

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA
MOL·LECULAR

INTERACCIONES ENTRE ACTIVADORES Y REPRESORES
EN EL INICIO DE LA TRANSCRIPCIÓN EN
SACCHAROMYCES CEREVISIAE.

LORENA PEIRÓ CHOVA

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2010

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 4 de juny de 2010 davant un tribunal format per:

- Dr. Fernando Moreno Sanz
- Dr. Francisco Navarro Gómez
- Dra. Olga M. Calvo García
- Dra. Susana Rodríguez Navarro
- Dr. José Enrique Pérez Ortín

Va ser dirigida per:

Dr. Francisco Estruch Ros

©Copyright: Servei de Publicacions
Lorena Peiró Chova

Dipòsit legal: V-3493-2011

I.S.B.N.: 978-84-370-7943-1

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

**Interacciones entre Activadores y
Represores en el Inicio de la Transcripción
en *Saccharomyces cerevisiae*.**

Memoria presentada por
Lorena Peiró Chova
para optar al grado de Doctor
por la Universitat de València.

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

CERTIFICA que Lorena Peiró Chova, Licenciada en Bioquímica por la Universitat de València, ha realizado bajo su dirección el trabajo que con el título “Interacciones entre Activadores y Represores en el Inicio de la Transcripción en *Saccharomyces cerevisiae*” presenta para optar al grado de Doctor por la Universitat de València.

Burjassot, abril de 2010

Dr. Francisco Estruch Ros.

Son tantas las personas a las que debo agradecer su apoyo que no sé por dónde empezar...

Empezaré dando las gracias a mi Director de Tesis, Paco, por haberme iniciado en el mundo de la investigación, por todo lo que he aprendido a su lado, por estar siempre dispuesto a ayudarme y a resolver mis dudas y, sobre todo, por haber hecho posible que disfrutara tanto de esta etapa de mi vida. Por todo ello, infinitas gracias.

También quiero dar las gracias a todo el profesorado y compañeros del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, porque de un modo u otro, han colaborado en mi formación, me han echado una mano cuando lo he necesitado y han hecho posible que me sintiera muy a gusto en mi lugar de trabajo. No me quiero olvidar de la gente del CIPF, gracias a Pau y a Susana, por su ayuda experimental, y a Anita, por su amistad y porque fue un placer empezar con ella este largo camino de Tesis.

Quiero dar las gracias con especial cariño a mis compañeros y grandes amigos de la universidad: a Laura, por nuestros años de convivencia y por su incansable apoyo y ayuda; a Irene, Ana y Raúl por la amistad que nos une y por estar siempre a mi lado; a Manolo, Raquel, Silvia y Carlos, por todos los buenos momentos de estos últimos años; a Natalia, que sin duda es la mejor compañera de laboratorio que se puede desear, por los favores, por su apoyo y por su amistad; y a mis grandes amigas y veteranas compañeras, María, Inma y Elena, por su ayuda, por los incontables buenos momentos vividos, por darme ánimos y por hacer que este largo camino de Tesis haya sido un auténtico placer a su lado: gracias, chicas, por estar siempre ahí. Tampoco quiero olvidarme de dar las gracias a Jordi, Elena Z. y María O., que fueron compañeros y ahora, buenos amigos. Gracias también a la pequeña Laia, que ha sido una de las últimas alegrías compartidas.

Gracias también a Irene B., Pedro, Pepo, David, Salva, Teresa, Hilaria, Francesc, Minerva, Ana C., Vero, Mari, Fran, Belén, Bruno, Jorge, Vane, Silvana, Jose, Fabián y Carme, por los buenos momentos compartidos.

Gracias a mis amigos de Gandía, Mar, Juanjo y Charo, por ser esos amigos especiales que nunca me fallan y que están siempre a mi lado cuando los necesito.

Quiero agradecer con un cariño muy especial el apoyo de José Luís y su familia. Gracias a Maruja, Pepe Luís, M^a José y Fajardo, por todos los buenos ratos compartidos y por su cariño, y a Adrià, por la alegría que me transmite. Gracias especialmente a José Luís, por su paciencia, por su ayuda, por su cariño, por darme seguridad, por apoyarme en todas mis decisiones, por animarme, por cuidarme, por alegrarme la vida y por hacerme sentir tan bien. Por todo ello, y por muchas más cosas, mil gracias.

Terminaré dando las gracias a mi familia, sin duda los grandes pilares de mi vida. Gracias a Mónica y a mi hermano Jose, por su cariño constante, por quererme tanto y por preocuparse por mí, a pesar de la distancia que nos separa. Gracias a mi abuela, por seguir a mi lado, y gracias a mis tíos Fina y Eliseo, por su cariño. Y finalmente, no existen las palabras adecuadas para expresar mi gratitud a mis padres, esos grandes sufridores que viven de cerca todas mis alegrías y todas mis penas. Gracias por vuestra paciencia, por el inmenso cariño que recibo de vosotros cada día, por vuestros sabios consejos, por la libertad que me habéis permitido siempre, por ayudarme y apoyarme en todas mis decisiones, por animarme en momentos difíciles, por cuidarme tanto y por llenarme de felicidad. Sin vosotros, nada de esto hubiera sido posible. Gracias por todo.

A mi familia

Principales abreviaturas utilizadas.

A: adenina

ADP: adenosín difosfato

AT: 3-aminotriazol

ATP: adenosín trifosfato

C: citosina

cdk: quinasa dependiente de ciclina

cDNA: *complementary DNA*

ChrIP: *chromatin immunoprecipitation* (inmunoprecipitación de cromatina)

CTD: *carboxy-terminal domain* (dominio carboxilo terminal)

C-terminal: carboxilo terminal

Cy3: *cyanine Dye 3* (fluoróforo)

DAPI: diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol

dCTP: desoxicitosina trifosfato

def. Pi: deficiente en fosfato inorgánico

DIC: *differential interference contrast* (contraste por interferencia diferencial)

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato

dpm: desintegraciones por minuto

DTT: 1,4-ditiotreitol

EDTA: ácido etileno diamino tetra-acético

FOA: ácido 5'-fluoro-orótico

G: guanina

GFP: *green fluorescent protein* (proteína verde fluorescente)

GLAM: *gene length-dependent accumulation of mRNA* (acumulación de mRNA dependiente de la longitud génica)

GTFs: *general transcription factors* (factores generales de transcripción)

HA: hemaglutinina

HAT: histona acetiltransferasa
IgG: inmunoglobulina G
IP: inmunoprecipitado
KDa: kilodalton
LB: medio *Luria-Bertani*
MDa: megadalton
min: minutos
mRNA: RNA mensajero
mRNP: *messenger ribonucleoprotein particle* (partícula ribonucleoproteica de RNA mensajero)
NC2: *negative cofactor 2* (cofactor negativo 2)
NES: *nuclear export sequence* (secuencia de exportación nuclear)
NLS: *nuclear localization sequence* (secuencia de localización nuclear)
NPC: *nuclear pore complex* (complejo de poro nuclear)
NP40: nonidet P40
N-terminal: amino terminal
OD₆₀₀: *optical density* (densidad óptica a 600nm)
ORF: *open reading frame* (pauta abierta de lectura)
PCR: *polymerase chain reaction* (reacción en cadena de la polimerasa)
PEG: polietilenglicol
Pi: fosfato inorgánico
PIC: *pre-initiation complex* (complejo pre-inicio)
PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo
poli(A)⁺: poliadenilado
p/v: peso/volumen
PVP: polivinil pirrolidona
RNA: ácido ribonucleico
RNA pol : RNA polimerasa
RNP: *ribonucleoprotein particle* (partícula ribonucleoproteica)
rpm: revoluciones por minuto

rRNA: RNA ribosómico

SAGA: *Spt/Ada/Gcn5 acetyltransferase*

SC: *synthetic complete medium* (medio mínimo completo)

SCSIE: *Servei Central de Suport a la Investigació Experimental*

SDS: dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS

Ser-2P: fosforilación en serina 2

Ser-5P: fosforilación en serina 5

SM: sulfometurón metil

snd: *suppressors of NC2 depletion* (supresores de la depleción de NC2)

SPM: *sporulation medium* (medio de esporulación)

T: timina

Tafs: *TBP associated factors* (factores asociados a TBP)

TAP: *Tandem Affinity Purification*

TBP: *TATA binding protein* (proteína de unión a la caja TATA)

TCA: ácido tricloroacético

TEMED: N, N, N', N', tetrametiletileno-diamino

TF: *Transcriptional Factor* (factor de transcripción)

Tris: Tris (hidroximetil) aminometano

UAS: *upstream activating sequence* (secuencia de activación aguas arriba)

URS: *upstream repressing sequence* (secuencia de represión aguas arriba)

UTR: *untranslated region* (región no traducida)

UV: ultravioleta

v/v: volumen/volumen

WB: *Western blot*

YPA: *yeast extract peptone acetate medium*

YPD: *yeast extract peptone dextrose medium* (medio rico con extracto de levadura, bactopectona y glucosa)

YPGal: *yeast extract peptone galactose médium* (medio rico con extracto de levadura, bactopectona y galactosa)

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Las RNA polimerasas eucariotas.....	2
1.1.1.- La subunidad Rpb2p de la RNA pol II.....	5
1.2.- Inicio de la transcripción de la RNA pol II.....	6
1.2.1.- Estructura del promotor de los genes transcritos por la RNA pol II.....	7
1.2.2.- Los factores generales de transcripción: GTFs.....	8
1.2.3.- La TATA <i>binding protein</i> (TBP) y los factores transcripcionales Mot1p y NC2.....	11
1.3.- El complejo pre-inicio (PIC).....	15
1.3.1.- Ensamblaje del PIC.....	15
1.3.2.- El Mediador.....	19
1.4.- Regulación de la transcripción.....	22
1.4.1.- Reguladores gen-específicos y coreguladores.....	22
1.4.2.- Regulación de los genes <i>GAL</i> , <i>PHO</i> y <i>SUC2</i>	25
1.5.- La exportación de mRNAs.....	30
1.6.- Acoplamiento entre las diferentes etapas de la expresión génica.....	31
Objetivos.....	33

2.- MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

2.1.- Anticuerpos.....	35
2.2.- Kits comerciales.....	35
2.3.- Oligonucleótidos.....	36
2.4.- Plásmidos.....	39
2.5.- Cepas.....	45
2.5.1.- Cepas de <i>E. coli</i>	45

2.5.2.- Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45
MÉTODOS	
2.6.- Medios de cultivo y ensayos de crecimiento.....	54
2.6.1.- Bacterias.....	54
2.6.2.- Levaduras.....	54
2.7.- Métodos de manipulación de microorganismos.....	57
2.7.1.- Transformación de <i>E. coli</i>	57
2.7.2.- Transformación de levadura.....	57
2.7.3.- Deleción de genes, etiquetado de proteínas y sustitución de promotores.....	58
2.7.4.- Obtención de diploides y disección de tétradas.....	59
2.7.5.- Rastros genómicos.....	60
2.7.5.1.- Rastreo genómico de supresión en multicopia.....	60
2.7.5.2.- Rastreo genómico de mutaciones supresoras por inserción de transposones.....	60
2.8.- Métodos de manipulación y análisis de ácidos nucleicos.....	61
2.8.1.- Aislamiento de DNA y RNA.....	61
2.8.1.1.- Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	61
2.8.1.2.- Aislamiento de DNA genómico de levadura.....	61
2.8.1.3.- Aislamiento de RNA.....	61
2.8.2.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y transcripción reversa (RT).....	62
2.8.2.1.- PCR.....	62
2.8.2.2.- RT (Transcripción Reversa o síntesis de cDNA).....	63
2.8.2.3.- qRT-PCR semicuantitativa.....	63
2.8.2.4.- RT-PCR cuantitativa (<i>Real Time</i> -PCR).....	64
2.8.3.- Otras técnicas de DNA recombinante. Digestiones y ligaciones.....	64
2.8.4.- Separación de ácidos nucleicos por electroforesis.....	64

2.8.4.1.- Electroforesis de fragmentos de DNA en geles de agarosa.....	64
2.8.4.2.- Electroforesis de RNA en geles de agarosa.....	65
2.9.- Técnicas radiactivas.....	65
2.9.1.- <i>Northern blot</i> . Marcaje de sondas de DNA con [α - 32 P] dCTP.....	65
2.9.2.- Análisis transcripcional a nivel genómico. Chips de DNA..	66
2.9.3.- Ensayo de accesibilidad al sitio de restricción de la endonucleasa <i>ClaI</i> situado en el promotor del gen <i>PHO5</i>	68
2.9.4.- Autorradiografía.....	70
2.9.5.- Lavado de membranas para la eliminación de las sondas...	70
2.10.- Métodos de manipulación y análisis de proteínas.....	70
2.10.1.- Obtención de extractos proteicos y cuantificación de proteínas.....	70
2.10.2.- Análisis por <i>Western blot</i>	71
2.10.3.- Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).....	72
2.11.- Ensayos de actividades enzimáticas.....	73
2.11.1.- Ensayo de actividad β -galactosidasa.....	73
2.11.2.- Ensayo de actividad fosfatasa ácida y cálculo de cocientes GLAM.....	73
2.12.- Técnicas microscópicas.....	74
2.12.1.- Localización <i>in vivo</i> de proteínas.....	74
2.12.2.- Tinción de núcleos.....	75
2.12.3.- Hibridación <i>in situ</i> de mRNA.....	75
2.13.- Medida del consumo celular de oxígeno.....	77
2.14.- Técnicas bioinformáticas.....	77
2.14.1.- Análisis de imagen y normalización de los Chips de DNA.....	77
2.14.2.- Análisis bioinformático de los resultados.....	78

RESULTADOS

3.- La sobre-expresión de un alelo truncado del gen *RPB2* suprime los defectos en el crecimiento y en la exportación de mRNAs del mutante *dbp5-2*, así como los defectos causados por la depleción del factor transcripcional NC2.

3.1.- La sobre-expresión de un alelo truncado de la subunidad *RPB2* de la RNA pol II suprime la letalidad sintética entre las mutaciones *dbp5-2* y *bur6-1*..... 81

3.2.- Efecto de la sobre-expresión de alelos truncados de *RPB2* y de *RPB1* y de la depleción de diferentes subunidades de la RNA pol II sobre el crecimiento del mutante *dbp5-2*..... 83

3.3.- La sobre-expresión de *rpb2t* mejora la exportación de mRNAs. 87

3.4.- Efecto de la sobre-expresión de *rpb2t* sobre la mutación en los componentes del factor transcripcional NC2..... 89

3.5.- La sobre-expresión de *rpb2t* compensa parcialmente los defectos transcripcionales causados por la actividad reducida de NC2..... 92

3.6.- Los defectos en el crecimiento causados por depleción de NC2 pueden suprimirse por sobre-expresión de diferentes truncaciones del gen *RPB2*..... 94

3.7.- La supresión del defecto en NC2 por sobre-expresión de *rpb2t* no se debe al secuestro de Rpb9p, Rpb12p o Sin4p por la sobre-expresión de la proteína truncada..... 96

4.- Identificación y caracterización de mutaciones supresoras de la deficiencia en NC2.

4.1.- Identificación de mutantes capaces de suprimir el defecto en el crecimiento causado por deficiencias en NC2..... 98

4.2.- La supresión de NC2 por parte de los mutantes *snd* no es consecuencia de la expresión constitutiva del promotor *GALI*..... 100

4.3.- La depleción de Nut2p suprime los defectos en el crecimiento de los mutantes en los componentes del factor NC2.....	102
4.4.- Las mutaciones <i>snd</i> permiten el crecimiento en ausencia de Bur6p e Ydr1p.....	104
4.5.- Diferentes mutaciones en subunidades del Mediador suprimen defectos en NC2.....	106
4.6.- Efecto de la depleción de NC2 y de mutaciones en componentes del Mediador sobre la activación transcripcional.....	108
4.7.- La depleción de diferentes subunidades de la RNA pol II suprime los defectos en NC2.....	112
4.8.- Mutaciones en TFIIH y TFIIB, pero no en componentes de SAGA y TFIID, suprimen defectos en NC2.....	114
5.- Identificación y caracterización del gen <i>IWR1</i> .	
5.1.- Mutaciones en el gen <i>IWR1</i> suprimen la deficiencia del factor transcripcional NC2.....	118
5.2.- La delección de <i>IWR1</i> compensa parcialmente los defectos transcripcionales causados por la actividad reducida de NC2.....	121
5.3.- Efectos transcripcionales causados por la delección de <i>IWR1</i>	123
5.4.- Caracterización fenotípica del mutante <i>Δiwr1</i>	127
5.5.- Actividad transcripcional de la fusión LexA-Iwr1p.....	130
5.6.- El mutante <i>Δiwr1</i> no presenta defectos en la elongación transcripcional.....	131
5.7.- La proteína Iwr1p se mueve entre el núcleo y el citoplasma de manera dependiente de la exportina Xpo1p.....	134
6. Estudio de la función de Iwr1p en la expresión génica.	
6.1.- La proteína Iwr1p es necesaria para la transcripción basal pero no para la inducción de los genes <i>ARG1</i> y <i>ATP16</i>	137
6.2.- La proteína Iwr1p está involucrada en la expresión del gen <i>SUC2</i>	138

6.3.- Los defectos en la inducción del gen <i>SUC2</i> en el mutante <i>Δiwr1</i> se suprimen en ausencia de la variante de histona H2A.Z.....	140
6.4.- La mutación <i>Δiwr1</i> afecta la inducción del gen <i>GAL1</i> pero no la de <i>HSP26</i>	142
6.5.- La proteína Iwr1p se requiere para la inducción de los genes del metabolismo del fosfato.....	144
6.6.- El requerimiento de la proteína Iwr1p para la inducción del gen <i>PHO5</i> depende de las condiciones de inducción.....	148
6.7.- La ausencia de Iwr1p altera la remodelación de la cromatina en el promotor del gen <i>PHO5</i>	150
6.8.- La proteína Iwr1p no se detectó asociada a la cromatina de los promotores de los genes <i>PHO5</i> , <i>SUC2</i> ni <i>ARG1</i>	153
6.9.-Análisis de los efectos de la translocación núcleo-citoplasma en la función transcripcional de la proteína Iwr1p.....	156
6.9.1.- Efecto de la delección de la secuencia NES en el crecimiento celular y en la inducción de la actividad fosfatasa ácida.....	156
6.9.2.- Análisis transcripcional del mutante <i>IWRI(ΔNES)</i>	157
7.- DISCUSIÓN.....	159
8.- CONCLUSIONES.....	178
9.- BIBLIOGRAFÍA.....	181
Anexo.....	202

1.- INTRODUCCIÓN

El material genético de una célula eucariota se halla confinado en el núcleo y está delimitado por una envoltura nuclear, perforada a intervalos por los complejos de poro nucleares (NPCs) a través de los cuales se produce el transporte de moléculas entre el núcleo y el citoplasma. Esta compartimentalización asegura la presencia de ambientes especializados para las diferentes etapas del proceso de expresión génica.

Los cambios en la expresión génica son esenciales para la respuesta celular a la diversidad de señales que regulan el metabolismo, el crecimiento celular, la diferenciación y el desarrollo. Diferentes grupos de genes se inducen en estadios del desarrollo concretos o tras cambios ambientales y su transcripción, además de iniciarse en el momento adecuado, debe de estar coordinada con la de los otros genes. Para ello, la célula ha desarrollado mecanismos que controlan la expresión génica a diferentes niveles. En este trabajo se ha tratado de contribuir al estudio de la regulación que ocurre durante el inicio de la transcripción.

Para estos estudios se ha elegido la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, un organismo que por su sencillez, facilidad de manipulación y alto grado de conocimiento es un modelo para elucidar los complejos mecanismos moleculares que controlan la expresión génica en las células eucariotas.

1.1.- Las RNA polimerasas eucariotas.

Hasta la fecha, se han identificado cuatro RNA polimerasas (RNA pol) nucleares en eucariotas superiores. Las RNA pol I, II y III fueron inicialmente identificadas por Roeder y Rutter en 1969. La RNA pol I se encarga principalmente de la transcripción de los rRNAs 18S y 28S; la RNA pol II transcribe los RNAs codificantes de proteínas y algunos RNAs nucleares pequeños y la RNA pol III es la responsable de la síntesis del rRNA 5S, así como de los tRNAs y algunos RNAs de pequeño tamaño. La

cuarta RNA pol, la RNA pol IV, ha sido identificada recientemente en plantas. La RNA pol IV no parece ser esencial para la viabilidad y muestra propiedades únicas no compartidas por las otras RNA polimerasas (Herr *et al.*, 2005; Kanno *et al.*, 2005; Onodera *et al.*, 2005). Otra RNA pol nuclear, llamada spRNAP-IV, se expresa a partir de un transcrito producido por corte-empalme alternativo del gen de la RNA pol mitocondrial y es la responsable de la transcripción de algunos mRNAs en células humanas y de ratón (Kravchenko *et al.*, 2005).

Todas las RNA pol eucarióticas tienen en común su incapacidad para reconocer, por sí solas, la secuencia específica que determina el inicio de la transcripción. Por tanto, es necesaria la participación de otras proteínas para formar un complejo RNA pol competente para iniciar la transcripción, el llamado “complejo pre-inicio” (PIC) (revisado en Thomas y Chiang, 2006).

La RNA pol II (Figura 1.1) está formada por doce subunidades, tanto en humanos como en levaduras, altamente conservadas en secuencia, en arquitectura y en función. A estas subunidades se les ha denominado, por orden decreciente en cuanto a masa molecular, desde Rpb1p hasta Rpb12p (Young, 1991). De las doce subunidades, cinco están presentes en las tres RNA pol eucarióticas (Rpb5p, Rpb6p, Rpb8p, Rpb10p y Rpb12p); cuatro presentan homología de secuencia con otras de la RNA pol I y III (Rpb1p, Rpb2p, Rpb3p y Rpb11p) y solamente las subunidades Rpb4p, Rpb7p, Rpb9p y el dominio carboxilo-terminal (CTD) de Rpb1p son exclusivos de la RNA pol II (revisado en Thomas y Chiang, 2006). Las subunidades Rpb4p y Rpb7p forman un heterodímero necesario para la formación del PIC y para el inicio de la transcripción, pero prescindible en la RNA pol II elongante (revisado en Hampsey, 1998; Lee y Young, 2000; Cramer, 2004, Hahn, 2004). Este heterodímero, Rpb4/7p, también participa en procesos tan diversos como son: la respuesta a estrés, la exportación de mRNAs y el mecanismo de reparación acoplado a la transcripción (revisado en Sampath y Sadhale, 2005). Rpb3p parece estar implicada en el ensamblaje de la RNA

pol II, mientras que las subunidades Rpb1p, Rpb2p y Rpb9p parecen estar implicadas en el reconocimiento del sitio de inicio transcripcional (revisado en Hampsey, 1998). Rpb9p también participa en el mantenimiento de la fidelidad transcripcional a través de diferentes vías: potenciando la capacidad del factor de elongación TFIIS para estimular la actividad 3'-nucleasa de la RNA pol II (Koyama *et al.*, 2007) y a través de otro(s) mecanismo(s) independientes de TFIIS (Nesser *et al.*, 2006; Walmacq *et al.*, 2009). Rpb9p desempeña, además, un papel importante en la ubiquitilación y degradación de Rpb1p en respuesta a radiación ultravioleta (Chen *et al.*, 2007). Las subunidades Rpb1p y Rpb2p conforman el sitio activo de la enzima y forman una hendidura central en la estructura de la RNA pol II por la que entra el ácido nucleico (Cramer *et al.*, 2000; Bushnell y Kornberg, 2003; Armache *et al.*, 2003). Las diez subunidades restantes rodean a las dos subunidades mayores, de manera que proporcionan soporte estructural a la RNA pol II y regulan su actividad enzimática.

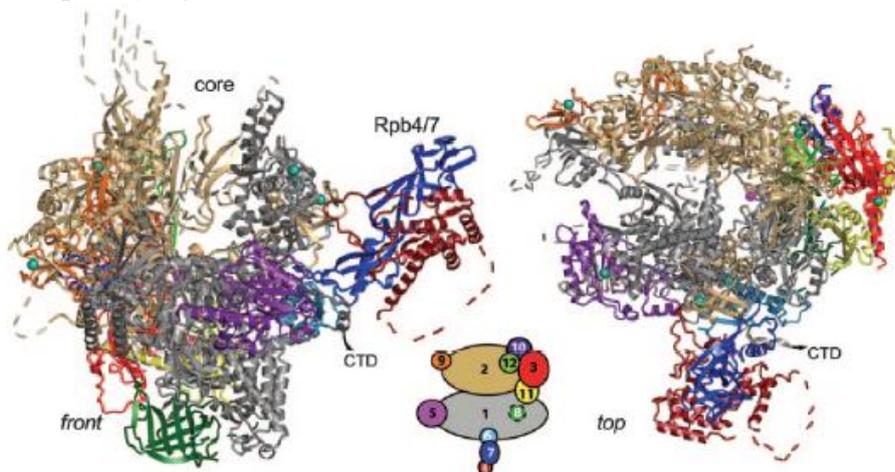


Figura 1.1: Estructura completa de la RNA pol II vista de frente (*front*) y desde arriba (*top*). En la parte central de la figura se muestra un diagrama de interacción entre las distintas subunidades que componen la RNA pol II y el código de colores permite diferenciar las distintas subunidades de la estructura que se representa. Las esferas azules representan los iones Zn²⁺ y la esfera rosa representa el ion Mg²⁺ del centro activo. (Imagen tomada de Armache *et al.*, 2005).

1.1.1.- La subunidad Rpb2p de la RNA pol II.

El gen *RPB2* de *Saccharomyces cerevisiae* se localiza en el cromosoma XV. Es un gen esencial y codifica la segunda subunidad mayor de la RNA pol II. La proteína Rpb2p consta de 1224 aminoácidos y cuenta con una masa molecular de aproximadamente 139 KDa. Forma, junto con la subunidad Rpb1p, el núcleo central de la RNA pol II y es similar a la subunidad β bacteriana.

Como se observa en la Figura 1.2, la región N-terminal de la subunidad Rpb2p forma parte de los dominios de la RNA pol II conocidos como “protusión” y “lóbulo”, e incluye regiones de interacción con Rpb12p y Rpb9p (Cramer *et al.*, 2001). Por otro lado, TFIIB contacta con la hendidura central de la RNA pol II y con el dominio “pared” de Rpb2p, mientras que el dominio de dimerización de TFIIF contacta con los dominios “lóbulo” y “protusión” de Rpb2p. Mutaciones en los dominios “lóbulo” y “protusión” de la RNA pol II alteran la unión de TFIIF, afectando al reconocimiento del sitio de inicio, fenotipo asociado a mutaciones en TFIIF, Rpb9p y TFIIB (Chen *et al.*, 2007). En trabajos anteriores ya se habían descrito interacciones funcionales entre TFIIB y Rpb2p con implicaciones sobre el mecanismo de selección del sitio de inicio transcripcional (Chen y Hampsey, 2004).

Rpb2p desempeña múltiples funciones durante la elongación transcripcional, por lo que se ha descrito como factor de elongación (Cramer *et al.*, 2000; Cui y Denis, 2003). Se han detectado también interacciones funcionales entre Rpb2p y Ssu72p (*suppressor of SUA7, gene 2*) (Pappas y Hampsey, 2000). *SSU72* es un gen esencial, evolutivamente conservado, que también interacciona con TFIIB, con actividad CTD fosfatasa específica de Ser-5P y esencial para la terminación de la transcripción de determinados mRNAs (Pappas y Hampsey, 2000; Krishnamurthy *et al.*, 2004; Reyes-Reyes y Hampsey, 2007; Ganem *et al.*, 2003; Steinmetz y Brow, 2003).

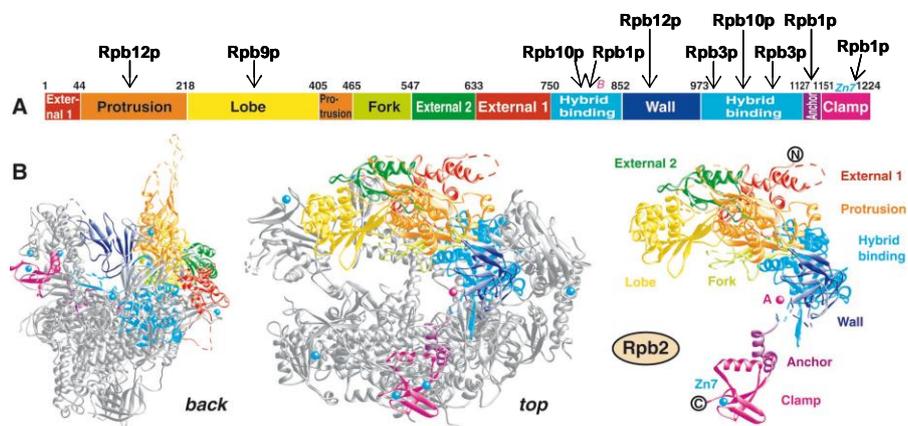


Figura 1.2: Estructura de la subunidad Rpb2p de la RNA pol II. (A) Esquema de los dominios de Rpb2p. Se indican también las regiones de interacción con otras subunidades de la RNA pol II, así como las regiones que contienen los residuos que participan en la coordinación del Zn^{2+} (Zn7, en azul) o del Mg^{2+} (B, en rosa). (B) Localización de Rpb2p dentro de la estructura cuaternaria de la RNA pol II, vista desde atrás (*back*) y desde arriba (*top*), y estructura cuaternaria de la Rpb2p sola. (Imagen tomada de Cramer *et al.*, 2001).

En resumen, la subunidad Rpb2p de la RNA pol II participa en el reconocimiento del sitio de inicio transcripcional, en el inicio de la transcripción y en la elongación llevada a cabo por la RNA pol II. Interacciona con el DNA, con otras subunidades de la RNA pol II, con los factores transcripcionales TFIIB y TFIIF y con el factor de elongación Ssu72p.

1.2.- Inicio de la transcripción de la RNA pol II.

La transcripción llevada a cabo por la RNA pol II es el primer paso en la conversión de la información genética de DNA a proteínas y también el principal punto de regulación de la expresión génica. La actividad de la RNA

pol II da lugar, principalmente, a pre-mRNAs, que se convierten en mRNAs mediante varias etapas de procesamiento. El procesamiento incluye la adición de la caperuza (*capping*), el corte y empalme de exones (*splicing*), el corte del extremo 3' y la poliadenilación (Proudfoot *et al.*, 2002; Reed y Hurt, 2002). A continuación, los mRNAs maduros son exportados a través de los complejos de poro nucleares (NPCs) al citoplasma para su traducción.

1.2.1.- Estructura del promotor de los genes transcritos por la RNA pol II.

Los promotores de los genes transcritos por la RNA pol II están compuestos por diferentes sitios de unión para proteínas reguladoras específicas de gen y por un núcleo o *core* compuesto por la caja TATA y/o por un elemento iniciador (Inr) (revisado en Pugh, 2000). La caja TATA es una secuencia rica en A/T, localizada aproximadamente a unos 25 o 30 nucleótidos aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción, que es reconocida por la *TATA-binding protein* (TBP) (revisado en Smale y Kadonaga, 2003). El elemento iniciador, Inr, contiene una secuencia rica en pirimidinas que rodea al sitio de inicio de la transcripción. La localización de la caja TATA es crítica para el posicionamiento de la burbuja de transcripción y, por lo tanto, del punto en el que se inicia el proceso (Breathmach y Chambon, 1981). Pero en realidad es el Inr el que es capaz de dirigir un inicio transcripcional preciso, bien solo o bien junto con la caja TATA u otros elementos del *core* del promotor. Además de la caja TATA y del Inr, se han identificado otros cinco elementos que pueden estar presentes en el núcleo o *core* de promotores eucariotas y son: el elemento DPE (*downstream promoter element*), el MTE (*motif ten element*), el DCE (*downstream core element*), el BRE^u (*upstream TFIIB-recognition element*) y el BRE^d (*downstream TFIIB-recognition element*). Todos estos elementos son secuencias características del DNA que contribuyen a un correcto ensamblaje del PIC en el lugar adecuado del promotor. Para que la

maquinaria general de transcripción se ensamble sobre el *core* del promotor, se requiere la participación de una serie de factores que son reclutados de forma secuencial, junto con la propia RNA pol II, durante la formación del PIC (revisado en Thomas y Chiang, 2006).

1.2.2.- Los factores generales de transcripción: GTFs.

La maquinaria general de transcripción está compuesta, básicamente, por los factores generales de transcripción (GTFs) y por la propia RNA pol II. Se han descrito seis GTFs (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF y TFIIH), purificados por fraccionamiento cromatográfico de extractos nucleares de células *HeLa* (Matsui *et al.*, 1980; Samuels *et al.*, 1982; Sawadogo y Roeder, 1985; Reinberg y Roeder, 1987; Flores *et al.*, 1989 y 1992; Ge *et al.*, 1996). A continuación se comenta la composición y la función de cada uno de estos factores:

- TFIIA está formada por tres subunidades codificadas por dos genes, que en *Saccharomyces cerevisiae* son *TOA1* y *TOA2*. Se ha descrito que TFIIA acelera y estabiliza la unión de TBP a la caja TATA (Yokomori *et al.*, 1994; Weideman *et al.*, 1997; Stewart y Stargell, 2001), pero además, ayuda a prevenir que inhibidores la disocien o inactiven (Inostroza *et al.*, 1992; Kokubo *et al.*, 1998; Ozer *et al.*, 1998). TFIIA puede contrarrestar los efectos negativos del corepresor NC2 (Xie *et al.*, 2000) y la actividad inhibidora de TAF1 y Mot1p sobre la unión de TBP al DNA (Auble y Hahn, 1993; Kokubo *et al.*, 1998). Por otro lado, se ha descrito que TFIIA puede actuar como un coactivador, contactando directamente con activadores, con cofactores generales o con otros componentes de la maquinaria general de transcripción, especialmente en ausencia de TAFs (revisado en Thomas y Chiang, 2006; Wu *et al.*, 1998).

- El factor TFIIB de levadura, codificado por el gen *SUA7*, es una proteína de 38 KDa conservada a lo largo de la evolución (Yamashita *et al.*, 1992). TFIIB desempeña, junto al factor TFIIF, un importante papel en el

reclutamiento de la RNA pol II al PIC y también en la especificación del sitio de inicio de la transcripción (Orphanides *et al.*, 1996; Hampsey, 1998; Hahn, 2004).

- TFIID es un complejo multiproteico que consta de dos tipos de componentes: la *TATA binding protein* (TBP) y aproximadamente 13 TAFs (*TBP associated factors*) (Kokubo *et al.*, 1998). La TBP desempeña un papel central en el ensamblaje del complejo y las TAFs contribuyen específicamente a la unión de TBP sobre promotores que carecen de una caja TATA típica (Martinez *et al.*, 1995; Oelgeschlager *et al.*, 1996). TFIID desempeña tres funciones fundamentales: i) es un factor de unión al *core* de promotores con o sin caja TATA; ii) es un coactivador que media interacciones entre activadores y componentes de la maquinaria general de transcripción para favorecer el ensamblaje del PIC y iii) es una enzima que modifica post-traduccionalmente a las histonas que forman la cromatina y a factores proteicos involucrados en la regulación transcripcional (revisado en Thomas y Chiang, 2006).

- TFIIE interacciona directamente con TFIIF, TFIIB, RNA pol II y con el DNA del promotor, favorece el reclutamiento de TFIIH y estimula las actividades ATPasa, CTD quinasa y DNA helicasa de TFIIH, facilitando la formación de un complejo RNA pol II competente para el inicio de la transcripción (revisado en Thomas y Chiang, 2006).

- La purificación de TFIIF nativo en *S. cerevisiae* condujo a la identificación de tres subunidades, dos de ellas, Tfg1p y Tfg2p, esenciales para la viabilidad celular y con homólogos en eucariotas superiores (Henry *et al.*, 1992 y 1994). La tercera subunidad, Tfg3p, no es esencial y se ha propuesto que actúa como un factor intermediario para facilitar las interacciones entre SWI/SNF y componentes de la maquinaria general de transcripción (revisado en Thomas y Chiang, 2006). TFIIF desempeña múltiples funciones en células eucariotas: i) Se asocia fuertemente a la RNA pol II, en concreto, al heterodímero disociable Rpb4p-Rpb7p (Chung *et al.*,

2003) y a la subunidad Rpb9p (Ziegler *et al.*, 2003; Ghazy *et al.*, 2004), con lo que se facilita el reclutamiento de la RNA pol II al complejo TFIID-TFIIB unido al promotor (Flores *et al.*, 1991); ii) actúa como un factor estabilizador para favorecer la afinidad de la RNA pol II por el complejo TBP-TFIIB-promotor, induciendo cambios en la topología del DNA para crear complejos TBP-TFIIB-pol II-TFIIF-DNA estables y resistentes a la inhibición causada por represores transcripcionales (Robert *et al.*, 1998; Hou *et al.*, 2000); iii) es necesario para el consiguiente reclutamiento de TFIIE y TFIIH (Orphanides *et al.*, 1996); iv) juega un papel, junto con RNA pol II y TFIIB, en la selección del sitio de inicio de la transcripción (Ghazy *et al.*, 2004); v) facilita la salida de la RNA pol II del promotor, favoreciendo la eficiencia de la elongación (revisado en Thomas y Chiang, 2006); y vi) aumenta la especificidad y la eficiencia de la transcripción llevada a cabo por la RNA pol II (Orphanides *et al.*, 1996; Hampsey, 1998).

- El factor TFIIH es un complejo multiproteico de nueve subunidades que incluye tres actividades enzimáticas necesarias para que tenga lugar la transcripción: i) ATPasa dependiente de DNA, necesaria para el inicio de la transcripción y para la salida de la holoenzima del promotor; ii) helicasa dependiente de ATP, tanto de 5' a 3' como de 3' a 5', necesarias para la transcripción y para reparación del DNA; y iii) CTD quinasa (revisado en Thomas y Chiang, 2006). Estudios recientes han identificado una décima subunidad pequeña de TFIIH, Tfb5p, implicada en reparación del DNA (Ranish *et al.*, 2004). Entre estas actividades de TFIIH, cabe destacar la quinasa dependiente de ciclina (cdk) de la subunidad Kin28, que fosforila el dominio CTD de la RNA pol II y promueve la salida de la holoenzima del promotor (revisado en Thomas y Chiang, 2006).

1.2.3.- La TATA *binding protein* (TBP) y los factores transcripcionales Mot1p y NC2.

La TBP es un factor transcripcional universal necesario para el inicio transcripcional llevado a cabo por las RNA pol I, II y III. Es una molécula de 27 KDa con una estructura en forma de silla de montar, cuya unión a la caja TATA resulta muy estable y apropiada para el ensamblaje de un PIC funcional (Patikoglou *et al.*, 1999). Pero la TBP se une con alta afinidad a una gran variedad de secuencias de DNA (Patikoglou *et al.*, 1999), de modo que la unión a sitios no específicos limita la cantidad de TBP disponible.

Existen varios factores encargados de modular el reclutamiento de la TBP o su función. La actividad de la TBP está regulada positivamente por los complejos TFIID y SAGA, complejos con funciones en el reclutamiento de la TBP y en la regulación transcripcional (Lee *et al.*, 2000). NC2 y Mot1p son otros dos reguladores transcripcionales con efectos globales sobre la actividad de la TBP. De manera general, en *Saccharomyces cerevisiae*, Mot1p y NC2 reprimen promotores con caja TATA y activan promotores sin caja TATA (Dasgupta *et al.*, 2002; Huisinga y Pugh, 2007; Zanton y Pugh, 2004), aunque en levadura se conoce muy poco sobre la transcripción de genes sin caja TATA a nivel bioquímico.

Mot1p es una ATPasa esencial y conservada, miembro de la familia de ATPasas dependientes de DNA Snf2/Swi2. Se asocia rápidamente a los complejos TBP/DNA y usa la energía de hidrólisis del ATP para disociar TBP del DNA (Auble *et al.*, 1994). Aunque la actividad ATPasa no es necesaria para que Mot1p se una a TBP, ésta sí es necesaria para eliminar TBP de la caja TATA. Esta actividad translocadora permite que Mot1p actúe favoreciendo la eliminación de la TBP de secuencias no promotoras ricas en AT, aumentando así la frecuencia de unión de la TBP a elementos TATA funcionales (revisado en Thomas y Chiang, 2006). La redistribución de TBP a las regiones promotoras correctas justificaría en parte la función

coactivadora de Mot1p al estimular tanto la transcripción basal como la activada de algunos genes (Collart, 1996; Li *et al.*, 1999; Dasgupta *et al.*, 2002; Geisberg *et al.*, 2002). Alternativamente, la eliminación de las formas inactivas de TBP atrapadas sobre el DNA sería esencial para despejar los promotores, dejándolos libres para el subsiguiente ensamblaje de PICs funcionales (Dasgupta *et al.*, 2005; Huisinga y Pugh, 2007). Bajo condiciones de crecimiento normal, complejos Mot1p-TBP unidos a promotor no contienen los factores generales de transcripción TFIIA, ni TFIIB ni RNA pol II, sugiriéndose que el complejo Mot1p-TBP es transcripcionalmente inactivo (Geisberg y Struhl, 2004). Sin embargo, en respuesta a estrés, Mot1p participa en complejos pre-inicio funcionales que contienen TFIIB pero no TFIIA (Geisberg y Struhl, 2004). Recientemente se ha demostrado que la inactivación de Mot1p conduce a incrementar la unión de TBP en promotores reprimidos por Mot1p, mientras que en promotores activados por Mot1p, aunque también hay un incremento del reclutamiento de TBP, la unión de Taf1, TFIIB y RNAPol II se ve reducida (Dasgupta *et al.*, 2005). El papel dual de Mot1p en la activación y represión génica está de acuerdo con los resultados de los análisis de perfiles transcripcionales, que sugieren que, en levadura, Mot1p afecta de manera positiva la expresión de un 10% de los genes, mientras que aproximadamente un 5% de los genes están regulados negativamente por Mot1p (Dasgupta *et al.*, 2002; Geisberg *et al.*, 2002).

Por otro lado, el represor NC2 (cofactor negativo 2), también conocido como Dr1-DRAP, se purificó inicialmente a partir de extractos celulares humanos como una actividad que inhibe la transcripción basal dependiente de TATA *in vitro* (Meisterernst y Roeder, 1991; Inostroza *et al.*, 1992). NC2 está compuesto por dos subunidades, NC2 α (DRAP1) y NC2 β (Dr1), que forman un complejo estable a través de dominios *histone fold* (Goppelt *et al.*, 1996; Mermelstein *et al.*, 1996; Kamada *et al.*, 2001). En *S. cerevisiae* existe un complejo homólogo (Bur6p/NC2 α e Ydr1p/NC2 β) necesario para el

crecimiento celular (Gadbois *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1997; Prelich, 1997). NC2 parece funcionar como un inhibidor de la transcripción llevada a cabo por la RNA pol II. *In vitro*, el complejo NC2 interacciona con TBP y bloquea la asociación de TFIIA y TFIIB en el complejo de transcripción que se está ensamblando (Goppelt *et al.*, 1996; Mermelstein *et al.*, 1996) y en levadura, una mutación puntual en TFIIA, que desestabiliza su interacción con el complejo TBP-TATA, suprime el papel esencial de NC2 para la viabilidad celular (Xie *et al.*, 2000). Esto es consistente con un papel fisiológico de interacciones competitivas entre TFIIA y NC2 por unirse a TBP. Por otro lado, hay estudios que sugieren que NC2 puede afectar positivamente la transcripción de algunos genes (Geisberg *et al.*, 2001; Chitikila *et al.*, 2002). En levadura, el componente Bur6p de NC2 se asocia preferentemente a promotores estimulados por Bur6p, sugiriéndose un papel directo en la transcripción de estos genes (Geisberg *et al.*, 2001). Defectos en NC2 afectan a la expresión del 17% de los genes de levadura y el papel dual de este factor en la transcripción se pone de manifiesto por el hecho de que aproximadamente la expresión de la mitad de estos genes se incrementa en el mutante, mientras que la otra mitad se reduce (Geisberg *et al.*, 2001).

Se ha descubierto que NC2 permite la relocalización de la TBP a lo largo del DNA, una actividad que encaja con la estructura del complejo NC2-TBP-DNA, que parece una abrazadera que rodea al DNA (Schluesche *et al.*, 2007). En cuanto a su función activadora de la transcripción, se ha propuesto que NC2 estabilizaría transitoriamente las interacciones débiles TBP-DNA (Cang y Prelich, 2002) o actuaría dirigiendo a la TBP al *core* de promotores catalizando su difusión a lo largo del DNA.

En la Figura 1.3 se esquematiza un modelo de cómo NC2 puede mediar tanto la represión como la activación transcripcional.

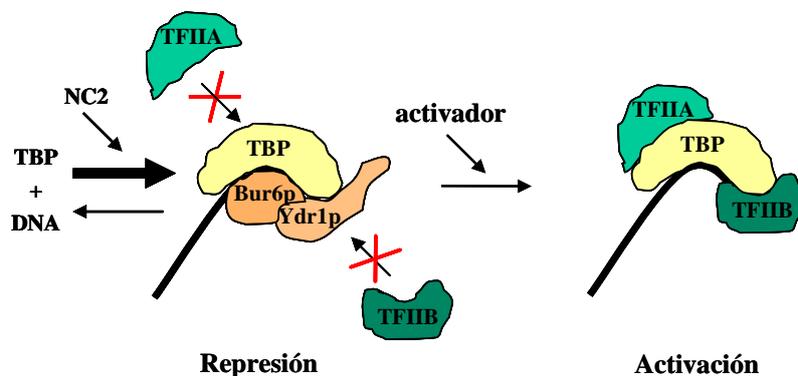


Figura 1.3: Representación esquemática del papel dual de NC2 en la represión y en la activación transcripcional. En el primer paso, NC2 estimula la unión de la TBP al DNA, aunque su presencia continua inhibe la subsiguiente unión de TFIIA y TFIIB. En el siguiente paso, los activadores transcripcionales (con ayuda o no de coactivadores) pueden eliminar físicamente a NC2 del complejo NC2-TBP-DNA (como se muestra en la figura) o pueden inactivar su actividad represora mientras NC2 permanece unido al complejo TBP-DNA, favoreciéndose así la activación transcripcional. (Imagen modificada de Cang y Prelich, 2002).

Recientemente, se ha demostrado que NC2, Mot1p y TBP colocalizan y pueden funcionar sobre los mismos promotores al mismo tiempo y se consiguió aislar un complejo NC2-TBP-Mot1p-DNA a partir de extractos de cromatina (van Werven *et al.*, 2008). Este complejo no contiene otros GTFs ni RNA pol II, por lo que se apoya aun más la idea de que Mot1p y NC2 interaccionan con formas de TBP transcripcionalmente inactivas. En los promotores de los genes activados por estos factores sería necesaria la actividad ATPasa de Mot1p para disociar el complejo transcripcionalmente inactivo NC2-TBP-Mot1p del promotor, permitiendo la unión de TFIID o TBP libre que favorecería el ensamblaje de un complejo PIC funcional y la consiguiente transcripción (van Werven *et al.*, 2008). Estudios proteómicos recientes (Arnett *et al.*, 2008) nos muestran que la complejidad de las interacciones que implican a NC2 y Mot1p en el control de la regulación

transcripcional es mucho mayor de lo que parece, por lo que futuros estudios son necesarios para comprender el papel de estos factores reguladores.

1.3.- El complejo pre-inicio (PIC).

1.3.1.- Ensamblaje del PIC.

El ensamblaje de un PIC funcional se logró *in vitro* empleando un sistema reconstituido que constaba de DNA, RNA pol II purificada y GTFs (Buratowski *et al.*, 1989; Ranish y Hahn, 1996). Este sistema era capaz de llevar a cabo la transcripción a nivel basal, pero no de responder a activadores. El ensamblaje de este PIC tiene lugar de manera ordenada y secuencial. Como se representa en la figura 1.4, el primer paso en la formación del complejo PIC sobre un promotor es la unión del factor TFIID a una región que se extiende en dirección 5' desde la secuencia TATA. Existen múltiples mecanismos que impiden la formación del complejo TBP-TATA o el posterior ensamblaje sobre él del resto de factores transcripcionales. Entre ellos cabe mencionar la homodimerización de la propia TBP, la interacción de Taf1 sobre el mismo punto de unión de TFIIA a la TBP, la disociación dependiente de ATP del complejo pre-formado TBP-TATA por acción de Mot1p, la unión del corepresor NC2 al complejo TBP-TATA impidiendo la unión de TFIIA y TFIIB, o la propia estructura compacta de la cromatina (revisado en Pugh, 2000). Por tanto, la unión de TBP a la caja TATA está altamente regulada.

Una vez se ha producido la unión de TBP al DNA, TFIIA y TFIIB se unen al complejo, seguido por la incorporación de la RNA pol II junto con TFIIF (Figura 1.4). Tras la unión de la RNA pol II, el subcomplejo TBP-TAFs interacciona con la cola CTD de la subunidad mayor de la RNA pol II, Rpb1p. El dominio CTD de la Rpb1p (desde el aminoácido 1535 al 1733 en levadura) forma una extensión desestructurada que está unida de manera flexible a una región adyacente al canal de salida del RNA a través de un

conector de 80 residuos, lo que proporciona una plataforma sobre la que pueden interaccionar diversas proteínas involucradas en el procesamiento del RNA (Meinhart *et al.*, 2005). El CTD se compone, en *S. cerevisiae*, de 26-27 repeticiones en tándem de la secuencia consenso, evolutivamente conservada Tyr₁-Ser₂-Pro₃-Thr₄-Ser₅-Pro₆-Ser₇ (YSPTSPS) (Allison *et al.*, 1985; Corden *et al.*, 1985). El número de repeticiones de este heptapéptido varía en las diferentes especies, desde 52 repeticiones en mamíferos a 17 en plasmodium. Se ha comprobado que la delección de todo el dominio CTD es letal, pero pueden tolerarse delecciones de cierto número de repeticiones. En la levadura, un mínimo de 11 repeticiones de esta secuencia son necesarias para la viabilidad celular (Nonet *et al.*, 1987), aunque al ir disminuyendo el número de heptapéptidos se ha observado una reducción en la velocidad de crecimiento celular y en la transcripción de varios genes (Nonet *et al.*, 1987; Bartolomei *et al.*, 1988). Este dominio es un buen sustrato de fosforilación, ya que cinco de los siete residuos consenso son potenciales fosfoaceptores. El grado de fosforilación de CTD se correlaciona con la actividad de la polimerasa y también afecta a las interacciones del CTD con los factores de procesamiento (revisado en Proudfoot *et al.*, 2002).

En este punto, para permitir que la RNA pol II comience su movimiento de alejamiento del promotor, se requiere la participación de los factores TFIIE y TFIIH (Figura 1.4). TFIIE interacciona directamente con TFIIIF, TFIIIB, RNA pol II y con el DNA del promotor, favoreciendo el reclutamiento de TFIIH (revisado en Thomas y Chiang, 2006). La quinasa dependiente de ciclina (cdk) de la subunidad Kin28p de TFIIH participa en la fosforilación del dominio CTD de la RNA pol II, actuando concretamente sobre la Ser5. (Feaver *et al.*, 1994). Esta fosforilación, conduce al reclutamiento de las enzimas que introducen la caperuza (*capping*) y está implicada en la salida de la holoenzima del promotor (revisado en Thomas y Chiang, 2006) para que tenga lugar la elongación transcripcional.

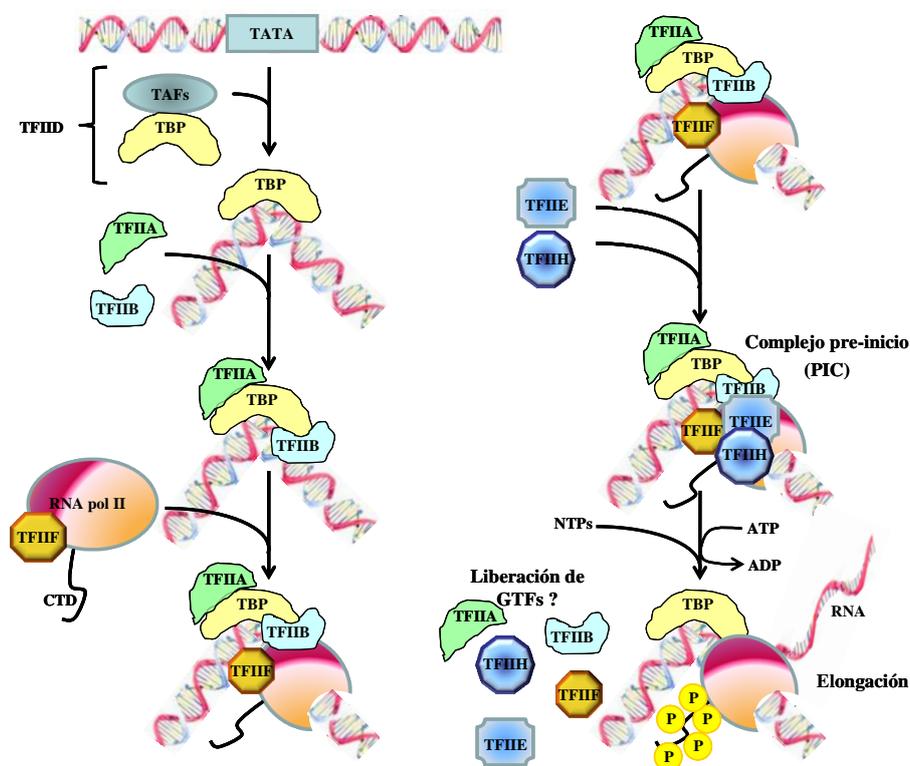


Figura 1.4: Modelo de ensamblaje del complejo pre-inicio (PIC). La formación del PIC tiene lugar de manera ordenada y secuencial, iniciándose con la unión del factor TFIID a una región que se extiende en dirección 5' desde la secuencia TATA. Una vez se ha producido la unión de TBP al DNA, los factores TFIIA y TFIIIB se unen al complejo, seguido por la incorporación de la RNA pol II junto con TFIIF. A continuación, se recluta el factor TFIIIE con la consiguiente entrada de TFIIH. Es necesaria la fosforilación de la cola CTD de la RNA pol II para que se inicie el proceso de elongación transcripcional.

Diferentes estudios han puesto de manifiesto la posibilidad de rutas alternativas para la formación del PIC (Sprouse *et al.*, 2008). Así, la purificación de la RNA pol II como un complejo holoenzimático pre-ensamblado que incluye la propia RNA pol II y las proteínas Srb

(*suppressors of RNA polymerase B mutations*; Kim *et al.*, 1994; Koleske y Young, 1994), con o sin un conjunto de GTFs y de otras proteínas, ha sugerido que la holoenzima pol II podría incorporarse pre-ensamblada a la región del promotor (revisado en Thomas y Chiang, 2006). Estudios recientes demuestran que, *in vivo*, otros complejos proteicos, como el Mediador (que se describe en el siguiente apartado), desempeñan un papel crucial en el reclutamiento de los GTFs al PIC (Esnault *et al.*, 2008). En *S. cerevisiae* se ha estudiado el orden en el reclutamiento de componentes implicados en la formación del PIC *in vivo* (Bhoite *et al.*, 2001; Bryant y Ptashne, 2003; Cosma *et al.*, 1999), demostrándose que el Mediador se recluta antes que la RNA pol II y que los GTFs, lo que sugiere que el Mediador es necesario para la unión de éstos. Pero, hasta el momento, se desconoce si los GTFs y la RNA pol II se ensamblan en el PIC de manera secuencial *in vivo* como lo hacen *in vitro* y cómo el Mediador estimula este proceso. Se ha observado que el Mediador y algunos GTFs, entre ellos TFIID y TFIIE, permanecen unidos al promotor tras el inicio de la transcripción de la RNA pol II, facilitándose así el reinicio (Yudkovsky *et al.*, 2000). *In vivo*, el reclutamiento de TFIID y TFIIE al PIC puede darse independientemente de la unión de la RNA pol II al PIC, pero de manera dependiente del Mediador, por lo que se propone la coexistencia *in vivo* de varias vías para el ensamblaje de los GTFs que conducen a la formación de un PIC funcional (Esnault *et al.*, 2008).

En resumen, aunque no ha podido establecerse que la RNA pol II eucariota exista como un complejo holoenzimático en la célula o que el complejo se ensamble de manera secuencial sobre el promotor, es posible que existan *in vivo* varias vías de ensamblaje del PIC, de manera que dependiendo de las moléculas de señalización específicas involucradas y del contexto del promotor, se den unas vías u otras en respuesta a las condiciones ambientales.

1.3.2.-El Mediador.

El Mediador se identificó por primera vez en levadura, pero se han caracterizado complejos homólogos en hongos, metazoos y plantas (Boube *et al.*, 2002; Malik y Roeder, 2000; Backstrom *et al.*, 2007). Estudios basados en el análisis de secuencias proponen que la mayoría de subunidades del Mediador (~80%) están conservadas desde levadura hasta humanos. En *S. cerevisiae*, el Mediador se identificó originariamente como un adaptador requerido para que los activadores transcripcionales específicos estimularan a la RNA pol II (Kelleher *et al.*, 1990; Flanagan *et al.*, 1991). La mayoría de las subunidades del Mediador fueron identificadas en un rastreo de mutantes capaces de suprimir el fenotipo de sensibilidad al frío de un mutante con una truncación en el dominio CTD de la RNA pol II (Nonet y Young, 1989). Otros componentes del Mediador fueron identificados como supresores de activadores transcripcionales (Carlson, 1997), y la identificación se completó con el aislamiento bioquímico del complejo (Kim *et al.*, 1994). Además de su papel en la transcripción dependiente de activador, existen pruebas de que el Mediador es necesario para la transcripción basal, ya que actúa como adaptador entre factores reguladores específicos de genes y la maquinaria de transcripción general (Biddick y Young, 2005). El Mediador interacciona con la forma desfosforilada del CTD (Myers *et al.*, 1998), pero no con la forma hiperfosforilada de la RNA pol II, de manera que cuando empieza la elongación, el Mediador se disocia de la RNA pol II (Svejstrup *et al.*, 1997). Para que se genere el sitio de unión a la RNA pol II y se pueda formar el complejo Mediador-RNA pol II son necesarios considerables cambios conformacionales en el Mediador (Davis *et al.*, 2002; Asturias *et al.*, 1999). Además, estos cambios deben persistir para que el Mediador pueda funcionar como plataforma en el reinicio de la transcripción y el ensamblaje de un nuevo PIC (Asturias, 2004).

