



**Universidad de Jaén**

Escuela de Doctorado

**Área de Genética**

**Departamento de Biología Experimental**

**Facultad de Ciencias Experimentales**

## **TESIS DOCTORAL**

**Papel de Bud27 en la coordinación de la  
actividad de las ARN polimerasas de la  
levadura *Saccharomyces cerevisiae***

**Autor:**

**Francisco Gutiérrez Santiago**

**Directores:**

**Francisco Navarro Gómez**

**Verónica Martínez Fernández**

**Jaén, marzo de 2022**





**Universidad de Jaén**

**Área de Genética**

**Departamento de Biología Experimental**

**Facultad de Ciencias Experimentales**

El Dr. Francisco Nicolás Navarro Gómez, Catedrático del Área de Genética de la Universidad de Jaén y la Dra. Verónica Martínez Fernández certifican que la Tesis Doctoral titulada “Papel de Bud27 en la coordinación de la actividad de las ARN polimerasas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*”, que presenta Francisco Gutiérrez Santiago para optar al Grado de Doctor con Mención Internacional, ha sido realizada bajo su dirección, reuniendo a su juicio, los requisitos exigidos para esta presentación.

Dr. Francisco Navarro Gómez  
Director de la Tesis Doctoral

Dra. Verónica Martínez Fernández  
Directora de la Tesis Doctoral

Francisco Gutiérrez Santiago  
Aspirante al grado de Doctor  
Jaén, marzo de 2022



# Índice





## ÍNDICE

RESUMEN/SUMMARY .....	3
INTRODUCCIÓN .....	15
<b>1. La levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como organismo modelo</b> .....	15
<b>2. La transcripción en eucariotas. ARN polimerasas</b> .....	16
2.1. ARN pol I .....	17
2.2. ARN pol II .....	20
2.3. ARN pol III .....	23
2.4. Ensamblaje y transporte de las ARN polimerasas .....	25
2.5. <i>Cross-talk</i> de las tres ARN polimerasas. ....	27
<b>3. El proceso transcripcional de la ARN pol III</b> .....	29
3.1. Genes diana de la ARN pol III .....	30
3.2. Factores de transcripción de la ARN pol III .....	31
3.2.1. TFIIA .....	31
3.2.2. TFIIC .....	32
3.2.3. TFIIB .....	33
3.3. Mecanismo transcripcional de la ARN pol III .....	34
3.3.1. Formación del PIC e iniciación de la transcripción .....	34
3.3.2. Elongación .....	35
3.3.3. Terminación y reciclaje .....	36
3.3.4. Otras proteínas involucradas en la transcripción de la ARN pol III .....	38
3.3.5. Remodelación de la cromatina .....	39
3.4. Regulación de la actividad de la ARN pol III .....	42
3.4.1. Maf1 .....	42
3.4.2. Rpc53 .....	46
<b>4. Prefoldinas y prefoldinas-like</b> .....	47
4.1. La prefoldina-like Bud27/URI .....	49
4.1.1. Organización y localización de Bud27/URI .....	49
4.1.2. Bud27 interviene en la traducción .....	50

4.1.3. Bud27 participa en el ensamblaje citoplasmático de las tres ARN polimerasas .....	51
4.1.4. Bud27 participa en la transcripción de las ARN polimerasas II y III .....	52
4.1.5. Otras funciones de Bud27/URI.....	53
4.1.6. Bud27/URI es un elemento de la ruta de señalización TOR.....	54
<b>5. La ruta de señalización TOR. Aspectos generales.....</b>	<b>55</b>
<b>OBJETIVOS/OBJECTIVES .....</b>	<b>61</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>65</b>
<b>1. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento .....</b>	<b>65</b>
1.1. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento para <i>Escherichia coli</i> .....	65
1.2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ..	65
1.3. Aminoácidos, vitaminas, antibióticos y drogas.....	66
1.3.1. Aminoácidos y vitaminas.....	66
1.3.2. Antibióticos y drogas.....	66
<b>2. Cepas, oligonucleótidos, plásmidos y anticuerpos .....</b>	<b>68</b>
2.1. Cepas de microorganismos .....	68
2.1.1. Cepa de <i>Escherichia coli</i> .....	68
2.1.2. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	68
2.2. Oligonucleótidos.....	71
2.3. Plásmidos.....	73
2.4. Anticuerpos .....	74
<b>3. Técnicas de manipulación de microorganismos.....</b>	<b>76</b>
3.1. Técnicas de manipulación de <i>Escherichia coli</i> . Electroporación .....	76
3.2. Técnicas de manipulación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	76
3.2.1. Transformación rápida .....	76
3.2.2. Transformación por el método Acetato de Litio / ADN de cadena sencilla / Polietilenglicol .....	77
3.2.3. Preparación de células competentes y transformación por el método de Acetato de Litio / Sorbitol / Polietilenglicol.....	77
3.2.4. Generación de cepas diploides .....	78

3.2.5. Esporulación .....	78
3.2.6. Selección de haploides .....	78
3.2.7. Generación de nuevas cepas mediante delección de genes o etiquetado de proteínas.....	79
<b>4. Técnicas de Biología molecular.....</b>	<b>80</b>
4.1. Técnicas de manipulación y análisis de ácidos nucleicos.....	80
4.1.1. Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> .....	80
4.1.2. Extracción de ADN genómico de <i>S. cerevisiae</i> .....	80
4.1.3. Extracción de ADN plasmídico de <i>S. cerevisiae</i> .....	80
4.1.4. Extracción de ARN de <i>S. cerevisiae</i> .....	81
4.1.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	81
4.1.6. Electroforesis y cuantificación de ácidos nucleicos .....	82
4.1.7. Transcripción inversa o retrotranscripción.....	82
4.1.8. PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) .....	83
4.1.9. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) .....	83
4.2. Técnicas de manipulación y análisis de proteínas .....	85
4.2.1. Extracción y cuantificación de proteínas .....	85
4.2.2. Inmunoprecipitación de proteínas .....	87
4.2.3. Análisis de estabilidad de complejos proteicos .....	88
4.2.4. yChEFs (yeast Chromatin Enriched Fractions) .....	89
4.2.5. Western blot.....	89
4.2.6. ProteomChIP .....	91
<b>5. Técnicas de microscopía .....</b>	<b>93</b>
5.1. Análisis de fluorescencia <i>in vivo</i> .....	93
5.2. Inmunolocalización.....	93
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>97</b>
<b>Capítulo I. Papel de Bud27 en la transcripción de las 3 ARN polimerasas .....</b>	<b>97</b>
<b>1. Influencia de Bud27 en la transcripción mediada por la ARN pol I .....</b>	<b>99</b>
1.1. Análisis de la asociación de la ARN pol I a la cromatina.....	99

1.2. Análisis de la interacción entre Spt5 y la ARN pol I en el mutante <i>bud27Δ</i> .....	104
1.3. Análisis del número de copias del gen ADNr 35S en el mutante <i>bud27Δ</i> .....	106
<b>2. Influencia de Bud27 en la transcripción mediada por la ARN pol III</b> .....	<b>109</b>
<b>3. Integración de la función de Bud27 con la ruta TOR mediante el estudio del estado de fosforilación de la proteína ribosómica Rps6</b> .....	<b>111</b>
<b>Capítulo II Estudio de la interconexión entre la <i>prefoldin-like</i> Bud27, el represor transcripcional Maf1 y la ruta TOR</b> .....	<b>117</b>
<b>1. Estudio de la influencia de Bud27 sobre la fosforilación y entrada al núcleo del represor de la ARN polimerasa III, Maf1</b> .....	<b>118</b>
1.1. Análisis del patrón de fosforilación y del proceso de desfosforilación de Maf1 .....	118
1.2. La fosforilación de Maf1 no depende de la localización celular de Bud27.....	123
1.3. La entrada de Maf1 al núcleo depende de Bud27 .....	125
1.4. Análisis de los niveles de ARNt tras la inhibición de la vía TOR .....	127
<b>2. Estudio de la relación entre Bud27 y Maf1 con la ruta de señalización TOR</b> .....	<b>131</b>
2.1. Análisis de interacciones genéticas.....	131
2.2. Análisis del patrón de fosforilación de Maf1 .....	134
<b>3. Estudio de la relación funcional entre Bud27 y PP4</b> .....	<b>136</b>
<b>4. Análisis del papel de Bud27 como posible cochaperona en el ensamblaje y/o estabilidad del complejo PP4</b> .....	<b>141</b>
<b>5. Localización del complejo PP4 en ausencia de Bud27</b> .....	<b>144</b>
<b>6. Interacción física entre Bud27 y PP4</b> .....	<b>148</b>
<b>Capítulo III. Análisis de complejos transcripcionales de la ARN polimerasa III</b> .....	<b>153</b>
1. Análisis de la estequiometría de la ARN pol III.....	154
2. Análisis de los factores de transcripción de la ARN pol III.....	157
3. Análisis de otros elementos relacionados con la transcripción de la ARN pol III.....	159
4. Análisis global de los datos de ProteomChIP y generación de categorías funcionales.....	162
5. Estudio de la influencia de Bud27 sobre la fosforilación de la subunidad Rps53.....	166
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>175</b>
<b>CONCLUSIONES/CONCLUSIONS</b> .....	<b>195</b>

<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	200
<b>ANEXO I. <i>Currículum vitae</i></b> .....	228
<b>ANEXO II. Publicaciones</b> .....	232

## Índice de Tablas

<b>Tabla I1</b> Subunidades que componen las tres ARN polimerasas en <i>S. cerevisiae</i> , arqueas y bacterias.....	17
<b>Tabla MyM 1.</b> Aminoácidos y vitaminas .....	66
<b>Tabla MyM 2.</b> Cepas de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas en este trabajo.....	71
<b>Tabla MyM 3.</b> Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....	73
<b>Tabla MyM 4.</b> Plásmidos utilizados en este trabajo.....	74
<b>Tabla MyM 5.</b> Anticuerpos utilizados en este trabajo. ....	75
<b>Tabla R1.</b> Subunidades de la ARN pol III identificadas tras la purificación de Rpc128-TAP mediante ProteomChIP y espectrometría de masas.....	155
<b>Tabla R2.</b> Subunidades de los factores de transcripción basales de la ARN pol III identificadas tras la purificación de Rpc128-TAP mediante ProteomChIP y espectrometría de masas. ...	157
<b>Tabla R3.</b> Otras proteínas relacionadas con la transcripción de la ARN pol III o el metabolismo de los ARNts identificadas tras la purificación de Rpc128-TAP mediante ProteomChIP y espectrometría de masas. ....	160
<b>Tabla S1.</b> Listado de proteínas utilizadas para el análisis de categorías funcionales con FunSpec.....	171

## Índice de Figuras

<b>Figura I1.</b> Estructura cristalográfica de la ARN pol I de <i>S. cerevisiae</i> .....	19
<b>Figura I2.</b> Estructura cristalográfica de la ARN pol II de <i>S. cerevisiae</i> .....	21
<b>Figura I3.</b> Estructura cristalográfica de la ARN pol III de <i>S. cerevisiae</i> .....	24

<b>Figura I4.</b> Modelo de ensamblaje de la ARN pol II de <i>S. cerevisiae</i> .....	27
<b>Figura I5.</b> Tipos de genes transcritos por la ARN pol III de <i>S. cerevisiae</i> .....	31
<b>Figura I6.</b> Esquema de la estructura del PIC en los genes tipo 1 y 2 de la ARN pol III.....	35
<b>Figura I7.</b> Esquema de las interacciones proteína-proteína y proteína-ADN durante la iniciación y el reciclaje de la ARN pol III. ....	38
<b>Figura I8.</b> Esquema de la proteína Maf1 en diferentes especies.....	43
<b>Figura I9.</b> Modelo propuesto sobre el control del estado de fosforilación, localización y actividad de Maf1. ....	45
<b>Figura I10.</b> Modelo propuesto sobre el control de la represión de la ARN pol III a través de la vía TOR.....	47
<b>Figura I11.</b> Esquema de la estructura del complejo prefoldina y prefoldina-like en mamíferos. ....	48
<b>Figura I12.</b> Esquema de Bud27 en <i>S. cerevisiae</i> y URI en humanos.....	50
<b>Figura I13.</b> Esquema de las diferentes funciones, tanto nucleares como citoplasmáticas, de Bud27 en <i>S. cerevisiae</i> .....	55
<b>Figura I14.</b> Resumen de las funciones de los complejos TORC1 y TORC2 en <i>S. cerevisiae</i> . ....	58
<b>Figura R1.</b> Análisis del efecto de la sobreexpresión de <i>RPB5</i> en el mutante <i>bud27Δ</i> en el ensamblaje de las ARN polimerasas y en la sensibilidad a ácido micofenólico. ....	98
<b>Figura R2.</b> Análisis de la ocupación de la ARN pol I en la unidad transcripcional del gen de ADNr 35S mediante inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).....	102
<b>Figura R3.</b> Análisis de las ARN pol I y III asociadas a la cromatina. ....	103
<b>Figura R4.</b> Estimación de la procesividad de la ARN pol I en el mutante <i>bud27Δ</i> comparado con su cepa isogénica silvestre.....	104
<b>Figura R5.</b> Análisis de la interacción entre Spt5 y las ARN pol I y II.....	105
<b>Figura R6.</b> Estimación del número de copias del gen 35S.....	107

<b>Figura R7.</b> Estudio del crecimiento de las cepas mutantes <i>bud27Δ</i> con alto (yFGS3) y bajo (yFGS4) número de copias del gen ADNr 35S.....	108
<b>Figura R8.</b> Análisis de la ocupación de la ARN pol III en los genes <i>RDN5</i> (tipo 1), <i>SUP56</i> (tL(CAA)A) (tipo 2), y <i>SCR1</i> .....	110
<b>Figura R9.</b> Análisis de la cinética de desfosforilación de Rps6 tras el tratamiento con rapamicina.....	112
<b>Figura R10.</b> Análisis de la desfosforilación de Maf1.....	118
<b>Figura R11.</b> Análisis de la desfosforilación de Maf1, en sobreexpresión de <i>RPB5</i> .....	119
<b>Figura R12.</b> La adición de cicloheximida no altera el patrón de fosforilación de Maf1.....	120
<b>Figura R13.</b> Análisis de la desfosforilación de Maf1 bajo diferentes situaciones de estrés.. .....	121
<b>Figura R14.</b> Análisis de desfosforilación de Maf1 por sobreexpresión de <i>BUD27</i> .....	122
<b>Figura R15.</b> Análisis <i>in vivo</i> , mediante microscopía de fluorescencia, de la localización celular de la proteína Bud27ΔNLS-GFP. ....	123
<b>Figura R16.</b> Estudio de la termosensibilidad de la cepa <i>bud27Δ</i> transformada con plásmidos que expresan diferentes alelos de <i>BUD27</i> .....	124
<b>Figura R17.</b> La fosforilación y desfosforilación de Maf1 no depende de la localización de Bud27.....	125
<b>Figura R18.</b> Análisis <i>in vivo</i> de la localización celular de Maf1.....	126
<b>Figura R19.</b> Esquema general de las zonas de hibridación de los cebadores utilizados en los ensayos de RT-qPCR para detectar formas inmaduras (pre-ARNt) y maduras (ARNt). ....	127
<b>Figura R20.</b> Análisis de los niveles de acumulación de las formas inmadura (pre-Leu3) y madura (Leu3) del ARNt-Leu3 (CAA) mediante RT-qPCR. ....	128
<b>Figura R21.</b> Análisis de los niveles de expresión de la forma inmadura del ARNt-Ile (TAT) mediante RT-qPCR. ....	129
<b>Figura R22.</b> Análisis de los niveles de expresión de las formas inmadura (pre-Trp) y madura (Trp) del ARNt-Trp (CCA) mediante RT-qPCR.. ....	130

<b>Figura R23.</b> Estudio del crecimiento del mutante <i>bud27Δ</i> y mutantes de genes para distintas kinasas y fosfatasas de la vía TOR. ....	132
<b>Figura R24.</b> Estudio del crecimiento del mutante <i>bud27Δ</i> y mutantes de genes para distintas kinasas y fosfatasas de la vía TOR. ....	133
<b>Figura R25.</b> Estudio del perfil de desfosforilación de Maf1 en el mutante <i>bud27Δ</i> , en mutantes de kinasas y fosfatasas de la vía TOR y en mutantes dobles. ....	135
<b>Figura R26.</b> Análisis de la cinética de desfosforilación de Maf1 en cepas mutantes simples <i>bud27Δ</i> y <i>pph3Δ</i> y de la cepa doble mutante <i>pph3Δ bud27Δ</i> tras el tratamiento con rapamicina.....	136
<b>Figura R27.</b> Estudio de la sensibilidad a drogas que provocan daño en ADN.....	138
<b>Figura R28.</b> Estudio de la respuesta a daño en el ADN dependiente de Bud27 y PP4.. ....	140
<b>Figura R29.</b> Purificación del complejo PP4 en cepas <i>bud27Δ</i> y silvestre mediante purificación TAP.....	142
<b>Figura R30.</b> Análisis de la estabilidad del complejo PP4 en cepas <i>bud27Δ</i> y silvestre. ....	143
<b>Figura R31.</b> Inmunolocalización de la subunidad Pph3-HA mediante microscopía de fluorescencia. ....	145
<b>Figura R32.</b> Inmunolocalización de la subunidad Psy2 mediante microscopía de fluorescencia. ....	146
<b>Figura R33.</b> Inmunolocalización de la subunidad Psy4 mediante microscopía de fluorescencia.....	147
<b>Figura R34.</b> Estudio de la interacción entre Bud27 y Pph3.....	149
<b>Figura R35.</b> Análisis de la estequiometría de las subunidades de la enzima ARN pol III identificadas mediante espectrometría de masas cuantitativa. ....	156
<b>Figura R36.</b> Análisis de la estequiometría de los factores de transcripción basales de la ARN pol III identificados mediante espectrometría de masas cuantitativa.....	158
<b>Figura R37.</b> Análisis de los niveles de otras proteínas relacionadas con la transcripción de la ARN pol III o el metabolismo de los ARNts.....	161

<b>Figura R38.</b> Representación gráfica del análisis global de los niveles de las proteínas identificadas mediante ProteomChIP y espectrometría de masas. ....	163
<b>Figura R39.</b> Análisis de categorías funcionales (GO procesos biológicos) a partir de los datos obtenidos de los experimentos de ProteomChIP. ....	165
<b>Figura R40.</b> Análisis de la fosforilación de Rpc53. ....	167



# **Resumen/Summary**





## **RESUMEN**

La prefoldina-*like* URI (ortólogo humano de Bud27) fue inicialmente descubierta como una proteína que interacciona físicamente con la subunidad común de las tres ARN polimerasas, RPB5 (Dorjsuren et al., 1998). Otras funciones se han descrito posteriormente tanto para URI como para Bud27. En el caso de Bud27, se ha demostrado su participación en el inicio de la traducción o la modulación en la expresión de genes relacionados con la asimilación de nutrientes, a través de la ruta TOR (Deplazes et al., 2009; Gstaiger et al., 2003).

El grupo del Dr. Navarro ha caracterizado otras funciones importantes de Bud27, en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Se ha demostrado que Bud27 participa en el ensamblaje citoplasmático de las tres ARN polimerasas, en una vía dependiente de Rpb5 (Mirón-García et al., 2013). Por otra parte, Bud27 se asocia a la cromatina interaccionando físicamente con el remodelador de cromatina RSC y favorece la elongación de la transcripción de la ARN polimerasa (pol) II (Mirón-García et al., 2014). Además, el grupo del Dr. Navarro ha demostrado que Bud27 regula la transcripción de genes de proteínas ribosómicas (RPs) y RiBis (*Ribosome Biogenesis*), todos ellos transcritos necesarios para la biogénesis de ribosomas (Martínez-Fernández et al., 2020). De igual manera, otros autores han establecido una correlación entre Bud27, la ARN pol III y el complejo RSC (Vernekar and Bhargava, 2015).

En el presente trabajo se demuestra el papel de Bud27 en otras funciones celulares. Por un lado, Bud27 actúa como un regulador de la actividad de las tres ARN polimerasas, probablemente a través de la ruta TOR, mediando la síntesis de los componentes necesarios para la biogénesis de ribosomas. Por otro lado, Bud27 participa en el proceso de represión de la ARN pol III por parte de Maf1, a través del control de la actividad de la fosfatasa PP4. Por último, se ha abordado el papel que Bud27 puede ejercer sobre la actividad de la maquinaria transcripcional de la ARN pol III.

## **Bud27 influye en la transcripción de las tres ARN polimerasas y en la biogénesis de ribosomas, probablemente a través de la vía TOR**

En el presente estudio se muestra que Bud27 participa en la transcripción de las tres ARN polimerasas para modular la biogénesis de ribosomas. La biogénesis de ribosomas es un proceso que está regulado por la vía TOR y por la disponibilidad de nutrientes (Mayer and Grummt, 2006). Además, requiere la coordinación de la actividad de las tres ARN polimerasas para asegurar una adecuada proporción de todos los transcritos necesarios (Lempiäinen and Shore, 2009). Esta regulación de las tres ARN polimerasas es posible gracias a la existencia

de mecanismos de *cross-talk*, que permiten modular de forma conjunta la actividad de estas enzimas en función de las condiciones del medio.

Previamente, el grupo del Dr. Navarro demostró el papel de Bud27 sobre la elongación de la transcripción de la ARN pol II (Mirón-García et al., 2014). Además, ha demostrado que Bud27 se une a los genes de RPs, y RiBis, y que la falta de Bud27 provoca una menor ocupación de la ARN pol II en esos mismos genes y una drástica caída de su expresión (Martínez-Fernández et al., 2020). En el presente trabajo se muestra que la ausencia de Bud27 provoca, además, una menor interacción entre la ARN pol II y el factor de elongación Spt5 (Figura R5).

Por otro lado, nuestros datos indican que la falta de Bud27 provoca una menor ocupación de la ARN pol III en sus genes diana, coincidiendo con lo descrito por otros autores (Vernekar and Bhargava, 2015). Como consecuencia, se produce una menor síntesis y acumulación de estos transcritos, y probablemente una alteración de su procesamiento (Martínez-Fernández et al., 2020; Vernekar and Bhargava, 2015). La menor síntesis de transcritos de la ARN pol III provocada por la ausencia de Bud27 no parece ser causada exclusivamente por los defectos en el ensamblaje de la enzima (Martínez-Fernández, 2016).

Bud27 modula la síntesis y/o el procesamiento de transcritos de la ARN pol I (Martínez-Fernández et al., 2020). A diferencia de su efecto sobre las otras dos ARN polimerasas, la falta de Bud27 provoca una mayor ocupación de la ARN pol I en las unidades transcripcionales de ADN ribosómico, además de un posible defecto en la procesividad de la enzima. Bud27 podría facilitar la interacción de la ARN pol I con factores remodeladores de cromatina, con factores de elongación y/o regular la cantidad de copias de ADN ribosómico (ADNr) transcripcionalmente activas.

