryotic pre-mRNA 3' end processing regulation. *Nucleic Acids Res* 38, 2757-2774.

Minaker, S. W., Filiatrault, M. C., Ben-Aroya, S., Hieter, P., and Stirling, P. C. (2013). Biogenesis of RNA polymerases II and III requires the conserved GPN small GTPases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 193, 853-864.

Minakhin, L., Bhagat, S., Brunning, A., Campbell, E. A., Darst, S. A., Ebright, R. H., and Severinov, K. (2001). Bacterial RNA polymerase subunit omega and eukaryotic RNA polymerase subunit RPB6 are sequence, structural, and functional homologs and promote RNA polymerase assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 892-897.

Miron-Garcia, M. C., Garrido-Godino, A. I., Garcia-Molinero, V., Hernandez-Torres, F., Rodriguez-Navarro, S., and Navarro, F. (2013). The prefoldin bud27 mediates the assembly of the eukaryotic RNA polymerases in an rpb5-dependent manner. *PLoS Genet* 9, e1003297.

Mitsuzawa, H., Kanda, E., and Ishihama, A. (2003). Rpb7 subunit of RNA polymerase II interacts with an RNA-binding protein involved in processing of transcripts. *Nucleic Acids Res* 31, 4696-4701.

Miyao, T., Barnett, J. D., and Woychik, N. A. (2001). Deletion of the RNA polymerase subunit RPB4 acts as a global, not stress-specific, shut-off switch for RNA polymerase II transcription at high temperatures. *J Biol Chem* 276, 46408-46413.

Moore, M. J., and Proudfoot, N. J. (2009). Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. *Cell* 136, 688-700.

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

Mosley, A. L., Hunter, G. O., Sardi, M. E., Smolle, M., Workman, J. L., Florens, L., and Washburn, M. P. (2013). Quantitative proteomics demonstrates that the RNA polymerase II subunits Rpb4 and Rpb7 dissociate during transcriptional elongation. *Mol Cell Proteomics* 12, 1530-1538.

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

Moss, T., Langlois, F., Gagnon-Kugler, T., and Stefanovsky, V. (2007). A housekeeper with power of attorney: the rRNA genes in ribosome biogenesis. *Cell Mol Life Sci* 64, 29-49.

Muhlrad, D., Decker, C. J., and Parker, R. (1994). Deadenylation of the unstable mRNA encoded by the yeast MFA2 gene leads to decapping followed by 5'-->3' digestion of the transcript. *Genes Dev* 8, 855-866.

Muhlrad, D., and Parker, R. (2005). The yeast EDC1 mRNA undergoes deadenylation-independent decapping stimulated by Not2p, Not4p, and Not5p. *Embo J* 24, 1033-1045.

Munoz, M. J., de la Mata, M., and Kornblihtt, A. R. (2010). The carboxy terminal domain of RNA polymerase II and alternative splicing. *Trends Biochem Sci* 35, 497-504.

Naji, S., Grunberg, S., and Thomm, M. (2007). The RPB7 orthologue E' is required for transcriptional activity of a reconstituted archaeal core enzyme at low temperatures and stimulates open complex formation. *J Biol Chem* 282, 11047-11057.

Nakanishi, T., Nakano, A., Nomura, K., Sekimizu, K., and Natori, S. (1992). Purification, gene cloning, and gene disruption of the transcription elongation factor S-II in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 267, 13200-13204.

Nechaev, S., and Adelman, K. (2011). Pol II waiting in the starting gates: Regulating the transition from transcription initiation into productive elongation. *Biochim Biophys Acta* 1809, 34-45.

Neely, K. E., Hassan, A. H., Brown, C. E., Howe, L., and Workman, J. L. (2002). Transcription activator interactions with multiple SWI/SNF subunits. *Mol Cell Biol* 22, 1615-1625.

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

Nguyen, T. N., Schimanski, B., and Gunzl, A. (2007). Active RNA polymerase I of *Trypanosoma brucei* harbors a novel subunit essential for transcription. *Mol Cell Biol* 27, 6254-6263.

Nonet, M., Scafe, C., Sexton, J., and Young, R. (1987). Eucaryotic RNA polymerase conditional mutant that rapidly ceases mRNA synthesis. *Mol Cell Biol* 7, 1602-1611.

Nouraini, S., Archambault, J., and Friesen, J. D. (1996). Rpo26p, a subunit common to yeast RNA polymerases, is essential for the assembly of RNA polymerases I and II and for the stability of the largest subunits of these enzymes. *Mol Cell Biol* 16, 5985-5996.

Nouraini, S., Xu, D., Nelson, S., Lee, M., and Friesen, J. D. (1997). Genetic evidence for selective degradation of RNA polymerase subunits by the 20S proteasome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 25, 3570-3579.

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.

Ouhammouch, M., Werner, F., Weinzierl, R. O., and Geiduschek, E. P. (2004). A fully recombinant system for activator-dependent archaeal transcription. *J Biol Chem* 279, 51719-51721.

Pawlicki, J. M., and Steitz, J. A. (2010). Nuclear networking fashions pre-messenger RNA and primary microRNA transcripts for function. *Trends Cell Biol* 20, 52-61.

Peiro-Chova, L., and Estruch, F. (2007). Specific defects in different transcription complexes compensate for the requirement of the negative cofactor 2 repressor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 176, 125-138.

Pelechano, V., Chavez, S., and Perez-Ortin, J. E. (2010). A complete set of nascent transcription rates for yeast genes. *PLoS One* 5, e15442.

Pelechano, V., and Perez-Ortin, J. E. (2008). The transcriptional inhibitor thiolutin blocks mRNA degradation in yeast. *Yeast* 25, 85-92.

Pelechano, V., Wilkening, S., Jarvelin, A. I., Tekkedil, M. M., and Steinmetz, L. M. (2012). Genome-wide polyadenylation site mapping. *Methods Enzymol* 513, 271-296.

Penate, X., Lopez-Farfan, D., Landeira, D., Wentland, A., Vidal, I., and Navarro, M. (2009). RNA pol II subunit RPB7 is required for RNA pol I-mediated transcription in *Trypanosoma brucei*. *EMBO Rep* 10, 252-257.

Pereira, L. A., van der Knaap, J. A., van den Boom, V., van den Heuvel, F. A., and Timmers, H. T. (2001). TAF(II)170 interacts with the concave surface of TATA-binding protein to inhibit its DNA binding activity. *Mol Cell Biol* 21, 7523-7534.

Perez-Ortin, J. E., Alepuz, P., Chavez, S., and Choder, M. (2013). Eukaryotic mRNA decay: methodologies, pathways, and links to other stages of gene expression. *J Mol Biol* 425, 3750-3775.

Peyroche, G., Milkereit, P., Bischler, N., Tschochner, H., Schultz, P., Sentenac, A., Carles, C., and Riva, M. (2000). The recruitment of RNA polymerase I on rDNA is mediated by the interaction of the A43 subunit with Rrn3. *Embo J* 19, 5473-5482.

Phatnani, H. P., and Greenleaf, A. L. (2006). Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. *Genes Dev* 20, 2922-2936.

Pillai, B., Verma, J., Abraham, A., Francis, P., Kumar, Y., Tatu, U., Brahmachari, S. K., and Sadhale, P. P. (2003). Whole genome expression profiles of yeast RNA polymerase II core subunit, Rpb4, in stress and nonstress conditions. *J Biol Chem* 278, 3339-3346.

Pinto, I., Ware, D. E., and Hampsey, M. (1992). The yeast SUA7 gene encodes a homolog of human transcription factor TFIIB and is required for normal start site selection in vivo. *Cell* 68, 977-988.

Preiss, T., and Hentze, M. W. (1998). Dual function of the messenger RNA cap structure in poly(A)-tail-promoted translation in yeast. *Nature* 392, 516-520.

Prelich, G. (1997). *Saccharomyces cerevisiae* BUR6 encodes a DRAP1/NC2alpha homolog that has both positive and negative roles in transcription in vivo. *Mol Cell Biol* 17, 2057-2065.

Prelich, G., and Winston, F. (1993). Mutations that suppress the deletion of an upstream activating sequence in yeast: involvement of a protein kinase and histone H3 in repressing transcription in vivo. *Genetics* 135, 665-676.

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

Qiu, H., Hu, C., Gaur, N. A., and Hinnebusch, A. G. (2012). Pol II CTD kinases Bur1 and Kin28 promote Spt5 CTR-independent recruitment of Paf1 complex. *Embo J* 31, 3494-3505.

Qiu, H., Hu, C., and Hinnebusch, A. G. (2009). Phosphorylation of the Pol II CTD by KIN28 enhances BUR1/BUR2 recruitment and Ser2 CTD phosphorylation near promoters. *Mol Cell* *33*, 752-762.

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

Quan, X., Rassadi, R., Rabie, B., Matusiewicz, N., and Stochaj, U. (2004). Regulated nuclear accumulation of the yeast hsp70 Ssa4p in ethanol-stressed cells is mediated by the N-terminal domain, requires the nuclear carrier Nmd5p and protein kinase C. *Faseb J* *18*, 899-901.