En *S. cerevisiae*, el Mediador es un complejo de 1 MDa que se compone de al menos 21 proteínas (Biddick y Young, 2005; Bjorklund y Gustafsson, 2005; Chadick y Asturias, 2005) y de un subgrupo adicional de proteínas Srb (*suppressors of RNA pol B*), que forman el submódulo Srb8-11p (Borggreffe *et al.*, 2002). Las subunidades del Mediador forman tres módulos, además del submódulo Srb8-11p, funcional y físicamente distintos:

- La cabeza (*head*) consta de las subunidades Med6p, Med8p, Med11p, Med17p, Med18p, Med19p, Med20p y Med22p (Koh *et al.*, 1998), conservadas desde levadura hasta humanos. Este módulo interacciona con el dominio CTD de la RNA pol II, así como con otras subunidades de la RNA pol II (Lee y Kim, 1998; Davis *et al.*, 2002) y es esencial para la transcripción basal y activada (Takagi *et al.*, 2006; Takagi y Kornberg, 2006). En levadura, todas las subunidades de este módulo, excepto Med18p y Med20p, son esenciales para la viabilidad celular (Koleske *et al.*, 1992; Thompson *et al.*, 1993; Larivieri *et al.*, 2006). *In vivo*, Med18p y Med20p regulan la transcripción de un subgrupo de genes y tienen una función principalmente positiva (van de Peppel *et al.*, 2005). Por otro lado, el dominio N-terminal de Med8p, altamente conservado, es el que se une a TBP *in vitro*, y es esencial *in vivo* (Takagi *et al.*, 2006).

- El centro (*middle*) consta de las subunidades Med1p, Med4p, Med5p, Med7p, Med9p, Med10p, Med21p y Med31p. Este módulo interacciona con el dominio CTD de la RNA pol II, con otras subunidades de la RNA pol II, con TFIIE y con el submódulo Srb8-11p (Kang *et al.*, 2001; Davis *et al.*, 2002).

- La cola (*tail*) consta de las subunidades Med2p, Med3p, Med14p, Med15p y Med16p. Este módulo parece interactuar con la RNA pol II y con activadores específicos de genes (Lewis y Reinberg, 2003).

En *S. cerevisiae*, el complejo purificado inicialmente carecía del submódulo Srb8p-11p (Kim *et al.*, 1994). Este submódulo funciona como represor de un pequeño conjunto de genes y se ha propuesto que podría

asociarse transitoriamente con el resto del complejo Mediador y prevenir su función activadora (revisado en Björklund y Gustafsson, 2005).

El análisis de los perfiles de expresión en cepas portadoras de mutaciones en los componentes no esenciales del Mediador ha revelado la existencia de varios submódulos con funciones antagónicas (van de Peppel *et al.*, 2005). Uno de estos submódulos consta de las subunidades de la cola, Med2p, Med3p y Gal11p. La eliminación de cualquiera de estos componentes da como resultado cambios similares en el perfil de expresión global, principalmente en niveles reducidos de transcritos, sugiriéndose un papel positivo para este submódulo en la regulación de la transcripción (van de Peppel *et al.*, 2005). También se ha visto que la tríada Med2p, Med3p y Gal11p es capaz de promover el reclutamiento de TBP de manera independiente al resto del Mediador (Zhang *et al.*, 2004), lo que apoya su papel como elemento funcional diferenciado dentro del Mediador.

Se puede afirmar que los tres módulos principales del Mediador contienen a su vez submódulos con distintas funciones implicadas en la regulación de diferentes subgrupos de genes (Lariviere *et al.*, 2008).

Se cree que el Mediador actúa principalmente durante el ensamblaje del PIC, bien aumentando la eficiencia y la tasa de este ensamblaje (Cantin *et al.*, 2003) o afectando al reclutamiento de la propia RNA pol II, de TFIID y de otros GTFs (Wu *et al.*, 2003; Johnson y Carey, 2003). Curiosamente, la función coactivadora del Mediador puede ocurrir en ausencia de los TAFs de TFIID, lo que sugiere que el Mediador y los TAFs pueden desempeñar funciones redundantes en el proceso de transcripción. De hecho, los TAFs también favorecen la entrada de la RNA pol II al PIC en presencia de activadores transcripcionales (Wu y Chiang, 2001). El Mediador es capaz de favorecer la unión de TBP a la caja TATA y también presenta actividades enzimáticas, como la actividad kinasa de la subunidad CDK8/Srb10p y la actividad histona acetil transferasa (HAT) de la subunidad Med5p/Nut1p.

CDK8 puede fosforilar el dominio CTD de la RNA pol II y la subunidad ciclina H de TFIIH. Med5p acetila principalmente las histonas H3 y H4 tanto libres como unidas a cromatina (revisado en Thomas y Chiang, 2006). El Mediador activa la transcripción a través de interacciones directas con la RNA pol II, con activadores unidos a elementos reguladores de sus genes diana o con algunos de los GTFs unidos a promotor. Curiosamente, las distintas subunidades del Mediador parecen estar implicadas en la interacción física con el dominio de activación de diferentes activadores transcripcionales (Collins *et al.*, 2007; Malik y Roeder, 2000). Estas interacciones específicas y la interacción cooperativa del Mediador con otros coactivadores, juegan un papel fundamental a la hora de coordinar la gran cantidad de factores necesarios para el ensamblaje de un PIC funcional (Casamassimi y Napoli, 2007). Además, también se han descrito interacciones entre el Mediador y regiones codificantes de muchos genes (Zhu *et al.*, 2006), de manera que puede que el Mediador también influya en otros aspectos de la expresión génica, como en la elongación transcripcional, en el *splicing*, en la remodelación de la cromatina o en la exportación de mRNAs (Björklund y Gustafsson, 2005).

En resumen, a pesar de los numerosos estudios, estamos sólo al principio de comprender los mecanismos funcionales que permiten al Mediador desempeñar sus (probables) múltiples actividades en el proceso de expresión génica.

1.4.- Regulación de la transcripción.

1.4.1.- Reguladores gen-específicos y coreguladores.

El inicio de la transcripción en células eucariotas está estrechamente controlado por interacciones entre factores positivos y negativos (Narlikar *et al.*, 2002; Orphanides y Reinberg, 2002). Estos factores incluyen reguladores gen-específicos, complejos proteicos coreguladores, factores generales de

transcripción y la propia RNA pol II (Hochheimer y Tjian, 2003; Lee y Young, 2000; Malik y Roeder, 2005; Sims *et al.*, 2004).

En función del patrón de expresión de un gen se pueden considerar diferentes “estados fisiológicos”, de forma que encontramos genes reprimidos, inducidos o con una expresión basal constitutiva. En general, la represión está asociada a una estructura de la cromatina que impide físicamente que la maquinaria de transcripción, o cualquier otro factor, pueda acceder al DNA del promotor de forma productiva. No obstante, también se ha descrito la existencia de represores transcripcionales que actúan a través de los componentes de la maquinaria transcripcional básica. La expresión basal requiere la adopción de una estructura cromatínica que posibilite el acceso de la maquinaria de transcripción, aunque la ausencia de activadores funcionales que aceleren su reclutamiento determina bajos niveles de expresión. Los genes inducidos presentan la estructura abierta de la cromatina y a ellos se encuentran unidos activadores transcripcionales que facilitan el ensamblaje correcto de la maquinaria de transcripción (revisado en Pugh, 2000).

De manera general, se puede hablar de tres niveles en la regulación transcripcional (Figura 1.5):

- mediante la unión de los reguladores a secuencias específicas del DNA;
- mediante interacciones de los reguladores con componentes de la maquinaria de transcripción basal, como es el caso del Mediador;
- mediante remodelación de la estructura de la cromatina, como es el caso de los complejos SAGA y SWI/SNF.

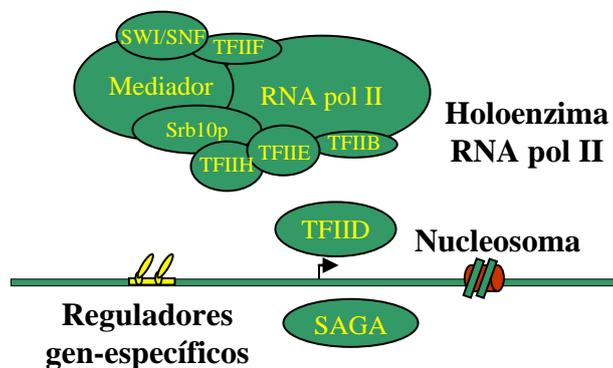


Figura 1.5: Representación esquemática de los niveles de regulación en el proceso de transcripción.

Uno de los papeles más importantes en la regulación de genes que codifican proteínas lo desempeñan los reguladores transcripcionales gen-específicos, que se encargan de regular la expresión de genes individuales mediante el reclutamiento de la holoenzima RNA pol II al promotor específico (Pillai *et al.*, 2001). Este tipo de reguladores estructuralmente presentan un dominio de unión al DNA y un dominio regulador, actuando sobre cualquier promotor que contenga el sitio de unión al DNA apropiado. Los reguladores gen-específicos se unen típicamente a secuencias localizadas en 5' respecto a la caja TATA (UAS *-upstream activating sequences-* o URS *-upstream repressing sequences-*) y, junto a coactivadores y corepresores, se encargan de modular el inicio de la transcripción, afectando al ensamblaje o a la actividad del complejo pre-inicio (PIC) (Liu *et al.*, 1999).

Un segundo tipo de reguladores actúan interaccionando con la RNA pol II y con los GTFs. El coactivador más conocido de este tipo es el Mediador (Björklund *et al.*, 2001; Myers y Kornberg, 2000), que ya ha sido descrito detalladamente en esta introducción.

Un tercer tipo de reguladores actúan remodelando la estructura de la cromatina. El acceso a la cromatina es un paso previo para que tenga lugar la transcripción y requiere que la cromatina pase de su estado inactivo a su estado activo. Las enzimas remodeladoras de cromatina, que a menudo forman parte de grandes complejos proteicos, se pueden agrupar en dos grupos principales: los remodeladores de cromatina dependientes de ATP y los modificadores de histonas (Narlikar *et al.*, 2002; Sudarsanam y Winston, 2000; Jenuwein y Allis, 2001; Cosgrove *et al.*, 2004; Mellor, 2005).

1.4.2.- Regulación de los genes *GAL*, *PHO* y *SUC2*.

Existen una serie de genes de *S. cerevisiae* cuya regulación ha sido extensamente estudiada, como es el caso de los genes *GAL*, *PHO* y *SUC2*. Todos ellos son elementos de sistemas de respuesta a nutrientes y su expresión está fuertemente regulada y es fácil de manipular (Lohr, 1997).

Los genes *GAL* codifican las enzimas y los reguladores necesarios para utilizar la galactosa como fuente de carbono (Lohr *et al.*, 1995; Johnston, 1987). El clúster *GAL* de *S. cerevisiae* incluye tres genes necesarios para el metabolismo de la galactosa: *GAL1*, *GAL7* y *GAL10*. En relación a su expresión, se pueden definir tres estados característicos dependiendo de la fuente de carbono disponible en el medio: estado inducido (en ausencia de glucosa y presencia de galactosa), estado no inducido (en ausencia de glucosa y presencia de otras fuentes de carbono, como rafinosa) o estado reprimido (en presencia de glucosa) (Houseley *et al.*, 2008). En presencia de galactosa, la inducción génica se da a través de la unión del dominio de activación C-terminal del activador específico Gal4p a las UAS_G. En ausencia de galactosa, Gal80p inhibe a Gal4p interaccionando directamente con su dominio de activación C-terminal (Johnston, 1987). La presencia de galactosa relaja la inhibición, permitiendo a Gal4p activar la transcripción de genes *GAL*. Es curioso que las regiones UAS_G se encuentren permanentemente libres de nucleosomas, de manera que Gal4p puede unirse

a estas secuencias sin que resulte necesaria la remodelación de la cromatina (Lohr, 1984; Fedor y Kornberg, 1989; Cavalli y Thoma, 1993; Lohr, 1993). Así, en el estado no inducido, Gal4p unido a UAS_G prepara a las células para una inducción rápida en caso de que la galactosa esté disponible en el medio (Lohr *et al.*, 1995). Por otro lado, en estado inactivo (no inducido o reprimido), sí existen nucleosomas posicionados sobre la caja TATA de los genes *GAL10*, *GAL7* y *GAL80*, sobre los sitios de inicio de la transcripción de los genes *GALI* y *GAL80*, y alrededor de la caja TATA de *GALI* (Lohr, 1984; Fedor y Kornberg, 1989; Cavalli y Thoma, 1993; Lohr, 1993). Estos nucleosomas ayudan a reprimir la expresión génica, aunque se ha observado una depleción parcial de nucleosomas en presencia de fuentes de carbono diferentes a la galactosa que permite una expresión parcial de *GALI* dependiente de TATA (Han y Grunstein, 1988). La inducción por galactosa desencadena la disrupción dependiente de Gal4p de todos estos nucleosomas, lo que facilita el inicio de la transcripción de los genes *GAL* (revisado en Lohr, 1997).

Por otro lado, *S. cerevisiae* es capaz de inducir un programa de expresión de genes de respuesta a fosfato cuando se depleciona el medio de fosfato inorgánico. El sistema incluye la permeasa Pho84p, la fosfatasa ácida Pho5p y otras proteínas involucradas en el almacenamiento de fosfato (Ogawa *et al.*, 2000). La inducción de estos genes está controlada por los factores transcripcionales Pho2p y Pho4p. La actividad y localización de Pho4p están reguladas, en respuesta a la disponibilidad de fosfato, a través de la fosforilación que lleva a cabo el complejo CDK-ciclina nuclear Pho80p-Pho85p (Oshima, 1997; O'Neill *et al.*, 1996; Komeili y O'Shea, 1999). En el promotor del gen *PHO5* existen dos elementos reguladores, conocidos como UASp1 y UASp2, que son los principales sitios de unión de los activadores Pho2p y Pho4p. En condiciones de alta concentración de fosfato, el complejo Pho80p-Pho85p fosforila al factor Pho4p, lo que

provoca que Pho4p sea exportado al citoplasma, donde no puede ejercer su función como activador transcripcional (Kaffman *et al.*, 1994; O'Neill *et al.*, 1996). Cuando la concentración de fosfato intracelular es baja, una cascada de señalización activa Pho81p, que inhibe la actividad quinasa del complejo Pho80p-Pho85p (Ogawa *et al.*, 1995; Schneider *et al.*, 1994). La inhibición de Pho80p-Pho85p permite que el factor Pho4p se mantenga en el núcleo, donde interacciona con el otro activador, Pho2p, para unirse al promotor del gen *PHO5* y activar su transcripción (Barbaric *et al.*, 1996; O'Neill *et al.*, 1996). Se pueden definir dos conformaciones de la cromatina para el promotor del gen *PHO5*. En condiciones de represión (alta concentración de fosfato), cuatro nucleosomas perfectamente posicionados están ensamblados sobre la región del promotor (nucleosomas de -4 a -1) ocultando la región UASp2 y la caja TATA (Svaren y Horz, 1995). En respuesta a la depleción de fosfato, estos cuatro nucleosomas se desensamblan (Boeger *et al.*, 2004). Tanto el complejo SAGA como el SWI/SNF contribuyen a la activación de *PHO5*, de manera dependiente de la concentración de fosfato (Barbaric *et al.*, 2003 y 2001). En condiciones de baja concentración de fosfato, el nivel de Pho4p en el núcleo es bajo, por lo que SAGA y SWI/SNF parecen ser necesarios para la unión de Pho4p al promotor de *PHO5*. En cambio, en condiciones de ausencia de fosfato, el nivel de Pho4p en el núcleo es mayor y los complejos SAGA y SWI/SNF no son imprescindibles para que el activador Pho4p se una al promotor de *PHO5* (Dhasarathy y Kladdé, 2005). La remodelación de los nucleosomas sobre el promotor de *PHO5* y la modificación de histonas favorecen la unión de los activadores Pho4p y Pho2p, aunque el desensamblaje de la cromatina del promotor no es necesario para que ocurra el reclutamiento de estos activadores. De hecho, se ha demostrado recientemente que Pho4p co-ocupa el mismo tramo de DNA que un octámero de histonas, lo que sugiere que la eliminación de histonas tiene lugar posteriormente a la unión del activador al promotor (Ransom *et al.*, 2009). En cambio, sí que es necesario el reclutamiento de Pho4p y la

remodelación de la cromatina para que se reclute al promotor, de manera estable, el complejo SAGA, el complejo SWI/SNF y la maquinaria general de transcripción (Adkins *et al.*, 2007). Aunque se han identificado muchos cofactores implicados en la apertura de la cromatina en el promotor de *PHO5* (componentes de SAGA y de SWI/SNF, INO80 y la chaperona Asf1p), ninguno de ellos parece ser absolutamente esencial para que se dé la inducción de este gen *in vivo*. Esto sugiere la existencia de una red compleja de rutas paralelas redundantes y mutuamente independientes que conducen a la remodelación del promotor del gen *PHO5* (Barbaric *et al.*, 2007).

El complejo Pho80p-Pho85p es capaz de fosforilar a Pho4p en cuatro residuos de serina funcionalmente importantes (O'Neill *et al.*, 1996), de manera que se pueden acumular distintas formas fosforiladas de Pho4p *in vivo* en respuesta a concentraciones de fosfato intermedias. Pho4p completamente fosforilado, citoplasmático, no puede activar la transcripción de ninguno de los genes de respuesta a fosfato, mientras que Pho4p completamente desfosforilado, nuclear, puede activar de manera eficiente la transcripción de todos estos genes. Sin embargo, las formas parcialmente fosforiladas de Pho4p activan la transcripción de algunos de estos genes, pero no la de otros. En condiciones intermedias de fosfato, el complejo Pho80p-Pho85p es parcialmente activo y se acumulan en el núcleo formas de Pho4p fosforiladas en el sitio 6 de fosforilación, fosfo-forma que se une eficientemente al promotor de *PHO84* y que activa su transcripción, pero que no se une de manera eficiente ni activa a *PHO5*. Las diferencias en la regulación de estos dos genes, *PHO84* y *PHO5*, se deben a diferencias en la afinidad de Pho4p por sus sitios de unión en los promotores de los genes *PHO5* y *PHO84*, así como a diferencias en sus cinéticas de activación (Springer *et al.*, 2003).

Finalmente, el gen *SUC2* de *S. cerevisiae* codifica la enzima invertasa, necesaria para la utilización de sacarosa y rafinosa como fuentes de carbono

(Carlson y Botstein, 1982). La transcripción del gen *SUC2* está regulada por la concentración de glucosa en el medio (Carlson, 1998). Cuando la concentración de este azúcar es elevada, el promotor de *SUC2* presenta una estructura cromatínica cerrada que impide su transcripción (Pérez-Ortín *et al.*, 1987; Edmondson *et al.*, 1996; Wu y Winston, 1997). Diferentes factores se han relacionado con la regulación de la expresión de *SUC2* como, por ejemplo, el complejo Mig1p-Ssn6p-Tup1p, las proteínas Hxk2p (hexoquinasa que cataliza la fosforilación de glucosa en el citosol), Gcr1p (factor transcripcional de genes involucrados en glicolisis), Grr1p (componente del complejo ubicuitín-ligasa SCF involucrado en represión por catabolito de carbono), Reg1p (subunidad reguladora de la fosfatasa tipo-1 Glc7p tipo-1) y Glc7p (subunidad catalítica de dicha fosfatasa) (Trumbly, 1992; Moreno y Herrero, 2002; Türkel *et al.*, 2003). En condiciones de elevada concentración de glucosa, Mig1p es desfosforilada por el complejo proteína fosfatasa Glc7p-Reg1p y se localiza principalmente en el núcleo donde actúa como represor transcripcional (Alms *et al.*, 1999). En estas condiciones, Hxk2p estabiliza al complejo represor Mig1p-Ssn6p-Tup1p al bloquear la fosforilación de Mig1p por la proteína quinasa Snf1p (Ahuatzi *et al.*, 2003 y 2007). En condiciones de baja concentración de glucosa se activa la proteína quinasa Snf1p (Wilson *et al.*, 1996) y se produce la salida de Hxk2 al citoplasma (Moreno y Herrero, 2002; Peláez *et al.*, 2009). Es entonces cuando Snf1p fosforila a Mig1p, provocando el desensamblaje del complejo represor y la salida de Mig1p al citoplasma (DeVit *et al.*, 1997). Por otra parte, se ha descrito la participación de diferentes remodeladores de cromatina en la activación del gen *SUC2*, como el complejo SWI/SNF (Sudarsanam y Winston, 2000), y las histona acetiltransferasas (Pollard y Peterson, 1997; Geng y Laurent, 2004) Gcn5p (componente del complejo SAGA; Vignali *et al.*, 2000) y Esa1p (subunidad catalítica del complejo HAT NuA4; Allard *et al.*, 1999).

1.5.- La exportación de mRNAs.

Entre las moléculas que deben ser transportadas del núcleo al citoplasma celular se encuentran los mRNAs, cuya exportación es un paso necesario para su traducción a proteínas. La exportación de mRNAs es un proceso complejo que requiere la participación de numerosos factores. Muchos de ellos se han identificado mediante rastreos genómicos utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, y algunos están conservados evolutivamente, por lo que se les considera elementos centrales en el proceso de exportación. A esta categoría pertenece la RNA helicasa de la familia de proteínas DEAD-box, Dbp5p/Rat8p, de la que hablaremos más adelante.

El conocimiento actual sobre el mecanismo de exportación de mRNAs es muy inferior al conocimiento del transporte de proteínas. Los mRNAs se exportan como grandes complejos ribonucleoproteicos (mRNPs). Algunas de las proteínas unidas al mRNA se eliminan de los mRNPs inmediatamente antes de su translocación a través del NPC, mientras que otras atraviesan la membrana y se eliminan en el lado citosólico del NPC, volviendo entonces al núcleo (Cole, 2000). Aunque la participación de receptores relacionados con la importina- β no puede descartarse por completo, distintas evidencias indican que el receptor de exportación para mRNAs en metazoos es TAP (Mex67p en levadura), que no pertenece a la familia de la importina- β (Conti y Izaurralde, 2001). Además, el mecanismo de exportación del grueso de mRNAs no parece ser directamente dependiente de Ran (Reed y Hurt, 2002). Como cabría esperar en un receptor de exportación de mRNAs, TAP y Mex67p se unen directamente a nucleoporinas y pueden ser reticulados a mRNAs poliadenilados (revisado en Conti y Izaurralde, 2001). Además, en *S. cerevisiae*, Mex67p es esencial para la exportación del grueso de mRNAs al citoplasma (Segref *et al.*, 1997).

Dbp5p es uno de los factores esenciales para la exportación de mRNAs que se ha conservado a lo largo de la evolución (Snay-Hodge *et al.*,

1998; Tseng *et al.*, 1998). Pertenece a la familia de proteínas DEAD-box, que incluye miembros que participan en cada una de las etapas de la biogénesis y degradación de mRNAs (revisado en de la Cruz *et al.*, 1999). Dbp5p se une a los NPCs, donde interacciona con Nup159p/Rat7p, Gle1p y otras proteínas situadas en las fibrillas citoplasmáticas del NPC o cerca de ellas (Snay-Hodge *et al.*, 1998; Hodge *et al.*, 1999). La localización de Dbp5p no es estática, sino que va y viene entre el núcleo y el citoplasma, como demuestra su acumulación nuclear reversible en mutantes *xpo1-1* (Hodge *et al.*, 1999). Se ha sugerido que la localización de Dbp5p en el lado citosólico del NPC la posicionaría para catalizar la eliminación de las proteínas que acompañan al mRNA a través del NPC. Sin embargo, su acumulación en el núcleo en determinados mutantes también sugiere una función para Dbp5p en el lado nuclear del NPC. Se ha puesto de manifiesto que la participación de Dbp5p comienza de forma temprana en la biogénesis de los mRNAs (Estruch y Cole, 2003).

1.6.- Acoplamiento entre las diferentes etapas de la expresión génica.

La expresión génica en células eucariotas es un proceso complejo integrado por diferentes etapas cuya ejecución debe coordinarse. La mayor parte de las modificaciones que sufre la molécula de mRNA se producen cotranscripcionalmente. Así, durante la transcripción tiene lugar la adición de la caperuza al extremo 5' del pre-mRNA naciente, la eliminación de intrones por corte y empalme de exones, el procesamiento del extremo 3' y la poliadenilación, así como la incorporación de diferentes proteínas que van a permitir su exportación al citoplasma para su traducción. Aunque se han descrito diferentes maquinarias moleculares encargadas de las distintas etapas, cada una de ellas interacciona física y funcionalmente con las otras, permitiendo el acoplamiento de los procesos y asegurando así una mayor

eficiencia y especificidad en cada paso de la expresión génica (revisado en Maniatis y Reed, 2002). Por tanto, tras el inicio transcripcional, el proceso de transcripción implica no sólo al complejo RNA pol II elongante y a factores de elongación transcripcional, sino que también implica la participación de complejos proteicos involucrados en el procesamiento y la exportación de mRNAs (Dreyfuss *et al.*, 1993).

Objetivos.

Los objetivos fundamentales de esta tesis doctoral son los siguientes:

- 1.- Establecer los efectos de la sobre-expresión de un alelo truncado del gen *RPB2* en el crecimiento y en la exportación de mRNAs del mutante *dpb5-2*, así como en los defectos causados por la depleción del factor transcripcional NC2.
- 2.- La identificación y la caracterización de otras mutaciones capaces de suprimir los defectos causados por la deficiencia en el factor transcripcional NC2.
- 3.- La identificación y la caracterización del gen *IWR1*, uno de los genes cuyas mutaciones suprimen la deficiencia en NC2.
- 4.- El estudio detallado de la función de la proteína Iwr1p en la expresión génica.
- 5.- El análisis de los efectos de la translocación núcleo-citoplasma en la función transcripcional de la proteína Iwr1p.

2.- MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES.

2.1.- Anticuerpos.

En la Tabla 2.1 se indican los anticuerpos utilizados y las concentraciones o cantidades de trabajo. En el caso del análisis por *Western blot* (WB) se indica también la dilución del anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa) empleado para un posterior revelado con el reactivo *ECL Advance*, de GE Healthcare.

Tabla 2.1: Listado de anticuerpos empleados en este trabajo.

Anticuerpo	Aplicación	Casa comercial
Anti-HA monoclonal de ratón (12CA5)	WB: 1:10000 ChrIp: 2 µg	SIGMA (0,4 mg/mL)
Anti-Myc monoclonal de ratón (9E10)	ChrIp: 2 µg	Roche (0,4 mg/mL)
Anti-Rpb1 (8WG16) monoclonal de ratón	ChrIp: 5 µg	Covance (2-3 mg/mL)
Anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa	WB: 1:15000	GE Healthcare

2.2.- Kits comerciales.

Se utilizaron los siguientes kits comerciales, siempre siguiendo las instrucciones del fabricante:

Perfectprep Plasmid Miniprep (Eppendorf)

Perfectprep Plasmid Midiprep (Eppendorf)

Perfectprep Plasmid Maxiprep (Eppendorf)

Perfectprep Gel Cleanup (Eppendorf)

ECL Advance Western blotting Detection Kit (GE Healthcare)

QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)

Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen)

2.3.- Oligonucleótidos.

Todos los oligonucleótidos empleados se adquirieron de *Thermo Electron*. En la Tabla 2.2 se indican los oligonucleótidos utilizados para llevar a cabo las PCR semicuantitativas (qRT-PCR) y las cuantitativas (RT-PCR) que se presentan en este trabajo, así como los empleados para la obtención de sondas para los análisis por *Northern blot*.

Tabla 2.2: Listado de oligonucleótidos empleados en este trabajo.

Oligonucleótido	Secuencia 5' a 3'	Utilidad
RPL17B UP	ATGGCAAGATACGGTGCTA	<i>Northern blot</i>
RPL17B DOWN	TACCTCTTTGTCTAGAAG TC	<i>Northern blot</i>
PGK1 ORF 1	CTTCAAAGTTGTCTGTCCAAG	<i>Northern blot</i>
PGK1 ORF 1200	GCAACACCTGGCAATTCC	<i>Northern blot</i>
ADH1 ORF 1	ATGTCTATCCCAGAACTC	<i>Northern blot</i>
ADH1 ORF 980	GGCAAGGTAGACAAGCCGAC	<i>Northern blot</i>
SCR1 up	GGGATGGGATACGTTGAGAA	<i>Northern blot</i>
SCR1 down	CACAATGTGCGAGTAAATCC	<i>Northern blot</i>
GAL10 +70	GGTTCACACACTGTGGTA	<i>Northern blot</i>
GAL10 r2000	CTTGGACCCGTAAGTTTCA	<i>Northern blot</i>
SDP1-1	CTATGCTGGCCACAGATGA	PCR semicuantitativa
SDP1-2	CGTAGCTGCGTGTATGATG	PCR semicuantitativa
UTR5 +100	CCACTGTTTCCTTACCTTC	PCR semicuantitativa
UTR5 +420	GATATATCCGGCTCAACAG	PCR semicuantitativa
YOL131w-1	ATAGCACAAGACGAAGTCC	PCR semicuantitativa
YOL131w-2	CTAGTATTGCGAATCTACC	PCR semicuantitativa
ECM23 +10	CAAAGAGCAGGGAACAAGC	PCR semicuantitativa
ECM23 +379	GCACTCTTTTGGTTGACCG	PCR semicuantitativa
YPL272c +1	ATGACTACGTTTAGGCCAC	PCR semicuantitativa
YPL272c +360	CCAATGGCAATTGACCTCC	PCR semicuantitativa

Oligonucleótido	Secuencia 5' a 3'	Utilidad
HIS4-1	CCGTTAATTGATGATCTGG	PCR semicuantitativa
HIS4-2	ACGGTCTGTACGTACTIONCA	PCR semicuantitativa
ACT1-1	GGATCTTCTACTACATCAGC	PCR semicuantitativa
ACT1-2	CACATACCAGAACCGTTATC	PCR semicuantitativa
GAL1 UP	CCAAGACCATTGGCCGAAAA	<i>Northern blot</i>
GAL1 +1560	GGTTTAGAGACGATGATAGC	<i>Northern blot</i>
ARG1 P+20	CTAAACCACCAGAATAAGCC	PCR semicuantitativa
ARG1 P-400	AGAGCGCTATGTTAGTCAC	PCR semicuantitativa
ATP16 UP	TCATATGCAGAAGCTGCT	PCR semicuantitativa
ATP16 DOWN	TTGCAGCTTCTGCGGCTTC	PCR semicuantitativa
GAP1-20	CGTACGAGAAGAATAATCC	PCR semicuantitativa
GAP1-320	ACCACCTGTTCTTAGTGCA	PCR semicuantitativa
PHO11P-335	CAGAACACATCCCTAAACG	PCR semicuantitativa
PHO11P+20	ACGGCTGACTTCAACATTG	PCR semicuantitativa
PHO12 +30	GCCGCTTCTTTGGTTAATG	PCR semicuantitativa
PHO12 +445	GCGTGTCTCTTAGCATTCA	PCR semicuantitativa
PAU3 up	CTTCAATCGCTGCTGGTGT	PCR semicuantitativa
PAU3 down	GTGTAGATACCGTCCTTAG	PCR semicuantitativa
CIT2-80	GATTTAGCGAAATCTACCC	PCR semicuantitativa
CIT2-380	CTTGCGCTTGAGTTGGAAC	PCR semicuantitativa
RPL9A-10	AACAACAAATCGAAGTCCC	PCR semicuantitativa
RPL9A-390	GTAACACCATCTCTAACTG	PCR semicuantitativa
IWR1-intron-U	GGGATGAGGATTCTGTGCA	PCR semicuantitativa
IWR1-intron-D	GCTATATCCTCTCCTTCGC	PCR semicuantitativa
ARG1 up	GCTTGGCTACTAGACCAAG	<i>Northern blot</i>
ARG1 down	CTGGCTTCAGAGCGTAAAA	<i>Northern blot</i>
ATP16 up	TCATATGCAGAAGCTGCTG	<i>Northern blot</i>

Oligonucleótido	Secuencia 5' a 3'	Utilidad
ATP16 down	TTGCAGCTTCTGCGGCTTC	<i>Northern blot</i>
SUC2 60	GACAAACGAAACTAGCGATA	<i>Northern blot</i>
SUC2 1550	AGTGGTCATGTTACAGATC	<i>Northern blot</i>
PHO5 60	CTTTGGCCAATGCAGGTACC	<i>Northern blot</i>
PHO5 1320	GACGTTACAGACCTTTAGGA	<i>Northern blot</i>
PHO11-UP	TGGTTAATGCAGGTACCA	<i>Northern blot</i>
PHO11 +1380	GTAGTGCTTGGTATTCCAG	<i>Northern blot</i>
PHO84 +60	CTTACCGAAGGTGGTAACATG	<i>Northern blot</i>
PHO84 +1740	GGGCTGGAAGATTCAATGTCA	<i>Northern blot</i>
PHO5-D-up	GTCAGAGATCAAGTCAGAGC	<i>Southern blot</i>
PHO5-D-down	GTCCTGTAAAGAGAGCGTG	<i>Southern blot</i>
INTERGENIC A	GGCTGTCAGAATATGGGGCCGT ...GTA	RT-PCR
INTERGENIC B	CACCCCGAAGCTGCTTTCACAA TAC	RT-PCR
PHO5 UAS _{p2} -A	TGGAAGTCATCTTATGTGCGCT GC	RT-PCR
PHO5 UAS _{p2} -B	ACGTGTGACTGCCAAGGTTGTA TC	RT-PCR
TATA-PHO5 RT	TTGGTCACCTTACTTGGCAAGG CAT	RT-PCR
TATA-PHO5 RT2	TGGTAATCTCGAATTTGCTTGC TCT	RT-PCR
PHO5 RT1	GGTCCAGGGTTCTCTTGTGAAA TC	RT-PCR
PHO5 RT2	TGTTCCAGTCCCAGTAGAAGGT CA	RT-PCR

Oligonucleótido	Secuencia 5' a 3'	Utilidad
SUC2 TATA A	CATTTGGAAGAAAGATTTGACG	RT-PCR
SUC2 TATA B	GCTTTTTGTGTTTTGCTTGTTTC TC	RT-PCR
ARG1-51	ATGTTTCCTTATCGCTGCACA	RT-PCR
ARG1-197	TAATCTGAGCAGTTGCGAGA	RT-PCR
ARG1-213	GCAGTCATCAATCTGATCCA	RT-PCR
ARG1-378	ACGGCTCTCCAGTCATTTAT	RT-PCR

La sonda para el gen *HSP26* se obtuvo por digestión *SphI/BglII* del plásmido pVZ26 (Susek y Lindquist, 1990).

2.4.- Plásmidos.

En la Tabla 2.3 se detallan los plásmidos que se emplearon para la obtención de módulos de integración. Con estos módulos se transformaron células de levadura con el fin de obtener mutantes de delección, cambiar el promotor o etiquetar proteínas. También se detallan los plásmidos portadores de genes reporteros, plásmidos utilizados para el cálculo de cocientes GLAM y los empleados para las construcciones llevadas a cabo en el curso de este trabajo.

Tabla 2.3: Listado de plásmidos empleados en este trabajo.

Plásmido	Descripción	Referencia
pFA6a-KanMX4	Integración del marcador <i>KanMX4</i> para deleccionar genes.	Wach <i>et al.</i> , 1994
pFA6a-KanMX6	Integración del marcador <i>KanMX6</i> para deleccionar genes.	Longtine <i>et al.</i> , 1998
pFA6a-TRP1	Integración del marcador <i>TRP1</i> para deleccionar genes.	Longtine <i>et al.</i> , 1998
pFA6a-His3MX6	Integración del marcador <i>His3MX6</i> (<i>his5⁺</i> de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>) para deleccionar genes.	Longtine <i>et al.</i> , 1998

Plásmido	Descripción	Referencia
pFA6a-GFP(S65T)-KanMX6	Integración del epítipo GFP con marcador <i>KanMX6</i> .	Longtine <i>et al.</i> , 1998
pFA6a-GFP(S65T)-His3MX6	Integración del epítipo GFP con marcador <i>His3MX6</i> (<i>his5⁺</i> de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>).	Longtine <i>et al.</i> , 1998
pFA6a-3HA-KanMX6	Integración de 3 copias del epítipo HA con marcador <i>KanMX6</i> .	Longtine <i>et al.</i> , 1998
pFA6a-3HA-His3MX6	Integración de 3 copias del epítipo HA con marcador <i>His3MX6</i> (<i>his5⁺</i> de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>).	Longtine <i>et al.</i> , 1998
pFA6a-13Myc-KanMX6	Integración de 13 copias del epítipo Myc con marcador <i>KanMX6</i> .	Longtine <i>et al.</i> , 1998
pFA6a-13Myc-His3MX6	Integración de 13 copias del epítipo Myc con marcador <i>His3MX6</i> (<i>his5⁺</i> de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>).	Longtine <i>et al.</i> , 1998
pFA6a-KanMX6-PGAL1-3HA	Sustitución del promotor de un gen por el promotor del gen <i>GAL1</i> , simultáneamente a la integración de 3 copias del epítipo HA con marcador <i>KanMX6</i> .	Longtine <i>et al.</i> , 1998
pFA6a-His3MX6-PGAL1-3HA	Sustitución del promotor de un gen por el promotor del gen <i>GAL1</i> , simultáneamente a la integración de 3 copias del epítipo HA con marcador <i>His3MX6</i> (<i>his5⁺</i> de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>).	Longtine <i>et al.</i> , 1998
pCM225	Sustitución del promotor de un gen por el promotor regulable por doxiciclina <i>tetO₇</i> con marcador <i>KanMX4</i> .	Bellí <i>et al.</i> , 1998
pRAT8.31	Plásmido centromérico con marcador <i>URA3</i> que expresa el gen <i>DBP5/RAT8</i> .	Snay-Hodge <i>et al.</i> , 1998
pCS833	Plásmido 2 μ con marcador <i>LEU2</i> que sobre-expresa el gen	Hodge <i>et al.</i> , 1999

<i>DBP5/RAT8.</i>		
Plásmido	Descripción	Referencia
YEp13	Plásmido 2 μ con marcador <i>LEU2</i> en el que se clonó la genoteca genómica para llevar a cabo el rastreo genómico de supresión en multicopia.	Nasmyth <i>et al.</i> , 1980
pRP212	Plásmido centromérico con marcador <i>URA3</i> que expresa el gen <i>RPB2</i> .	Scafe <i>et al.</i> , 1990
pRP112	Plásmido centromérico con marcador <i>URA3</i> que expresa el gen <i>RPB1</i> .	Nonet <i>et al.</i> , 1987
pSH18-34	Plásmido 2 μ con marcador <i>URA3</i> que contiene el gen reportero <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i> y cuyo promotor incluye los sitios de unión de LexA.	Estojak <i>et al.</i> , 1995
pLexA-GAL4	Plásmido 2 μ con marcador <i>TRP1</i> y con el dominio de unión de LexA fusionado al <i>GAL4</i> .	Moretti <i>et al.</i> , 1994
YEp26	Plásmido 2 μ con marcador <i>URA3</i> que contiene el gen reportero <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i> bajo control del promotor del gen <i>HSP26</i> .	Martínez-Pastor, 1996 (Tesis, Doctoral. Universitat de València)
pYCG_YDL115c	Plásmido centromérico (pRS416) con marcador <i>URA3</i> que expresa el gen <i>IWRI</i> .	EUROFAN
pBTM116 (pLexA)	Plásmido 2 μ con marcador <i>TRP1</i> y con el dominio de unión de LexA bajo control del promotor del gen <i>ADHI</i> .	Bartel y Fields, 1995
pSch202	Plásmido centromérico con marcador <i>URA3</i> que contiene la región codificante del gen <i>PHO5</i> bajo control del promotor del gen <i>GALI</i> .	Morillo-Huesca <i>et al.</i> , 2006
pSch212	pSch202 con la región codificante del gen <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i> fusionado a la región 3'-UTR del gen <i>PHO5</i> .	Morillo-Huesca <i>et al.</i> , 2006

Plásmido	Descripción	Referencia
pSCh255	pSCh202 con la región codificante del gen <i>lac4</i> de <i>Kluyveromyces lactis</i> fusionado a la región 3'-UTR del gen <i>PHO5</i> .	Morillo-Huesca <i>et al.</i> , 2006
p416-P _{GALI} -lacZ	Plásmido centromérico con marcador <i>URA3</i> que contiene el gen reportero <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i> bajo control del promotor del gen <i>GALI</i> .	Barbaric <i>et al.</i> , 2001
YCplac33	Vector de clonación centromérico con marcador <i>URA3</i> .	Gietz y Sugino, 1988
YCplac111	Vector de clonación centromérico con marcador <i>LEU2</i> .	Gietz y Sugino, 1988
YEplac181	Vector de clonación 2 μ con marcador <i>LEU2</i> .	Gietz y Sugino, 1988
YEplac195	Vector de clonación 2 μ con marcador <i>URA3</i> .	Gietz y Sugino, 1988
pRS316	Vector de clonación centromérico con marcador <i>URA3</i> .	Sikorski y Hieter, 1989
pRS425	Vector de clonación 2 μ con marcador <i>LEU2</i> .	Sikorski y Hieter, 1989
pRS426	Vector de clonación 2 μ con marcador <i>URA3</i> .	Sikorski y Hieter, 1989

Los plásmidos que contienen delecciones C-terminales del gen *RPB2* fueron construidos subclonando en el vector multicopia YEplac181 diferentes fragmentos de restricción de la ORF de este gen presente en el plásmido pRP212. Todos estos fragmentos empiezan en el sitio de restricción *XbaI*, localizado en la posición -872 relativa al codón ATG y terminan en las posiciones indicadas en la Tabla 2.4:

Tabla 2.4: Listado de los sitios de restricción, y sus posiciones, empleados para la construcción de los plásmidos con deleciones C-terminales de *RPB2*.

Sitio de restricción	Posición relativa al ATG
<i>Pst</i> I	+77
<i>Sna</i> BI	+357
<i>Bgl</i> II	+721
<i>Eco</i> RI	+1075
<i>Xba</i> I (<i>rpb2t</i>)	+1137
<i>Eco</i> RV	+1824
<i>Xho</i> I	+2128
<i>Sca</i> I	+2829
<i>Sal</i> I	+4616

El plásmido para la sobre-expresión de la truncación C-terminal del gen *RPB1* fue construido por subclonación del fragmento *Hind*III-*Xba*I procedente del plásmido pRP112 en el vector multicopia YEplac181. Este plásmido fue digerido con las enzimas de restricción *Xba*I y *Bam*HI, situados en el *polylinker*, y a este vector digerido se le añadió, empleando la T4 DNA ligasa, el fragmento *Xba*I-*Bgl*II obtenido mediante amplificación por PCR del molde pFA6a-13Myc-His3MX6. De este modo, se introdujo en el sitio de restricción *Xba*I, un epítipo 13xMyc en pauta con *RPB1* (posición +2532) así como el terminador del gen *ADHI*.

Los plásmidos YEplac195-RPB12, pRS425-RPB9, pRS426-SIN4, pRS316-NUT2, pRS316-YDR1, pRS316-BUR6, YCplac111-YDR1 y YCplac111-BUR6 fueron construidos subclonando en los vectores correspondientes los fragmentos de restricción obtenidos mediante amplificación por PCR del DNA genómico de una cepa silvestre (FY86), empleando los cebadores adecuados para amplificar el gen de interés.

El plásmido YCplac111-LexA-GAL4 se obtuvo por clonación de un fragmento de restricción *SphI* del plásmido pLexA-GAL4 que contenía la fusión *LexA-GAL4*, en el vector YCplac111.

Para la obtención del plásmido YCplac111-LexA-GCN4 se amplificó un fragmento de PCR que contenía el gen *GCN4* y en el que se generaron sitios de restricción *BamHI* y *PstI* en las regiones inmediatamente aguas arriba y aguas abajo, respectivamente, de la secuencia codificante de *GCN4*. El fragmento resultante se digirió con estas enzimas y se clonó en el vector pLexA (pBTM116), previamente digerido con las enzimas *BamHI* y *PstI*. Esta construcción pLexA-GCN4 se digirió con la enzima *SphI* y el fragmento resultante se clonó en el vector YCplac111.

El plásmido YCplac33-IWR1-GFP se construyó a partir del DNA genómico de la cepa que contiene el alelo *IWR1::GFP::Kan^R*. Este DNA fue digerido con las enzimas de restricción *XbaI* y *SphI*, y el fragmento originado se subclonó en el vector YCplac33. Los plásmidos con el inserto correcto se seleccionaron en placas de LB+ampicilina+kanamicina. El plásmido YCplac33-IWR1 Δ NES-GFP se construyó mediante amplificación por PCR del plásmido YCplac33-IWR1-GFP empleando oligonucleótidos parcialmente solapantes en los que se eliminaron los nucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos IIEHIDLAL. El producto de PCR se digirió con *DpnI* y se empleó para transformar *E. coli*. Se comprobó la correcta obtención de este plásmido mediante secuenciación de la ORF entera de *IWR1*.

El plásmido pLexA-IWR1 se obtuvo generando sitios de restricción *BamHI* y *SalI* mediante PCR en las regiones inmediatamente aguas arriba y aguas abajo, respectivamente, de la secuencia codificante de *IWR1*. El fragmento resultante se clonó en el vector pBTM116.

El plásmido para la sobre-expresión de Pho4p (YEplac181-PHO4) se obtuvo generando sitios de restricción *SpeI* y *HindIII* mediante PCR en las regiones inmediatamente aguas arriba y aguas abajo, respectivamente, de la

secuencia codificante de *PHO4*. El fragmento resultante se digirió con las enzimas *SpeI* y *HindIII* y se clonó en el vector YEplac181 digerido con las enzimas *XbaI* y *HindIII*.

2.5.- Cepas.

2.5.1.- Cepas de *E. coli*.

Se ha utilizado la cepa de *E. coli* DH5 α (*F*, *endA1*, *hsdr17*, (*rk*, *mk*), *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *RelA1*, *80dlacZ*, Δ *M15*).

2.5.2.- Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Todas las cepas de levadura utilizadas en este trabajo se encuentran detalladas en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5: Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo	Fuente
BY4743	<i>MATα his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 LYS2/lys2Δ0 met15Δ0/MET15 ura3Δ0/ura3Δ0</i>	Open Biosystems
FY86	<i>MATα leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200</i>	Winston <i>et al.</i> , 1995
FY23	<i>MATα leu2Δ1 ura3-52 trp1Δ63</i>	Winston <i>et al.</i> , 1995
<i>dbp5-2</i> (CSY550)	<i>MATα leu2Δ1 ura3-52 trp1Δ63 Rat8-2</i>	Snay-Hodge <i>et al.</i> , 1998
CSY564	<i>MATα leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 rat8-2 [pRAT8.31]</i>	Estruch y Cole, 2003
<i>bur6-1</i>	<i>MATα ura3-52 trp1Δ63 his4-912δ lys2-128δ bur6-1</i>	Prelich, 1997
<i>dbp5-2 bur6-1</i>	<i>MATα leu2Δ1 ura3-52 lys2-128δ rat8-2 bur6-1 [pRAT8.31]</i>	Estruch y Cole, 2003
<i>mot1-301</i>	<i>MATα ura3-52 leu2Δ1 his4-912δ lys2-128δ mot1-301</i>	Prelich, 1997
<i>dbp5-2 mot1-301</i>	<i>MATα leu2Δ1 ura3-52 trp1Δ63 Rat8-2 mot1-301 [pRAT8.31]</i>	Estruch y Cole, 2003
<i>P_{tetO}-DBP5</i>	<i>MATα leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 KanMX4::<i>tetO</i>₇-DBP5</i>	este trabajo

Cepa	Genotipo	Fuente
<i>P_{tetO}-RPB1</i>	<i>MATα his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0</i> <i>URA3::CMV-tTA</i> <i>Kan^R-teto₇-TATA::RPB1</i>	Open Biosystems
<i>P_{tetO}-RPB2</i>	<i>MATα his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0</i> <i>URA3::CMV-tTA</i> <i>Kan^R-teto₇-TATA::RPB2</i>	Open Biosystems
<i>P_{tetO}-RPB7</i>	<i>MATα leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200</i> <i>KanMX4::tetO₇-RPB7</i>	este trabajo
<i>P_{tetO}-RPB1 dbp5-2</i>	<i>MAT? leu2Δ his3Δ rat8-2</i> <i>URA3::CMV-tTA</i> <i>Kan^R-teto₇-TATA::RPB1</i>	este trabajo
<i>P_{tetO}-RPB2 dbp5-2</i>	<i>MAT? leu2Δ his3Δ rat8-2</i> <i>URA3::CMV-tTA</i> <i>Kan^R-teto₇-TATA::RPB2</i>	este trabajo
<i>P_{tetO}-RPB7 dbp5-2</i>	<i>MATα leu2Δ1 ura3-52 trp1Δ63</i> <i>Rat8-2 KanMX4::tetO₇-RPB7</i>	este trabajo
<i>dbp5-2 Δrpb9</i>	<i>MAT? leu2Δ ura3Δ his3Δ rat8-2</i> <i>Y04437w::KanMX4</i>	este trabajo
<i>P_{GALI}-BUR6/Kan^R</i>	<i>MATα leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200</i> <i>GALI::3HA-BUR6::KanMX6</i>	este trabajo
<i>P_{GALI}-YDR1/Kan^R</i>	<i>MATα leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200</i> <i>GALI::3HA-YDR1::KanMX6</i>	este trabajo
<i>P_{GALI}-BUR6/his5</i>	<i>MATα leu2Δ1 ura3-52</i> <i>GALI::3HA-BUR6::his5</i>	este trabajo
<i>P_{GALI}-YDR1/his5</i>	<i>MATα leu2Δ1 ura3-52</i> <i>GALI::3HA-YDR1::his5</i>	este trabajo
<i>P_{GALI}-MOT1</i>	<i>MATα leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200</i> <i>GALI::3HA-MOT1::KanMX6</i>	este trabajo
<i>P_{GALI}-BUR6</i> <i>P_{GALI}-YDR1</i>	<i>MATα leu2Δ1 ura3-52</i> <i>GALI::3HA-BUR6::KanMX6</i> <i>GALI::3HA-YDR1::his5</i>	este trabajo
<i>BUR6 shuffle</i>	<i>MATα ura3-52 leu2-3 his3-11 trp1-1</i> <i>ade2-1 bur6::his5</i> [pBUR6/CEN/URA3]	D. Reinberg
<i>bur6-ts</i>	<i>MATα ura3-52 leu2-3 his3-11 trp1-1</i> <i>ade2-1 bur6::his5</i> [pbur6-ts/CEN/LEU2]	D. Reinberg
<i>P_{GALI}-ROT1/Kan^R</i>	<i>MATα leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200</i> <i>GALI::3HA-BUR6::KanMX6</i>	este trabajo

Cepa	Genotipo	Fuente
<i>Δbur6 Δsrb2</i>	<i>MATa ura3-52 leu2-3 his3-11 trp1-1 ade2-1 bur6::his5</i> [pBUR6/CEN/URA3] <i>YHR041c::KanMX4</i>	este trabajo
<i>Δbur6 P_{tetO}-NUT2</i>	<i>MATa ura3-52 leu2-3 his3-11 trp1-1 ade2-1 bur6::his5</i> [pBUR6/CEN/URA3] <i>KanMX4::tetO₇-NUT2</i>	este trabajo
<i>Δbur6 P_{tetO}-RPB7</i>	<i>MATa ura3-52 leu2-3 his3-11 trp1-1 ade2-1 bur6::his5</i> [pBUR6/CEN/URA3] <i>KanMX4::tetO₇-RPB7</i>	este trabajo
<i>Δbur6 P_{tetO}-MED7</i>	<i>MATa ura3-52 leu2-3 his3-11 trp1-1 ade2-1 bur6::his5</i> [pBUR6/CEN/URA3] <i>KanMX4::tetO₇-MED7</i>	este trabajo
<i>Δbur6 P_{tetO}-TFB1</i>	<i>MATa ura3-52 leu2-3 his3-11 trp1-1 ade2-1 bur6::his5</i> [pBUR6/CEN/URA3] <i>KanMX4::tetO₇-TFB1</i>	este trabajo
<i>YDR1 shuffle</i>	<i>MATa ura3Δ0 his3Δ1 leu2Δ0 ydr1::his5</i> [pRS316-YDR1]	este trabajo
<i>Δydr1 Δsrb2</i>	<i>MATa ura3Δ0 his3Δ1 leu2Δ0 ydr1::his5</i> [pRS316-YDR1] <i>YHR041c::KanMX4</i>	este trabajo
<i>Δydr1 P_{tetO}-RPB7</i>	<i>MATa ura3Δ0 his3Δ1 leu2Δ0 ydr1::his5</i> [pRS316-YDR1] <i>KanMX4::tetO₇-RPB7</i>	este trabajo
<i>Δydr1 P_{tetO}-TFB1</i>	<i>MATa ura3Δ0 his3Δ1 leu2Δ0 ydr1::his5</i> [pRS316-YDR1] <i>KanMX4::tetO₇-TFB1</i>	este trabajo
<i>P_{tetO}-NUT2</i>	<i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 URA3::CMV-tTA</i> <i>Kan^R-teto₇-TATA::NUT2</i>	Open Biosystems
<i>P_{tetO}-NUT2</i> <i>P_{GALI}-YDR1</i>	<i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 URA3::CMV-tTA</i> <i>Kan^R-teto₇-TATA::NUT2</i> <i>GALI::3HA-YDR1::his5</i>	este trabajo

Cepa	Genotipo	Fuente
<i>Diploide</i> <i>NUT2/nut2Δ</i>	<i>MATa/MATα his3-Δ1/ his3-Δ1</i> <i>leu2-Δ0/ leu2-Δ0 lys2-Δ/LYS2</i> <i>MET15/ met15-Δ0 ura3-Δ0/ura3-Δ0</i> <i>nut1::KanMX4/NUT2</i> [pNUT2-URA3-CEN]	este trabajo
<i>Δsrb5/Δmed18</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i> <i>ura3-0 YGR104c::KanMX4</i>	EUROSCARF
<i>Δsrb2/Δmed20</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i> <i>ura3-0 YHR041c::KanMX4</i>	EUROSCARF
<i>Δmed1</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i> <i>ura3-0 YPR070w::KanMX4</i>	EUROSCARF
<i>Δnut1/Δmed5</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i> <i>ura3-0 YGL151w::KanMX4</i>	EUROSCARF
<i>Δsoh1/Δmed31</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i> <i>ura3-0 YGL127c::KanMX4</i>	EUROSCARF
<i>Δcse2/Δmed9</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i> <i>ura3-0 YNR010w::KanMX4</i>	EUROSCARF
<i>Δsin4/Δmed16</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i> <i>ura3-0 YNL236w::KanMX4</i>	EUROSCARF
<i>Δmed3/Δpgd1</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i> <i>ura3-0 YGL025c::KanMX4</i>	EUROSCARF
<i>Δmed2</i>	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0</i> <i>ura3-0 YDL005c::KanMX4</i>	EUROSCARF
<i>Δgal11/Δmed15</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i> <i>ura3-0 YOL051w::KanMX4</i>	EUROSCARF
<i>Δsrb10</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i> <i>ura3-0 YPL042c::KanMX4</i>	EUROSCARF
<i>Δsrb11</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i> <i>ura3-0 YNL025c::KanMX4</i>	EUROSCARF
<i>Δsrb8/Δmed12</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i> <i>ura3-0 YCR081w::KanMX4</i>	EUROSCARF
<i>Δsrb9/Δmed13</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i> <i>ura3-0 YDR443c::KanMX4</i>	EUROSCARF
<i>Δsrb5/Δmed18</i> <i>P_{GALI}-BUR6</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i> <i>ura3-0 YGR104c::KanMX4</i> <i>GAL1::3HA-BUR6::his5</i>	este trabajo
<i>Δsrb2/Δmed20</i> <i>P_{GALI}-BUR6</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i> <i>ura3-0 YHR041c::KanMX4</i> <i>GAL1::3HA-BUR6::his5</i>	este trabajo