En conjunto, nuestros datos indican que Bud27 regula la actividad, posiblemente mediante mecanismos diferentes, de las tres ARN polimerasas con el fin de sintetizar los transcritos necesarios para la biogénesis ribosomal. Teniendo en cuenta que la biogénesis de ribosomas está directamente vinculada a la vía TOR y a la disponibilidad de nutrientes, parte de la función de Bud27 en este proceso podría deberse a su participación como un elemento de la cascada de señalización de la vía TOR (Figura R9) (Gstaiger et al., 2003; Martínez-Fernández et al., 2020). Además, se podría especular que Bud27 coordina las tres ARN polimerasas a través su subunidad común Rpb5, ya que ambas proteínas interaccionan física y funcionalmente (Dorjsuren et al., 1998; Gstaiger et al., 2003; Mirón-García et al., 2013; Mirón-García et al., 2014).

### **Bud27 modula la represión de la ARN pol III a través de la fosfatasa de Maf1, PP4.**

La represión de la actividad transcripcional de la ARN pol III se lleva a cabo gracias al regulador negativo Maf1 (Boguta, 2013). Se trata de una proteína cuya actividad está controlada principalmente a través de la vía TOR mediante un mecanismo de fosforilación (Boguta, 2013). La forma fosforilada de Maf1 es inactiva y se localiza mayoritariamente en el citoplasma. Cuando se produce la desfosforilación de Maf1, esta se transloca al núcleo donde ejerce su función represora uniéndose físicamente a la ARN pol III (Boguta, 2013; Moir and Willis, 2013). El control del estado de fosforilación de Maf1 ocurre gracias a un balance entre la actividad de sus kinasas y fosfatasas (Boguta, 2013; Moir and Willis, 2013). Cuando las condiciones de crecimiento son óptimas, las kinasas son más activas, manteniendo a Maf1 fosforilado e inactivo (Boguta, 2013; Moir and Willis, 2013). Cuando las condiciones son adversas y la ruta TOR se bloquea, las kinasas se inhiben y se activan las fosfatasas que actúan sobre Maf1 para promover la rápida represión de la ARN pol III (Boguta, 2013; Moir and Willis, 2013).

En el presente trabajo, demostramos que Bud27 es un elemento fundamental en el proceso de represión de la ARN pol III. La ausencia de Bud27 provoca una mayor proporción de la forma fosforilada de Maf1, así como un defecto de la cinética de desfosforilación tras un bloqueo de la vía TOR (ver capítulo II de Resultados, apartado 1). Del mismo modo, Bud27 parece jugar un papel en la translocación de Maf1 hacia el núcleo (Figura R18). Como consecuencia, la represión de la ARN pol III en células carentes de Bud27 no se lleva a cabo de manera adecuada (Figura R20, 21 y 22).

Bud27 actúa junto con la fosfatasa PP4 para regular la actividad de Maf1 y controlar así la transcripción de la ARN pol III (Figura R26). PP4 se ha descrito como la principal fosfatasa de Maf1, actuando ante diversas señales de estrés para reprimir rápidamente la actividad de la ARN pol III (Oler and Cairns, 2012). En el presente trabajo demostramos que Bud27 se asocia con PP4 y actúa directamente sobre el complejo modulando su actividad (Figura R34). En base a nuestros datos, proponemos un modelo en el que Bud27 controla directamente la actividad de PP4, cooperando en el reconocimiento del sustrato Maf1 y favoreciendo, probablemente, una asociación tripartita Bud27-PP4-Maf1. Cabe la posibilidad de que Bud27, en su función cochaperona, promueva algún cambio conformacional en PP4 favoreciendo un estado activo.

### **Bud27 podría participar en la formación de los complejos transcripcionales de la ARN pol III**

La ARN pol III es la encargada de sintetizar los ARN transferentes, el ARN ribosómico 5S y otros ARNs no codificantes con diferentes funciones. La transcripción mediada por la ARN pol III es un proceso muy regulado que necesita, además de la propia enzima, otros elementos como los factores de transcripción basales TFIIIA, TFIIIB y TFIIIC, remodeladores de cromatina y otras proteínas accesorias como Nab2 o Sub1 (Acker et al., 2013).

Nuestro grupo y otros autores hemos demostrado que la delección de *BUD27* provoca defectos transcripcionales de la ARN pol III (Gstaiger et al., 2003; Martínez-Fernández et al., 2020; Vernekar and Bhargava, 2015). Dado que estos defectos transcripcionales en el mutante *bud27Δ* no están provocados por problemas de ensamblaje de la enzima, ni por una mayor represión de la actividad transcripcional por parte de Maf1, en el presente trabajo decidimos abordar el estudio de la composición de la maquinaria transcripcional de la ARN pol III. Para ello, se empleó la técnica de ProteomChIP, que permite el análisis de complejos transcripcionales asociados a la cromatina, mediante espectrometría de masas cuantitativa (Hierlmeier et al., 2013). De este modo, se comparó la maquinaria transcripcional de la ARN pol III en una cepa silvestre con el mutante *bud27Δ*. Por otra parte, también se analizó el estado de fosforilación de la subunidad Rpc53, dado que se trata de un indicador de represión de la ARN pol III.

Este estudio de la maquinaria transcripcional de la ARN pol III sugiere posibles alteraciones en la composición de subunidades de la enzima (Figura R35), lo que podría estar provocando problemas en la conformación y/o estabilidad de la ARN pol III. Por otro lado, nuestros datos muestran un incremento en la cantidad de Tfc6, componente del complejo TFIIIC, en células carentes de Bud27 (Figura R36). El factor de transcripción TFIIIC es esencial para el reconocimiento del promotor, el reclutamiento del complejo TFIIIB y la formación del complejo de preiniciación (Lassar et al., 1983; Schultz et al., 1989). Este proceso podría estar alterado en los mutantes *bud27Δ*. Además, se ha propuesto que el complejo TFIIIC se disocia a medida que la ARN pol III avanza por el ADN molde durante el proceso transcripcional (Bardleben et al., 1994; Kassavetis et al., 1990; Roberts et al., 2003), por lo que la falta de Bud27 podría estar provocando defectos en la elongación de la ARN pol III, haciendo que el factor TFIIIC no se disocie.

Los datos de ProteomChIP del presente trabajo también muestran posibles alteraciones de otras proteínas que intervienen en el proceso transcripcional de la ARN pol III. Se observó una mayor cantidad del factor remodelador de cromatina Isw2 en el entorno cromatínico de la ARN pol III de los mutantes *bud27Δ* (Figura R37). Isw2 se ha relacionado

con un mayor posicionamiento de nucleosomas en las regiones adyacentes a los genes de la ARN pol III, lo que implica menor actividad transcripcional (Whitehouse and Tsukiyama, 2006; Yadon et al., 2010). En este sentido, datos de MNasa-seq del grupo del Dr. Navarro sugieren que en el mutante *bud27Δ* hay un mayor posicionamiento de nucleosomas aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción, al menos para los genes de ARNt. En su conjunto, estos datos plantean la posibilidad de que Bud27 podría favorecer una conformación de la cromatina adecuada para la transcripción de la ARN pol III.

De entre las 17 subunidades de la ARN pol II, la subunidad Rpc53 se fosforila durante el proceso de represión de la ARN pol III en respuesta a condiciones de crecimiento adversas (Lee et al., 2012). Rpc53 está relacionada con el reconocimiento de la señal de terminación de los genes e interviene, junto con las subunidades Rpc37 y Rpc11, en el reciclaje de la ARN pol III hacia el promotor (Landrieux et al., 2006; Vannini et al., 2010). Curiosamente, el proceso de fosforilación de Rpc53 está alterado en ausencia de Bud27 (Figura R40). Dado que la falta de Rpc53 provoca defectos de terminación, se produce una mayor síntesis de transcritos aberrantes o *readthroughs* por parte de la ARN pol III (Landrieux et al., 2006). La delección de *BUD27* también conllevó una mayor cantidad de la proteína Rrp6 en el entorno cromatínico de la ARN pol III (Figura R37), componente del complejo exosoma, encargado de la degradación de los transcritos aberrantes o *readthroughs* (Turowski et al., 2016).

Estos datos sugieren que la falta de Bud27 podría estar provocando una alteración en la conformación de la subunidad Rpc53, o de su proceso de fosforilación por parte de las quinasas controladas por la vía TOR, produciendo defectos en el reconocimiento de la señal de terminación de los genes y/o en el reciclaje de la enzima. No obstante, todas las hipótesis mencionadas deben ser exploradas con detalle.

### **SUMMARY**

The prefoldin-like URI (human orthologue of Bud27) was initially discovered as a protein that physically interacts with the common subunit of the three RNA polymerases, RPB5 (Dorjsuren et al., 1998). Other functions have subsequently been described for this protein and for Bud27, such as the participation in translation initiation and the modulation of gene expression related to nutrient assimilation through the TOR pathway by Bud27 (Deplazes et al., 2009; Gstaiger et al., 2003).

Dr. Navarro's group has characterized other important roles of Bud27. It participates in the cytoplasmic assembly of the three RNA polymerases in an Rpb5-dependent manner (Mirón-García et al., 2013). Moreover, Bud27 associates with chromatin through the interaction with RSC. Thus, Bud27 promotes the RNA polymerase (pol) II transcription elongation (Mirón-García et al., 2014). In addition, Dr. Navarro's group has demonstrated that Bud27 regulates the transcription of ribosomal protein genes (RPs) and RiBis (*Ribosome Biogenesis*), which are necessary for ribosome biogenesis (Martínez-Fernández et al., 2020). Similarly, other authors have established a correlation between Bud27, RNA pol III and the RSC complex (Vernekar and Bhargava, 2015).

In the present work, we demonstrate the role of Bud27 in other cellular functions. On the one hand, Bud27 regulates the activity of the three RNA polymerases, probably through the TOR pathway, mediating the synthesis of the components necessary for ribosome biogenesis. On the other hand, Bud27 participates in RNA pol III transcription repression by Maf1, by controlling PP4 phosphatase activity. Finally, the role that Bud27 may exert on the activity of the RNA pol III transcription machinery has been addressed.

### **Bud27 influences the transcription of the three RNA polymerases and ribosome biogenesis, probably through the TOR pathway**

The present study shows that Bud27 participates in the transcription of the three RNA polymerases to modulate ribosome biogenesis. Ribosome biogenesis is a process regulated by the TOR pathway and nutrient availability (Mayer and Grummt, 2006). In addition, it requires the coordination of the three RNA polymerases activity to ensure an adequate ratio of all necessary transcripts (Lempiäinen and Shore, 2009). The existence of cross-talk mechanisms regulating the activity of the three RNA polymerases may allow their coordination depending on growth conditions.

Previously, Dr. Navarro's group demonstrated the role of Bud27 in the RNA pol II transcription elongation (Mirón-García et al., 2014). Furthermore, it has been shown that

## Summary

Bud27 binds to RPs and RiBi genes, and that Bud27 absence causes a lower occupancy of RNA pol II in those same genes and a drastic drop in their expression (Martínez-Fernández et al., 2020). The present work shows that the lack of Bud27 also causes a reduced interaction between RNA pol II and the elongation factor Spt5 (Figure R5).

Moreover, our data show that the lack of Bud27 causes a lower occupancy of RNA pol III in its target genes, in agreement with other authors (Vernekar and Bhargava, 2015). Therefore, there is a lower synthesis rate and accumulation of these transcripts, and probably an alteration of their processing (Martínez-Fernández et al., 2020; Vernekar and Bhargava, 2015). The reduced synthesis of RNA pol III transcripts in the absence of Bud27 does not appear to be driven exclusively by defects in enzyme assembly (Martínez-Fernández, 2016).

Bud27 modulates the synthesis and processing of RNA pol I transcripts (Martínez-Fernández et al., 2020). In contrast to the other two RNA polymerases, the absence of Bud27 results in increased occupancy of RNA pol I in the rDNA transcriptional units and in a possible defect in the processivity of the enzyme. Bud27 could facilitate the interaction of RNA pol I with chromatin remodelling factors, elongation factors, and/or regulate the amount of transcriptionally active rDNA copies.

Altogether, our data indicate that Bud27 regulates the activity, possibly by different mechanisms, of the three RNA polymerases to synthesize the transcripts required for ribosome biogenesis. Since ribosome biogenesis is directly linked to the TOR pathway and nutrient availability, part of the function of Bud27 in this process may be due as an element of the TOR signalling pathway (Figure R9) (Gstaiger et al., 2003; Martínez-Fernández et al., 2020). Furthermore, we speculate that Bud27 coordinates the three RNA polymerases through their common subunit Rpb5, since both proteins physically and functionally interact (Dorjsuren et al., 1998; Gstaiger et al., 2003; Mirón-García et al., 2013; Mirón-García et al., 2014).

### **Bud27 modulates the repression of RNA pol III through the Maf1 phosphatase, PP4**

The negative regulator Maf1 carries out repression of RNA pol III transcriptional activity (Boguta, 2013). Maf1 activity is mainly controlled *via* the TOR pathway by a phosphorylation mechanism (Boguta, 2013). The phosphorylated form of Maf1 is inactive and mainly localized in the cytoplasm. Maf1 dephosphorylation triggers Maf1 translocation into the nucleus to exert its repressor activity by physically binding to RNA pol III (Boguta, 2013; Moir and Willis, 2013). The control of the phosphorylation state of Maf1 occurs through a balance between the activity of kinases and phosphatases (Boguta, 2013; Moir and Willis, 2013). Under optimal growth conditions, kinases are more active, keeping Maf1 phosphorylated and inactive (Boguta, 2013;

## Summary

Moir and Willis, 2013). When conditions are adverse, and the TOR pathway is blocked, kinases are inhibited, and phosphatases acting on Maf1 are activated to promote rapid repression of RNA pol III (Boguta, 2013; Moir and Willis, 2013).

In the current work, we demonstrate that Bud27 is an important element to repress RNA pol III transcription. The lack of Bud27 results in increased levels of the phosphorylated form of Maf1, as well as in dephosphorylation kinetics defects following TOR pathway inhibition (see Results chapter II, section 1). Similarly, Bud27 seems to play a role in the translocation of Maf1 into the nucleus (Figure R18). Consequently, repression of RNA pol III in cells lacking Bud27 is not carried out properly (Figure R20, 21 and 22).

Bud27 acts together with the phosphatase PP4 to regulate Maf1 activity and thus control RNA pol III transcription (Figure R26). PP4 has been described as the main phosphatase of Maf1, acting upon various stress signals to repress RNA pol III activity quickly (Oler and Cairns, 2012). In this regard, we demonstrate that Bud27 associates with PP4 and acts modulating its phosphatase activity (Figure R34). Based on our data, we propose a model in which Bud27 directly controls PP4 activity, cooperating in the recognition of the Maf1 substrate and probably facilitating a tripartite Bud27-PP4-Maf1 association. It is possible that Bud27, as a cochaperone, modulates some conformational change in PP4 to promote an active state.

### **Bud27 could influence the formation of RNA pol III transcriptional complexes**

RNA pol III carries out the synthesis of transfer RNAs, 5S ribosomal RNA and other non-coding RNAs with different functions. RNA pol III-mediated transcription is a highly regulated process that requires, in addition to the enzyme itself, other elements such as the basal transcription factors TFIIIA, TFIIIB and TFIIIC, chromatin remodelers and other accessory proteins such as Nab2 or Sub1 (Acker et al., 2013).

Our group and other authors have shown that deletion of *BUD27* causes several defects in RNA pol III transcription (Gstaiger et al., 2003; Martinez-Fernandez et al., 2020; Vernekar and Bhargava, 2015). Since these transcriptional defects in the *bud27Δ* mutant are not caused by enzyme assembly problems, nor increased repression of transcriptional activity by Maf1, we decided to address the study of the composition of the RNA pol III transcriptional machinery. For this purpose, we employed the ProteomChIP technique, which allows the analysis of chromatin-associated transcriptional complexes by quantitative mass spectrometry (Hierlmeier et al., 2013). In this way, the transcriptional machineries of RNA pol III in a wild

## Summary

type strain and *bud27Δ* mutant were compared. In addition, the phosphorylation status of the Rpc53 subunit was also analyzed, since it is an indicator of RNA pol III repression.

This study of the RNA pol III transcriptional machinery suggests possible alterations in the subunit composition of the enzyme (Figure R35), which could cause problems in the conformation and/or stability of RNA pol III. On the other hand, our data show an increase in the amount of Tfc6, a component of the TFIIIC complex, in cells lacking Bud27 (Figure R36). The transcription factor TFIIIC is essential for promoter recognition, recruitment of the TFIIIB complex and formation of the preinitiation complex (Lassar et al., 1983; Schultz et al., 1989). These processes could be altered in *bud27Δ* mutant. In addition, it has been proposed that the TFIIIC complex dissociates when RNA pol III proceeds through the DNA template during the transcriptional process (Bardleben et al., 1994; Kassavetis et al., 1990; Roberts et al., 2003). Thus, the absence of Bud27 could cause defects in RNA pol III elongation, by impairing the dissociation of the TFIIIC factor from chromatin.

Our ProteomChIP data also suggest possible alterations of other proteins involved in the RNA pol III transcription process. An increased amount of the chromatin remodeling factor Isw2 was observed in the chromatin environment of RNA pol III of *bud27Δ* mutant (Figure R37). Isw2 has been linked to increased nucleosome positioning in regions adjacent to RNA pol III genes, causing lower transcriptional activity (Whitehouse and Tsukiyama, 2006; Yadon et al., 2010). In this regard, MNase-seq data from Dr. Navarro's group suggest that in the *bud27Δ* mutant, there is increased nucleosome positioning upstream of the transcriptional start site, at least for tRNA genes. Overall, these data raise the possibility that Bud27 might contribute to a chromatin conformation suitable for RNA pol III transcription.

The Rpc53 subunit is phosphorylated during RNA pol III transcription repression in response to adverse growth conditions (Lee et al., 2012). Rpc53 is involved in gene termination signal recognition, and it participates, together with the Rpc37 and Rpc11 subunits, in the recycling of RNA pol III back to the promoter (Landrieux et al., 2006; Vannini et al., 2010). Interestingly, the phosphorylation process of Rpc53 is altered in the absence of Bud27 (Figure R40). On the other hand, lack of Rpc53 leads to increased synthesis of readthrough transcripts by RNA pol III (Landrieux et al., 2006). Deletion of *BUD27* also led to an increased amount of the Rrp6 protein in the chromatin environment of RNA pol III (Figure R37), which is a component of the exosome complex, responsible for the degradation of readthrough transcripts (Turowski et al., 2016).

These data suggest that the lack of Bud27 could cause an alteration in the conformation of the Rpc53 subunit, or its phosphorylation process by kinases controlled by the TOR

## ***Summary***

pathway, producing defects in the recognition of the gene termination signal and/or in the recycling of the enzyme. However, all of the above hypotheses need to be explored in detail.

# Introducción





## INTRODUCCIÓN

### 1. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un hongo unicelular perteneciente a la división *Ascomycota*, utilizado desde hace miles de años para la fabricación de vino, cerveza y pan y en la actualidad también como modelo de investigación científica (Satyanarayana and Kunze, 2009). Su genoma fue completamente secuenciado en el año 1996, siendo el primero entre los organismos eucariotas (Goffeau et al., 1997). *S. cerevisiae* tiene un genoma de 12 Mb, repartidas en 16 cromosomas y con unos 6000 genes, además del ADN mitocondrial y un plásmido 2 $\mu$  que se encuentra en muchas de las cepas (Futcher and Cox, 1983).

*S. cerevisiae* puede existir en forma de tres tipos celulares diferentes. Dos de ellos son haploides y pueden aparearse entre sí, llamados “a” y “ $\alpha$ ”. El locus *MAT* determina el tipo sexual de las células en función del alelo que posean. Así, si las células poseen el alelo *MAT<sub>a</sub>* serán del tipo “a” y si por el contrario poseen el alelo *MAT $\alpha$*  serán del tipo “ $\alpha$ ” (Herskowitz, 1988). El tipo otro tipo celular es el diploide a/ $\alpha$ , que no puede aparearse con ningún otro tipo celular pero sí que puede dividirse por meiosis. El ciclo de vida de *S. cerevisiae* tiene dos fases bien diferenciadas. Durante la fase asexual o vegetativa, las células (haploides o diploides) se dividen por gemación, dando lugar a clones idénticos. Durante la fase sexual, dos células haploides de diferente tipo sexual se aparean para formar el diploide a/ $\alpha$ . Si las condiciones del medio son adversas (bajo contenido en nitrógeno y carbono), las células diploides realizan la meiosis y se forman cuatro esporas haploides, dos de tipo “a” y otras dos de tipo “ $\alpha$ ” (Herskowitz, 1988).

*S. cerevisiae* es un organismo mesófilo. Su temperatura de crecimiento óptima está en 30°C, y su pH entre 4 y 5. Mientras hay disponibilidad de nutrientes, las células estarán creciendo de manera exponencial con un metabolismo fermentativo. Cuando se agotan las fuentes de carbono fermentables, las levaduras pasan a realizar la respiración celular, entrando en una fase del crecimiento llamada estacionaria. Durante esta fase, si siguen escaseando los nutrientes, las levaduras no se dividen exponencialmente sino que su crecimiento se ralentiza o incluso se detiene (Esser and Lemke, 1994).

El hecho de que se trate de un organismo cuyo genoma ha sido completamente secuenciado, así como su fácil manejo y manipulación, lo han convertido en un modelo fundamental para la investigación biológica (Karathia et al., 2011). Además, cuenta con la ventaja de que la mayor parte de sus genes codificantes tienen una alta homología con eucariotas superiores (Kachroo et al., 2015).

## 2. La transcripción en eucariotas. ARN polimerasas

La transcripción es un proceso altamente controlado y sincronizado, que implica la participación de las ARN polimerasas y de multitud de proteínas, entre las que se encuentran factores de iniciación, elongación y terminación así como diversas proteínas reguladoras activadoras o represoras.

Las ARN polimerasas están muy conservadas a lo largo de la evolución (Werner, 2008; Werner and Grohmann, 2011). Mientras que las bacterias, arqueas y virus tan solo cuentan con un tipo de ARN polimerasa (ARN pol), los eucariotas cuentan con tres tipos diferentes, cada una de las cuales ha evolucionado para especializarse en transcribir un grupo de genes determinado (Cramer et al., 2008). Las plantas cuentan, además, con las ARN polimerasas IV y V, las cuales no han sido descritas en ningún otro grupo de organismos (Haag and Pikaard, 2011). Así, la ARN pol I sintetiza el ARN ribosómico (ARNr) 35S. La ARN pol II sintetiza los ARN mensajeros (ARNm) y otros transcritos no codificantes. La ARN pol III sintetiza los ARN transferentes (ARNt), el ARNr 5S y otros ARNs no codificantes. Por último, las ARN polimerasas IV y V sintetizan ARNs pequeños de interferencia o ARNsi, que participan en el silenciamiento y la regulación de la expresión génica (Haag and Pikaard, 2011).