Ramanathan, Y., Rajpara, S. M., Reza, S. M., Lees, E., Shuman, S., Mathews, M. B., and Pe'ery, T. (2001). Three RNA polymerase II carboxyl-terminal domain kinases display distinct substrate preferences. *J Biol Chem* *276*, 10913-10920.

Ranuncolo, S. M., Ghosh, S., Hanover, J. A., Hart, G. W., and Lewis, B. A. (2012). Evidence of the involvement of O-GlcNAc-modified human RNA polymerase II CTD in transcription in vitro and in vivo. *J Biol Chem* *287*, 23549-23561.

Reese, J. C. (2003). Basal transcription factors. *Curr Opin Genet Dev* *13*, 114-118.

Reese, J. C. (2012). The control of elongation by the yeast Ccr4-not complex. *Biochim Biophys Acta* *1829*, 127-133.

Robinson, P. J., Bushnell, D. A., Trnka, M. J., Burlingame, A. L., and Kornberg, R. D. (2012). Structure of the mediator head module bound to the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 17931-17935.

Rodriguez-Gil, A., Garcia-Martinez, J., Pelechano, V., Munoz-Centeno Mde, L., Geli, V., Perez-Ortin, J. E., and Chavez, S. (2010). The distribution of active RNA polymerase II along the transcribed region is gene-specific and controlled by elongation factors. *Nucleic Acids Res* *38*, 4651-4664.

Rodriguez, C. R., Cho, E. J., Keogh, M. C., Moore, C. L., Greenleaf, A. L., and Buratowski, S. (2000). Kin28, the TFIIF-associated carboxy-terminal domain kinase, facilitates the recruitment of mRNA processing machinery to RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* *20*, 104-112.

Röther, S., and Sträßer, K. (2009). mRNA Export—An Integrative Component of Gene Expression.

Rubbi, L., Labarre-Mariotte, S., Chedin, S., and Thuriaux, P. (1999). Functional characterization of ABC10alpha, an essential polypeptide shared by all three forms of eukaryotic DNA-dependent RNA polymerases. *J Biol Chem* *274*, 31485-31492.

Runner, V. M., Podolny, V., and Buratowski, S. (2008). The Rpb4 subunit of RNA polymerase II contributes to cotranscriptional recruitment of 3' processing factors. *Mol Cell Biol* *28*, 1883-1891.

Sambrook, J., and Russell, D. W. (2006). Transformation of *E. coli* by Electroporation. *CSH Protoc* *2006*.

- Sampath, V.,** Balakrishnan, B., Verma-Gaur, J., Onesti, S., and Sadhale, P. P. (2008). Unstructured N terminus of the RNA polymerase II subunit Rpb4 contributes to the interaction of Rpb4.Rpb7 subcomplex with the core RNA polymerase II of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* *283*, 3923-3931.
- Sanchez, Y.,** Taulien, J., Borkovich, K. A., and Lindquist, S. (1992). Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. *Embo J* *11*, 2357-2364.
- Saunders, A.,** Core, L. J., and Lis, J. T. (2006). Breaking barriers to transcription elongation. *Nat Rev Mol Cell Biol* *7*, 557-567.
- Scafe, C.,** Martin, C., Nonet, M., Podos, S., Okamura, S., and Young, R. A. (1990). Conditional mutations occur predominantly in highly conserved residues of RNA polymerase II subunits. *Mol Cell Biol* *10*, 1270-1275.
- Schiestl, R. H., and Gietz, R. D.** (1989). High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet* *16*, 339-346.
- Schluesche, P.,** Stelzer, G., Piaia, E., Lamb, D. C., and Meisterernst, M. (2007). NC2 mobilizes TBP on core promoter TATA boxes. *Nat Struct Mol Biol* *14*, 1196-1201.
- Schroeder, S. C.,** Schwer, B., Shuman, S., and Bentley, D. (2000). Dynamic association of capping enzymes with transcribing RNA polymerase II. *Genes Dev* *14*, 2435-2440.
- Schroeder, S. C.,** Zorio, D. A., Schwer, B., Shuman, S., and Bentley, D. (2004). A function of yeast mRNA cap methyltransferase, Abd1, in transcription by RNA polymerase II. *Mol Cell* *13*, 377-387.
- Schwer, B.,** Mao, X., and Shuman, S. (1998). Accelerated mRNA decay in conditional mutants of yeast mRNA capping enzyme. *Nucleic Acids Res* *26*, 2050-2057.
- Schwer, B.,** Saha, N., Mao, X., Chen, H. W., and Shuman, S. (2000). Structure-function analysis of yeast mRNA cap methyltransferase and high-copy suppression of conditional mutants by AdoMet synthase and the ubiquitin conjugating enzyme Cdc34p. *Genetics* *155*, 1561-1576.
- Schwer, B., and Shuman, S.** (1996). Conditional inactivation of mRNA capping enzyme affects yeast pre-mRNA splicing in vivo. *Rna* *2*, 574-583.
- Selitrennik, M.,** Duek, L., Lotan, R., and Choder, M. (2006). Nucleocytoplasmic shuttling of the Rpb4p and Rpb7p subunits of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase II by two pathways. *Eukaryot Cell* *5*, 2092-2103.
- 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.
- Shalem, O.,** Groisman, B., Choder, M., Dahan, O., and Pilpel, Y. (2011). Transcriptome kinetics is governed by a genome-wide coupling of mRNA production and degradation: a role for RNA Pol II. *PLoS Genet* *7*, e1002273.
- 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.

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

Sheffer, A., Varon, M., and Choder, M. (1999). Rpb7 can interact with RNA polymerase II and support transcription during some stresses independently of Rpb4. *Mol Cell Biol* *19*, 2672-2680.

Sheth, U., and Parker, R. (2003). Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* *300*, 805-808.

Shpakovski, G. V., Acker, J., Wintzerith, M., Lacroix, J. F., Thuriaux, P., and Vigneron, M. (1995). Four subunits that are shared by the three classes of RNA polymerase are functionally interchangeable between *Homo sapiens* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* *15*, 4702-4710.

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.

Simon, M., Seraphin, B., and Faye, G. (1986). KIN28, a yeast split gene coding for a putative protein kinase homologous to CDC28. *Embo J* *5*, 2697-2701.

Sims, R. J., 3rd, Rojas, L. A., Beck, D., Bonasio, R., Schuller, R., Drury, W. J., 3rd, Eick, D., and Reinberg, D. (2011). The C-terminal domain of RNA polymerase II is modified by site-specific methylation. *Science* *332*, 99-103.

Singh, B. N., and Hampsey, M. (2007). A transcription-independent role for TFIIB in gene looping. *Mol Cell* *27*, 806-816.

Singh, J., and Padgett, R. A. (2009). Rates of in situ transcription and splicing in large human genes. *Nat Struct Mol Biol* *16*, 1128-1133.

Sogaard, T. M., and Svejstrup, J. Q. (2007). Hyperphosphorylation of the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II facilitates dissociation of its complex with mediator. *J Biol Chem* *282*, 14113-14120.

Somesh, B. P., Reid, J., Liu, W. F., Sogaard, T. M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Svejstrup, J. Q. (2005). Multiple mechanisms confining RNA polymerase II ubiquitylation to polymerases undergoing transcriptional arrest. *Cell* *121*, 913-923.

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

Sonenberg, N., and Hinnebusch, A. G. (2009). Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* *136*, 731-745.

Soutourina, J., Bordas-Le Floch, V., Gendrel, G., Flores, A., Ducrot, C., Dumay-Odelot, H., Soularue, P., Navarro, F., Cairns, B. R., Lefebvre, O., and Werner, M. (2006). Rsc4 connects the chromatin remodeler RSC to RNA polymerases. *Mol Cell Biol* *26*, 4920-4933.

Soutourina, J., Wydau, S., Ambroise, Y., Boschiero, C., and Werner, M. (2011). Direct interaction of RNA polymerase II and mediator required for transcription in vivo. *Science* 331, 1451-1454.

Spedale, G., Meddens, C. A., Koster, M. J., Ko, C. W., van Hooff, S. R., Holstege, F. C., Timmers, H. T., and Pijnappel, W. W. (2012). Tight cooperation between Mot1p and NC2beta in regulating genome-wide transcription, repression of transcription following heat shock induction and genetic interaction with SAGA. *Nucleic Acids Res* 40, 996-1008.

Spies, N., Burge, C. B., and Bartel, D. P. (2013). 3' UTR-isoform choice has limited influence on the stability and translational efficiency of most mRNAs in mouse fibroblasts. *Genome Res* 23, 2078-2090.

Sprouse, R. O., Brenowitz, M., and Auble, D. T. (2006). Snf2/Swi2-related ATPase Mot1 drives displacement of TATA-binding protein by gripping DNA. *Embo J* 25, 1492-1504.

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

Steinmetz, E. J., and Brow, D. A. (1996). Repression of gene expression by an exogenous sequence element acting in concert with a heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-like protein, Nrd1, and the putative helicase Sen1. *Mol Cell Biol* 16, 6993-7003.

Steinmetz, E. J., and Brow, D. A. (2003). Ssu72 protein mediates both poly(A)-coupled and poly(A)-independent termination of RNA polymerase II transcription. *Mol Cell Biol* 23, 6339-6349.