Cepa	Genotipo	Fuente
<i>Δmed1</i> <i>P_{GALI}-BUR6</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i> <i>ura3-0 YPR070w::KanMX4</i> <i>GALI::3HA-BUR6::his5</i>	este trabajo
<i>Δnut1/Δmed5</i> <i>P_{GALI}-BUR6</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i> <i>ura3-0 YGL151w::KanMX4</i> <i>GALI::3HA-BUR6::his5</i>	este trabajo
<i>Δsoh1/Δmed31</i> <i>P_{GALI}-BUR6</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i> <i>ura3-0 YGL127c::KanMX4</i> <i>GALI::3HA-BUR6::his5</i>	este trabajo
<i>Δcse2/Δmed9</i> <i>P_{GALI}-BUR6</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i> <i>ura3-0 YNR010w::KanMX4</i> <i>GALI::3HA-BUR6::his5</i>	este trabajo
<i>Δsin4/Δmed16</i> <i>P_{GALI}-BUR6</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i> <i>ura3-0 YNL236w::KanMX4</i> <i>GALI::3HA-BUR6::his5</i>	este trabajo
<i>Δmed3/Δpgd1</i> <i>P_{GALI}-BUR6</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i> <i>ura3-0 YGL025c::KanMX4</i> <i>GALI::3HA-BUR6::his5</i>	este trabajo
<i>Δmed2</i> <i>P_{GALI}-BUR6</i>	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3-0</i> <i>YDL005c::KanMX4</i> <i>GALI::3HA-BUR6::his5</i>	este trabajo
<i>Δgal11/Δmed15</i> <i>P_{GALI}-BUR6</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i> <i>ura3-0 YOL051w::KanMX4</i> <i>GALI::3HA-BUR6::his5</i>	este trabajo
<i>Δsrb10</i> <i>P_{GALI}-BUR6</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i> <i>ura3-0 YPL042c::KanMX4</i> <i>GALI::3HA-BUR6::his5</i>	este trabajo
<i>Δsrb11</i> <i>P_{GALI}-BUR6</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i> <i>ura3-0 YNL025c::KanMX4</i> <i>GALI::3HA-BUR6::his5</i>	este trabajo
<i>Δsrb8 Δmed12</i> <i>P_{GALI}-BUR6</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i> <i>ura3-0 YCR081w::KanMX4</i> <i>GALI::3HA-BUR6::his5</i>	este trabajo
<i>Δsrb9 Δmed13</i> <i>P_{GALI}-BUR6</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i> <i>ura3-0 YDR443c::KanMX4</i> <i>GALI::3HA-BUR6::his5</i>	este trabajo
<i>Δsrb2/Δmed20</i> <i>P_{GALI}-YDR1</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i> <i>ura3-0 YHR041c::KanMX4</i> <i>GALI::3HA-YDR1::his5</i>	este trabajo

Cepa	Genotipo	Fuente
<i>Δmed1</i> <i>P_{GALI}-YDR1</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i> <i>ura3-0 YPR070w::KanMX4</i> <i>GALI::3HA-YDR1::his5</i>	este trabajo
<i>Δnut1/Δmed5</i> <i>P_{GALI}-YDR1</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i> <i>ura3-0 YGL151w::KanMX4</i> <i>GALI::3HA-YDR1::his5</i>	este trabajo
<i>Δsoh1/Δmed31</i> <i>P_{GALI}-YDR1</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i> <i>ura3-0 YGL127c::KanMX4</i> <i>GALI::3HA-YDR1::his5</i>	este trabajo
<i>Δcse2/Δmed9</i> <i>P_{GALI}-YDR1</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i> <i>ura3-0 YNR010w::KanMX4</i> <i>GALI::3HA-YDR1::his5</i>	este trabajo
<i>Δsin4/Δmed16</i> <i>P_{GALI}-YDR1</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i> <i>ura3-0 YNL236w::KanMX4</i> <i>GALI::3HA-YDR1::his5</i>	este trabajo
<i>Δmed3/Δpgd1</i> <i>P_{GALI}-YDR1</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i> <i>ura3-0 YGL025c::KanMX4</i> <i>GALI::3HA-YDR1::his5</i>	este trabajo
<i>Δmed2</i> <i>P_{GALI}-YDR1</i>	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3-0</i> <i>YDL005c::KanMX4</i> <i>GALI::3HA-YDR1::his5</i>	este trabajo
<i>Δgal11/Δmed15</i> <i>P_{GALI}-YDR1</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i> <i>ura3-0 YOL051w::KanMX4</i> <i>GALI::3HA-YDR1::his5</i>	este trabajo
<i>Δsrb10</i> <i>P_{GALI}-YDR1</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i> <i>ura3-0 YPL042c::KanMX4</i> <i>GALI::3HA-YDR1::his5</i>	este trabajo
<i>Δsrb11</i> <i>P_{GALI}-YDR1</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i> <i>ura3-0 YNL025c::KanMX4</i> <i>GALI::3HA-YDR1::his5</i>	este trabajo
<i>Δsrb8/Δmed12</i> <i>P_{GALI}-YDR1</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i> <i>ura3-0 YCR081w::KanMX4</i> <i>GALI::3HA-YDR1::his5</i>	este trabajo
<i>Δsrb9/Δmed13</i> <i>P_{GALI}-YDR1</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i> <i>ura3-0 YDR443c::KanMX4</i> <i>GALI::3HA-YDR1::his5</i>	este trabajo
<i>Δsrb2 Δmed3</i> <i>P_{GALI}-YDR1</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i> <i>ura3-0 YHR041c::KanMX4</i> <i>GALI::3HA-YDR1::his5</i> <i>med3-Δ1::LEU2</i>	este trabajo

Cepa	Genotipo	Fuente
P_{tetO} -TFB1 P_{GALI} -YDR1	$MAT\alpha$ <i>leu2</i> Δ 0 <i>ura3</i> -0 <i>KanMX4-tetO</i> ₇ ::TFB1 <i>GALI::3HA-YDR1::his5</i>	este trabajo
P_{tetO} -TFB1 P_{GALI} -YDR1 Δ med2	$MAT\alpha$ <i>leu2</i> Δ 0 <i>ura3</i> -0 <i>KanMX4-tetO</i> ₇ ::TFB1 <i>GALI::3HA-YDR1::his5</i> <i>med2::TRP1</i>	este trabajo
P_{tetO} -RPB7 P_{GALI} -YDR1	$MAT\alpha$ <i>leu2</i> Δ 0 <i>ura3</i> -0 <i>KanMX4-tetO</i> ₇ ::RPB7 <i>GALI::3HA-YDR1::his5</i>	este trabajo
P_{tetO} -RPB7 P_{GALI} -YDR1 Δ med2	$MAT\alpha$ <i>leu2</i> Δ 0 <i>ura3</i> -0 <i>KanMX4-tetO</i> ₇ ::RPB7 <i>GALI::3HA-YDR1::his5</i> <i>med2::TRP1</i>	este trabajo
P_{tetO} -BUR6	$MAT\alpha$ <i>leu2</i> Δ 1 <i>ura3</i> -52 <i>his3</i> Δ 200 <i>KanMX4::tetO</i> ₇ -BUR6	este trabajo
P_{tetO} -BUR6 Δ srb2	$MAT\alpha$ <i>leu2</i> Δ 1 <i>ura3</i> -52 <i>his3</i> Δ 200 <i>KanMX4::tetO</i> ₇ -BUR6 <i>YHR041c::his5</i>	este trabajo
P_{tetO} -BUR6 Δ med2	$MAT\alpha$ <i>leu2</i> Δ 1 <i>ura3</i> -52 <i>his3</i> Δ 200 <i>KanMX4::tetO</i> ₇ -BUR6 <i>YDL005c::his5</i>	este trabajo
Δ rbp9	$MAT\alpha$ <i>his3</i> Δ 1 <i>leu2</i> Δ 0 <i>met15</i> Δ 0 <i>ura3</i> -0 <i>Y04437w::KanMX4</i>	EUROSCARF
Δ rbp9 P_{GALI} -YDR1	$MAT\alpha$ <i>leu2</i> Δ 0 <i>met15</i> Δ 0 <i>ura3</i> -0 <i>Y04437w::KanMX4</i> <i>GALI::3HA-YDR1::his5</i>	este trabajo
P_{tetO} -RPB1 P_{GALI} -YDR1	$MAT\alpha$ <i>leu2</i> - Δ 0 <i>met15</i> - Δ 0 <i>URA3::CMV-tTA</i> <i>Kan^R-teto</i> ₇ -TATA::RPB1 <i>GALI::3HA-YDR1::his5</i>	este trabajo
P_{tetO} -RPB2 P_{GALI} -YDR1	$MAT\alpha$ <i>leu2</i> - Δ 0 <i>met15</i> - Δ 0 <i>URA3::CMV-tTA</i> <i>Kan^R-teto</i> ₇ -TATA::RPB2 <i>GALI::3HA-YDR1::his5</i>	este trabajo
<i>ssl1</i> -1	$MAT\alpha$ <i>ura3</i> -52 <i>ino1</i> -13 <i>ssl1</i> -1	Yoon <i>et al.</i> , 1992
<i>rad3</i> -20	$MAT\alpha$ <i>ade2</i> -1 <i>can1</i> -100 <i>HIS3</i> · <i>Leu2</i> -3,112 <i>trp1</i> -1 <i>ura3</i> -1 <i>rad3</i> -20	A. Bailis
Δ ada2	$MAT\alpha$ <i>his3</i> Δ 1 <i>leu2</i> Δ 0 <i>met15</i> Δ 0 <i>ura3</i> -0 <i>ada2</i> Δ :: <i>KanMX4</i>	R. Sendra

Cepa	Genotipo	Fuente
<i>Δgcn5</i>	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3-0 gcn5Δ::KanMX4</i>	R. Sendra
<i>taf1-ts</i>	<i>MATa ura3-52, lys2-801, ade2-101 trp1-Δ1 his3-Δ200 leu2-Δ1 taf130::LEU2 pSW104</i>	Walker <i>et al.</i> , 1996
<i>SUA7-13Myc</i>	<i>MATa ade2-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ura3-1 SUA7::13MYC::TRP1</i>	P.M. Alepuz
<i>ssl1-1 P_{GALI}-YDR1</i>	<i>MATa ura3-52 ino1-13 ssl1-1 GAL1::3HA-YDR1::KanMX6</i>	este trabajo
<i>rad3-20 P_{GALI}-YDR1</i>	<i>MATa ade2-1 can1-100 HIS3-leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 rad3-20 GAL1::3HA-YDR1::KanMX6</i>	este trabajo
<i>Δada2 P_{GALI}-YDR1</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3-0 ada2Δ::kanMX4 GAL1::3HA-YDR1::his5</i>	este trabajo
<i>Δgcn5 P_{GALI}-YDR1</i>	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3-0 gcn5Δ::KanMX4 GAL1::3HA-YDR1::his5</i>	este trabajo
<i>taf1-ts P_{GALI}-YDR1</i>	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ1 his3-Δ200 leu2-Δ1 taf130::LEU2 pSW104 GAL1::3HA-YDR1::KanMX6</i>	este trabajo
<i>SUA7-13Myc P_{GALI}-YDR1</i>	<i>MATa ade2-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ura3-1 SUA7::13MYC::TRP1 GAL1::3HA-YDR1::KanMX6</i>	este trabajo
<i>iwr1-Δ1</i>	<i>MATα leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 iwr1-Δ1::kanMX6</i>	este trabajo
<i>iwr1-Δ2</i>	<i>MATα leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 iwr1-Δ2::kanMX6</i>	este trabajo
<i>Δiwr1::his5</i>	<i>MATα leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 iwr1-Δ1::his5</i>	este trabajo
<i>P_{GALI}-BUR6 Δiwr1</i>	<i>MATα leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 GAL1::3HA-BUR6::kanMX6 Iwr1-Δ1::his5</i>	este trabajo
<i>P_{GALI}-YDR1 Δiwr1</i>	<i>MATα leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 GAL1::3HA-YDR1::kanMX6 Iwr1-Δ1::his5</i>	este trabajo

Cepa	Genotipo	Fuente
<i>Δbur6 Δiwr1</i>	<i>MATa ura3-52 leu2-3 his3-11 trp1-1 ade2-1 bur6::his5 iwr1-Δ1::kanMX6 [pBUR6/CEN/URA3]</i>	este trabajo
<i>bur6-1 Δiwr1</i>	<i>MATa ura3-52 trp1Δ63 his4-912δ lys2-128δ bur6-1 iwr1-Δ1::kanMX6</i>	este trabajo
<i>TAT-7</i>	<i>MATa trp1 leu2 his3 LYS2::lexA-HIS3 ura3::lexA-lacZ</i>	Fujiwara <i>et al.</i> , 1998
<i>xpo1-1</i>	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can 1-100 xpo1::LEU2 [pKW457 (xpo1-1 en pRS313)]</i>	Stade <i>et al.</i> , 1997
<i>cepa silvestre (XPO1)</i>	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can 1-100 xpo1::LEU2 [pKW440 (XPO1 en pRS313)]</i>	Stade <i>et al.</i> , 1997
<i>Δgcn4</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 gcn4::kanMX4</i>	EUROSCARF
<i>Δgcn4 Δiwr1</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 gcn4::kanMX4 iwr1-Δ1::his5</i>	este trabajo
<i>Δhap4</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 hap4::kanMX4</i>	EUROSCARF
<i>Δhap4 Δiwr1</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 hap4::kanMX4 Iwr1-Δ1::his5</i>	este trabajo
<i>Δmig1</i>	<i>MATα his4-539 leu2::HIS3 ura3-52 mig1::LEU2</i>	M. Carlson
<i>Δmig1 Δiwr1</i>	<i>MATα leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 mig1::LEU2 Δiwr1-Δ1::kanMX4</i>	este trabajo
<i>Δhtz1</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 htz1::kanMX4</i>	EUROSCARF
<i>Δhtz1 Δiwr1</i>	<i>MATa leu2Δ0 trp1-Δ63 htz1::kanMX4 Δiwr1-Δ1::kanMX6 [pIWR1/URA3/CEN]</i>	este trabajo
<i>P_{tetO}-IWR1</i>	<i>MATa ura3-52 trp1-Δ63 leu2-Δ1 kanMX4-tetO₇::IWR1</i>	este trabajo
<i>P_{tetO}-IWR1Δhtz1</i>	<i>MATα leu2Δ1 ura3-52 trp1-Δ63 kanMX4-tetO₇::IWR1 htz1::kanMX4</i>	este trabajo
<i>Pho4-GFP</i>	<i>MATα leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 PHO4-GFP::KanMX6</i>	este trabajo

Cepa	Genotipo	Fuente
<i>Δpho4</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 pho4::kanMX4</i>	EUROSCARF
<i>Δpho4 Δiwr1</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 pho4::kanMX4 Iwr1-Δ1::his5</i>	este trabajo
<i>Δpho80</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 pho80::kanMX4</i>	EUROSCARF
<i>Δpho80 Δiwr1</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 pho80::kanMX4 Iwr1-Δ1::his5</i>	este trabajo
<i>Pho4-HA</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2 met15 ura3 PHO4-HA-HIS-TRP</i>	Adkins <i>et al.</i> , 2007
<i>Pho4-HA Δiwr1</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2 met15 ura3 PHO4-HA-HIS-TRP iwr1-Δ2::kanMX6</i>	este trabajo
<i>Iwr1-HA</i>	<i>MATa leu2Δ1 ura3-52 trp1Δ63 IWRI-HA::TRP1</i>	este trabajo
<i>Iwr1-Myc</i>	<i>MATα leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 IWRI-Myc::KanMX6</i>	este trabajo
<i>Iwr1-TAP</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 IWRI-TAP::His3Mx6</i>	Open Biosystems

MÉTODOS.

2.6.- Medios de cultivo y ensayos de crecimiento.

2.6.1.- Bacterias.

Los cultivos de *E. coli* se realizaron en medio LB (extracto de levadura 0,5% (p/v), bacto triptona 1% (p/v), NaCl 1% (p/v)) suplementado con ampicilina 50 μg/mL (LBA) a 37 °C con agitación (200 rpm). Para los cultivos en placa el medio fue suplementado con agar al 2%.

2.6.2.- Levaduras.

Para los cultivos de células de levadura sin auxotrofías se utilizó medio rico YPD (extracto de levadura al 1% (p/v), bacto peptona al 2% (p/v) y glucosa al 2% (p/v)), agitación a 200 rpm e incubación a 30 °C. Para el

crecimiento en soporte sólido se utilizó el mismo medio YPD con agar al 2% (p/v) y las placas se incubaron a 30 °C.

Las cepas auxótrofas transformadas con plásmidos o con módulos de integración (al deletar un gen, etiquetarlo o sustituir un promotor) fueron cultivadas en medio mínimo selectivo [base nitrogenada para levadura sin aminoácidos y sin sulfato amónico al 0,17% (p/v), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 0,5% (p/v), mezcla de aminoácidos (“*Drop out*”) sin el aminoácido marcador de la auxotrofia al 0,2% (p/v) y glucosa al 2% (p/v)]. Para la elaboración de los medios sólidos se agregó agar al 2% (p/v).

Las placas con 5'-FOA se prepararon añadiendo 1 g/L de ácido 5'-fluoro-orótico a medio sintético completo (SC). Las placas o medios de cultivo con doxiciclina (para apagar el promotor regulable P_{tetO}) se prepararon añadiendo entre 0,1-10 µg/mL de doxiciclina a los medios. Las placas o medios con rapamicina se prepararon añadiendo diferentes cantidades de rapamicina al medio YPD (concentraciones finales de 1 hasta 200 ng/mL).

Las cepas con el promotor natural de un gen sustituido por un promotor de expresión fuerte regulado por galactosa (P_{GALI}) se crecieron en medios de cultivo líquido o en placas que contenían galactosa al 2%, en lugar de glucosa, tanto en medio rico como mínimo.

Para seleccionar las células que contienen el marcador de selección que confiere resistencia a kanamicina y derivados (módulos de integración con marcador $KanMX$) se suplementaron los medios de cultivo con geneticina (GIBCO) a 200 µg/mL.

Los medios YPD ácido, YPD básico, YPD deplecionado de fosfato inorgánico (Pi) y el medio sintético carente por completo de Pi, que se emplearon en algunos ensayos, se prepararon como se detalla a continuación:

- YPD ácido: extracto de levadura al 1% (p/v), bactopectona al 2% (p/v), glucosa al 2% (p/v) y HCl hasta pH 5,6.

- YPD básico: extracto de levadura al 1% (p/v), bactopectona al 2% (p/v), glucosa al 2% (p/v) y KOH hasta pH 8,0.

- YPD deplecionado de Pi: se preparó un medio de cultivo con extracto de levadura al 3,4% (p/v), bactopectona al 6,6% (p/v) y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ al 1,5% (p/v). Se llevó a pH a 8,0 con NH_4OH concentrado. La disolución se mantuvo en hielo 30 minutos para precipitar el fosfato. Se realizaron 2 centrifugaciones a 10000 x g durante 10 minutos a 4 °C y se filtró el último sobrenadante en papel Whatmann 3MM. Se ajustó de nuevo el pH a 7,0 con HCl 2 M. Se preparó un medio que contenía la solución deplecionada de fosfato al 7,6% (v/v) suplementada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 0,6% (p/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ al 0,05% (p/v), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ al 0,0326% (p/v), adenina al 0,002% (p/v), uracilo al 0,002% (p/v), glucosa al 2% y KH_2PO_4 a la concentración final deseada para cada ensayo (condiciones experimentales de bajo fosfato no contienen KH_2PO_4 adicionado, mientras que condiciones experimentales de alto fosfato contienen 13,4 mM de KH_2PO_4).

- Medio sintético carente por completo de fosfato: se preparó como se prepara el medio sintético completo, pero utilizando una base nitrogenada para levadura sin Pi.

Para los ensayos de crecimiento, los cultivos celulares de levadura se diluyeron a la misma OD_{600} , se prepararon cuatro diluciones seriadas (1:10) y se depositaron 2,5 μL de cada dilución sobre el medio sólido, incubándose estas placas a la temperatura requerida para el estudio.

Todos los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a 120 °C y las disoluciones de aminoácidos, de antibióticos y de otros reactivos empleados para preparar los medios, se esterilizaron por filtración (filtros PALL Acrodisc de 32 mm de diámetro y 2 μm de tamaño de poro, de Life Sciences).

2.7.- Métodos de manipulación de microorganismos.

2.7.1.- Transformación de *E. coli*.

La transformación bacteriana fue llevada a cabo por electroporación a partir de una alícuota de 50 μL de células competentes DH5 α descongeladas en hielo. A las células se les añadieron entre 1 y 20 ng de DNA plasmídico en un volumen no superior al 6% (v/v) del volumen de células competentes y se depositaron en una cubeta de electroporación estéril (Eppendorf, 1 mm de ancho de ranura). Las células se sometieron a un choque eléctrico de 1,8 kV durante 2 segundos empleando un electroporador *E. coli Pulser* de Bio-Rad. Las células se recogieron de la cubeta con 1 mL de LB o SOC (bactopeptona al 2% (p/v), extracto de levadura al 0,5% (p/v), NaCl al 0,0584% (p/v), KCl al 0,0186% (p/v), MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM y glucosa 20 mM) y se incubaron a 37 °C durante 1 hora para su recuperación. Finalmente, se sembró 1/10 parte de las células recuperadas en una placa de LBA que se incubó a 37 °C durante 24 horas.

2.7.2.- Transformación de levadura.

Las cepas de *S. cerevisiae* se transformaron siguiendo el protocolo basado en la incubación con acetato de litio (Gietz *et al.*, 1995). Cultivos celulares de una noche de 50 mL en YPD se diluyeron hasta una OD₆₀₀ de 0,2-0,3 y se incubaron a 30 °C el tiempo equivalente a 2,5-3 generaciones. Las células se recogieron por centrifugación a 2.500 rpm durante 3 minutos y se lavaron, en este orden: dos veces con agua desionizada y una vez con LiAc 0,1 M. Seguidamente, las células se resuspendieron en 0,5 mL de LiAc 0,1 M y se incubaron durante 15 minutos a 30 °C. A una alícuota de 50 μL de células en LiAc 0,1M se añadieron 5 μL de DNA 2 mg/mL de espermatozoos de salmón desnaturalizado disuelto en TE (Tris-HCl 1 M a pH 8,0 y EDTA 0,5 M a pH 8,0) y 0,1-1 μg de DNA plasmídico o 1-5 μg de DNA producto de PCR, en el caso de los módulos de integración. A la mezcla se le añadió, en este orden, 240 μL de una solución de polietilenglicol al 50% (p/v) (peso

molecular medio 3.350, SIGMA), 30 μ L de agua desionizada y 30 μ L de LiAc 1 M. Se agitó de forma vigorosa y se incubó a 30 °C durante 30 minutos, seguido de un choque térmico a 42 °C en baño de agua durante 20 minutos. Finalmente, las células se recogieron por centrifugación, se eliminó el sobrenadante por aspiración, y se resuspendieron en 200 μ L de agua desionizada para ser sembradas en las placas requeridas. En el caso de las transformaciones con plásmidos o módulos de integración que complementan auxotrofías de la cepa, las células se sembraron en medio mínimo selectivo. En el caso de las transformaciones en las que la selección se basa en la resistencia al antibiótico kanamicina, las células se recuperaron sembrándolas en placas de YPD o YPGal durante 24 horas a 30 °C y se transfirieron, empleando terciopelos estériles, a placas con 0,2 mg/mL de geneticina.

2.7.3.- Deleción de genes, etiquetado de proteínas y sustitución de promotores.

Para realizar las manipulaciones a nivel genómico se utilizaron módulos de integración obtenidos por PCR. Estos módulos de integración contienen un gen marcador flanqueado por secuencias de DNA homólogas a las secuencias del gen diana que se pretende manipular. Para su obtención se utilizaron como moldes los plásmidos descritos en la Tabla 2.3.

Para la deleción de genes no esenciales se emplearon los plásmidos descritos por Wach *et al.* (1994) y por Longtine *et al.* (1998). En este trabajo se han construido dos deleciones distintas del gen *IWR1*: la deleción *iwr1- Δ 1* (en la que se eliminó la secuencia desde la posición +58 respecto al ATG hasta el codón de parada en la posición +1130) y la deleción *iwr1- Δ 2* (en la que se eliminó la ORF completa). Estos dos alelos no presentan diferencias en cuanto a crecimiento ni en cuanto a actividad fosfatasa ácida. En los experimentos contenidos en este trabajo se ha utilizado el alelo *iwr1- Δ 1*.

Para el etiquetado de proteínas con los epitopos HA, Myc o GFP se emplearon como molde los plásmidos descritos por Longtine *et al.* (1998).

La sustitución de promotores se realizó empleando una estrategia similar. Para la sustitución por el promotor P_{GAL1} se utilizaron los plásmidos descritos por Longtine *et al.* (1998). Para la sustitución por el promotor P_{tetO} se utilizó el plásmido pCM225 (Bellí *et al.*, 1998).

Para la construcción de cepas “*shuffle*” en la cepa diploide BY4743 se sustituyó uno de los alelos por el gen $his5^+$ de *Schizosaccharomyces pombe* (método descrito por Longtine *et al.*, 1998). La cepa heterocigota se transformó con un plásmido que contenía el gen silvestre clonado en el vector pRS316 con marcador *URA3*. Se esporularon los diploides y se seleccionaron los segregantes que contenían una disrupción genómica del gen de interés además del gen silvestre en el plásmido pRS316.

2.7.4.- Obtención de diploides y disección de tétradas.

La conjugación de cepas haploides se realizó en placa, seleccionando los diploides por sus auxotrofías o por separación manual, utilizando el micromanipulador. Para inducir la esporulación, los diploides se sembraron en placas de medio YPA (extracto de levadura al 1% (p/v), bactopectona al 2% (p/v), acetato potásico al 1% (p/v) y agar al 2%) incubándose a 30 °C un día y, a continuación, se transfirieron a placas de medio SPM (acetato potásico al 0,3%, rafinosa al 0,02%, aminoácidos necesarios a concentración final de 10 µg/mL y agar al 2%) que se incubaron a temperatura ambiente durante 4-5 días. La formación de tétradas se comprobó en el microscopio (NIKON Phase contrast-2, Type119 Alphaphot-2 YS2). Para la disección de diploides, se digirieron las ascas incubándolas con zimoliasa 20T a 5 µg/mL en una disolución de sorbitol 0.12 M y fosfato potásico 0,01 M a pH 6,5 durante 5 minutos a temperatura ambiente y se enfriaron en hielo. Las células se depositaron en placas de medio YPD y se diseccionaron utilizando un micromanipulador Synger Instruments MSM System.

2.7.5.- Rastros genómicos.

2.7.5.1.- Rastreo genómico de supresión en multicopia.

Los supresores multicopia de la letalidad sintética entre los alelos mutantes *bur6-1* y *dbp5-2* se obtuvieron por transformación de la cepa doble mutante *bur6-1 dbp5-2* suplementada con el gen *DBP5* silvestre en un plásmido centromérico con marcador de selección *URA3* (pRAT8.31) con una genoteca genómica de levadura clonada en el vector YEp13, un plásmido multicopia cuyo origen de replicación procede del plásmido de 2 μ m y que tiene como marcador de selección el gen *LEU2*. Los transformantes (40.000) se sembraron en placas selectivas (SC-LEU + 2% glucosa) a 30 °C durante 3 días y a continuación se hicieron réplicas en placas de medio con 5'-FOA, incubándose 2 días a 30 °C. En los transformantes capaces de crecer en este medio se recuperaron los plásmidos, y su capacidad de supresión se comprobó de nuevo en la cepa *bur6-1 dbp5-2*. En el caso de los clones positivos, se secuenciaron los extremos de los insertos y se descartaron aquellos que contenía el gen *BUR6*. Los plásmidos restantes presentaron un inserto y el gen supresor se identificó subclonando fragmentos de restricción en el vector YEplac181, analizándose su capacidad de suprimir la letalidad sintética de la cepa *bur6-1 dbp5-2*.

2.7.5.2.- Rastreo genómico de mutaciones supresoras por inserción de transposones.

La cepa *P_{GALI}-BUR6 P_{GALI}-YDR1* se transformó con una genoteca genómica de levadura mutageneizada por inserción del transposón *mTn3-lacZ/LEU2* (Burns *et al.*, 1994). Los mutantes supresores se seleccionaron en placas de medio sintético completo sin leucina (SC-LEU) con 2% de glucosa como fuente de carbono a temperatura ambiente. Tras 8 días de incubación, se seleccionaron 74 colonias, de las que se aisló el DNA genómico y se identificó el sitio de inserción del transposón en 17 de los casos, empleando

el protocolo de rescate por PCR “*vectorette*” desarrollado por C. Friddle (<http://genome-www.stanford.edu/group/botlab>).

2.8.- Métodos de manipulación y análisis de ácidos nucleicos.

2.8.1.- Aislamiento de DNA y RNA.

2.8.1.1.- Aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli*.

Para la obtención de DNA plasmídico a pequeña escala se utilizó el sistema comercial *Perfectprep Plasmid Mini* de Eppendorff siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.8.1.2.- Aislamiento de DNA genómico de levadura.

La obtención de DNA genómico se llevó a cabo a partir de cultivos de 5 mL en YPD crecidos durante toda la noche a 30 °C. Las células se recogieron por centrifugación a 2.500 rpm durante 3 minutos y se lavaron dos veces con agua desionizada estéril. Al sedimento de células se le añadió 200 µL de tampón de lisis (triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM), 200 µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y 200 µL de perlas de vidrio. La mezcla se agitó durante 15 minutos en vórtex a 4 °C. Seguidamente, se añadieron 200 µL de tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM a pH 8,0) y se centrifugó durante 5 minutos a 13.200 rpm a 4 °C. Se recogió la fase acuosa en un nuevo tubo y se añadieron dos volúmenes de etanol 96% (v/v) frío. Se dejó a -20 °C 20 minutos para que precipitara el DNA y éste se recogió a 13.200 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante por aspiración y se lavó el DNA con etanol frío al 70% (v/v). El DNA genómico seco se resuspendió en agua destilada estéril y se guardó a -20 °C hasta su utilización.

2.8.1.3.- Aislamiento de RNA.

Para la extracción de RNA total de levadura, las células se recogieron por centrifugación, se lavaron dos veces con agua desionizada estéril fría y el

sedimento celular se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido, almacenándose a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento posterior. Las células se descongelaron en hielo y se resuspendieron en 0,5 mL de tampón LETS (LiCl 0,1 M, EDTA 0,01 M, Tris HCl 0,01 M, SDS 0,2% (p/v), pH 7,4). Se añadieron 0,5 mL de fenol:cloroformo (5:1) (el fenol a pH 4,3) y 0,3 mL de perlas de vidrio. Las células se rompieron por agitación en el aparato Fast-Prep FP120 (Savant Instruments Inc. Farmingdale, NY) durante dos períodos de 30 segundos a velocidad 5,5, entre los cuales las células se mantuvieron 1 minuto en hielo. Posteriormente, se centrifugaron las muestras durante 5 minutos a 13.200 rpm a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El sobrenadante se extrajo con la mezcla de fenol:cloroformo (5:1) y se realizó una segunda extracción con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). El RNA se precipitó con un volumen de LiCl 5 M a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante al menos 3 horas, se recogió por centrifugación, se lavó con etanol 70% (v/v) y se resuspendió en agua desionizada estéril. En este punto, se procedió a cuantificar el RNA total midiendo la absorbancia a 260 nm.

Todo el material utilizado para la obtención de RNA fue autoclavado a 2 atmósferas y $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora para inactivar las RNasa y durante todo el proceso se utilizaron guantes.

2.8.2.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y transcripción reversa (RT).

2.8.2.1.- PCR.

Las reacciones se realizaron en un volumen final de 50 μL (PCR preparativa) o de 25 μL (PCR de comprobación). Para 50 μL de reacción se emplearon: 3 μL de DNA molde diluido 1/10 a partir de miniprep comercial (Eppendorff), 26,5 μL de agua desionizada estéril, 0,5 μL de Taq polimerasa (Eppendorff), 5 μL del tampón 10x de la Taq polimerasa (Eppendorff) que incluye MgCl_2 , 5 μL de cada cebador 10 mM y 5 μL de una mezcla de los 4 dNTPs a 2,5 mM. Para algunas amplificaciones fue necesario emplear una

polimerasa de alta fidelidad de copia, Taq polimerasa Triple Master de Eppendorff. En estos casos la mezcla de reacción fue: 1 μ L de DNA molde diluido, 35,5 μ L de agua estéril, 0,5 μ L de Triple Master Taq polimerasa (Eppendorff), 5 μ L del tampón de alta fidelidad 10x de la Triple Master Taq polimerasa (Eppendorff) que incluye $MgCl_2$, 2 μ L de cada cebador 10 mM y 4 μ L de una mezcla de los 4 dNTPs a 2,5 mM. Para las PCRs de comprobación se empleó la mitad de las cantidades indicadas. Las condiciones de reacción fueron: 1 ciclo de 3 minutos a 94 °C; 30 ciclos compuestos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a la temperatura óptima de hibridación para cada par de oligonucleótidos y un tiempo variable (1 minuto por Kb) a 72 °C; y finalmente, 1 ciclo de 10 minutos a 72 °C.

2.8.2.2.- RT (Transcripción Reversa o síntesis de cDNA).

Se incubaron 10 μ g de RNA con 1 unidad de DNasa I (Turbo DNase, Ambion) en un volumen final de 50 μ L a 37 °C durante 30 minutos. A continuación se incubaron 5 μ g del RNA digerido con 1 μ L de oligodT (500 ng/ μ L) y 2 μ L de una mezcla de los cuatro dNTPs a una concentración de 10 mM cada uno, a 65 °C durante 5 minutos, tras lo cual se transfirió el tubo a hielo. Se añadieron entonces 8 μ L de tampón 5X para SuperScript III (Invitrogen), 2 μ L de DTT 0,1 M, 1 μ L de inhibidor de RNasa (Invitrogen) y 1 μ L de transcriptasa reversa SuperScript III (Invitrogen). Esta mezcla se incubó durante 60 minutos a 50 °C y finalmente se inactivó la enzima incubando a 70 °C durante 15 minutos.

2.8.2.3.- qRT-PCR semicuantitativa.

Para la amplificación del producto de la transcripción reversa (cDNA) se realizó una dilución 1/10 del cDNA obtenido como se describe en el apartado anterior y se utilizaron 2,5 μ L como molde de la PCR. El volumen de reacción para estos estudios fue de 15 μ L. Los oligonucleótidos empleados se detallan en la Tabla 2.2.

2.8.2.4.- RT-PCR cuantitativa (*Real Time*-PCR).

Los análisis de ChIP se llevaron a cabo mediante RT-PCR cuantitativa en el termociclador de Bio-Rad (DNA Engine Peltier Thermal Cycler) utilizando el kit *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG with ROX* (Invitrogen). El diseño de oligonucleótidos (detallados en la Tabla 2.2), la mezcla de reacción y las condiciones de amplificación se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. Se hizo triplicado de PCR para todas las muestras y para el procesamiento de los datos se empleó el método $\Delta\Delta CT$ (Livak y Schmittgen, 2001), comparando los resultados del amplificado de la muestra inmunoprecipitada con el del extracto celular completo y utilizando como normalizador, una región intergénica.

2.8.3.- Otras técnicas de DNA recombinante. Digestiones y ligaciones.

Las digestiones de DNA genómico o plasmídico con endonucleasas de restricción se realizaron siguiendo las recomendaciones del fabricante (Roche o Fermentas).

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

2.8.4.- Separación de ácidos nucleicos por electroforesis.

2.8.4.1.- Electroforesis de fragmentos de DNA en geles de agarosa.

La separación de fragmentos de DNA se realizó en geles de agarosa de concentración variable (0,8%-1,8% (p/v)), según los tamaños de los fragmentos de DNA a separar, en tampón TBE 0,5X (Tris 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM, EDTA 1,25 mM), que también fue utilizado como tampón de electroforesis. Los geles se prepararon añadiendo 3 μ L de bromuro de

etidio 10 mg/mL por cada 100 mL de gel. Las muestras se mezclaron con la cantidad de tampón de carga 6X (azul de bromofenol 0,25% (p/v), xilen cianol 0,25% (p/v), glicerol 30% (v/v)) necesaria para dejar las muestras a una concentración final 1X y la electroforesis se realizó a voltaje constante (6-10 V/cm) durante un tiempo variable en función de la resolución requerida.

2.8.4.2.- Electroforesis de RNA en geles de agarosa.

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

2.9.- Técnicas radiactivas.

2.9.1.- Northern blot. Marcaje de sondas de DNA con [α -³²P] dCTP.

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

mL de agua). El tampón de electroforesis es MOPS 1X y la electroforesis se realizó a voltaje constante de 80 V durante aproximadamente 2 horas.

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

Los oligonucleótidos utilizados para la obtención de sondas se detallan en la Tabla 2.2. Para el marcaje de sondas con el isótopo [α - 32 P] dCTP ([α - 32 P] dCTP; 3000 Ci/mmol, Perkin Elmer), aproximadamente 25 ng de DNA se desnaturalizaron a 95 °C durante 5 minutos. Para un volumen final de 20 μ L, se añadieron al DNA 4 μ L del reactivo *High Prime* (Roche) y 2,5 μ L de [α - 32 P] dCTP y se incubó la mezcla durante 10 minutos a 37 °C. La reacción se paró añadiendo 2 μ L de EDTA a pH 8,0 y 50 μ L de agua desionizada. La sonda se purificó utilizando una columna MicroSpin S-300 HR (GE Healthcare).

Las membranas se pre-hibridaron a 65 °C durante 1 hora y 30 minutos en tampón fosfato sódico 0,5 M a pH 7,2, EDTA 1 mM y SDS al 7%. La hibridación se realizó durante toda la noche a 65 °C con la misma disolución a la que se adicionó la sonda previamente desnaturalizada. Tras la hibridación, se realizaron 2 lavados de las membranas con solución de lavado (SSC 0,5X y SDS 0,1% (p/v)), uno rápido a temperatura ambiente y otro de 10 minutos a 65 °C. Los filtros se sellaron y se sometieron a análisis autorradiográfico (Ver apartado 2.9.4.- Autorradiografía).

2.9.2.- Análisis transcripcional a nivel genómico. Chips de DNA.

En este trabajo se han utilizado los chips de DNA de *Saccharomyces cerevisiae* realizados por el servicio de chips de DNA (SCSIE) de la Universitat de València. Estos chips tienen como soporte una membrana de nylon de 7 x 11 cm y poseen 6.144 puntos donde se distribuyen las sondas

que cubren la zona codificante de la mayoría de los genes de levadura (Alberola *et al.*, 2004). En todas las aproximaciones genómicas se han usado las mismas condiciones de hibridación, lavado y lectura.

Se emplearon 40 µg de RNA total que se hibridaron con 1 µL de oligo dT (500 ng/µL) y 1 µL de inhibidor de RNAsas (RNasa OUT; Invitrogen) a 70 °C durante 10 minutos, en un volumen final de 10 µL. El tubo se enfrió en hielo y se añadieron 6 µL de tampón 5X First Strand (Invitrogen), 3 µL de DTT 0,1 M, 1,5 µL de una mezcla de dNTPs (16 mM en A, G y T, y 0,1 mM en C), 1 µL de transcriptasa reversa SuperScript II (Invitrogen), 4 µL de [α -³³P] dCTP ([α -³³P] dCTP; 3000 Ci/mmol, Perkin Elmer) y 4,5 µL de agua. Esta mezcla se incubó durante 60 minutos a 42 °C y finalmente se paró la reacción añadiendo 1 µL de EDTA 0,5 M a pH 8,0. Se añadieron 69 µL de agua desionizada y se purificó el cDNA marcado utilizando las columnas de purificación MicroSpin S-300 HR Columns (GE Healthcare).

La radiactividad incorporada en cada marcaje fue cuantificada mediante un contador de centelleo (Wallac 1409), usando 5 mL de solución de centelleo (*Cocktail 22 Normascint* (CO0135) de Scharlau) y 1 µL del cDNA recién marcado y purificado. La cuantificación se llevó a cabo durante 10 minutos con el programa de contaje para ³³P.

Los filtros de nylon se pre-hibridaron al menos 1 hora con 5 mL de solución de hibridación (SSC 5X, *Denhart's* 5X (0,5% BSA, 0,5% Ficoll, 0,5% PVP), SDS 0,5% y DNA de arenque 100 µg/mL). La hibridación de los filtros se llevó a cabo con 3-5 mL de solución de hibridación a la que se añadió el cDNA marcado (previamente desnaturalizado a 95 °C durante 5 minutos) a una concentración de aproximadamente 5×10^6 dpm/mL durante 42 horas a 65 °C en agitación rotatoria. Tras la hibridación, se realizó un lavado rápido de los filtros con 5 mL de solución de lavado I (SSC 2X y SDS 0,1%). Seguidamente, los filtros se lavaron una vez durante 20 minutos con 30 mL de solución de lavado I a 65 °C y dos veces durante 30 minutos con 30 mL de solución de lavado II (SSC 0,2X y SDS 0,1%) a la misma

temperatura. Tras los lavados, los filtros se sellaron con film plástico alimentario (cloruro de polivinilideno) y se colocaron en un *Hypercassette* (GE Healthcare) para su exposición con pantalla IP *Phosphorimager* (Ver apartado 2.9.4.- Autorradiografía). Los archivos de datos Excel se encuentran en <http://scsie.uv.es/chipsdna/chipsdna-e.html#datos>.

2.9.3.- Ensayo de accesibilidad al sitio de restricción de la endonucleasa *ClaI* situado en el promotor del gen *PHO5*.

Las células de un cultivo de 500 mL (a una OD₆₀₀ de aproximadamente 1,5) se recogieron por centrifugación. Las células se lavaron 2 veces con solución de lavado (sorbitol 1 M, Tris-HCl 50 mM a pH 7,4 y MgCl₂ 5 mM) y se congelaron en nitrógeno líquido, almacenándose a -80 °C. Tras su descongelación en hielo, las células se resuspendieron en 2 volúmenes de solución de pre-incubación (β -mercaptoetanol 0,7 M y EDTA 2,8 mM a pH 8,0) y se incubaron en agitación durante 30 minutos a 28 °C. Las células se recogieron por centrifugación a 3.000 x g durante 5 minutos a 4 °C y se lavaron con sorbitol 1 M. Las células se resuspendieron en 5 mL/(g de células) de tampón de lisis (sorbitol 1 M y β -mercaptoetanol 5 mM) y se añadieron 1/50 volúmenes de una disolución 20 mg/mL de zimoliasa (*Zymoliasa* 100T USBiological) en el mismo tampón. Las células se incubaron a 28 °C el tiempo necesario para que la OD₆₀₀ de una dilución 1/500 se redujera hasta el 5-20% del valor inicial. Las células se centrifugaron a 2.000 x g durante 2 minutos a 4 °C, se lavaron con sorbitol 1 M y se resuspendieron en 7 mL/(g de células) de tampón ficoll (18% (p/v) de ficoll, 20 mM de KH₂PO₄ a pH 6,8, 1 mM de MgCl₂, 0,25 mM de EGTA y 0,25 mM de EDTA). Los núcleos se obtuvieron por centrifugación a 130.000 rpm en una ultracentrífuga Optima Beckman Coulter. Los sedimentos nucleares se congelaron en N₂ líquido y se guardaron a -80 °C.

Para su digestión, los núcleos se lavaron con tampón de digestión (Tris-HCl 10 mM a pH 7,4, NaCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, espermidina

0,5 mM, espermina 0,15 mM, EDTA 0,2 mM, EGTA 0,2 mM y β -mercaptoetanol 5 mM) y alícuotas procedentes de 0,05 g de células se resuspendieron en 200 μ L de este mismo tampón. Los núcleos se digirieron con 50 o 200 unidades de la enzima de restricción *Cla*I, a 37 °C durante 30 minutos. La digestión se paró añadiendo 10 μ L de solución de parada (Tris-HCl 1 M a pH 8,8 y EDTA 12 mM a pH 8,0), 5 μ L de SDS al 20% y 10 μ L de proteinasa K (20 mg/mL) incubándose toda la mezcla a 37 °C, 30 minutos. El DNA se extrajo dos veces con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol frío al 96% (v/v), durante 20 minutos a -20 °C. El DNA se recogió por centrifugación a 4 °C, se resuspendió en 125 μ L de tampón TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM) y se digirió con 5 μ L de RNasa A (10 mg/mL) durante 1 hora a 37 °C. El DNA se volvió a precipitar añadiendo 5 μ L de NaCl 5 M y 0,6 volúmenes de isopropanol, se recogió por centrifugación a 4 °C, se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 80 μ L de tampón TE. 10 μ L de este DNA se digirieron con 40 unidades de la enzima de restricción *Hae*III. Tras la segunda digestión, se precipitó el DNA con 10% de acetato sódico y 2 volúmenes de etanol 96% frío durante 20 minutos a -20 °C. Finalmente el DNA se disolvió en 15 μ L de agua y 10 μ L se analizaron por *Southern blot* en un gel de agarosa al 1,5% (p/v) en tampón TBE 0,5X. Tras la electroforesis, el gel se trató con una solución de NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M, durante 30 minutos en agitación y, a continuación, con una solución NaCl 3 M, Tris-HCl 1 M a pH 7,5 durante 45 minutos en agitación. El DNA se transfirió a una membrana de nylon *N-Hybond* (GE Healthcare). El entrecruzamiento de las muestras, marcaje con la sonda *PHO5-D*, pre-hibridación e hibridación así como los lavados y el sellado de los filtros se realizó como se describe para el *Northern blot* (ver apartado 2.9.1.- *Northern blot*. Marcaje de sondas de DNA con [α -³²P] dCTP). El resultado se visualizó mediante autorradiografía (ver apartado 2.9.4.- Autorradiografía).

2.9.4.- Autorradiografía.

Los filtros de nylon sellados se colocaron en un *Hypercassette* (GE Healthcare) y se expusieron a una película fotográfica (Fuji Medical X-Ray Film 100NIF Super RX) o a una pantalla IP *Phosphorimager* (Fujifilm Imaging Plate, BAS-IP MS 2025,) durante el tiempo apropiado (de horas a días). El análisis la pantalla IP para la cuantificación de la radiactividad se llevó a cabo con un sistema de autorradiografía *Phosphorimager* FLA3000 (Fujifilm). El análisis de la imagen se llevó a cabo con el programa *Image Gauge* 4.0 (Fujifilm).

2.9.5.- Lavado de membranas para la eliminación de las sondas.

Las membranas de nylon se lavaron 3 veces durante 10-15 minutos a 95 °C con una solución de SDS al 0,1% (v/v) y fosfato sódico 5 mM a pH 7,0.

2.10.- Métodos de manipulación y análisis de proteínas.

2.10.1.- Obtención de extractos proteicos y cuantificación de proteínas.

Para la obtención de extractos proteicos, los cultivos celulares se recogieron por centrifugación (3 minutos a 2.500 rpm) y se lavaron con agua estéril. El sedimento de células se resuspendió en 100 µL de agua desionizada fría, 20 µL de TCA al 100% y 100 µL de perlas de vidrio. La mezcla se agitó en vórtex durante 15 minutos a 4 °C. Al lisado se le añadió 1 mL de TCA al 5% (v/v) frío y se centrifugó durante 20 minutos a 13.200 rpm a 4 °C. Se desechó el sobrenadante, junto con las perlas de vidrio y el sedimento se resuspendió en 80 µL de tampón de muestra (4% de SDS, 80 mM de Tris a pH 6,8, 12,5% de glicerol, 4% de β-mercaptoetanol y 0,1% de azul de bromofenol) y se añadieron 20 µL de Tris-base 2 M para su neutralización. Las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a

13.200 rpm para eliminar las perlas y restos celulares. El extracto se incubó durante 5 minutos a 95 °C antes de ser analizado por electroforesis.

La cuantificación de las proteínas en los extractos se realizó por el método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando el reactivo comercializado por Bio-Rad y siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

2.10.2.- Análisis por *Western blot*.

La separación de proteínas por electroforesis se realizó utilizando geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE). La electroforesis se llevó a cabo a amperaje constante de 15-25 mA/gel durante 100-150 minutos en tampón de electroforesis (Tris base al 0,3% (p/v), glicina al 1,4% (p/v) y SDS al 0,1% (p/v)) y, posteriormente, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Protran, Whatmann) por electrotransferencia a 100 V durante 40 minutos a 4 °C. El tampón de transferencia fue el mismo que el utilizado en la electroforesis al que se añadió metanol al 20% (v/v).

Las proteínas transferidas se tiñeron con una solución de *Ponceau* al 1% (p/v) en ácido acético al 1% (v/v) durante 1 minuto, lavando con ácido acético al 1% (v/v). El colorante se eliminó lavando la membrana con TBS (0,02 M de Tris-HCl a pH 7,6 y 0,8% (p/v) de NaCl)–Tween-20 al 0,01% (v/v) (TBS-Tween).

La membrana se bloqueó con TBS-Tween suplementado con 2% (p/v) de agente bloqueante (*ECL-Advance*; GE Healthcare) durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo primario se diluyó en TBS-Tween con 2% (p/v) de agente bloqueante y la membrana se incubó en esta disolución durante toda una noche a 4 °C. La membrana se lavó tres veces durante 15 minutos con TBS-Tween. El anticuerpo secundario se preparó también en TBS-Tween con agente bloqueante al 2 % (p/v) y se incubó la membrana con él durante 1 hora a 4 °C. Se realizaron 3 lavados adicionales de 10 minutos con TBS-Tween y la detección quimioluminiscente se realizó mediante el sistema *ECL Advance* (GE Healthcare) siguiendo las

instrucciones del fabricante. Los anticuerpos empleados y las concentraciones de trabajo se detallan en la Tabla 2.1.

2.10.3.- Inmunoprecipitación de cromatina (ChrIp).

Se utilizaron células procedentes de cultivos de 100 mL en medio YPD, que se crecieron hasta una OD₆₀₀ de 0,5-0,7. Las células se entrecruzaron *in vivo* con formaldehído al 1%, durante 15 minutos a temperatura ambiente. El entrecruzamiento se detuvo por la adición de glicina a una concentración final de 125 mM, con una incubación adicional de 5 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron 4 veces con 25 mL de TBS frío y se congelaron a -20 °C. Las células se lisaron con 300 µL de tampón de lisis (HEPES-KOH 50 mM a pH 7,5, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 al 1% (v/v), desoxicolato sódico al 0,1% (p/v), PMSF 1 mM, benzamidina 1 mM e inhibidor de proteasas Complete (Roche)) y 300 µL de perlas de vidrio. La lisis se llevó a cabo durante 30 minutos a 4 °C en un vórtex modelo Genie-2 (Scientific Industries) a máxima potencia. Tras eliminar las perlas de vidrio, la cromatina se fragmentó (tamaño medio entre 400 y 800 pb) por sonicación (5 pulsos de 30 segundos a la máxima potencia con un sonicador BioRuptor Diagenode) y se centrifugó a 12.000 rpm durante 20 minutos. El extracto se incubó a 4 °C en agitación rotatoria durante 2-3 horas con el anticuerpo pre-unido a las bolas magnéticas Dynabeads Pan Mouse IgG (Invitrogen) para etiquetas HA y Myc o se incubó con Dynabeads Pan Rabbit IgG (Invitrogen) sin anticuerpo adicional para etiqueta TAP. Las bolas magnéticas se lavaron 2 veces con tampón de lisis, dos veces con tampón de lisis suplementado con NaCl 500 mM, dos veces con tampón de lavado (Tris-HCl 10 mM a pH 8,0, LiCl 250 mM, NP-40 al 0,5% (v/v), desoxicolato sódico al 0,5% (p/v) y EDTA 1mM) y una vez con tampón TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1mM). La elución se realizó con tampón de elución (Tris-HCl 50 mM a pH 8,0, EDTA 10 mM y SDS al 10% (p/v)) calentando a 65 °C durante 10 minutos. El entrecruzamiento se

revirtió mediante una incubación a 65 °C durante la noche. El eluido se digirió durante 90 minutos a 37 °C con 0,33 mg/mL de proteinasa K y se purificó el DNA utilizando el kit *QIAquick PCR Purification* (QIAGEN).

2.11.- Ensayos de actividades enzimáticas.

2.11.1.- Ensayo de actividad β -galactosidasa.

Las células se recogieron por centrifugación, se lavaron con agua, y se resuspendieron en 1 mL de tampón Z (Na_2HPO_4 60 mM, NaH_2PO_4 40 mM, KCl 10 mM, MgSO_4 1 mM y β -mercaptoetanol 40 mM). Las células se permeabilizaron añadiendo 3 gotas de cloroformo y 2 gotas de SDS al 0,1% (p/v), agitándose la mezcla en vórtex durante 10 segundos. Las células se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se añadieron 200 μL de ONPG (o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido) a 4 mg/mL preparado en tampón Z. La reacción se detuvo tras la aparición de coloración añadiendo 500 μL de Na_2CO_3 1M, se centrifugó para eliminar los restos celulares y se midió la OD_{420} . Las unidades de actividad β -galactosidasa se calcularon a través de la fórmula siguiente:

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

Siendo:

OD₆₀₀: OD_{600} de las células ensayadas.

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

t: tiempo en parar la reacción, en minutos.

2.11.2.- Ensayo de actividad fosfatasa ácida y cálculo de cocientes GLAM.

El ensayo de actividad fosfatasa ácida y el cálculo de los cocientes GLAM (*gene length-dependent accumulation of mRNA*) se llevaron a cabo tal y como se describe en (Morillo-Huesca *et al.*, 2006). Las células se

recogieron por centrifugación, se lavaron con agua y se resuspendieron en agua aproximadamente a una OD₆₀₀ de 5. El ensayo se llevó a cabo con 30 µL (o 10 µL) de la suspensión celular, añadiendo agua hasta 100 µL, 350 µL de tampón acetato sódico 70 mM a pH 4,0, y 50 µL de para-nitrofenilfosfato (pNPP) a 5 mg/mL. La mezcla se incubó a 37 °C durante 10 minutos. La reacción se detuvo añadiendo 120 µL de TCA al 25% (v/v) y 600 µL de Na₂CO₃ saturado (~3M) y se midió la OD₄₀₅. Las unidades de actividad fosfatasa ácida se calcularon a través de la fórmula siguiente:

$$\text{Actividad fosfatasa ácida} = (\text{OD}_{405} \times 0,066) / (\text{OD}_{600} \times V \times t)$$

Siendo:

0,066: factor de corrección.

OD₆₀₀: OD₆₀₀ de las células ensayadas.

V: volumen de células ensayado, en mL (en nuestro caso, 0,03 o 0,01mL).

t: tiempo en parar la reacción, en minutos (en nuestro caso, 10 minutos).

Los cocientes GLAM se determinaron calculando la actividad fosfatasa ácida en cepas que contenían las construcciones descritas en la Tabla 2.3: pSch202, pSch212, pSch255. El vector vacío (YCplac33) se utilizó para cuantificar la actividad fosfatasa endógena, que se restó a la actividad derivada de las construcciones mencionadas. A partir de la media obtenida de tres experimentos diferentes, se calcularon los cocientes de actividad fosfatasa ácida entre las distintas unidades transcripcionales y la unidad transcripcional más corta.

2.12.- Técnicas microscópicas.

2.12.1.- Localización *in vivo* de proteínas.

Para visualizar las fusiones GFP se emplearon cultivos en fase de crecimiento logarítmica. Alícuotas de 1,2 µL se visualizaron con un

microscopio de fluorescencia Zeiss Axioskop II. Las imágenes se tomaron con una cámara digital SPOT (Diagnostic Instruments Inc.) y se procesaron con el software Adobe PhotoShop v.8.0.1.

2.12.2.- Tinción de núcleos.

La tinción de núcleos se realizó utilizando células fijadas durante 5 minutos a temperatura ambiente con etanol al 70% (v/v). Las células se tiñeron con una solución 0,1 mg/mL de 4,6-diamidino-2-fenilindol, (DAPI; SIGMA).

2.12.3.- Hibridación *in situ* de mRNA.

Cultivos de 50 mL se crecieron hasta alcanzar una OD₆₀₀ entre 0,5-1. Las células se fijaron con formaldehído a una concentración final del 4% (v/v) durante 15 minutos a la temperatura apropiada y en agitación. Se recogieron las células por centrifugación a 2.800 rpm durante 1 minuto y se resuspendieron en 10 mL de formaldehído 4% en tampón fosfato potásico 0,1 M a pH 6,4, incubándose durante 1 hora a 25 °C. Las células se recogieron por centrifugación, se lavaron 2 veces con tampón fosfato potásico 0,1 M a pH 6,4 y una vez con tampón fosfato potásico 0,1 M a pH 6,4 suplementado con sorbitol 1,2 M. El sedimento celular se resuspendió en 1 mL de este tampón al que se adicionó 500 µg de zimoliasa 100T, incubándose durante 30 minutos a 30 °C con agitación rotatoria. Las células se recogieron por centrifugación a 3.000 rpm durante 3 minutos, se lavaron con tampón fosfato potásico 0,1 M a pH 6,4 con sorbitol 1,2 M y se resuspendieron en este tampón (2 volúmenes del sedimento celular). Se aplicaron 20 µL de células digeridas sobre los pocillos de un portaobjetos, previamente tratados con 20 µL de poli-L-lisina (3 mg/mL) durante 15-30 minutos y lavados durante 5 minutos 2 veces con agua estéril. Tras una incubación de 5 minutos, las células no adheridas se eliminaron por aspiración. Las células del pocillo se lavaron con SSC 2X, se incubaron

durante 10 minutos con SSC 2X y durante 1 hora a 37 °C en cámara húmeda con 30 µL de solución de pre-hibridación (sulfato de dextran al 10% (p/v), formamida al 50% (v/v), tRNA de *E. coli* 125 µg/mL, DNA de esperma de salmón 500 µg/mL, SSC 4X, denhart's 1X, DTT 1 mM y RNasina 4 u/mL). A cada pocillo se añadieron 0,75 µL de una disolución de oligo(dT)₅₀ marcado en 5' con Cy3 a una concentración de 1 pmol/µL. La hibridación se realizó en cámara húmeda y oscura durante la noche a 37 °C. Tras la hibridación, las células se lavaron con SSC 2X durante 10 minutos y con SSC 1X durante 5 minutos. La tinción de los núcleos se realizó incubando con SSC 1X suplementado con 0,002% (v/v) de DAPI (2,5 mg/mL) durante 3 minutos. Las células se lavaron durante 5 minutos con SSC 1X y 5 minutos con SSC 0,5X. Los pocillos se dejaron secar a temperatura ambiente y se añadió a cada uno de ellos 3,5 µL de una disolución de Mowiol [se mezclaron 2,4 g de Mowiol (Calbiochem-Merck) con 6,9 g de glicerol apto para microscopía de fluorescencia (Merck) y se añadieron 6 mL de agua, dejándose la mezcla en agitación durante varias horas a temperatura ambiente. Se añadieron entonces 12 mL de Tris-HCl 0,2 M a pH 8,5 y se calentó la mezcla durante 10 minutos a 50 °C. Se centrifugó la mezcla a 5.000 x g 15 minutos y se hicieron alícuotas de 0,5 mL, almacenándose a -20 °C. Antes de su utilización, se añadió a cada alícuota 12,5 mg de 1,4-diazabicyclo-[2,2,2]-octano (DABCO; Sigma), calentándose la mezcla a 37 °C hasta su disolución]. Los cubre-objetos se sellaron con laca de uñas y las células se observaron con un microscopio de fluorescencia Zeiss Axioskop II. Las imágenes se tomaron con una cámara digital SPOT (Diagnostic Instruments Inc.) y se procesaron con el software Adobe PhotoShop v.8.0.1.