Todas las ARN polimerasas están relacionadas evolutivamente entre sí y comparten bastante homología con la ARN pol bacteriana, la cual se compone de las subunidades  $\alpha\beta\beta'\omega$  (Wild and Cramer, 2012). Las ARN polimerasas de *S. cerevisiae* han sido objeto de estudio durante mucho tiempo y han sido ampliamente caracterizadas. Las ARN pol I, II y III contienen 14, 12 y 17 subunidades respectivamente (Cramer et al., 2008). Dichas subunidades pueden clasificarse en cuatro grupos diferentes (Tabla I1):

1. El esqueleto base o *core*, compuesto por cinco subunidades que tienen alta homología con la ARN pol bacteriana  $\alpha\beta\beta'\omega$ . Son las que tienen la actividad catalítica.
2. Subunidades propias, que solo están presentes en eucariotas y arqueas: Rpb5, Rpb10 y Rpb12 en las tres ARN polimerasas. La subunidad Rpb8 se encuentra en eucariotas y tiene homología con la subunidad RpoG de algunas arqueas. En la ARN pol I se encuentran también Rpa14, Rpa43 y Rpa12; en la ARN pol II, Rpb4, Rpb7, Rpb9 y Rpb11; en la ARN pol III, Rpc17, Rpc25 y Rpc11.
3. Subunidades específicas. La ARN pol I tiene Rpa49 y Rpa34.5. La ARN pol III tiene Rpc82, Rpc53, Rpc37, Rpc34 y Rpc31.
4. Subunidades comunes. Son cinco: Rpb5, Rpb6, Rpb8, Rpb10 y Rpb12 (Martínez-Fernández et al., 2018a; Woychik et al., 1990).

Las subunidades de las tres ARN polimerasas eucariotas, así como las de la ARN pol bacteriana y de arqueas se muestran en la Tabla I1.

Eucariotas			Arqueas	Bacterias
ARN pol I	ARN pol II	ARN pol III		
Rpa190	Rpb1	Rpc160	Rpo1 (RpoA)	$\beta'$
Rpa135	Rpb2	Rpc128	Rpo2 (RpoB)	$\beta$
Rpac40	Rpb3	Rpac40	Rpo3 (RpoD)	$\alpha$
Rpac19	Rpb11	Rpac19	Rpo11(RpoL)	$\alpha$
Rpb5	Rpb5	Rpb5	Rpo15 (RpoH)	
Rpb6	Rpb6	Rpb6	Rpo6 (RpoK)	$\omega$
Rpb8	Rpb8	Rpb8	Rpo8 (RpoG)	
Rpb10	Rpb10	Rpb10	Rpo10 (RpoN)	
Rpb12	Rpb12	Rpb12	Rpo12 (RpoP)	
Rpa12	Rpb9	Rpc11		
Rpa14	Rpb4	Rpc17	Rpo4 (RpoF)	
Rpa43	Rpb7	Rpc25	Rpo7 (RpoE)	
Rpa49		Rpc53		
Rpa34.5		Rpc37		
		Rpc82		
		Rpc34		
		Rpc31		
			Rpo13	

**Tabla I1. Subunidades que componen las tres ARN polimerasas en *S. cerevisiae*, arqueas y bacterias.** Entre paréntesis se encuentran los nombres alternativos para las subunidades.

### 2.1. ARN pol I

La ARN pol I se encarga de la síntesis del ARNr 35S, que tras su procesamiento, dará lugar, en levaduras, a las formas de ARNr 25S, 18S y 5,8S (Houseley and Tollervey, 2009). Tiene 14 subunidades y un peso molecular de 589 kDa, y el ARNr que sintetiza representa el 80% del ARN total de la célula (Warner, 1999). Es la ARN polimerasa más activa, realizando alrededor del 60% de la actividad transcripcional total de la célula (Roberts et al., 2006a; Warner, 1999). En *S. cerevisiae*, el núcleo de la enzima está formado por las dos subunidades mayores, Rpa190 y Rpa135, que contactan directamente con el ADN y forman la hendidura o

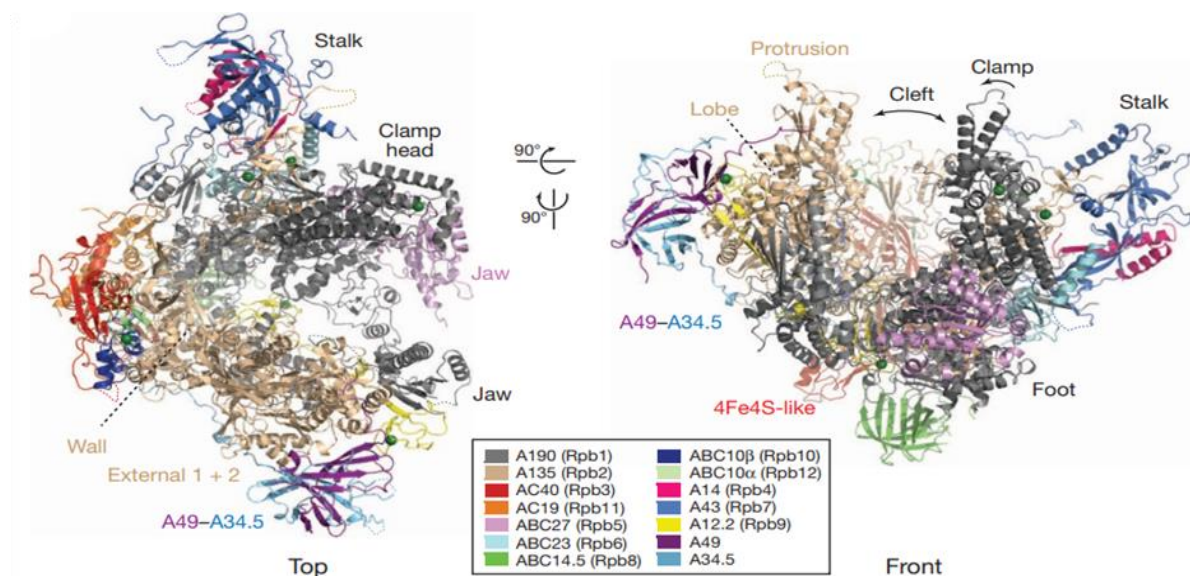
*cleft*, y por las cinco subunidades comunes de las tres ARN polimerasas (Rpb5, Rpb6, Rpb8, Rpb10 y Rpb12). También forma parte del núcleo el heterodímero Rpac40/Rpac19 y la subunidad Rpa12. El dímero Rpac40/Rpac19 también está presente en la ARN pol III y comparte homología con las subunidades de la ARN pol II Rpb3 y Rpb11, respectivamente. Se ha propuesto que su función es la de servir de plataforma para el ensamblaje del resto de subunidades de la enzima (Fernández-Tornero et al., 2013). La subunidad Rpa12 participa en la escisión del ARN naciente (Fernández-Tornero et al., 2013; Kuhn et al., 2007). La ARN pol I cuenta con dos subunidades específicas, el heterodímero Rpa49/Rpa34.5, relacionado con el heterodímero Rpc37/Rpc53 en la ARN pol III y con el factor de iniciación TFIIF en la ARN pol II (Engel et al., 2013; Fernández-Tornero et al., 2013). El heterodímero Rpa49/Rpa34.5 se sitúa en la parte superior de la ARN pol I, contactando con Rpac40 y estabilizando a Rpa12 (Engel et al., 2013). Además, la subunidad Rpa49 tiene un dominio C-terminal tWH (del inglés, *tandem winged helix*), que presenta homología con Rpc34 y con el factor de transcripción TFIIE (Fernández-Tornero et al., 2013). Por último, el tallo o *stalk*, formado por el heterodímero Rpa14/Rpa43, se sitúa cerca del núcleo de la enzima y tiene una alta homología con los heterodímeros Rpb4/Rpb7 en la ARN pol II y Rpc17/Rpc25 en la ARN pol III (Fernández-Tornero et al., 2013; Peyroche et al., 2002; Siaut et al., 2003; Zaros and Thuriaux, 2005). La estructura de la ARN pol I se muestra en la Figura I1.

Durante el proceso transcripcional, la ARN pol I es reclutada en los promotores de los genes 35S gracias a la interacción física entre la subunidad Rpa43 y el factor de transcripción Rrn3 (Peyroche et al., 2000). Para la iniciación de la transcripción, además de la interacción Rpa43-Rrn3, la ARN pol I necesita de otros factores de transcripción como UAF (*Upstream Activator Factor*), la proteína de unión a TATA, o TBP (*TATA Binding Protein*), o el *Core Factor* (CF), formado por Rrn7, Rrn6 y Rrn11 (Keener et al., 1998). Los factores UAF y TBP actúan como activadores, mientras que el complejo CF es imprescindible para la transcripción (Keener et al., 1998). Por tanto, la formación del complejo ARN pol I-Rrn3-CF es esencial para que la ARN pol I se sitúe en la zona promotora y comience la transcripción (Bedwell et al., 2012). Durante la elongación, la ARN pol I también necesita la presencia de otros factores de transcripción. El factor de transcripción Spt5 se asocia físicamente con la ARN pol I y con Rrn3, y se ha sugerido que estas interacciones son importantes para la elongación de la ARN pol I (Schneider et al., 2006; Viktorovskaya et al., 2011). Del mismo modo, se ha demostrado que el factor de transcripción Hmo1 se asocia a lo largo del locus de ADN<sub>r</sub>, participando en la transcripción de la ARN pol I y en el procesamiento del ARNr 35S (Hall et al., 2006). Para la transcripción mediada por la ARN pol I, también se requiere la actividad de factores remodeladores de cromatina ATP-dependientes como RSC o SWI/SNF (Soutourina et al., 2006; Zhang et al., 2013). La terminación de la transcripción y la liberación del transcrito de

## Introducción

ARNr ocurren cuando la proteína Reb1 reconoce una señal de terminación de 61 pares de bases (Lang and Reeder, 1995; Reeder et al., 1999). Reb1 se asocia a esa región, pausando el avance de la ARN pol I y facilitando la liberación del ARNr (Lang and Reeder, 1995).

La ARN pol I existe tanto en forma monomérica como dimérica. La forma activa, capaz de interactuar con Rrn3 e iniciar la transcripción es la monomérica (Milkereit et al., 1997). Cuando las condiciones de crecimiento no son óptimas, se produce rápidamente la disociación de Rrn3 y la ARN pol I, y esta última interactúa con otra molécula de ARN pol I formando un homodímero inactivo (Torreira et al., 2017). Cuando se restablecen unas condiciones de crecimiento adecuadas, la situación se revierte y la ARN pol I vuelve a interactuar con el factor Rrn3 (Torreira et al., 2017). Se ha propuesto que las subunidades Rpa43 y Rpa14 juegan un importante papel en la regulación de la formación de los homodímeros inactivos de la ARN pol I y en la transición hacia los monómeros activos y su interacción con la región promotora de los genes (Torreira et al., 2017).



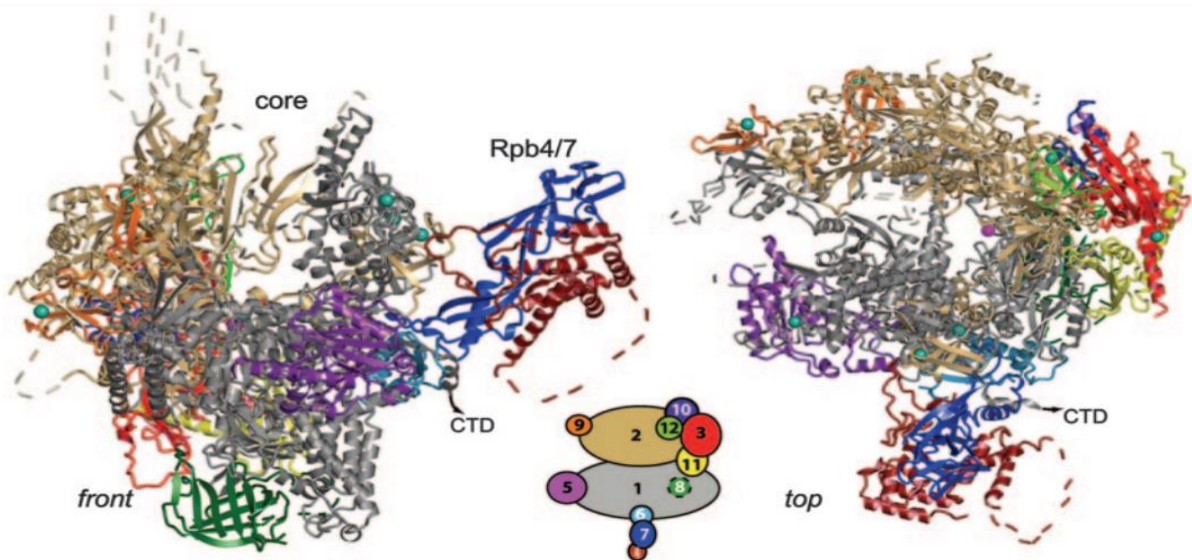
**Figura I1. Estructura cristalográfica de la ARN pol I de *S. cerevisiae*.** Esquema de las distintas subunidades que componen la ARN pol I y algunas de las regiones que forman las mismas. El cuadro contiene el código de colores para representar las subunidades. Extraído de (Fernández-Tornero et al., 2013).

Los genes 35S en *S. cerevisiae* están organizados en grupos o *clusters*, separados entre sí por regiones espaciadoras cortas que contienen el gen *RDN5* para el ARNr 5S y un origen de replicación (Planta and Raue, 1988; Warner, 1989). Se ha calculado que el número de repeticiones del gen 35S está en torno a 150, siendo la mitad de ellas transcripcionalmente activas (Cioci et al., 2003). Las condiciones de crecimiento modulan tanto la síntesis de

transcritos de ARNr 35S (Planta and Raue, 1988; Raué and Planta, 1991) como el número de copias activas de ADNr (Dammann et al., 1993; Murayama et al., 2008).

### 2.2. ARN pol II

La ARN pol II ha sido la más estudiada de todas las ARN polimerasas. Se encarga de sintetizar todos los ARNm y algunos ARNs no codificantes, como los ARN pequeños nucleares (ARNsn) o los ARN pequeños nucleolares (ARNsno) (Houseley and Tollervey, 2009). Está formada por 12 subunidades y tiene un peso molecular de 514 kDa aproximadamente (Cramer et al., 2000). La ARN pol II consta de cuatro subunidades (Rpb1, Rpb2, Rpb3 y Rpb11) que tienen sus homólogos en la ARN pol I y ARN pol III (Tabla I1), las cinco subunidades comunes y las subunidades Rpb9, Rpb4 y Rpb7, exclusivas de la ARN pol II. De todas las subunidades que la forman, todas son imprescindibles para la viabilidad celular excepto Rpb4 y Rpb9 (Woychik and Young, 1990). La subunidad Rpb4 forma, junto con Rpb7, un heterodímero (Rpb4/Rpb7) que podría disociarse del resto de la enzima en *S. cerevisiae* (Choder, 2004). El núcleo de la ARN pol II está formado por cuatro módulos móviles: núcleo o *core*, garra-lóbulo o *jaw lobe*, plataforma o *shelf* y grapa o *clamp*. La región de la grapa tiene una conformación abierta cuando el heterodímero Rpb4/Rpb7 no está ensamblado, facilitando la entrada del ADN molde al centro activo. Una vez que el dímero Rpb4/Rpb7 interacciona con el núcleo de la ARN pol II, el módulo de la grapa sufre un cambio conformacional que promueve la elongación de la transcripción (Cramer et al., 2001). La estructura de la ARN pol II se muestra en la Figura I2.



**Figura 12. Estructura cristalográfica de la ARN pol II de *S. cerevisiae*.** Se muestran las distintas subunidades que componen la ARN pol II. El esquema inferior contiene el código de colores para representar las subunidades. Extraído de (Armache et al., 2005).

La subunidad Rpb1 de la ARN pol II cuenta con un dominio carboxilo terminal exclusivo llamado CTD (C-Terminal Domain), no presente en las otras ARN polimerasas. Este dominio CTD está formado repeticiones en tándem de un heptapéptido, de secuencia  $Y_1S_2P_3T_4S_5P_6S_7$ . El número de repeticiones de este dominio varía en función de la especie, siendo en *S. cerevisiae* de 26 y en humanos, de 52 (Chapman et al., 2008). Este dominio se modifica postraduccionalmente a lo largo del proceso transcripcional, participando en el reclutamiento de proteínas reguladoras (Eick and Geyer, 2013).

La iniciación de la transcripción comienza con el reconocimiento del promotor por parte de numerosos factores de transcripción basales y el posterior reclutamiento de la ARN pol II. Generalmente, TBP se asocia al ADN gracias al reconocimiento de la secuencia TATA. De esta forma, se reclutan de manera secuencial los factores de transcripción TFIID, TFIIA y TFIIB. Se reclutan entonces el factor TFIIF y la ARN pol II, formando de este modo el PIC (preinitiation complex) (Shandilya and Roberts, 2012). Por último se reclutan el complejo mediador y los factores TFIIH y TFIIIE, favoreciendo el paso de iniciación a la elongación de la transcripción (Shandilya and Roberts, 2012). Para que tenga lugar el paso de la iniciación a la elongación, es imprescindible la acción del complejo Spt4/5, el cual parece estar implicado en la remodelación de la cromatina y las modificaciones de las histonas necesarias para que tenga lugar la elongación (Hartzog and Fu, 2013). Además, durante la iniciación, se fosforila tanto la Serina 5 (Ser5) como Ser7 del dominio CTD (Calvo and García, 2012). Sin embargo, mientras los niveles de Ser5-P disminuyen gradualmente durante la elongación, los de Ser7-

## Introducción

P se mantienen estables hasta la terminación (Calvo and García, 2012). La fosfatasa del CTD, Rtr1, parece tener un papel importante en esta etapa (Garrido-Godino et al., 2022; Hsu et al., 2014; Mosley et al., 2009). Durante la elongación, la ARN pol II va añadiendo nucleótidos al extremo 3' de la cadena nascente de ARNm. Se trata de una etapa altamente regulada en la que el dominio CTD sufre diversas modificaciones como la fosforilación progresiva de Ser2 y la desfosforilación de Ser5, lo que permite el reclutamiento de factores que colaboran con la maquinaria transcripcional (Calvo and García, 2012). Como se ha mencionado anteriormente, la Ser7-P se mantiene sin cambios en la fosforilación hasta la terminación (Calvo and García, 2012). La ARN pol II sufre frecuentes procesos de parada durante esta etapa, tras lo que puede reanudar la transcripción o quedarse bloqueada de manera estable (Darzacq et al., 2007). La parada de la ARN pol II y la reanudación de la elongación se resuelve generalmente mediante varios mecanismos diferentes. El principal mecanismo es el que incluye el fenómeno de *backtracking*, mediante el cual la ARN pol II retrocede sobre el ARNm, pierde el contacto con el extremo 3' del transcrito nascente y este es escindido gracias a la acción del factor TFIS (Gómez-Herreros et al., 2012). Esta escisión del extremo 3' del ARNm permite su recolocación en el centro activo de la enzima (Gómez-Herreros et al., 2012). Otro mecanismo está mediado por el complejo Ccr4-Not, el cual favorece la reanudación de la elongación de la transcripción sin necesidad de la escisión de un fragmento del ARNm nascente (Kruk et al., 2011).

La terminación de la transcripción ocurre una vez que ha terminado la síntesis del ARNm y la ARN pol II se disocia del ADN molde. Durante esta etapa, se producen los máximos niveles de Ser2-P, a la vez que se produce también la fosforilación de Tyr1 (Calvo and García, 2012). La fosforilación de Ser2 es necesaria para el reclutamiento de la maquinaria de procesamiento de los ARNm en 3' y la terminación de la transcripción (Calvo and García, 2012). Por su parte, la función de la fosforilación de Tyr1 podría ser la de participar en el reclutamiento de factores de terminación (Mayer et al., 2012). El proceso de terminación está controlado principalmente por dos vías. En una de ellas, llamada ruta dependiente de poli(A), la ARN pol II alcanza y transcribe una región del ADN llamada señal de poliadenilación, tras lo cual reduce su procesividad y favorece la escisión y liberación del ARNm, que posteriormente será procesado (Shandilya and Roberts, 2012). Esta vía se observa mayoritariamente en transcritos de más de 1 kb. Para transcritos de menor tamaño la terminación suele llevarse a cabo a través de la vía dependiente de la helicasa Sen1. Sen1 separa el híbrido ADN-ARN del centro activo de la ARN pol II, favoreciendo su disociación (Steinmetz and Brow, 1996).

La fosforilación del residuo Ser5 del dominio CTD estimula el reclutamiento de la maquinaria de *capping*, formada por las proteínas Cet1, Ceg1 y Abd1 y cuya función es la adición de la caperuza (nucleótido de 7-metilguanosina) en el extremo 5' del ARNm (Ghosh

and Lima, 2010). El proceso de *capping* es co-transcripcional. La función de la caperuza es proteger al ARNm de la degradación y favorecer la iniciación de la traducción (Schwer et al., 1998; Sonenberg and Hinnebusch, 2009). El pre-ARNm de eucariotas también suele sufrir un proceso de corte de los intrones y empalme de exones o *splicing*. Este proceso también es co-transcripcional, iniciándose en fases avanzadas de la elongación (Plaschka et al., 2019). Durante esta etapa, se recluta la maquinaria del espliceosoma que comienza el corte de los intrones y finaliza una vez acabada la transcripción (Plaschka et al., 2019). El reclutamiento del espliceosoma está controlado a través de fosforilaciones en el CTD (Sims et al., 2004). Además de los procesos de *capping* y *splicing*, la mayor parte de los ARNm de eucariotas son poliadenilados. Este proceso consiste en la adición de una cola de poli(A) en el extremo 3' del ARNm, tras un corte endonucleolítico previo, controlado por la proteína Pab1 (Colgan and Manley, 1997; Mandel et al., 2008).