Steinmetz, E. J., Conrad, N. K., Brow, D. A., and Corden, J. L. (2001). RNA-binding protein Nrd1 directs poly(A)-independent 3'-end formation of RNA polymerase II transcripts. *Nature* 413, 327-331.

Steinmetz, E. J., Warren, C. L., Kuehner, J. N., Panbehi, B., Ansari, A. Z., and Brow, D. A. (2006). Genome-wide distribution of yeast RNA polymerase II and its control by Sen1 helicase. *Mol Cell* 24, 735-746.

Sterner, D. E., and Berger, S. L. (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 435-459.

Sterner, D. E., Lee, J. M., Hardin, S. E., and Greenleaf, A. L. (1995). The yeast carboxyl-terminal repeat domain kinase CTDK-I is a divergent cyclin-cyclin-dependent kinase complex. *Mol Cell Biol* 15, 5716-5724.

Stettler, S., Chiannilkulchai, N., Hermann-Le Denmat, S., Lalo, D., Lacroute, F., Sentenac, A., and Thuriaux, P. (1993). A general suppressor of RNA polymerase I, II and III mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 239, 169-176.

Stewart, M. (2010). Nuclear export of mRNA. *Trends Biochem Sci* 35, 609-617.

Strambio-De-Castilla, C., Niepel, M., and Rout, M. P. (2010). The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 490-501.

Strasser, K., Bassler, J., and Hurt, E. (2000). Binding of the Mex67p/Mtr2p heterodimer to FXFG, GLFG, and FG repeat nucleoporins is essential for nuclear mRNA export. *J Cell Biol* *150*, 695-706.

Strasser, K., Masuda, S., Mason, P., Pfannstiel, J., Oppizzi, M., Rodriguez-Navarro, S., Rondon, A. G., Aguilera, A., Struhl, K., Reed, R., and Hurt, E. (2002). TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature* *417*, 304-308.

Sudarsanam, P., and Winston, F. (2000). The Swi/Snf family nucleosome-remodeling complexes and transcriptional control. *Trends Genet* *16*, 345-351.

Sugihara, F., Kasahara, K., and Kokubo, T. (2011). Highly redundant function of multiple AT-rich sequences as core promoter elements in the TATA-less RPS5 promoter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* *39*, 59-75.

Suh, M. H., Meyer, P. A., Gu, M., Ye, P., Zhang, M., Kaplan, C. D., Lima, C. D., and Fu, J. (2010). A dual interface determines the recognition of RNA polymerase II by RNA capping enzyme. *J Biol Chem* *285*, 34027-34038.

Svejstrup, J. Q., Li, Y., Fellows, J., Gnatt, A., Bjorklund, S., and Kornberg, R. D. (1997). Evidence for a mediator cycle at the initiation of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 6075-6078.

Svetlov, V., and Nudler, E. (2013). Basic mechanism of transcription by RNA polymerase II. *Biochim Biophys Acta* *1829*, 20-28.

Tan, Q., Prysak, M. H., and Woychik, N. A. (2003). Loss of the Rpb4/Rpb7 subcomplex in a mutant form of the Rpb6 subunit shared by RNA polymerases I, II, and III. *Mol Cell Biol* *23*, 3329-3338.

Teixeira, D., and Parker, R. (2007). Analysis of P-body assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* *18*, 2274-2287.

Teixeira, D., Sheth, U., Valencia-Sanchez, M. A., Brengues, M., and Parker, R. (2005). Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *Rna* *11*, 371-382.

Teixeira, M. C., Monteiro, P., Jain, P., Tenreiro, S., Fernandes, A. R., Mira, N. P., Alenquer, M., Freitas, A. T., Oliveira, A. L., and Sa-Correia, I. (2006). The YEASTRACT database: a tool for the analysis of transcription regulatory associations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* *34*, D446-451.

Tharun, S. (2009). Lsm1-7-Pat1 complex: a link between 3' and 5'-ends in mRNA decay? *RNA Biol* *6*, 228-232.

Tian, B., and Graber, J. H. (2012). Signals for pre-mRNA cleavage and polyadenylation. *Wiley Interdiscip Rev RNA* *3*, 385-396.

Tombacz, I., Schauer, T., Juhasz, I., Komonyi, O., and Boros, I. (2009). The RNA Pol II CTD phosphatase Fcp1 is essential for normal development in *Drosophila melanogaster*. *Gene* *446*, 58-67.

- Topalidou, I.,** Papamichos-Chronakis, M., Thireos, G., and Tzamarias, D. (2004). Spt3 and Mot1 cooperate in nucleosome remodeling independently of TBP recruitment. *Embo J* 23, 1943-1948.
- Tuck, A. C., and Tollervey, D.** (2011). RNA in pieces. *Trends Genet* 27, 422-432.
- Tucker, M.,** Staples, R. R., Valencia-Sanchez, M. A., Muhlrads, D., and Parker, R. (2002). Ccr4p is the catalytic subunit of a Ccr4p/Pop2p/Notp mRNA deadenylase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 21, 1427-1436.
- Ujvari, A., and Luse, D. S.** (2006). RNA emerging from the active site of RNA polymerase II interacts with the Rpb7 subunit. *Nat Struct Mol Biol* 13, 49-54.
- van Gool, A. J.,** Verhage, R., Swagemakers, S. M., van de Putte, P., Brouwer, J., Troelstra, C., Bootsma, D., and Hoeijmakers, J. H. (1994). RAD26, the functional *S. cerevisiae* homolog of the Cockayne syndrome B gene ERCC6. *Embo J* 13, 5361-5369.
- Van Mullem, V.,** Wery, M., De Bolle, X., and Vandenhoute, J. (2003). Construction of a set of *Saccharomyces cerevisiae* vectors designed for recombinational cloning. *Yeast* 20, 739-746.
- Van Mullem, V.,** Wery, M., Werner, M., Vandenhoute, J., and Thuriaux, P. (2002). The Rpb9 subunit of RNA polymerase II binds transcription factor TFIIE and interferes with the SAGA and elongator histone acetyltransferases. *J Biol Chem* 277, 10220-10225.
- van Oevelen, C. J.,** van Teeffelen, H. A., and Timmers, H. T. (2005). Differential requirement of SAGA subunits for Mot1p and Taf1p recruitment in gene activation. *Mol Cell Biol* 25, 4863-4872.
- Vasiljeva, L.,** Kim, M., Mutschler, H., Buratowski, S., and Meinhart, A. (2008). The Nrd1-Nab3-Sen1 termination complex interacts with the Ser5-phosphorylated RNA polymerase II C-terminal domain. *Nat Struct Mol Biol* 15, 795-804.
- Venters, B. J., and Pugh, B. F.** (2009). How eukaryotic genes are transcribed. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 44, 117-141.
- Verma, R.,** Oania, R., Fang, R., Smith, G. T., and Deshaies, R. J. (2011). Cdc48/p97 mediates UV-dependent turnover of RNA Pol II. *Mol Cell* 41, 82-92.
- Vinciguerra, P., and Stutz, F.** (2004). mRNA export: an assembly line from genes to nuclear pores. *Curr Opin Cell Biol* 16, 285-292.
- Wada, T.,** Takagi, T., Yamaguchi, Y., Watanabe, D., and Handa, H. (1998). Evidence that P-TEFb alleviates the negative effect of DSIF on RNA polymerase II-dependent transcription in vitro. *Embo J* 17, 7395-7403.
- Wang, W.,** Carey, M., and Gralla, J. D. (1992). Polymerase II promoter activation: closed complex formation and ATP-driven start site opening. *Science* 255, 450-453.
- Wang, Y.,** Fairley, J. A., and Roberts, S. G. (2010). Phosphorylation of TFIIB links transcription initiation and termination. *Curr Biol* 20, 548-553.
- Warner, J. R.** (1999). The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci* 24, 437-440.

Weideman, C. A., Netter, R. C., Benjamin, L. R., McAllister, J. J., Schmiedekamp, L. A., Coleman, R. A., and Pugh, B. F. (1997). Dynamic interplay of TFIIA, TBP and TATA DNA. *J Mol Biol* 271, 61-75.

Wente, S. R., and Rout, M. P. (2010). The nuclear pore complex and nuclear transport. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a000562.

Werner-Washburne, M., Becker, J., Kusic-Smithers, J., and Craig, E. A. (1989). Yeast Hsp70 RNA levels vary in response to the physiological status of the cell. *J Bacteriol* 171, 2680-2688.

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

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.

Werner, M., Thuriaux, P., and Soutourina, J. (2009). Structure-function analysis of RNA polymerases I and III. *Curr Opin Struct Biol* 19, 740-745.

West, S., Gromak, N., and Proudfoot, N. J. (2004). Human 5' --> 3' exonuclease Xrn2 promotes transcription termination at co-transcriptional cleavage sites. *Nature* 432, 522-525.

Westover, K. D., Bushnell, D. A., and Kornberg, R. D. (2004). Structural basis of transcription: separation of RNA from DNA by RNA polymerase II. *Science* 303, 1014-1016.