2.13.- Medida del consumo celular de oxígeno.

Se tomaron aproximadamente 10^8 células (contadas en el aparato *Particle Count and Size Analyser Z2; Coulter Inc.*) a partir de cultivos celulares en medio SC con glucosa al 2% crecidos hasta una OD_{600} aproximada de 0,4. Las células se recogieron por centrifugación a 2.500 rpm durante 2 minutos y se resuspendieron en nuevo medio SC con glucosa al 2%. El consumo de oxígeno se midió con un oxímetro (*Hansatech Instruments*) y se refirió al consumo de una cepa silvestre crecida en las mismas condiciones.

2.14.- Técnicas bioinformáticas.

2.14.1.- Análisis de imagen y normalización de los Chips de DNA.

Todas las imágenes de hibridaciones de los Chips fueron obtenidas usando un lector FLA3000 *Phosphorimager* (FujiFilm) a 16 bits y resolución de 50 μm . Las imágenes fueron analizadas usando el programa de análisis de imagen *ArrayVision* (Imaging Research). Se excluyeron del análisis todos los puntos cuya señal no fuera al menos 1,35 veces más intensa que el fondo. Posteriormente se calculó para cada punto el sARM (*Artifact Removed Median*), siendo éste el valor de la mediana de la intensidad de los *pixels* en cada punto al que se le ha eliminado las posibles manchas artefactuales y se le ha restado la intensidad del fondo.

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado barajando los chips entre réplicas. Para fusionar entre sí las diferentes réplicas se usó el programa *ArrayStat* (Imaging Research). Se usó un modelo proporcional (dado que existe una relación entre la desviación estándar y la media) en escala logarítmica. Se normalizaron los datos a lo largo de las réplicas, asumiendo condiciones independientes y exigiendo un mínimo de 2 réplicas válidas (dentro de las 3 réplicas) para cada gen. Para calcular el error

asociado a cada medida se usó una estimación del error conjunta para el ajuste de una curva. Finalmente, se eliminaron los valores anómalos.

2.14.2.- Análisis bioinformático de los resultados.

Para el análisis de los resultados e interpretación biológica de los mismos se han utilizado múltiples herramientas y bases de datos. Entre estas herramientas se pueden destacar las siguientes:

Bases de datos para obtener información biológica:

- Base de datos SGD. "*Saccharomyces Genome Database*" (<http://www.yeastgenome.org/>).

Programas para la anotación funcional:

- La herramienta para el cálculo de enriquecimiento en categorías funcionales: *FuncAssociate* (<http://llama.med.harvard.edu/cgi/func/funcasociate>) (Berriz *et al.*, 2003).

Además de estos servicios *on-line* se utilizaron las herramientas informáticas Microsoft Office Excel y los programa *Quantity One* (Bio-Rad) e *Image Gauge 4.0* para la cuantificación de las señales de RT-PCR semicuantitativa y de *Northern blot*, respectivamente.

RESULTADOS

3.- La sobre-expresión de un alelo truncado del gen *RPB2* suprime los defectos en el crecimiento y en la exportación de mRNAs del mutante *dbp5-2*, así como los defectos causados por la depleción del factor transcripcional NC2.

3.1.- La sobre-expresión de un alelo truncado de la subunidad *RPB2* de la RNA pol II suprime la letalidad sintética entre las mutaciones *dbp5-2* y *bur6-1*.

Nuestro grupo ha identificado interacciones genéticas entre el factor de exportación de mRNAs *DBP5/RAT8* y genes involucrados en el proceso de transcripción (Estruch y Cole, 2003). Una de las interacciones descritas es la letalidad sintética entre el alelo *dbp5-2* y la mutación *bur6-1*. El gen *BUR6* codifica una de las subunidades del factor transcripcional NC2, para el que se han descrito funciones negativas y positivas en el inicio de la transcripción (Goppelt *et al.*, 1996; Mermelstein *et al.*, 1996; Gadbois *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1997; Prelich, 1997; Xie *et al.*, 2000; Geisberg *et al.*, 2001; Chitikila *et al.*, 2002).

Con el objetivo de profundizar en el conocimiento de las relaciones funcionales entre *Dbp5p* y los factores de transcripción, se llevó a cabo un rastreo genómico (descrito en Materiales y Métodos; apartado 2.7.5.1.- Rastreo genómico de supresión en multicopia) en busca de genes cuya sobre-expresión fuera capaz de suprimir la letalidad sintética del doble mutante *dbp5-2 bur6-1*. El análisis de los insertos presentes en los plásmidos obtenidos de los transformantes capaces de crecer en placas con 5'-FOA, identificó en 23 ocasiones la presencia del gen *BUR6*. Sin embargo, sorprendentemente, no se obtuvo ningún plásmido que contuviera el gen *DBP5*. Con objeto de analizar la posible toxicidad de la sobre-expresión del gen *DBP5* en el doble mutante *dbp5-2 bur6-1*, se transformó la cepa utilizada en el rastreo genómico con el plásmido pCS833, un plásmido multicopia que contiene el gen *DBP5* silvestre y el marcador de selección *LEU2*. La viabilidad de los transformantes en presencia de 5'-FOA (resultados no mostrados) descarta la toxicidad de la sobre-expresión de *DBP5* como el motivo de su no recuperación en el rastreo genómico y apunta a la ausencia de plásmidos portadores de *DBP5* en la genoteca

utilizada como causante del resultado obtenido. Además de los plásmidos con insertos que contenían el gen *BUR6* también se obtuvieron 6 plásmidos cuyos insertos, procedentes del cromosoma XV de *S. cerevisiae*, incluían parte del gen *RPB2*, el gen *YOR152c* y parte del gen *PDR5* (Figura 3.1). Mediante la subclonación de fragmentos de restricción se localizó la actividad supresora en el gen truncado *RPB2*. El gen *RPB2* codifica una de las subunidades de la RNA pol II, la segunda mayor por tamaño, con 1.224 residuos. El alelo identificado en nuestro rastreo incluye la secuencia codificadora de los primeros 379 aminoácidos y se le llamó *rpb2t* (Figura 3.1).

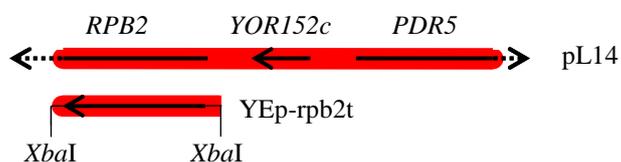


Figura 3.1: Representación esquemática de uno de los plásmidos de la genoteca capaz de suprimir la letalidad sintética del doble mutante *dbp5-2 bur6-1*. Seis de los plásmidos obtenidos de la genoteca (pL14 es uno de ellos) mostraron insertos idénticos, que incluían el gen completo *YOR152c* y los genes truncados *RPB2* y *PDR5*. La actividad supresora se localizó en un fragmento *XbaI*, que se subclonó en el vector multicopia YEplac181 dando lugar al plásmido YEp-rpb2t.

La interacciones genéticas entre *DBP5* y los factores de transcripción incluyen la letalidad sintética entre las mutaciones *dbp5-2* y *mot1-301* a la temperatura de 30 °C (Estruch y Cole, 2003). Al igual que NC2, Mot1p es un factor transcripcional que interacciona con TBP (Pereira *et al.*, 2003; Pugh *et al.*, 2000). Por ello, se investigó si la sobre-expresión de *rpb2t* en el vector multicopia YEp-rpb2t permitía al doble mutante *dbp5-2 mot1-301* crecer a 30 °C. Como puede observarse en la Figura 3.2, la sobre-expresión de *rpb2t* suprime la letalidad sintética del doble mutante *dbp5-2 mot1-301* a la temperatura de 30 °C.

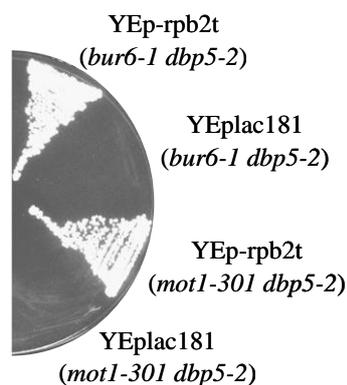


Figura 3.2: La sobre-expresión de *rpb2t* suprime la letalidad sintética entre *bur6-1* y *dbp5-2* así como entre *mot1-301* y *dbp5-2*. Las cepas dobles mutantes *dbp5-2 bur6-1* y *dbp5-2 mot1-301*, que contenían el gen silvestre *DBP5* en un plásmido centromérico con marcador de selección *URA3* (pRAT8.31; Snay-Hodge *et al.*, 1998), fueron transformadas con el plásmido YEp-*rpb2t* y con el vector vacío YEplac181. Los transformantes se sembraron en placas con 5'-FOA y se incubaron 4 días a 30 °C.

3.2.- Efecto de la sobre-expresión de alelos truncados de *RPB2* y de *RPB1* y de la depleción de diferentes subunidades de la RNA pol II sobre el crecimiento del mutante *dbp5-2*.

El efecto de *rpb2tp* en el doble mutante *dbp5-2 bur6-1* nos llevó a determinar si la sobre-expresión de *rpb2t* también era capaz de suprimir el defecto en el crecimiento del mutante sencillo *dbp5-2* a la temperatura semi-restrictiva de 34 °C. Como se observa en la Figura 3.3.A, la sobre-expresión del alelo truncado *rpb2t*, pero no la del gen silvestre *RPB2*, suprime parcialmente el defecto en el crecimiento de *dbp5-2* a 34 °C. Sin embargo, cuando el plásmido YEp-*rpb2t* se introdujo en una cepa en la que el gen silvestre *DBP5* se puso bajo control del promotor *tetO*, reprimible por doxiciclina, no se observó ninguna mejora en el crecimiento de esta cepa en presencia de doxiciclina (Figura 3.3.B), por tanto, la sobre-expresión de *rpb2t* no es capaz de suprimir los defectos en el crecimiento causados por la depleción de Dbp5p.

Al igual que ocurre con la sobre-expresión del alelo truncado *rpb2t*, la sobre-expresión de un alelo truncado del gen *RPB1* (*rpb1t*) también suprime la letalidad sintética del doble mutante *dbp5-2 bur6-1* (resultado no mostrado), así como los defectos en el crecimiento provocados por la depleción del componente de NC2, Ydr1p (como se verá más adelante). Por ello, se investigó el efecto de la sobre-expresión del alelo truncado *rpb1t* sobre el crecimiento del mutante sencillo *dbp5-2*. Este alelo codifica los primeros 844 aminoácidos, de un total de 1.733 residuos y se subclonó en el vector multicopia YEplac181. Como se observa en la Figura 3.3.C, la sobre-expresión de *rpb1t* no permite el crecimiento del mutante *dbp5-2* a 34 °C.

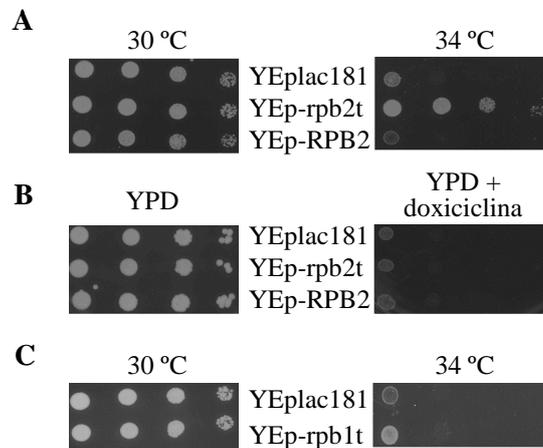


Figura 3.3: La sobre-expresión de *rpb2t* suprime el defecto en el crecimiento del mutante *dbp5-2* a la temperatura semi-restrictiva de 34 °C. (A) La cepa *dbp5-2* se transformó con el vector vacío YEplac181, con YEp-rpb2t y con YEp-RPB2, vector que sobre-expresa el gen silvestre *RPB2*, y se sembraron diluciones seriadas de los transformantes en placas de YPD, incubándose durante 4 días a 30 °C y 34 °C. (B) La cepa *P_{tetO}-DBP5* se transformó con los mismos plásmidos y diluciones seriadas de estos transformantes se sembraron en placas de YPD sin y con doxiciclina (10 µg/mL) durante 4 días a 34 °C. (C) El mutante sencillo *dbp5-2* se transformó con el plásmido YEp-rpb1t y con el vector vacío YEplac181 y diluciones seriadas de los transformantes se sembraron en placas de YPD y se incubaron durante 4 días a 30 °C y 34 °C.

La sobre-expresión de los alelos truncados, *rpb1t* y *rpb2t*, se llevó a cabo sobre células portadoras de los correspondientes genes silvestres, y es posible que esta sobre-expresión de alelos truncados pudiera implicar la formación de formas no funcionales de la RNA pol II, que contendrían alguna subunidad truncada, causando una reducción de la actividad transcripcional.

Con el objeto de comprobar si, en efecto, una reducción de la actividad de RNA pol II es capaz de suprimir el defecto en el crecimiento del mutante *dbp5-2* a la temperatura semi-restrictiva de 34 °C, se construyeron una serie de cepas en las que los promotores de diferentes subunidades de la RNA pol II se sustituyeron por el promotor regulable *tetO*. En la Figura 3.4.A se observa que las cepas con los genes *RPB1*, *RPB2* y *RPB7* bajo control del promotor *tetO* son capaces de crecer en presencia de doxiciclina, aunque el crecimiento es inferior al observado en ausencia de doxiciclina, debido a la reducción en la expresión del gen controlado por el promotor *tetO* y, con ello, a la reducción en la cantidad de RNA pol II presente en la célula. Esta reducción tiene un efecto negativo en el crecimiento del mutante *dbp5-2* tanto a 30 °C como a 33,5 °C (Figura 3.4.A). Además, se observó que la delección del gen *RPB9* que codifica una subunidad no esencial de la RNA pol II también tenía un efecto negativo sobre el crecimiento de la cepa *dbp5-2* a temperatura semi-restrictiva de 34 °C (Figura 3.4.B). Por lo tanto, la simple reducción de la cantidad o de la actividad de la RNA pol II no parece ser suficiente para suprimir el defecto en el crecimiento del mutante *dbp5-2* a temperatura semi-restrictiva de 34 °C.

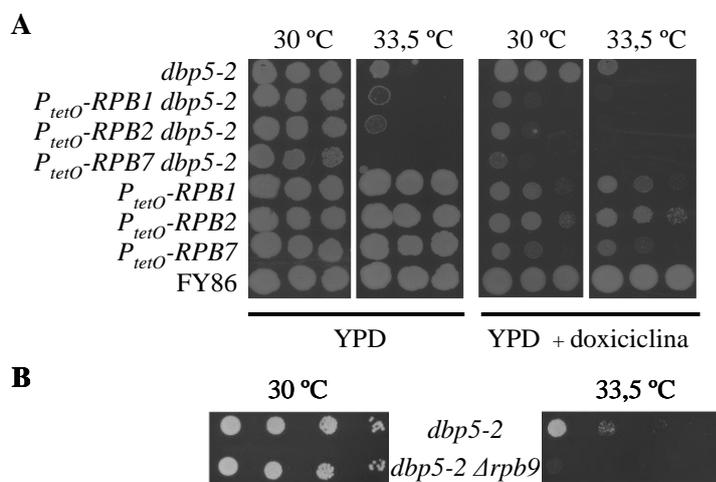


Figura 3.4: La reducción en la actividad de la RNA pol II no suprime la termosensibilidad del mutante *dbp5-2*. (A) La depleción de subunidades de la RNA pol II no suprime el defecto en el crecimiento del mutante *dbp5-2* a temperatura semirestrictiva. Se sembraron diluciones seriadas de los mutantes sencillos *dbp5-2*, *P_{tetO}-RPB1*, *P_{tetO}-RPB2*, *P_{tetO}-RPB7*, de los dobles mutantes y de la cepa silvestre (FY86) en placas de YPD sin y con doxiciclina (10 µg/mL) y se incubaron durante 4 días a 30 °C y 33,5 °C. (B) La delección de *RPB9* acentúa los defectos en el crecimiento del mutante *dbp5-2*. Se sembraron diluciones seriadas de los mutantes sencillos *dbp5-2* y del doble mutante *dbp5-2 Δrpb9* en placas de YPD y se incubaron durante 4 días a 30 °C y 33,5 °C.

Por otra parte, para analizar los posibles efectos de la sobre-expresión de *rpb2t* en la tasa de transcripción dependiente de la RNA pol II se analizaron por *Northern blot* los niveles de diferentes transcritos en una cepa silvestre (FY86) y en un mutante *dbp5-2* transformados con el plásmido YEp-*rpb2t* o con el vector vacío, utilizando el transcrito de la RNA pol III, *SCR1*, para normalizar las cantidades totales de RNA. Como se puede observar en la Figura 3.5, la sobre-expresión de *rpb2t* no dio lugar a una reducción en el nivel de transcrito de ninguno de los genes analizados.

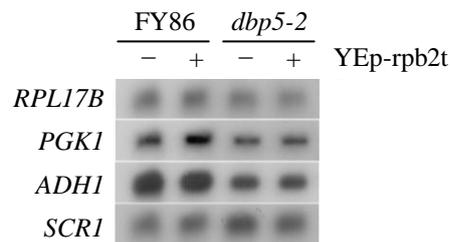


Figura 3.5: La sobre-expresión de *rpb2t* no provoca cambios en el nivel de transcrito de diferentes genes que se expresan de manera constitutiva en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Células de la cepa silvestre (FY86) y del mutante *dbp5-2* transformadas con el plásmido YEp-rpb2t (+) o con el vector vacío YEplac181 (-) se crecieron hasta fase exponencial temprana en YPD y se obtuvo el RNA total, analizándose por *Northern blot* la expresión de los genes indicados. El transcrito de la RNA pol III, *SCR1*, se usó como control de carga.

3.3.- La sobre-expresión de *rpb2t* mejora la exportación de mRNAs.

Dado que la sobre-expresión de *rpb2t* mejora claramente el crecimiento del mutante *dbp5-2* a temperatura semi-restrictiva (Figura 3.3.A), se pensó que esta mejora en el crecimiento podría ser consecuencia de la supresión del fenotipo de acumulación nuclear de RNA poliadenilado que causa la mutación *dbp5-2*. La Figura 3.6.A muestra el resultado del análisis de la localización de RNA poliadenilado a diferentes temperaturas, mediante hibridación *in situ*, en una cepa silvestre y en un mutante *dbp5-2* transformados con el plásmido YEp-rpb2t y con el vector vacío. Como puede observarse, este análisis no reveló diferencias significativas en cuanto a la distribución del RNA poliadenilado entre las cepas transformadas con el vector y aquellas que sobre-expresaban el alelo *rpb2t*.

Para superar las limitaciones de la técnica de hibridación *in situ* para detectar cambios modestos en la tasa de exportación, se diseñó un ensayo alternativo para cuantificar el efecto de la sobre-expresión de *rpb2t* en la exportación del transcrito que codifica la enzima β -galactosidasa (producido

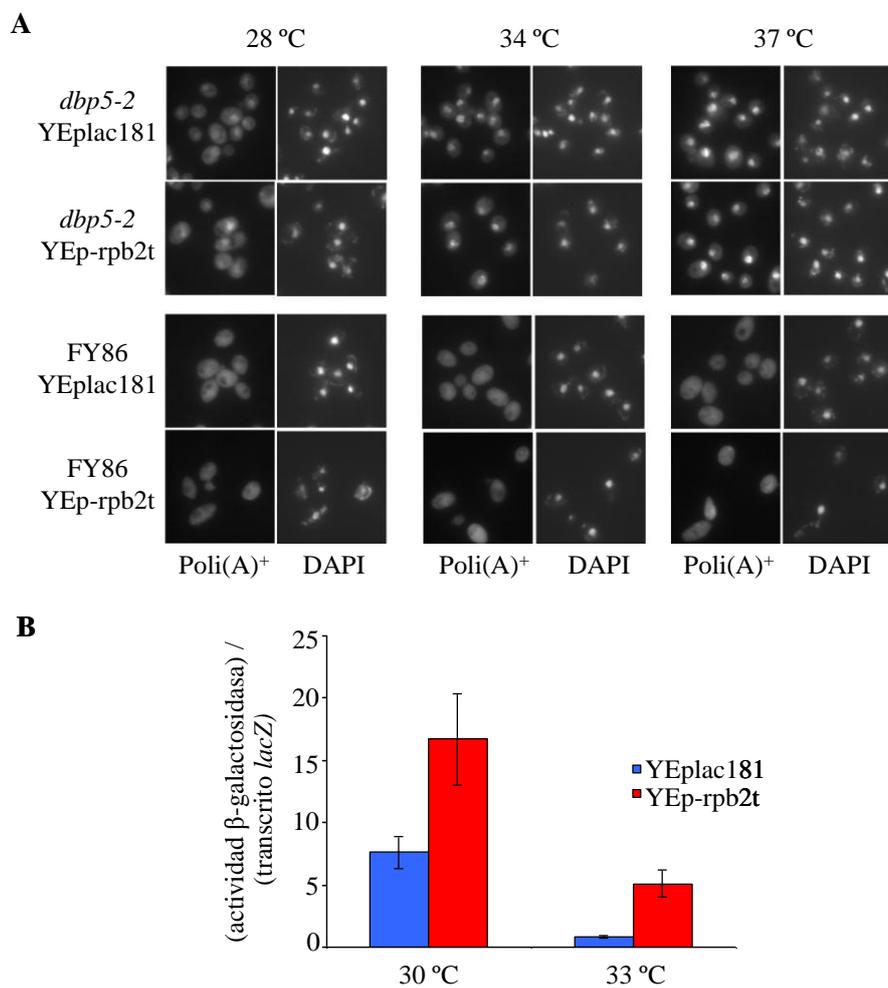


Figura 3.6: La sobre-expresión de *rpb2t* mejora la exportación de partículas ribonucleoproteicas (mRNP) sin alterar significativamente los niveles de mRNA. (A) Localización de colas poli(A)⁺ de mRNA y de núcleos (DAPI) en la cepa silvestre (FY86) y en el mutante *dbp5-2* que contienen el plásmido YEplac181 o YEp-rpb2t a 28 °C, 34 °C y 37 °C. (B) Actividad β-galactosidasa en el mutante *dbp5-2*, (transformado con un plásmido portador del gen reportero *lacZ* bajo control del promotor del gen *ADHI*) que contiene el vector YEplac181 o YEp-rpb2t a 30 °C y 33 °C, referida al nivel de transcrito *lacZ* sintetizado por estas cepas bajo las mismas condiciones para tres experimentos independientes.

a partir de un gen reportero que expresa el gen *lacZ* de *E.coli* bajo el control del promotor del gen *ADHI* de *S. cerevisiae*). En este ensayo se cuantificaron los niveles totales de transcrito mediante la técnica de *Northern blot* y se midió la capacidad de exportación en función de la actividad enzimática β -galactosidasa producida. Los resultados mostrados en la Figura 3.6.B indican que la sobre-expresión de *rpb2t* en el mutante *dbp5-2* da lugar a un incremento de la relación proteína/transcrito respecto a la que presenta dicha cepa transformada con el vector vacío, tanto a la temperatura permisiva de 30 °C como a la temperatura semi-restrictiva de 34 °C.

3.4.- Efecto de la sobre-expresión de *rpb2t* sobre la mutación en los componentes del factor transcripcional NC2.

El hallazgo de que la sobre-expresión de *rpb2t* suprime la letalidad sintética entre *bur6-1* y *dbp5-2* y sus efectos sobre el crecimiento y la exportación de mRNAs en el mutante *dbp5-2*, nos llevó a determinar si el plásmido YEp-rpb2t también sería capaz de suprimir los defectos causados por la pérdida de función del componente de NC2, Bur6p. Por ser *BUR6* un gen esencial para la viabilidad celular (Kim *et al.*, 1997), se procedió a construir el alelo condicional, *P_{GALI}-BUR6*, en el que se reemplazó el promotor silvestre del gen *BUR6* por el promotor regulable *GALI*. La cepa portadora de este alelo es incapaz de crecer en un medio con glucosa (Figura 3.7.A), dado que el promotor *GALI* sólo se expresa cuando la fuente de carbono es galactosa. Cuando esta cepa se transformó con el plásmido YEp-rpb2t se observó que los transformantes eran capaces de crecer en un medio que contenía glucosa como fuente de carbono (Figura 3.7.A). Al igual que Bur6p, el segundo componente del factor transcripcional NC2, Ydr1p, está codificado por un gen esencial. Por lo tanto, cuando el promotor de *YDR1* se sustituyó por el promotor del gen *GALI*, la cepa resultante fue incapaz de crecer en un medio con glucosa (Figura 3.7.A). La sobre-expresión de *rpb2t*

también es capaz de suprimir los defectos en el crecimiento causados por la depleción de Ydr1p (en la cepa $P_{GALI}\text{-}YDR1$; Figura 3.7.A), así como la depleción simultánea de ambos componentes (en una cepa $P_{GALI}\text{-}BUR6$ $P_{GALI}\text{-}YDR1$; resultado no mostrado).

De forma similar a NC2, la sobre-expresión de *rpb2t* fue capaz de suprimir la depleción de la proteína Mot1p, como demuestra el crecimiento en glucosa de la cepa donde el gen *MOT1* se expresa bajo el control del promotor *GALI*, transformada con el plásmido YEp-rpb2t (Figura 3.7.B).

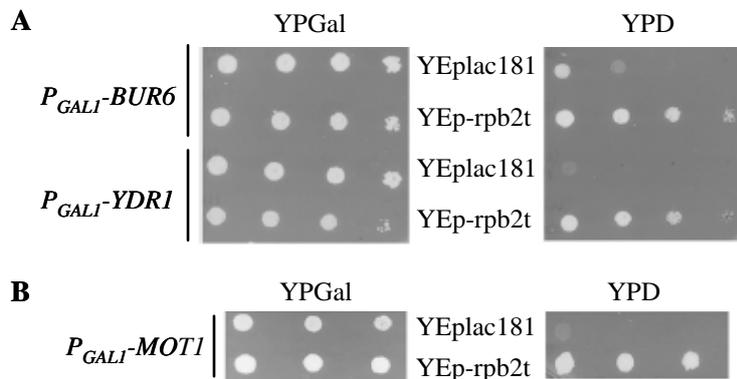


Figura 3.7: La sobre-expresión de *rpb2t* suprime la deficiencia de los componentes de NC2, *BUR6* e *YDR1* y de la ATPasa codificada por *MOT1*. (A) Las cepas $P_{GALI}\text{-}BUR6$ y $P_{GALI}\text{-}YDR1$ fueron transformadas con YEp-rpb2t o con el vector vacío YEplac181. Se sembraron diluciones seriadas de los transformantes en placas de YPD o de YPGal y se incubaron a 30 °C durante 3 días. (B) La cepa $P_{GALI}\text{-}MOT1$ fue transformada con YEp-rpb2t o con el vector vacío YEplac181 y se sembraron diluciones de los transformantes en YPD y en YPGal, incubándose durante 4 días a 30 °C.

Para descartar que el crecimiento observado fuera consecuencia de un defecto en la represión por glucosa del promotor *GALI* provocado por la sobre-expresión de *rpb2t*, se analizaron los niveles de las proteínas Bur6p e Ydr1p en medio con galactosa o glucosa como fuente de carbono. Para ello

se utilizaron las 3 copias del epitopo hemaglutinina (HA) que se introdujeron en el extremo N-terminal de estas proteínas cuando se sustituyeron sus promotores por el promotor *GALI* (Longtine *et al.*, 1998), haciendo posible su detección por *Western blot*. En la Figura 3.8 se compara la cantidad de estas proteínas en la cepa $P_{GALI-BUR6} P_{GALI-YDR1}$ que sobre-expresa *rpb2t* con la cantidad de estas proteínas en la cepa parental ($P_{GALI-BUR6} P_{GALI-YDR1}$) cuando las células se crecieron en un medio con galactosa como fuente de carbono y se transfirieron posteriormente 5 horas a un medio con glucosa. Dado que la sobre-expresión de *rpb2t* no comporta un incremento de los niveles de HA-Bur6p y de HA-Ydr1p en glucosa, la supresión de los defectos en el crecimiento de la depleción de NC2 no parece ser consecuencia de una represión defectuosa del promotor *GALI*.

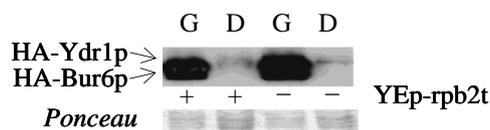


Figura 3.8: La sobre-expresión de *rpb2t* no altera la represión por glucosa del promotor *GALI*. Se obtuvieron extractos proteicos totales de células de la cepa doble mutante $P_{GALI-BUR6} P_{GALI-YDR1}$ transformada con el plásmido YEp-rpb2t (+) o con el vector YEplac181 (-) tanto en fase de crecimiento exponencial en galactosa (G) como transferidas durante 5 horas a un medio con glucosa (D). Las proteínas se separaron por SDS-PAGE en un gel al 8%, aunque las bandas correspondientes a HA-Ydr1p y a HA-Bur6p no pudieron resolverse adecuadamente (aparecen solapadas en la imagen) por ser Ydr1p de unos 16,6 KDa y Bur6p de unos 15,5 KDa. Ambas proteínas etiquetadas se detectaron con anti-HA monoclonal de ratón y con anti-inmunoglobulina G de ratón conjugado con peroxidasa como anticuerpo secundario. La tinción *Ponceau* del *Western blot* se empleó como control de carga.

Por otro lado, con el objeto de comprobar si la sobre-expresión de *rpb2t* era capaz de permitir la supervivencia de las levaduras en ausencia del factor transcripcional NC2, se transformó con el vector YEp-rpb2t una cepa que presentaba una deleción cromosomal del gen *BUR6* que era portadora de

un plásmido centromérico con el gen *BUR6* silvestre y que además contenía el gen *URA3* como marcador de selección. La cepa resultante no fue capaz de crecer en placas con 5'-FOA (resultado no mostrado), lo que indica que la sobre-expresión de *rpb2t* no permite prescindir por completo de la actividad de NC2. Además, la sobre-expresión de *rpb2t* tampoco fue capaz de suprimir el defecto en el crecimiento de una cepa termosensible *bur6-ts* a 37 °C (resultado no mostrado). Todos estos resultados sugieren que la supresión mediada por *rpb2t* requiere una mínima actividad del factor NC2.

3.5.- La sobre-expresión de *rpb2t* compensa parcialmente los defectos transcripcionales causados por la actividad reducida de NC2.

El papel de NC2 en la transcripción sugirió que la supresión de los defectos en el crecimiento de la depleción de NC2 por la sobre-expresión de *rpb2t* podría ocurrir a través de la supresión de los defectos transcripcionales provocados por la deficiencia de NC2. Con este objetivo se analizó el efecto de la sobre-expresión de *rpb2t* en el transcriptoma de una cepa donde se deplecionó la proteína Ydr1p. Estos estudios se llevaron a cabo utilizando macromatrices de nylon del servicio SCSIE de la Universitat de València.

Se comparó, en primer lugar, el perfil transcripcional de una cepa *P_{GALI}-YDR1* con el perfil de la cepa isogénica silvestre tras 4 horas de incubación en medio con glucosa como fuente de carbono (datos completos en <http://scsie.uv.es/chipsdna/chipsdna-e.html#datos>). La actividad reducida de NC2 dio como resultado una variación significativa en los niveles de transcrito de 1.346 genes (23%). De estos, 871 mostraron un nivel mayor de transcripción en la cepa mutante (65%), mientras 475 mostraron disminución de la transcripción (35%). Cuando se restringió el análisis a los transcritos que aumentaban o disminuían con un factor igual o superior a 2 en la cepa *P_{GALI}-YDR1* comparado con la silvestre, un total de 414 genes veían incrementados sus niveles de transcripción, mientras que 95 genes

disminuían, lo que parece sugerir que NC2 tiene, principalmente, efectos negativos sobre la expresión génica. Con el objeto de comprobar si la supresión de los defectos en el crecimiento causada por la sobre-expresión de *rpb2t* era consecuencia de la compensación de los defectos transcripcionales originados por la depleción de NC2, se compararon los perfiles de expresión (relativos a la cepa isogénica silvestre, tras una incubación de 4 horas en glucosa) de la cepa P_{GALI} -*YDR1* transformada con YE*p-rpb2t* con los de esta misma cepa transformada con el vector vacío YE*plac181*. Los resultados obtenidos indicaron que en condiciones de sobre-expresión de *rpb2t*, la mayoría de los genes (88%) cuya expresión aumentaba o disminuía más de 2 veces en la cepa P_{GALI} -*YDR1* (comparado con la cepa isogénica silvestre), mostraban un nivel de expresión más próximo al que presentan en la cepa silvestre en las mismas condiciones (Figura 3.9).

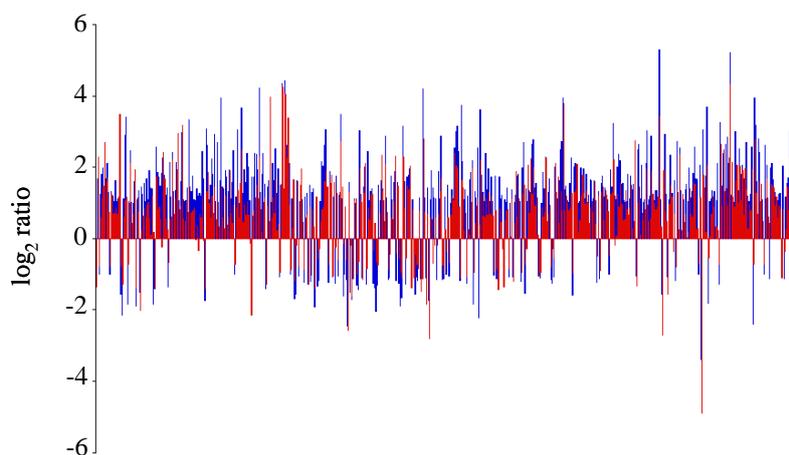


Figura 3.9: La sobre-expresión de *rpb2t* compensa los defectos en la expresión génica causados por la actividad reducida de NC2. En azul se muestran los logaritmos en base 2 del nivel de inducción para los transcritos que aumentaron o disminuyeron con un factor igual o superior a 2 en la cepa P_{GALI} -*YDR1* transformada con el vector YE*plac181* comparada con la cepa isogénica silvestre. Las barras rojas muestran el logaritmo en base 2 del nivel de inducción (también comparado con la cepa isogénica silvestre), para los mismos transcritos, en la cepa P_{GALI} -*YDR1* transformada con YE*p-rpb2t*.

La sobre-expresión de *rpb2t* en la cepa silvestre tuvo un efecto más reducido en la expresión génica, con sólo 94 transcritos cuya expresión cambió con un factor igual o superior a 2. De este modo, la sobre-expresión de *rpb2t* parece compensar el efecto global en la expresión génica causado por la actividad reducida de NC2.

3.6.- Los defectos en el crecimiento causados por depleción de NC2 pueden suprimirse por sobre-expresión de diferentes truncaciones del gen *RPB2*.

En el rastreo genómico que condujo a la identificación de *rpb2t*, se aislaron, de forma independiente, 6 plásmidos que contenían el mismo alelo. Con el objeto de comprobar si la capacidad de supresión de la letalidad sintética de la cepa *dbp5-2 bur6-1* era específica de la truncación a la que da lugar el alelo *rpb2t*, se clonaron fragmentos de restricción que contenían distintas partes de la pauta abierta de lectura del gen *RPB2* en el vector multicopia YEplac181, y los plásmidos resultantes se utilizaron para transformar la cepa *P_{GALI}-YDR1*. Como se esquematiza en la Figura 3.10, hasta las truncaciones C-terminales que incluían tan sólo 240 aminoácidos (de un total de 1.224 aminoácidos) fueron capaces de suprimir el defecto en el crecimiento del alelo *P_{GALI}-YDR1* en glucosa. No se observó crecimiento cuando se sobre-expresaron fragmentos de *RPB2* que contenían las secuencias codificadoras para los primeros 25 o 119 aminoácidos. La truncación C-terminal más larga, que contenía 943 aminoácidos, fue capaz de suprimir el defecto en el crecimiento de la cepa *P_{GALI}-YDR1*, mientras que la sobre-expresión del gen completo *RPB2* no tuvo ningún efecto supresor (Figura 3.10). La capacidad de supresión es consecuencia de la sobre-expresión de los alelos truncados del gen *RPB2* dado que cuando se transformó la cepa *P_{GALI}-YDR1* con un plásmido centromérico portador del

alelo *rpb2t* los transformantes fueron incapaces de crecer en glucosa (resultado no mostrado).

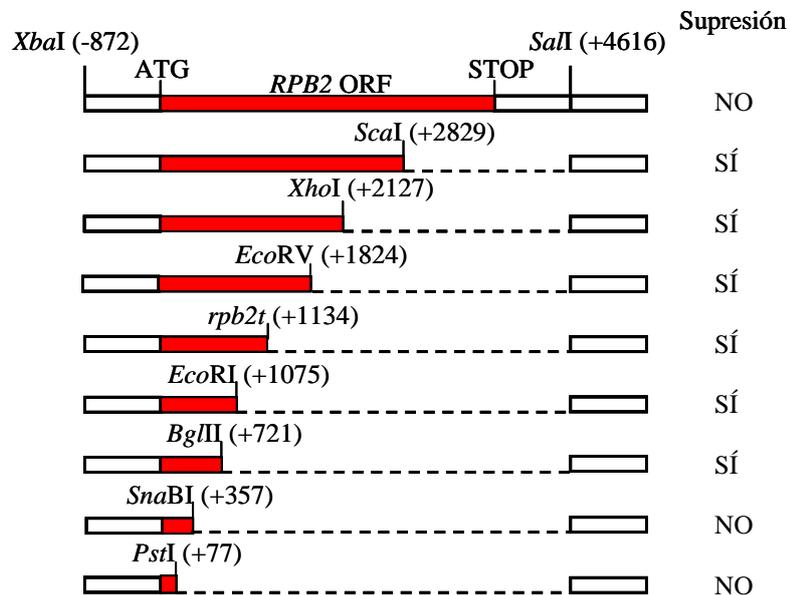


Figura 3.10: La sobre-expresión de fragmentos N-terminales de *rpb2t* suprime el defecto en el crecimiento causado por la depleción de NC2. Se generaron deleciones C-terminales de *RPB2* subclonando diferentes fragmentos de restricción del plásmido pRP212 en el vector YEplac181. Los fragmentos comparten el mismo extremo 5' (un sitio *Xba*I localizado en la posición -872 del codón ATG de *RPB2*) y terminan en las posiciones indicadas (respecto al codón ATG). Se señala su capacidad de supresión del defecto en el crecimiento de una cepa *P_GALI-YDRI*.

Como se ha indicado, la sobre-expresión de una versión truncada del gen *RPB1* no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento del mutante *dbp5-2* a la temperatura semi-restrictiva de 34 °C (Figura 3.3.C). Con objeto de comprobar los efectos de la sobre-expresión de alelos truncados de *RPB1* sobre la depleción de NC2, se subclonaron en el vector multicopia YEplac181 fragmentos de restricción del gen *RPB1* que contenían las secuencias codificadoras de los 220 o los 844 aminoácidos N-terminales (de un total de 1.733 residuos). Ambos fragmentos fueron capaces de suprimir

los defectos en el crecimiento de la cepa *P_{GALI}-YDR1* en un medio con glucosa como fuente de carbono (resultado no mostrado).

3.7.- La supresión del defecto en NC2 por sobre-expresión de *rpb2t* no se debe al secuestro de Rpb9p, Rpb12p o Sin4p por la sobre-expresión de la proteína truncada.

La RNA pol II de *S. cerevisiae* está constituida por 12 subunidades, 10 de las cuales son esenciales para la viabilidad celular y 5 están conservadas en las tres RNA polimerasas eucariotas (Hampsey, 1998). La región N-terminal de la subunidad Rpb2p forma parte de los dominios de la RNA pol II conocidos como “protusión” y “lóbulo”, e incluye regiones de interacción con Rpb12p y Rpb9p (Cramer *et al.*, 2001). Por otro lado, se ha descrito que mutaciones en el componente del Mediador Sin4p permiten la supervivencia celular en ausencia de NC2 (Lemaire *et al.*, 2000).

Partiendo de estas premisas, se analizó la posibilidad de que la supresión por parte de *rpb2t* del defecto de NC2 pudiera deberse al secuestro o a una disminución funcional de alguna de estas subunidades, Rpb9p, Rpb12p o Sin4p, provocado por la sobre-expresión de *rpb2t*. Para analizar esta posibilidad, se clonaron los genes *RPB9*, *RPB12* y *SIN4* en un vector multicopia y se transformó con ellos una cepa *P_{GALI}-YDR1* portadora del plásmido YEp-rpb2t. En todos los casos, los dobles transformantes fueron todavía capaces de crecer en glucosa, sugiriéndose que el secuestro de Rpb9p, Rpb12p o Sin4p no es responsable, o al menos no es la única causa, de la supresión por parte de *rpb2t* del defecto en el crecimiento provocado por la actividad reducida de NC2.

4.- Identificación y caracterización de mutaciones supresoras de la deficiencia en NC2.

4.1.- Identificación de mutantes capaces de suprimir el defecto en el crecimiento causado por deficiencias en NC2.

Como se ha comentado en la introducción, NC2 es un factor transcripcional, evolutivamente conservado, al que se han atribuido funciones positivas y negativas en la regulación de la transcripción. Sin embargo, si exceptuamos su capacidad de unión con TBP, se desconoce casi por completo su relación con otros componentes de la maquinaria transcripcional. Con el objetivo de identificar interacciones genéticas que contribuyan a la caracterización funcional de NC2 se llevó a cabo un rastreo genómico en busca de mutaciones supresoras del requerimiento de NC2 para el crecimiento celular. Para ello, se transformó una cepa, donde la expresión de los genes *YDR1* y *BUR6* se encuentra bajo el control del promotor *GALI*, con una genoteca de DNA genómico mutagenizado por inserción del transposón *mTn3-lacZ/LEU2* (Burns *et al.*, 1994). Las mutaciones supresoras se seleccionaron por su capacidad de permitir el crecimiento en medio con glucosa como fuente de carbono a temperatura ambiente. La identificación de las mutaciones se llevó a cabo mediante la localización del sitio de inserción del transposón (ver Materiales y Métodos; apartado 2.7.5.2.- Rastreo genómico de mutaciones supresoras por inserción de transposones). Se identificaron un total de 17 alelos supresores, que se denominaron *snd* (por *suppressors of NC2 depletion*). Como se muestra en la Tabla 4.1, diez de las mutaciones identificadas corresponden a alelos de genes que codifican proteínas previamente caracterizadas como componentes de la maquinaria básica de transcripción. Otros alelos supresores encontrados en este rastreo correspondieron a los genes *IWR1* e *YMR185w*. El gen *IWR1* también es objeto de estudio de este trabajo, como se verá más adelante.

Tabla 4.1: Alelos *snd* obtenidos en el rastreo por inserción de transposones que corresponden a genes que codifican componentes de la maquinaria básica de transcripción.

Alelo	Gen	Esencial	Tamaño ORF (nt)	Posición de inserción (respecto al ATG)
<i>snd1-1</i>	<i>NUT2/MED10</i>	SÍ	471	+475
<i>snd1-2</i>	<i>NUT2/MED10</i>	SÍ	471	+183
<i>snd1-5</i>	<i>NUT2/MED10</i>	SÍ	471	-765
<i>snd1-6</i> <i>snd1-18</i>	<i>NUT2/MED10</i>	SÍ	471	-277
<i>snd1-9</i> <i>snd1-50</i>	<i>NUT2/MED10</i>	SÍ	471	+140
<i>snd1-26</i>	<i>NUT2/MED10</i>	SÍ	471	-675
<i>snd2-1</i>	<i>TFB1</i>	SÍ	1926	+1857
<i>snd3-1</i>	<i>RPB7</i>	SÍ	513	+642
<i>snd4-1</i>	<i>MED7</i>	SÍ	666	-63
<i>snd5-1</i>	<i>SRB2</i>	NO	731 (intrón incluido)	+380

Nut2p/Med10p, Med7p y Srb2p son subunidades del Mediador. Por otro lado, Tfb1p es un componente del factor transcripcional TFIID y Rpb7p es una de las subunidades de la RNA pol II. Cabe destacar que, a excepción de *SRB2*, todos los genes identificados son esenciales. No obstante, como se indica en la Tabla 4.1, salvo en los alelos *snd1-2*, *snd1-9*, *snd1-50* y *snd2-1*, la inserción del transposón tuvo lugar fuera de la pauta abierta de lectura de estos genes, bien en el flanco 5' o bien en el 3'. Aunque la inserción del transposón en el alelo *snd2-1*, cerca del extremo 3' del gen *TFB1*, sugiere que este alelo puede codificar una proteína truncada que conserve parcialmente su función, no ocurre lo mismo con los alelos del gen *NUT2*, donde las inserciones se han producido en diferentes puntos de la región codificadora, lo que hace suponer que, en condiciones de depleción de las proteínas Bur6p e Ydr1p, la mutación nula *nut2* deja de ser inviable (ver más adelante).

4.2.- La supresión de NC2 por parte de los mutantes *snd* no es consecuencia de la expresión constitutiva del promotor *GALI*.

El rastreo genómico en busca de supresores del defecto en el crecimiento provocado por deficiencias en NC2 se llevó a cabo sobre una cepa donde la expresión de los genes *BUR6* e *YDR1* está controlada por el promotor *GALI*. Este hecho planteó la posibilidad de que la capacidad de crecimiento de los mutantes en un medio con glucosa como única fuente de carbono se debiera a una represión defectuosa del promotor *GALI* causada por la mutación *snd*. Para descartar esta posibilidad se analizó, en primer lugar, si los mutantes *snd* aislados en el rastreo genómico eran capaces de suprimir los defectos en el crecimiento causados por depleción de una proteína esencial, no relacionada con la regulación transcripcional, expresada bajo control del promotor *GALI*. Para ello, empleamos una cepa en la que el gen *ROT1*, que codifica una proteína localizada en retículo endoplasmático involucrada en la dinámica del citoesqueleto de actina, se puso bajo control del promotor *GALI*. Como cabía esperar, esta cepa no fue capaz de crecer en un medio con glucosa como fuente de carbono (resultado no mostrado). Ninguna de las mutaciones identificadas en nuestro rastreo permitió a la cepa *P_{GALI}-ROT1* crecer en un medio con glucosa (resultado no mostrado). En segundo lugar, se analizaron los niveles de las proteínas Bur6p e Ydr1p en los mutantes *snd*, aprovechando que estas proteínas fueron etiquetadas en su extremo N-terminal con 3 copias del epitopo hemaglutinina (HA) cuando se sustituyó su promotor por el promotor *GALI* (Longtine *et al.*, 1998), permitiéndonos su detección por *Western blot*. En la Figura 4.1 se compara la cantidad de estas proteínas expresadas bajo control del promotor *GALI* en los mutantes *snd* con las cantidades de estas proteínas en la cepa *SND* isogénica silvestre (control), cuando las células se crecieron

en un medio con galactosa como fuente de carbono y se transfirieron durante 5 horas a un medio con glucosa. Ningún mutante mostró un aumento de los niveles de estas proteínas, de modo que la supresión no parece ser consecuencia de la represión defectuosa del promotor *GALI* en glucosa.

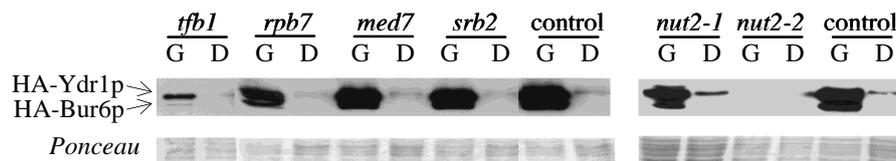


Figura 4.1: Las mutaciones *snd* no provocan defectos en la represión por glucosa del promotor *GALI*. Se obtuvieron extractos proteicos totales de células de la cepa doble mutante $P_{GALI}-BUR6 P_{GALI}-YDR1$ (control) y de dicha cepa con los alelos *snd* indicados tanto en fase de crecimiento exponencial en galactosa (G) como transferidas durante 5 horas a un medio con glucosa (D). Las proteínas se separaron por SDS-PAGE en un gel al 8%. HA-Bur6p y HA-Ydr1p se detectaron con anti-HA monoclonal de ratón y con anti-inmunoglobulina G de ratón conjugado con peroxidasa como anticuerpo secundario. La tinción *Ponceau* del *Western blot* se empleó como control de carga.

Se observó que en los mutantes *snd1-2/nut2-2* y *snd2-1/tfb1-1* el nivel de las proteínas Bur6p e Ydr1p en galactosa es menor que en la cepa control, lo que sugiere que estos mutantes podrían ser defectivos en la inducción del promotor *GALI*. Esta podría ser la razón del fenotipo de crecimiento lento que muestran estos dos mutantes en galactosa, siendo este defecto incluso mayor que el observado en glucosa (Figura 4.2). El resto de mutaciones no afectan al crecimiento en galactosa de la cepa doble mutante (resultados no mostrados).

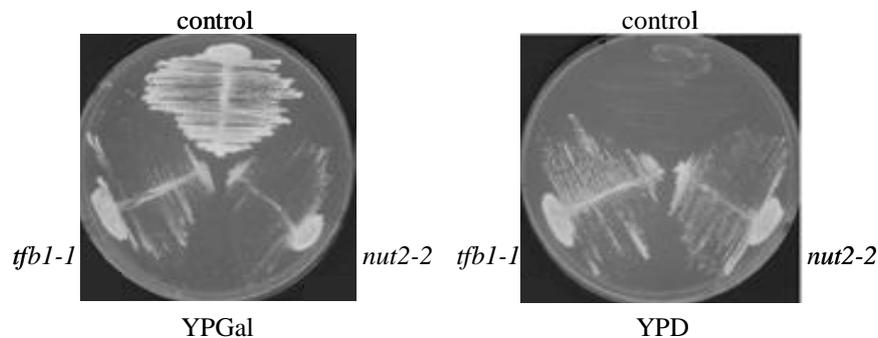


Figura 4.2: Los alelos *snd1-2/nut2-2* y *snd2-1/tfb1-1* provocan un fenotipo de lento crecimiento en galactosa. La cepa doble mutante $P_{GALI-BUR6} P_{GALI-YDR1}$ con el alelo *nut2-2* o con el alelo *tfb1-1* y la cepa parental doble mutante (control) se sembraron en placas de YPGal e YPD y se incubaron a 30 °C durante 6 días.

4.3.- La depleción de Nut2p suprime los defectos en el crecimiento de los mutantes en los componentes del factor NC2.

El locus identificado con mayor frecuencia en el rastreo genómico por inserción del transposón corresponde al gen *NUT2/MED10* (Tabla 4.1), componente del Mediador; se aislaron 8 mutantes independientes y se mapearon 6 sitios diferentes de inserción del transposón en este gen. Dado que *NUT2* es un gen esencial, resultó sorprendente que dos de las inserciones (*snd1-2* y *snd1-9/snd1-50*) se localizaran en la región codificadora, en posiciones que probablemente dan lugar a una proteína no funcional. Estos mutantes muestran un crecimiento extremadamente lento tanto en glucosa como en galactosa y resultó imposible obtener un mutante sencillo *snd1-2/nut2-2* al cruzar el triple mutante $P_{GALI-BUR6} P_{GALI-YDR1} nut2-1::mTn-lacZ/LEU2$ con una cepa silvestre. Este resultado parece sugerir que la mutación *nut2-2* sólo es viable en condiciones de actividad NC2 reducida.

Para analizar la relación genética entre *NUT2* y *NC2*, se construyó, una cepa P_{tetO} -*NUT2* en la que se sustituyó el promotor silvestre de este gen por el reprimible por doxiciclina, *tetO*. Aunque se había descrito que este cambio de promotor producía un fenotipo de crecimiento lento constitutivo (Mnaimneh *et al.*, 2004), en nuestra cepa, el cambio de promotor no tuvo ningún efecto en el crecimiento celular a cualquiera de las concentraciones de doxiciclina empleadas (Figura 4.3). En ausencia de doxiciclina, el crecimiento de la cepa P_{tetO} -*NUT2* P_{GALI} -*YDR1* resultó similar al de la cepa P_{GALI} -*YDR1*, tanto en medio con glucosa como con galactosa (resultado no mostrado). Sin embargo, en presencia de doxiciclina, la represión del promotor *tetO* da lugar a una mejora en el crecimiento del doble mutante P_{tetO} -*NUT2* P_{GALI} -*YDR1* en glucosa que es proporcional a la concentración de doxiciclina en el medio (Figura 4.3).

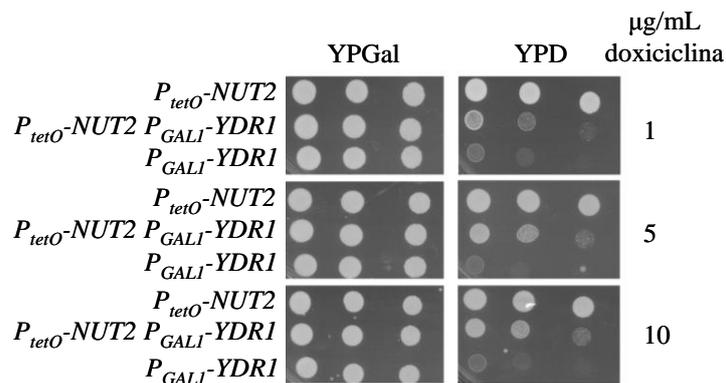


Figura 4.3: La reducción en la expresión de *NUT2* suprime los defectos en el crecimiento causados por la depleción de *Ydr1p*. Diluciones seriadas de la cepa doble mutante P_{tetO} -*NUT2* P_{GALI} -*YDR1* y de los mutantes sencillos se sembraron en placas de YPD y de YPGal suplementadas con diferentes concentraciones de doxiciclina y se incubaron a 30 °C durante 4 días.

4.4.- Las mutaciones *snd* permiten el crecimiento en ausencia de Bur6p e Ydr1p.

Con el objeto de comprobar si las mutaciones en los genes identificados en el rastreo genómico eran capaces de suprimir la ausencia total de NC2, se utilizó una cepa con una deleción cromosomal del gen *BUR6* y mantenida viable por la presencia de un plásmido centromérico con el gen *BUR6* silvestre con marcador de selección *URA3* (pBUR6/URA3). En el caso del gen *SRB2*, por su carácter no esencial, se procedió a construir una deleción completa del gen. En los otros genes se sustituyó su promotor por el promotor *tetO*, reprimible por doxiciclina. La capacidad para suprimir la ausencia de Bur6p se realizó sembrando estos mutantes en placas que contenían 5'-FOA y además, en el caso de *P_{tetO}-NUT2*, *P_{tetO}-MED7*, *P_{tetO}-TFB1* y *P_{tetO}-RPB7*, en presencia de 10 mg/L de doxiciclina para reprimir el promotor *tetO*. Como control positivo se empleó la cepa parental transformada con un plásmido centromérico que contenía el gen silvestre *BUR6* con el marcador de selección *LEU2* (pBUR6/LEU2). Como control negativo se empleó la cepa parental.

En la Figura 4.4.A se observa que la pérdida del plásmido pBUR6/URA3 impidió el crecimiento de la cepa parental no modificada, mientras que la deleción de *SRB2* y las reducciones en la expresión de *NUT2*, *MED7*, *TFB1* y *RPB7* permitieron el crecimiento celular en ausencia de *BUR6*. Estos resultados confirman que una depleción en las subunidades del Mediador Nut2p, Med7p y Srb2p, del componente del factor transcripcional transcripcional TFIIH, Tfb1p, así como de la subunidad Rpb7p de la RNA pol II, son capaces de permitir el crecimiento en ausencia de Bur6p.

Del mismo modo, la Figura 4.4.B muestra que el requerimiento esencial del gen *YDR1* puede compensarse por mutaciones en componentes del Mediador (*SRB2*), de TFIIH (*TFB1*) y de la RNA pol II (*RPB7*).