### 2.3. ARN pol III

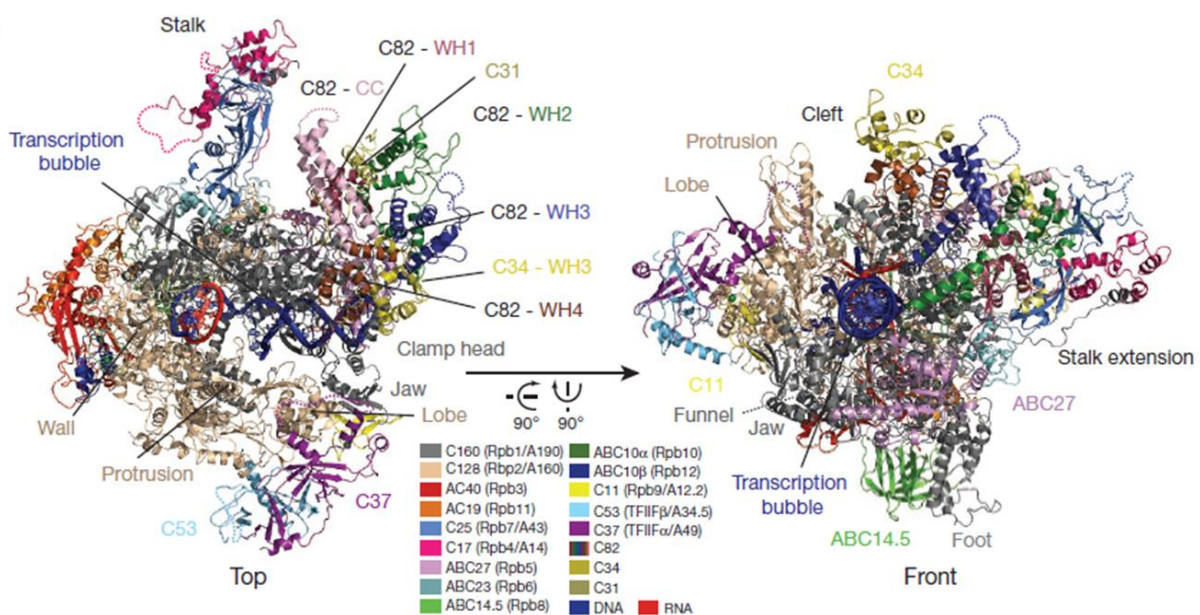
La ARN pol III se encarga de la síntesis de los ARNt, el ARNr 5S y otros ARNs pequeños como el ARNsno U6 o la partícula de reconocimiento de la señal o SRP (Houseley and Tollervey, 2009). Está compuesta por 17 subunidades y tiene una masa molecular de 700 kDa, siendo la de mayor tamaño y complejidad entre las ARN polimerasas. El núcleo de la enzima está compuesto por diez subunidades. Este incluye las dos de mayor tamaño (Rpc160 y Rpc128) que forman la hendidura y el centro activo y tienen gran homología con las subunidades Rpb1 y Rpb2 de la ARN pol II y Rpa190 y Rpa135 de la ARN pol I (Tabla I1). También incluye las cinco subunidades comunes y el heterodímero Rpc40/Rpac19, que es común a la ARN pol I y que comparte homología con las subunidades de la ARN pol II Rpb3 y Rpb11, respectivamente (Tabla I1). Por último, el núcleo de la enzima contiene la subunidad Rpc11, específica de la ARN pol III pero que tiene cierta homología con la subunidad Rpb9 de la ARN pol II y con el factor de transcripción TFIIS (Fernández-Tornero et al., 2011) y cuya función es participar en el reciclaje de la enzima hacia el promotor (Landrieux et al., 2006; Vannini et al., 2010). La subunidad Rpc11 también es importante para la escisión del ARN naciente (Huang et al., 2005).

El heterodímero Rpc17/Rpc25, homólogo de los heterodímeros Rpb4/Rpb7 de la ARN pol II y Rpa14/Rpa43 de la ARN pol I, se une al núcleo y forma un tallo o *stalk* que favorece el inicio de la transcripción e interacciona con el ARN naciente (Siaut et al., 2003).

La ARN pol III contiene cinco subunidades específicas: Rpc82, Rpc53, Rpc37, Rpc34 y Rpc31. Estas cinco subunidades se organizan en dos subcomplejos diferentes que se

## Introducción

asocian con el núcleo de la enzima. Por un lado, está el heterotrímero Rpc31/Rpc82/Rpc34, que presenta cierta homología con el factor de transcripción TFIIE y participa en la iniciación de la transcripción (Carter and Drouin, 2010). Las subunidades Rpc82 y Rpc34 están relacionadas con las proteínas Tfa1 y Tfa2 del factor TFIIE (Carter and Drouin, 2010). Ambas subunidades podrían interactuar con el ADN gracias a que poseen dominios WH que sobresalen por fuera de la estructura del núcleo (Hoffmann et al., 2015). Rpc82 podría actuar a modo de puente en la estructura de la enzima para conectar la región de la grapa con el tallo (Hoffmann et al., 2015). Rpc34 participa en el reclutamiento de la ARN pol III en los genes porque interactúa físicamente con el factor de transcripción Brf1 (Brun et al., 1997). Por otro lado, el heterodímero Rpc37/Rpc53 se une al lóbulo de Rpc128 y a la hendidura (Fernández-Tornero et al., 2011). Presenta homología con el dímero Rpa49/Rpa34.5 en la ARN pol I y al factor de transcripción TFIIF en la ARN pol II (Carter and Drouin, 2010; Kuhn et al., 2007). Su localización en la estructura de la enzima es similar a la que ocupa el factor TFIIF en el PIC de la ARN pol II (Carter and Drouin, 2010; Vannini et al., 2010) y parece tener funciones similares. Participa en la apertura del promotor, en el reconocimiento de la señal de terminación y el reciclaje de la ARN pol III, así como en la elongación (Kassavetis et al., 2010; Landrieux et al., 2006; Vannini et al., 2010). Además, la subunidad Rpc53 se sitúa cerca del extremo 3' del transcrito naciente y del centro activo de la enzima (Kassavetis et al., 2010). La estructura de la ARN pol III se muestra en la Figura I3. El proceso transcripcional de la ARN pol III se aborda con más detalle en el apartado 3 de esta Introducción.



**Figura I3. Estructura cristalográfica de la ARN pol III de *S. cerevisiae*.** Esquema de las distintas subunidades que componen la ARN pol III y algunas de las regiones que forman las mismas. El cuadro contiene el código de colores para representar las subunidades. Extraído de (Hoffmann et al., 2015)

## 2.4. Ensamblaje y transporte de las ARN polimerasas

Los procesos de biogénesis y ensamblaje de las ARN polimerasas, así como su transporte al núcleo no se conocen con detalle. La mayor parte de los autores proponen que el ensamblaje de las ARN polimerasas ocurriría parcial o totalmente en el citoplasma y sería anterior al importe nuclear (Boulon et al., 2010; Garrido-Godino et al., 2022; Garrido-Godino et al., 2021; Gómez-Navarro and Estruch, 2015; Mirón-García et al., 2013; Wild and Cramer, 2012). Los modelos propuestos tanto en levaduras como en humanos se basan en los conocimientos previos del proceso de ensamblaje *in vitro* de la ARN pol bacteriana (Wild and Cramer, 2012). Este comenzaría con la formación del dímero  $\alpha\alpha$ , que interaccionaría posteriormente con la subunidad  $\beta$ . A continuación, el módulo  $\alpha\alpha\beta$  interaccionaría con la subunidad  $\beta'$ . Por último, la subunidad  $\omega$  se asociaría estabilizando la subunidad  $\beta'$  (Wild and Cramer, 2012).

En *S. cerevisiae* se ha propuesto un modelo similar para la biogénesis de la ARN pol II (Garrido-Godino et al., 2021). En dicho modelo, el subcomplejo Rpb3, formado por las subunidades Rpb3, Rpb10, Rpb11 y Rpb12, se correspondería con el dímero  $\alpha\alpha$  bacteriano. Este interaccionaría con el subcomplejo Rpb2, compuesto a su vez de las subunidades Rpb2 y Rpb9 y que se correspondería con la subunidad  $\beta$  bacteriana. Por último, el subcomplejo Rpb3-Rpb2 se asociaría con el subcomplejo Rpb1, formado por las subunidades Rpb1, Rpb5, Rpb6 y Rpb8 y que se correspondería con las subunidades  $\beta'$  y  $\omega$  bacterianas. La subunidad Rpb6 (subunidad  $\omega$ ) actuaría estabilizando todo el complejo (Nouraini et al., 1996). Finalmente, el dímero Rpb4/Rpb7 se asociaría con el resto de la enzima (Garrido-Godino et al., 2022; Garrido-Godino et al., 2021; Wild and Cramer, 2012), aunque se puede disociar de esta (Armache et al., 2005). Teniendo en cuenta que las subunidades de la ARN pol II que se corresponderían con el módulo  $\alpha\alpha\beta\beta'\omega$  bacteriano también están conservadas en la ARN pol I y III, se ha sugerido una ruta de ensamblaje similar, aunque con posibles diferencias, para estas dos enzimas (Garrido-Godino et al., 2021; Wild and Cramer, 2012).

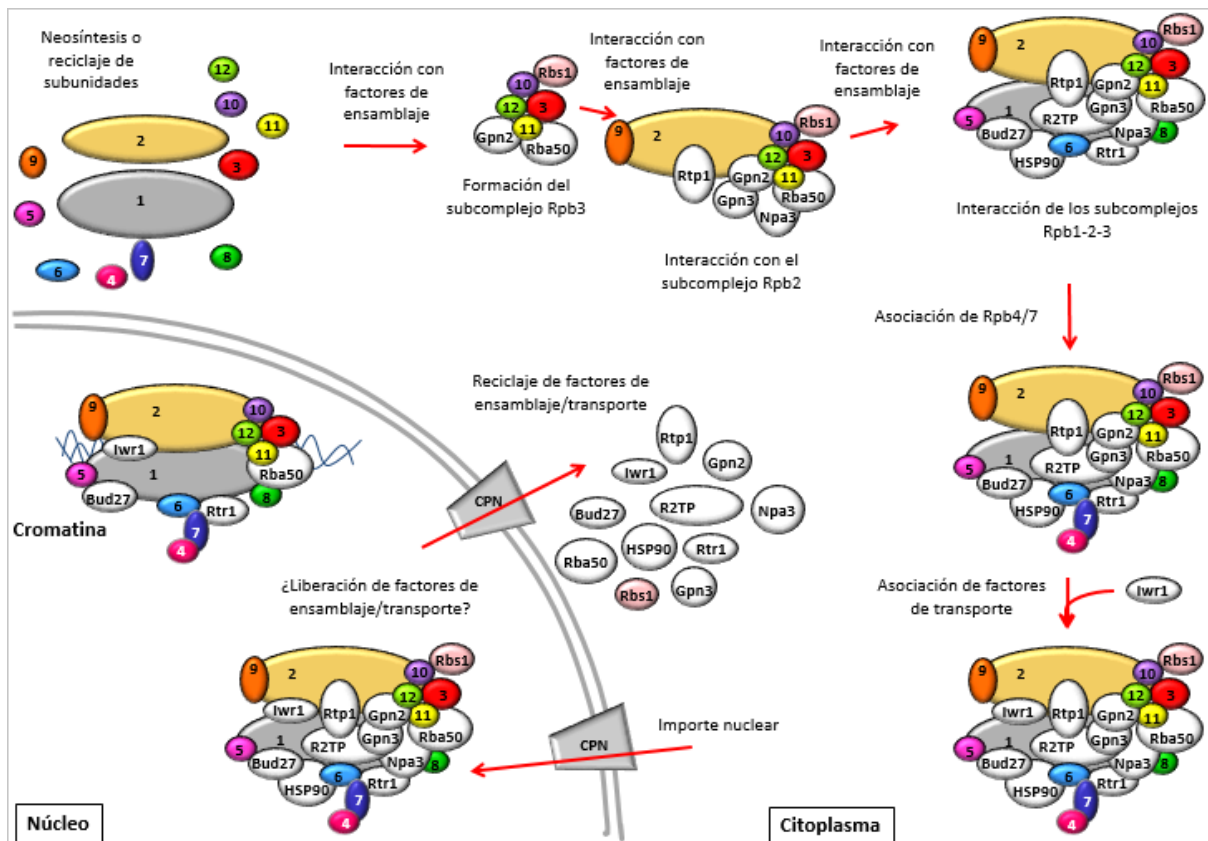
En el caso de la ARN polimerasa III, el ensamblaje podría comenzar con la formación del dímero Rpac40/Rpac19 (Turowski and Boguta, 2021). Este dímero podría interaccionar con la subunidad Rpb10, formando el complejo Rpac40/Rpac19/Rpb10, similar al subcomplejo Rpb3 de la ARN pol II y al dímero  $\alpha\alpha$  bacteriano (Turowski and Boguta, 2021). Este complejo interaccionaría con Rpb12, y esta unión facilitaría la asociación de Rpb128 (subunidad  $\beta$  bacteriana) (Turowski and Boguta, 2021). Se ha sugerido que el resto de subunidades del núcleo de la enzima se ensamblarían de un modo similar al de la ARN pol II (Garrido-Godino et al., 2021; Turowski and Boguta, 2021; Wild and Cramer, 2012). Se ha propuesto, además, que las subunidades específicas de la ARN pol III podrían tener un ensamblaje nuclear (Hardeland and Hurt, 2006). En el caso de la ARN pol I, se ha propuesto

que el ensamblaje sería citoplasmático y ocurriría a través una ruta similar a la de las otras dos enzimas en *S. cerevisiae* (Garrido-Godino et al., 2021; Schneider and Nomura, 2004; Wild and Cramer, 2012), aunque en células de mamífero se ha propuesto que el ensamblaje ocurriría directamente en el promotor de los genes (Dundr et al., 2002).

Los estudios de los últimos años han puesto de manifiesto la necesidad de factores para el proceso de ensamblaje de las ARN polimerasas. Algunos de ellos son específicos de una sola ARN pol, mientras que otros actúan en las rutas de ensamblaje de varias de ellas (Garrido-Godino et al., 2021). Entre los factores de ensamblaje específicos de la ARN pol II, se ha demostrado la participación del complejo R2TP, la chaperona Hsp90, la GTPasa Npa3, la fosfatasa del CTD Rtr1, y la proteína Rtp1 (Garrido-Godino et al., 2021). Por su parte, se ha demostrado que la proteína Rbs1 participaría en el ensamblaje y transporte de la ARN pol III (Cieśła et al., 2015). Existen otros factores de ensamblaje, como Gpn2, Gpn3 o Rba50, compartidos entre la ARN pol II y III (Garrido-Godino et al., 2021; Xie et al., 2022). La *prefoldina-like* Bud27 es el único factor conocido que participa en el ensamblaje de las tres ARN polimerasas (Mirón-García et al., 2013).

El transporte de las ARN polimerasas al núcleo es un proceso poco conocido. La ruta más importante de importe nuclear de la ARN pol II involucra a la proteína Iwr1, la cual se une al *cleft* de la enzima una vez que está totalmente ensamblada (Czeko et al., 2011). Iwr1 transporta a la ARN pol II hacia el núcleo gracias a su señal NLS, y una vez allí, se disocia de la enzima para poder reciclarse y exportarse al citoplasma (Czeko et al., 2011). Algunas de las proteínas que participan en el ensamblaje también parecen estar involucradas en el transporte nuclear de la ARN polimerasa II, como Rtr1, Npa3 y Rtp1 (Garrido-Godino et al., 2021; Gómez-Navarro et al., 2013; Staresincic et al., 2011). Además, se ha propuesto que el factor de ensamblaje Rbs1 podría participar también en el transporte de la ARN pol III hacia el núcleo (Cieśła et al., 2015).

El proceso de ensamblaje se resume en el modelo de la Figura I4, basado en la ARN pol II pero extensible a las otras dos ARN polimerasas.



**Figura 14. Modelo de ensamblaje de la ARN pol II de *S. cerevisiae*.** Se muestran las distintas subunidades y los subcomplejos que componen la enzima, así como los factores de ensamblaje que participan en el proceso (en color blanco). La proteína Rbs1 se muestra de color rosa, puesto que solo se ha demostrado su participación en el proceso de ensamblaje de la ARN pol III (Cieśła et al., 2015). El proceso comienza con la formación del subcomplejo 3, el cual interactúa después con el subcomplejo 2 y posteriormente con el 1. El dímero Rpb4/Rpb7 se uniría al final y con la participación de Rtr1 (Garrido-Godino et al., 2022). El factor lwr1 se une al centro activo de la enzima para facilitar su transporte al núcleo (Czeko et al., 2011). Tras el importe al núcleo, algunos factores se liberan y se reciclan al citoplasma, mientras que otros participan en el proceso transcripcional. Aunque este modelo está basado en la ARN pol II, se ha propuesto que el proceso de ensamblaje de las ARN polimerasas I y III debe ser similar. Adaptado de (Garrido-Godino et al., 2021).

## 2.5. Cross-talk de las tres ARN polimerasas

La transcripción es un importante proceso celular altamente regulado y sincronizado. En *S. cerevisiae*, el 80% de toda la actividad transcripcional de las tres ARN polimerasas va destinado a la síntesis de componentes ribosómicos (Warner, 1999; Xiao and Grove, 2009). Para ello, la ARN pol I sintetiza el ARNr precursor 35S, que tras su procesamiento, da lugar a los ARNr maduros 25S, 18S y 5,8S. La ARN pol II sintetiza los ARNm de todas las proteínas ribosómicas. También sintetiza los ARNm de más de 250 proteínas y otros 80 ARNsno conocidos como RiBis (del inglés *Ribosomal Biogenesis*), que participan en la formación de los ribosomas. La ARN pol III sintetiza el ARNr 5S. La regulación de esta actividad transcripcional se consigue gracias a la coordinación de las tres ARN polimerasas (Bhargava,

2021; Briand et al., 2001; Michels and Hernandez, 2006). Dicha regulación implica que las células ajustan la cantidad de transcritos para la biogénesis de ribosomas en función de las condiciones de crecimiento y la disponibilidad de nutrientes (Lempiäinen and Shore, 2009; Mayer and Grummt, 2006; Michels and Hernandez, 2006).

La producción de transcritos para la biogénesis de ribosomas está estrechamente ligada con la proliferación y el crecimiento celular (Lempiäinen and Shore, 2009). Las tres ARN polimerasas están coordinadas para producir las cantidades adecuadas de todos los transcritos necesarios para la biogénesis de ribosomas (Lempiäinen and Shore, 2009; Michels and Hernandez, 2006). En este sentido, varios estudios han documentado la existencia de una interconexión o *cross-talk* entre las maquinarias transcripcionales de las tres ARN polimerasas.

Se ha descrito un *cross-talk* entre las ARN polimerasas I y II. La estabilización del dímero Rpa43-Rrn3 en una cepa de *S. cerevisiae* que provoca que la transcripción de la ARN pol I no se reprima tras un tratamiento de rapamicina (que bloquea la ruta de señalización TOR) conlleva que la transcripción de la ARN pol II, para la síntesis de ARNm de proteínas ribosómicas (RPs) y RiBis, no se vea afectada, aunque sí para resto de transcritos (Chédin et al., 2007; Laferte et al., 2006). Esto sugiere que la síntesis de transcritos de la ARN pol I, de algún modo modula positivamente la síntesis de ARNm de RPs por parte de la ARN pol II (Laferte et al., 2006). El *cross-talk* entre la ARN pol I y II también parece ir en sentido opuesto. La ausencia de Fhl1, una importante proteína reguladora de la síntesis de ARNm de RPs, redujo la transcripción de la ARN pol II y también la de la ARN pol I (Rudra et al., 2005). En línea con lo anterior, Fhl1 forma parte de un complejo compuesto por Utp22 y Rrp7, encargado del procesamiento de ARNr (Rudra et al., 2007). Por lo tanto, Fhl1 podría ejercer alguna función en el *cross-talk* entre el procesamiento del ARNr y la síntesis ARNm de proteínas ribosómicas.

También se ha sugerido la existencia de un *cross-talk* entre las ARN polimerasas II y III. Se ha demostrado *in vitro* que la presencia de proteínas ribosómicas modula positivamente la síntesis de ARNts por la ARN pol III (Dieci et al., 2009). En este sentido, el factor de transcripción de la ARN pol II, TFIIS, se asocia a la mayor parte de los genes de la ARN pol III (Ghavi-Helm et al., 2008). Además, algunos mutantes de *DST1*, gen que codifica TFIIS, muestran defectos transcripcionales de las ARN polimerasas II y III (Ghavi-Helm et al., 2008). Recientemente, un estudio proteómico para la identificación del interactoma completo de la maquinaria transcripcional de la ARN pol III ha permitido identificar numerosas proteínas, factores de transcripción y remodeladores de cromatina que podrían estar compartidos entre las ARN polimerasas II, pero también con la III (Bhalla et al., 2019).

También se ha propuesto la existencia de un *cross-talk* entre las ARN polimerasas I y III. La desregulación de la ARN pol I provoca una desregulación de la síntesis del ARNr 5S (Laferte et al., 2006). En el interactoma de la maquinaria transcripcional de la ARN pol III propuesto por Bhalla *et al*, también se identificaron varias proteínas reguladoras de la ARN pol I, que podrían estar, por tanto, compartidas entre ambas ARN polimerasas (Bhalla et al., 2019). Este *cross-talk* entre las ARN polimerasas I y III parece ir en ambas direcciones, puesto que se ha demostrado que mutantes *rpc160* provocan defectos transcripcionales de la ARN pol I, del mismo modo que mutantes *rpa190* provocan defectos en la síntesis de pre-ARNt (Briand et al., 2001).

Aunque no se conocen los mecanismos precisos del *cross-talk* de las tres ARN polimerasas, numerosas líneas de evidencia sugieren que la vía TOR (del inglés *Target Of Rapamycin*) podría ser un regulador central (Lempiäinen and Shore, 2009; Mayer and Grummt, 2006; Michels and Hernandez, 2006). La rapamicina inhibe la transcripción de las tres ARN polimerasas (Powers and Walter, 1999; Zaragoza et al., 1998), aunque lo hace mediante mecanismos diferentes. Se ha demostrado que la vía TOR regula la interacción del factor Rrn3 con la ARN pol I y el reclutamiento de esta al promotor (Claypool et al., 2004). En *S. cerevisiae*, el complejo TORC1 modula la actividad de Hmo1, un factor de transcripción de la ARN pol I que también se asocia a algunos promotores de genes de RPs (Berger et al., 2007; Hall et al., 2006). Además, la vía TOR también modula negativamente la actividad de Crf1 y cuando se inhibe, Crf1 actúa como una proteína reguladora, uniéndose al factor Fhl1 y reprimiendo la síntesis de ARNm de RPs (Martin et al., 2004a). Todo esto sugiere que el *cross-talk* entre las ARN polimerasas I y II podría estar regulado a través de la ruta TOR. En línea con lo anterior, Tor1 (componente de TORC1) se asocia a los promotores de los genes 35S, favoreciendo la transcripción de la ARN pol I (Li et al., 2006), así como a los promotores de los genes 5S, promoviendo la actividad de la ARN pol III (Wei et al., 2009). Además, favorecería la síntesis de pre-ARNts, ya que fosforila e inactiva a Maf1, el único regulador negativo conocido de la ARN pol III (Wei et al., 2009). Esto indica que el *cross-talk* de las ARN polimerasas I y III podría estar, al menos parcialmente, controlado por la vía TOR.