Wierzbicki, A. T. (2012). The role of long non-coding RNA in transcriptional gene silencing. *Curr Opin Plant Biol* 15, 517-522.

Wierzbicki, A. T., Haag, J. R., and Pikaard, C. S. (2008). Noncoding transcription by RNA polymerase Pol IVb/Pol V mediates transcriptional silencing of overlapping and adjacent genes. *Cell* 135, 635-648.

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

Wilkening, S., Pelechano, V., Jarvelin, A. I., Tekkedil, M. M., Anders, S., Benes, V., and Steinmetz, L. M. (2013). An efficient method for genome-wide polyadenylation site mapping and RNA quantification. *Nucleic Acids Res* 41, e65.

Wilson, M. D., Harreman, M., and Svejstrup, J. Q. (2012). Ubiquitylation and degradation of elongating RNA polymerase II: The last resort. *Biochim Biophys Acta* 1829, 151-157.

Wilson, M. D., Harreman, M., Taschner, M., Reid, J., Walker, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Svejstrup, J. Q. (2013). Proteasome-mediated processing of Def1, a critical step in the cellular response to transcription stress. *Cell* 154, 983-995.

Wilusz, C. J., Wormington, M., and Peltz, S. W. (2001). The cap-to-tail guide to mRNA turnover. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 237-246.

Winkler, D. D., and Luger, K. (2011). The histone chaperone FACT: structural insights and mechanisms for nucleosome reorganization. *J Biol Chem* 286, 18369-18374.

Woodcock, D. M., Crowther, P. J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S. S., Michael, M. Z., and Graham, M. W. (1989). Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* *17*, 3469-3478.

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

Woychik, N. A., and Hampsey, M. (2002). The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell* *108*, 453-463.

Woychik, N. A., and Young, R. A. (1989). RNA polymerase II subunit RPB4 is essential for high- and low-temperature yeast cell growth. *Mol Cell Biol* *9*, 2854-2859.

Woychik, N. A., and Young, R. A. (1990). RNA polymerase II: subunit structure and function. *Trends Biochem Sci* *15*, 347-351.

Wu, C. C., Herzog, F., Jennebach, S., Lin, Y. C., Pai, C. Y., Aebersold, R., Cramer, P., and Chen, H. T. (2012). RNA polymerase III subunit architecture and implications for open promoter complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 19232-19237.

Wu, W. H., Pinto, I., Chen, B. S., and Hampsey, M. (1999). Mutational analysis of yeast TFIIB. A functional relationship between Ssu72 and Sub1/Tsp1 defined by allele-specific interactions with TFIIB. *Genetics* *153*, 643-652.

Xiang, K., Manley, J. L., and Tong, L. (2012). The yeast regulator of transcription protein Rtr1 lacks an active site and phosphatase activity. *Nat Commun* *3*, 946.

Xiang, K., Nagaike, T., Xiang, S., Kilic, T., Beh, M. M., Manley, J. L., and Tong, L. (2010). Crystal structure of the human symplekin-Ssu72-CTD phosphopeptide complex. *Nature* *467*, 729-733.

Xiao, T., Shibata, Y., Rao, B., Laribee, R. N., O'Rourke, R., Buck, M. J., Greenblatt, J. F., Krogan, N. J., Lieb, J. D., and Strahl, B. D. (2007). The RNA polymerase II kinase Ctk1 regulates positioning of a 5' histone methylation boundary along genes. *Mol Cell Biol* *27*, 721-731.

Yao, S., Neiman, A., and Prelich, G. (2000). BUR1 and BUR2 encode a divergent cyclin-dependent kinase-cyclin complex important for transcription in vivo. *Mol Cell Biol* *20*, 7080-7087.

Yokomori, K., Verrijzer, C. P., and Tjian, R. (1998). An interplay between TATA box-binding protein and transcription factors IIE and IIA modulates DNA binding and transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 6722-6727.

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

Zaros, C., Briand, J. F., Boulard, Y., Labarre-Mariotte, S., Garcia-Lopez, M. C., Thuriaux, P., and Navarro, F. (2007). Functional organization of the Rpb5 subunit shared by the three yeast RNA polymerases. *Nucleic Acids Res* *35*, 634-647.

Zaros, C., and Thuriaux, P. (2005). Rpc25, a conserved RNA polymerase III subunit, is critical for transcription initiation. *Mol Microbiol* 55, 104-114.

Zenklusen, D., Vinciguerra, P., Wyss, J. C., and Stutz, F. (2002). Stable mRNP formation and export require cotranscriptional recruitment of the mRNA export factors Yra1p and Sub2p by Hpr1p. *Mol Cell Biol* 22, 8241-8253.

Zentner, G. E., and Henikoff, S. (2013). Mot1 Redistributes TBP from TATA-Containing to TATA-Less Promoters. *Mol Cell Biol* 33, 4996-5004.

Zhang, D. W., Mosley, A. L., Ramisetty, S. R., Rodriguez-Molina, J. B., Washburn, M. P., and Ansari, A. Z. (2012). Ssu72 phosphatase-dependent erasure of phospho-Ser7 marks on the RNA polymerase II C-terminal domain is essential for viability and transcription termination. *J Biol Chem* 287, 8541-8551.

Zhao, J., Hyman, L., and Moore, C. (1999). Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 405-445.

Zheng, D., Ezzeddine, N., Chen, C. Y., Zhu, W., He, X., and Shyu, A. B. (2008). Deadenylation is prerequisite for P-body formation and mRNA decay in mammalian cells. *J Cell Biol* 182, 89-101.

Anexos



ABREVIATURAS**³³P- α -dCTP:** Deoxicitidina trifosfato α -³³P**A:** Adenina**AAS:** 3-aminopropiltriétoxissilane**Acetil-CoA:** Acetil-CoenzimaA**Ade:** Adenina**ATP:** Adenosin trifosfato**B&W:** Unión y lavado (*Bind and wash*)**Bp:** par de bases (*base pair*)**BSA:** Albúmina de suero bovino (*bovine serum albumin*)**C:** Citosina**cDNA:** ADN copia (*copy DNA*)**CEN:** Centromérico**CHAPS:** Ácido 3-[(3-colamidopropil) dimetil-amonio]-1-propanosulfónico (*3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate*)**ChIP:** Immunoprecipitación de cromatina (*chromatin immunoprecipitation*)**CoIP:** Co-Immunoprecipitación**CTD:** Dominio carboxilo terminal (*carboxi-terminal domain*)**C-terminal:** Carboxilo-terminal**CTR:** Región carboxilo terminal (*carboxi-terminal region*)**D.O:** Densidad óptica.**Da:** Daltons**DAPI:** 4',6-diamino-2-fenilindol (*4',6-diamin-2-phenylindole*)**DNA:** Ácido desoxirribonucleico (*Deoxiribonucleic acid*)**dNTPs:** Desoxirribonucleótidos trifosfato**dsDNA:** ADN de doble cadena (*double-strand DNA*)**DTT:** Ditiotreititol**E:** Ácido glutámico**EB:** Tampón de elución (*elution buffer*)**ECL:** Sustrato de quimioluminiscencia mejorada (*enhanced chemiluminescent substrate*)**EDTA:** Ácido etilén-diamino-tetraacético (*Ethylenediaminetetraacetic acid*)

- ESR:** Respuesta a estrés ambiental (*environmental stress response*)
- FG:** Fenilalanina-glutamina
- FOA:** Ácido 5-fluoroorótico (*5-fluoro-orotic acid*)
- G:** Guanina
- GFP:** Proteína verde fluorescente (*Green fluorescent protein*)
- GLAM:** Acumulación de ARNm dependiente de la longitud del gen (*gene length-dependent accumulation of mRNA*)
- Gln:** Glutamina
- Gly:** Glicina
- GMP:** Guanosin monofosfato
- GTF:** Factor general de transcripción (*general transcription factor*)
- H₂O:** Agua
- HA:** Hemaglutinina
- HEPES:** Ácido N-[2-hidroxietil] piperacina-N'-[2-etanosulfónico]
- His:** Histidina
- I:** Isoleucina
- IgG:** Inmunoglobulina G
- InsP₆:** inositol hexafosfato
- isRIP:** Immunoprecipitación de ARN específica de isoformas (*isoform-specific RNA immunoprecipitation*)
- IVT:** Transcritos *in vitro* (*in vitro transcripts*)
- K48:** Lisina-48
- K63:** Lisina-63
- KAN:** Gen de resistencia a geneticina
- L:** Leucina
- LB:** Luria-Bertani
- Leu:** Leucina
- LMB:** leptomicina B
- LN:** Logaritmo neperiano
- lncRNA:** ARN largo no codificante (*long non-coding RNA*)
- Log:** Logaritmo
- Lys:** Lisina
- M7G:** 7-metilguanosina