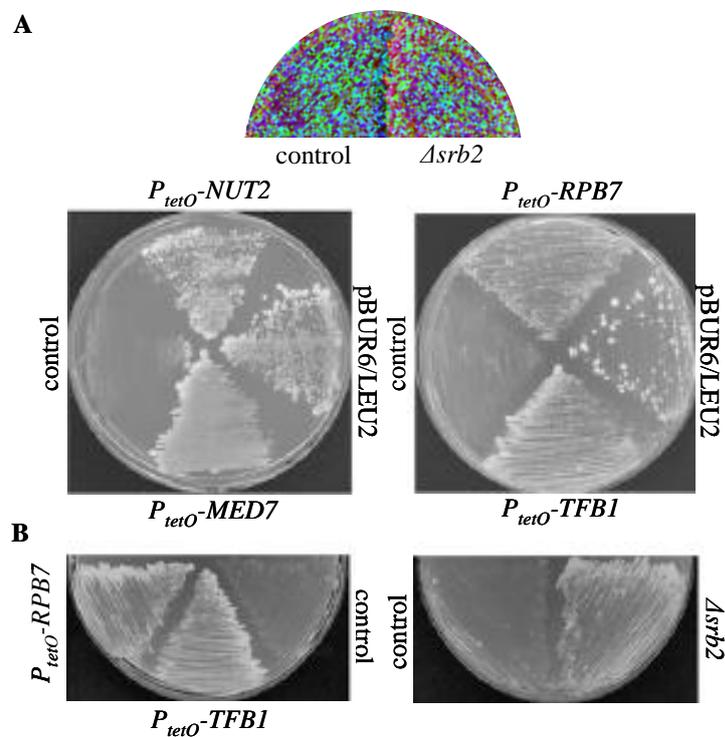


Figura 4.4: Las mutaciones *snd* compensan la ausencia de Bur6p e Ydr1p. (A) Los alelos mutantes $\Delta srb2$, P_{tetO} -NUT2, P_{tetO} -RPB7, P_{tetO} -MED7 y P_{tetO} -TFB1 se introdujeron en la cepa control $\Delta bur6$ que contenía además el gen *BUR6* silvestre en un plásmido centromérico, pBUR6/URA3, y se sembraron los transformantes en placas con 5'-FOA ($\Delta srb2$) o en placas con 5'-FOA y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de doxiciclina (cepas con genes bajo control del promotor *tetO*), incubándose durante 5 días a 30 °C. Como control positivo se empleó la cepa control transformada con un plásmido centromérico que contenía el gen *BUR6* silvestre y el marcador de selección *LEU2* (pBUR6/LEU2). La cepa $\Delta bur6$ con el gen *BUR6* silvestre en un plásmido centromérico pBUR6/URA3 sin transformaciones adicionales se empleó como control negativo. (B) Mutaciones en componentes del Mediador ($\Delta srb2$), de TFIIH (P_{tetO} -TFB1) y de la RNA pol II (P_{tetO} -RPB7) se introdujeron en la cepa $\Delta ydr1$ que contenía además el gen *YDR1* silvestre en un plásmido centromérico, pYDR1/URA3, y los transformantes se sembraron en placas con 5'-FOA ($\Delta srb2$) o en placas con 5'-FOA y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de doxiciclina (cepas con genes bajo control del promotor *tetO*), incubándose a 30 °C durante 5 días.

4.5.- Diferentes mutaciones en subunidades del Mediador suprimen defectos en NC2.

En el rastreo genómico llevado a cabo por inserción del transposón, además de *nut2*, también se identificaron mutaciones en genes que codifican otras dos subunidades del Mediador: Med7p y Srb2p. Para analizar en profundidad las interacciones genéticas entre el Mediador y el factor transcripcional NC2, se realizó un estudio sistemático del efecto de las mutaciones en los genes que codifican las subunidades no esenciales del Mediador sobre el crecimiento de una cepa con actividad NC2 reducida. Para ello se sustituyeron, en cada una de las cepas mutantes en subunidades no esenciales del Mediador, los promotores de los genes *YDR1* o *BUR6* por el promotor regulable *GAL1* y se analizó su capacidad de crecimiento en un medio con glucosa como fuente de carbono. En la Figura 4.5 se observa que, excepto en el caso de *med2*, *med3* y *gal11*, las mutaciones en cualquiera de las subunidades no esenciales del Mediador son capaces de suprimir, en diferente grado, los defectos en el crecimiento causados por la depleción de Bur6p o de Ydr1p. Las mutaciones *med2*, *med3* y *gal11* no sólo no suprimen, sino que tienen un efecto negativo en el crecimiento residual en glucosa de las cepas con una actividad NC2 reducida. Las proteínas codificadas por los genes cuya mutación no da lugar a supresión parecen formar un submódulo específico dentro de la llamada “cola” del Mediador. Así, mutantes en los componentes de este submódulo muestran perfiles de expresión transcripcional similares, que son muy distintos al perfil mostrado por el mutante *Δsin4* (van de Peppel *et al.*, 2005). El gen *SIN4* codifica la otra subunidad no esencial de la “cola” del Mediador y su mutación sí suprime los defectos causados por la depleción de *YDR1* y de *BUR6* (Figura 4.5) Además, se ha comprobado que la tríada Med2p/Med3p/Gal11p es capaz de funcionar como un subcomplejo libre y puede ser reclutada en el

PIC de forma independiente a los demás componentes del Mediador (Zhang *et al.*, 2004).

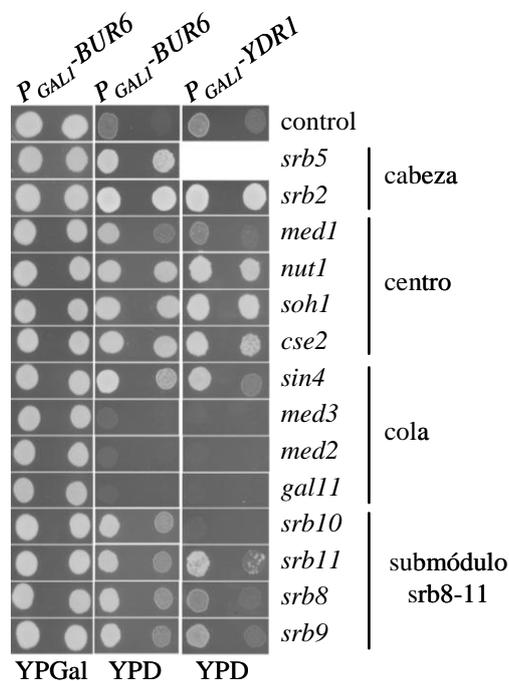


Figura 4.5: Mutaciones en los genes que codifican las subunidades no esenciales del Mediador, excepto Med2p, Med3p y Gal11p, suprimen, en diferente grado, los defectos en el crecimiento causados por la depleción de NC2. Diluciones seriadas de las cepas con mutaciones en una subunidad del Mediador y los alelos $P_{GALI-YDR1}$ o $P_{GALI-BUR6}$, así como de las cepas con las mutaciones sencillas $P_{GALI-YDR1}$ o $P_{GALI-BUR6}$ (control) se sembraron en placas de YPD y de YPGal y se incubaron a 30 °C durante 4 días.

El hecho de que los componentes de la tríada Med2p/Med3p/Gal11p y el resto de subunidades no esenciales del complejo Mediador muestren interacciones genéticas antagónicas con el factor transcripcional NC2 nos llevó a investigar el efecto causado sobre el crecimiento de una cepa con actividad reducida de NC2 ($P_{GALI-YDR1}$) al combinar una mutación supresora ($\Delta srb2$) con una no supresora ($\Delta med3$). En la Figura 4.6 se observa

que el efecto compensatorio de la delección $\Delta srb2$ en una cepa con actividad reducida de NC2 es completamente eliminado por la mutación en el gen *MED3*. También se observa en esta figura que la delección de *MED2* es capaz de eliminar el efecto compensatorio de la depleción del componente de TFIID (*TFB1*) y de la subunidad de la RNA pol II (*RPB7*) en la cepa P_{GALI} -*YDR1* cuando ésta se crece en un medio con glucosa como fuente de carbono. Estos resultados sugieren que la integridad de la tríada Med2p/Med3p/Gal11p es necesaria para la capacidad supresora causada por mutaciones en otros componentes del complejo Mediador, así como en otros componentes de la maquinaria transcripcional básica.

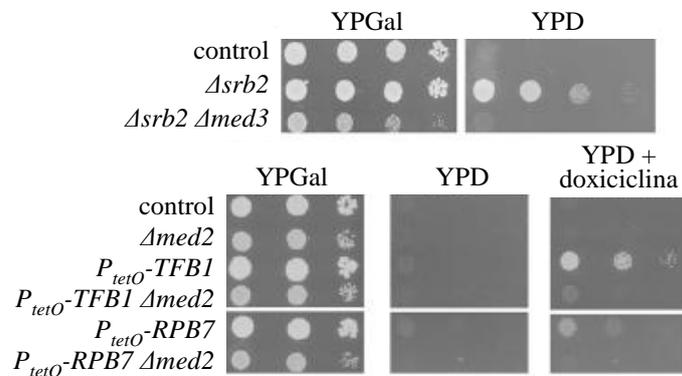


Figura 4.6: Relación epistática entre la tríada Med2p/Med3p/Gal11p y diferentes supresores de los defectos en NC2. Se analizó el efecto de las mutaciones indicadas sobre el crecimiento de la cepa P_{GALI} -*YDR1* (control) sembrando diluciones seriadas de los transformantes en placas de YPGal, YPD e YPD con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de doxiciclina e incubándose a 30 °C durante 4 días.

4.6.- Efecto de la depleción de NC2 y de mutaciones en componentes del Mediador sobre la activación transcripcional.

Como se ha comentado en el apartado anterior, las mutaciones en los componentes del submódulo Med2p/Med3p/Gal11p y las mutaciones en el

resto de subunidades no esenciales del Mediador tienen efectos antagónicos sobre el crecimiento de las cepas con defectos en el factor transcripcional NC2 (Figura 4.5). Se planteó la posibilidad de que los efectos sobre el crecimiento fueran consecuencia de la supresión o la exacerbación de los defectos transcripcionales de los mutantes en NC2 por las mutaciones en los componentes del Mediador. Para comprobar este punto se seleccionaron dos mutaciones en componentes del Mediador con efectos contrarios sobre el crecimiento de las cepas $P_{GALI-YDR1}$ y $P_{GALI-BUR6}$ en glucosa ($\Delta srb2$ y $\Delta med2$) y se combinaron con un alelo en el que la expresión del gen $BUR6$ se encuentra bajo el control del promotor $tetO$ ($P_{tetO-BUR6}$). Las cepas resultantes tuvieron el comportamiento esperado, siendo las interacciones genéticas observadas similares cuando se deplecionó Bur6p mediante el apagado de los promotores $tetO$ y $GALI$ (Figura 4.7).

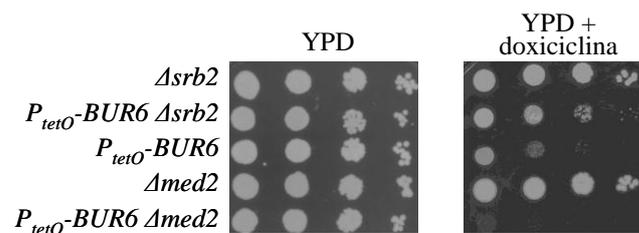


Figura 4.7: La deleción de $SRB2$, pero no la de $MED2$, suprime los defectos en el crecimiento causados por la reducción en la expresión de Bur6p mediante el apagado del promotor $tetO$. Diluciones seriadas de las cepas dobles mutantes $P_{tetO-BUR6} \Delta srb2$ y $P_{tetO-BUR6} \Delta med2$, así como de las cepas con las mutaciones sencillas $P_{tetO-BUR6}$, $\Delta srb2$ y $\Delta med2$ se sembraron en placas de YPD y de YPD con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de doxiciclina y se incubaron a 30 °C durante 3 días.

Estas cepas se utilizaron para analizar los efectos de la deleción de $MED2$ y $SRB2$ sobre los defectos transcripcionales provocados por la depleción de Bur6p sobre diferentes sistemas. El primero de ellos consiste en el gen reportero $lacZ$ de *Escherichia coli* expresado bajo el control de un

promotor que incluye los sitios de unión de LexA. Este gen se activa mediante la expresión en la célula de levadura de la proteína de fusión LexA-Gal4p (Figura 4.8.A) o mediante la proteína de fusión LexA-Gcn4p (Figura 4.8.B).

Como se observa en la Figura 4.8.A, la depleción de Bur6p provoca un ligero aumento en la expresión mediada por el factor transcripcional Gal4p, aumento que es superior tanto en la cepa $\Delta srb2 P_{tetO}-BUR6$ como en la $\Delta med2 P_{tetO}-BUR6$. En el caso de la activación transcripcional mediada por Gcn4p, la depleción de Bur6p provoca un importante incremento de la expresión del gen reportero, mientras que tanto la depleción de *MED2* como de *SRB2* reducen, en diferente grado, dicho incremento (Figura 4.8.B).

El segundo de los sistemas analizados consiste en el gen reportero *lacZ* expresado bajo el control del promotor del gen *HSP26*, que es activado por choque térmico a través de los factores transcripcionales Hsf1p y Msn2p/Msn4p (Amorós y Estruch, 2001). Como se observa en la Figura 4.8.C, la depleción de Bur6p provoca un incremento de la expresión constitutiva (a 25 °C) del gen $P_{HSP26}-lacZ$, aunque reduce la activación por choque térmico (a 37 °C) respecto a la observada en la cepa silvestre. La depleción de *SRB2* y de *MED2* reduce la expresión del gen reportero causada por la depleción de Bur6p, tanto en condiciones basales como de inducción (Figura 4.8.C).

Así pues, al menos en los sistemas ensayados, las mutaciones en los componentes del Mediador, *MED2* y *SRB2*, no tienen efectos antagónicos sobre los defectos transcripcionales provocados por la depleción de Bur6p.

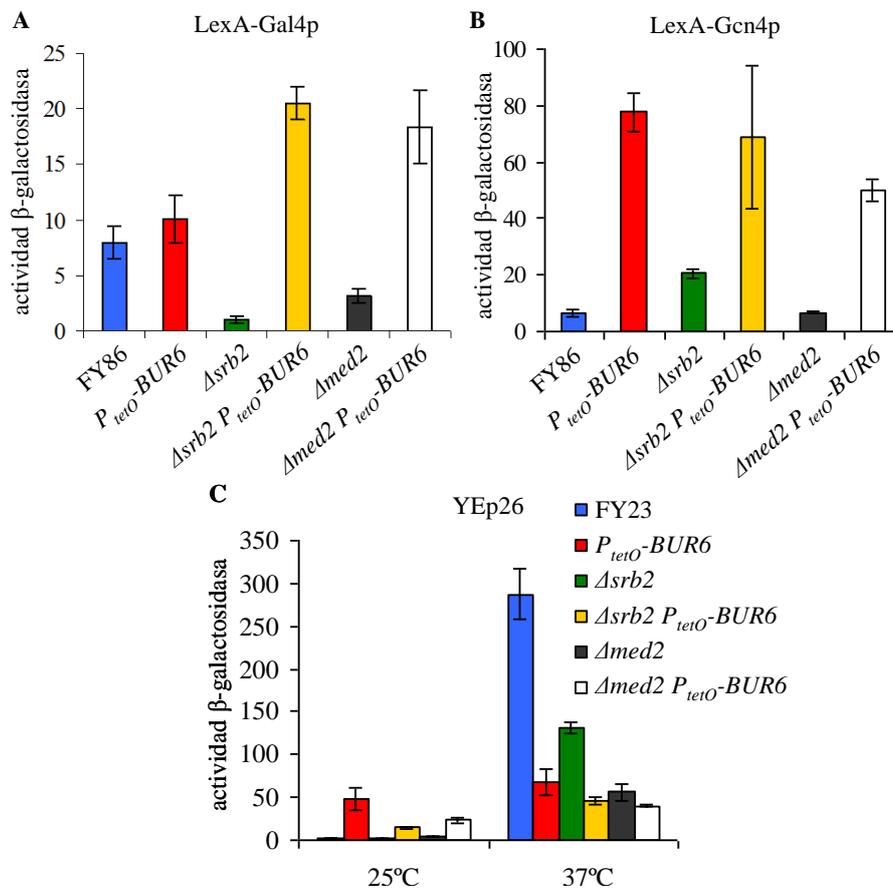


Figura 4.8: Efecto de mutaciones en componentes del Mediador y de la depleción de Bur6p sobre la activación transcripcional. (A) Las cepas indicadas transformadas con los plásmidos YCplac111-LexA-GAL4 y pSH18-34 (LexA-lacZ) se crecieron durante la noche en medio mínimo sintético sin leucina ni uracilo (SC-URA-LEU) con 10 μ g/mL de doxiciclina hasta fase exponencial temprana. Se representan los valores de actividad β -galactosidasa en cada caso. (B) Las cepas indicadas transformadas con los plásmidos YCplac111-LexA-GCN4 y pSH18-34 se crecieron como en (A) y se ensayó la actividad β -galactosidasa en cultivos que se encontraban en fase exponencial de crecimiento. (C) Las cepas indicadas transformadas con el plásmido YEp26 (P_{HSP26} -lacZ) se crecieron a 25 °C durante toda la noche en medio mínimo sintético sin uracilo (SC-URA) con 10 μ g/mL de doxiciclina hasta fase exponencial temprana. La inducción se realizó incubando las células a 37 °C durante 30 minutos. En todos los casos se representa la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

4.7.- La depleción de diferentes subunidades de la RNA pol II suprime los defectos en NC2.

Una de las mutaciones supresoras de los defectos en el crecimiento causados por actividad reducida de NC2 se localizó en el gen *RPB7* que codifica una de las subunidades de la RNA pol II (Tabla 4.1). Aunque *RPB7* es un gen esencial, en nuestro rastreo, la inserción del transposón (alelo *snd3-1*) se produjo 129 nucleótidos después del codón de parada, por lo que es posible que este alelo codifique una proteína tipo silvestre, y que sus efectos sean consecuencia de los cambios en la cantidad de la misma. Por otro lado, como se ha comentado anteriormente, la sobre-expresión de formas truncadas de Rpb2p también suprimen los defectos en el crecimiento causados por la depleción de NC2 (Figura 3.10). Estos resultados parecen sugerir que, en general, defectos en la RNA pol II pueden compensar los defectos en el crecimiento causados por una actividad reducida de NC2.

Para extender las observaciones realizadas a otros componentes de la RNA pol II, se subclonó en el vector multicopia YEplac181 una forma truncada C-terminal de la subunidad mayor de la RNA pol II, Rpb1p, a la que se llamó *rpb1t*. Esta forma truncada contiene los 844 aminoácidos N-terminales, de un total de 1.733 residuos. Con el plásmido YEp-rpb1t se transformó la cepa P_{GALI} -YDR1 y, como se observa en la Figura 4.9, la sobre-expresión de *rpb1t* tuvo un efecto positivo sobre el crecimiento de la cepa P_{GALI} -YDR1 en medio con glucosa como fuente de carbono, aunque este efecto es más débil que el observado cuando se sobre-expresa *rpb2t*. A continuación, se introdujo el alelo P_{GALI} -YDR1 en una cepa con una deleción en la subunidad no esencial de la RNA pol II, Rpb9p. Como puede observarse en la Figura 4.9, la deleción de *RPB9*, fue incapaz de suprimir los defectos en el crecimiento de la cepa P_{GALI} -YDR1 en glucosa, ocasionando un efecto negativo sobre su crecimiento.

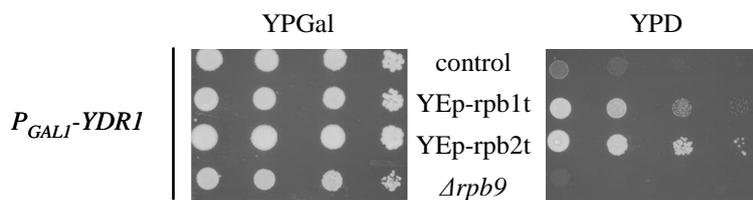


Figura 4.9: Defectos en *RPB1* y *RPB2*, pero no en *RPB9*, suprimen la depleción de Ydr1p. Alelos truncados (en el extremo 3') de *RPB1* (*rpb1t*) y de *RPB2* (*rpb2t*) se subclonaron en el vector multicopia YEplac181 y se utilizaron para transformar la cepa mutante P_{GALI} -YDR1. El alelo P_{GALI} -YDR1 también se introdujo en una cepa con una deleción completa del gen *RPB9*. Diluciones seriadas de estas cepas se sembraron en placas de YPD y de YPGal y se incubaron a 30 °C durante 4 días.

En el caso de los experimentos en que se sobre-expresaban formas truncadas de Rpb1p o de Rpb2p, las cepas contenían, además de éstas, las copias silvestres de los genes. Para comprobar si la reducción de la cantidad total de estas subunidades también es capaz de compensar la deficiencia de NC2, se emplearon cepas en las que los promotores de los genes *RPB1* o *RPB2* fueron sustituidos por el promotor reprimible por doxiciclina, *tetO*. En la Figura 4.10 se muestra que el cambio de promotor de estos genes, por sí mismo, sólo tiene un efecto detectable sobre el crecimiento celular a elevadas concentraciones de doxiciclina. Sin embargo, la reducción en la expresión génica de *RPB1* y *RPB2* provocada por la adición de doxiciclina sí que alivia la necesidad de NC2 para el crecimiento celular. Inesperadamente, este efecto supresor es más marcado a bajas concentraciones de doxiciclina. Como la represión del promotor *tetO* es proporcional a la concentración de doxiciclina (Garí *et al.*, 1997), este resultado podría indicar que la supresión de la depleción de NC2 requiere una reducción moderada de la cantidad de Rpb1p y Rpb2p, de manera que niveles muy bajos de estas proteínas no son capaces de suprimir los defectos en el crecimiento debidos a la depleción de NC2, aunque sí pueden mantener el crecimiento celular.

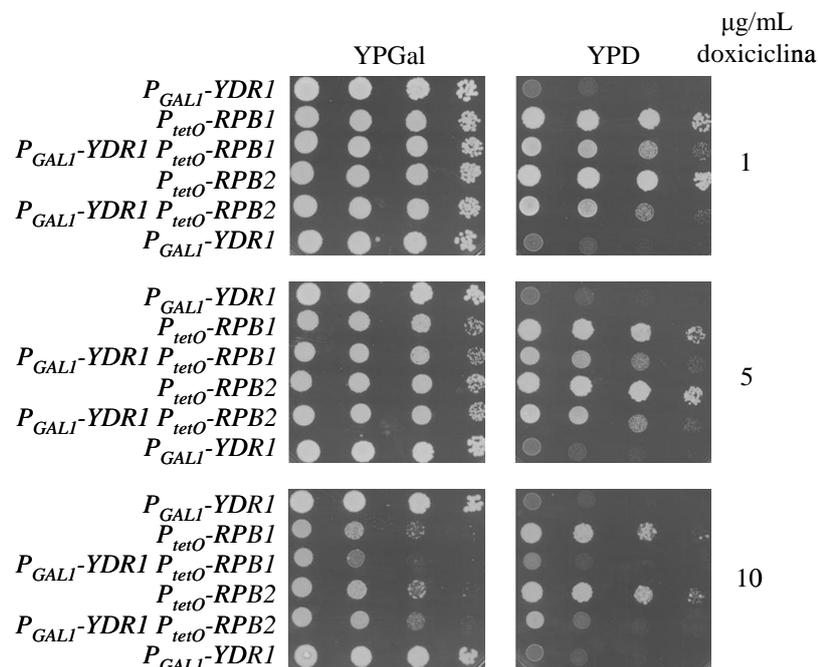


Figura 4.10: Efecto de la reducción en la expresión génica de *RPB1* y *RPB2* sobre la depleción de Ydr1p. El alelo P_{GALI} -YDR1 se introdujo en cepas con el gen *RPB1* o *RPB2* bajo control del promotor reprimible por doxiciclina *tetO*. Diluciones seriadas de las cepas dobles mutantes y de las cepas controles con las mutaciones sencillas se sembraron en placas de YPD y de YPGal con diferentes concentraciones de doxiciclina y se incubaron a 30 °C durante 4 días.

4.8.- Mutaciones en TFIIH y TFIIB, pero no en componentes de SAGA y TFIID, suprimen defectos en NC2.

Otro de los genes identificados como supresor de los defectos en el crecimiento causados por la actividad reducida de NC2 fue *TFB1* (Tabla 4.1). El gen *TFB1* codifica un componente esencial del factor transcripcional general TFIIH (Gileadi *et al.*, 1992). El sitio de inserción del transposón se localizó en el extremo C-terminal de la pauta abierta de lectura de *TFB1*, por lo que el efecto supresor podría ser consecuencia de la producción de una

forma truncada de la proteína Tfb1p. Esta mutación provoca un fenotipo de crecimiento muy lento, especialmente en medio con galactosa como fuente de carbono (Figura 4.2), lo que podría estar relacionado con una inducción defectuosa del promotor *GALI*. Para comprobar si mutaciones en otros componentes de TFIID también eran capaces de suprimir los defectos en el crecimiento causados por la reducción de NC2, se introdujo el alelo *P_{GALI}-YDR1* en cepas que contenían mutaciones en los componentes de TFIID, *SSL1* y *RAD3* (Feaver *et al.*, 1993). En la Figura 4.11 se observa que la mutación *ssl1-1* era capaz de suprimir el defecto en el crecimiento causado por reducción de Ydr1p, pero no así la mutación *rad3-20*. Se comprobó que la supresión provocada por la mutación *ssl1-1* no es consecuencia de un aumento en el nivel de proteína Ydr1p en el mutante *ssl1-1* en un medio con glucosa como fuente de carbono (resultado no mostrado).

Por otro lado, utilizando una versión etiquetada con trece copias del epitopo Myc de TFIIB (codificado por el gen *SUA7*), se comprobó que la proteína TFIIB codificada por este alelo era capaz de suprimir los defectos en el crecimiento causados por *P_{GALI}-YDR1* en un medio con glucosa (Figura 4.11). Este resultado sugiere que la adición del epitopo 13xMyc a la proteína TFIIB da lugar a una pérdida parcial de la actividad de este factor transcripcional que es capaz de suprimir los defectos en el crecimiento causados por la cantidad reducida de NC2.

Finalmente, se analizó si mutaciones en otras funciones involucradas en la regulación de la transcripción, pero sin relación directa con los genes identificados en nuestro rastreo genómico, eran capaces de suprimir los defectos causados por la depleción de NC2. Para ello, se introdujo el alelo *P_{GALI}-YDR1* en cepas con delección completa de los genes *GCN5* o *ADA2* (componentes del complejo remodelador de cromatina, SAGA), y en una cepa con un alelo termosensible de *TAF1*, que codifica una subunidad de TFIID. Como se observa en la Figura 4.11, ninguna de estas mutaciones fue

capaz de suprimir los defectos en el crecimiento causados por $P_{GALI}\text{-YDR1}$ en glucosa.

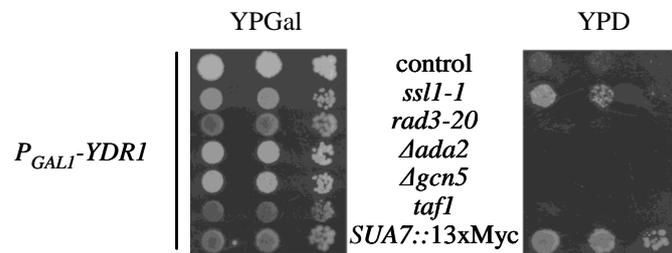


Figura 4.11: Efecto de las mutaciones en diferentes componentes de la maquinaria transcripcional sobre la depleción de Ydr1p. Cepas con los alelos termosensibles en componentes de TFIID, *ssl1-1* y *rad3-20*; una cepa con el alelo termosensible *taf1*, componente de TFIID; cepas con los alelos nulos Δ *gcn5* y Δ *ada2*, componentes del complejo SAGA; y una cepa que contenía TFIIB (*SUA7*) etiquetado con un epítopo 13xMyc en el extremo C-terminal, se combinaron con el alelo $P_{GALI}\text{-YDR1}$. Diluciones seriadas de los transformantes y de la cepa control $P_{GALI}\text{-YDR1}$ se sembraron en placas de YPD y de YPGal y se incubaron a 30 °C durante 4 días.

5.- Identificación y caracterización del gen *IWR1*.

5.1.- Mutaciones en el gen *IWR1* suprimen la deficiencia del factor transcripcional NC2.

Otro de los genes identificado por la capacidad de sus mutaciones para suprimir el requerimiento de NC2 para el crecimiento celular, fue *IWR1* (*Interacting with RNA pol II*). Iwr1p se identificó independientemente en dos estudios diferentes de caracterización sistemática de complejos proteicos en la levadura *S. cerevisiae*. En estos estudios se comprobó que una proteína de fusión Iwr1p-TAP era capaz de interactuar físicamente con la mayor parte de las subunidades de la RNA pol II (Krogan *et al.*, 2006; Gavin *et al.*, 2006). En nuestro rastreo se aislaron 5 supresores independientes en los que el sitio de inserción del transposón se localizó en puntos distintos de la ORF de *IWR1* o en el extremo 5' de este gen, lo que sugirió que el efecto supresor debía ser consecuencia de una pérdida completa de la función de Iwr1p. Esta hipótesis se confirmó al deletar la ORF de *IWR1* en una cepa P_{GALI} -*YDR1* o P_{GALI} -*BUR6*.

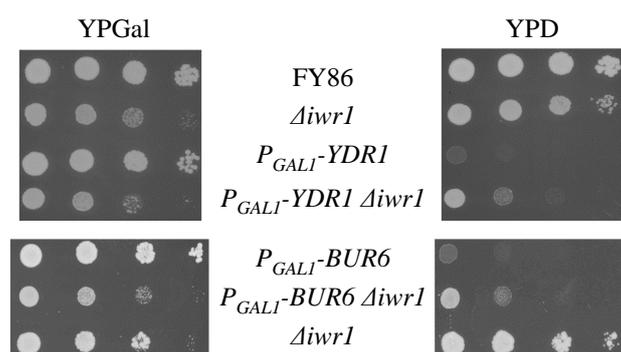


Figura 5.1: La delección de *IWR1* suprime la depleción de NC2. Se deletó la secuencia codificante de *IWR1* en cepas con los alelos P_{GALI} -*YDR1* y P_{GALI} -*BUR6*. Diluciones seriadas de estas cepas se sembraron en YPGal e YPD a 30 °C durante 3 días.

Como se observa en la Figura 5.1, la delección de *IWR1* suprime parcialmente los defectos en el crecimiento causados por la depleción de

ambos componentes de NC2, dado que los dobles mutantes $P_{GALI}\text{-YDR1}$ $\Delta iwr1$ o $P_{GALI}\text{-BUR6}$ $\Delta iwr1$ son capaces de crecer en un medio con glucosa como fuente de carbono, crecimiento que no se observa en los mutantes sencillos $P_{GALI}\text{-YDR1}$ y $P_{GALI}\text{-BUR6}$.

A continuación se analizó, como se hizo con las restantes mutaciones identificadas en el rastreo genómico (apartado 4.2.- La supresión de NC2 por parte de los mutantes *snd* no es consecuencia de la expresión constitutiva del promotor *GALI*), si la supresión observada era consecuencia de una represión defectuosa del promotor *GALI*. Para ello, se analizaron los niveles de proteínas Ydr1p y Bur6p en el mutante $\Delta iwr1$, aprovechando que estas proteínas fueron etiquetadas en su extremo N-terminal con 3 copias del epitopo hemaglutinina (HA) cuando se sustituyó su promotor por el promotor *GALI* (Longtine *et al.*, 1998), permitiéndonos su detección por *Western blot*. En la Figura 5.2.A, se comparan las cantidades de las proteínas Ydr1p y Bur6p (expresadas bajo control del promotor *GALI*) en el mutante $\Delta iwr1$ y en la cepa isogénica silvestre antes y después de una incubación de 5 horas en glucosa. La delección de *IWR1* reduce la cantidad de estas proteínas tanto en galactosa como en glucosa, sugiriéndose que esta mutación debe causar defectos tanto en la expresión basal como en la expresión inducida del promotor *GALI*. Paralelamente, se analizó mediante *Northern blot* la expresión del gen *GAL10* en el mutante $\Delta iwr1$ y en la cepa isogénica silvestre en células crecidas en medio con glucosa o incubadas durante diferentes tiempos en un medio con galactosa como fuente de carbono (Figura 5.2.B). Como cabía esperar por los resultados del *Western blot*, en el mutante $\Delta iwr1$ no se observó expresión constitutiva del gen *GAL10*, siendo la inducción en galactosa menor que en la cepa silvestre. Por tanto, la supresión de la deficiencia en NC2 por la delección de *IWR1* no es

consecuencia de una represión defectuosa del promotor *GALI* en un medio con glucosa.

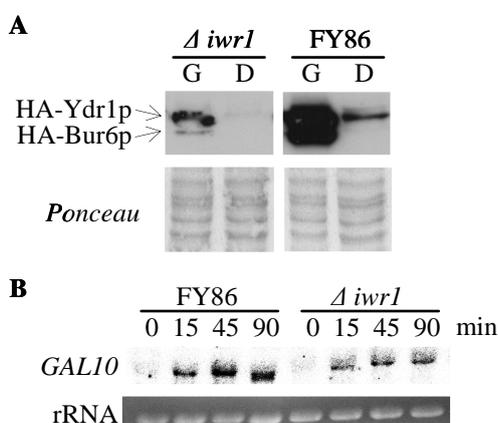


Figura 5.2: La delección de *IWR1* no da lugar a defectos en la represión por glucosa del promotor *GALI*. (A) Se analizaron por SDS-PAGE (en gel al 8%) extractos proteicos totales obtenidos a partir de células crecidas exponencialmente en galactosa (G) o transferidas durante 5 horas a un medio con glucosa (D). Las proteínas HA-Ydr1p y HA-Bur6p se detectaron con un anticuerpo anti-HA monoclonal de ratón y con anti-inmunoglobulina G de ratón conjugado con peroxidasa como anticuerpo secundario. La tinción *Ponceau* del *Western blot* se empleó como control de carga. (B) Se obtuvo RNA total de células de la cepa silvestre (FY86) y del mutante *Δiwr1* crecidas en un medio con glucosa y tras una incubación en un medio con galactosa durante los tiempos indicados (minutos). La aplicación y transferencia de cantidades similares de RNA se verificó mediante tinción del RNA ribosómico con bromuro de etidio.

A continuación, nos preguntamos si la delección de *IWR1* también era capaz de suprimir la ausencia de la subunidad de NC2, Bur6p. Para comprobarlo, se introdujo la mutación *Δiwr1* en una cepa que presentaba una delección cromosomal del gen *BUR6* y que contenía además un plásmido pURA3/CEN con el gen *BUR6* silvestre. Como se muestra en la Figura 5.3, la cepa resultante fue capaz de crecer en placas de 5'-FOA, lo que es indicativo de que la delección de *IWR1* es capaz de compensar, de otra forma, el requerimiento esencial del componente Bur6p de NC2.

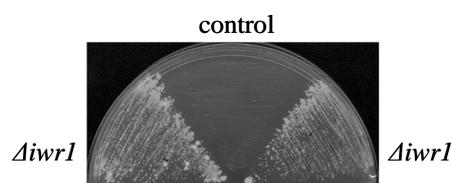


Figura 5.3: *IWR1* suprime la ausencia de la subunidad de NC2, Bur6p. Se introdujo una delección completa del gen *IWR1* en la cepa control portadora de una delección cromosomal del gen *BUR6* suplementada con el gen silvestre *BUR6* en un plásmido pURA3/CEN. La cepa resultante ($\Delta iwr1$) y la parental (control) se sembraron en placa de 5'-FOA y se incubaron 5 días a 30 °C.

5.2.- La delección de *IWR1* compensa parcialmente los defectos transcripcionales causados por la actividad reducida de NC2.

Una reducción en la cantidad de NC2 origina, mayoritariamente, un aumento de los niveles de transcritos, comparado con los que presenta la cepa isogénica silvestre, aunque determinados transcritos muestran niveles inferiores en la cepa mutante (ver Figura 3.9). Para estudiar el posible efecto de la delección de *IWR1* sobre los defectos en la expresión génica causados por la depleción de NC2, se analizó mediante PCR semicuantitativa la expresión de genes cuyos transcritos aumentan (*SPD1*, *UTR5*, *YOL131w* y *ECM23*), disminuyen (*HIS4*) o no cambian (*YPL272c*) al deplecionar NC2. Como se observa en la Figura 5.4., para la mayoría de estos genes, la delección de *IWR1* reduce los defectos transcripcionales causados por la depleción de NC2, ya que los niveles de transcritos en glucosa en el doble mutante $P_{GALI}\text{-}YDR1 \Delta iwr1$ son más similares a los de la cepa silvestre, que los que muestra el mutante sencillo $P_{GALI}\text{-}YDR1$.

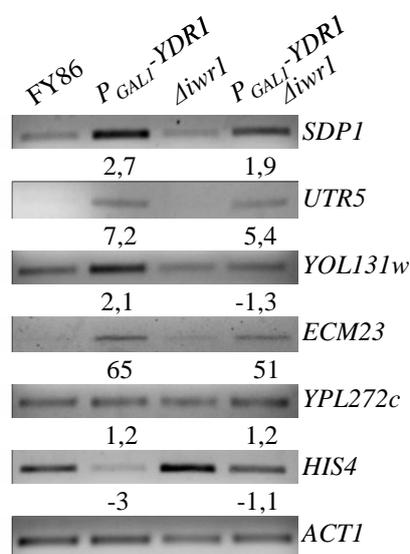


Figura 5.4: La delección de *IWR1* compensa parcialmente los defectos transcripcionales causados por depleción de NC2. Células en fase exponencial de crecimiento en YPGal se transfirieron a YPD y se incubaron a 30 °C 4 horas. Se obtuvo el cDNA y se llevaron a cabo PCR semicuantitativas para amplificar los fragmentos de los genes indicados. Los productos de PCR se cuantificaron por densitometría empleando el *Quantity One* (Bio-Rad) y se normalizaron frente a la banda de *ACT1*. Se indican los niveles de inducción (valores positivos) o de represión (valores negativos) relativos a la cepa silvestre (FY86).

En esta misma línea, también se analizó la expresión de genes cuya transcripción se ha descrito que resulta afectada por la mutación *bur6-1* (Cang *et al.*, 2002). Como se observa en la Figura 5.5.A, la inducción del gen *GAL1* se reduce de forma importante tanto en la cepa *bur6-1* como en la cepa $\Delta iwr1$, pero se restablece parcialmente en el doble mutante $\Delta iwr1 bur6-1$. Por otra parte, la mutación *bur6-1* da lugar a un aumento de la expresión basal del gen *HSP26* (Figura 5.5.B). Aunque también se puede observar una expresión constitutiva débil del gen *HSP26* en la cepa mutante $\Delta iwr1$, el nivel basal de este transcrito no aumenta en la cepa doble mutante $\Delta iwr1 bur6-1$ cuando se compara con la cepa silvestre (Figura 5.5.B). Por

tanto, todos estos resultados apuntan a que la delección de *IWR1* es capaz de compensar parcialmente algunos defectos transcripcionales causados por la depleción de NC2.

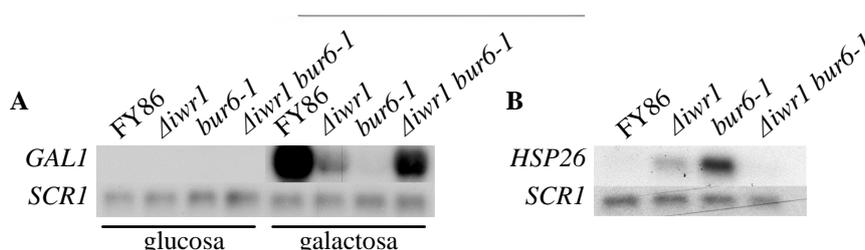


Figura 5.5: La delección de *IWR1* compensa parcialmente los defectos transcripcionales causados por depleción de NC2. (A) Las células en fase exponencial de crecimiento en YPD se transfirieron a YPGal y se incubaron a 30 °C durante 4 horas. Se obtuvo el RNA total y se analizó por *Northern blot* la expresión del gen *GALI*. (B) A partir de células de las cepas indicadas en fase exponencial temprana de crecimiento, se obtuvo el RNA total y se analizó por *Northern blot* el transcrito del gen *HSP26*. El transcrito de la RNA pol III, *SCR1*, se utilizó como control de carga en (A) y (B).

5.3.- Efectos transcripcionales causados por la delección de *IWR1*.

Otro de los aspectos investigados en la caracterización funcional de Iwr1p fue el efecto en el transcriptoma de la delección del gen *IWR1*. Para ello, se comparó el perfil transcripcional de la cepa mutante $\Delta iwr1$ con el perfil de la cepa isogénica silvestre en células en fase exponencial de crecimiento en medio YPD (conjunto de datos completos en <http://www.uv.es/estruch>). Estos estudios se llevaron a cabo utilizando macromatrices de nylon del servicio SCSIE de la Universitat de València. Un total de 178 genes mostraron cambios en sus niveles de expresión cuando se restringió el análisis a aquellos transcritos que aumentaban o disminuían con un factor igual o superior a 2 en la cepa $\Delta iwr1$, comparado con la cepa silvestre (Tabla A.I en Anexo). De los 178 transcritos, 73 mostraron niveles

superiores en la cepa mutante, mientras que los niveles de 105 transcritos estaban reducidos. Los cambios en los niveles de expresión de algunos genes detectados en el análisis transcripcional, se verificaron mediante PCR semicuantitativa y se muestran en la Figura 5.6. Además, en la última parte de este trabajo se estudia en detalle el efecto de la mutación $\Delta iwr1$ sobre la expresión de algunos genes identificados mediante este análisis.

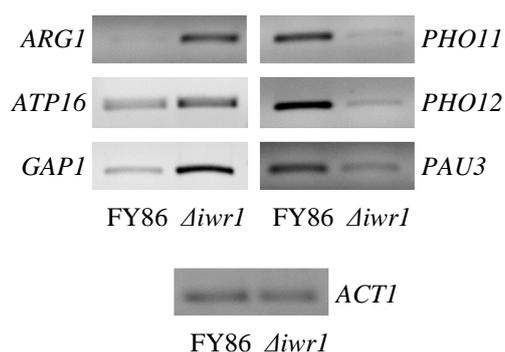


Figura 5.6: Defectos transcripcionales en el mutante $\Delta iwr1$. A partir de células en fase exponencial de crecimiento en YPD de la cepa mutante $\Delta iwr1$ y de la cepa silvestre (FY86), se analizó la expresión de los genes indicados por PCR semicuantitativa, empleándose el gen *ACT1* como control. A la izquierda se muestran genes con mayor nivel de expresión en el mutante $\Delta iwr1$ y a la derecha, genes con menor nivel de expresión en el mutante.

Para determinar si la delección de *IWR1* afecta algunas rutas metabólicas específicas, se analizó la distribución en categorías funcionales de aquellos genes cuyos niveles de expresión se ven alterados en el mutante $\Delta iwr1$ (Tabla A.II en Anexo). Se observó que 15 de los 73 genes cuya expresión aumenta en el mutante $\Delta iwr1$ corresponden a genes que codifican proteínas mitocondriales. De estos 15 genes, 10 codifican proteínas que participan en la fosforilación oxidativa (incluyendo 7 de los 15 genes que codifican subunidades de la ATP sintasa). La posibilidad de que en medio con glucosa como fuente de carbono (en el que la actividad respiratoria está

fuertemente reprimida) la mayor expresión de genes relacionados con la respiración en el mutante *Δiwr1* determinara una mayor actividad respiratoria, nos llevó a analizar el consumo celular de oxígeno de la cepa *Δiwr1* respecto al de la cepa silvestre. Los resultados obtenidos indicaron que en un medio con glucosa como fuente de carbono el consumo de oxígeno de la cepa mutante es un 20% superior al de la cepa silvestre (Figura 5.7).

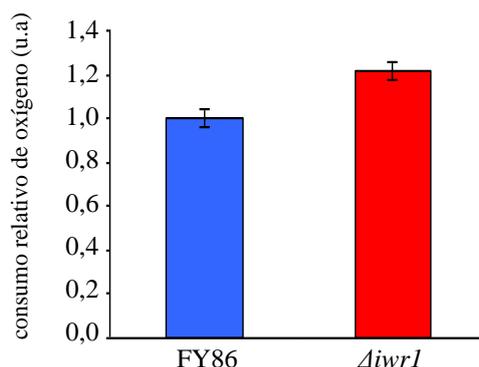


Figura 5.7: Mayor actividad respiratoria en el mutante *Δiwr1*. Se determinó el consumo de oxígeno con un oxímetro en tres cultivos independientes de células de la cepa silvestre (FY86) y del mutante *Δiwr1* en fase exponencial de crecimiento en medio SC con glucosa como fuente de carbono. Se asignó el valor de 1 al consumo de oxígeno de la cepa silvestre y se representó el valor relativo, en unidades arbitrarias (ua), para la cepa mutante.

Por otro lado, la tinción con DAPI del DNA puso de manifiesto una mayor abundancia en la cepa mutante de estructuras citoplasmáticas que podrían corresponder al DNA mitocondrial, indicando que en el mutante *Δiwr1* podría haber más cantidad de moléculas de DNA mitocondrial que en la cepa isogénica silvestre (Figura 5.8). Finalmente, la observación microscópica de la cepa mutante *Δiwr1* también puso de manifiesto un tamaño celular significativamente mayor que el de la cepa silvestre. Los volúmenes celulares promedio, medidos en células crecidas

exponencialmente en medio YPD, de la cepa silvestre y de la cepa mutante *Δiwr1* fueron, respectivamente, 43,30 fl y 68,52 fl.

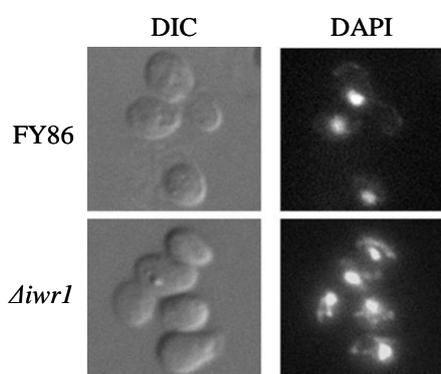


Figura 5.8: Acumulación de DNA mitocondrial en el mutante *Δiwr1*. Células en fase exponencial de crecimiento en medio SC con glucosa como fuente de carbono del mutante *Δiwr1* y de la cepa silvestre se tiñeron con DAPI y se observaron al microscopio.

El análisis de los genes cuya transcripción resulta afectada por la mutación *iwr1* puso de manifiesto la existencia de 11 genes cuyos promotores contienen sitios de unión para el complejo Hap2p/3p/4p/5p [*GDH1*, *ATP16*, *ATP17*, *COX13*, *ATP19*, *ATP15*, *ATP3*, *ATP7*, *QCR7*, *COX7* y *PET9* (SGD; Riego *et al.*, 2002); Tabla A.III en Anexo]. Curiosamente, el propio gen *HAP4* es uno de los genes cuya expresión aumenta en el mutante *Δiwr1*. También se observó que había 6 genes de expresión aumentada en el mutante *Δiwr1* cuya expresión debe estar regulada por Gcn4p [*GDH1*, *ARG1*, *HSP78*, *PCL5*, *ARG5*, *ARG6* y *TRP5* (SGD; Riego *et al.*, 2002; Hinnebusch, 1988); Tabla A.III en Anexo]. Entre los genes cuyos niveles de expresión se veían disminuidos en el mutante *Δiwr1*, la única categoría funcional significativa encontrada correspondió a la actividad fosfatasa ácida, e incluye los genes *PHO3*, *PHO5*, *PHO11* y *PHO12* (Tabla A.II en Anexo).

Finalmente, también se encontró significativo que algunos de los genes cuya expresión resultaba afectada por la mutación *iwr1* se hubiera descrito que están regulados a nivel transcripcional por rapamicina. Para estudiar el posible papel de la proteína Iwr1p en la transcripción dependiente de rapamicina, se analizaron los efectos de esta droga sobre la expresión de distintos genes en la cepa silvestre y en el mutante $\Delta iwr1$. Como se observa en la Figura 5.9, no se aprecian diferencias significativas entre el mutante y la cepa silvestre para aquellos genes cuyos niveles basales no están afectados por Iwr1p. Por tanto, Iwr1p no es imprescindible para los cambios en la expresión génica inducidos por rapamicina.

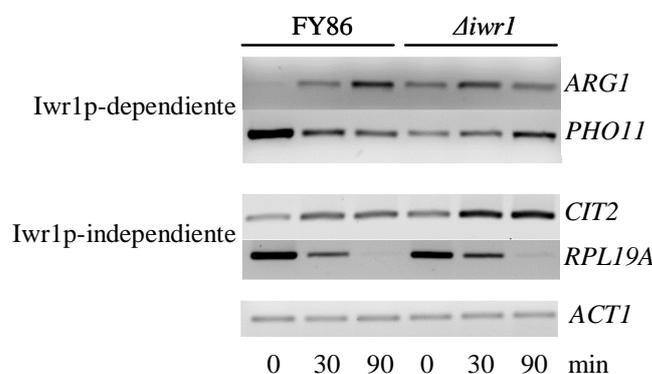


Figura 5.9: Iwr1p no es necesaria para los cambios en la expresión génica inducidos por rapamicina. A partir de células de la cepa silvestre (FY86) y del mutante $\Delta iwr1$ en fase de crecimiento exponencial en YPD en presencia de 100 ng/mL de rapamicina a 30 °C durante los tiempos indicados (minutos), se analizó la expresión de los genes indicados por PCR semicuantitativa, empleándose el gen *ACT1* como control.

5.4.- Caracterización fenotípica del mutante $\Delta iwr1$.

Como se ha comentado, *IWR1* no es un gen esencial. Sin embargo, su delección tiene un efecto negativo sobre el crecimiento celular en medio YPD

(Figura 5.10.A). El análisis transcripcional del mutante *Δiwr1* mostró un incremento en los niveles de transcritos de genes involucrados en la respiración aeróbica (Tabla A.II y A.III en Anexo). Por ello, se analizó el crecimiento del mutante *Δiwr1* en medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono, tanto fermentables como no fermentables, así como en medio sintético (SC). Como se observa en la Figura 5.10.A, el mutante *Δiwr1* es capaz de crecer en todos los medios ensayados, aunque a una velocidad inferior a la de la cepa silvestre, siendo el defecto más acentuado el que se observa en medio SC.

En esta misma línea, se analizó la expresión del gen *IWR1* en células crecidas en medios con diferentes fuentes de carbono. Como se observa en la Figura 5.10.B, mediante PCR semicuantitativa se detectó la presencia de dos productos de transcripción diferentes. La existencia de un intrón en el gen *IWR1* ya se había sugerido por análisis *in silico* y se había comprobado experimentalmente (Davis *et al.*, 2000), por lo que las dos bandas observadas por PCR semicuantitativa deben corresponder a los transcritos con y sin intrón. Nuestro análisis reveló que el procesamiento del transcrito de *IWR1* es incompleto en condiciones de crecimiento exponencial. Además, se observó una mayor expresión de *IWR1* en medios que contienen una fuente de carbono distinta a la glucosa, especialmente si se utiliza etanol como fuente de carbono (Figura 5.10.B).

Como se ha comentado, algunos genes cuya transcripción está alterada en el mutante *Δiwr1* están regulados por rapamicina. Por ello, se analizó el efecto de la rapamicina en la expresión de *IWR1* y en el crecimiento de la cepa mutante *Δiwr1*. Se detectó una mayor expresión del gen *IWR1* tras incubar las células en presencia de rapamicina 100 nM (Figura 5.10.C). Además, el mutante *Δiwr1* resultó ser hipersensible a la rapamicina, de forma que la cepa *Δiwr1* no es capaz de crecer en un medio que contiene

concentraciones de rapamicina tan bajas como de 8 ng/mL (7,2 nM) (Figura 5.10.D).

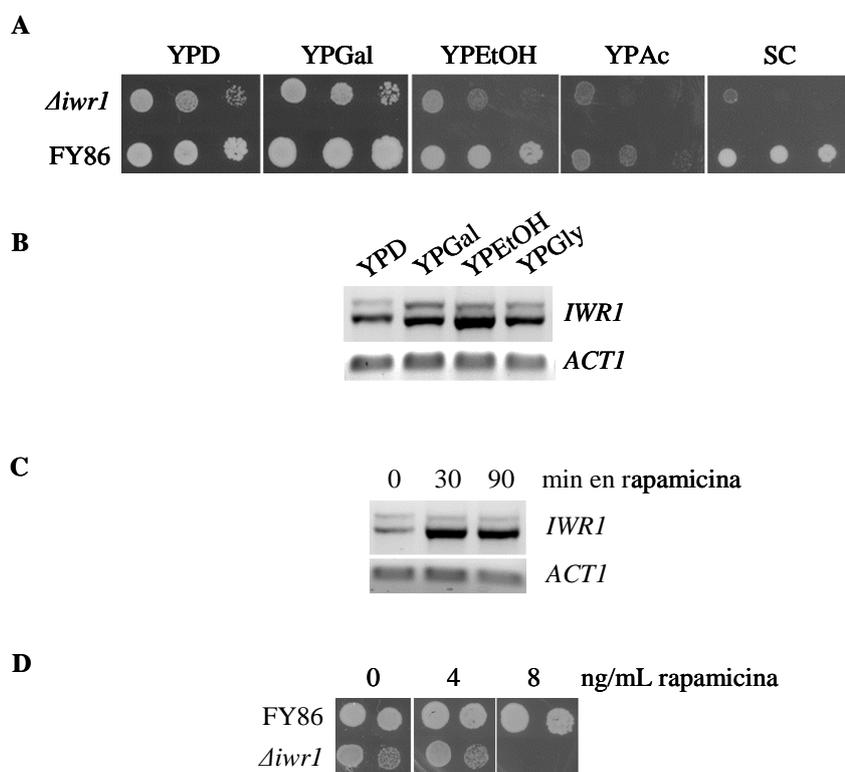


Figura 5.10: Caracterización fenotípica del mutante *Δiwr1* y expresión del gen *IWR1* en diferentes medios. (A) Defectos en el crecimiento del mutante *Δiwr1*. Se sembraron células del mutante *Δiwr1* y de la cepa isogénica silvestre (FY86) en los medios de crecimiento indicados y se incubaron a 30 °C durante 3 días. (B) Se cultivaron células de la cepa silvestre en los medios indicados hasta fase exponencial de crecimiento y se obtuvo el cDNA. La expresión del gen *IWR1* se analizó por PCR semicuantitativa empleándose el gen *ACT1* como control. (C) Se cultivaron células de la cepa silvestre hasta fase exponencial de crecimiento en medio YPD con rapamicina a una concentración de 100 ng/mL durante los tiempos indicados y se analizó la expresión del gen *IWR1* como en (B). (D) Hipersensibilidad a la rapamicina del mutante *Δiwr1*. Se sembraron células del mutante *Δiwr1* y de la cepa silvestre en placas de YPD que contenían las cantidades indicadas de rapamicina.

5.5.- Actividad transcripcional de la fusión LexA-Iwr1p.

La naturaleza de los supresores del requerimiento de NC2 identificados en éste y en otros trabajos parece sugerir que Iwr1p podría desempeñar un papel positivo en el inicio de la transcripción (Lee *et al.*, 1998; Xie *et al.*, 2000; Lemaire *et al.*, 2000; Peiró-Chova y Estruch, 2007). Para estudiar esta posibilidad, se expresó una proteína de fusión, que incluía el dominio de unión a DNA de LexA y la proteína Iwr1p completa (LexA-Iwr1p), en una cepa que contenía el gen reportero *HIS3* y el gen reportero *lacZ* de *Escherichia coli*, y cuyos promotores incluían los sitios de unión de LexA.

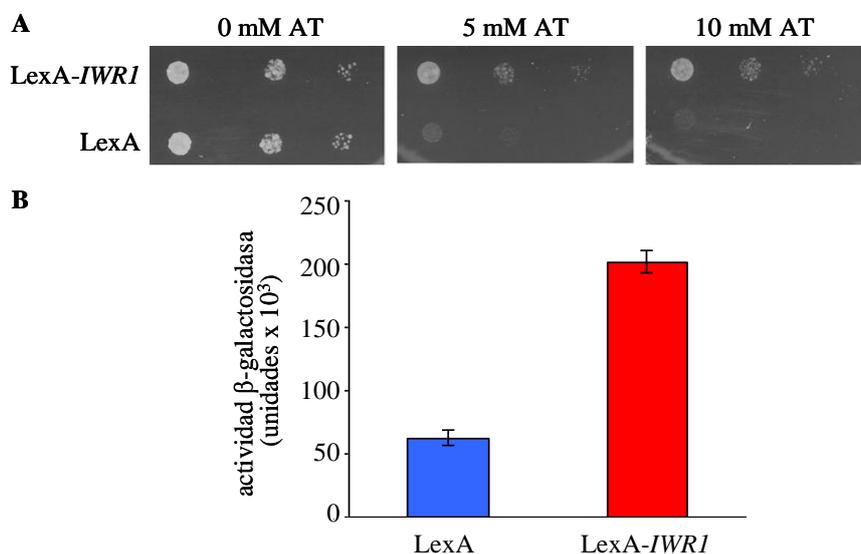


Figura 5.11: Iwr1p activa la transcripción de un gen reportero cuando se une artificialmente a su promotor. (A) Iwr1p fusionada al dominio de unión a DNA de LexA (LexA-IWR1) o únicamente LexA (LexA) se expresaron en la cepa TAT-7. La activación transcripcional se detectó por crecimiento en medio sintético completo (SC) sin histidina y con las cantidades indicadas de 3-aminotriazol (AT) después de 3 días a 30 °C. (B) LexA-Iwr1p activa la expresión del gen reportero *lacZ*. La actividad β -galactosidasa se midió en cultivos en fase de crecimiento exponencial en medio SC con glucosa como fuente de carbono de células de la cepa TAT-7 que expresaban LexA-Iwr1p o LexA. Los valores de actividad β -galactosidasa y las desviaciones estándar se obtuvieron de tres experimentos independientes.

Como se observa en la Figura 5.11.A, la expresión de LexA-Iwr1p tiene un efecto positivo en la transcripción del gen *HIS3*, ya que sólo la cepa que expresa la proteína de fusión LexA-Iwr1p es capaz de crecer en presencia de 3-aminotriazol (AT). Además, la proteína de fusión LexA-Iwr1p también es capaz de activar un gen reportero *lacZ* que contiene sitios de unión de LexA en su promotor (Figura 5.11.B). La capacidad de la proteína Iwr1p de activar la transcripción de genes reportero cuando se une artificialmente a sus promotores indica que Iwr1p tiene un efecto positivo sobre la transcripción.

5.6.- El mutante $\Delta iwr1$ no presenta defectos en la elongación transcripcional.