### **3. El proceso transcripcional de la ARN pol III**

La ARN pol III ha evolucionado para especializarse en la síntesis de transcritos cortos no codificantes, como los ARNt, el ARNr 5S y otros ARNs pequeños con diversas funciones. Puesto que muchos de sus transcritos son componentes esenciales para la traducción, la ARN pol III debe sintetizarlos con una tasa elevada y, al mismo tiempo, ser susceptible de una regulación precisa para reprimir la transcripción cuando las condiciones de crecimiento no sean favorables. La ARN pol III consigue alcanzar esta elevada tasa de síntesis gracias a la

eficacia durante el proceso de reiniciación y a la capacidad para mantenerse asociada de forma estable en el mismo gen durante varios ciclos de transcripción (Dieci et al., 2013).

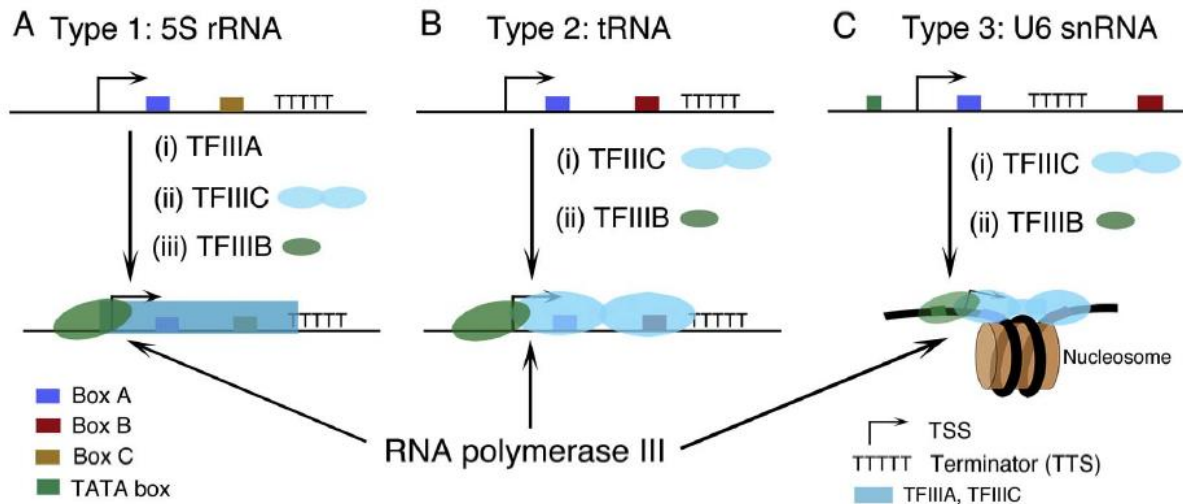
### 3.1. Genes diana de la ARN pol III

Como se ha mencionado anteriormente, la ARN pol III se encarga de la síntesis de ARNt, ARNr 5S, los ARNs no codificantes (ARNnc) de la partícula de reconocimiento de la señal scR1 y de la RNasa P (*RPR1*), el ARNsn U6 del espliceosoma y el ARNsno snR52 (Arimbasseri and Maraia, 2016). Clásicamente, los genes de la ARN pol III en *S. cerevisiae*, se dividen en tres clases diferentes, en función del tipo de promotores que contengan (Shukla and Bhargava, 2018) (Figura I5).

- Tipo 1: es el gen *RDN5*, cuyo transcrito es el ARNr 5S. Se caracteriza por no tener caja TATA y por tener promotores internos dentro del marco de lectura del gen. En *S. cerevisiae*, existe una región con cierta homología con la secuencia consenso de la caja A, que va desde la posición +50 hasta +61, aunque que no es imprescindible para la iniciación de la transcripción (Challice and Segall, 1989). La región imprescindible para el inicio de la transcripción se conoce como elemento de control interno o ICR (del inglés *Internal Control Region*). El ICR de este gen en *S. cerevisiae* está formado por una caja C de 14 nucleótidos de longitud (Acker et al., 2013; Challice and Segall, 1989).
- Tipo 2: Son los ADNt. Estos genes están desprovistos de caja TATA y contienen tanto caja A como B, ambas internas. La caja A se sitúa más cerca del sitio de inicio de la transcripción (Schramm and Hernandez, 2002). La distancia entre ambas cajas varía según el ADNt, y entre ellos suele situarse un intrón (Schramm and Hernandez, 2002). Dado que son elementos internos, tanto la caja A como B se transcriben y dan lugar, respectivamente, a los brazos D y T del futuro ARNt maduro (Turowski and Tollervey, 2016). En el caso de *S. cerevisiae*, existen hasta 275 genes dentro de esta categoría (Shukla and Bhargava, 2018).
- Tipo 3: Estos genes se caracterizan por poseer caja TATA y porque suelen tener los promotores externos (Arimbasseri and Maraia, 2016; Schramm and Hernandez, 2002). El gen *SNR6* es el único de los genes transcritos por la ARN pol III de *S. cerevisiae* que cuenta con una caja TATA aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción (Leśniewska and Boguta, 2017). Además, cuenta con cajas A y B, el primero de ellos dentro del marco de lectura del gen y el segundo, aguas abajo de la señal de terminación (Leśniewska and Boguta, 2017).

En *S. cerevisiae*, además de los grupos de genes anteriormente mencionados, la ARN pol III transcribe otros genes que no se incluyen en ninguno de ellos. El gen más largo de todos

los que transcribe la ARN pol III en es *SCR1*, el cual contiene una caja A y una caja B internas, dentro del marco de lectura del gen (Leśniewska and Boguta, 2017). Los genes *RPR1* y *SNR52* también cuentan con cajas A y B, pero en este caso ambos elementos se encuentran aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción (Leśniewska and Boguta, 2017).



**Figura 15. Tipos de genes transcritos por la ARN pol III de *S. cerevisiae*.** Esquema de los diferentes genes transcritos por la ARN pol III de *S. cerevisiae*, con sus respectivos promotores, identificados según los colores que se muestran en la leyenda. El gen *RDN5* (Tipo 1) cuenta con cajas A y C internas, siendo la segunda imprescindible para la transcripción. Los ADNt (Tipo 2) cuentan con cajas A y B internas. El gen *SNR6* (Tipo 3) es el único gen de la ARN pol III en *S. cerevisiae* con caja TATA. Extraído de (Shukla and Bhargava, 2018).

### 3.2. Factores de transcripción de la ARN pol III

Los factores de transcripción asociados a la ARN pol III se describieron por primera vez en la década de 1980. Desde entonces, numerosos trabajos han puesto de manifiesto que la presencia de estas proteínas es imprescindible para la transcripción mediada por la ARN pol III. Estos factores son la proteína Pzf1 (TFIIIA), el complejo TFIIIB y el complejo TFIIIC.

#### 3.2.1. TFIIIA

Está compuesto por una única proteína con dedos de zinc, de unos 40 kDa, llamada Pzf1 (Acker et al., 2013). Se ha demostrado que solo es necesario para la síntesis del ARNr 5S, siendo prescindible para todos los demás (Camier et al., 1995). Su función es la de reconocer la región promotora interna ICR (caja C en *S. cerevisiae*) del gen *RDN5*, ocupando una región de 35 pares de bases, tras lo cual favorece el reclutamiento del factor TFIIIC (Acker et al., 2013; Braun et al., 1989). En *S. cerevisiae*, Pzf1 contiene nueve dedos de zinc, de los cuales los tres primeros son indispensables para su unión al ADN (Woychik and Young, 1992).

Uno de los dominios entre los dedos de zinc 8 y 9, de 81 aminoácidos de longitud, es esencial para la actividad de Pzf1, al parecer porque es el que permite el reclutamiento del factor TFIIC (Rowland and Segall, 1998).

### 3.2.2. TFIIC

Es un factor clave en el proceso transcripcional de la ARN pol III, interviniendo en todos los tipos de genes. Se trata de un factor flexible que reconoce y se une a las cajas A y B de los genes (Schultz et al., 1989). Después de asociarse con los promotores, favorece el reclutamiento del factor TFIIB aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción (Lassar et al., 1983). En el caso del gen *RDN5*, primero es necesaria la unión del factor TFIIA al promotor, tras lo cual se recluta el complejo TFIIC y posteriormente, TFIIB (Braun et al., 1989). En *S. cerevisiae*, el factor TFIIC está compuesto por seis proteínas diferentes organizadas en dos subcomplejos, todas ellas imprescindibles para su actividad *in vivo* (Leśniewska and Boguta, 2017). Por un lado, está el subcomplejo  $\tau$ A, formado por las subunidades Tfc1, Tfc4 y Tc7 y encargado de unirse a la caja A (Ducrot et al., 2006). Por otro lado, está el subcomplejo  $\tau$ B, formado por las subunidades Tfc3, Tfc6 y Tfc8, y encargado de unirse a la caja B (Ducrot et al., 2006). Se ha sugerido que las subunidades encargadas del reconocimiento directo de las cajas A y B son, respectivamente, Tfc1 y Tfc3, por su proximidad al molde de ADN (Gabrielsen et al., 1989). Experimentos de co-inmunoprecipitación han demostrado que la subunidad Tfc4 es la que permite el reclutamiento de los factores Brf1 y Bdp1 del complejo TFIIB (Dumay-Odelot et al., 2002). Se ha sugerido que el reclutamiento de TBP está mediado por la subunidad Tfc8 (Deprez et al., 1999). Dado que el complejo TFIIC se encarga del reconocimiento de las secuencias promotoras y de reclutar al factor TFIIB, juega un papel fundamental en la formación del complejo de preiniciación o PIC.

El papel del factor TFIIC durante la elongación no está totalmente establecido. Estudios *in vitro* sugieren que el complejo TFIIC permanecería unido al ADN durante todo el proceso transcripcional (Ruet et al., 1984), mientras que otros estudios sugieren lo contrario, de manera que el complejo TFIIC se disociaría del ADN una vez completado el primer ciclo de transcripción y su función sería la de un factor de ensamblaje para el reclutamiento del complejo TFIIB (Bardleben et al., 1994; Kassavetis et al., 1990; Roberts et al., 2003). En línea con lo anterior, los estudios *in vivo* sobre la cantidad total del factor TFIIC unido a los genes demuestran que es menor que la del factor TFIIB o de la propia ARN pol III (Harismendy et al., 2003; Oficjalska-Pham et al., 2006). Otros estudios más recientes demuestran que en condiciones de crecimiento con fuentes de carbono no fermentables, hay mayor asociación del factor TFIIC que de la ARN pol III en los genes (Cieśła et al., 2018). El restablecimiento de las condiciones óptimas de crecimiento hace que aumente la ocupación

de la ARN pol III y que baje la del factor TFIIC en los genes, lo cual va en línea con la posibilidad de que el complejo TFIIC se disocie del ADN durante la elongación (Cieśła et al., 2018).

Aunque en la mayor parte de los genes no parece ser necesario durante la elongación, el factor TFIIC podría tener una función en el correcto reciclaje de la ARN pol III al sitio de inicio de la transcripción en el caso del gen *SCR1* (Ferrari et al., 2004). Por otra parte, se ha demostrado que el factor TFIIC interacciona físicamente con la subunidad Rpc53 de la ARN pol III, por lo que podría tener alguna función en la terminación y el reciclaje (Braun et al., 1992; Landrieux et al., 2006; Nagarajavel et al., 2013). Al factor TFIIC se le ha atribuido también una función en la remodelación de la estructura de la cromatina que permitiría la transcripción de la ARN pol III, al menos para los genes *SNR6* y *SCR1*, debido a que existe competencia entre la formación del PIC y de los nucleosomas (Dieci et al., 2002; Marsolier et al., 1995; Shivaswamy et al., 2004). Otras posibles funciones durante las demás etapas de la transcripción no han sido totalmente esclarecidas.

### 3.2.3. TFIIB

El factor de transcripción basal TFIIB está formado por tres proteínas diferentes: TBP, Brf1 y Bdp1. No se ha demostrado la existencia de este complejo de manera estable en ausencia de ADN, ni tampoco puede ensamblarse en los promotores de los genes a menos que el factor TFIIC se haya ensamblado previamente (Huet et al., 1994). TBP (o Spt15) es un factor de transcripción general cuya función abarca las tres ARN polimerasas. Brf1 es una proteína cuyo extremo N-terminal presenta bastante homología con el factor TFIIB de la ARN pol II (Kassavetis et al., 1998). La función de este dominio parece ser la de facilitar la extensión de la burbuja de transcripción más allá del sitio de inicio (Kassavetis et al., 2001). Su extremo C-terminal permite la interacción con las otras dos proteínas TBP y Bdp1, manteniendo la estabilidad del complejo (Kassavetis et al., 1998). Por su parte, Bdp1 es la única proteína del complejo TFIIB cuya secuencia de aminoácidos no presenta homología con ningún elemento de las otras maquinarias de transcripción. Tan solo se ha detectado cierta homología entre una región de 60 aminoácidos y un dominio conocido como SANT (Aasland et al., 1996). Este tipo de dominios está presente en varias proteínas reguladoras de la transcripción, así como en remodeladores de cromatina, y está considerado como un dominio de unión a cromatina (Yang and Seto, 2008). Parte del dominio SANT de Bdp1 también interacciona con la subunidad Brf1 (Aasland et al., 1996). Recientemente se ha demostrado que la subunidad Bdp1 está fosforilada durante el proceso transcripcional y se desfosforila cuando las condiciones de crecimiento no son adecuadas (Lee et al., 2015).

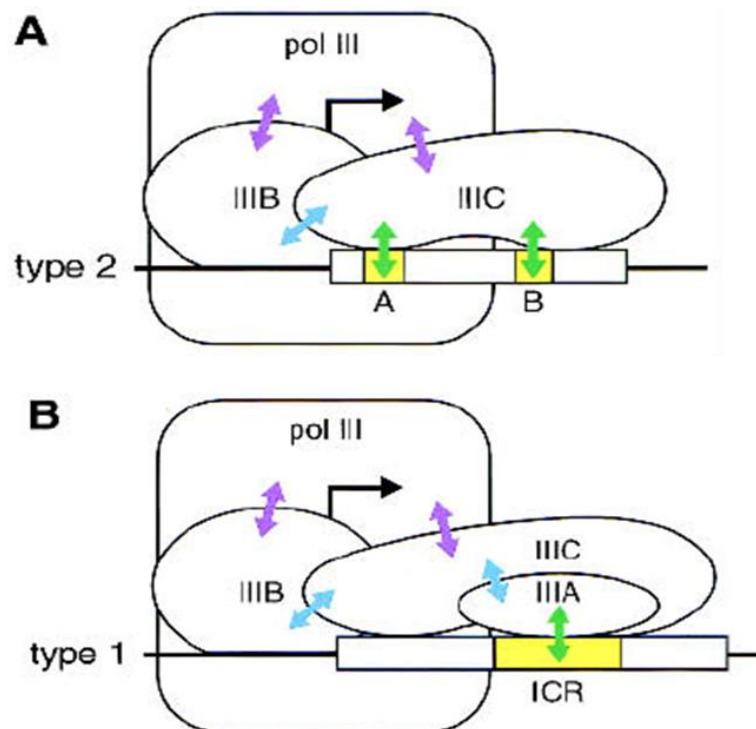
El complejo TFIIIB es reclutado por el factor TFIIIC aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción y su función más importante es la de reclutar a la ARN pol III (Acker et al., 2013; Dieci et al., 2013). También se ha sugerido que podría participar en la apertura del promotor para facilitar el inicio de la transcripción (Kassavetis et al., 2001). Es, por lo tanto, un elemento central en el proceso transcripcional de la ARN pol III.

### 3.3. Mecanismo transcripcional de la ARN pol III

#### 3.3.1. Formación del PIC e iniciación de la transcripción

El proceso transcripcional de la ARN pol III comienza con la formación del PIC en el gen diana. Como se ha comentado anteriormente, la subunidad Tfc1 del factor de transcripción TFIIIC reconoce la secuencia de la caja A y las subunidades Tfc3 y Tfc6 reconocen la secuencia de la caja B, ya que ambas cajas están presentes en todos los genes de la ARN pol III, excepto en *RDN5* (Acker et al., 2013; Dieci et al., 2013). En el caso del gen *RDN5*, primero se asocia el factor TFIIIA a la caja C y posteriormente se recluta el complejo TFIIIC (Acker et al., 2013). Una vez se encuentra el complejo TFIIIC unido a los promotores, se recluta el factor TFIIIB, esencial para el inicio de la transcripción (Dieci et al., 2013; Turowski and Tollervey, 2016). El reclutamiento de TFIIIB comienza cuando la subunidad Tfc4 de...interacciona con Brf1 (Leśniewska and Boguta, 2017). Entonces, TBP interacciona con Tfc8 y también con Brf1 (Leśniewska and Boguta, 2017). Por último, Bdp1 se recluta gracias a su interacción con Tfc4, que ya está unido a Brf1 (Leśniewska and Boguta, 2017). La unión de Bdp1 a Tfc4 podría requerir el reordenamiento del complejo TFIIIC y la disociación de la subunidad Tfc3 (Leśniewska and Boguta, 2017). El complejo TFIIIB queda entonces reclutado aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción. Varios estudios *in vitro* demuestran que el factor TFIIIB es por sí solo capaz de iniciar la transcripción de la ARN pol III, sin necesidad de la presencia del complejo TFIIIC (Bardleben et al., 1994; Kassavetis et al., 1990). El complejo TFIIIB-ADN formado es muy estable, ya que resiste tratamientos de heparina o altas concentraciones salinas sin disociarse (Kassavetis et al., 1990). El factor TFIIIB recluta a la ARN pol III gracias a múltiples interacciones proteína-proteína. Brf1 interacciona con Rpc34 y Rpc17 (Schramm and Hernandez, 2002). Estas interacciones permiten que la ARN pol III se sitúe sobre el sitio de inicio de la transcripción. Los estudios de microscopía electrónica han permitido demostrar que durante la iniciación, la ARN pol III existe en dos conformaciones diferentes (Hoffmann et al., 2015). Esto indica dos etapas diferenciadas que se corresponden con un PIC cerrado y otro abierto (Hoffmann et al., 2015). En la conformación abierta la ARN pol III puede asociarse más eficazmente con el ADN molde. En la conformación cerrada, la estructura de la ARN pol III es similar a la que tiene durante la elongación (Hoffmann et al., 2015). Tanto la subunidad Rpc34 como Rpc82 contienen dominios WH que interaccionan

directamente con el ADN, lo cual favorece la apertura del promotor (Hoffmann et al., 2015). Un reordenamiento de estos dominios aguas abajo del sitio de inicio de la transcripción favorece el cambio conformacional del centro activo de la ARN pol III que da paso a la elongación (Hoffmann et al., 2015). La estructura del complejo de preiniciación se muestra en la Figura I6.



**Figura I6. Esquema de la estructura del PIC en los genes tipo 1 y 2 de la ARN pol III.** A) Estructura del PIC en los genes de ADNt (tipo 2). B) Estructura del PIC en el gen *RDN5* (tipo 1). Las flechas de colores indican las interacciones entre los componentes del PIC. Extraído de (Schramm and Hernandez, 2002).

### 3.3.2. Elongación

La mayoría de los genes que transcribe la ARN pol III tienen un tamaño inferior a los 400 pares de bases, por lo que la elongación es una etapa muy corta. Un estudio reciente demuestra que hay mayor acumulación de la ARN pol III hacia la zona 5' de los genes y otra ligera acumulación justo antes de la señal de terminación (Turowski et al., 2016). Este descubrimiento sugiere que durante la elongación, la ARN pol III pueda sufrir una atenuación o incluso una parada (Turowski et al., 2016). De manera interesante, las dos regiones donde la enzima parece experimentar una acumulación coinciden con las secuencias de las cajas A y B, incluso en aquellos genes en los que ambas cajas están separadas por un intrón

(Turowski et al., 2016). Este hecho podría sugerir que el TFIIC asociado a esas secuencias podría provocar una ralentización en el avance de la ARN pol III.

Como se ha mencionado anteriormente, existe cierta controversia sobre el papel del factor TFIIC durante la elongación. Aunque un estudio *in vitro* sugiere que seguiría asociado al ADN durante la elongación (Ruet et al., 1984), la mayor parte de los trabajos *in vitro* e *in vivo* sugieren que se disociaría completamente del ADN una vez que comienza la elongación (Bardeleben et al., 1994; Cieśla et al., 2018; Harismendy et al., 2003; Kassavetis et al., 1990; Oficjalska-Pham et al., 2006; Roberts et al., 2003). La necesidad de disociar el complejo TFIIC de los promotores podría explicar, en parte, el hecho de que se observe una acumulación de la ARN pol III en esas zonas.