- Met:** Metionina
- miRNA:** microARN (*microRNA*)
- MOPS:** Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfónico
- mRNA:** ARN mensajero (*messenger RNA*)
- mRNP:** Complejos de proteínas y ARNm (*mRNP: mRNA-protein complex*)
- ncRNA:** ARN no codificante (*non-coding RNA*)
- NLS:** Secuencia de localización nuclear (*Nuclear localization sequence*)
- NP-40:** Nonil fenoxipolietoxietanol (*nonyl phenoxypolyethoxyethanol*)
- NPC:** Complejo de poro nuclear (*nuclear pore complex*)
- N-terminal:** Amino-terminal
- OD:** Densidad óptica (*optical density*)
- ORF:** Marco de lectura abierto (*Open reading frame*)
- P:** Prolina
- PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida (*polyacrylamide gel electrophoresis*)
- PB:** cuerpos de procesamiento (*p-bodies, processing bodies*)
- pb:** Pares de bases
- PBS:** Tampón fosfato salino (*Phosphate Buffer Saline*)
- PBST:** Tampón fosfato salino con Tween-20 (*Phosphate Buffer Saline-Tween20*)
- PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*)
- PEG:** Polietilenglicol
- pGAL:** Promotor regulable por galactosa
- Phe:** Fenilalanina
- PIC:** Complejo de preiniciación (*preinitiation complex*)
- PIPES:** Piperazina-1,4-bis (ácido 2-etanosulfónico)
- piRNA:** *piwi-interacting RNA*
- PMSF:** Fluoruro de fenilmetilsulfonil (*phenylmethylsulfonyl fluoride*)
- PNPP:** p-Nitrofenilfosfato (*p-Nitrophenyl phosphate*)
- Pol:** Polimerasa
- PVDF:** Difluoruro de polivinilo (*polyvinylidene difluoride*)
- Q:** Glutamina
- qRT-PCR:** PCR cuantitativa acoplada a retrotranscripción (*quantitative retrotranscription PCR*)
- R:** Arginina

RIP: Immunoprecipitación de ARN (*RNA immunoprecipitation*)

RNA: Ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)

RP: Proteínas ribosómicas (*ribosomal protein*)

rpm: revoluciones por minuto

rRNA: ARN ribosómico (*ribosomal RNA*)

RT: Retrotranscripción

S: Serina

scaRNA: ARNs asociados a los cuerpos de Cajal (*small Cajal body-specific RNA*)

SD: Medio mínimo sintético (*Synthetic dropout medium*)

sdRNA: Fragmentos derivados de ARN pequeños nucleolares (*snoRNA-derived fragments*)

SDS: Dodecil sulfato de sodio (*sodium dodecyl sulphate*)

Ser: Serina

SG: Gránulos de estrés (*stress granules*)

siRNA: Pequeño ARN de interferencia (*small interfering RNA*)

snoRNA: ARN pequeño nucleolar (*small nucleolar RNA*)

snRNA: ARN pequeño nuclear (*small nuclear RNA*)

SOC: Medio de cultivo óptimo con represión catabólica (*Super Optimal broth with Catabolite repression*)

Spo: Medio de esporulación

SSC: Tampón salino con citrato sódico (*saline-sodium citrate buffer*)

SSPE: Tampón salino fosfato sódico-EDTA (*Saline sodium phosphate EDTA buffer*)

T: Timina

T: Treonina

TAP: Purificación por afinidad en tándem (*Tandem affinity purification*)

Taq: *Thermus aquaticus*

TCA: Ácido tricloroacético (*trichloroacetic acid*)

TC-NER: Reparación por escisión de nucleótidos acoplada a la transcripción (*Transcription-coupled nucleotide excision repair*)

TCR: Reparación acoplada a la transcripción (*Transcription-coupled repair*)

TE: Tampón Tris-EDTA

TEV: *Tobacco Etch Virus*

TF: Factor de transcripción (*transcription factor*)

- TRADE:** Degradación de la ARN pol II dependiente de parada transcripcional (*transcriptional stalling-dependent degradation of RNA pol II*)
- tRF:** Fragmento regulatorio de ARNt (*tRNA regulatory fragments*)
- tRNA:** ARN transferente (*transfer RNA*)
- Trp:** Triptófano
- TSS:** Sitio de inicio de la transcripción (*transcription start site*)
- tWH:** Dominio formado por hélices en tándem (*tandem winged helix*)
- U:** Uracilo
- Ub:** Ubiquitina
- UMP:** Uridin monofosfato
- Ura:** Uracilo
- UTR:** Región no traducida (*untranslated region*)
- UV:** Ultravioleta
- v/v:** Volumen/volumen
- V:** Valina
- Val:** Valina
- w/v:** Peso /volumen (*weight/volume*)
- W:** Triptófano
- WT:** Cepa Silvestre (*wild type*)
- YPD:** Medio de cultivo compuesto por extracto de levadura, peptone y dextrosa (*Yeast Extract Peptone Dextrose*)

CURRICULUM VITAE

DATOS PERSONALES

Apellidos y Nombre: Garrido Godino, Ana Isabel

Correo electrónico: aggodino@ujaen.es

FORMACIÓN ACADÉMICA

Licenciada en Biología

Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Jaén

Julio de 2009

Máster en “Investigación básica y aplicada en biología molecular y celular” (Mención de Calidad)

Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Jaén

Enero de 2011

Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular. RD. 56/2005 (Mención de Calidad)

Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Jaén

SITUACIÓN PROFESIONAL ACTUAL

Organismo: Universidad de Jaén

Centro: Facultad de Ciencias Experimentales

Departamento: Departamento de Biología Experimental (Área de Genética)

Categoría profesional: Personal investigador en formación. Becaria predoctoral en la convocatoria de ayudas para la Formación de Personal Universitario (FPU) del Ministerio de Educación

Fecha de inicio: 1 de Enero de 2011. Contrato en prácticas desde 1 de marzo de 2012

Dirección postal: Ed. B3, Paraje las Lagunillas, S/N; 23071 Jaén

Correo electrónico: aggodino@ujaen.es

ACTIVIDADES DE CARÁCTER CIENTÍFICO O PROFESIONAL

Posición: Becaria EMBO (European Molecular Biology Organization)

Institución: European Molecular Biology Laboratory (EMBL). Grupo del Dr. Lars Steimmetz.
Unidad de Genome Biology

Fecha: Desde el 1 de septiembre de 2013 hasta el 1 de diciembre de 2013

Posición: Becaria Predoctoral del programa de Formación de Personal Investigador de la Universidad de Jaén

Institución: Departamento de Biología Experimental (Área de Genética). Universidad de Jaén

Fecha: Desde Marzo de 2010 hasta Diciembre de 2010

Posición: Becaria Colaboración Ministerio de Educación

Institución: Departamento de Biología Experimental (Área de Bioquímica y Biología Molecular). Universidad de Jaén

Fecha: 2008/2009

PARTICIPACION EN PROYECTOS DE INVESTIGACION FINANCIADOS

Proyecto: Generación de herramientas para purificación de complejos proteicos y de complejos proteína-DNA por sistemas acuosos de 2 fases (ATPSS).

Organismo financiador: Junta de Andalucía

Código según financiadora: CVI 6521

Fecha: Desde 01/07/2011 hasta 30/06/2015

Proyecto: Regulación global de la expresión génica análisis molecular de las RNAs polimerasas.

Organismo financiador: Otros programas, Ministerio de Ciencia y Tecnología

Código según financiadora: BFU2010-21975-C03-02

Fecha: Desde 01/01/2011 hasta 31/12/2013

PUBLICACIONES

Título: Correct assembly of RNA polymerase II depends on the foot domain and is required for multiple steps of transcription in *Saccharomyces cerevisiae*.

Autores: Garrido-Godino, A. I. Garcia-Lopez, M. C., and Navarro, F.

Año de publicación: 2013

Revista: Mol Cell Biol 33, 3611-3626

Título: The yeast prefoldin-like URI-orthologue Bud27 associates with the RSC nucleosome remodeler and modulates transcription.

Autores: Mirón-García MC, **Garrido-Godino AI**, Martínez-Fernández V, Fernández-Pevida A, Cuevas-Bermúdez A, Chávez S, de la Cruz J and Navarro F.

Año de publicación: Submitted

Revista: Nucleic Acid Research (*Submitted*)

Título: The prefoldin Bud27 mediates the assembly of the eukaryotic RNA polymerases in an Rpb5-dependent manner.

Autores: Miron-Garcia, M. C., **Garrido-Godino, A. I.**, Garcia-Moliner, V., Hernandez-Torres, F., Rodriguez-Navarro, S., and Navarro, F.

Año de publicación: 2013

Revista: PLoS Genet 9, e1003297

Título: The conserved foot domain of RNA pol II associates with proteins involved in transcriptional initiation and/or early elongation.

Autores: Garcia-Lopez, M. C., Pelechano, V., Miron-Garcia, M. C., **Garrido-Godino, A. I.**, Garcia, A., Calvo, O., Werner, M., Perez-Ortin, J. E., and Navarro, F.

Año de publicación: 2011

Revista: Genetics 189, 1235-1248

Título: Overexpression of SNG1 causes 6-azauracil resistance in *Saccharomyces cerevisiae*.

Autores: Garcia-Lopez, M. C., Miron-Garcia, M. C., **Garrido-Godino, A. I.**, Mingorance, C., and Navarro, F.