El posible papel de la proteína Iwr1p en la elongación transcripcional se analizó mediante el ensayo “GLAM”, que permite determinar la eficiencia de la biosíntesis de mRNA en función de la longitud génica (Morillo-Huesca *et al.*, 2006). Este ensayo nos permite estimar *in vivo* la eficiencia en la procesividad de la RNA pol II durante la elongación. Para ello se mide la actividad fosfatasa ácida derivada de la actividad del gen *PHO5* utilizando tres construcciones que difieren en la longitud del extremo 3'-UTR. Estas tres construcciones contienen la región codificante del gen *PHO5* expresado bajo el control del promotor del gen *GAL1* y como marcador de selección, el gen *URA3*. El plásmido pSch202 no presenta ninguna extensión sobre el extremo 3' mientras que las otras dos construcciones varían en la longitud del extremo 3'-UTR: una de ellas presenta fusionado a *PHO5* el gen *lacZ* de *Escherichia coli* (pSch212) mientras que la otra presenta fusionado a *PHO5* el gen *lac4* (pSch255), el homólogo eucariota en *Kluyveromyces lactis* del gen *lacZ* (Figura 5.12.A). Ambos genes, *lacZ* y *lac4*, tienen la misma

longitud, pero difieren en su contenido en G+C y en la estructura de la cromatina. Además, se utiliza el plásmido YCplac33 como control para evaluar la actividad producida por el gen *PHO5* endógeno en el ensayo enzimático. El plásmido pSch202, que no incluye ninguna extensión sobre el extremo 3'-UTR, se utilizó como denominador en los cocientes de los transcritos largos, para discriminar cualquier defecto derivado de los primeros pasos de la expresión génica, como el ensamblaje del complejo PIC en la región promotora del gen, la iniciación de la transcripción o la elongación temprana. De esta manera, el análisis de los cocientes de la actividad fosfatasa ácida, actúa como indicador de la eficiencia en la acumulación del mRNA en función de la longitud del transcrito.

Para estudiar el posible efecto de un mutante *Δiwr1* en la elongación de la transcripción, se transformó tanto una cepa silvestre como una cepa *Δiwr1* con los distintos plásmidos y se procedió a cuantificar la actividad fosfatasa ácida en las condiciones descritas para el ensayo (Morillo-Huesca *et al.*, 2006). Como se puede observar en la Figura 5.12.B, no se observaron diferencias entre el mutante y la cepa silvestre cuando se analizó la unidad transcripcional *P_{GALI}-PHO5-lacZ*. Asimismo, la ligera reducción encontrada para la unidad transcripcional *P_{GALI}-PHO5-lac4* en el mutante *Δiwr1* es considerablemente menor que la observada en mutantes con funciones conocidas en la elongación (resultados no mostrados), lo que sugiere que el mutante *Δiwr1* no presenta defectos importantes en el proceso de elongación de la transcripción.

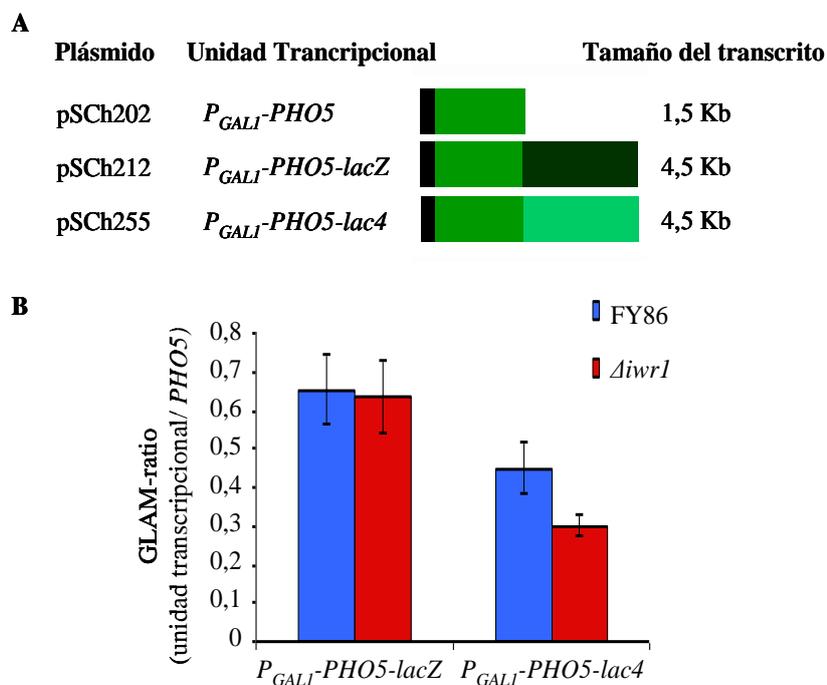


Figura 5.12: El mutante $\Delta iwr1$ no presenta defectos en la elongación transcripcional. (A) Construcciones génicas utilizadas para el cálculo de cocientes GLAM correspondiente a los plásmidos pSch202, pSch212 y pSch255. (B) Células de la cepa silvestre y del mutante $\Delta iwr1$ transformadas con los plásmidos centroméricos descritos se crecieron en medio sintético completo sin uracilo con galactosa como fuente de carbono y se determinó la actividad fosfatasa ácida en cada caso. Los cocientes GLAM son valores relativos calculados a partir de la actividad generada por fosfatasa ácida de las unidades transcripcionales largas, $P_{GALI}-PHO5-lacZ$ o $P_{GALI}-PHO5-lac4$, respecto al valor de fosfatasa ácida que presenta la unidad transcripcional de tamaño corto $P_{GALI}-PHO5$. Se realizaron en todos los casos tres experimentos independientes.

5.7.- La proteína Iwr1p se mueve entre el núcleo y el citoplasma de manera dependiente de la exportina Xpo1p.

El aislamiento de mutaciones en *IWR1* como supresoras de la deficiencia en el represor transcripcional NC2 y la capacidad de la proteína de fusión LexA-Iwr1p para activar la transcripción, junto a las interacciones físicas descritas entre Iwr1p y diferentes subunidades de la RNA pol II (Krogan *et al.*, 2006; Gavin *et al.*, 2006), sugieren que alguna de las funciones de Iwr1p tiene lugar en el núcleo. Para localizar Iwr1p en la célula se añadió una etiqueta GFP al extremo C-terminal de la proteína. La funcionalidad de la proteína de fusión Iwr1p-GFP se comprobó por su capacidad de complementar el fenotipo de lento crecimiento de la cepa mutante $\Delta iwr1$ (resultado no mostrado). Como se observa en la Figura 5.13.A, la proteína Iwr1p-GFP se distribuye por toda la célula, sin que se observe un enriquecimiento en el núcleo. Por otra parte, el análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína Iwr1p a través del servidor NetNES 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/>) que permite identificar posibles secuencias de exportación nuclear (NES; *Nuclear Export Signal*), predijo una posible secuencia NES entre los aminoácidos 169 y 177 (IIEHIDLAL), con las características de las secuencias reconocidas por el factor de exportación Xpo1p. Así pues, se planteó la posibilidad de que la proteína Iwr1p se moviera entre el núcleo y el citoplasma de una manera dependiente de la exportina Xpo1p. Por ello, se examinó la localización de Iwr1p-GFP en una cepa *xpo1-1*. El mutante *xpo1-1* es termosensible, perdiendo la proteína Xpo1-1p su función a la temperatura restrictiva de 37 °C. Como se observa en la Figura 5.13.B, en el mutante *xpo1-1*, la proteína Iwr1p-GFP se detecta principalmente en el núcleo tras un choque térmico a 37 °C. No se observan diferencias en la localización de Iwr1p-GFP

a 30 °C y 37 °C cuando esta proteína se expresa en una cepa silvestre (resultado no mostrado).

Con objeto de determinar si el efecto de Xpo1p en la localización de Iwr1p-GFP depende de la posible NES localizada entre las posiciones 169 y 177, se procedió a eliminar esta región mediante mutagénesis dirigida. Como se observa en la Figura 5.13.C, la delección de esta secuencia (en la proteína Iwr1p Δ NES-GFP) da lugar a la acumulación nuclear de Iwr1p, lo que indica que esta secuencia es necesaria para la exportación de la proteína Iwr1p desde el núcleo hacia el citoplasma.

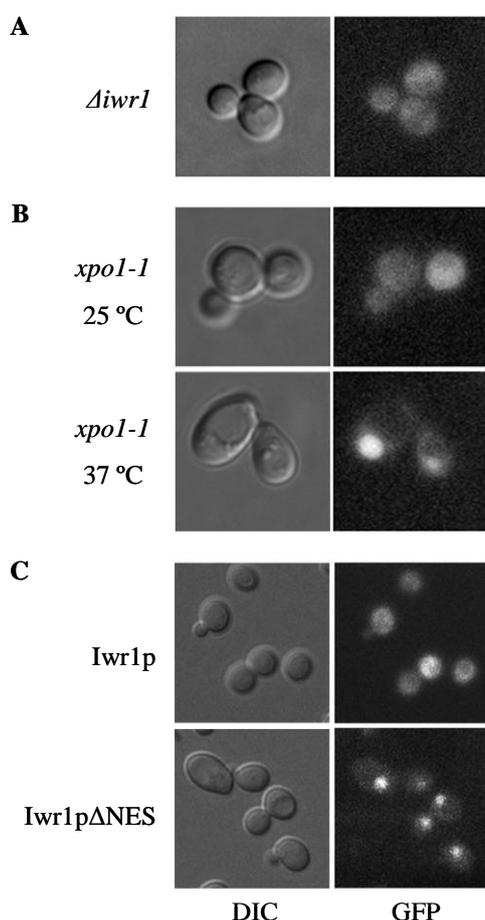


Figura 5.13: Iwr1p se mueve entre el núcleo y el citoplasma de manera dependiente de Xpo1p. (A) Localización subcelular de Iwr1p-GFP. Células del mutante *Δiwr1* que expresaban la proteína Iwr1p-GFP se crecieron en medio sintético completo (SC) con glucosa como fuente de carbono a 30 °C y la proteína de fusión se visualizó en el microscopio de fluorescencia. (B) La proteína Iwr1p-GFP se visualizó en células del mutante *xpo1-1* en fase exponencial de crecimiento a 25 °C y tras un choque térmico a 37 °C durante 30 minutos. (C) Acumulación nuclear de la proteína Iwr1p Δ NES-GFP. Se cultivaron células del mutante *Δiwr1* que expresaban la proteína de fusión Iwr1p-GFP o la proteína con la delección (Iwr1p Δ NES-GFP) hasta fase de crecimiento exponencial en medio sintético completo (SC) con glucosa como fuente de carbono a 30 °C, localizándose ambas proteínas en el microscopio de fluorescencia.

6. Estudio de la función de Iwr1p en la expresión génica.

En la última parte de este trabajo se estudia detenidamente el papel de Iwr1p en la transcripción de varios genes cuya expresión está alterada en el mutante $\Delta iwr1$ (ver Tabla A.I en Anexo), así como la posible función de la translocación núcleo-citoplasma en la actividad de Iwr1p. El criterio que se ha seguido para la selección de estos genes es el amplio conocimiento que se posee sobre los mecanismos que regulan su expresión en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

6.1.- La proteína Iwr1p es necesaria para la transcripción basal pero no para la inducción de los genes *ARG1* y *ATP16*.

Como se ha indicado, el análisis transcriptómico reveló un incremento en los niveles de transcrito de los genes *ARG1* y *ATP16* en el mutante *Δiwr1*. El gen *ARG1*, que codifica la enzima argininosuccinato sintetasa, está regulado por dos vías: se induce en condiciones de ausencia de aminoácidos a través del factor de transcripción Gcn4p (Natarajan *et al.*, 2001) y se reprime en presencia de arginina a través del complejo ArgR/Mcm1 (Crabeel *et al.*, 1995; Crabeel *et al.*, 1990). La expresión del gen *ARG1* se puede inducir por adición al medio de crecimiento de sulfometurón metil (SM), un inhibidor de la biosíntesis de isoleucina/valina, (Qiu *et al.*, 2004). En la Figura 6.1.A se observa que tanto la expresión basal de *ARG1* como la inducida, son dependientes de Gcn4p y que la expresión basal de *ARG1* aumenta en el mutante *Δiwr1*. Sin embargo, Iwr1p no es necesario para la inducción del gen *ARG1* en presencia de SM. La delección del gen *IWR1* aumenta moderadamente la expresión basal de *ARG1* tanto en presencia como en ausencia de Gcn4p.

El gen *ATP16* codifica una de las subunidades de la ATP sintasa de *Saccharomyces cerevisiae* (Velours y Arselin, 2000). La transcripción de genes que codifican componentes de la cadena de transporte electrónico está regulada por el complejo proteico activado por hemo Hap2/3/4/5p, cuando éste se une a la caja CCAAT (Forsburg y Guarente, 1989). La expresión de *ATP16* aumenta en presencia de fuentes de carbono no fermentables, como el etanol, de manera dependiente de Hap4p (Figura 6.1.B). Como en el caso de *ARG1*, la delección de *IWR1* no afecta la inducción de *ATP16*, pero aumenta de manera moderada su expresión basal tanto en presencia como en ausencia de Hap4p (Figura 6.1.B).

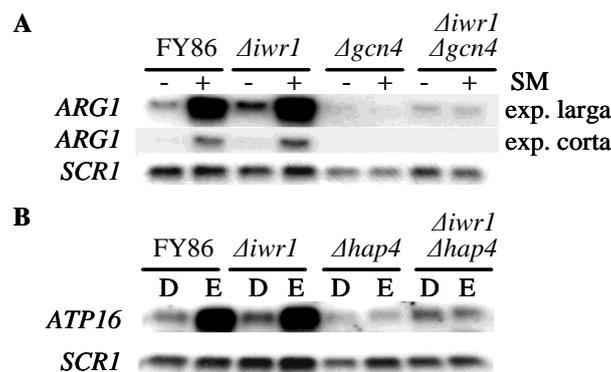


Figura 6.1: La transcripción basal de los genes *ARG1* y *ATP16* aumenta en el mutante $\Delta iwr1$. (A) Se cultivaron las cepas indicadas en medio mínimo (SC) hasta fase de crecimiento exponencial temprana y se transfirieron a un medio mínimo (SC) sin los aminoácidos isoleucina (Ile) ni valina (Val) con (+) o sin (-) 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de sulfometurón metil (SM) durante 2 horas para inducir la síntesis de Gcn4p por falta de Ile/Val. Se extrajo el RNA total de las muestras y se analizó por *Northern blot* la expresión del gen *ARG1*. Se muestran dos exposiciones distintas de la película, una larga (exp. larga) y otra corta (exp. corta). El transcrito de la RNA pol III, *SCR1*, se usó como control de carga. (B) Se cultivaron las cepas indicadas en medio YPD (D) y en YPEtanol (E) hasta fase de crecimiento exponencial y se obtuvo el RNA total, analizándose por *Northern blot* la expresión del gen *ATP16*. El transcrito de la RNA pol III, *SCR1*, se usó como control de carga.

6.2.- La proteína Iwr1p está involucrada en la expresión del gen *SUC2*.

Muchos de los genes relacionados con la respiración aeróbica, cuya expresión se ve aumentada en el mutante $\Delta iwr1$ (Tabla A.II en Anexo), están sujetos a represión por glucosa. Como el análisis transcripcional a nivel de genoma se llevó a cabo a partir de células en fase de crecimiento exponencial en YPD, se pensó que posiblemente la expresión aumentada de los genes involucrados en respiración en este medio podría deberse a una reducción de la represión por catabolito en el mutante $\Delta iwr1$. Para estudiar esta posibilidad, se analizó la expresión del gen *SUC2*, gen reprimido por

glucosa cuya regulación ha sido ampliamente estudiada (Trumbly, 1992; Belinchón y Gancedo, 2007; Geng y Laurent, 2004).

En la Figura 6.2.A se puede observar que las células del mutante *Δiwr1* crecidas en un medio con glucosa como fuente de carbono no transcriben el gen *SUC2*, lo que sugiere que la expresión constitutiva de genes reprimidos por glucosa no es la causa de los niveles aumentados de los transcritos de genes respiratorios que se observa en el mutante *Δiwr1*. La expresión de *SUC2* se induce al disminuir la cantidad de glucosa en el medio de crecimiento celular. En estas condiciones se observaron niveles reducidos del transcrito de *SUC2* en la cepa mutante *Δiwr1* cuando se compara con los niveles de transcrito de este gen en la cepa silvestre (Figura 6.2.A).

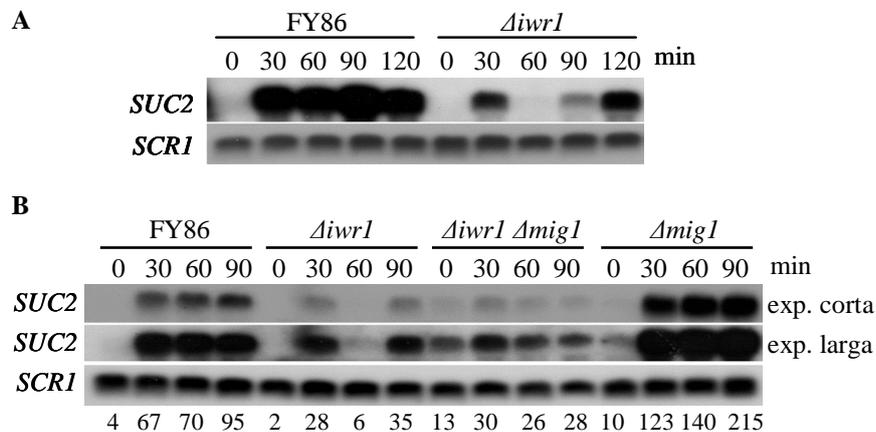


Figura 6.2: Inducción defectuosa del gen *SUC2* en el mutante *Δiwr1*. (A) y (B) Se cultivaron células de las cepas indicadas en medio YPD (2% glucosa) hasta fase exponencial temprana y se transfirieron a medio YPD con sólo 0,05% de glucosa durante los tiempos indicados (en minutos). Se obtuvo el RNA total, analizándose por *Northern blot* la expresión del gen *SUC2*. El transcrito de la RNA pol III, *SCR1*, se usó como control de carga. En (B) se muestran dos exposiciones distintas de la película, una larga (exp. larga) y otra corta (exp. corta). También se muestra la cuantificación de la señal del transcrito *SUC2*, normalizado frente a la señal de *SCR1*, cuantificación que se llevó a cabo empleando un *PhosphorImager* (*Molecular Dynamics*).

Curiosamente, se observó la desaparición prácticamente completa del mRNA de *SUC2* a los 60 minutos de inducción en condiciones de baja concentración de glucosa en el medio. Se observó también que la delección del gen *MIG1*, que codifica un represor de la expresión de *SUC2* (Nehlin *et al.*, 1990), evita la ausencia transitoria del transcrito de *SUC2* que tiene lugar a los 60 minutos de incubación, aunque no provoca un aumento significativo en los niveles reducidos de *SUC2* del mutante *Δiwr1* (Figura 6.2.B).

6.3.- Los defectos en la inducción del gen *SUC2* en el mutante *Δiwr1* se suprimen en ausencia de la variante de histona H2A.Z.

Se han identificado interacciones genéticas entre la mutación *Δiwr1* y delecciones en componentes del complejo SWR (Krogan *et al.*, 2006). El complejo SWR ensambla la variante de histona H2A.Z/Htz1p a la cromatina (Mizuguchi *et al.*, 2004). Tras comprobar que la delección de ambos genes, *IWR1* y *HTZ1*, es letal sintética (Figura 6.3.A), se construyó una cepa con la delección del gen *HTZ1* y con el gen *IWR1* bajo control del promotor reprimible *tetO*. Como se observa en la Figura 6.3.B, la adición de doxiciclina en el medio de crecimiento empeora severamente el crecimiento del doble mutante *P_{tetO}-IWR1 Δhtz1*. A continuación, se analizó el efecto de la mutación *Δhtz1* sobre los defectos transcripcionales causados por la depleción de Iwr1p en la transcripción del gen *SUC2*. Como se observa en la Figura 6.3.C, la inducción del gen *SUC2* en la cepa *P_{tetO}-IWR1* presenta un patrón similar al observado en la cepa *Δiwr1* (Figura 6.2.A y B). Sin embargo, se aprecian algunas diferencias en los niveles de transcrito, que pueden deberse a una expresión residual del gen *IWR1* en la cepa *P_{tetO}-IWR1*, incluso en presencia de doxiciclina.

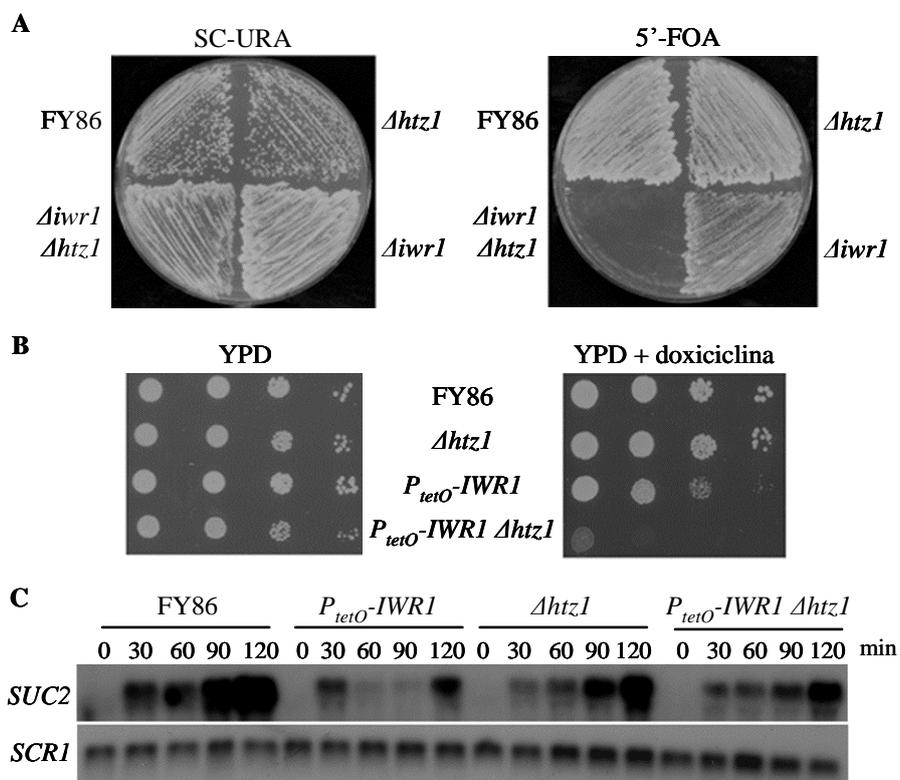


Figura 6.3: La delección de *HTZ1* suprime parcialmente el defecto en la inducción de *SUC2* del mutante *Δiwr1*. (A) Letalidad sintética entre las mutaciones *Δiwr1* y *Δhtz1*. Se sembraron las cepas indicadas, que contenían además el gen silvestre *IWR1* en un plásmido pURA3/CEN, en placas de medio mínimo sin uracilo (SC-URA) y en placas con 5'-FOA, incubándose durante 3 días a 30 °C. (B) Se sembraron diluciones seriadas de las cepas indicadas en placas de YPD y en placas de YPD que contenían además 10 mg/L de doxiciclina, incubándose durante 3 días a 30 °C. (C) Se cultivaron las cepas indicadas en medio YPD (2% glucosa) hasta fase exponencial temprana y se transfirieron a medio YPD (2% glucosa) que contenía 10 mg/L de doxiciclina, incubándose durante 4 horas a 30 °C. Posteriormente, las células se transfirieron a medio YPD con 0,05% de glucosa y 10 mg/L de doxiciclina y se incubaron durante los tiempos indicados (en minutos). Se obtuvo el RNA total, analizándose por *Northern blot* la expresión del gen *SUC2*. El transcrito de la RNA pol III, *SCR1*, se usó como control de carga.

Como en el caso de la cepa *Δiwr1*, en la Figura 6.3.C se puede observar una casi completa desaparición del mRNA de *SUC2* tras una inducción inicial. La presencia del transcrito de *SUC2* a tiempos de inducción intermedios se restablece al delecionar el gen *HTZI*, siendo la cinética de inducción en la cepa doble mutante *P_{tetO}-IWR1 Δhtz1* similar a la mostrada por la cepa silvestre, aunque los niveles de transcrito son menores en la cepa doble mutante para todos los tiempos analizados (Figura 6.3.C).

6.4.- La mutación *Δiwr1* afecta la inducción del gen *GALI* pero no la de *HSP26*.

Otro de los sistemas modelo en el estudio de la regulación de la expresión génica por fuente de carbono son los genes *GALI/GAL10*. Para analizar la inducción del gen *GALI* se empleó un plásmido (p416-P_{GALI}-lacZ) portador de una fusión génica que expresa el gen reportero *lacZ* bajo control del promotor del gen *GALI*. Se transformaron células de la cepa silvestre y del mutante *Δiwr1* con el plásmido p416-P_{GALI}-lacZ y se determinó la actividad β-galactosidasa para los tiempos indicados. Como se observa en la Figura 6.4.A, la inducción del gen *GALI* se ve retardada en el mutante *Δiwr1*. Por otro lado, los factores transcripcionales Msn2p/Msn4p de *S. cerevisiae* regulan la expresión de un gran número de genes inducidos por diversas condiciones de estrés (Martínez-Pastor *et al.*, 1996). Para comprobar si la expresión dependiente de Msn2p/Msn4p estaba afectada en el mutante *Δiwr1* se analizó la inducción del gen *HSP26* por choque térmico, inducción que es dependiente de Msn2p/Msn4p y del factor Hsf1p (Amorós y Estruch, 2001). Se analizó por *Northern blot* la inducción de *HSP26* y la señal obtenida se cuantificó empleando un *PhosphorImager* (*Molecular Dynamics*), normalizándose esta señal frente a la del transcrito de la RNA pol III, *SCR1*, empleado como control de carga. Como se observa en Figura 6.4.B, la inducción del gen *HSP26* no se ve afectada por la mutación *Δiwr1*.

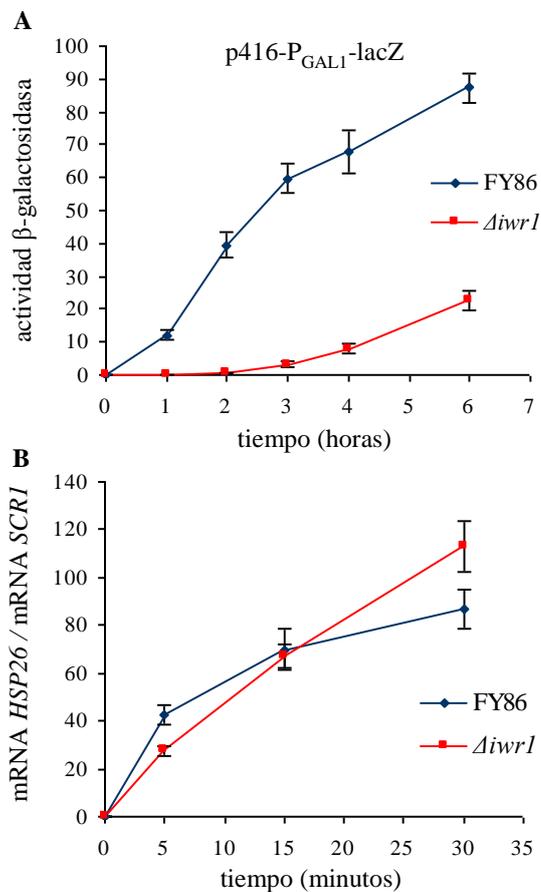


Figura 6.4: Efecto de la mutación $\Delta iwr1$ en la inducción de los genes *GAL1* y *HSP26*. (A) Se cultivaron células de la cepa mutante $\Delta iwr1$ y de la cepa isogénica silvestre (FY86) en medio mínimo sin uracilo (SC-URA) con rafinosa al 2% como fuente de carbono hasta fase exponencial temprana y se transfirieron a medio SC-URA con galactosa al 2% durante los tiempos indicados. Se determinó la actividad β -galactosidasa para tres experimentos independientes. (B) Se cultivaron células de la cepa mutante $\Delta iwr1$ y de la cepa isogénica silvestre en medio YPD hasta fase exponencial temprana y se transfirieron a medio YPD atemperado a 37 °C, incubándose durante los tiempos indicados a esta temperatura. Se obtuvo el RNA total de las muestras, analizándose por *Northern blot* la expresión del gen *HSP26*. El transcrito de la RNA pol III, *SCR1*, se usó como control de carga. Se representan los valores de la cuantificación (mediante *PhosphorImager*) de la señal obtenida para *HSP26* respecto a la señal de *SCR1* para tres experimentos independientes.

6.5.- La proteína Iwr1p se requiere para la inducción de los genes del metabolismo del fosfato.

Entre los genes cuya expresión disminuye en el mutante *Δiwr1* se identificaron varios genes regulados por la presencia de fosfato inorgánico (Pi) en el medio de cultivo (Tabla A.II en Anexo). Estos genes se inducen cuando se cultivan las células en un medio deplecionado de Pi (Ueda *et al.*, 1975) y su expresión está regulada por los factores de transcripción Pho2p y Pho4p (Magbanua *et al.*, 1997). En la Figura 6.5 se observa que la mutación *Δiwr1* reduce la inducción del gen *PHO5*.

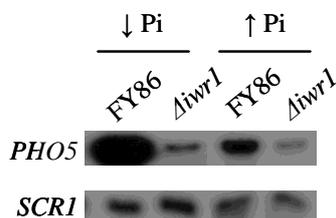


Figura 6.5: Inducción defectuosa del gen *PHO5* en el mutante *Δiwr1*. Se cultivaron células de la cepa silvestre (FY86) y del mutante *Δiwr1* hasta fase de crecimiento exponencial en un medio deplecionado de Pi al que no se le adicionó KH_2PO_4 (↓ Pi) y al que se le añadió KH_2PO_4 a concentración final de 13,4 mM (↑ Pi). Se obtuvo el RNA total de las muestras, analizándose por *Northern blot* la expresión del gen *PHO5*. El transcrito de la RNA pol III, *SCR1*, se usó como control de carga.

Esta inducción defectuosa del gen *PHO5* en el mutante *Δiwr1* no se debe a una localización defectuosa del factor transcripcional Pho4p, ya que como se puede ver en la Figura 6.6, la entrada de esta proteína en el núcleo celular en condiciones de baja concentración de Pi en el medio no se ve afectada en el mutante *Δiwr1*.

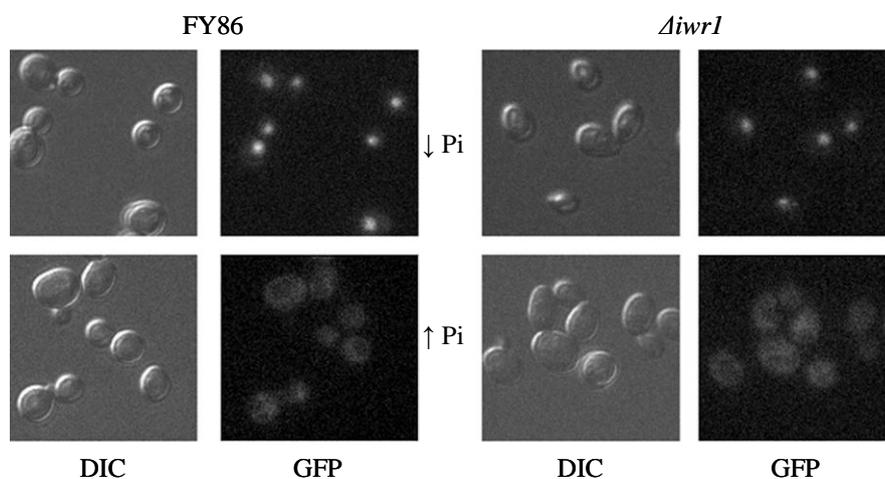


Figura 6.6: Localización subcelular de Pho4p-GFP. Se cultivaron células de la cepa silvestre (FY86) y del mutante $\Delta iwr1$ que expresaban la proteína de fusión Pho4p-GFP en YPD hasta fase exponencial temprana y se transfirieron las células 4 horas a medio sintético completo (SC) con glucosa como fuente de carbono sin (\downarrow Pi) o con 13,4 mM de K_2HPO_4 (\uparrow Pi) a 30 °C. Se localizó la proteína de fusión en ambas condiciones mediante microscopía de fluorescencia.

Se ha descrito que los genes de respuesta a fosfato responden de manera diferente a concentraciones intermedias de Pi en el medio de crecimiento celular (Springer *et al.*, 2003). Estos genes se pueden clasificar en dos grupos en función de su respuesta a una forma del factor transcripcional Pho4p que sólo puede ser fosforilada en el sitio 6 (Pho4^{SA1234WT6}) en condiciones de alta concentración de Pi (Springer *et al.*, 2003). Tanto el gen *PHO5* como el gen *PHO11* se inducen moderadamente por Pho4^{SA1234WT6} en condiciones de alta concentración de Pi, mientras que otros genes de respuesta a fosfato, como *PHO84*, muestran una inducción elevada en dichas condiciones. La diferente regulación de estos genes es, probablemente, consecuencia de la presencia en el promotor del gen *PHO84* de sitios de unión del factor Pho4p de mayor afinidad que los presentes en el

promotor del gen *PHO5* (Springer *et al.*, 2003). Cuando se analizó el efecto de la delección de *IWR1* en la expresión de los genes *PHO5* y *PHO84* a diferentes concentraciones de Pi (Figura 6.7) se observó que mientras la mutación $\Delta iwr1$ anula la inducción de *PHO5* a cualquiera de las concentraciones de Pi utilizadas, hay un aumento en los niveles de mRNA de *PHO84* a medida que disminuye la concentración de Pi en el medio, tanto en la cepa silvestre como en el mutante $\Delta iwr1$, aunque los niveles de transcrito son siempre menores en el mutante $\Delta iwr1$.

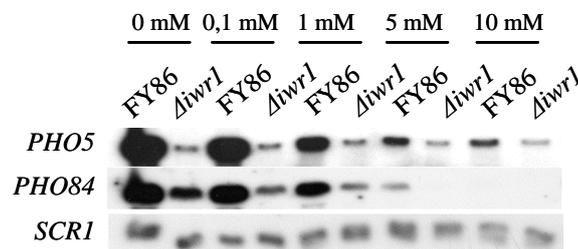


Figura 6.7: Inducción defectuosa de genes *PHO* en el mutante $\Delta iwr1$. Se cultivaron células de la cepa silvestre (FY86) y del mutante $\Delta iwr1$ hasta fase de crecimiento exponencial en medios deplecionados de Pi a los que se les añadieron las cantidades indicadas de KH_2PO_4 . Se obtuvo el RNA total de las muestras, analizándose por *Northern blot* la expresión de los genes *PHO5* y *PHO84*. El transcrito de la RNA pol III, *SCR1*, se usó como control de carga.

La inducción de *PHO84* que se observa en el mutante $\Delta iwr1$ en condiciones de baja concentración de Pi es dependiente de Pho4p, ya que no se observa en la cepa doble mutante $\Delta iwr1 \Delta pho4$ (Figura 6.8).

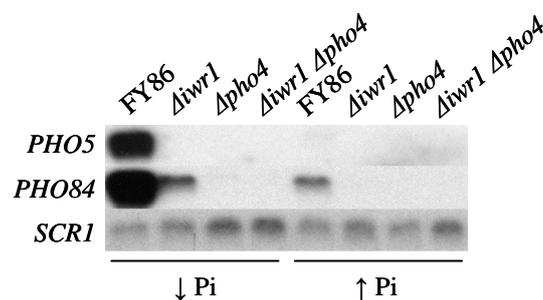


Figura 6.8: La inducción de *PHO84* en el mutante *Δiwr1* es dependiente de Pho4p. Se cultivaron células de las cepas indicadas hasta fase de crecimiento exponencial en medio deplecionado de Pi al que no se le adicionó KH_2PO_4 (↓ Pi) o al que se le añadió KH_2PO_4 a concentración final de 13,4 mM (↑ Pi). Se obtuvo el RNA total de las muestras, analizándose por *Northern blot* la expresión de los genes *PHO5* y *PHO84*. El transcrito de la RNA pol III, *SCRI*, se usó como control de carga.

El factor Pho4p también está involucrado en la inducción del gen *PHO84* en condiciones de pH alcalino (Serrano *et al.*, 2002). Como se observa en la Figura 6.9, esta inducción también se ve negativamente afectada en ausencia de Iwr1p.

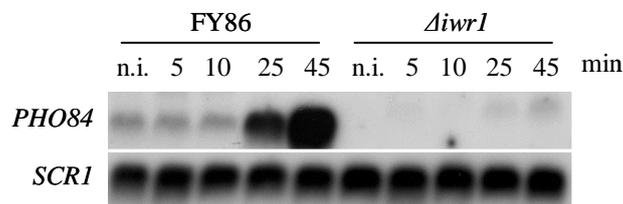


Figura 6.9: La inducción de *PHO84* a pH alcalino se ve negativamente afectada en el mutante *Δiwr1*. Se cultivaron células de la cepa silvestre (FY86) y del mutante *Δiwr1* hasta fase de crecimiento exponencial en medio YPD a pH 5,6 (medio de no inducción, n.i.) y se transfirieron a medio YPD a pH 7,6 durante los tiempos indicados (en minutos). Se obtuvo el RNA total de las muestras y se analizó mediante *Northern blot* la expresión del gen *PHO84*. El transcrito de la RNA pol III, *SCRI*, se usó como control de carga.

6.6.- El requerimiento de la proteína Iwr1p para la inducción del gen *PHO5* depende de las condiciones de inducción.

El requerimiento de algunos factores para la activación de los genes *PHO* depende de las condiciones de inducción. Este es el caso de la chaperona de histonas Asf1p, que es esencial para la inducción de *PHO5* en medio rico YPD deplecionado de Pi, pero no en un medio sintético carente por completo de Pi (Körber *et al.*, 2006). Por ello, se analizó el efecto de la delección del gen *IWR1* sobre la inducción del gen *PHO5* en diferentes condiciones de cultivo, midiendo la actividad fosfatasa ácida. Como muestra la Figura 6.10.A, no se pudo detectar ningún incremento en la actividad fosfatasa en el mutante $\Delta iwr1$ en un medio deficiente en Pi. Sin embargo, en un medio carente por completo de Pi, la inducción del gen *PHO5* se ve retardada en el mutante $\Delta iwr1$, aunque los niveles de actividad fosfatasa ácida de este mutante tras una incubación durante toda la noche en este medio carente de Pi fueron similares a aquellos niveles mostrados por la cepa silvestre (Figura 6.10.A).

La eliminación del regulador negativo Pho80p conduce a una concentración nuclear del factor transcripcional Pho4p y, por tanto, a una completa inducción del gen *PHO5* incluso en condiciones de alta concentración de Pi en el medio (O'Neill *et al.*, 1996; Schmid *et al.*, 1992). Como se observa en la Figura 6.10.B, la proteína Iwr1p no es necesaria para la activación del gen *PHO5* en ausencia del regulador negativo Pho80p, ya que se observa un alto nivel de actividad fosfatasa ácida en la cepa doble mutante $\Delta iwr1 \Delta pho80$. Este mismo resultado se obtuvo también por *Northern blot*, observándose niveles muy similares de mRNA de *PHO5* en la cepa $\Delta pho80$ y en la cepa $\Delta iwr1 \Delta pho80$ (resultado no mostrado).

Por otro lado, también se observó que la proteína Iwr1p es sólo parcialmente necesaria para la inducción del gen *PHO5* cuando se sobre-expresa el factor transcripcional Pho4p (Figura 6.10.C).

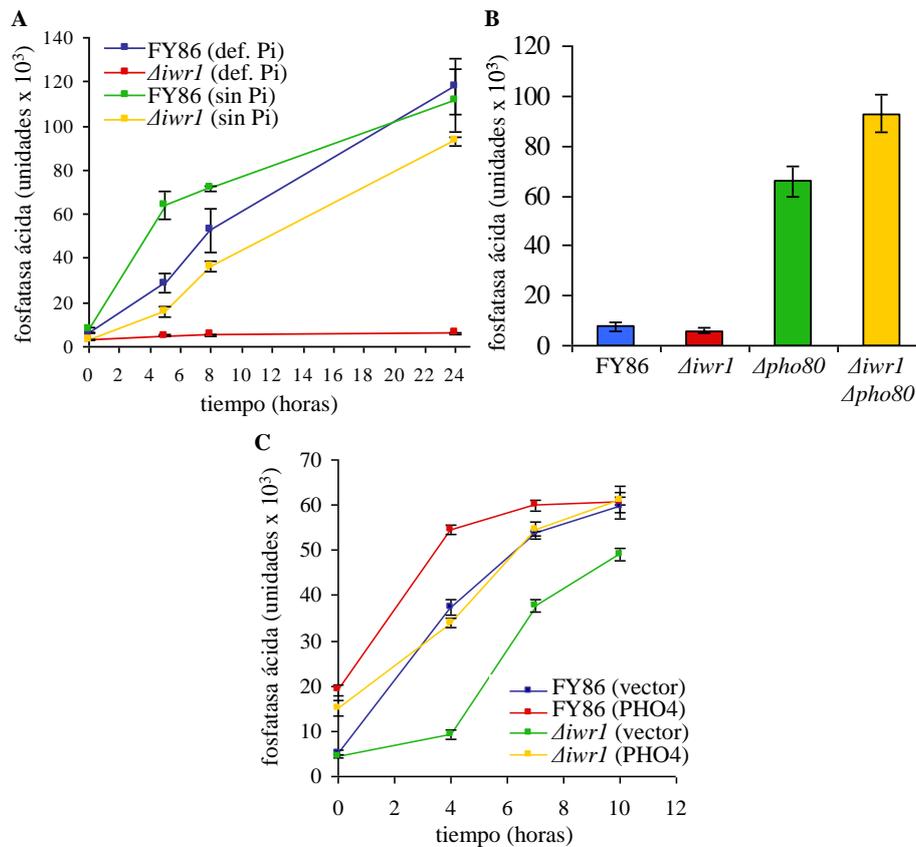


Figura 6.10: La proteína Iwr1p se requiere de manera diferente dependiendo de las condiciones de inducción del gen *PHO5*. (A) Se cultivaron células de la cepa silvestre (FY86) y del mutante $\Delta iwr1$ hasta fase exponencial temprana en un medio deficiente en Pi al que se le añadió KH_2PO_4 a concentración final de 13,4 mM (0 h) y se transfirieron a un medio deficiente en Pi (def. Pi) o completamente carente de Pi (sin Pi), incubándose durante los tiempos indicados (en horas). (B) Se cultivaron células de las cepas indicadas hasta fase exponencial temprana en un medio deficiente en Pi al que se le añadió KH_2PO_4 a concentración final de 13,4 mM. (C) Se cultivaron células de la cepa silvestre (FY86) o del mutante $\Delta iwr1$ transformadas con el vector vacío YEplac181(vector) o con el vector que sobre-expresa *PHO4*, YEplac181-*PHO4* (*PHO4*), hasta fase exponencial temprana en un medio deficiente en Pi al que se le añadió KH_2PO_4 a concentración final de 13,4 mM (0 h). Se transfirieron las células a un medio completamente carente de Pi (sin Pi) durante los tiempos indicados (en horas). En (A), (B) y (C) se determinó la actividad fosfatasa ácida. Las medias y desviaciones estándar se obtuvieron a partir de tres experimentos independientes.

Como se observa en la Figura 6.10.C, la cepa mutante *Δiwr1* muestra niveles mayores de actividad fosfatasa ácida cuando contiene un plásmido que sobre-expresa el gen *PHO4* que la cepa transformada únicamente con el vector.

6.7.- La ausencia de Iwr1p altera la remodelación de la cromatina en el promotor del gen *PHO5*.

Entre los genes de respuesta a fosfato, el gen *PHO5* es un ejemplo muy bien estudiado de gen cuyo promotor experimenta una remodelación importante a nivel de la cromatina durante el proceso de inducción. En condiciones de alta concentración de fosfato inorgánico (Pi) en el medio existen 4 nucleosomas perfectamente posicionados asociados a la región del promotor del gen *PHO5* (Reinke y Horz, 2004; Almer *et al.*, 1986). Estos cuatro nucleosomas dejan de estar posicionados en condiciones de baja concentración de Pi en el medio y este proceso se puede seguir determinando la accesibilidad a un sitio de restricción *ClaI* localizado dentro del nucleosoma -2 (Figura 6.11.A). En la Figura 6.11.B se observa que el sitio de restricción *ClaI* es accesible en la cepa silvestre tras incubar las células 4 horas en un medio deficiente en fosfato inorgánico. En cambio, el nivel de apertura de la cromatina en el mutante *Δiwr1* en esas condiciones es similar al observado en condiciones de alta concentración de fosfato en el medio, sugiriéndose que la ausencia de la proteína Iwr1p afecta negativamente a la remodelación de la cromatina del promotor del gen *PHO5*.

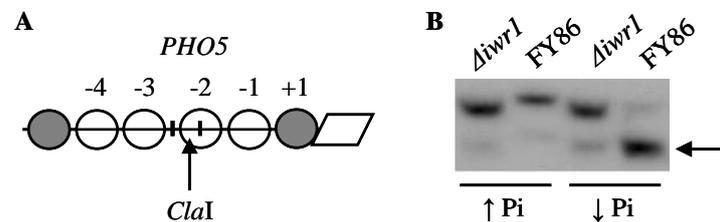


Figura 6.11: La delección de *Iwr1p* afecta a la apertura de la cromatina en el promotor de *PHO5*. (A) Esquema del posicionamiento nucleosomal en el promotor de *PHO5* en condiciones de represión (modificado de Barbaric *et al.*, 2007). La remodelación de la cromatina tras la inducción deja accesible el sitio de restricción *ClaI* del nucleosoma -2. (B) Los núcleos de las cepas indicadas, obtenidos a partir de células cultivadas en condiciones de represión (\uparrow Pi) o en condiciones de inducción en un medio deficiente en Pi durante 4 horas (\downarrow Pi), se digirieron con 100 unidades de *ClaI*. La accesibilidad al sitio *ClaI* se analizó como se describe en Almer *et al.*, 1986 (ver Materiales y Métodos; apartado 2.9.3.- Ensayo de accesibilidad al sitio de restricción de la endonucleasa *ClaI* situado en el promotor del gen *PHO5*). El corte en *ClaI* del nucleosoma -2 se manifiesta por la aparición de una banda más baja (indicada por una flecha).

Por otro lado, se analizó el reclutamiento del activador Pho4p en el mutante $\Delta iwr1$. Se ha descrito que es necesario la remodelación de la cromatina para la unión del factor Pho4p a la región UASp2 del nucleosoma -2 en condiciones de baja concentración de Pi en el medio (Adkins *et al.*, 2007; Dhasarathy y Kladde, 2005; Barbaric *et al.*, 2007). De acuerdo con esto, el análisis mediante inmunoprecipitación de cromatina (ChrIp) no mostró reclutamiento del factor Pho4p en condiciones de baja concentración de Pi en ausencia de *Iwr1p* (Figura 6.12.A). Además, la deficiente remodelación de la cromatina observada en el mutante $\Delta iwr1$ también impide el reclutamiento de la subunidad Rpb1p de la RNA pol II al promotor del gen *PHO5* a los tiempos analizados (Figura 6.12.B).

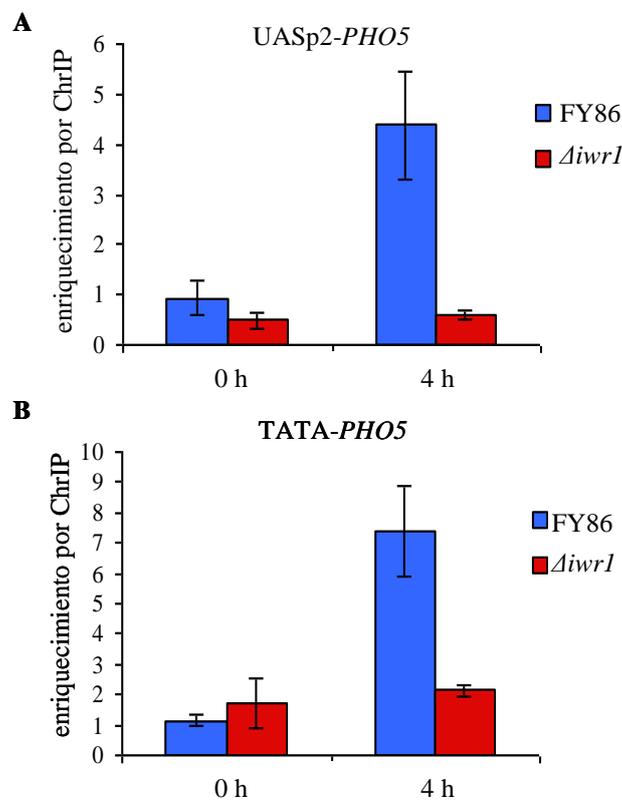


Figura 6.12: La delección de *Iwr1p* afecta al reclutamiento de Pho4p y de Rpb1p al promotor de *PHO5*. (A) Análisis por inmunoprecipitación de cromatina (ChrIp) de los niveles de Pho4p sobre la región UASp2 del gen *PHO5*, empleando cepas con la proteína etiquetada Pho4p-HA. Se cultivaron células de la cepa silvestre (FY86) y del mutante $\Delta iwr1$ en un medio deficiente en Pi al que se le añadió KH_2PO_4 a concentración final de 13,4 mM y se transfirieron las células a un medio deficiente en Pi sin KH_2PO_4 adicionado, incubándose durante 4 horas. Se determinó la cantidad de inmunoprecipitado (IP) mediante PCR cuantitativa (RT-PCR). Se representa la ocupación relativa sobre la región UASp2 del promotor de *PHO5*, que se determinó por el *ratio* del IP relativo al *input* (región UASp2-*PHO5*) dividido por el *ratio* del IP control relativo al *input* control (región intergénica). (B) Análisis por inmunoprecipitación de cromatina (ChrIp) de los niveles de Rpb1p sobre la región de la caja TATA del gen *PHO5*, llevado a cabo como se describe en (A). Las medias y desviaciones estándar se calcularon a partir de tres experimentos independientes.

6.8.- La proteína Iwr1p no se detectó asociada a la cromatina de los promotores de los genes *PHO5*, *SUC2* ni *ARG1*.

Finalmente, se analizó si la proteína Iwr1p se reclutaba junto con la RNA pol II a los promotores de aquellos genes cuya transcripción era dependiente de Iwr1p. Para ello se llevaron a cabo análisis por inmunoprecipitación de cromatina (ChrIp) empleando cepas con la proteína Iwr1p etiquetada de diferentes maneras (Myc, HA o TAP). Se determinó la cantidad de Iwr1p presente en los promotores de los genes *PHO5* y *SUC2* en condiciones de represión (alta concentración de fosfato inorgánico o de glucosa en el medio, respectivamente) y en condiciones de inducción (baja concentración de fosfato inorgánico o de glucosa en el medio, respectivamente). También se analizó la presencia de Iwr1p en el promotor del gen *ARG1*, cuya expresión basal se veía incrementada en el mutante $\Delta iwr1$ (Figura 6.1.A). Los niveles de Iwr1p asociados a los promotores de los genes *PHO5* y *SUC2* no varían de manera significativa durante su inducción y, además, son similares al nivel de Iwr1p en una región intergénica no transcrita (Figura 6.13 A-D). Del mismo modo, no se detecta ningún enriquecimiento en el contenido de Iwr1p (relativo a la región intergénica) para las diferentes secuencias de DNA a lo largo del locus de *PHO5* (Figura 6.13 A-C) ni en el promotor del gen *ARG1* (Figura 6.14.A y B). Por tanto, los resultados sugieren que Iwr1p no parece estar asociada a la RNA pol II cuando ésta se recluta al promotor de genes activos.

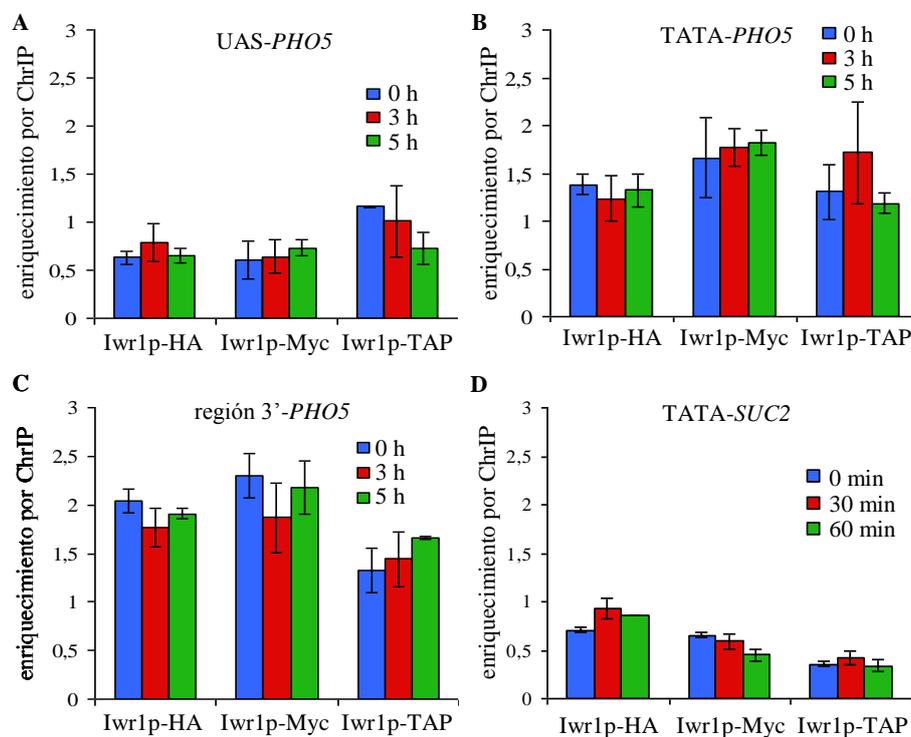


Figura 6.13: La proteína Iwr1p no se detecta asociada a la cromatina de sus genes diana, *PHO5* y *SUC2*. Se llevaron a cabo análisis por inmunoprecipitación de cromatina (ChrIp) en células con la proteína Iwr1p etiquetada en su extremo C-terminal con el epitopo HA (Iwr1p-HA), Myc (Iwr1p-Myc) o TAP (Iwr1p-TAP). (A) (B) y (C) Para el análisis del gen *PHO5*, se cultivaron las células en un medio deficiente en Pi al que se le añadió KH_2PO_4 a concentración final de 13,4 mM y se transfirieron a un medio deficiente en Pi sin KH_2PO_4 adicionado, incubándose durante los tiempos indicados (en horas). (D) Para el análisis del gen *SUC2*, se cultivaron las células en YPD con glucosa al 2% hasta fase exponencial temprana y se transfirieron a un medio YPD con 0,05% de glucosa durante los tiempos indicados (en minutos). Se determinó la cantidad de inmunoprecipitado (IP) mediante PCR cuantitativa. La ocupación relativa se determinó por el *ratio* del IP relativo al *input* (región de interés) dividido por el *ratio* del IP control relativo al *input* control (región intergénica). Las medias y desviaciones estándar se calcularon a partir de tres experimentos independientes.

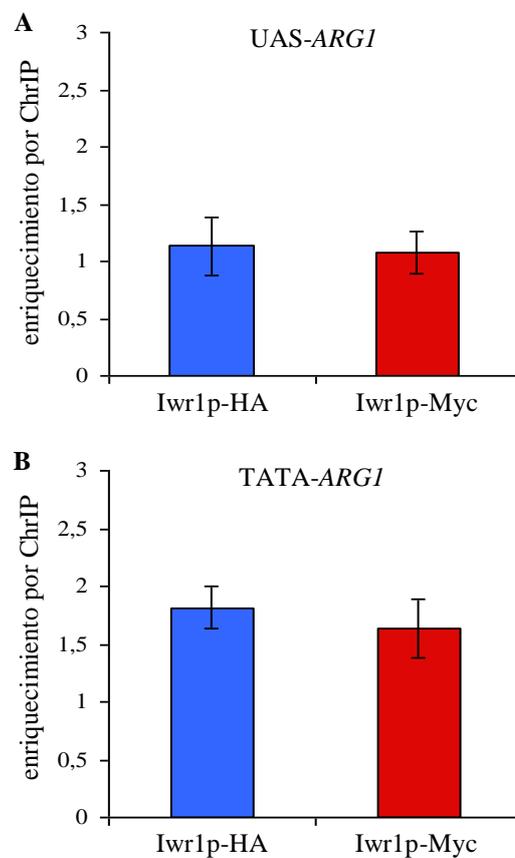


Figura 6.14: La proteína Iwr1p no se detecta asociada a la cromatina del gen *ARG1*. Se llevaron a cabo análisis por inmunoprecipitación de cromatina (ChrIP) en células con la proteína Iwr1p etiquetada en su extremo C-terminal con el epitopo HA (Iwr1p-HA) o Myc (Iwr1p-Myc). (A) y (B) Para el análisis del gen *ARG1* se cultivaron las células en YPD hasta fase exponencial temprana. Se determinó la cantidad de inmunoprecipitado (IP) mediante PCR cuantitativa. La ocupación relativa se determinó por el *ratio* del IP relativo al *input* (región de interés) dividido por el *ratio* del IP control relativo al *input* control (región intergénica). Las medias y desviaciones estándar se calcularon a partir de tres experimentos independientes.

6.9.-Análisis de los efectos de la translocación núcleo-citoplasma en la función transcripcional de la proteína Iwr1p.

6.9.1.- Efecto de la delección de la secuencia NES en el crecimiento celular y en la inducción de la actividad fosfatasa ácida.

Como se ha comentado (ver Resultados; apartado 5.7.- La proteína Iwr1p se mueve entre el núcleo y el citoplasma de manera dependiente de la exportina Xpo1p) la proteína Iwr1p contiene una secuencia de exportación nuclear (NES) cuya delección provoca la acumulación de Iwr1p en el núcleo (Figura 5.13).