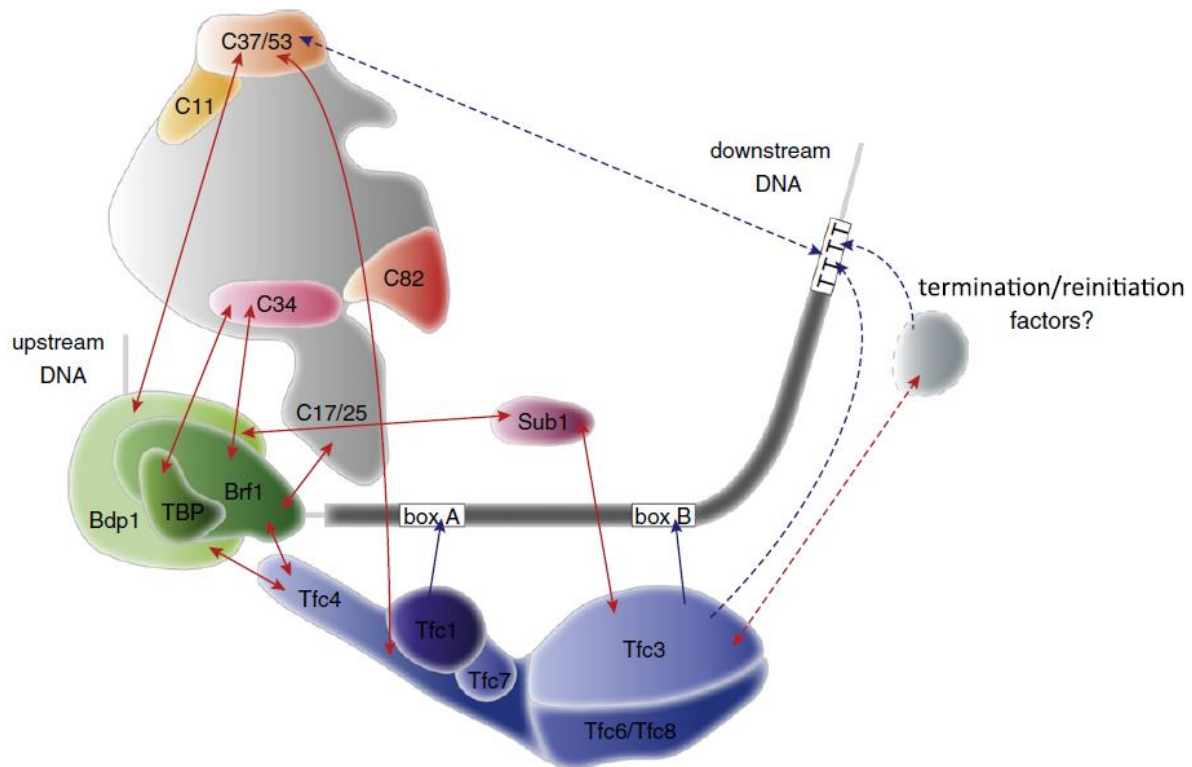
### 3.3.3. Terminación y reciclaje

La señal de terminación de la ARN pol III consiste en un tramo de varias timinas presentes en la hebra no transcrita, que puede variar en longitud según la especie (Leśniewska and Boguta, 2017). Los genes de *S. cerevisiae* requieren, como mínimo, 6 timinas para una adecuada terminación (Braglia et al., 2005). El tamaño de este tramo y los nucleótidos presentes a ambos lados de la señal de terminación influyen en la eficacia de la terminación (Arimbasseri et al., 2013). Se han identificado tres subunidades de la ARN pol III (Rpc53, Rpc37 y Rpc11) como las más importantes durante la terminación. El heterodímero Rpc37/Rpc53 participa en el reconocimiento de la señal de terminación (Landrieux et al., 2006), mientras que la subunidad Rpc11 es necesaria para la escisión del ARN naciente (Huang et al., 2005). El dímero Rpc37/Rpc53 se disocia con facilidad del resto de la enzima (Lorenzen et al., 2007) y su falta hace que la enzima tenga problemas para reconocer la señal de terminación, generando una mayor proporción de transcritos aberrantes conocidos como *readthrough* (Landrieux et al., 2006). El mecanismo preciso de terminación no se conoce con exactitud, aunque se sabe que se produce una ralentización en el avance de la polimerasa cuando esta llega a la señal de terminación (Arimbasseri et al., 2013). Algunos estudios sugieren que podría formarse un complejo de preterminación o PTC (del inglés *pre-termination complex*), necesario para que el transcrito recién sintetizado sea liberado del centro activo de la ARN pol III (Arimbasseri and Maraia, 2015). Para ello, es necesario que las subunidades Rpc53, Rpc37 y Rpc11 interactúen con la tercera y cuarta timinas de la señal de terminación. A continuación, el dominio C-terminal de la subunidad Rpc37 y la quinta timina permitirían la liberación del transcrito (Arimbasseri and Maraia, 2015). Los estudios de microscopía electrónica han confirmado estos resultados puesto que se ha observado que cinco residuos de Rpc37 interactúan con las primeras cuatro timinas de la señal de terminación (Hoffmann et al., 2015). La terminación finaliza en el sitio canónico (séptima u

octava timina en *S. cerevisiae*), aunque se ha demostrado que se genera una pequeña proporción de transcritos *readthrough*, que se extienden entre 50 y 200 nucleótidos aguas abajo de la señal de terminación (Turowski et al., 2016). Estos transcritos *readthrough* son degradados rápidamente por el exosoma (Turowski et al., 2016).

El reciclaje y la elevada tasa de transcripción mediada por la ARN pol III es posible gracias a que el factor TFIIIB permanece unido al ADN de manera estable (Dieci et al., 2013). El reciclaje se define como el proceso mediante el cual la ARN pol III vuelve a ser reclutada en la misma molécula de ADN donde completó el primer ciclo de transcripción (Dieci et al., 2013). Además, el correcto reconocimiento de la señal de terminación en el sitio canónico es necesario para un reciclaje eficaz. De lo contrario, la tasa de reciclaje de la ARN pol III se vuelve mucho más lenta (Dieci et al., 2013; Turowski and Tollervey, 2016). Un estudio demuestra que la presencia de los factores de transcripción TFIIIB y TFIIIC es necesaria para el reclutamiento de la ARN pol III al promotor durante el primer ciclo de transcripción y también para la rápida tasa de reciclaje de esta en los ciclos posteriores (Ferrari et al., 2004). Se ha demostrado que este proceso no es estocástico, sino que es específico debido a la unión de los factores de transcripción a las secuencias promotoras (Dieci et al., 2013). Los estudios *in vitro* demuestran que el factor TFIIIC es prescindible para el reciclaje de la ARN pol III en la mayoría de los genes, si bien es necesario en el caso de la transcripción de *SCR1* (520 pares de bases aproximadamente) (Dieci et al., 2013). Además de los factores de transcripción basales, se ha demostrado que el dímero Rpc37/Rpc53, junto con la subunidad Rpc11, es imprescindible para el reciclaje de la ARN pol III (Landrieux et al., 2006). Por otra parte, se ha propuesto que la fosforilación de la subunidad Rpc53 tras la inhibición de la vía TOR podría interferir en el reciclaje de la ARN pol III (Lee et al., 2012).

En la Figura 17 se muestran las diferentes interacciones en la maquinaria transcripcional de la ARN pol III durante la iniciación y el reciclaje.



**Figura 17. Esquema de las interacciones proteína-proteína y proteína-ADN durante la iniciación y el reciclaje de la ARN pol III.** Las flechas rojas indican interacciones proteína-proteína y las flechas azules indican interacciones proteína-ADN. Las flechas discontinuas indican interacciones hipotéticas. Extraído de (Dieci et al., 2013).

### 3.3.4. Otras proteínas involucradas en la transcripción de la ARN pol III

Además de los factores de transcripción basales TFIIIA, TFIIIB y TFIIIC, se han descrito otras proteínas que tienen alguna función en la transcripción mediada por la ARN pol III. Se ha constatado la existencia de un factor de transcripción, conocido como TFIIIE, el cual actúa como potenciador de la transcripción *in vitro* de los genes ADNt y *RDN5* (Dieci et al., 1993). Se ha demostrado que participa también en la transcripción del gen *SNR6* (Rüth et al., 1996).

Sub1 fue inicialmente identificado como un coactivador de la ARN pol II, aunque se ha descrito que mejora la transcripción de la ARN pol III *in vitro* (Wang and Roeder, 1998). Posteriormente, estudios de *genome-wide* demostraron que Sub1 se une tanto a genes de la ARN pol II como de la ARN pol III (Tavenet et al., 2009). La delección de *SUB1* provoca una caída en la transcripción de la ARN pol III, así como defectos en la ocupación de la ARN pol III y Bdp1 en los genes (Acker et al., 2014; Conesa and Acker, 2010; Rosonina et al., 2009; Tavenet et al., 2009). *In vitro*, Sub1 contribuye al reclutamiento de los factores TFIIIC y TFIIIB en los promotores de los ADNt, posiblemente gracias a interacciones físicas con subunidades de ambos complejos (Acker et al., 2014; Conesa and Acker, 2010). La función más importante

de Sub1 parece ser la de facilitar la iniciación y el reciclaje de la ARN pol III (Tavenet et al., 2009).

Nab2 es una proteína esencial que se descubrió por ser un factor de unión al ARNm poliadenilado (Anderson et al., 1993). Posteriormente se descubrió que Nab2 favorece la transcripción de la ARN pol III gracias a que promueve la interacción del factor TFIIB con el promotor (Reuter et al., 2015). Se ha demostrado que se une físicamente tanto a la ARN pol III como al factor TFIIB (Reuter et al., 2015). Alelos mutantes de *NAB2* provocan una menor ocupación de la ARN pol III en los genes (Reuter et al., 2015). Además, se le han propuesto otras importantes funciones, como el control sobre la neosíntesis de los transcritos de la ARN pol III (Schmid et al., 2012) o la degradación de transcritos aberrantes o *readthrough* (Turowski et al., 2016).

### 3.3.5. Remodelación de la cromatina

Uno de los elementos clave en el control de la regulación de la expresión génica es la cromatina. La cromatina se compone principalmente de unas proteínas básicas llamadas histonas, las cuales se organizan en unas estructuras denominadas nucleosomas. El núcleo de un nucleosoma está compuesto de un octámero formado por dos copias de histonas H2A, H2B, H3 y H4. La hebra de ADN se enrolla alrededor del octámero, dando casi dos vueltas completas, con 147 nucleótidos por vuelta. Cada octámero de histonas está enlazado con el siguiente gracias a un fragmento de ADN llamado lazo internucleosómico y a la histona H1.

La presencia de cromatina es, generalmente, represiva. Numerosos estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que los factores de transcripción basal, los activadores, los coactivadores, represores y demás proteínas que participan en la transcripción son incapaces de unirse al ADN cuando este está condensado en nucleosomas. La estructura cromatínica viene determinada por cuatro factores fundamentales: posicionamiento de nucleosomas, remodelación de la cromatina, modificaciones de histonas y variantes de histonas. Los nucleosomas son, por tanto, un importante elemento de regulación génica. De hecho, las histonas poseen una elevada cantidad de residuos susceptibles de sufrir todo tipo de modificaciones postraduccionales, que en último término son los mecanismos que controlan la estructura cromatínica y, por tanto, la expresión génica (Smolle and Workman, 2013). Este conjunto de mecanismos que alteran la expresión génica sin modificar la secuencia de nucleótidos del ADN es lo que se denomina epigenética.

En el caso concreto de la ARN pol III, a diferencia de las otras dos ARN polimerasas, la mayor parte de los genes no tienen secuencias reguladoras aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción (Orioli et al., 2012). Sin embargo, se ha demostrado que la actividad de la ARN pol III depende de la estructura de la cromatina en las regiones adyacentes a los genes

## Introducción

(Shukla and Bhargava, 2018; Yadon et al., 2010). Los genes ADNt en *S. cerevisiae* están desprovistos de nucleosomas en el tramo que corresponde a la región codificante, desde el sitio de inicio de la transcripción hasta la señal de terminación (Bhargava, 2013; Kumar and Bhargava, 2013). La mayoría de los genes de la ARN pol III tienen el tamaño aproximado de un nucleosoma. Como se ha comentado anteriormente, la asociación del factor TFIIC a la unidad transcripcional puede ser la causa de la exclusión de los nucleosomas (Dieci et al., 2002; Marsolier et al., 1995; Shivaswamy et al., 2004). En este sentido, en *S. cerevisiae* existen 29 pseudogenes de ARNt o TLEs (del inglés *tRNA-like elements*) que contienen secuencias promotoras incompletas y no se transcriben (Pavesi et al., 1994). *In vivo*, se ha demostrado que estos pseudogenes están ocupados por nucleosomas (Nagarajavel et al., 2013). Los genes ADNt están libres de nucleosomas, excepto en las regiones flanqueantes. Se ha demostrado la existencia de un nucleosoma aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción y de otro posicionado después de la señal de terminación en todos los ADNt (Kumar and Bhargava, 2013). Curiosamente, se ha demostrado que el nucleosoma que se posiciona aguas abajo lo hace en una posición variable en función del gen de ADNt, mientras que el que se posiciona aguas arriba lo hace en una posición fija (Kumar and Bhargava, 2013). Otros genes de la ARN pol III, como *SNR6*, muestran un posicionamiento de los nucleosomas muy similar a los ADNt, aun a pesar de tener unas secuencias promotoras algo diferentes (Figura I5) (Kumar and Bhargava, 2013).

La estructura cromatínica y el posicionamiento de nucleosomas depende de numerosos complejos proteicos. Uno de ellos es RSC (del inglés *Remodels Structure of Chromatin*), un complejo de 15 subunidades que pertenece a los remodeladores de cromatina ATP-dependientes (Cairns et al., 1996). Su subunidad catalítica es Sth1, mientras que las demás subunidades cuentan con varios dominios que podrían participar en el reclutamiento de otras proteínas a los genes diana (Saha et al., 2005).

Los estudios de *genome-wide* han demostrado que RSC se une a las regiones adyacentes de los ADNt (Ng et al., 2002). La interacción física entre la subunidad Rsc4 y Rpb5 (Soutourina et al., 2006) es necesaria para la transcripción de la ARN pol III (Kumar and Bhargava, 2013; Mahapatra et al., 2011). La delección del dominio C-terminal de Rsc4 (*rsc4-Δ4*) provoca la pérdida de interacción de RSC con la ARN pol III (Soutourina et al., 2006) y un aumento del posicionamiento de nucleosomas en muchos ADNts, lo que conlleva una caída en su actividad transcripcional (Kumar and Bhargava, 2013). La ausencia de la subunidad Sth1 provoca una menor ocupación de la ARN pol III en los genes y un aumento en el posicionamiento de los nucleosomas, y por lo tanto un descenso en la actividad transcripcional (Parnell et al., 2008). Teniendo en cuenta que los ADNt tienen poca presencia de nucleosomas y una elevada ocupación de RSC, y que la falta de actividad de RSC provoca un mayor

posicionamiento de nucleosomas, parece que la función principal de RSC es la de mantener una baja ocupación de nucleosomas para facilitar la transcripción de la ARN pol III (Parnell et al., 2008).

El complejo FACT también juega un importante papel en la remodelación de la cromatina. En *S. cerevisiae*, está compuesto de tres subunidades: Spt16, Pob3 y Nhp6 (Formosa et al., 2001). Nhp6 interacciona con los nucleosomas y recluta al heterodímero Spt16-Pob3 en esa región (Formosa et al., 2001). Diferentes estudios han puesto de manifiesto la importancia de Nhp6 para la transcripción tanto de *SNR6* como de los ADNt (Acker et al., 2013). Nhp6 se asocia *in vivo* a los ADNt y favorece su expresión, posiblemente facilitando el reclutamiento del factor TFIIB aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción (Braglia et al., 2007). Otros estudios sugieren que el complejo FACT regularía la transcripción de la ARN pol III actuando a modo de chaperona, favoreciendo el movimiento de la histona H2A.Z en el gen *SUP4* (Mahapatra et al., 2011).

Las proteínas Isw1 y Isw2 también participan en la remodelación de la cromatina de los genes de la ARN pol III. Se ha propuesto que ambas proteínas participan en el posicionamiento de nucleosomas de los ADNt (Kumar and Bhargava, 2013). Ambas proteínas parecen tener funciones antagónicas. Isw1 se encuentra asociada en el sitio de inicio de la transcripción de los ADNt, y su delección (*isw1Δ*) conlleva un mayor posicionamiento de nucleosomas en esa región (Tirosh et al., 2010). La función de Isw1 podría ser la de mantener los ADNt con una baja ocupación de nucleosomas para facilitar la transcripción (Zentner et al., 2013). Por su parte, Isw2 se une aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción de los ADNt (Kumar and Bhargava, 2013) y su función es la de favorecer el reclutamiento de nucleosomas en esas regiones para reprimir la expresión de los genes (Whitehouse and Tsukiyama, 2006; Yadon et al., 2010).

Las modificaciones de las histonas también juegan un importante papel en la expresión de los genes de la ARN pol III. La acetilación favorece la expresión de los genes, debido a que se eliminan cargas positivas de los residuos de lisina de las histonas, se genera una repulsión con el ADN (cargado negativamente) y la cromatina se relaja en esa región, permitiéndose el acceso a las zonas promotoras. Algunos estudios han demostrado que durante el crecimiento en fase exponencial en *S. cerevisiae*, la lisina en posición 56 de la histona H3 (H3K56) presente en la zona promotora de los ADNt se mantiene acetilada (Rufiange et al., 2007). La histona acetiltransferasa encargada de esta modificación es Rtt109, la cual se activa gracias a las chaperonas Asf1 y Vps75 (D'Arcy and Luger, 2011). En concordancia, se ha demostrado que tanto Asf1 como Vps75 se asocian a varios genes de la ARN pol III (Schwabish and Struhl, 2006; Selth et al., 2009). Aunque Rtt109 no parece

asociarse a los genes de la ARN pol III, su delección provoca una menor ocupación de Bdp1, lo que sugiere que podría participar en la regulación de la expresión génica *in vivo*, tal vez acetilando las histonas libres cuando no están ensambladas en nucleosomas (Dhillon et al., 2009; Selth et al., 2009). Del mismo modo, también se ha observado que las histona desacetilasas Hda1 y Hos2 se asocian *in vivo* a los ADNt (Mou et al., 2006; Venters et al., 2011).

### 3.4. Regulación de la actividad de la ARN pol III

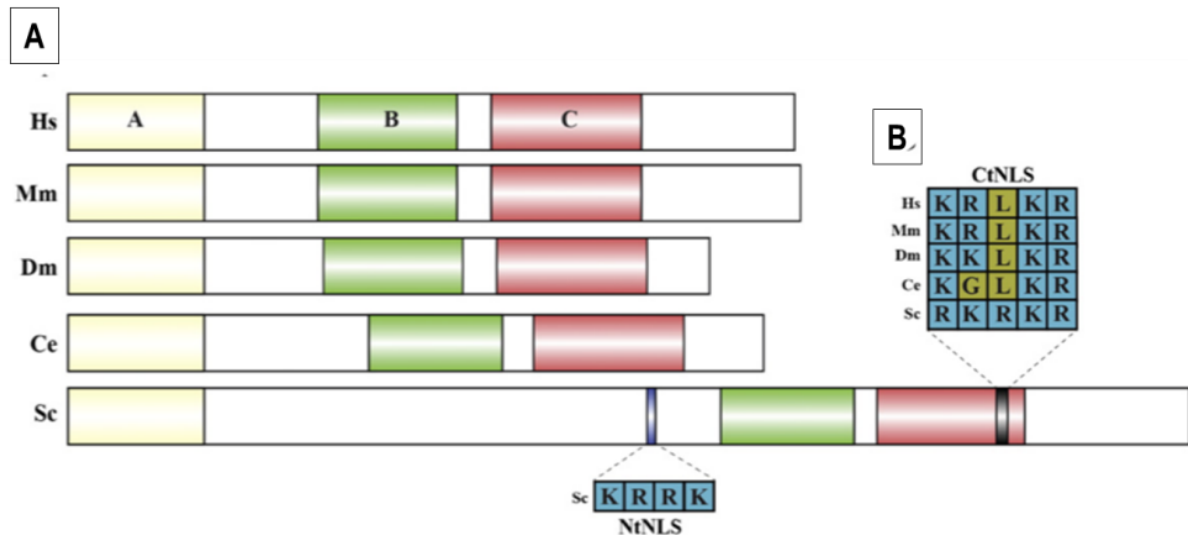
En células creciendo exponencialmente, la síntesis de transcritos de la ARN pol III representa un 15% del total de la actividad transcripcional (Moir and Willis, 2013). La actividad de la ARN pol III se regula de manera muy precisa en respuesta a los cambios en las condiciones crecimiento. Este control se ejerce principalmente gracias al represor Maf1, aunque también debido a modificaciones postraduccionales de la subunidad Rpc53 de la propia enzima.

#### 3.4.1. Maf1

Maf1 es el único represor negativo conocido de la ARN pol III, conservado desde levaduras hasta humanos (Boguta, 2013; Pluta et al., 2001; Reina et al., 2006; Willis et al., 2004). Se identificó por primera vez en un estudio de supresión génica, donde se aisló el alelo *maf1-1* que reducía la eficacia del supresor *SUP11* y provocaba un fenotipo de termosensibilidad cuando la cepa que lo portaba crecía en medios con fuentes de carbono no fermentables (Murawski et al., 1994). Maf1 se identificó poco tiempo después como un posible factor con funciones en la transcripción de la ARN pol III cuando se observó que la sobreexpresión de algunos fragmentos del gen *RPC160* corregían los defectos de crecimiento del mutante *maf1-1* (Boguta et al., 1997).

La proteína Maf1 tiene tres dominios conservados en todos los organismos, llamados A, B y C (Pluta et al., 2001; Reina et al., 2006). Los dominios B y C están separados entre sí, en prácticamente todos los organismos, por unos 10 aminoácidos (Boguta, 2013). En cambio, la distancia entre los dominios A y B varía enormemente entre especies (Boguta, 2013). Estos dominios son exclusivos de Maf1, ya que no se ha encontrado homología con ninguna otra proteína (Boguta, 2013). Sin embargo, se desconoce su función exacta (Boguta, 2013). Un estudio propone que el dominio A de Maf1 es necesario para su interacción con la ARN pol III y el dominio B, para interactuar con Brf1 (Reina et al., 2006). Maf1 es una proteína con movimiento núcleo-citoplasmático. En *S. cerevisiae*, la proteína Maf1 tiene dos secuencias de localización nuclear o NLS (del inglés Nuclear Localization Signal), una descrita cerca del

extremo N-terminal (NtNLS) y otra cerca del C-terminal (CtNLS) (Pluta et al., 2001). La organización de la proteína Maf1 en diferentes especies se muestra en la Figura I8.



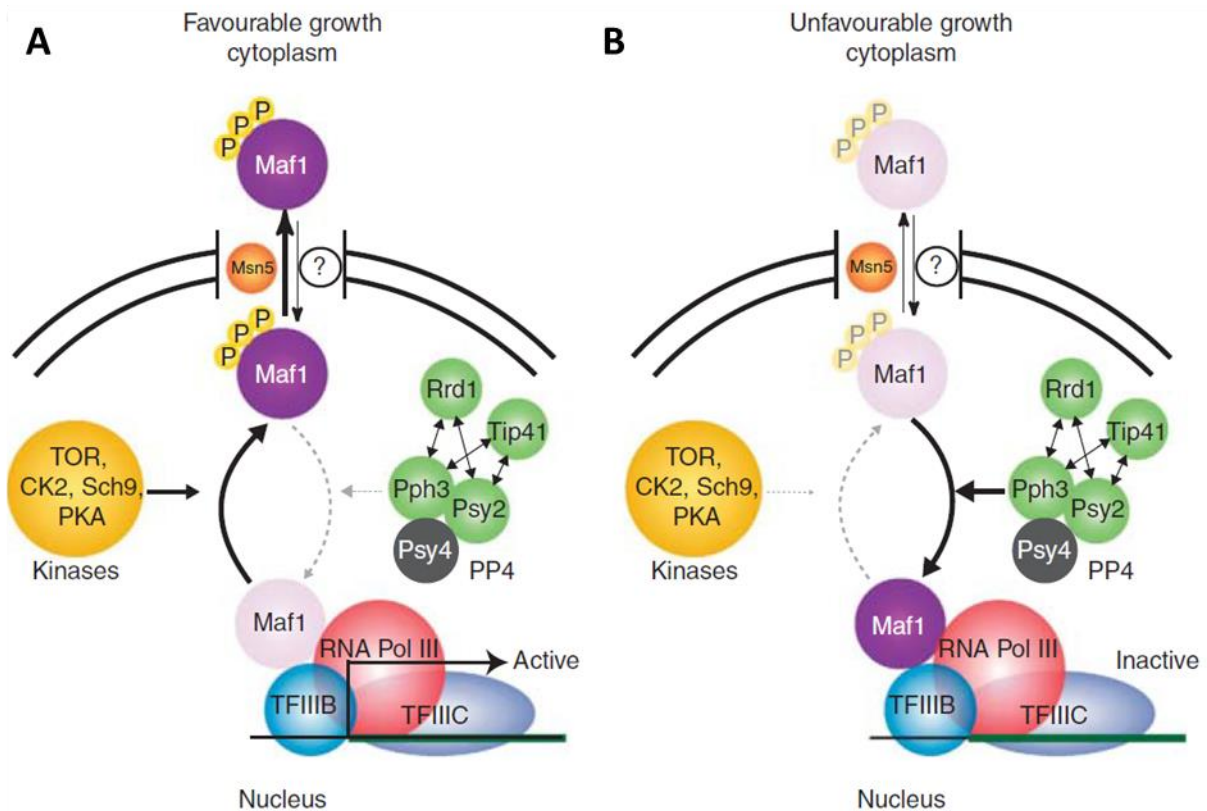
**Figura I8. Esquema de la proteína Maf1 en diferentes especies.** A) Regiones de la secuencia de Maf1 con alta homología entre diferentes organismos. B) Alineamiento de la región CtNLS en diferentes especies. Hs: *Homo sapiens*; Mm: *Mus musculus*; Dm: *Drosophila melanogaster*; Ce: *Caenorhabditis elegans*; Sc: *Saccharomyces cerevisiae*. Extraído de (Khanna et al., 2015).