Año de publicación: 2010

Revista: Curr Genet 56, 251-263

CONTRIBUCIONES A CONGRESOS

Congresos internacionales

Título: New insights into de assembly/disassembly of eukaryotic RNA Polymerases.

Autores: **Garrido-Godino AI**, Mirón-García MC, Martínez-Fernández V, García-López MC, Oya R, Navarro F.

Congreso: "26th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology"

Lugar: Frankfurt University, Germany

Fecha: Agosto 29-Septiembre 3, 2013

Título: New insights into de assembly/disassembly of eukaryotic RNA Polymerases.

Autores: Garrido-Godino AI, Mirón-García MC, Martínez-Fernández V, García-López MC, Oya R, Navarro F.

Congreso: Federation of European Biochemical Societies CONGRESS 2013 “Mechanisms in Biology”

Lugar: Saint Petersburg, Russia

Fecha: Julio 6–11, 2013

Título: The integrity of the RNA polymerase II depends on the foot domain and modulates CTD phosphorylation and transcription initiation.

Autores: Garrido-Godino AI, García-López MC, Mirón-García MC, Oya R and Navarro F.

Congreso: EMBO Conference on Gene Transcription in Yeast 2012

Lugar: San Feliu de Guixols, Girona, España

Fecha: Junio 16 - 21, 2012

Título: The prefoldin Bud27 determines the assembly of the three RNA polymerases prior their transport to the nucleus.

Autores: Mirón-García MC, Garrido-Godino AI, García-Molinero V, Rodríguez-Navarro S and Navarro F.

Congreso: EMBO Conference on Gene Transcription in Yeast 2012

Lugar: San Feliu de Guixols, Girona, España

Fecha: Junio 16 - 21, 2012

Título: The prefoldin Bud27 participates in transcription elongation mediated by the RNA polymerase II.

Autores: Mirón-García MC, Garrido-Godino AI, Mingorance C, Gómez F, Fernández A, Chávez S, De la Cruz J, Navarro F.

Congreso: EMBO Conference on Gene Transcription in Yeast 2012

Lugar: San Feliu de Guixols, Girona, España

Fecha: Junio 16 - 21, 2012

Título: The foot of the RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae* acts as a platform to maintain the integrity and/or stability of the complex.

Autores: Garrido-Godino AI, García-López MC, Mirón-García MC, Navarro F.

Congreso: 25th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology

Lugar: Olsztyn-Kortowo, Poland

Fecha: Julio 11-16, 2011

Título: Analysis of the role of a specific region of the foot of the RNA pol II in transcription.

Autores: Garrido-Godino AI, García-López MC, Pelechano V, Garcia-Martinez J, Pérez-Ortín JE, and Navarro F.

Congreso: EMBO Conference on Gene Transcription in Yeast 2010

Lugar: San Feliu de Guixols, España

Fecha: 19-24 de junio de 2010

Congresos Nacionales

Título: La región del “pie” de la ARN polimerasa II de *Saccharomyces cerevisiae* actúa como una plataforma para mantener la integridad y/o la estabilidad del complejo.

Autores: Garrido-Godino AI, García-López MC, Mirón-García MC, Oya R and Navarro F.

Congreso: Sociedad Española de Genética 2011

Lugar: Murcia, España

Fecha: 21-23 Septiembre de 2011

Título: Relación entre prefoldinas, los procesos de ensamblaje de las ARN polimerasas eucarióticas y su entrada al núcleo.

Autores: Mirón-García MC, Garrido-Godino AI, and Navarro F.

Congreso: Sociedad Española de Genética 2011

Lugar: Murcia, España

Fecha: 21-23 Septiembre de 2011

Título: Relación entre la subunidad de las ARN polimerasas eucarióticas Rpb5 y la prefoldinas Bud27 y su papel en la elongación de la transcripción.

Autores: Mirón-García MC, Mingorance C, Fernández A, Garrido-Godino AI, Chávez S, De La Cruz J, Navarro F.

Congreso: Sociedad Española de Genética 2011

Lugar: Murcia, España

Fecha: 21-23 Septiembre de 2011

Título: Mecanismos De Ensamblaje Y Desensamblaje De Las ARN Polimerasasa Eucarióticas.

Autores: Garrido-Godino, AI; Mirón-García, MC; Martínez-Fernández, V, Navarro F.

Jornadas: Segundas Jornadas Sobre Investigación En Biotecnología Y Biomedicina

Lugar: Universidad de Jaén

Fecha: 2012

BECAS, AYUDAS Y PREMIOS RECIBIDOS

Premios recibidos

Mención Honorífica en la convocatoria Premios a los mejores Trabajos Fin de Máster defendidos en 2010, de la Universidad de Jaén, por el trabajo: *“Análisis de la región específica del pie de la ARN polimerasa II de Saccharomyces cerevisiae”* (Máster Universitario en Investigación Básica y Aplicada en Biología Molecular y Celular).

Premio al Mejor Trabajo Fin del Máster “Investigación básica y aplicada en biología molecular y celular” defendido en 2010. Con el Vº Bº de la Comisión de Postgrado de 28 de julio de 2011 (Aprobado el 26 de septiembre de 2011).

Mención Especial en la convocatoria de Premios Nacionales a la Excelencia en el Rendimiento Académico Universitario del curso 2008-2009 (Resolución de 30 de junio de 2011).

Premio Extraordinario De Grado de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Jaén. Promoción del 2009 (Resolución del 27/10/2009).

Premio al mejor expediente científico de bachillerato correspondiente al curso 2005/2006 en la titulación de Licenciada en Biología, convocado por la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Jaén.

Becas y ayudas

Beca o ayuda: Beca predoctoral en la convocatoria de ayudas para la Formación de Personal Universitario (FPU) del Ministerio de Educación.

Fecha: Desde el 1 de Enero de 2011. Contrato en prácticas desde 1 de marzo de 2012 hasta 28 de febrero de 2014.

Beca o ayuda: Beca EMBO (European Molecular Biology Organization) Short-term Fellowship, para la realización de estancias en un centro extranjero.

Fecha: Desde el 1 de septiembre de 2013 hasta el 1 de diciembre de 2013.

Beca o ayuda: Beca Predoctoral del programa de Formación de Personal Investigador de la Universidad de Jaén.

Fecha: Desde Marzo de 2010 hasta Diciembre de 2010.

Beca o ayuda: Beca de Colaboración Ministerio de Educación.

Fecha: Curso 2008/2009.

Beca o ayuda: Becas de carácter general para alumnado universitario del Ministerio de Educación.

Fecha: cursos 2005/2006, 2006/2007, 2007/2008, 2008/2009, 2009/2010.

CURSOS

Curso: Curso de Gestores Bibliográficos (ALFIN, 11) organizado por el Vicerrectorado de Docencia y Profesorado de la Universidad de Jaén, de acuerdo con el Programa de Formación Permanente y Actualización del Profesorado, celebrado en Jaén en febrero de 2012.

Curso: Curso de Weblogs: Sistemas de apoyo a la docencia y a la investigación; organizado por el Vicerrectorado de Docencia y Profesorado de la Universidad de Jaén, de acuerdo con el Programa de Formación Permanente y Actualización del Profesorado, celebrado en Jaén en julio de 2012.

Asistencia al Simposio internacional: “Las levaduras como modelos y herramientas”. Fundación Ramón Areces, Madrid (España). Fecha: 10 y 11 de mayo de 2011.

Curso: Curso de Especialización en Ecología Política. Departamento de antropología, geografía e historia de la universidad de Jaén. Fecha: Octubre de 2006.

DOCENCIA

Créditos de docencia impartidos:

- Bioinformática (Grado en Biología): 3,5 créditos ECTS curso 2011-2012
- Genética (Grado en Biología): 1 créditos ECTS curso 2011-2012
- Genética humana, clínica y forense (Grado en Biología): 2 créditos ECTS curso 2012-2013
- Genética (Grado en Biología): 2 créditos ECTS curso 2012-2013
- Genética (Grado en Biología): 2,4 créditos ECTS curso 2013-2014
- Ingeniería genética, transgénesis y mejora (Grado en Biología): 1 créditos ECTS curso 2013-2014
- Biología (Grado en Ciencias Ambientales): 0,92 créditos ECTS curso 2013-2014

Participación en el Plan de Acción Tutorial, organizado por el Vicerrectorado de Docencia y Profesorado en colaboración con la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Jaén, durante el curso 2012/2013 en el Grado de Biología.

Co-dirección del Trabajo Fin de Máster titulado: “Análisis de la región conservada de la garra de la ARN polimerasa II de *Saccharomyces cerevisiae*” presentado por Marta Romero Pineda dentro del Máster en Biotecnología y Biomedicina de la Universidad de Jaén durante el curso 2011/2012.

Participación en el Proyecto de Innovación Docente “ *Estímulo del aprendizaje de la asignatura de Fisiología Vegetal mediante la creación de nuevo material docente utilizando la plataforma de Docencia Virtual (PID84B)*” incluido en la III Convocatoria de Proyectos Interdepartamentales por Titulaciones del Plan Innovación Docente, curso 2006-2007 de la Universidad de Jaén.