Como se observa en la Figura 6.15, la delección de la secuencia NES no provoca ningún efecto negativo sobre el crecimiento de las células de levadura.



Figura 6.15: Efecto de la delección de la secuencia NES en el crecimiento celular. Se sembraron diluciones seriadas de la cepa *Δiwr1* transformada con las construcciones YCplac33-IWR1-GFP o YCplac33-IWR1ΔNES-GFP o con el vector vacío YCplac33 en placas de SC-URA durante 4 días a 30 °C.

Por otro lado, tampoco se observan diferencias en la actividad fosfatasa ácida entre la cepa silvestre y la cepa mutante *Δiwr1* que expresa Iwr1p-GFP o Iwr1pΔNES-GFP, tanto en condiciones de represión (alta concentración de Pi en el medio de cultivo) como en condiciones de inducción (baja concentración de Pi) (Figura 6.16).

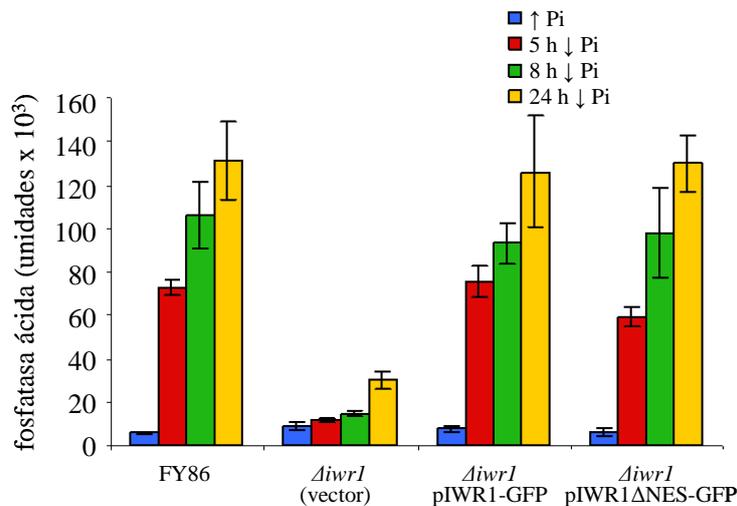


Figura 6.16: Efecto de la delección de la secuencia NES en la inducción de la actividad fosfatasa ácida. Se cultivaron células de la cepa silvestre (FY86) o del mutante $\Delta iwr1$ transformadas con el vector vacío YCplac33 (vector) o con el vector que expresa *Iwr1p*-GFP o *Iwr1p* Δ NES-GFP, hasta fase exponencial temprana de crecimiento (0 h) en un medio deficiente en Pi al que se le añadió KH_2PO_4 a concentración final de 13,4 mM. Se transfirieron las células a un medio deficiente en Pi (sin KH_2PO_4 adicionado) durante los tiempos indicados. Las medias y desviaciones estándar se calcularon a partir de tres experimentos independientes.

6.9.2.- Análisis transcripcional del mutante *IWR1*(Δ NES).

Los efectos sobre el crecimiento celular y sobre la inducción del gen *PHO5* causados por delección de la secuencia NES de *Iwr1p* indican que la inhibición de la translocación núcleo-citoplasma no impide, en términos generales, la función de la proteína *Iwr1p*. Con el objeto de comprobar si esta translocación estaba específicamente implicada en alguno de los efectos transcripcionales de *Iwr1p*, se comparó el transcriptoma de la cepa mutante $\Delta iwr1$ transformada con la construcción YCplac33-*IWR1* Δ NES-GFP con el de esta misma cepa transformada con la construcción YCplac33-*IWR1*-GFP. Para ello, las células se crecieron durante toda la noche en medio mínimo sin uracilo (SC-URA) y se transfirieron a medio YPD hasta fase de crecimiento

exponencial. Como cabía esperar, tan sólo un número reducido de genes mostraron cambios significativos (aumentos o reducciones de más de dos veces) en sus niveles de expresión (Tabla A.IV en Anexo). De los 14 genes con diferencias significativas, 9 mostraron un nivel mayor de transcripción en la cepa con la delección de la NES, mientras que en 5 genes los niveles de transcrito fueron menores. El análisis de los genes afectados puso de manifiesto que 4 de los genes cuya expresión disminuye por la delección de la NES (*SNZ3*, *CHAI*, *ECM4* y *BAT2*) se inducen por la adición de rapamicina en el medio de cultivo. El papel de Iwr1p y, específicamente, el de su translocación núcleo-citoplasma será objeto de posteriores estudios.

7.- DISCUSIÓN

Las interacciones genéticas identificadas por nuestro grupo entre Bur6p y diversas proteínas que participan en la exportación de mRNAs (Estruch y Cole, 2003), así como las características del factor transcripcional NC2, del que Bur6p forma parte, determinaron nuestro interés por el mismo y la planificación y ejecución de diferentes rastreos genómicos con el objeto de obtener información sobre su función en la célula.

El primero de los abordajes fue la identificación de genes cuya sobre-expresión fuera capaz de suprimir la letalidad sintética que muestran las mutaciones *bur6-1* y *dbp5-2*. Este rastreo condujo a la identificación de un alelo truncado de la segunda subunidad mayor de la RNA pol II, *rpb2t*. El hecho de que NC2 se identificara inicialmente como una actividad que reprime la transcripción basal *in vitro* (Meisterernst y Roeder, 1991) y el efecto supresor que sobre *dbp5-2* tienen mutaciones en funciones necesarias para la activación transcripcional (Estruch y Cole, 2003) planteó la posibilidad de que la letalidad sintética entre las mutaciones *bur6* y *dbp5* estuviera causada por un incremento en la tasa de transcripción (consecuencia del defecto en Bur6p) que no podría ser soportado por la célula cuando el funcionamiento de la maquinaria de exportación de mRNAs fuera defectuoso (por el defecto en Dbp5p). En este contexto, la sobre-expresión del alelo truncado *rpb2t* podría suprimir la letalidad sintética por su efecto negativo sobre la transcripción. Este efecto negativo podría ser fruto de una competencia entre las moléculas de Rpb2p funcionales y las moléculas truncadas, no funcionales, codificadas por *rpb2t*.

La sobre-expresión de *rpb2t* también fue capaz de suprimir los defectos en el crecimiento del mutante sencillo *dbp5-2* a temperatura restrictiva de 34 °C (Figura 3.3). Además, nuestro trabajo sugiere que la supresión de los defectos en el crecimiento del mutante *dbp5-2* por la sobre-expresión de *rpb2t*, es consecuencia de la mejora en la tasa de exportación de transcritos (Figura 3.6). Esta interacción genética es compatible con un

efecto negativo de la sobre-expresión de *rpb2t* sobre la transcripción. Como se ha comentado, los defectos en el crecimiento del mutante *dbp5-2* pueden ser suprimidos por mutaciones en los factores transcripcionales Ssl1p (componente de TFIID) y Srb4p (componente del Mediador), que juegan un papel positivo en la formación del complejo pre-inicio de la transcripción (Estruch y Cole, 2003). Una reducción en la concentración de holoenzima RNA pol II funcional, causado por la sobre-expresión de las moléculas truncadas Rpb2tp y el consiguiente efecto en la transcripción sería compatible con dichas observaciones. Sin embargo, no se observó efecto supresor del defecto en el crecimiento del mutante *dbp5-2* a temperatura semi-restrictiva cuando se sobre-expresó la subunidad truncada *rpb1t* (Figura 3.3) o cuando se deplecionaron las subunidades de la RNA pol II Rpb1p, Rpb2p o Rpb7p, ni cuando se eliminó la subunidad no esencial Rpb9p (Figura 3.4). Tampoco se observó que la sobre-expresión de *rpb2t* diera lugar a una reducción significativa de diferentes transcritos analizados (Figura 3.5). Así pues, estos últimos resultados indican que una simple reducción de la tasa de transcripción no sería suficiente para suprimir los defectos de la mutación *dbp5-2* y sugieren que el efecto de la sobre-expresión de *rpb2t* (así como el de otras mutaciones supresoras) podría ser específico sobre una etapa determinada del proceso transcripcional, efecto que no tendría que traducirse necesariamente en cambios significativos globales de los niveles de transcrito. La reducción en el desarrollo de esta(s) etapa(s) tendría un efecto positivo en la formación de mRNPs competentes para ser exportadas, probablemente permitiendo un reclutamiento más efectivo de proteínas a la mRNP naciente en condiciones en las que el proceso de exportación se ve comprometido.

La sobre-expresión de determinados alelos truncados de las subunidades Rpb1p y Rpb2p de la RNA pol II son también capaces de

suprimir los defectos en el crecimiento originados por la presencia de cantidades limitadas de NC2 o de Mot1p, originadas por expresión de los alelos *P_{GALI}-BUR6*, *P_{GALI}-YDR1* o *P_{GALI}-MOT1* cuando se utiliza un medio con glucosa como fuente de carbono (Figura 3.7 y 3.10). Es posible que sólo determinadas formas truncadas de Rpb1p y Rpb2p sean capaces de ensamblarse y otras no, lo que conduciría a que las formas ensambladas formaran polimerasas que compitieran con las silvestres y redujeran la transcripción, permitiendo la supresión de los defectos en NC2 observada. En nuestro trabajo, y en el de otros grupos, se han identificado diferentes supresores de los defectos en NC2 (Gadbois *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2000; Lemaire *et al.*, 2000; Xie *et al.*, 2000; Peiró-Chova y Estruch, 2007, ver más adelante). La naturaleza de estos supresores permite concluir que los defectos en el crecimiento de los mutantes en NC2 pueden ser compensados por mutaciones en funciones que tienen un efecto positivo en la formación del complejo pre-inicio. Así pues, aunque NC2 puede actuar como un efector tanto positivo como negativo de la transcripción (Prelich, 1997; Geisberg *et al.*, 2001; Cang y Prelich, 2002), la función esencial de NC2 resultaría de su papel como represor transcripcional.

Los análisis transcriptómicos están de acuerdo con un papel predominante de NC2 como represor transcripcional, ya que una deficiencia en el componente Ydr1p de NC2 ocasiona un aumento de los niveles de transcripción de 414 genes, mientras que sólo 95 genes muestran una expresión reducida. La comparación de los perfiles transcripcionales de células con actividad Ydr1p reducida con los de las mismas células que sobre-expresan *rpb2t*, muestra que la sobre-expresión de *rpb2t* es capaz de compensar los efectos transcripcionales globales causados por la reducción de NC2. Así, cerca del 90% de los genes cuya expresión aumenta o disminuye con un factor igual o superior a 2 en la cepa con actividad Ydr1p reducida (comparada con la cepa isogénica silvestre) mostraron un nivel de

expresión más próximo al valor de la cepa isogénica silvestre cuando se sobre-expresaba *rpb2t* (Figura 3.9). El hecho de que la sobre-expresión de *rpb2t* compense tanto el exceso como el defecto de transcripción provocado por la depleción de NC2 sugiere que la sobre-expresión de *rpb2t* y la carencia de NC2 afectan de forma opuesta la(s) misma(s) etapa(s) del proceso de expresión génica.

Dado que los efectos supresores de *rpb2t* se observan únicamente cuando se sobre-expresa el alelo truncado, pero no así cuando este alelo se introduce en la levadura en un vector centromérico, es posible que la sobre-expresión se deba a la competencia entre Rbp2p y Rpb2tp en su interacción con otros componentes de la holoenzima RNA pol II. Resulta, por lo tanto, sorprendente el efecto supresor de fragmentos N-terminales de Rpb2p de tan solo 240 aminoácidos, que representan un 20% del total de la proteína (Figura 3.10). Esto sugiere que la región N-terminal de Rpb2p puede adoptar estructuras capaces de interactuar con otros componentes de la holoenzima RNA pol II. La región N-terminal de Rpb2p incluye secuencias que interactúan con las subunidades de la RNA pol II, Rpb12p y Rpb9p (Cramer *et al.*, 2001), pero el secuestro individual de cualquiera de estas subunidades por parte de las versiones truncadas de Rpb2p no parece ser la causa del efecto supresor. Por otro lado, también se observó supresión del defecto en el crecimiento causado por actividad reducida de NC2 sobre-expresando una truncación C-terminal de Rpb1p (Figura 4.9). Probablemente, el mecanismo supresor de *rpb1t* es similar al de *rpb2t* y es interesante señalar que la forma truncada supresora *rpb1t* no contiene el dominio CTD. El dominio CTD de la Rpb1p media el acoplamiento entre la transcripción, el procesamiento de mRNAs y otros eventos nucleares, y se requiere para que los procesos de adición de la caperuza (*capping*), el corte y empalme de exones (*splicing*), el procesamiento del extremo 3' y la poliadenilación sean eficientes *in vivo* (Meinhart *et al.*, 2005). Nuestros

resultados indican que la supresión del defecto en NC2 no implica necesariamente a proteínas que interaccionan con el dominio CTD.

Nuestra hipótesis de que es una reducción en la actividad transcripcional la que compensa la necesidad de NC2 se ve reforzada por la supresión observada cuando se reduce la cantidad de Rpb1p o Rpb2p (Figura 4.10). Resulta interesante el hecho de que el nivel más alto de supresión se obtiene para una reducción moderada de estas proteínas. Por otro lado, una actividad RNA polimerasa defectuosa, como la que resulta de la ausencia en la holoenzima de la subunidad no esencial Rpb9p, no suprime, sino que aun empeora los defectos en el crecimiento que se observan en la cepa *P_{GALI}-YDR1* (Figura 4.9). Este conjunto de resultados revelan la necesidad de un fino equilibrio entre funciones transcripcionales positivas y negativas para mantener el crecimiento celular.

La incapacidad de la cepa doble mutante *P_{GALI}-YDR1 P_{GALI}-BUR6* de crecer en un medio con glucosa como fuente de carbono, fue utilizada para la identificación de nuevas mutaciones supresoras de la función de NC2, que se han denominado en este trabajo *snd* (por “*suppressors of NC2 depletion*”). La mayoría de las mutaciones identificadas en nuestro rastreo genómico correspondieron a componentes de tres complejos básicos en la transcripción: el Mediador, TFIIH, y la propia RNA pol II (Tabla 4.1). Las mutaciones restantes afectaron al gen *IWR1* (*Interacting with RNA pol II*, que también se ha estudiado en detalle en el desarrollo de este trabajo) y a un gen de función desconocida, *YMR185w*. El mecanismo de supresión de la depleción de NC2 por las mutaciones *snd* no es consecuencia de una represión deficiente del promotor *GALI* en glucosa (Figura 4.1). Además, se ha demostrado que mutaciones en todos los genes identificados en este rastreo genómico son capaces de compensar la ausencia total del gen *BUR6* (Figura 4.4), validándose así el empleo de las cepas *P_{GALI}-YDR1* y *P_{GALI}-*

BUR6 como herramientas para identificar genes relacionados funcionalmente con NC2.

Como ya se ha comentado, se han descrito funciones positivas y negativas de NC2 durante el inicio de la transcripción (Geisberg *et al.*, 2001; Chitikila *et al.*, 2002). El hecho de que las mutaciones identificadas en nuestro rastreo originen una pérdida de función en componentes de complejos con un papel predominantemente activador de la transcripción, apoya la idea de que defectos en NC2 impiden el crecimiento celular como consecuencia de una represión transcripcional ineficiente.

Trabajos previos sobre la función de NC2 identificaron relaciones genéticas entre éste y el componente del Mediador Sin4p, así como con el factor general de transcripción TFIIA (Kim *et al.*, 2000; Lemaire *et al.*, 2000; Xie *et al.*, 2000). Sin4p forma parte de la “cola” del Mediador, junto a la tríada Med2p/Med3p/Gal11p y la subunidad esencial Rgr1p (Chaddick y Asturias, 2005). En los estudios donde se describe la supresión de los defectos en NC2 por mutaciones en el gen *SIN4* (Kim *et al.*, 2000; Lemaire *et al.*, 2000) se analizó también la capacidad de supresión de NC2 por mutaciones en los otros componentes de la cola del Mediador. Kim y colaboradores encontraron que mutaciones en *GAL11* no eran capaces de suprimir el fenotipo sensible al frío de una cepa mutante *ydr1*. Por otra parte, Lemaire y colaboradores comprobaron que mutaciones en los genes *MED2*, *MED3* y *RGR1* tampoco eran capaces de compensar el requerimiento de NC2. Estos resultados llevaron a interpretar la supresión por *sin4* como una interacción genética específica entre esta subunidad del Mediador y NC2. En nuestro rastreo identificamos mutaciones en los componentes del Mediador, Nut2p, Med7p y Srb2p como supresores de la depleción de NC2 y también comprobamos que mutaciones en estos componentes compensan la ausencia total de *BUR6* (Figura 4.4).

Dos de los componentes identificados en nuestro rastreo, Nut2p y Med7p, están codificados por genes esenciales (Myers y Kornberg, 2000). Sorprendentemente, en dos de los alelos mutantes de *NUT2* (*snd1-2* y *snd1-9/snd1-50*, Tabla 4.1) la inserción del transposón se da en el interior de la secuencia codificante, en posiciones que eliminan una gran porción de la región codificadora. Nuestros resultados, aunque no de forma concluyente, sugieren que estos alelos no son viables a menos que la actividad de NC2 esté reducida. Así pues, la reducción de NC2 sería capaz de aliviar parcialmente el requerimiento del Mediador. El hecho de que una relación genética análoga a la observada entre *NUT2* y los componentes de NC2 se haya descrito para *SRB4*, que codifica otro componente esencial del Mediador (Gadbois *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1998), refuerza la posibilidad de que la compensación funcional entre el Mediador y NC2 sea recíproca.

Además, en conjunto, nuestros resultados sugieren un funcionamiento del Mediador como una entidad que compensaría la función de NC2, más que unas interacciones genéticas específicas entre NC2 y determinadas subunidades del Mediador. Esta interpretación está basada en el análisis de la capacidad supresora de los componentes no esenciales del Mediador. Así, 11 de las 14 subunidades estudiadas (13 de 16 si incluimos las subunidades esenciales, Nut2p y Med7p) fueron capaces de suprimir la reducción de NC2, aunque en diferentes grados. Resulta interesante el hecho de que las 3 subunidades no supresoras, Med2p, Med3p y Gal11p, formen un submódulo dentro de la “cola” del Mediador. Los análisis de los perfiles de expresión génica muestran que mutaciones en estos genes provocan un descenso generalizado de los niveles de transcripción (van de Peppel *et al.*, 2005), sugiriéndose que este submódulo desempeña un papel positivo en la expresión génica. Una interpretación simplista del balance entre efectores positivos y negativos llevaría a predecir que mutaciones en genes de esta tríada suprimieran la deficiencia de NC2, como de hecho ocurre con

mutaciones en otras subunidades “positivas” del Mediador (caso de *Srb2p* y *Srb5p* de la “cabeza” o *Soh1p* del “centro”) que sí suprimen fuertemente los defectos en el crecimiento causados por reducción de *NC2* (Figura 4.5). Sin embargo, nuestros resultados indican que las deleciones en los componentes de esta tríada empeoran los defectos en el crecimiento de las cepas mutantes en componentes de *NC2* (Figura 4.5). Por otro lado, también resulta contradictorio el hecho de que mutaciones en subunidades del módulo *Srb8-11* del Mediador (que, de manera general, parece desempeñar un papel negativo en la expresión génica) sean capaces de suprimir los defectos en el crecimiento provocados por reducción de *NC2*, aunque a niveles más bajos que las mutaciones en otros componentes del Mediador.

El submódulo *Med2p/Med3p/Gal11p* forma parte de la “cola” del Mediador, una región que no parece contactar con la RNA pol II, pero interacciona con activadores específicos de genes (Lewis y Reinberg, 2003), lo que apoya la posibilidad de que esta tríada no esté involucrada en la transcripción basal ni interaccione funcionalmente con *NC2*. Sin embargo, nuestro análisis epistático (Figura 4.6) revela una relación genética entre la tríada y *NC2*, mostrando que la integridad de la tríada es necesaria para que mutaciones en otras subunidades del Mediador, como en *SRB2*, puedan compensar la reducción de *NC2*. La posibilidad propuesta por Cang y Prelich (2002) de que *NC2* actúe reprimiendo selectivamente la transcripción basal pero estimulando la transcripción activada, podría explicar por qué la eliminación de estos componentes positivos empeora los defectos en el crecimiento de las cepas mutantes en *NC2* (Figura 4.5) y también explicaría el resultado del análisis epistático (Figura 4.6). Además, la observación de que la tríada *Med2p/Med3p/Gal11p* sea necesaria para la supresión que se da al reducir la actividad de *TFIIH* o de la RNA pol II (Figura 4.6) podría indicar una interacción específica entre *NC2* y estos componentes del Mediador. En resumen, nuestros resultados muestran que defectos en

componentes de todos los módulos del Mediador son capaces de compensar la reducción de NC2, sugiriendo que el Mediador, como entidad, desempeña una función opuesta a la de NC2. Pero además, nuestros resultados también revelan la existencia de submódulos dentro del Mediador que presentan relaciones antagónicas con el represor NC2.

Por otro lado, también se estudió el efecto de la depleción de NC2 y de mutaciones en componentes del Mediador sobre la activación transcripcional mediada por el activador Gal4p, por Gcn4p o por choque térmico, obteniéndose resultados muy variados (Figura 4.8). Estos resultados sugieren que el efecto de mutaciones en componentes del Mediador y de defectos en NC2 sobre la activación transcripcional es específico para cada activador o para cada ruta de señalización, por lo que no se obtiene un patrón de activación similar en todos los casos estudiados.

Además de mutaciones en genes que codifican componentes del Mediador, nuestro rastreo genómico (y otros experimentos adicionales incluidos en este trabajo) nos ha permitido identificar mutaciones en componentes de TFIID (*tfb1* y *ssl1*) y en subunidades de la RNA pol II (Rpb1p, Rpb2p y Rpb7p) como supresores de la reducción en la actividad de NC2. Como ocurre con el Mediador, no todos los componentes de estos complejos presentan capacidad supresora. Por ejemplo, la mutación en un componente de TFIID, *rad3-20* (Figura 4.11), y la delección de *RPB9* (Figura 4.9) no solo no suprimen la depleción de NC2, sino que empeoran el crecimiento de las cepas con actividad NC2 reducida. Tampoco muestran efecto supresor las mutaciones en los componentes del complejo remodelador de cromatina, SAGA analizadas, *Agcn5* y *Ada2*, y la mutación *taf1*, componente de TFIID (Figura 4.11), pero no podemos afirmar que

mutaciones en otros componentes de estos complejos no muestren capacidad supresora.

Se ha sugerido que NC2 podría funcionar tanto como un efector positivo como negativo de la transcripción (Geisberg *et al.*, 2001; Chitikila *et al.*, 2002). La naturaleza de la mayoría de los supresores identificados en este trabajo sugiere que la detención del crecimiento de células con actividad NC2 reducida sería consecuencia de un aumento del nivel de transcripción, y que los supresores funcionarían reduciendo dicho nivel de transcripción. La mayoría de las mutaciones identificadas en nuestro rastreo corresponden a subunidades del complejo Mediador. Lewis y Reinberg propusieron un modelo en el que el Mediador podría adoptar diferentes configuraciones (Lewis y Reinberg, 2003). Estas conformaciones tendrían diferentes afinidades intrínsecas por la RNA pol II, regulándose así el acceso de la RNA pol II a nivel de formación del complejo pre-inicio (PIC), de inicio de la transcripción o de la consiguiente re-entrada de la polimerasa. Se podría postular entonces que la reducción de NC2 podría aumentar el acceso de la RNA pol II a los promotores, provocando un aumento en la transcripción que causaría la inviabilidad celular. Los supresores actuarían alterando la conformación de un componente específico de la holoenzima (Mediador, TFIIH o la propia RNA pol II) de tal modo que provocarían una disminución de la afinidad por otros componentes de la holoenzima, con la consiguiente disminución del acceso de la RNA pol II a los promotores. Pero, como ya se ha comentado, se han identificado mutaciones en componentes para los que se postula un efecto negativo en la transcripción (como el módulo Srb8-11 del Mediador) que son capaces de compensar parcialmente la reducción de NC2, al igual que se han identificado deleciones en factores con un efecto positivo en la transcripción (Rpb9p, Med2p, Med3p y Gal11p) que empeoran los defectos en el crecimiento causados por actividad reducida de

NC2. Así pues, la relación entre NC2 y componentes de la maquinaria de activación transcripcional parece ser muy compleja y aún se desconocen los mecanismos funcionales que relacionan a uno con los otros. Pero todos estos resultados sugieren que NC2 participaría compitiendo de manera continua y dinámica con factores positivos y que esta competición controlaría el grado de reclutamiento de la RNA pol II al promotor y el nivel de expresión génica.

La segunda parte de este trabajo se centró en la caracterización de *IWR1*, gen que se obtuvo en nuestro rastreo genómico como supresor de la deficiencia del represor NC2. *Iwr1p* se identificó inicialmente como una proteína que copurifica con casi todas las subunidades de la RNA pol II (Krogan *et al.*, 2006; Gavin *et al.*, 2006). Se detectaron interacciones entre *Iwr1p* y las subunidades Rpb1p, Rpb2p, Rpb3p, Rpb4p, Rpb5p, Rpb7p y Rpb9p en ambos trabajos. Además, en el trabajo de Gavin y colaboradores (2006), se detectaron también interacciones entre *Iwr1p* y las subunidades Rpb6p, Rpb8p y Rpb11p, mientras que en el trabajo de Krogan y colaboradores (2006) se observó que *Iwr1p* también copurificaba con el factor de inicio TFIIF y los factores de elongación Spt4p/Spt5p y Dst1p. Todos estos datos sugieren que *Iwr1p* es un componente del complejo holoenzima RNA polimerasa II.

Iwr1p es una proteína altamente conservada con un homólogo en *Drosophila melanogaster*, CG10528, que colocaliza parcialmente con la RNA pol II fosforilada y transcripcionalmente activa en cromosomas politénicos (Krogan *et al.*, 2006). El hecho de que la delección de *IWR1* sea capaz de suprimir el requerimiento de la función de NC2 para el crecimiento celular (Figura 5.1), compensando los defectos transcripcionales (Figura 5.4), apoya la relación entre *Iwr1p* y la maquinaria de transcripción básica. Como se ha comentado, el rasgo común de los supresores de NC2

identificados en éste y otros trabajos es su papel positivo en el inicio de la transcripción. La capacidad de Iwr1p de activar la transcripción cuando se fusiona a un dominio de unión a DNA heterólogo (Figura 5.11), tal y como ocurre con varias de las subunidades de la holoenzima RNA pol II (Ptashne y Gann, 1997; Balciunas *et al.*, 1999), está de acuerdo con una función temprana de Iwr1p en el proceso transcripcional. Nuestros resultados muestran que el mutante $\Delta iwr1$ no presenta defectos en elongación transcripcional (Figura 5.12).

A diferencia de otros factores generales de transcripción, la localización de Iwr1p no es exclusivamente nuclear. En este trabajo se demuestra que Iwr1p viaja entre el núcleo y el citoplasma y puede detectarse por toda la célula en condiciones de crecimiento exponencial (Figura 5.13). Iwr1p se acumula en el núcleo de células mutantes *xpo1-1* y presenta una secuencia rica en leucina (IEHIDLAL) que probablemente actúa como una secuencia de exportación nuclear (NES). La capacidad de viajar a través de la envoltura nuclear es característica de proteínas que desempeñan una función tanto nuclear como citosólica. Sin embargo, no se requiere una distribución dinámica para aquellas proteínas cuya función tiene lugar exclusivamente en el compartimento nuclear, como ocurre con los típicos factores de transcripción generales, lo que sugiere que Iwr1p debe tener funciones adicionales en la célula que requieren esta salida del núcleo. De este modo, Iwr1p podría participar en una o más rutas de transducción de señales que terminan en el núcleo. Sin embargo, aunque esta posibilidad estaría de acuerdo con el perfil transcripcional mostrado por el mutante $\Delta iwr1$, no hemos sido capaces de encontrar ninguna condición que modifique la distribución celular de Iwr1p. Además, este ir y venir de Iwr1p entre el núcleo y el citoplasma no es necesario para la inducción del gen *PHO5* en condiciones de baja concentración de fosfato (Figura 6.16). El análisis transcriptómico de la cepa que expresa la versión de Iwr1p en la que

se ha delecionado la NES revela escasas diferencias con la cepa silvestre (Tabla A.IV en Anexo), siendo remarcable el hecho de que la mayor parte de los genes cuya expresión disminuye por la deleción de la NES se inducen por la adición de rapamicina en el medio de cultivo. El papel de la translocación núcleo-citoplasma de Iwr1p en la expresión de estos genes está siendo investigado.

Aunque *IWR1* no es un gen esencial, su deleción empeora el crecimiento celular en todas las condiciones ensayadas (Figura 5.10.A). Este crecimiento deficiente es probable que esté relacionado con los defectos en transcripción génica que presenta el mutante $\Delta iwr1$. Con la finalidad de tratar de entender el papel de Iwr1p en la célula, se analizaron los efectos transcripcionales a nivel de genoma causados por la deleción del gen *IWR1*. El hallazgo más sorprendente de este análisis fue la expresión aumentada de genes que codifican proteínas mitocondriales en el mutante $\Delta iwr1$, particularmente aquellos involucrados en fosforilación oxidativa (Tablas A.I, A.II y A.III en Anexo). Aunque la mayoría de los genes implicados en la respiración aeróbica están sujetos a represión por glucosa, el perfil transcripcional del mutante $\Delta iwr1$ no muestra una sobre-expresión de otros genes reprimibles por glucosa como *SUC2*. De este modo, nuestros resultados implican a Iwr1p en la regulación de un conjunto de genes involucrados en la respiración aeróbica. La posibilidad de que el aumento en la expresión de genes implicados en respiración en el mutante *iwr1* ocasione un aumento de la actividad respiratoria, se analizó comparando el consumo de oxígeno del mutante *iwr1* con el de la cepa silvestre cuando se cultivaron las células en un medio rico con glucosa como fuente de carbono. La deleción de *IWR1* ocasiona un modesto incremento (alrededor del 20%) del consumo de oxígeno (Figura 5.7). Un aumento en la transcripción de genes nucleares que codifican componentes de la fosforilación oxidativa ya había

sido documentado para el componente del mediador Med5p (Nut1p), aunque en este caso el aumento transcripcional se da en células crecidas en medio sintético completo con glucosa, pero no en medio YPD (Béve *et al.*, 2005). Por tanto, es posible que la maquinaria básica de transcripción incluya varios componentes para coordinar la expresión génica nuclear con las necesidades respiratorias.

Además de los genes que codifican componentes de la fosforilación oxidativa, también está alterada la expresión de genes regulados por aminoácidos (*ARG1*), por fuente de carbono (*SUC2* y *GALI*) o por deficiencia de fosfato (*PHO5* y *PHO84*) en el mutante *Δiwr1*. Sin embargo, el efecto de la delección de *IWR1* en la expresión de estos genes es muy diferente. La delección de *IWR1* aumenta la expresión basal de los genes *ARG1* y *ATP16*, pero no su inducción. Por otro lado, Iwr1p participa en la inducción de los genes *SUC2*, *GALI*, *PHO5* y *PHO84*, sugiriéndose que el requerimiento de Iwr1p es específico de gen.

El papel de Iwr1p como diana de factores de transcripción específicos podría explicar la sorprendente cinética de inducción de *SUC2* que se observa en el mutante *Δiwr1* (Figura 6.2). Geng y Laurent (Geng y Laurent, 2004) describieron un modelo bifásico para la inducción transcripcional del gen *SUC2*, la primera fase de la cual está parcialmente mediada por los factores transcripcionales generales de respuesta a estrés Msn2p y Msn4p. Nuestros resultados son compatibles con un efecto de *Δiwr1* en retardar la segunda fase de inducción sin afectar la inducción temprana dependiente de Msn2p y Msn4p. De acuerdo con este modelo, observamos que la inducción del gen *HSP26*, que depende de Msn2p/4p (Amorós y Estruch, 2001), no se ve afectada por la mutación *Δiwr1* (Figura 6.4.B). Además, nuestros resultados implican a Mig1p en la fase tardía de la inducción del gen *SUC2*, ya que la desaparición transitoria del transcrito de *SUC2* a los 60 minutos de incubación en un medio pobre en glucosa no se observa en el doble mutante

Δiwr1 Δmig1 (Figura 6.2.B). Esto sugiere que Iwr1p participa en la eliminación de la represión ejercida por Mig1p. La desaparición transitoria del transcrito de *SUC2* tampoco se observa en una cepa con una delección en *HTZ1*, gen que codifica la variante de histona H2A.Z (Figura 6.3.C). La represión mediada por Mig1p requiere al corepresor Ssn6p-Tup1p (Treitel y Carlson, 1995), y Tup1p parece estar implicada en el depósito de la histona H2A.Z en el promotor de los genes *GAL1* y *SUC2* (Gligoris *et al.*, 2007). Por tanto, es posible que el complejo Mig1p-Ssn6p-Tup1p participe en el depósito de H2A.Z en el promotor del gen *SUC2*, lo cual podría tener un efecto negativo en la inducción tardía de *SUC2*, en la que Iwr1p es necesaria para eliminar esta represión. En la actualidad, nuestro grupo trabaja para determinar la presencia de todas estas proteínas en el promotor de *SUC2* a diferentes tiempos durante el proceso de activación.

Otro de los efectos causados por la delección de *IWR1* se observa en la inducción de genes de respuesta a fosfato en condiciones de deficiencia de fosfato. Nuestros resultados muestran que la ausencia de Iwr1p afecta negativamente a la inducción de los genes *PHO5* y *PHO84* (Figuras 6.5, 6.7 y 6.8). La deficiente inducción de los genes *PHO5* y *PHO84* en el mutante *Δiwr1* puede deberse a diferentes causas: i) defectos en la transducción de la señal que conduce a la activación de los genes *PHO* debida, por ejemplo, a un tasa de crecimiento lenta y, por tanto, al agotamiento más lento de la reserva de fosfato intracelular; ii) un defecto en la remodelación de la cromatina debida, por ejemplo, a la falta de cofactores que se reclutan normalmente a través de Iwr1p; iii) un reclutamiento defectuoso de la maquinaria transcripcional en el promotor de *PHO5*; o iv) una actividad defectuosa de la RNA pol II deficiente en Iwr1p para iniciar la transcripción una vez unida a las secuencias de *PHO5*. La ausencia de efecto de la mutación *iwr1* en la cinética de translocación nuclear del factor Pho4p tras la

depleción de fosfato (Figura 6.6) o la deficiente inducción de *PHO84* por pH alcalino (Figura 6.9), no apoyan que una menor tasa de crecimiento del mutante *Δiwr1* sea la causa del defecto en la inducción de los genes *PHO*. La respuesta de *PHO84* a pH alcalino también es dependiente de Pho4p y se ha sugerido que la exposición a este medio genera una situación de deficiencia de fosfato que sería la responsable de la inducción de algunos de los genes *PHO* (Serrano *et al.*, 2002). En estas condiciones, la inducción de *PHO84* es rápida, detectándose el transcrito a tiempos tan cortos como a los 25 minutos (Figura 6.9), lo que hace improbable que los defectos de inducción de los genes *PHO* observados en el mutante *Δiwr1* en condiciones de baja concentración de fosfato sean consecuencia de la menor tasa de crecimiento del mutante y de la consiguiente ralentización de la depleción de las reservas de fosfato en la célula. Por otro lado, nuestros resultados muestran un defecto en la remodelación de la cromatina del promotor de *PHO5* en ausencia de Iwr1p, con respecto a la que ocurre en la cepa silvestre cuando las células se incuban en un medio con baja concentración de fosfato (Figura 6.11). En ausencia de remodelación de la cromatina se ha descrito que el reclutamiento del factor transcripcional Pho4p a los sitios de unión de alta afinidad del promotor de *PHO5* es deficiente (Adkins *et al.*, 2007; Dhasarathy y Kladde, 2005; Barbaric *et al.*, 2007) y, en consonancia con este resultado, en el mutante *Δiwr1* hay un defecto en el reclutamiento de Pho4p (Figura 6.12.A). Como cabía esperar, en estas condiciones no se observa reclutamiento de la RNA pol II al promotor de *PHO5* (Figura 6.12.B), lo que determinaría, en última instancia, el defecto en la inducción transcripcional de este gen (Figura 6.5).

Por otra parte, nuestros resultados sugieren que Iwr1p desempeñaría un papel anterior a la formación del complejo pre-inicio (PIC) de la transcripción, que sería dependiente de la cantidad de Pho4p reclutado al promotor del gen *PHO*. Así, la mayor dependencia de Iwr1p para la

inducción de *PHO5* que para la inducción de *PHO84* podría explicarse por una mayor accesibilidad de Pho4p al promotor de *PHO84* (Springer *et al.*, 2003; Lam *et al.*, 2008). La necesidad de Iwr1p para la inducción de *PHO5* puede aliviarse parcialmente aumentando la cantidad de Pho4p (Figura 6.10.C), lo que está en concordancia recíproca con un estudio previo en el que una mayor dependencia de cofactores transcripcionales como Gcn5 o SWI/SNF se correlaciona con una mayor ocupación de Pho4p en el promotor de *PHO5* (Dhasarathy y Kladde, 2005). Aunque Iwr1p es parcial o completamente prescindible en condiciones de activación completa (como en medio carente de fosfato (Figura 6.10.A) o en el mutante *Δpho80* (Figura 6.10.B)), es esencial en condiciones intermedias de activación (como en medio deficiente en fosfato (Figura 6.10.A)). Estos resultados apoyan la fuerte influencia de Iwr1p en la vía de señalización de Pho4p al promotor de *PHO5* e indican que una vez la RNA pol II carente en Iwr1p se une al promotor es capaz de transcribir el gen *PHO5* con normalidad.

A pesar de nuestros múltiples esfuerzos, no se ha observado ningún reclutamiento específico de Iwr1p a la cromatina de sus genes diana (Figura 6.13 y 6.14). Por tanto, es posible que la asociación de Iwr1p a la RNA pol II se vea restringida a aquellos casos en que la enzima no esté asociada al DNA. De este modo, Iwr1p podría participar en regular el reclutamiento de la RNA pol II a promotores específicos, pero abandonaría a la enzima antes de la unión de ésta al DNA (Peiró-Chova y Estruch, 2009). La interacción de Iwr1p con la polimerasa no unida a cromatina estaría de acuerdo con el hecho de que sólo se consiguió recuperar una mínima fracción de la subunidad Rpb3p de la RNA pol II total cuando se inmunoprecipitó la mayor parte de la proteína de fusión Iwr1-TAP (resultados no mostrados).

Así pues, el mecanismo molecular a través del cual Iwr1p regula la participación de la RNA pol II en la activación transcripcional aún debe ser establecido, siendo éste uno de los objetivos actuales de nuestro grupo de investigación.

8.- CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se pueden extraer de este trabajo se detallan a continuación:

1. El hecho de que *rpb2t* codifique una proteína no funcional y que la supresión de la letalidad sintética entre *bur6-1* y *dbp5-2* se observe únicamente cuando *rpb2t* está presente en un plásmido multicopia sugiere una competencia entre las moléculas de Rpb2p funcionales y las moléculas truncadas que afectaría específicamente a alguna etapa del proceso transcripcional y que compensaría la excesiva tasa de transcripción del mutante *bur6*.
2. La sobre-expresión del alelo *rpb2t* en el mutante *dbp5-2* tiene un efecto positivo en la exportación de transcritos que es, probablemente, responsable de la supresión de los defectos en el crecimiento del mutante *dbp5-2* a temperatura semi-restrictiva.
3. La sobre-expresión de *rpb2t* es capaz de compensar los efectos transcripcionales globales causados por una actividad reducida de NC2, lo que sugiere que la sobre-expresión de *rpb2t* y los defectos en NC2 afectan de forma opuesta la(s) misma(s) etapa(s) del proceso de expresión génica.
4. La naturaleza de los supresores de la deficiencia en NC2 identificados en este trabajo indica que los defectos en el crecimiento de los mutantes NC2 pueden ser compensados por mutaciones en funciones que tienen un efecto positivo en la formación del complejo pre-inicio. Así pues, la función esencial de NC2 para el crecimiento resultaría de su papel como represor transcripcional.
5. Defectos en componentes de todos los módulos del Mediador son capaces de compensar la reducción de NC2, sugiriéndose que el

Mediador, como entidad, y NC2 desempeñarían globalmente funciones antagónicas.

6. Se ha identificado una interacción específica y diferente a la del resto de los componentes del Mediador entre NC2 y las proteínas Med2p, Med3p y Gal11p.
7. La delección de *IWR1* es capaz de suprimir el requerimiento de la función de NC2 para el crecimiento celular, consecuencia probable de la compensación parcial de los defectos transcripcionales.
8. La localización de Iwr1p no es estática, sino que viaja entre el núcleo y el citoplasma de manera dependiente de Xpo1p.
9. Los análisis transcriptómicos relacionan a Iwr1p con la expresión génica. Dentro de los genes cuya expresión resulta afectada por la ausencia de Iwr1p destacan los implicados en la respiración y el metabolismo del fosfato.
10. Iwr1p participa en la inducción de los genes *SUC2*, *GAL1*, *PHO5* y *PHO84*. En el caso de *SUC2*, Iwr1p altera específicamente la inducción tardía de este gen, hecho que podría ser consecuencia de su papel en la eliminación de la represión ejercida por Mig1p.
11. La función de Iwr1p se requiere para la remodelación normal de la cromatina en el promotor del gen *PHO5* que se produce en condiciones de baja concentración de fosfato en el medio, y que es necesaria para el reclutamiento del factor transcripcional Pho4p y la RNA pol II.
12. A pesar de su papel en la expresión génica, no se detecta (mediante ChIP) asociación de Iwr1p a la cromatina de sus genes diana.

9.-BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. **Adkins, M. W., Williams, S. K., Linger, J. and Tyler, J. K.** 2007. Chromatin disassembly from the *PHO5* promoter is essential for the recruitment of the general transcription machinery and coactivators. *Mol Cell Biol* **27**, 6372-6382.
2. **Ahuatzi, D., Riera, A., Peláez, R., Herrero, P. and Moreno, F.** 2007. Hxk2 regulates the phosphorylation state of Mig1 and therefore its nucleocytoplasmic distribution. *J Biol Chem* **282**, 4485-4493.
3. **Ahuatzi, D., Herrero, P., de la Cera, T. and Moreno, F.** 2003. The glucose-regulated nuclear localization of hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* is Mig1-dependent. *J Biol Chem* **279**, 14440-14446.
4. **Alberola, T. M., García-Martínez, J., Antúnez, O., Viladevall, L., Barceló, A., Ariño, J. and Pérez-Ortín, J. E.** 2004. A new set of DNA microchips for the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: features and uses. *Int Microbiol* **7**, 199-206.
5. **Allard, S., Utley, R. T., Savard, J., Clarke, A., Grant, P., Brandl, C. J., Pillus, L., Workman, J. L. and Côté, J.** 1999. NuA4, an essential transcription adaptor/histone H4 acetyltransferase complex containing Esa1p and the ATM-related cofactor Tra1p. *EMBO J* **18**, 5108-5119.
6. **Almer, A., Rudolph, H., Hinnen, A. and Hörz, W.** 1986. Removal of positioned nucleosomes from the yeast *PHO5* promoter upon *PHO5* induction releases additional upstream activating DNA elements. *EMBO J* **5**, 2689-2696.
7. **Alms, G. R., Sanz, P., Carlson, M. and Haystead, T. A.** 1999. Reg1p targets protein phosphatase 1 to dephosphorylate hexokinase II in *Saccharomyces cerevisiae*: characterizing the effects of a phosphatase subunit on the yeast proteome. *EMBO J* **18**, 4157-4168.
8. **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.
9. **Amorós, 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.
10. **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.
11. **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.
12. **Arnett, D. R., Jennings, J. L., Tabb, D. L., Link, A. J. and Weil, P. A.** 2008. A proteomics analysis of yeast Mot1p protein-protein associations: insights into mechanism. *Mol Cell Proteomics* **7**, 2090-2106.

13. **Asturias, F. J.** 2004. RNA polymerase II structure and organization of the preinitiation complex. *Curr Opin Struct Biol* **14**, 121-129.
14. **Asturias, F. J., Jiang, Y. W., Myers, L. C., Gustafsson, C. M. and Kornberg, R. D.** 1999. Conserved structures of mediator and RNA polymerase II holoenzyme. *Science* **283**, 985-987.
15. **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.
16. **Auble, D. T. and Hahn, S.** 1993. An ATP-dependent inhibitor of TBP binding to DNA. *Genes Dev* **7**, 844-856.
17. **Bäckström, S., Elfving, N., Nilsson, R., Wingsle, G. and Björklund, S.** 2007. Purification of a plant mediator from *Arabidopsis thaliana* identifies PFT1 as the Med25 subunit. *Mol Cell* **26**, 717-729.
18. **Balciunas, D., Galman, C., Ronne, H. and Björklund, S.** 1999. The Med1 subunit of the yeast mediator complex is involved in both transcriptional activation and repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 376-381.
19. **Barbaric, S., Luckenbach, T., Schmid, A., Blaschke, D., Hörz, W. and Korber, P.** 2007. Redundancy of chromatin remodeling pathways for the induction of the yeast *PHO5* promoter *in vivo*. *J Biol Chem* **282**, 27610-27621.
20. **Barbaric, S., Reinke, H. and Hörz, W.** 2003. Multiple mechanistically distinct functions of SAGA at the *PHO5* promoter. *Mol Cell Biol* **23**, 3468-3476.
21. **Barbaric, S., Walker, J., Schmid, A., Svejstrup, J. Q. and Hörz, W.** 2001. Increasing the rate of chromatin remodeling and gene activation—a novel role for the histone acetyltransferase Gcn5. *EMBO J* **20**, 4944-4951.
22. **Barbaric, S., Münsterkötter, M., Svaren, J., and Hörz, W.** 1996. The homeodomain protein Pho2 and the basic-helix-loop-helix protein Pho4 bind DNA cooperatively at the yeast *PHO5* promoter. *Nucleic Acids Res* **24**, 4479-4486.
23. **Bartel, P. L. and Fields, S.** 1995. Analyzing protein-protein interactions using two-hybrid system. *Methods Enzymol* **254**, 241-263.
24. **Bartolomei, M. S., Halden, N. F., Cullen, C. R. and Corden, J. L.** 1988. Genetic analysis of the repetitive carboxyl-terminal domain of the largest subunit of mouse RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* **8**, 330-339.
25. **Belinchón, M. M. and Gancedo J. M.** 2007. Different signalling pathways mediate glucose induction of *SUC2*, *HXT1* and pyruvate decarboxylase in yeast. *FEMS Yeast Res* **7**, 40-47.
26. **Bellí, G., Garí, E., Aldea, M. and Herrero, E.** 1998. Functional analysis of yeast essential genes using a promoter-substitution cassette and the tetracycline-regulatable dual expression system. *Yeast* **14**, 1127-1138.

27. **Berrix, G. F., King O. D., Bryant, B., Sander, C. and Roth, F. P.** 2003. Characterizing gene sets with FuncAssociate. *Bioinformatics* **19**, 2502-2504.
28. **Béve, J., Hu, G. Z., Myers, L. C., Balciunas, D., Werngren, O., Hultenby, K., Wibom, R., Ronne, H. and Gustafsson, C. M.** 2005. The structural and functional role of Med5 in the yeast Mediator tail module. *J Biol Chem* **280**, 41366-41372.
29. **Bhoite, L. T., Yu, Y. and Stillman, D. J.** 2001. The Swi5 activator recruits the Mediator complex to the HO promoter without RNA polymerase II. *Genes Dev* **15**, 2457-2469.
30. **Biddick, R. and Young, E. T.** 2005. Yeast mediator and its role in transcriptional regulation. *C R Biol* **328**, 773-782.
31. **Björklund, S. and Gustafsson, C. M.** 2005. The yeast Mediator complex and its regulation. *Trends Biochem Sci* **30**, 240-244.
32. **Björklund, S., Buzaitė, O. and Hallberg, M.** 2001. The yeast mediator. *Mol Cells* **11**, 129-136.
33. **Boeger, H., Griesenbeck, J., Strattan, J. S. and Kornberg, R. D.** 2004. Removal of promoter nucleosomes by disassembly rather than sliding *in vivo*. *Mol Cell* **14**, 667-73.
34. **Borggreffe, T., Davis, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Kornberg, R. D.** 2002. A complex of the Srb8, -9, -10, and -11 transcriptional regulatory proteins from yeast. *J Biol Chem* **277**, 44202-44207.
35. **Boube, M., Joulia, L., Cribbs, D. L. and Bourbon, H. M.** 2002. Evidence for a mediator of RNA polymerase transcriptional regulation conserved from yeast to man. *Cell* **110**, 143-151.
36. **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.
37. **Breathnach, R. and Chambon, P.** 1981. Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins. *Annu Rev Biochem* **50**, 349-383.
38. **Bryant, G. O. and Ptashne, M.** 2003. Independent recruitment *in vivo* by Gal4 of two complexes required for transcription. *Mol Cell* **11**, 1301-1309.
39. **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.
40. **Burns, N., Grimwade, B., Ross-Macdonald, P. B., Choi, E. Y., Finberg, K., Roeder, G. S. and Snyder, M.** 1994. Large-scale analysis of gene expression, protein localization, and gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **8**, 1087-1105.
41. **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.

42. **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.
43. **Cantin, G. T., Stevens, J. L. and Berk, A. J.** 2003. Activation domain-mediator interactions promote transcription preinitiation complex assembly on promoter DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12003-12008.
44. **Carlson, M.** 1998. Regulation of glucose utilization in yeast. *Curr Opin Genet Dev* **8**, 560-564.
45. **Carlson, M.** 1997. Genetics of transcriptional regulation in yeast: connections to the RNA polymerase II CTD. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 1-23.
46. **Carlson, M. and Botstein, D.** 1982. Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted with intracellular forms of yeast invertase. *Cell* **28**, 145-154.
47. **Casamassimi, A. and Napoli, C.** 2007. Mediator complexes and eukaryotic transcription regulation: an overview. *Biochimie* **89**, 1439-1446.
48. **Cavalli, G. and Thoma, F.** 1993. Chromatin transitions during activation and repression of galactose-regulated genes in yeast. *EMBO J* **12**, 4603-4613.
49. **Chadick, J. Z. and Asturias, F. J.** 2005. Structure of eukaryotic Mediator complexes. *Trends Biochem Sci* **30**, 264-271.
50. **Chen, B. S. and Hampsey, M.** 2004. Functional interaction between TFIIB and the Rpb2 subunit of RNA polymerase II: implications for the mechanism of transcription initiation. *Mol Cell Biol* **24**, 3983-3991.
51. **Chen, H. T., Warfield, L. and Hahn, S.** 2007. The positions of TFIIF and TFIIE in the RNA polymerase II transcription preinitiation complex. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 696-703.
52. **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.
53. **Chitikila, C., Huisinga, K. L., Irvin, J. D., Basehoar, A. D. and Pugh, B. F.** 2002. Interplay of TBP inhibitors in global transcriptional control. *Mol Cell* **10**, 871-882.
54. **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.
55. **Cole, C. N.** 2000. mRNA export: the long and winding road. *Nat Cell Biol* **2**, E55-58.
56. **Collart, M. A.** 1996. The *NOT*, *SPT3* and *MOT1* genes functionally interact to regulate transcription at core promoters. *Mol Cell Biol* **16**, 6668-6676.

57. **Collins, S. R., Miller, K. M., Maas, N. L., Roguev, A., Fillingham, J., Chu, C. S., Schuldiner, M., Gebbia, M., Recht, J., Shales, M., Ding, H., Xu, H., Han, J., Ingvarsdottir, K., Cheng, B., Andrews, B., Boone, C., Berger, S. L., Hieter, P., Zhang, Z., Brown, G. W., Ingles, C. J., Emili, A., Allis, C. D., Toczyski, D. P., Weissman, J. S., Greenblatt, J. F. and Krogan, N. J.** 2007. Functional dissection of protein complexes involved in yeast chromosome biology using a genetic interaction map. *Nature* **446**, 806-810.
58. **Conti, E. and Izaurralde, E.** 2001. Nucleocytoplasmic transport enters the atomic age. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 310-319.
59. **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 USA* **82**, 7934-7938.
60. **Cosgrove, M. S., Boeke, J. D. and Wolberger, C.** 2004. Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 1037-1043.
61. **Cosma, M. P., Tanaka, T. and Nasmyth, K.** 1999. Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle and developmentally regulated promoter. *Cell* **97**, 299-311.
62. **Crabeel, M., de Rijcke, M., Seneca, S., Heimberg, H., Pfeiffer, I. and Matisova, A.** 1995. Further definition of the sequence and position requirements of the arginine control element that mediates repression and induction by arginine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **11**, 1367-1380.
63. **Crabeel, M., Lavallo, R. and Glansdorff, N.** 1990. Arginine-specific repression in *Saccharomyces cerevisiae*: kinetic data on *ARG1* and *ARG3* mRNA transcription and stability support a transcriptional control mechanism. *Mol Cell Biol* **10**, 1226-1233.
64. **Cramer, P.** 2004. RNA polymerase II structure: from core to functional complexes. *Curr Opin Genet Dev* **14**, 218-226.
65. **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.
66. **Cramer, P., Bushnell, D. A., Fu, J., Gnatt, A. L., Maier-Davis, B., Thompson, M. 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.
67. **Cui, Y. and Denis, C. L.** 2003. *In vivo* evidence that defects in the transcriptional elongation factors RPB2, TFIIS, and SPT5 enhance upstream poly(A) site utilization. *Mol Cell Biol* **23**, 7887-7901.

68. **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.
69. **Dasgupta, A., Darst, R. P., Martin, K. J., Afshari, C. A. and Auble, D. T.** 2002. Mot1 activates and represses transcription by direct, ATPase-dependent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2666-2671.
70. **Davis, J. A., Takagi, Y., Kornberg, R. D. and Asturias, F. A.** 2002. Structure of the yeast polymerase II holoenzyme: Mediator conformation and polymerase interaction. *Mol Cell* **10**, 409-415.
71. **Davis, C. A., Grate, L., Spingola, M. and Ares, M. Jr.** 2000. Test of intron predictions reveals novel splice sites, alternatively spliced mRNAs and new introns in meiotically regulated genes of yeast. *Nucleic Acids Res* **28**, 1700-1706.
72. **de la Cruz, J., Kressler, D. and Linder, P.** 1999. Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *Trends Biochem Sci* **24**, 192-198.
73. **De Vit, M. J., Waddle, J. A. and Johnston, M.** 1997. Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. *Mol Biol Cell* **8**, 1603-1618.
74. **Dhasarathy, A. and Kladde, M. P.** 2005. Promoter occupancy is a major determinant of chromatin remodeling enzyme requirements. *Mol Cell Biol* **25**, 2698-2707.
75. **Dreyfuss, G., Matunis, M. J., Piñol-Roma, S. and Burd, C. G.** 1993. hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem* **62**, 289-321.
76. **Edmondson, D. G., Smith, M. M. and Roth, S. Y.** 1996. Repression domain of the yeast global repressor Tup1 interacts directly with histones H3 and H4. *Genes Dev* **10**, 1247-1259.
77. **Esnault, C., Ghavi-Helm, Y., Brun, S., Soutourina, J., van Berkum, N., Boschiero, C., Holstege, F. and Werner, M.** 2008. Mediator-dependent recruitment of TFIIH modules in preinitiation complex. *Mol Cell* **31**, 337-346.
78. **Estojak, J., Brent, R. and Golemis E.A.** 1995. Correlation of two-hybrid affinity data with *in vitro* measurements. *Mol Cell Biol* **15**, 5820-5829.
79. **Estruch, F. and Cole, C. N.** 2003. An early function during transcription for the yeast mRNA export factor Dbp5p/Rat8p suggested by its genetic and physical interactions with transcription factor IIH components. *Mol Biol Cell* **14**, 1664-1676.
80. **Feaver, W. J., Svejstrup, J. Q., Henry, N. L. and Kornberg, R. D.** 1994. Relationship of Cdk-activating kinase and RNA polymerase II CTD kinase TFIIH/TFIK. *Cell* **79**, 1103-1109.

81. **Feaver, W. J., Svejstrup, J. Q., Bardwell, L., Bardwell, A. J., Buratowski, S., Gulyas, K. D., Donahue, T. F., Friedberg, E. C. and Kornberg, R. D.** 1993. Dual roles of a multiprotein complex from *S. cerevisiae* in transcription and DNA repair. *Cell* **75**, 1379-1387.
82. **Fedor, M.J. and Kornberg, R. D.** 1989. Upstream activation sequence-dependent alteration of chromatin structure and transcription activation of the yeast *GAL1-GAL10* genes. *Mol Cell Biol* **9**, 1721-1732.
83. **Flanagan, P. M., Kelleher, R. J. 3rd, Sayre, M. H., Tschochner, H. and Kornberg, R. D.** 1991. A mediator required for activation of RNA polymerase II transcription *in vitro*. *Nature* **350**, 436-438.
84. **Flores, O., Lu, H. and Reinberg, D.** 1992. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. Identification and characterization of factor IIF. *J Biol Chem* **267**, 2786-2793.
85. **Flores, O., Lu, H., Killeen, M., Greenblatt, J., Burton, Z. F. and Reinberg, R. D.** 1991. The small subunit of transcription factor IIF recruits RNA polymerase II into the preinitiation complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9999-10003.
86. **Flores, O., Maldonado, E. and Reinberg, D.** 1989. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. Factors IIE and IIF independently interact with RNA polymerase II. *J Biol Chem* **264**, 8913-8921.
87. **Forsburg, S. L. and Guarente, L.** 1989. Identification and characterization of HAP4: a third component of the CCAAT-bound HAP2/HAP3 heteromer. *Genes Dev* **3**, 1166-1178.
88. **Fujiwara, T., Tanaka, K., Mino, A., Kikyo, M., Takahashi, K., Shimizu, K. and Takai, Y.** 1998. Rho1p-Bni1p-Spa2p interactions: implication in localization of Bni1p at the bud site and regulation of the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **9**, 1221-1233.
89. **Gadbois, E. L., Chao, D. M., Reese, J. C., Green, M. R. and Young, R. A.** 1997. Functional antagonism between RNA polymerase II holoenzyme and global negative regulator NC2 *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3145-3150.
90. **Ganem, C., Devaux, F., Torchet, C., Jacq, C., Quevillon-Cheruel, S., Labesse, G., Facca, C. and Faye, G.** 2003. Ssu72 is a phosphatase essential for transcription termination of snoRNAs and specific mRNAs in yeast. *EMBO J* **22**, 1588-1598.
91. **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.