En condiciones de crecimiento óptimas, Maf1 está localizado mayoritariamente en el citoplasma, aunque una pequeña parte es nuclear (Moir et al., 2006; Towpik et al., 2008). Su localización citoplasmática está controlada a través de dos mecanismos. Por un lado, la inactivación mediante fosforilación de sus dominios NLS (Moir et al., 2006). Por otro lado, el transporte nuclear de Maf1 fosforilado por la exportina Msn5 (Towpik et al., 2008).

El estado de fosforilación de Maf1 se corresponde con su localización celular. La forma fosforilada de Maf1 se corresponde con una localización citoplasmática, mientras que su forma desfosforilada es principalmente nuclear (Graczyk et al., 2011; Lee et al., 2009; Moir et al., 2006; Oficjalska-Pham et al., 2006; Roberts et al., 2006b; Wei et al., 2009). La forma desfosforilada de Maf1 es la forma “activa”, puesto que es la que ejerce la función represora sobre la ARN pol III (Graczyk et al., 2011; Oler and Cairns, 2012; Roberts et al., 2006b; Towpik et al., 2008). Cuando las condiciones de crecimiento son óptimas, Maf1 está fosforilado y retenido en el citoplasma gracias a la acción directa de varias quinasas. Se ha propuesto que Sch9 es la principal quinasa de Maf1, actuando a través de la vía TOR (Huber et al., 2009). Sch9 fosforila a Maf1 *in vitro* e interaccionan físicamente en una forma dependiente de rapamicina (Lee et al., 2009). También se ha descrito que PKA (*Protein Kinase A*) es una

importante kinasa de Maf1 (Moir et al., 2006). La kinasa TORC1 fosforila a Sch9 para controlar la actividad de Maf1 (Urban et al., 2007), aunque también se ha demostrado que fosforila directamente a Maf1 *in vitro* (Wei et al., 2009). La kinasa CK2 (Casein Kinase 2) se ha descrito que fosforila a Maf1 *in vitro* (Graczyk et al., 2011). La función de CK2, *in vivo*, es la de restablecer la actividad de la ARN pol III, fosforilando a Maf1 después de que ejerza su función represora en el núcleo en un medio con una fuente de carbono no fermentable (Graczyk et al., 2011). Todas estas kinasas contribuyen en mayor o menor grado a mantener a Maf1 fosforilado e inactivo cuando las condiciones de crecimiento son óptimas, permitiendo así la actividad de la ARN pol III (Moir and Willis, 2013).

Maf1 actúa como efector de diferentes rutas de señalización para reprimir a la ARN pol III (Ciesla et al., 2007; Oler and Cairns, 2012; Upadhyay et al., 2002). Bajo diferentes situaciones de estrés como bloqueo de la vía TOR, daño en la pared celular, estrés del retículo endoplasmático o daño en el ADN, Maf1 se desfosforila, entra al núcleo y reprime la actividad de la ARN pol III (Ciesla et al., 2007; Oler and Cairns, 2012; Upadhyay et al., 2002). Se ha sugerido que PP2A podría ser una de las fosfatasa de Maf1 (Oficjalska-Pham et al., 2006). Otro estudio propone que es PP4 (del inglés Protein Phosphatase 4) la principal fosfatasa de Maf1 (Oler and Cairns, 2012). PP4 es una serina/treonina fosfatasa de la familia de las PPPs (Phosphaprotein phosphatases), muy conservada en eucariotas y que participa en diversos procesos celulares esenciales (Cohen et al., 2005; Gingras et al., 2005; Heideker et al., 2007; Park and Lee, 2020). PP4 es un complejo de varias proteínas: Pph3, Psy2 y Psy4. Pph3 es la subunidad con actividad catalítica, mientras que la subunidad Psy2 tiene función reguladora, siendo ambas necesarias para la desfosforilación de Maf1 *in vivo* (Gingras et al., 2005; Oler and Cairns, 2012; Van Hoof et al., 2005). Psy4 participa en la desfosforilación de la histona H2A (Keogh et al., 2006). Se han descrito otras posibles subunidades reguladoras, como Rrd1 o Tip41, que se asocian físicamente a Pph3 y son necesarias para la desfosforilación de Maf1 (Gingras et al., 2005; Oler and Cairns, 2012; Van Hoof et al., 2005). PP4 controla la represión de la transcripción de la ARN pol III, integrando diferentes rutas de señalización para desfosforilar a Maf1 (Oler and Cairns, 2012). La regulación por fosforilación/desfosforilación de Maf1 se muestra en el modelo de la Figura I9.



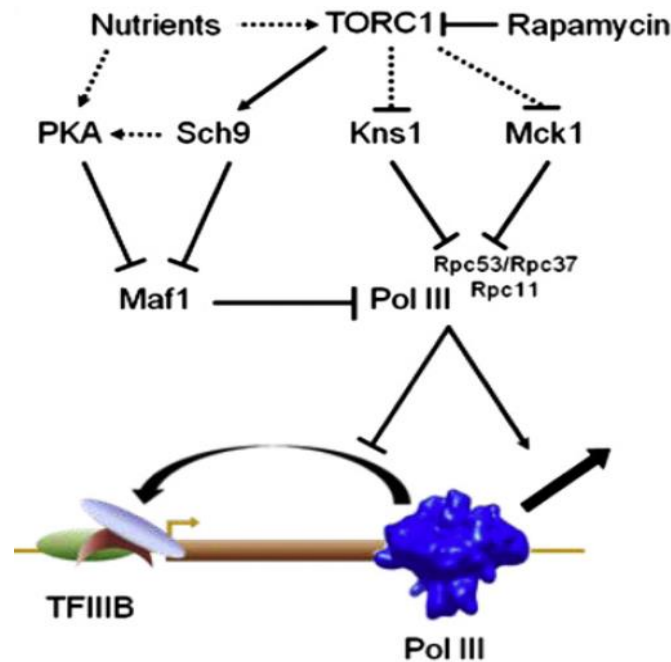
**Figura 19. Modelo propuesto sobre el control del estado de fosforilación, localización y actividad de Maf1.**  
 A) En condiciones óptimas de crecimiento, Maf1 se encuentra mayoritariamente fosforilado por la acción de las diferentes quinasas. En su estado fosforilado, Maf1 no tiene acción represora y es exportado del núcleo por Msn5.  
 B) En condiciones de estrés, Maf1 se acumula en el núcleo y es desfosforilado principalmente por la fosfatasa PP4. Cuando está desfosforilado, Maf1 puede unirse a la ARN pol III y al factor TFIIB inhibiendo la transcripción.  
 Extraído de (Oler and Cairns, 2012).

Se desconocen algunos aspectos del mecanismo de inhibición por parte de Maf1, aunque podría interferir con varias etapas del proceso transcripcional. Cuando Maf1 está localizado en el núcleo y está desfosforilado, se une físicamente al extremo N-terminal de la subunidad Rpc160 de la ARN pol III (Oficjalska-Pham et al., 2006; Pluta et al., 2001; Vannini et al., 2010). Esta unión de Maf1 provoca un reordenamiento del heterotrímero Rpc31/Rpc82/Rpc34 dentro de la estructura de la ARN pol III, impidiendo la asociación ARN pol III-TFIIB, y así, reprimiendo la iniciación de la transcripción (Vannini et al., 2010) (Brun et al., 1997). De esta manera, Maf1 impide que la ARN pol III sea reclutada en los promotores de los genes (Vannini et al., 2010). La acción represora de Maf1, por tanto, no implicaría una inhibición de la actividad catalítica de la ARN pol III, sino que impide su asociación con el factor TFIIB (Vannini et al., 2010). Se ha sugerido que Maf1 se uniría a la enzima durante la elongación (Vannini et al., 2010). Por otra parte, estudios *in vitro* demuestran que Maf1 inhibe el reclutamiento de TFIIB por parte del complejo TFIIC-ADN, y también impide el reclutamiento de la ARN pol III al complejo TFIIB-TFIIC-ADN (Desai et al., 2005). También

se ha demostrado que Maf1 coprecipita con el componente Brf1 del factor TFIIB (Desai et al., 2005; Pluta et al., 2001). Por último, experimentos de ChIP demuestran que Maf1 se une a los genes durante la represión, aunque no se ha establecido si es una consecuencia indirecta de su asociación con la ARN pol III (Oficjalska-Pham et al., 2006; Roberts et al., 2006b).

### 3.4.2. Rpc53

Aunque Maf1 es el principal regulador negativo de la ARN pol III, se ha demostrado que existen otros mecanismos de represión de la ARN pol III. El alelo mutante de *MAF1* en el que se sustituyeron los residuos fosforilables por residuos de alanina (Maf1<sup>7A</sup>), provoca que Maf1 esté permanentemente desfosforilado y con localización nuclear, reprimiendo a la ARN pol III (Huber et al., 2009). En estas condiciones, es necesario someter a las células a un tratamiento de estrés para lograr la completa represión de la ARN pol III (Huber et al., 2009). Este descubrimiento sugirió que debían existir mecanismos adicionales durante el proceso de represión para permitir la actividad de Maf1. Uno de estos mecanismos adicionales es la fosforilación de la subunidad Rpc53 de la ARN pol III, llevada a cabo por las kinasas Kns1 y Mck1, las cuales son efectores de la ruta TOR (Lee et al., 2012). Kns1 es el único miembro de la familia de kinasas LAMMER/Clk en *S. cerevisiae* (Padmanabha et al., 1991). Los niveles de Kns1 se mantienen bajos cuando está activa la vía TOR y aumentan cuando esta se inhibe (Lee et al., 2012). Por otra parte, Mck1 es uno de los cuatro miembros de la familia de las glucógeno-sintasa kinasas 3 o GSK3, la cual tiene importantes funciones en diversos procesos como el crecimiento celular, metabolismo basal o la apoptosis (Jope and Johnson, 2004). Se ha demostrado que tanto Kns1 como Mck1 fosforilan a Rpc53 en diferentes condiciones de estrés, aunque actuando de manera secuencial (Lee et al., 2012). La delección de *KNS1* o *MCK1* provoca que Rpc53 no se fosforile en ninguna condición de estrés (Lee et al., 2012). Cuando Rpc53 no se fosforila, se produce una atenuación de la represión de la ARN pol III (Lee et al., 2012). De manera interesante, se ha demostrado que la fosforilación de Rpc53 por parte de estas dos kinasas se lleva a cabo mediante un mecanismo independiente de Maf1 pero complementario a su actividad represiva (Lee et al., 2012). Se ha propuesto un modelo en el que la fosforilación de Rpc53 favorece un cambio conformacional de la enzima que facilita su interacción con Maf1, produciéndose la completa represión de la ARN pol III (Lee et al., 2012) (Figura I10).



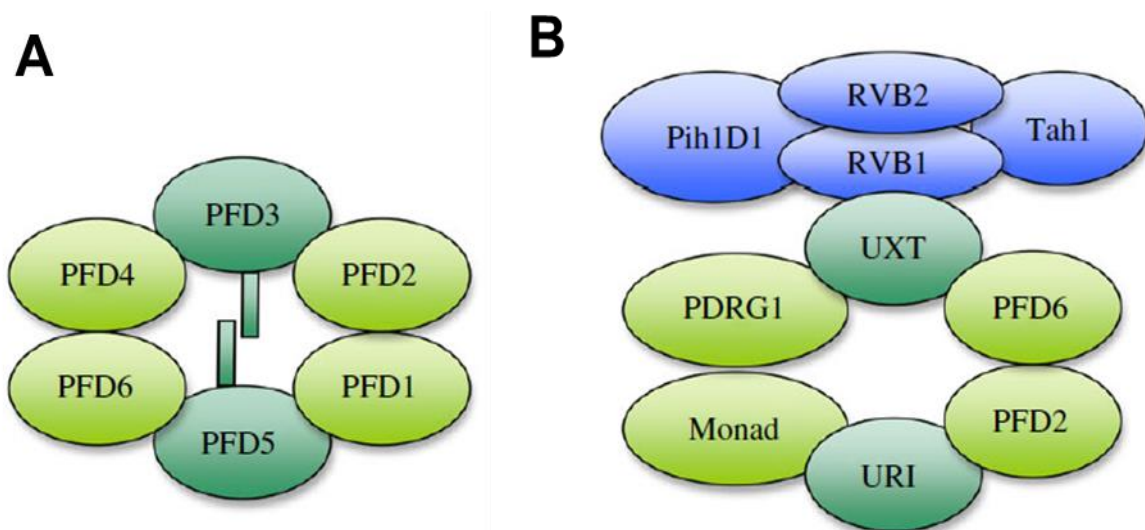
**Figura I10. Modelo propuesto sobre el control de la represión de la ARN pol III a través de la vía TOR.** Cuando hay disponibilidad de nutrientes y la vía TOR está activa, Sch9 y PKA fosforilan a Maf1 manteniéndolo inactivo. Las kinasas efectoras de la vía TOR, Kns1 y Mck1, se mantienen a bajos niveles e inhibidas. Cuando la ruta TOR se bloquea, estas kinasas fosforilan a la subunidad Rpc53 de la ARN pol III, favoreciendo un cambio conformacional de la enzima que facilita la interacción con Maf1, el cual ha sido desfosforilado por PP4. Extraído de (Lee et al., 2012).

#### **4. Prefoldinas y prefoldinas-like**

Las prefoldinas son una familia de proteínas conservadas en los eucariotas, originalmente descritas como cochaperonas capaces de capturar polipéptidos desplegados y transferirlos a las chaperoninas de clase II ATP-dependientes CCT (del inglés *Chaperonin Containing ICP-1*) (Kubota et al., 1994; Vainberg et al., 1998). Aunque no se han encontrado prefoldinas en bacterias, sí están presentes en arqueas, lo que sugiere que las prefoldinas eucariotas pueden tener su origen evolutivo en este grupo (Leroux et al., 1999). El complejo prefoldina típico está formado por seis subunidades: 2 de clase  $\alpha$  (Pfd3 y Pfd5) y 4 de clase  $\beta$  (Pfd1, Pfd2, Pfd4 y Pfd6) (Figura I11 A). Su diana mejor caracterizada son los componentes del citoesqueleto (Geissler et al., 1998). El complejo prefoldina capta los monómeros desplegados de actina y de  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina, y se mantiene unido a ellos hasta que los transporta al complejo CCT (Geissler et al., 1998). Además de estas funciones, también se ha descrito que el complejo prefoldina en *S. cerevisiae* participa en la elongación de la transcripción de la ARN pol II (Millán-Zambrano et al., 2013).

Existen otras proteínas tipo prefoldina (prefoldina-like) que participan en el ensamblaje citoplasmático de complejos que no forman parte del citoesqueleto (Millán-Zambrano and

Chávez, 2014). En mamíferos, además del complejo prefoldina canónico, las subunidades PFDN2 y PFDN6 (Pfd2 y Pfd6 en *S. cerevisiae*, respectivamente) forman otro complejo con las proteínas UXT, RPB5, WDR92/Monad, PDRG1 y URI (Bud27 en *S. cerevisiae*) (Gstaiger et al., 2003; Martínez-Fernández et al., 2018b). Este complejo prefoldina-like adopta una conformación en la que todas las subunidades  $\alpha$  y algunas  $\beta$  son sustituidas por polipéptidos prefoldina-like (Figura I11 B) (Millán-Zambrano and Chávez, 2014). El complejo prefoldina-like coopera funcionalmente con el complejo chaperona R2TP, el cual está formado por las subunidades RVB1, RVB2, PihD1 y hSpagh (Figura I11 B) (Kakihara and Houry, 2012). Entre las funciones del complejo prefoldina-like humano destacan su participación en el ensamblaje citoplasmático de la ARN pol II (Boulon et al., 2010) y el ensamblaje y estabilización de la kinasa relacionada con complejo fosfatidilinositol-3 kinasa (Hořejší et al., 2010). Cabe mencionar que el complejo R2TP también existe en *S. cerevisiae*, aunque no se ha detectado la presencia del complejo R2TP-prefoldina-like en este organismo (Martínez-Fernández et al., 2018b).



**Figura I11. Esquema de la estructura del complejo prefoldina y prefoldina-like en mamíferos.** A) El complejo prefoldina en mamíferos y en *S. cerevisiae* está formado por 2 subunidades de clase  $\alpha$  (Pfd3 y Pfd5, verde oscuro) y 4 de clase  $\beta$  (Pfd1, Pfd2, Pfd4 y Pfd6, verde claro). B) El complejo prefoldina-like (solo descubierto en mamíferos) está compuesto de las dos subunidades tipo  $\beta$  del complejo prefoldina (PFD6 y PFD2) y otros polipéptidos que sustituyen a las demás subunidades canónicas del complejo prefoldina (UXT, RPB5, WDR92/Monad, PDRG1 y URI). Este complejo se asocia al complejo chaperona R2TP (azul) para ejercer sus funciones. Extraído de (Millán-Zambrano and Chávez, 2014).

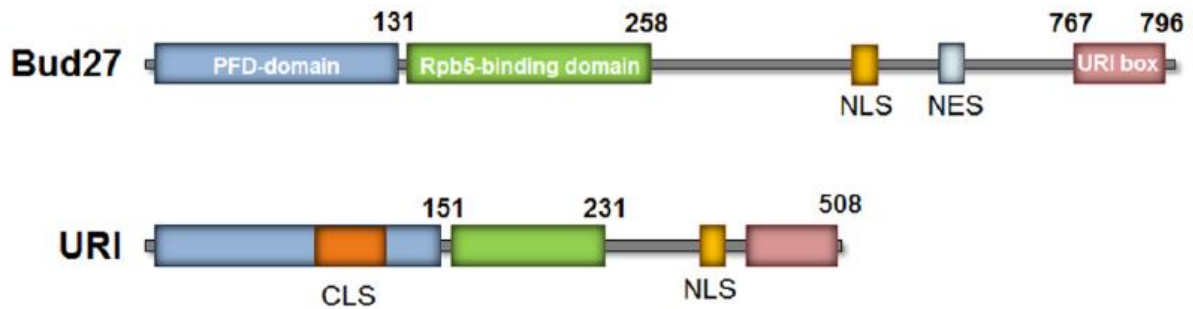
## 4.1. La prefoldina-like Bud27/URI

La proteína URI (del inglés *Unconventional RPB5 Interactor*) humana, también llamada RMP (del inglés *RPB5 Mediating Protein*), de 508 aminoácidos, fue identificada por primera vez como un factor que interactuaba con la subunidad común de las tres ARN polimerasas, RPB5 (Dorjsuren et al., 1998). Poco tiempo después se identificó el gen ortólogo de *URI* en *S. cerevisiae* (*YFL023w*), en un estudio donde se identificaron varios mutantes que presentaban un patrón de selección del sitio de gemación alterado (Ni and Snyder, 2001). Al gen *YFL023w* se le denominó *BUD27* (*BUD site selection 27*) (Ni and Snyder, 2001).

### 4.1.1. Organización y localización de Bud27/URI

Bud27 y su ortólogo humano URI, son miembros de la familia de prefoldinas que actúan como chaperonas ATP-independientes (Martínez-Fernández et al., 2015; Martínez-Fernández et al., 2018b; Millán-Zambrano and Chávez, 2014). El gen *URI* en *D. melanogaster* sí es esencial y las mutaciones en *C. elegans* producen múltiples efectos somáticos, así como esterilidad (Kirchner et al., 2008; Parusel et al., 2006). El gen *BUD27* de *S. cerevisiae* no es esencial para la viabilidad celular, aunque su delección provoca una respuesta transcripcional alterada de genes mayoritariamente relacionados con el metabolismo de aminoácidos (Gstaiger et al., 2003).

Tanto Bud27 como URI tienen tres regiones conservadas en su secuencia de aminoácidos: dominio prefoldina (PFD), dominio de unión a Rpb5 y caja URI (Figura 112) (Delgermaa et al., 2004; Martínez-Fernández et al., 2015; Mirón-García et al., 2013). Ninguno de esos dominios parece ser esencial para la función de Bud27 *in vivo* (Deplazes et al., 2009; Mirón-García et al., 2013). Sin embargo, el dominio PFD es importante para las funciones de Bud27. Permite la interacción de Bud27 con Pfd6 (Gstaiger et al., 2003), es importante para el papel de Bud27 en la elongación de la transcripción de la ARN pol II (Mirón-García et al., 2014) y también para la interacción de Bud27 con el factor de iniciación de la traducción eIF1A (Deplazes et al., 2009). Además, se ha propuesto que el dominio PFD en URI es importante para su interacción con el complejo R2TP-prefoldina-like (Mita et al., 2013). El dominio de unión a Rpb5 es, como su nombre indica, necesario para la interacción de Bud27/URI con la subunidad común de las tres ARN polimerasas, Rpb5 (Gstaiger et al., 2003; Mirón-García et al., 2013; Mita et al., 2013). No se ha identificado una función clara para la caja URI, aunque su delección parece afectar ligeramente la traducción (Deplazes et al., 2009). En humanos, se ha demostrado que la caja URI es necesaria para la interacción de URI con el factor de transcripción TFIIF (Wei et al., 2003).