OTROS MÉRITOS

Miembro de la Sociedad Española de Genética desde 2010

Miembro de la Sociedad Española de Microbiología desde 2013



Correct Assembly of RNA Polymerase II Depends on the Foot Domain and Is Required for Multiple Steps of Transcription in *Saccharomyces cerevisiae*

A. I. Garrido-Godino,^a M. C. García-López,^b F. Navarro^a

Departamento de Biología Experimental, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén, Jaén, Spain^a; Departamento de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Granada, Spain^b

Recent papers have provided insight into the cytoplasmic assembly of RNA polymerase II (RNA pol II) and its transport to the nucleus. However, little is known about the mechanisms governing its nuclear assembly, stability, degradation, and recycling. We demonstrate that the foot of RNA pol II is crucial for the assembly and stability of the complex, by ensuring the correct association of Rpb1 with Rpb6 and of the dimer Rpb4-Rpb7 (Rpb4/7). Mutations at the foot affect the assembly and stability of the enzyme, a defect that is offset by *RPB6* overexpression, in coordination with Rpb1 degradation by an Asr1-independent mechanism. Correct assembly is a prerequisite for the proper maintenance of several transcription steps. In fact, assembly defects alter transcriptional activity and the amount of enzyme associated with the genes, affect C-terminal domain (CTD) phosphorylation, interfere with the mRNA-capping machinery, and possibly increase the amount of stalled RNA pol II. In addition, our data show that TATA-binding protein (TBP) occupancy does not correlate with RNA pol II occupancy or transcriptional activity, suggesting a functional relationship between assembly, Mediator, and preinitiation complex (PIC) stability. Finally, our data help clarify the mechanisms governing the assembly and stability of RNA pol II.

RNA polymerase II (RNA pol II) produces all mRNAs and many noncoding RNAs but contributes less than 10% of the total RNA present in growing cells (1). It consists of 12 protein subunits with a heterodimeric subcomplex of subunits Rpb4 and Rpb7 (Rpb4/7). The catalytic core of the bacterial and eukaryotic enzymes is highly conserved through evolution. However, only five subunits have bacterial homologs (Rpb1, Rpb2, Rpb3, Rpb6, and Rpb11); the others are common to archaea but have no eubacterial homologs (2, 3). The RNA pol II transcription machinery is the most complex of those associated with the three RNA polymerases, with a total of nearly 60 polypeptides, including general transcription factors, coregulators, and specific transcription activators as well as repressors (1).

Many studies have contributed to the knowledge of physical interactions between RNA pol II and transcriptional regulators and have enabled the identification of regions that are important for transcription, from initiation to mRNA export (2, 4–12). In addition, we have recently reported the existence of five “conserved domains,” located at the surface of the structure of the complex, with poor or no conservation in their paralogs in RNA polymerases I (Rpa190 and Rpa135) and III (Rpc160 and Rpc128) and in their homologs in archaea and bacteria and demonstrate that all of them make contact with transcriptional regulators (10).

One of these regions corresponds to the foot domain (2, 10), which, in cooperation with the “lower jaw,” the “assembly” domain, and the “cleft” regions, constitutes the “shelf” module of RNA pol II, which might contribute to the rotation of the DNA as it advances toward the active center (2, 8). This domain, conserved among RNA pol II enzymes from different species, is one of the two regions in the largest subunit that differ the most in sequence among RNA polymerases I, II, and III (10, 13, 14). It should be noted that we and others have identified interactions between the foot and proteins involved in transcription initiation and/or early elongation, such as the regulators Mvp1 and Spo14 and the RNA-

capping enzyme (CE) in *Saccharomyces cerevisiae* (13, 14). Moreover, evidence from manipulating the foot indicates that this domain contributes to specificity in the interaction of the CE with RNA pol II, as opposed to RNA polymerases I and III (14). In addition, some authors have proposed that the *rpo21-4* mutation in the foot of RNA pol II of *S. cerevisiae* affects the assembly or the integrity of RNA pol II (15–17). However, whether this effect on the assembly of the complex is specific to this mutation or it is determined by the domain of the foot of RNA pol II remains to be elucidated.

To determine the consequences of mutating the foot of RNA pol II, we used two different *S. cerevisiae* mutants of this region, *rpb1-84* and *rpo21-4*, and demonstrated that the foot of RNA pol II is essential for maintaining the stability and the assembly of the complex, in coordination with Rpb6 and the dimer Rpb4/7. In fact, both mutants affect the assembly of RNA pol II, leading to the formation of different RNA pol II intermediary subcomplexes and to a decrease in the total amount of RNA pol II, and also of Rpb1, probably as a result of Rpb1 degradation. We also demonstrate that proper assembly is crucial for maintaining correct transcriptional activity, since altering the assembly/integrity of RNA pol II affects the amount of enzyme associated to the genes, probably increases the amount of stalled RNA pol II, affects C-terminal domain (CTD) phosphorylation, and also interferes with the mRNA-capping machinery. In addition, our data show that

Received 6 March 2013 Returned for modification 29 March 2013

Accepted 2 July 2013

Published ahead of print 8 July 2013

Address correspondence to F. Navarro, fngomez@ujaen.es.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/MCB.00262-13

The Prefoldin Bud27 Mediates the Assembly of the Eukaryotic RNA Polymerases in an Rpb5-Dependent Manner

María Carmen Mirón-García¹, Ana Isabel Garrido-Godino¹, Varinia García-Molinero², Francisco Hernández-Torres¹, Susana Rodríguez-Navarro², Francisco Navarro^{1*}

1 Departamento de Biología Experimental, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén, Jaén, Spain, **2** Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), Gene Expression Coupled with RNA Transport Laboratory, Valencia, Spain

Abstract

The unconventional prefoldin URI/RMP, in humans, and its orthologue in yeast, Bud27, have been proposed to participate in the biogenesis of the RNA polymerases. However, this role of Bud27 has not been confirmed and is poorly elucidated. Our data help clarify the mechanisms governing biogenesis of the three eukaryotic RNA pols. We show evidence that Bud27 is the first example of a protein that participates in the biogenesis of the three eukaryotic RNA polymerases and the first example of a protein modulating their assembly instead of their nuclear transport. In addition we demonstrate that the role of Bud27 in RNA pols biogenesis depends on Rpb5. In fact, lack of *BUD27* affects growth and leads to a substantial accumulation of the three RNA polymerases in the cytoplasm, defects offset by the overexpression of *RPB5*. Supporting this, our data demonstrate that the lack of Bud27 affects the correct assembly of Rpb5 and Rpb6 to the three RNA polymerases, suggesting that this process occurs in the cytoplasm and is a required step prior to nuclear import. Also, our data support the view that Rpb5 and Rpb6 assemble somewhat later than the rest of the complexes. Furthermore, Bud27 Rpb5-binding but not PFD-binding domain is necessary for RNA polymerases biogenesis. In agreement, we also demonstrate genetic interactions between *BUD27*, *RPB5*, and *RPB6*. Bud27 shuttles between the nucleus and the cytoplasm in an Xpo1-independent manner, and also independently of microtubule polarization and possibly independently of its association with the RNA pols. Our data also suggest that the role of Bud27 in RNA pols biogenesis is independent of the chaperone prefoldin (PFD) complex and of Iwr1. Finally, the role of URI seems to be conserved in humans, suggesting conserved mechanisms in RNA pols biogenesis.

Citation: Mirón-García MC, Garrido-Godino AI, García-Molinero V, Hernández-Torres F, Rodríguez-Navarro S, et al. (2013) The Prefoldin Bud27 Mediates the Assembly of the Eukaryotic RNA Polymerases in an Rpb5-Dependent Manner. *PLoS Genet* 9(2): e1003297. doi:10.1371/journal.pgen.1003297

Editor: Gregory P. Copenhaver, The University of North Carolina at Chapel Hill, United States of America

Received: July 18, 2012; **Accepted:** December 18, 2012; **Published:** February 14, 2013

Copyright: © 2013 Mirón-García et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Education and Science, Ministry of Science and Innovation, and FEDER (BFU2010-21975-C03-02 Spain; <http://www.idi.mineco.gob.es/portal/site/MICINN/>) to FN and SR-N (BFU2011-23418; <http://www.idi.mineco.gob.es/portal/site/MICINN/>) and from Junta de Andalucía (BIO258, P10-CVI6521, P08-CVI-03508; <http://www.juntadeandalucia.es/organismos/economiainnovacioncienciayempleo.html>) to FN. AIG-G and VG-M are recipients of predoctoral fellowships from MEC, and FH-T of postdoctoral fellowships from Junta de Andalucía. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: fngomez@ujaen.es

Introduction

Eukaryotic RNA polymerases are a family of multimeric enzymes, RNA pol I, II, and III, responsible for the specific synthesis of different RNAs. RNA pol I is specialized in the synthesis of the pre-rRNA precursor of the three largest rRNA and typically account for about 75% of the entire transcription output in fast-growing yeast cells. RNA pol III transcribes mostly tRNAs and 5S rRNA, together with several short non-translated RNAs, while transcription corresponds to about 15% of the total RNA. RNA pol II, the enzyme that produces all mRNAs and many non-coding ones, transcribes most of the nuclear genome but nevertheless contributes to less than 10% of total RNA in growing cells. RNA pol I, II, and III are composed of 14, 12, and 17 subunits respectively, with a catalytic core formed by the two largest subunits highly conserved through evolution and five common subunits to the three enzymes [1–3]. Despite intensive studies concerning the structure and the transcriptional regulation

of the three RNA polymerases [4,5], little is known about the mechanisms governing their assembly and their nuclear import.