92. **Gavin, A. C., Aloy, P., Grandi, P., Krause, R., Boesche, M., Marzioch, M., Rau, C., Jensen, L. J., Bastuck, S., Dumpelfeld, B., Edlmann, A., Heurtier, M. A., Hoffman, V., Hoefert, C., Klein, K., Hudak, M., Michon, A. M., Schelder, M., Schirle, M., Remor, M., Rudi, T., Hooper, S., Bauer, A., Bouwmeester, T., Casari, G., Drewes, G., Neubauer, G., Rick, J. M., Kuster, B., Bork, P., Russell, R. B. and Superti-Furga, G.** 2006. Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature* **440**, 631-636.
93. **Ge, H., Martinez, E, Chiang, C. M. and Roeder, R. G.** 1996. Activator-dependent transcription by mammalian RNA polymerase II: *in vitro* reconstitution with general transcription factors and cofactors. *Methods Enzymol* **274**, 57-71.
94. **Geisberg, J. V. and Struhl, K.** 2004. Cellular stress alters the transcriptional properties of promoter-bound Mot1-TBP complexes. *Mol Cell* **14**, 479-489.
95. **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.
96. **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.
97. **Geng, F. and Laurent, B. C.** 2004. Roles of SWI/SNF and HATs throughout the dynamic transcription of a yeast glucose-repressible gene. *EMBO J* **23**, 127-137.
98. **Ghazy N. A., Brodie, S. A., Ammerman, M. L., Ziegler, L. M. and Ponticelli, A. S.** 2004. Amino acid substitutions in yeast TFIIF confer upstream shifts in transcription initiation and altered interaction with RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* **24**, 10975-10985.
99. **Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, A. R. and Woods, R. A.** 1995. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* **11**, 355-360.
100. **Gietz, R. D. and Sugino, A.** 1988. New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **74**, 527-534.
101. **Gileadi, O., Feaver, W. J and Kornberg, R. D.** 1992. Cloning of a subunit of yeast RNA polymerase II transcription factor b and CTD kinase. *Science* **257**, 1389-1392.
102. **Gligoris, T., Thireos, G. and Tzamarias, D.** 2007. The Tup1 corepressor directs Htz1 deposition at a specific promoter nucleosome marking the *GALI* gene for rapid activation. *Mol Cell Biol* **27**, 4198-4205.
103. **Goppelt, A., Stelzer, G., Lottspeich, F. and Meisterernst, M.** 1996. A mechanism for repression of class II gene transcription through specific binding of NC2 to TBP-promoter complexes via heterodimeric histone fold domains. *EMBO J* **15**, 3105-3116.

104. **Goppelt, A. and Meisterernst, M.** 1996. Characterization of the basal inhibitor of class II transcription NC2 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **24**, 4450-4455.
105. **Hahn, S.** 2004. Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 394-403.
106. **Hampsey, M.** 1998. Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 465-503.
107. **Han, M. and Grunstein, M.** 1988. Nucleosome loss activates yeast downstream promoters *in vivo*. *Cell* **55**, 1137-1145.
108. **Henry, N. L., Campbell, A. M., Feaver, W. J., Poon, D., Well, P. A. and Kornberg, R. D.** 1994. TFIIF-TAF-RNA polymerase II connection. *Genes Dev* **8**, 2868-2878.
109. **Henry, N. L., Sayre, M. H. and Kornberg, R. D.** 1992. Purification and characterization of yeast RNA polymerase II general initiation factor g. *J Biol Chem* **267**, 23388-23392.
110. **Herr, A. J., Jensen, M. B. Dalmay, T. and Baulcombe, D. C.** 2005. RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. *Science* **308**, 118-120.
111. **Hinnebusch, A. G.** 1988. Mechanisms of gene regulation in the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **52**, 248-273.
112. **Hochheimer, A. and Tjian, R.** 2003. Diversified transcription initiation complexes expand promoter selectivity and tissue-specific gene expression. *Genes Dev* **17**, 1309-1320.
113. **Hodge, C. A., Colot, H. V., Stafford, P. and Cole, C. N.** 1999. Rat8p/Dbp5p is a shuttling transport factor that interacts with Rat7p/Nup159p and Gle1p and suppresses the mRNA export defect of *xpo1-1* cells. *EMBO J* **18**, 5778-5788.
114. **Hou, S. Y., Wu, S. Y., Zhou, T., Thomas, M. C. and Chiang, C. M.** 2000. Alleviation of human papillomavirus E2-mediated transcriptional repression via formation of a TATA binding protein (or TFIID)-TFIIB-RNA polymerase II-TFIIF preinitiation complex. *Mol Cell Biol* **20**, 113-125.
115. **Houseley, J., Rubbi, L., Grunstein, M., Tollervey, D. and Vogelauer, M.** 2008. A ncRNA modulates histone modification and mRNA induction in the yeast *GAL* gene cluster. *Mol Cell* **32**, 685-95.
116. **Huisinga, K. L. and Pugh, B. F.** 2007. A TATA binding protein regulatory network that governs transcription complex assembly. *Genome Biol* **8**, R46.
117. **Inostroza, J. A., Mermelstein, F. H., Ha, L., Lane, W. S and Reinberg, D.** 1992. Dr1, a TATA-binding protein-associated phosphoprotein and inhibitor of class II gene transcription. *Cell* **70**, 477-489.
118. **Jenuwein, T. and Allis, C. D.** 2001. Translating the histone code. *Science* **293**, 1074-1080.
119. **Johnson, K. M. and Carey, M.** 2003. Assembly of a mediator/TFIID/TFIIA complex bypasses the need for an activator. *Curr Biol* **13**, 772-777.

120. **Johnston, M.** 1987. A model fungal gene regulatory mechanism: the *GAL* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **51**, 458-76.
121. **Kaffman, A., Herskowitz, I., Tjian, R. and O'Shea, E. K.** 1994. Phosphorylation of the transcription factor PHO4 by a cyclin-CDK complex, PHO80-PHO85. *Science* **263**, 1153-6.
122. **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.
123. **Kang, J. S., Kim, S. H., Hwang, M. S., Han, S. J., Lee, Y. C. and Kim, Y. J.** 2001. The structural and functional organization of the yeast mediator complex. *J Biol Chem* **276**, 42003-42010.
124. **Kanno, T., Huettel, B., Mette, M. F., Aufsatz, W., Jaligot, E., Daxinger, L., Kreil, D. P., Matzke, M. and Matzke A. J. M.** 2005. Atypical RNA polymerase subunits required for RNA-directed DNA methylation. *Nature Genetics* **37**, 761-765.
125. **Kelleher, R. J. 3rd, Flanagan, P. M. and Kornberg, R. D.** 1990. A novel mediator between activator proteins and the RNA polymerase II transcription apparatus. *Cell* **61**, 1209-1215.
126. **Kim, S., Cabane, K., Hampsey, M. and Reinberg, D.** 2000. Genetic analysis of the YDR1-BUR6 repressor complex reveals an intricate balance among transcriptional regulatory proteins in yeast. *Mol Cell Biol* **20**, 2455-2465.
127. **Kim, S., Na, J. G., Hampsey, M. and Reinberg, D.** 1997. The Dr1/DRAP1 heterodimer is a global repressor of transcription *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 820-825.
128. **Kim, Y. J., Björklund, S., Li, Y., Sayre, M. H. and Kornberg, R. D.** 1994. A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell* **77**, 599-608.
129. **Koh, S. S., Ansari, A. Z., Ptashne, M. and Young, R. A.** 1998. An activator target in the RNA polymerase II holoenzyme. *Mol Cell* **1**, 895-904.
130. **Kokubo, T., Swanson, M. J., Nishikawa, J. L., Hinnebusch, A. G. and Nakatani, Y.** 1998. The yeast TAF145 inhibitory domain and TFIIA competitively bind to TATA-binding protein. *Mol Cell Biol* **18**, 1003-1012.
131. **Koleske, A. J. and Young, R. A.** 1994. Regulation of TATA-binding protein dynamics in living yeast cells. *Nature* **368**, 466-469.
132. **Koleske, A. J., Buratowski, S., Nonet, M. and Young, R. A.** 1992. A novel transcription factor reveals a functional link between the RNA polymerase II CTD and TFIIID. *Cell* **69**, 883-894.
133. **Komeili, A. and O'Shea, E. K.** 1999. Roles of phosphorylation sites in regulating activity of the transcription factor Pho4. *Science* **284**, 977-980.

134. **Korber, P., Barbaric, S., Luckenbach, T., Schmid, A., Schermer, U. J., Blaschke, D. and Hörz, W.** 2006. The histone chaperone Asf1 increases the rate of histone eviction at the yeast *PHO5* and *PHO8* promoters. *J Biol Chem* **281**, 5539-5545.
135. **Koyama, H., Ito, T., Nakanishi, T. and Sekimizu, K.** 2007. Stimulation of RNA polymerase II transcript cleavage activity contributes to maintain transcriptional fidelity in yeast. *Genes Cells* **12**, 547-559.
136. **Kravchenko, J. E., Rogozin, I. B., Koonin, E. V. and Chumakov, P. M.** 2005. Transcription of mammalian messenger RNAs by a nuclear RNA polymerase of mitochondrial origin. *Nature* **436**, 735-739.
137. **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.
138. **Krogan, N. J., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., Guo, X., Ignatchenko, A., Li, J., Pu, S., Datta, N., Tikuisis, A. P., Punna, T., Peregrin-Alvarez, J. M., Shales, M., Zhang, X., Davey, M., Robinson, M. D., Paccanaro, A., Bray, J. E., Sheung, A., Beattie, B., Richards, D. P., Canadien, V., Lalev, A., Mena, F., Wong, P., Starostine, A., Canete, M. M., Vlasblom, J., Wu, S., Orsi, C., Collins, S. R., Chandran, S., Haw, R., Rilstone, J. J., Gandi, K., Thompson, N. j., Musso, G., St Onge, P., Ghanny, S., Lam, M. H., Butland, G., Altaf-Ul, A. M., Kanaya, S., Shilatifard, A., O'Shea, E., Weissman, J. S., Ingles, C. J., Hughes, T.R., Parkinson, J., Gerstein, M., Wodak, S. J., Emili, A. and Greenblatt, J. F.** 2006. Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **440**, 637-643.
139. **Lam, F. H., Steger, D. J. and O'Shea, E. K.** 2008. Chromatin decouples promoter threshold from dynamic range. *Nature* **453**, 246-250.
140. **Larivière, L., Seizl, M., van Wageningen, S., Röther, S., van de Pasch, L., Feldmann, H., Strässer, K., Hahn, S., Holstege, F. C. and Cramer, P.** 2008 Structure-system correlation identifies a gene regulatory Mediator submodule. *Genes Dev* **22**, 872-877.
141. **Larivière, L., Geiger, S., Hoepfner, S., Röther, S., Strässer, K. and Cramer, P.** 2006. Structure and TBP binding of the Mediator head subcomplex Med8-Med18-Med20. *Nat Struct Mol Biol* **13**, 895-901.
142. **Lee, T. I. and Young, R. A.** 2000. Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu Rev Genet* **34**, 77-137.
143. **Lee, T. I., Causton, H. C., Holstege, F. C. P., Shen, W. C., Hannett, N., Jennings, E. G., Winston, F., Green, M. R. and Young, R. A.** 2000. Redundant roles for the TFIID and SAGA complexes in global transcription. *Nature* **405**, 701-704.

144. **Lee, T. I., Wyrick, J. J., Koh, S. S., Jennings, E. G., Gadbois, E. L. and Young, R. A.** 1998. Interplay of positive and negative regulators in transcription initiation by RNA polymerase II holoenzyme. *Mol Cell Biol* **18**, 4455-4462.
145. **Lee, Y. C. and Kim, Y. J.** 1998. Requirement for a functional interaction between mediator components Med6 and Srb4 in RNA polymerase II transcription. *Mol Cell Biol* **18**, 5364-5370.
146. **Lemaire, M., Xie, J., Meisterernst, M. and Collart, M. A.** 2000. The NC2 repressor is dispensable in yeast mutated for the Sin4p component of the holoenzyme and plays roles similar to Mot1p *in vivo*. *Mol Microbiol* **36**, 163-173.
147. **Lewis, B. A. and Reinberg, D.** 2003. The mediator coactivator complex: functional and physical roles in transcriptional regulation. *J Cell Sci* **116**, 3667-3675.
148. **Li, X. Y., Virbasius, A., Zhu, X. and Green, M. R.** 1999. Enhancement of TBP binding by activators and general transcription factors. *Nature* **399**, 605-609.
149. **Liu Q., Gabriel, S. E., Roinick, K. L., Ward, R. D. and Arndt, K. M.** 1999. Analysis of TFIIA function *In vivo*: evidence for a role in TATA-binding protein recruitment and gene-specific activation. *Mol Cell Biol* **19**, 8673-8675.
150. **Livak, K. J. and Schmittgen, T. D.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408.
151. **Lohr, D.** 1997. Nucleosome transactions on the promoters of the yeast *GAL* and *PHO* genes. *J Biol Chem* **272**, 26795-26798.
152. **Lohr, D., Venkov, P. and Zlatanova, J.** 1995. Transcriptional regulation in the yeast *GAL* gene family: a complex genetic network. *FASEB J* **9**, 777-787.
153. **Lohr, D.** 1993. Chromatin structure and regulation of the eukaryotic regulatory gene *GAL80*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10628-10632.
154. **Lohr, D.** 1984. Organization of the *GAL1-GAL10* intergenic control region chromatin. *Nucleic Acids Res* **12**, 8457-8474.
155. **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.
156. **Magbanua, J. P., Ogawa, N., Harashima, S. and Oshima, Y.** 1997. The transcriptional activators of the PHO regulon, Pho4p and Pho2p, interact directly with each other and with components of the basal transcription machinery in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem* **121**, 1181-1189.
157. **Malik, S. and Roeder, R. G.** 2005. Dynamic regulation of pol II transcription by the mammalian Mediator complex. *Trends Biochem Sci* **30**, 256-263.

158. **Malik, S. and Roeder, R. G.** 2000. Transcriptional regulation through Mediator-like coactivators in yeast and metazoan cells. *Trends Biochem Sci* **25**, 277-283.
159. **Maniatis, T. and Reed, R.** 2002. An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* **416**, 499-506.
160. **Martínez, E., Zhou, Q., L'Etoile, N. D., Oelgeschlager, T., Berk, A. J. and Roeder, R. G.** 1995. Core promoter-specific function of a mutant transcription factor TFIID defective in TATA-box binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11864-11868.
161. **Martínez-Pastor, M. T., Marchler, G., Schuller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H. and Estruch, F.** 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J* **15**, 2227-2235.
162. **Matsui, T., Segall, J., Weil, P. A. and Roeder, R. G.** 1980. Multiple factors required for accurate initiation of transcription by purified RNA polymerase II. *J Biol Chem* **255**, 11992-11996.
163. **Meinhart, A., Kamenski, T., Hoepfner, S., Baumli, S. and Cramer, P.** 2005. A structural perspective of CTD function. *Genes Dev* **19**, 1401-1415.
164. **Meisterernst, M. and Roeder, R. G.** 1991. Family of proteins that interact with TFIID and regulate promoter activity. *Cell* **67**, 557-567.
165. **Mellor, J.** 2005. The dynamics of chromatin remodeling at promoters. *Mol Cell* **19**, 147-157.
166. **Mermelstein, F., Yeung, K., Cao, J., Inostroza, J. A., Erdjument-Bromage, H., Egelson, K., Landsman, D., Levitt, P., Tempst, P. and Reinberg, D.** 1996. Requirement of a corepressor for Dr1-mediated repression of transcription. *Genes Dev* **10**, 1033-1048.
167. **Mizuguchi, G., Shen, X., Landry, J., Wu, W. H., Sen, S. and Wu, C.** 2004. ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* **303**, 343-348.
168. **Mnaimneh, S., Davierwala, A. P., Haynes, J., Moffat, J., Peng, W. T., Zhang, W., Yang, X., Pootoolal, J., Chua, G., Lopez, A., Trochesset, M., Morse, D., Krogan, N. J., Hiley, S. L., Li, Z., Morris, Q., Grigull, J., Mitsakakis, N., Roberts, C. J., Greenblatt, J. F., Boone, C., Kaiser, C. A., Andrews, B. J. and Hughes, T. R.** 2004. Exploration of essential gene functions via titratable promoter alleles. *Cell* **118**, 31-44.
169. **Moreno, F. and Herrero, P.** 2002. The hexokinase 2-dependent glucose signal transduction pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **26**, 83-90.
170. **Moretti, P., Freeman, K., Coodly, L. and Shore, D.** 1994. Evidence that a complex of SIR proteins interacts with the silencer and telomere-binding protein RAP1. *Genes Dev* **8**, 2257-2269.

171. **Morillo-Huesca, M., Vanti, M. and Chávez, S.** 2006. A simple *in vivo* assay for measuring the efficiency of gene length-dependent processes in yeast mRNA biogenesis. *FEBS J* **273**, 756-769.
172. **Myers, L.C. and Kornberg, R. D.** 2000. Mediator of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem* **69**, 729- 749.
173. **Myers, L. C., Gustafsson, C. M., Bushnell, D. A., Lui, M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Kornberg, R. D.** 1998. The Med proteins of yeast and their function through the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev* **12**, 45-54.
174. **Narlikar, G. J., Fan, H. Y. and Kingston, R. E.** 2002. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* **108**, 475-487.
175. **Nasmyth, K. A. and Reed, S. I.** 1980. Isolation of genes by complementation in yeast: molecular cloning of a cell-cycle gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **4**, 2119-2123.
176. **Natarajan, K., Meyer, M. R., Jackson, B. M., Slade, D., Roberts, C., Hinnebusch, A. G. and Marton, M. J.** 2001. Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol Cell Biol* **21**, 4347-4368.
177. **Nehlin, J. O. and Ronne, H.** 1990. Yeast *MIG1* repressor is related to the mammalian early growth response Wilms' tumour finger proteins. *EMBO J* **9**, 2891-2898.
178. **Nesser, N. K., Peterson, D. O. and Hawley, D. K.** 2006. RNA polymerase II subunit Rpb9 is important for transcriptional fidelity *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 3268-3273.
179. **Nonet, M. L. and Young, R. A.** 1989. Intragenic and extragenic suppressors of mutations in the heptapeptide repeat domain of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase II. *Genetics* **123**, 715-724.
180. **Nonet, M., Sweetser, D. and Young, R. A.** 1987. Functional redundancy and structural polymorphism in the large subunit of RNA polymerase II. *Cell* **50**, 909-915.
181. **Oelgeschlager, T., Chiang, C. M. and Roeder, R. G.** 1996. Topology and reorganization of a human TFIID-promoter complex. *Nature* **382**, 735-738.
182. **Ogawa, N., DeRisi, J. and Brown, P. O.** 2000. New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis. *Mol Biol Cell* **11**, 4309-4321.
183. **Ogawa, N., Noguchi, K., Sawai, H., Yamashita, Y., Yompakdee, C. and Oshima, Y.** 1995. Functional domains of Pho81p, an inhibitor of Pho85p protein kinase, in the transduction pathway of Pi signals in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **15**, 997-1004.

184. **O'Neill, E. M., Kaffman, A., Jolly, E. R. and O'Shea, E. K.** 1996. Regulation of PHO4 nuclear localization by the PHO80-PHO85 cyclin-CDK complex. *Science* **271**, 209-212.
185. **Onodera, Y., Haag, J. R., Ream, T., Nunes, P. C., Pontes, O. and Pikaard C. S.** 2005. Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation. *Cell* **120**, 613-622.
186. **Orphanides, G. and Reinberg, D.** 2002. A unified theory of gene expression. *Cell* **108**, 439-451.
187. **Orphanides, G., Lagrange, T. and Reinberg, D.** 1996. The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev* **10**, 2657-2683.
188. **Oshima, Y.** 1997. The phosphatase system in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Genet Syst* **72**, 323-334.
189. **Ozer, J., Mitsouras, K., Zerby, D., Carey, M. and Lieberman, P. M.** 1998. Transcription factor IIA derepresses TATA-binding protein (TBP)-associated factor inhibition of TBP-DNA binding. *J Biol Chem* **273**, 14293-14300.
190. **Pappas, D. L. Jr. and Hampsey, M.** 2000. Functional interaction between Ssu72 and the Rpb2 subunit of RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **20**, 8343-8351.
191. **Patikoglou, G. A., Kim, J. L., Sun, L., Yang, S. H., Kodadek, T. and Burley, S. K.** 1999. TATA element recognition by the TATA box-binding protein has been conserved throughout evolution. *Genes Dev* **13**, 3217-3230.
192. **Peiró-Chova, L. and Estruch, F.** 2009. The yeast RNA polymerase II-associated factor Iwr1p is involved in the basal and regulated transcription of specific genes. *J Biol Chem* **284**, 28958-28967.
193. **Peiró-Chova, L. and Estruch, F.** 2007. Specific defects in different transcription complexes compensate for the requirement of the negative cofactor 2 repressor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **176**, 125-138.
194. **Peláez, R., Herrero, P. and Moreno, F.** Nuclear export of the yeast hexokinase 2 protein requires the Xpo1 (Crm1)-dependent pathway. *J Biol Chem* **284**, 20548-20555.
195. **Pereira, L. A., Klejman, M. P. and Timmers, H. T.** 2003. Roles for BTAFl and Mot1p in dynamics of TATA-binding protein and regulation of RNA polymerase II transcription. *Gene* **315**, 1-13.
196. **Pérez-Ortín, J. E., Estruch, F., Matallana, E. and Franco, L.** 1987. Fine analysis of the chromatin structure of the yeast *SUC2* gene and of its changes upon derepression. Comparison between the chromosomal and plasmid-inserted genes. *Nucleic Acids Res* **15**, 6937-6956.
197. **Pillai, B., Sampath, V., Sharma, N. and Sadhale, P.** 2001. Rpb4, a non-essential subunit of core RNA polymerase II of *Saccharomyces cerevisiae* is important for activated transcription of a subset of genes. *J Biol Chem* **276**, 30641-30647.

198. **Pollard, K. J. and Peterson, C. L.** 1997. Role for ADA/GCN5 products in antagonizing chromatin-mediated transcriptional repression. *Mol Cell Biol* **17**, 6212-6222.
199. **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.
200. **Proudfoot N. J., Furger, A. and Dye, M. J.** 2002. Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* **108**, 501-512.
201. **Ptashne, M. and Gann, A.** 1997. Transcriptional activation by recruitment. *Nature* **386**, 569-577.
202. **Pugh, B. F.** 2000. Control of gene expression through regulation of the TATA-binding protein. *Gene* **255**, 1-14.
203. **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.
204. **Ranish, J. A., Hahn, S., Lu, Y., Yi, E. C., Li, X. J., Eng, J. and Aebersold, R.** 2004. Identification of TFB5, a new component of general transcription and DNA repair factor IIIH. *Nat Genet* **36**, 707-713.
205. **Ranish, J. A. and Hahn, S.** 1996. Transcription: basal factors and activation. *Curr Opin Genet Dev* **6**, 151-158.
206. **Ransom, M., Williams, S. K., Dechassa, M. L., Das, C., Linger, J., Adkins, M., Liu, C., Bartholomew, B. and Tyler, J. K.** 2009. FACT and the proteasome promote promoter chromatin disassembly and transcriptional initiation. *J Biol Chem* **284**23461-23471.
207. **Reed R. and Hurt, E.** 2002. A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing. *Cell* **108**, 523-531.
208. **Reinberg, D. and Roeder, R. G.** 1987. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. Purification and functional analysis of initiation factors IIB and IIE. *J Biol Chem* **262**, 3310-3321.
209. **Reinke, H. and Hörz, W.** 2004. Anatomy of a hypersensitive site. *Biochim Biophys Acta* **1677**, 24-29.
210. **Reyes-Reyes, M. and Hampsey, M.** 2007. Role for the Ssu72 C-terminal domain phosphatase in RNA polymerase II transcription elongation. *Mol Cell Biol* **27**, 926-936.
211. **Riego, L., Avendaño, A., DeLuna, A., Rodriguez, E. and Gonzalez, A.** 2002. *GDH1* expression is regulated by *GLN3*, *GCN4*, and *HAP4* under respiratory growth. *Biochem Biophys Res Commun* **293**, 79-85.
212. **Robert, F., Douziech, M., Forget, D., Egly, J. M., Greenblatt, J., Burton, Z. F. and Coulombe, B.** 1998. Wrapping of promoter DNA around the RNA polymerase II initiation complex induced by TFIIIF. *Mol Cell* **2**, 341-351.

213. **Roeder, R. G.** 1998. Role of general and gene-specific cofactors in the regulation of eukaryotic transcription. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **63**, 201-218.
214. **Roeder, R. G. and Rutter, W. J.** 1969. Multiple forms of DNA-dependent RNA polymerase in eukaryotic organisms. *Nature* **224**, 234-237.
215. **Sampath, V. and Sadhale, P.** 2005. Rpb4 and Rpb7: a sub-complex integral to multi-subunit RNA polymerases performs a multitude of functions. *IUBMB Life* **57**: 93-102.
216. **Samuels, M., Fire, A. and Sharp, P. A.** 1982. Separation and characterization of factors mediating accurate transcription by RNA polymerase II. *J Biol Chem* **257**, 14419-14427.
217. **Sawadogo, M. and Roeder, R. G.** 1985. Factors involved in specific transcription by human RNA polymerase II: analysis by a rapid and quantitative *in vitro* assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 4394-4398.
218. **Scafe, C., Nonet, M. and Young, R. A.** 1990. RNA polymerase II mutants defective in transcription of a subset of genes. *Mol Cell Biol* **10**, 1010-1016.
219. **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.
220. **Schmid, A., Fascher, K. D. and Hörz, W.** 1992. Nucleosome disruption at the yeast *PHO5* promoter upon *PHO5* induction occurs in the absence of DNA replication. *Cell* **71**, 853-864.
221. **Schneider, K. R., Smith, R. L., O'Shea, E. K.** 1994. Phosphate-regulated inactivation of the kinase PHO80-PHO85 by the CDK inhibitor PHO81. *Science* **266**, 122-126.
222. **Segref, A., Sharma, K., Doye, V., Hellwig, A., Huber, J., Lührmann, R. and Hurt, E.** 1997. Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly(A)⁺ RNA and nuclear pores. *EMBO J* **16**, 3256-3271.
223. **Serrano, R., Ruiz, A., Bernal, D., Chambers, J. R. and Ariño, J.** 2002. The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium-mediated signalling. *Mol Microbiol* **46**, 1319-1333.
224. **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.
225. **Sims, R. J. 3rd, Mandal, S. S. and Reinberg, D.** 2004. Recent high-lights of RNA-polymerase-II-mediated transcription. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 263-271.
226. **Smale, S. T. and Kadonaga, J. T.** 2003. The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem* **72**, 449-479.
227. **Snay-Hodge, C. A., Colot, H. V., Goldstein, A. L. and Cole, C. N.** 1998. Dbp5p/Rat8p is a yeast nuclear pore-associated DEAD-box protein essential for RNA export. *EMBO J* **17**, 2663-2676.

-
228. **Springer, M., Wykoff, D. D., Miller, N. and O'Shea, E. K.** 2003. Partially phosphorylated Pho4 activates transcription of a subset of phosphate-responsive genes. *PLoS Biol* **1**, E28.
229. **Sprouse, R. O., Karpova, T. S., Mueller, F., Dasgupta, A., McNally, J. C. and Auble, D. T.** 2008. Regulation of TATA-binding protein dynamics in living yeast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 13304-13308.
230. **Stade, K., Ford, C. S., Guthrie, C. and Weis, K.** 1997. Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* **90**, 1041-1050.
231. **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.
232. **Stewart, J. J. and Stargell, L. A.** 2001. The stability of the TFIIA-TBP-DNA complex is dependent on the sequence of the TATAAA element. *J Biol Chem* **276**, 30078-30084.
233. **Sudarsanam, P. and Winston, F.** 2000. The Swi/Snf family nucleosome-remodeling complexes and transcriptional control. *Trends Genet* **16**, 345-351.
234. **Susek, R. E. and Lindquist, S.** 1990. Transcriptional derepression of the *Saccharomyces cerevisiae* HSP26 gene during heat shock. *Mol Cell Biol* **10**, 6362-6373.
235. **Svaren, J. and Hörz, W.** 1995. Interplay between nucleosomes and transcription factors at the yeast PHO5 promoter. *Semin Cell Biol* **6**, 177-183.
236. **Svejstrup, J. Q., Li, Y., Fellows, J., Gnatt, A., Björklund, S. and Kornberg, R. D.** 1997. Evidence for a mediator cycle at the initiation of transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 6075-6078.
237. **Takagi, Y., Calero, G., Komori, H., Brown, J. A., Ehrensberger, A. H., Hudmon, A., Asturias, F. and Kornberg, R. D.** 2006. Head module control of mediator interactions. *Mol Cell* **23**, 355-364.
238. **Takagi, Y. and Kornberg, R. D.** Mediator as a general transcription factor. *J Biol Chem* **281**, 80-89.
239. **Thomas, M. C. and Chiang C. M.** 2006. The general transcription machinery and general cofactors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **41**, 105-178.
240. **Thompson, C. M., Koleske, A. J., Chao, D. M. and Young, R. A.** 1993. A multisubunit complex associated with the RNA polymerase II CTD and TATA-binding protein in yeast. *Cell* **73**, 1361-1375.
241. **Treitel, M. A. and Carlson, M.** 1995. Repression by SSN6-TUP1 is directed by MIG1, a repressor/activator protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3132-3136.
242. **Trumbly, R. J.** 1992. Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **6**, 15-21.
243. **Tseng, S. S., Weaver, P. L., Liu, Y., Hitomi, M., Tartakoff, A. M. and Chang, T. H.** 1998. Dbp5p, a cytosolic RNA helicase, is required for poly(A)+ RNA export. *EMBO J* **17**, 2651-2662.

244. **Türkel, S., Turgut, T., López, M. C., Uemura, H. and Baker, H. V.** 2003. Mutations in *GCR1* affect *SUC2* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* **268**, 825-831.
245. **Ueda, Y., To-E. A. and Oshima, Y.** 1975. Isolation and characterization of recessive, constitutive mutations for repressible acid phosphatase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **122**, 911-922.
246. **van de Peppel, J., Kettelarij, N., van Bakel, H., Kockelkorn, T. T., van Leenen, D. and Holstege, F. C.** 2005. Mediator expression profiling epistasis reveals a signal transduction pathway with antagonistic submodules and highly specific downstream targets. *Mol Cell* **19**, 511-522.
247. **van Werven, F. J., van Bakel, H., van Teeffelen, H. A., Altelaar, A. F., Koerkamp, M. G., Heck, A. J., Holstege, F. C. and Timmers, H. T.** 2008. Cooperative action of NC2 and Mot1p to regulate TATA-binding protein function across the genome. *Genes Dev* **22**, 2359-2369.
248. **Velours, J. and Arselin, G.** 2000. The *Saccharomyces cerevisiae* ATP synthase. *J Bioenerg Biomembr* **32**, 383-390.
249. **Vignali, M., Hassan, A. H., Neely, K. E. and Workman, J. L.** 2000. ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol Cell Biol* **20**, 1899-1910.
250. **Wach, A., Brachat, A., Pöhlmann, R. and Philippsen, P.** 1994. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**, 1793-1808.
251. **Walker, S. S., Reese, J. C., Apone, L. M. and Green, M. R.** 1996. Transcription activation in cells lacking TAFIIS. *Nature* **383**, 185-188
252. **Walmacq, C., Kireeva, M. L., Irvin, J., Nedialkov, Y., Lubkowska, L., Malagon, F., Strathern, J. N. and Kashlev, M.** 2009. RPB9 subunit controls transcription fidelity by delaying NTP sequestration in RNA polymerase II. *J Biol Chem* **284**, 19601-19612.
253. **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.
254. **Wilson, W. A., Hawley, S. A. and Hardie, D. G.** 1996. Glucose repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio. *Curr Biol* **6**, 1426-1434.
255. **Winston, F., Dollard, C. and Ricupero-Hovasse, S. L.** 1995. Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C. *Yeast* **11**, 53-55.
256. **Wu, S. Y., Zhou, T. and Chiang, C. M.** 2003. Human mediator enhances activator-facilitate drecruitment of RNA polymerase II and promoter recognition by TATA-binding protein (TBP) independently of TBP-associated factors. *Mol Cell Biol* **23**, 6229-6242.

-
257. **Wu, S. Y. and Chiang, C. M.** 2001. TATA-binding protein-associated factors enhance the recruitment of RNA polymerase II by transcriptional activators. *J Biol Chem* **276**, 34235-34243.
258. **Wu, S. Y., Kershner, E. and Chiang, C. M.** 1998. TAFII-independent activation mediated by human TBP in the presence of the positive cofactor PC4. *EMBO J* **17**, 4478-4490.
259. **Wu, L. and Winston, F.** 1997. Evidence that Snf-Swi controls chromatin structure over both the TATA and UAS regions of the *SUC2* promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **25**, 4230-4234.
260. **Xie, J., Collart, M., Lemaire, M., Stelzer, G. and Meisterernst, M.** 2000. A single point mutation in TFIIA suppresses NC2 requirement *in vivo*. *EMBO J* **19**, 672-682.
261. **Yamashita, S., Wada, K., Horikoshi, M., Gong, D. W., Kokubo, T., Hisatake, K., Yokotani, N., Malik, S., Roeder, R. G. and Nakatani, Y.** 1992. Isolation and characterization of a cDNA encoding *Drosophila* transcription factor TFIIIB. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2839-2843.
262. **Yokomori, K., Zeidler, M. P., Chen, J. L., Verrijzer, C. P., Mlodzik, M. and Tjian, R.** 1994. *Drosophila* TFIIA directs cooperative DNA binding with TBP and mediates transcriptional activation. *Genes Dev* **8**, 2313-2323.
263. **Yoon, H., Miller, S. P., Pabich, E. K. and Donahue, T. F.** 1992. *SSL1*, a suppressor of a *HIS4* 5'-UTR stem-loop mutation, is essential for translation initiation and affects UV resistance in yeast. *Genes Dev* **6**, 2463-2477.
264. **Young, R. A.** 1991. RNA polymerase II. *Annu Rev Biochem* **60**, 689-715.
265. **Yudkovsky, N., Ranish, J. A. and Hahn, S.** 2000. A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator. *Nature* **408**, 225-229.
266. **Zanton, S. J. and Pugh, B. F.** 2004. Changes in genomewide occupancy of core transcriptional regulators during heat stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16843-16848.
267. **Zhang, F., Sumibcay, L., Hinnebusch, A. G. and Swanson, M. J.** 2004. A triad of subunits from the Gal11/tail domain of Srb mediator is an *in vivo* target of transcriptional activator Gcn4p. *Mol Cell Biol* **24**, 6871-6886.
268. **Zhu, X., Wirén, M., Sinha, I., Rasmussen, N. N., Linder, T., Holmberg, S., Ekwall, K. and Gustafsson, C. M.** 2006. Genome-wide occupancy profile of mediator and the Srb8-11 module reveals interactions with coding regions. *Mol Cell* **22**, 169-178.
269. **Ziegler, L. M., Khapersky, D. A., Ammerman, M. L. and Ponticelli, A.S.** 2003. Yeast RNA polymerase II lacking the Rpb9 subunit is impaired for interaction with transcription factor IIF. *J Biol Chem* **278**, 48950-48956.

ANEXO

Tabla A.I: Genes cuya expresión se ve alterada en la cepa mutante *Δiwr1*. Se muestran los genes con un cambio en el nivel de expresión igual o superior a un factor de 2 en la cepa mutante *Δiwr1* comparada con la expresión de estos genes en la cepa silvestre. Se indica también la función molecular y el proceso biológico en el que está implicado cada gen. El factor de cambio (*fold change*) que se muestra es el promedio de tres experimentos independientes.

ORF	Gene	Molecular function	Biological Process	Fold change
YIL022W	TIM44	protein transporter activity	mitochondrial translocation	7.353
YKR100C		unknown	unknown	5.823
YOR375C	GDH1	glutamate dehydrogenase (NADP) activity	glutamate biosynthesis	5.608
YGR032W	GSC2	1,3-beta-glucan synthase activity	beta-1,3 glucan biosynthesis, cell wall organization and biogenesis	5.392
YPL226W	NEW1	unknown	unknown	4.755
YJR044C	VPS55	unknown	late endosome to vacuole transport	4.444
YDL004W	ATP16	ATP synthase activity	ATP synthesis coupled proton transport	4.261
YGR183C	QCR9	ubiquinol-cytochrome c reductase	aerobic respiration	4.110
YKL058W	TOA2	general RNA polymerase II transcription factor activity	transcription initiation from Pol II promoter	3.680
YOR068C		unknown	unknown	3.534
YDR377W	ATP17	ATP synthase activity	ATP synthesis coupled proton transport	3.463
YOL058W	ARG1	argininosuccinate synthase activity	arginine biosynthesis,	3.369
YBL045C	COR1	ubiquinol-cytochrome c reductase activity	aerobic respiration	3.348
YFL037W	TUB2	structural constituent of cytoskeleton	chromosome segregation, nuclear migration	3.312

ORF	Gene	Molecular function	Biological Process	Fold change
YBR067C	TIP1	lipase activity, structural constituent of cell wall	cell wall organization and biogenesis	3.284
YDR443C	SSN2	transcription factor	negative regulation of transcription from Pol II promoter	3.245
YNL036W	NCE103	unknown	secretion, non-classical	3.241
YJR080C		unknown	unknown	3.101
YLR418C	CDC73	transcription elongation factor	RNA elongation from Pol II promoter	3.014
YBR109C	CMD1	calcium ion binding activity	budding, cytoskeleton organization and biogenesis, mitosis	3.014
YPR071W		unknown	unknown	2.839
YER081W	SER3	phosphoglycerate dehydrogenase activity	serine family amino acid biosynthesis	2.804
YKL109W	HAP4	transcriptional activator activity	regulation of carbohydrate metabolism, transcription	2.748
YML110C	COQ5	ubiquinone biosynthesis	aerobic respiration, ubiquinone metabolism	2.717
YLR168C		unknown	unknown	2.711
YJL143W	TIM17	protein transporter activity	mitochondrial translocation	2.701
YGL191W	COX13	cytochrome c oxidase, enzyme regulator	aerobic respiration	2.700
YHR076W	PTC7	protein phosphatase type 2C activity	unknown	2.696
YPR115W		unknown	unknown	2.685
YDR258C	HSP78	chaperone activity, heat shock protein	protein folding, mitochondrial genome maintenance	2.621

ORF	Gene	Molecular function	Biological Process	Fold change
YMR251W-A	HOR7	unknown	response to stress	2.606
YOL077W-A	ATP19	ATP synthesis coupled proton transport	unknown	2.552
YPL078C	ATP4	ATP synthase activity	ATP synthesis coupled proton transport	2.546
YML091C	RPM2	ribonuclease P	mitochondrion organization and biogenesis, protein biosynthesis, tRNA 5'-leader removal	2.538
YPL271W	ATP15	hydrogen-transporting two-sector ATPase	ATP synthesis coupled proton transport	2.521
YOR140W	SFL1	specific transcriptional repressor activity	negative regulation of transcription from Pol II promoter	2.511
YBR039W	ATP3	hydrogen-transporting two-sector ATPase	ATP synthesis coupled proton transport	2.481
YHR071W	PCL5	cyclin-dependent protein kinase	cell cycle	2.478
YPL004C	LSP1	unknown	unknown	2.468
YFR024C-A	LSB3	unknown	unknown	2.433
YPL137C		unknown	unknown	2.427
YER139C		unknown	unknown	2.383
YDL015C	TSC13	oxidoreductase activity	very-long-chain fatty acid metabolism	2.368
YER069W	ARG5,6	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase acetylglutamate kinase	ornithine biosynthesis	2.353
YKL016C	ATP7	hydrogen-transporting two-sector ATPase	ATP synthesis coupled proton transport	2.347

ORF	Gene	Molecular function	Biological Process	Fold change
YDR529C	QCR7	ubiquinol-cytochrome c reductase activity	aerobic respiration	2.337
YJL062W-A		unknown	unknown	2.309
YMR234W	RNH1	ribonuclease H activity	DNA replication, cell wall organization and biogenesis	2.285
YGR239C	PEX21	enzyme activator activity, protein binding activity	protein-peroxisome targeting	2.272
	COX7	cytochrome c oxidase activity	aerobic respiration	2.249
YBL047C	EDE1	unknown	endocytosis	2.246
YGL008C	PMA1	hydrogen-transporting two-sector ATPase activity	regulation of pH, proton transport	2.243
YOL075C		ATP-binding cassette (ABC) transporter activity	transport	2.241
YKR039W	GAP1	general amino acid permease activity	amino acid transport	2.226
YLR342W	FKS1	1,3-beta-glucan synthase activity	beta-1,3 glucan biosynthesis, cell wall organization and biogenesis	2.214
YAL007C	ERP2	unknown	ER to Golgi transport	2.184
YIL117C	PRM5	unknown	conjugation with cellular fusion	2.149
YPR090W		unknown	unknown	2.145
YDR296W	MHR1	transcription regulator activity	mitochondrial genome maintenance	2.142
YOR065W	CYT1	electron transporter, c reductase complex activity	oxidative phosphorylation, oxidative phosphorylation, ubiquinone to cytochrome c	2.125

ORF	Gene	Molecular function	Biological Process	Fold change
YML090W		unknown	unknown	2.122
YBL104C		unknown	unknown	2.109
YER163C		unknown	unknown	2.107
YHR057C	CPR2	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity	unknown	2.093
YFL038C	YPT1	RAB small monomeric GTPase activity	ER to Golgi transport, protein complex assembly	2.091
YGR218W	CRM1	protein carrier activity	mRNA-nucleus export, protein-nucleus export, ribosomal large subunit nucleus export	2.080
YGL026C	TRP5	tryptophan synthase	tryptophan biosynthesis	2.070
YBL030C	PET9	ATP/ADP antiporter	ATP/ADP exchange	2.063
YFL018C	LPD1	dihydrolipoamide dehydrogenase activity	acetyl-CoA biosynthesis from pyruvate	2.053
YBR221C	PDB1	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) activity	pyruvate metabolism	2.031
YOR156C	NFI1	unknown	chromosome condensation	2.029
YEL065W	SIT1	siderochrome-iron (ferrioxamine) uptake transporter	iron homeostasis, iron-siderochrome transport	2.014
YBL106C	SRO77	unknown	Golgi to plasma membrane transport, exocytosis	2.002
YIL134W	FLX1	flavin-adenine dinucleotide transporter activity	mitochondrial transport	0.497
YBR301W	DAN3	unknown	unknown	0.495
YKL214C	YRA2	RNA binding activity	poly(A)+ mRNA-nucleus export	0.495
YBR012C		unknown	unknown	0.490

ORF	Gene	Molecular function	Biological Process	Fold change
YGL031C	RPL24A	RNA binding, structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	0.485
YHR055C	CUP1-2	copper binding	response to copper	0.482
YOR152C		unknown	unknown	0.480
YIL060W		unknown	unknown	0.479
YNL096C	RPS7B	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	0.478
YJR099W	YUH1	ubiquitin-specific protease	protein deubiquitination	0.478
YJL078C	PRY3	unknown	unknown	0.477
YDR428C		unknown	unknown	0.475
YNL023C	FAP1	transcription factor activity	unknown	0.473
YMR163C		unknown	unknown	0.471
YOR040W	GLO4	hydroxyacylglutathione hydrolase activity	carbohydrate metabolism	0.471
YOR088W		unknown	unknown	0.469
YKL193C	SDS22	enzyme regulator activity	chromosome segregation, protein targeting	0.464
YOL101C		unknown	unknown	0.464
YLR134W	PDC5	pyruvate decarboxylase activity	ethanol fermentation, pyruvate metabolism	0.463
YGL053W	PRM8	unknown	conjugation with cellular fusion	0.463
YLR256W	HAP1	specific RNA polymerase II transcription factor activity	aerobic respiration, positive regulation of Pol II promoter transcription	0.460
YAL021C	CCR4	3'-5' exoribonuclease activity	poly(A) tail shortening, regulation of transcription from Pol II promoter	0.459
YER186C		unknown	unknown	0.459
YHR131C		unknown	unknown	0.457
YGL261C		unknown	unknown	0.456

ORF	Gene	Molecular function	Biological Process	Fold change
YAL002W	VPS8	unknown	late endosome to vacuole transport	0.452
YIL051C	MMF1	unknown	isoleucine biosynthesis, mitochondrial genome maintenance	0.451
YGL009C	LEU1	3-isopropylmalate dehydratase activity	leucine biosynthesis	0.449
YHR094C	HXT1	fructose transporter activity	hexose transport	0.447
YCR028C	FEN2	pantothenate transporter	pantothenate transport	0.444
YLR436C	ECM30	unknown	cell wall organization and biogenesis	0.442
YLR231C	BNA5	kynureninase	nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis	0.442
YKL216W	URA1	dihydroorotate dehydrogenase activity	pyrimidine base biosynthesis	0.440
YDR286C		unknown	unknown	0.439
YMR316C-A		unknown	unknown	0.439
YER142C	MAG1	alkylbase DNA N-glycosylase activity	DNA dealkylation	0.438
YPL032C	SVL3	unknown	endocytosis	0.438
YAL001C	TFC3	RNA polymerase III transcription factor	transcription initiation from Pol III promoter	0.438
YKL008C	LAC1	protein transporter activity	aging, ceramide biosynthesis	0.436
YIL053W	RHR2	glycerol-1-phosphatase activity	glycerol biosynthesis, response to osmotic stress	0.436
YGR180C	RNR4	ribonucleoside-diphosphate reductase activity	DNA replication	0.436

ORF	Gene	Molecular function	Biological Process	Fold change
YLR040C		unknown	unknown	0.432
YLR420W	URA4	dihydroorotase activity	pyrimidine nucleotide biosynthesis	0.428
YNL328C	MDJ2	unknown	protein holding	0.424
YOL102C	TPT1	tRNA 2'-phosphotransferase activity	tRNA splicing	0.422
YDR233C	RTN1	unknown	unknown	0.422
YER109C	FLO8	specific RNA polymerase II transcription factor activity	invasive growth, pseudohyphal growth	0.421
YGR286C	BIO2	biotin synthase activity	biotin biosynthesis	0.421
YEL010W		unknown	unknown	0.418
YOR175C		unknown	unknown	0.418
YIL050W	PCL7	cyclin-dependent protein kinase	regulation of glycogen biosynthesis	0.415
YDL070W	BDF2	unknown	unknown	0.411
YDR248C		unknown	unknown	0.408
YIL133C	RPL16A	RNA binding, structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	0.406
YBR092C	PHO3	acid phosphatase activity	thiamin transport	0.398
YER024W	YAT2	carnitine O-acetyltransferase activity	alcohol metabolism, carnitine metabolism	0.397
YBL086C			unknown	0.395
YGL052W		unknown	unknown	0.392
YNL259C	ATX1	copper chaperone activity	copper ion transport, high affinity iron ion transport, response to oxidative stress	0.391
YHR210C		unknown	unknown	0.391
YFL-TyA	TY2A			0.391

ORF	Gene	Molecular function	Biological Process	Fold change
YOL143C	RIB4	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase activity	vitamin B2 biosynthesis	0.388
YOR394W		unknown	unknown	0.387
YGL127C	SOH1	unknown	DNA repair, transcription from Pol II promoter	0.381
YOR121C		unknown	unknown	0.372
YBR214W	SDS24	unknown	DNA metabolism, endocytosis, meiosis	0.367
YKL178C	STE3	mating-type a-factor pheromone receptor	signal transduction during conjugation with cellular fusion	0.362
YHR145C		unknown	unknown	0.351
YGR260W	TNA1	nicotinamide mononucleotide permease activity	nicotinamide mononucleotide transport	0.343
YGR206W		unknown	unknown	0.338
YJR071W		unknown	unknown	0.306
YMR193C-A		unknown	unknown	0.305
YCL020W		unknown	unknown	0.296
YDR539W		unknown	unknown	0.288
YKL011C	CCE1	endodeoxyribonuclease activity	DNA recombination	0.288
YGL229C	SAP4	protein serine/threonine phosphatase activity	G1/S transition of mitotic cell cycle	0.285
YGL088W		unknown	unknown	0.283
YER088C	DOT6	unknown	cell elongation, regulation of transcription from Pol II promoter.	0.280
YER005W	YND1	nucleoside diphosphatase	protein amino acid glycosylation	0.270
YER028C	MIG3	DNA binding, transcription factor activity	transcription initiation	0.266
YAR053W		unknown	unknown	0.249

ORF	Gene	Molecular function	Biological Process	Fold change
YBL020W	RFT1	oligosaccharide transporter activity	N-linked glycosylation, oligosaccharide transport	0.249
YGR041W	BUD9	unknown	bud site selection	0.246
YER121W		unknown	unknown	0.234
YNR076W	PAU6	unknown	unknown	0.225
YCL064C	CHA1	L-serine ammonia-lyase activity, threonine dehydratase activity	serine family amino acid catabolism, threonine catabolism	0.211
YOL161C		unknown	unknown	0.201
YEL049W	PAU2	unknown	unknown	0.180
YCR104W	PAU3	unknown	unknown	0.171
YFL060C	SNO3	imidazoleglycerol phosphate synthase activity	pyridoxine metabolism, thiamin biosynthesis	0.171
YHR215W	PHO12	acid phosphatase activity	unknown	0.166
YGL089C	MFA α 2		mating	0.164
YDR024W	FYV1	unknown	unknown	0.159
YDR504C		unknown	unknown	0.155
YIL176C		unknown	unknown	0.151
YLR263W	RED1	unknown	synaptonemal complex formation	0.147
YJR115W		unknown	unknown	0.143
YAR071W	PHO11	acid phosphatase activity	phosphate metabolism	0.131
YIL139C	REV7	zeta DNA polymerase activity	DNA repair, mutagenesis	0.125
YIL121W		unknown	unknown	0.012
YHR022C		unknown	unknown	0.009

Tabla A.II: Distribución en categorías funcionales, empleando la herramienta “*Function Associate*” (<http://llama.med.harvard.edu/cgi/func/funcassociate>), de aquellos genes expresados de manera diferencial (con un factor igual o superior a 2) en la cepa mutante $\Delta iwr1$ respecto a la cepa silvestre.

N	X	P	GO Attribute
15	112	1,3e-07	parte de la membrana mitocondrial
11	58	1,8e-07	actividad transportadora transmembrana del ion hidrógeno
7	20	3,8e-07	complejo ATP sintasa transportador de protones
11	63	4,5e-07	actividad transportadora transmembrana de cationes inorgánicos monovalentes
14	109	6e-07	actividad transportadora transmembrana de cationes inorgánicos
10	54	8,6e-07	fosforilación oxidativa
18	193	1,8e-06	generación de metabolitos precursores y energía
24	323	2e-06	actividad transportadora transmembrana
22	282	2,5e-06	actividad transportadora transmembrana específica de sustrato
7	27	3,8e-06	proceso de biosíntesis de ATP
16	166	4,6e-06	actividad transportadora transmembrana de cationes
18	209	5,7e-06	membrana interna mitocondrial
8	40	6,1e-06	transportador de protones
9	54	7,8e-06	transportador de cationes inorgánicos monovalentes
7	30	8,1e-06	proceso metabólico de nucleósidos de purina trifosfato
18	221	1,2e-05	membrana interna de orgánulo
7	32	1,3e-05	proceso metabólico de ribonucleótidos trifosfato
4	7	1,4e-05	actividad fosfatasa ácida
3	3	1,7e-05	parte central del transportador de protones ATP sintasa
26	417	1,8e-05	actividad transportadora
7	34	2e-05	proceso biosintético de nucleósidos trifosfato
11	93	2,3e-05	proceso biosintético de nucleótidos
7	35	2,4e-05	transportador de protones del complejo ATPasa
7	36	2,9e-05	proceso metabólico de nucleósidos trifosfato
16	194	3,3e-05	actividad transportadora transmembrana del iones
22	341	5,2e-05	actividad transportadora específica de sustrato

N	X	P	GO Attribute
5	18	6,9e-05	mecanismo rotacional de la actividad transportadora de ion hidrógeno de la ATP sintasa
8	55	7e-05	proceso biosintético de ribonucleótidos

N representa el número de genes de cada categoría que aparece en nuestro experimento.

X es el número total de genes en esa categoría.

P es el *p-value*.

Tabla A.III: Genes cuyos niveles de expresión aumentan en la cepa *Δiwr1*. Los genes que muestran una inducción igual o superior a un factor de 2 en la cepa *Δiwr1* se dividen en categorías funcionales definidas por el *Gene Ontology Consortium*. Se indican los valores P (*P-value*) de cada grupo y el factor de cambio (*fold change*) para cada gen.

fosforilación oxidativa (1,60 x 10⁻¹²)	respiración aeróbica* (1,96 x 10⁻⁰⁵)		
ATP16 (4,3)	COR1 (3,3)		
QCR9 (4,1)	COQ5 (2,7)		
ATP17 (3,5)	COX13 (2,7)		
ATP19 (2,6)	PET9 (2,1)		
ATP4 (2,5)			
ATP15 (2,5)	biosíntesis de aminoácidos (0,00057)		
ATP3 (2,5)	GDH1 (5,6)		
ATP7 (2,3)	ARG1 (3,7)		
QCR7 (2,3)	SER3 (2,8)		
COX7 (2,2)	ARG5,6 (2,4)		
CYT1 (2,1)	TRP5 (2,1)		
	LPD1 (2,1)		
mitocondria** (1,63 x 10⁻¹⁰)	otros		
TIM44 (7,4)			
NEW1 (4,7)	YKR100C (5,8)	YPR115W (2,7)	ERP2 (2,2)
FMP26 (3,1)	GSC2 (5,4)	HOR7 (2,6)	PRM5 (2,1)
YLR168C (2,7)	VPS5 (4,4)	SFL1 (2,5)	YPR090W (2,1)
TIM17 (2,7)	TOA2 (3,7)	PCL5 (2,5)	YML090W(2,1)
PTC7 (2,7)	TUB2 (3,3)	YER139C (2,4)	YBL104C (2,1)
HSP78 (2,6)	TIP1 (3,3)	RNH1 (2,3)	YER163C (2,1)
RPM2 (2,5)	SSN2 (3,3)	PEX21 (2,3)	CRM1 (2,1)
LSP1 (2,5)	NCE103 (3,2)	EDE1 (2,2)	NFI1 (2,0)
LSB3 (2,4)	CDC73 (3,0)	PMA1 (2,2)	SIT1 (2,0)
YPL137C (2,4)	CMD1 (3,0)	GAP1 (2,2)	SRO77 (2,0)
TSC13 (2,4)	HAP4 (2,7)	FKS1 (2,2)	
ARG5,6 (2,4)	* Los genes correspondientes al término ontológico “fosforilación oxidativa” también se incluyen en esta categoría.		
YJL062W-A (2,3)	**Los genes correspondientes al término ontológico “fosforilación oxidativa” y “respiración aeróbica” también se incluyen en esta categoría esta categoría.		
MHR1 (2,1)			
YPT1 (2,1)			
LPD1 (2,1)			
PDB1 (2,0)			

Tabla A.IV: Genes cuya expresión se ve alterada en la cepa mutante *Δiwr1* transformada con la construcción YCplac33-IWR1 Δ NES-GFP. Se muestran los genes con un cambio en el nivel de expresión igual o superior a un factor de 2 en la cepa *Δiwr1* + YCplac33-IWR1 Δ NES-GFP comparada con la expresión de estos genes en la cepa *Δiwr1* + YCplac33-IWR1-GFP. Se indica también la función molecular y el proceso biológico en el que está implicado cada gen. El factor de cambio (*fold change*) que se muestra es el promedio de tres experimentos independientes.

ORF	Gene	Molecular function	Biological Process	Fold change
YER037W	PHM8	unknown	unknown	4.871
YDR034W-B	YDR034W-B	unknown	unknown	4.746
YDL011C	YDL011C	unknown	unknown	3.933
YAL054C	ACS1	acetate-CoA ligase	acetate fermentation, acetyl-CoA biosynthesis	3.453
YPR082C	DIB1	pre-mRNA splicing factor activity	mRNA splicing	3.116
YGL248W	PDE1	cAMP-specific phosphodiesterase activity	cAMP-mediated signaling	2.998
YPL276W	FDH2	formate dehydrogenase activity	formate catabolism	2.816
YOR333C	SWF5	unknown	unknown	2.681
YDR209C	YDR209C	unknown	unknown	2.564
YFL059W	SNZ3	protein binding	pyridoxine metabolism, thiamin biosynthesis	0.447
YCL064C	CHA1	L-serine ammonia-lyase activity, threonine dehydratase activity	serine family amino acid catabolism, threonine catabolism	0.419
YPL187W	MFalpha1	pheromone activity	response to pheromone during conjugation with cellular fusion	0.397
YKR076W	ECM4	unknown	cell wall organization and biogenesis	0.342
YJR148W	BAT2	branched-chain amino acid aminotransferase activity	amino acid catabolism branched chain family	0.292