Noteworthy findings in both human and yeast demonstrate the participation of different proteins in the transport of the RNA pol II to the nucleus, Iwr1 and Npa3 in yeast, and GPN1 (RPAP4) and GPN3 in humans [6–10]. It has also been suggested that RPAP2 plays a role in import on the basis that it is cytoplasmic, binds fully assembled enzyme and shuttles in a CRM1-dependent manner [11]. However, no data concerning proteins involved in the nuclear transport of the RNA pol I or III are available. In addition, proteomic analysis in humans cells seek to decipher the mechanisms of RNA pol II biogenesis and assembly identifying a number of polymerase-associated factors. Among these, HSP90 and its R2TP/Prefoldin-like chaperone, including hSpagh (RPAP3), are clearly involved in these processes [8,12].

In humans, R2TP/Prefoldin-like complex contains Rpb5, a common subunit to the three eukaryotic RNA polymerases [2], as well as the unconventional prefoldin Rpb5 interactor (URI/RMP),

The Conserved Foot Domain of RNA Pol II Associates with Proteins Involved in Transcriptional Initiation and/or Early Elongation

M. Carmen García-López,* Vicent Pelechano,^{†,§} M. Carmen Mirón-García,* Ana I. Garrido-Godino,*

Alicia García,** Olga Calvo,** Michel Werner,[‡] José E. Pérez-Ortín,[†] and Francisco Navarro*¹

^{*}Departamento de Biología Experimental, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén, 23071 Jaén, Spain, [†]Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universitat de València, E46100 Burjassot, Spain, [‡]Commissariat a la Énergie Atomique, iBiTec-S, Service de Biologie Intégrative et Génétique Moléculaire, F-91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France, [§]Department of Genome Biology, EMBL, D-69117 Heidelberg, Germany, and ^{**}Instituto de Biología Funcional y Genómica, Consejo Superior de Investigaciones Científicas/Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, Salamanca 37007, Spain

ABSTRACT RNA polymerase (pol) II establishes many protein–protein interactions with transcriptional regulators to coordinate different steps of transcription. Although some of these interactions have been well described, little is known about the existence of RNA pol II regions involved in contact with transcriptional regulators. We hypothesize that conserved regions on the surface of RNA pol II contact transcriptional regulators. We identified such an RNA pol II conserved region that includes the majority of the “foot” domain and identified interactions of this region with Mvp1, a protein required for sorting proteins to the vacuole, and Spo14, a phospholipase D. Deletion of *MVP1* and *SPO14* affects the transcription of their target genes and increases phosphorylation of Ser5 in the carboxy-terminal domain (CTD). Genetic, phenotypic, and functional analyses point to a role for these proteins in transcriptional initiation and/or early elongation, consistent with their genetic interactions with *CEG1*, a guanylyltransferase subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* capping enzyme.

In eukaryotes as in archaea, bacteria, chloroplasts, some mitochondria, and nucleocytoplasmic DNA viruses, transcription is ensured by heteromultimeric DNA-dependent RNA polymerases (Thuriaux and Sentenac 1992; Vassilyev *et al.* 2002; Werner and Weinzierl 2002; Iyer *et al.* 2006). RNA polymerase II (RNA pol II) produces all mRNAs and many noncoding RNAs. Although it transcribes most of the nuclear genome, it contributes <10% of the total RNA present in growing cells (Hahn 2004). To transcribe a gene, RNA pol II requires the action of general transcription factors, coregulators, specific transcription activators, and repressors. In fact, the RNA pol II transcription machinery is the most complex of those associated with the three RNA polymerases, with a total of nearly 60 polypeptides (Hahn 2004).

Knowledge of both the architecture making up this complex and the function of its different parts is essential to understand their role in the different transcription steps (Cramer 2006; Zaros *et al.* 2007; Venter and Pugh 2009). Structural data gathered over the last few years on *Saccharomyces cerevisiae* RNA pol II have provided a detailed map of the physical interactions between the different subunits, establishing regions that are important for transcription (Cramer *et al.* 2001; Bushnell *et al.* 2002; Armache *et al.* 2003; Meyer *et al.* 2009). Notably, recent work has contributed to the understanding of how RNA pol II amino acid regions or subunits are involved in the contact with transcriptional regulators such as TFIIS, TFIIB, TFIIE, TFIIIF, or Mediator, among others, although the data are sometimes imprecise or controversial (Guglielmi *et al.* 2004; Chadick and Asturias 2005; Chen *et al.* 2007; Meyer *et al.* 2009; Kostrewa *et al.* 2009).

A major question that remains unexplored is the identification of domains of RNA pol II that could be involved in the interaction with elements of the transcriptional machinery and that could participate in coordinating with them.

Copyright © 2011 by the Genetics Society of America

doi: 10.1534/genetics.111.133215

Manuscript received July 25, 2011; accepted for publication September 19, 2011

Supporting information is available online at <http://www.genetics.org/content/suppl/2011/09/27/genetics.111.133215.DC1>.

¹Corresponding author: Departamento de Biología Experimental, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén, Paraje de las Lagunillas, s/n, 23071 Jaén, Spain. E-mail: fngomez@ujen.es

Overexpression of *SNG1* causes 6-azauracil resistance in *Saccharomyces cerevisiae*

Ma Carmen García-López · Ma Carmen Mirón-García ·
Ana I. Garrido-Godino · Carlos Mingorance ·
Francisco Navarro

Received: 21 December 2009 / Revised: 4 March 2010 / Accepted: 14 March 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract The mechanism of action of 6AU, a growth inhibitor for many microorganisms causing depletion of intracellular nucleotide pools of GTP and UTP, is not well understood. To gain insight into the mechanisms leading to 6AU resistance, and in an attempt to uncover novel genes required for this resistance, we undertook a high-copy-number suppressor screening to identify genes whose overexpression could repair the 6AU^S growth defect caused by *rpb1* mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. We have identified *SNG1* as a multicopy suppressor of the 6AU^S growth defect caused by the *S. cerevisiae* *rpb1* mutant. The mechanism by which *Sng1* causes 6AU resistance is independent of the transcriptional elongation and of the nucleotide-pool regulation through *Imd2* and *Ura2*, as well as of the *Ssm1*-mediated 6AU detoxification. This resistance to 6AU is not extended to other uracil analogues, such as 5-fluorouracil, 5FU. In addition, our results suggest that 6AU enters *S. cerevisiae* cells through the uracil permease *Fur4*. Our results demonstrate that *Sng1* is localised in the plasma membrane and evidence *SNG1* and *FUR4* genes as determinants of resistance and susceptibility to this inhibitory compound, respectively. Taken together, these results show new mechanisms involved in the resistance and susceptibility to 6AU.

Keywords 6-azauracil · *Fur4* · Plasma membrane · Transcription

Introduction

The mechanism of action of 6AU is not well understood, although it has been widely considered to be diagnostic for proteins involved in transcription elongation, and large-scale screening have identified processes unrelated to transcription participating in 6AU metabolism. Then, to look for new elements involved in resistance and susceptibility to this inhibitory compound could help us to understand how this drug acts in the cell.

6-Azauracil (6AU) is a well-known growth inhibitor for many microorganisms including yeast. 6AU competes with substrates in the pyrimidine biosynthetic pathway, being transformed into 6-aza-UMP, a powerful competitive inhibitor of orotidylic acid decarboxylase (Exinger and Lacroute 1992).

6AU causes changes in the nucleoside pools, lowering GTP levels by inhibiting IMP dehydrogenase (*Imd2*), which participates in the first step of the GMP anabolic pathway, as well as in the UTP levels (Kimura et al. 1997; Kim et al. 1997). Yeast cells respond to changes in the pools of nucleosides caused by 6AU by inducing the corresponding *IMD2/PUR5* (Riles et al. 2004) and *URA2* gene, encoding the rate-limiting enzyme of UTP biosynthesis, which is transcriptionally activated by UTP shortage, via the effective progression of RNA polymerase II beyond the *URA2* mRNA start site(s) (Kwapisz et al. 2008). In addition, yeast cells induce the *SSM1* gene coding for the pyrimidine nucleotidase *Ssm1/Sdt1* required for detoxification of 6AU (Nakanishi and Sekimizu 2002; Shimoaraiso et al. 2000). However, some mutants that are

Communicated by K. Kuchler.

M. C. García-López and M. C. Mirón-García have contributed equally to this work.

M. C. García-López · M. C. Mirón-García ·
A. I. Garrido-Godino · C. Mingorance · F. Navarro (✉)
Departamento de Biología Experimental, Facultad de Ciencias
Experimentales, Universidad de Jaén, Paraje de las Lagunillas,
s/n, 23071 Jaén, Spain
e-mail: fngomez@ujaen.es

Published online: 28 April 2010

 Springer