**Figura I12. Esquema de Bud27 en *S. cerevisiae* y URI en humanos.** Se muestran las tres regiones conservadas: dominio prefoldina, dominio de unión a Rpb5 y caja URI. Se muestran, además, la señal de localización nuclear o NLS (*Nuclear Localization Signal*), la señal de exporte nuclear o NES (*Nuclear Export Signal*) y la señal de localización citoplasmática o CLS (*Cytoplasmic Localization Signal*). Extraído de (Martínez-Fernández et al., 2018b).

Bud27/URI es una proteína con localización núcleo-citoplasmática. En cultivos celulares humanos se demostró que URI se mueve entre núcleo y citoplasma, aunque su localización mayoritaria es citoplasmática (Delgermaa et al., 2004). Esto concuerda con la presencia en la proteína URI de una señal de localización nuclear (NLS) y otra señal de localización citoplasmática (CLS) (Figura I11) (Delgermaa et al., 2004). Del mismo modo, también se demostró que aunque URI es principalmente citoplasmático en *D. melanogaster*, una pequeña parte se localiza en la cromatina, asociada a la ARN pol II (Kirchner et al., 2008).

La proteína Bud27 de *S. cerevisiae* fue originalmente descrita como citoplasmática (Deplazes et al., 2009). El grupo del Dr. Navarro demostró posteriormente que la delección del dominio NES provocaba su acumulación en el núcleo (Mirón-García et al., 2013). Además, Bud27 tiene funciones relacionadas con la transcripción, lo que concuerda con su translocación al núcleo (Martínez-Fernández et al., 2020; Mirón-García et al., 2014; Vernekar and Bhargava, 2015). De manera interesante, la translocación de Bud27 al núcleo es independiente de la exportina Xpo1 y de la polarización de los microtúbulos, a diferencia de lo que ocurre con URI en células humanas (Mirón-García et al., 2013; Mita et al., 2013).

Por último, se ha descrito que URI sufre modificaciones postraduccionales, aunque la importancia de estas sobre su función no ha sido explorada en profundidad (Gstaiger et al., 2003; Mita et al., 2013).

#### 4.1.2. Bud27 interviene en la traducción

La traducción es un proceso celular esencial muy regulado en el que participan de forma coordinada los ribosomas, varios factores de traducción y chaperonas que se encargan del control y plegamiento de los polipéptidos de nueva síntesis (Frydman, 2001). Uno de los principales mecanismos de control de calidad traduccional consiste en la fosforilación del

factor de iniciación eIF2a por parte de la proteína Gcn2. Este mecanismo inhibe la traducción de muchas proteínas y ayuda en la activación de otros factores regulados por estrés, como Gcn4 (Albanese et al., 2006). En condiciones óptimas de crecimiento, la expresión de Gcn4 está inhibida a nivel traduccional, manteniéndose bajos niveles de la misma. Bajo diferentes situaciones de estrés o carencia de nutrientes o aminoácidos, se dispara la expresión de Gcn4, el cual es un factor de transcripción que controla la expresión de varios genes relacionados con el metabolismo de los aminoácidos (Hinnebusch, 2005).

Bud27 contribuye a regular negativamente la expresión de Gcn4 (Deplazes et al., 2009; Gstaiger et al., 2003). La delección de *BUD27* provoca un aumento en los niveles de la proteína Gcn4 (Gstaiger et al., 2003). La desrepresión de Gcn4 en una cepa mutante creciendo en condiciones óptimas es un factor indicativo de defectos en la iniciación de la traducción, y provoca lo que se conoce como fenotipo Gcd<sup>-</sup> (del inglés *General control depressed*) (Deplazes et al., 2009). Estos mutantes se caracterizan por presentar, además de una mayor expresión de Gcn4, una menor cantidad de complejo ternario o TC (del inglés *Ternary Complex*), que consiste en el ARNt iniciador de metionina (Met-ARNt<sup>Met</sup>), el factor de iniciación eIF2 y el GTP, unidos a la subunidad menor del ribosoma, 40S, (Hinnebusch, 2005). Mutantes con defectos en la traducción presentan un crecimiento lento y termosensibilidad (Cuesta et al., 1998). Todos estos fenotipos están presentes en los mutantes *bud27Δ* (Deplazes et al., 2009; Gstaiger et al., 2003; Martínez-Fernández et al., 2020; Mirón-García et al., 2013; Mirón-García et al., 2014). Además, la ausencia de Bud27 provoca que las células sean sensibles a drogas inhibitoras de la traducción como la paramomicina, higromicina B o la cicloheximida (Deplazes et al., 2009). Además, los mutantes *bud27Δ* presentan un perfil de polisomas alterado (Deplazes et al., 2009; Martínez-Fernández et al., 2020; Vernekar and Bhargava, 2015).

El papel de Bud27 se asocia con la iniciación de la traducción, ya que promueve el reclutamiento del TC a la subunidad 40S del ribosoma (Deplazes et al., 2009). Este proceso ocurre gracias a la interacción de Bud27 con el factor de iniciación de la traducción eIF1A y con los ribosomas (Deplazes et al., 2009). Bud27 también interacciona con chaperonas de la familia Hsp70 y Hsp40, como Ssb1 y Sis1, y con la prefoldina Pfd6 (Deplazes et al., 2009; Gstaiger et al., 2003; Mirón-García et al., 2013; Möckli et al., 2007). Esto sugiere que Bud27, al menos de manera indirecta, podría participar en el control de calidad co-traduccional y en el plegamiento proteico.

#### 4.1.3. Bud27 participa en el ensamblaje citoplasmático de las tres ARN polimerasas

Bud27 es la primera proteína para la que se ha descrito su papel en la biogénesis y ensamblaje de las tres ARN polimerasas (Mirón-García et al., 2013). La ausencia de Bud27

provoca la acumulación citoplasmática de las tres ARN polimerasas (Martínez-Fernández et al., 2020; Mirón-García et al., 2013). La localización de Bud27 no influye en la localización de las ARN polimerasas, lo cual indica que Bud27 no participa en el transporte de estas enzimas al núcleo (Mirón-García et al., 2013). El papel de Bud27 sobre la biogénesis de las ARN polimerasas también es independiente de las prefoldinas (Mirón-García et al., 2013). Además, el papel de Bud27 en la biogénesis y ensamblaje de las ARN polimerasas es independiente del factor de transporte Iwr1 (Mirón-García et al., 2013).

Bud27 participa en este proceso en una vía dependiente de Rpb5, y es fundamental para el correcto ensamblaje de Rpb5 y Rpb6 en el núcleo de las ARN polimerasas (Mirón-García et al., 2013). Una función similar se ha sugerido para el homólogo humano URI, al menos en el caso de la ARN pol II (Mirón-García et al., 2013; Mita et al., 2013). Por último, otros autores han descrito que Bud27 participa en la biogénesis de las subunidades Rpc160 y Rpc128 y en el ensamblaje de la ARN pol III (Vernekar and Bhargava, 2015).

#### 4.1.4. Bud27 participa en la transcripción de las ARN polimerasas II y III

Los mutantes *bud27Δ* presentan un fenotipo de sensibilidad a drogas que reducen la disponibilidad de nucleótidos para la transcripción, como el 6-Azauracilo o el ácido micofenólico (Martínez-Fernández et al., 2020; Mirón-García et al., 2014). La delección de *BUD27* provoca una menor ocupación de la ARN pol II en múltiples genes, lo cual podría deberse, al menos parcialmente, a los defectos de ensamblaje de la enzima (Mirón-García et al., 2013; Mirón-García et al., 2014). Sin embargo, el grupo del Dr. Navarro demostró que los defectos transcripcionales provocados por la ausencia de Bud27 eran independientes de Rpb5 (Mirón-García et al., 2014). Bud27 se asocia a la cromatina e interacciona con Rpb1, la subunidad mayor de la ARN pol II, fosforilada en el dominio CTD tanto en Ser5-P como en Ser2-P (Mirón-García et al., 2014). Su ausencia provoca un patrón de fosforilación del CTD alterado, con una mayor proporción de Ser5-P y Ser2-P, lo cual indica problemas en la elongación de la transcripción (Mirón-García et al., 2014). *BUD27* interacciona genéticamente con *RSC4*, *RSC1* y *RSC8* (Collins et al., 2007; Mirón-García et al., 2014) y a nivel de proteína, Bud27 interacciona físicamente con Sth1, todos ellos componentes del complejo remodelador de cromatina RSC (Mirón-García et al., 2014). La función de Bud27 podría ser la de mediar la interacción entre la subunidad Rpb5 de la ARN pol II y el complejo RSC, dado que la ausencia de Bud27 provoca una pérdida de esta interacción (Mirón-García et al., 2014). Esto puede ocurrir estableciéndose una asociación tripartita Rpb5-Bud27-RSC, que favorecería una adecuada conformación de la cromatina que permita la transcripción.

De acuerdo a lo anteriormente mencionado, el trabajo de nuestro grupo muestra que la ausencia de Bud27 provoca una menor ocupación de la ARN pol II en los genes de RPs y

RiBis, así como una menor acumulación de ARNm de RPs (Martínez-Fernández et al., 2020). Curiosamente, Bud27 se une también a los genes de RPs y RiBis (Martínez-Fernández et al., 2020).

De manera similar a lo que sucede en el caso de la ARN pol II, se ha descrito que la delección de *BUD27* conlleva una menor ocupación de la ARN pol III en muchos de sus genes diana (Vernekar and Bhargava, 2015). Como consecuencia, hay una menor síntesis de transcritos de la ARN pol III (Gstaiger et al., 2003; Martínez-Fernández et al., 2020; Vernekar and Bhargava, 2015). La ausencia de Bud27 provoca una pérdida de interacción entre la ARN pol III y RSC (Vernekar and Bhargava, 2015). Por lo tanto, Bud27 podría, de nuevo, facilitar la interacción entre la ARN pol III y RSC para mantener una adecuada estructura de la cromatina que favorezca la transcripción.

Se han descrito funciones para el homólogo humano de Bud27, URI, en la transcripción. Se ha descrito que URI actúa como un modulador positivo de la transcripción en *D. melanogaster* (Kirchner et al., 2008). En células humanas, URI modula la transcripción del receptor de andrógenos celular, actuando a modo de represor (Mita et al., 2011). También se ha descrito una función correpresora de URI en la transactivación de la proteína del virus de la Hepatitis B, HBx, debido a que interfiere en la interacción entre Rpb5 y TFIIB (Dorjsuren et al., 1998). Además, se ha propuesto que actúa como supresor de la activación de la transcripción de genes de la ARN pol II debido a su interacción con el factor general de transcripción TFIIF (Wei et al., 2003).

#### 4.1.5. Otras funciones de Bud27/URI

La participación de Bud27 y URI en otros importantes procesos celulares se ha sugerido en base a varios trabajos. En *S. cerevisiae*, Bud27 podría tener un papel en los procesos de reparación del ADN (Muñoz-Galván et al., 2013). Por un lado, la delección de *BUD27* provoca una alteración en el sistema de recombinación de cromátidas hermanas (Muñoz-Galván et al., 2013). Por otro lado, la ausencia de Bud27 aumenta los niveles de la proteína Rad52, implicada en la reparación de roturas de doble cadena en el ADN en condiciones de crecimiento vegetativo y durante la meiosis (Muñoz-Galván et al., 2013).

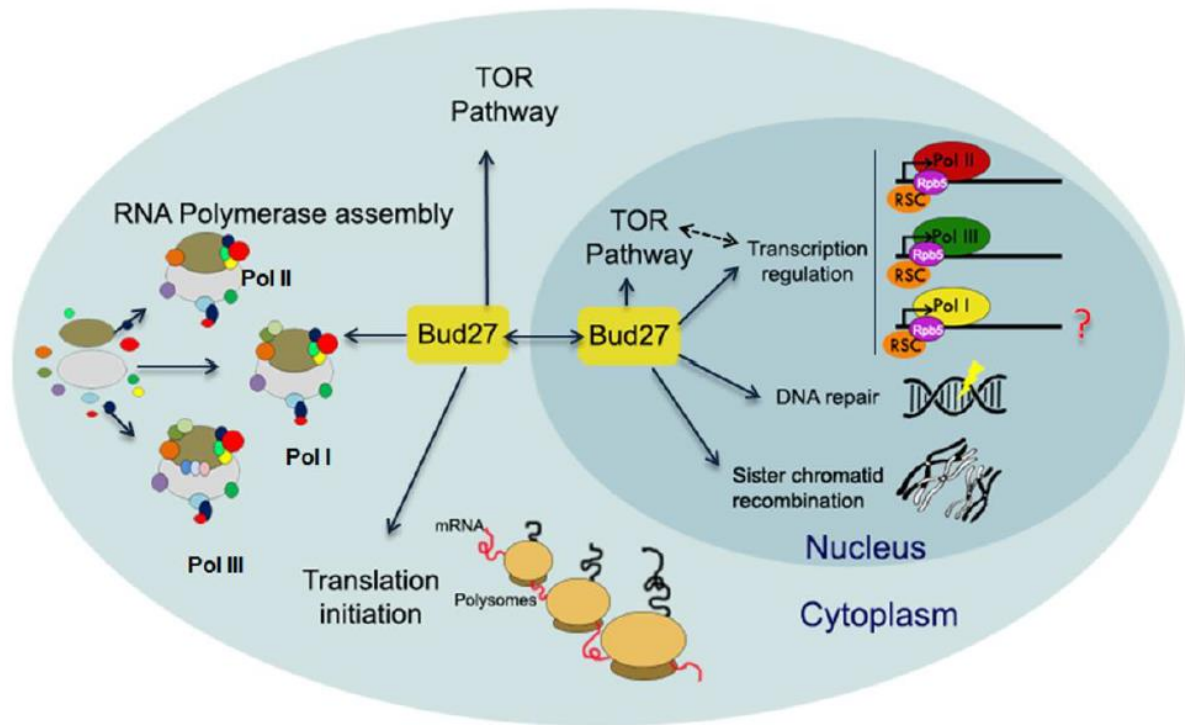
Se ha sugerido que Bud27 podría ser el elemento central de un complejo proteico que incluye a la histona desmetilasa Gis1, la cual participa en la regulación de genes en condiciones de falta de nutrientes en *S. cerevisiae* (Tronnorsjö et al., 2007). Por último, se ha propuesto un papel oncogénico de la proteína URI humana (Burén et al., 2016; Mita et al., 2016; Theurillat et al., 2011; Tummala et al., 2014).

### 4.1.6. Bud27/URI es un elemento de la ruta de señalización TOR

La ruta TOR es la principal vía de señalización celular que vincula la disponibilidad de nutrientes con procesos celulares como la transcripción, la traducción o la división celular (Loewith and Hall, 2011; Mayer and Grummt, 2006). La ausencia de nutrientes o de factores de crecimiento inhibe el funcionamiento de la vía TOR, lo que produce una inmediata respuesta transcripcional en la célula (Hardwick et al., 1999). La mayoría de los genes regulados a través de esta ruta están relacionados con el metabolismo y con la biosíntesis de aminoácidos (Hardwick et al., 1999) y con el control de la biogénesis de ribosomas (Martin et al., 2006) (ver siguiente apartado sobre la ruta TOR).

Se ha propuesto que tanto Bud27 como URI participan en la respuesta transcripcional dependiente de la ruta TOR, concretamente en aquellos genes relacionados con la biosíntesis de aminoácidos (Gstaiger et al., 2003; Martínez-Fernández et al., 2020). Los trabajos del grupo del Dr. Navarro muestran que el mutante *bud27Δ* presenta unos 1000 genes desregulados, de los cuales aproximadamente un 30% coinciden con los que se alteran tras un bloqueo de la vía TOR (Martínez-Fernández et al., 2020). Los genes cuya expresión aumentó están relacionados con procesos biosintéticos, mientras que aquellos en los que su expresión disminuyó están relacionados con traducción, biogénesis de ribosomas y procesamiento de ARNr (Martínez-Fernández et al., 2020). En concordancia, otro trabajo anterior mostró que la inactivación de Bud27 provoca una desregulación de 39 genes, de los cuales 37 coinciden con los alterados tras un bloqueo de la vía TOR con rapamicina y/o por carencia de aminoácidos (Gstaiger et al., 2003). Según el mismo estudio, una parte de los genes de la ARN pol II desregulados contienen una secuencia consenso para Gcn4 (Gstaiger et al., 2003). Como se ha mencionado anteriormente, Gcn4 es un activador transcripcional de genes relacionados con la biosíntesis de aminoácidos (Hinnebusch, 2005). El hecho de que el perfil transcripcional del mutante *bud27Δ* mimetice parcialmente un bloqueo de la vía TOR con rapamicina, sugiere que Bud27 puede ser un elemento dentro de esta vía. Además, se ha demostrado que los niveles de Bud27 descienden tras una situación de carencia de fuentes de nitrógeno (Gstaiger et al., 2003), lo cual podría explicar las similitudes en la respuesta transcripcional del mutante *bud27Δ* y de la inhibición de la vía TOR. Finalmente, se ha demostrado que URI se fosforila a través de la vía TOR, aunque la función biológica de este hecho no se ha establecido todavía (Gstaiger et al., 2003; Mita et al., 2013).

Las funciones de Bud27 se resumen esquemáticamente en la Figura I13.



**Figura 113. Esquema de las diferentes funciones, tanto nucleares como citoplasmáticas, de Bud27 en *S. cerevisiae*.** La prefoldina-like participa en el ensamblaje citoplasmático de las tres ARN polimerasas en una vía dependiente de Rpb5 (Mirón-García et al., 2013), en la iniciación de la traducción (Deplazes et al., 2009), en la transcripción de las ARN polimerasas II y III gracias a su interacción con RSC (Mirón-García et al., 2014; Vernekar and Bhargava, 2015), y se le han propuesto posibles funciones en la recombinación homóloga y la reparación del ADN (Muñoz-Galván et al., 2013). Además, se ha sugerido que sea un elemento de la vía TOR (Gstaiger et al., 2003; Martínez-Fernández et al., 2020). Extraído de (Martínez-Fernández et al., 2018b).

## 5. La ruta de señalización TOR. Aspectos generales

La ruta de transducción de señales TOR está conservada desde levaduras hasta humanos y es la vía más importante en la regulación del crecimiento, el metabolismo y la división celular (Loewith and Hall, 2011; Mayer and Grummt, 2006). Se descubrió gracias a la rapamicina, una droga producida por la bacteria *Streptomyces hygroscopicus* que provoca inmunosupresión, inhibición de la división celular y arresto del ciclo celular (Loewith and Hall, 2011). La rapamicina se une físicamente a la proteína Fpr1 de *S. cerevisiae* y a FKBP12 en humanos (Crespo and Hall, 2002). El complejo Fpr1-Rapamicina interactúa físicamente con el complejo TORC1, bloqueando la cascada de señalización y sus efectores (Crespo and Hall, 2002). Debido a las similitudes entre este bloqueo de la vía TOR por la acción de la rapamicina y el tratamiento de carencia de nutrientes sobre las células, se sugirió que la vía TOR controla el crecimiento, la división celular, la autofagia y la biogénesis de ribosomas en función de la disponibilidad de nutrientes y de otras señales de estrés (Mayer and Grummt, 2006).

## Introducción

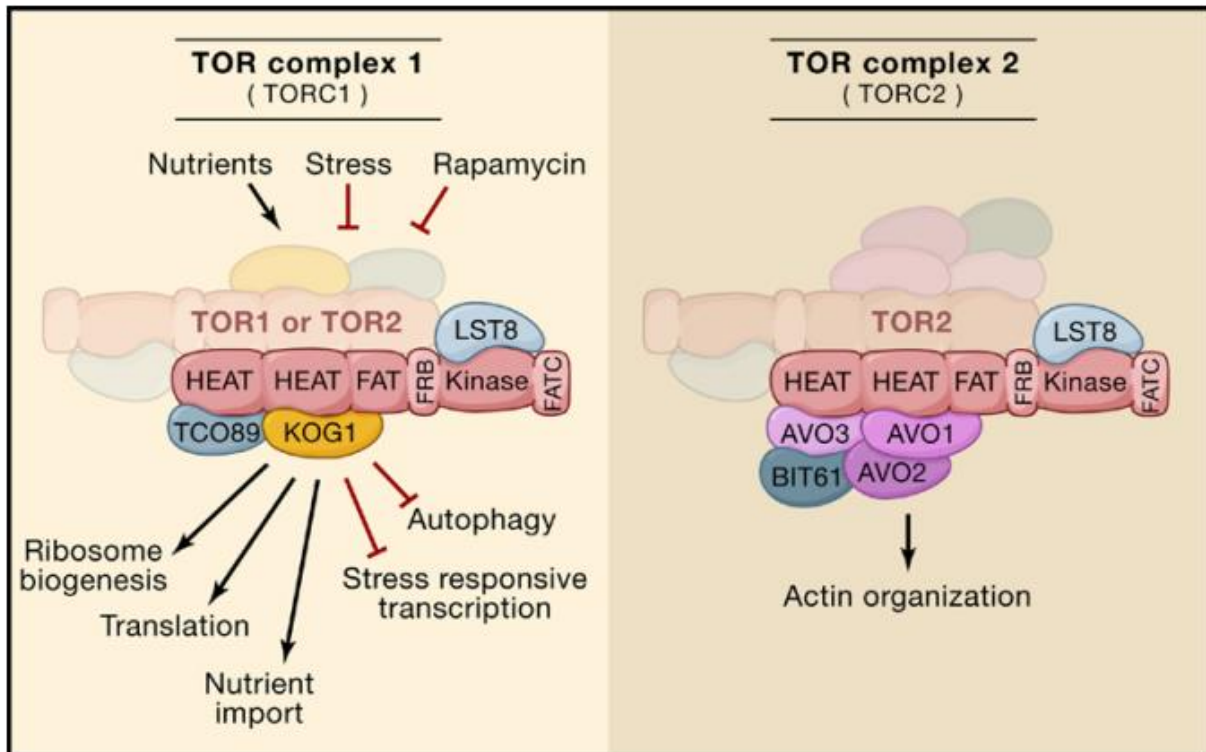
El gen *TOR1* codifica una kinasa de la familia de las PI3K-like (del inglés *Phosphatidylinositide 3-kinase*) (Mayer and Grummt, 2006). Tor1 es una proteína de 2470 aminoácidos, con un peso molecular aproximado de 280 kDa y cinco dominios bien diferenciados (Schmelzle and Hall, 2000). Tor1 tiene, desde el dominio N-terminal hasta el C-terminal, varias repeticiones del dominio HEAT, un dominio FAT, un dominio FRB, el dominio kinasa con actividad catalítica y un dominio FATC (Schmelzle and Hall, 2000). El dominio FRB, de unos 100 aminoácidos, es el dominio de unión al complejo Fpr1-Rapamicina (Loewith and Hall, 2011). Tor1 es la kinasa del complejo TORC1, que cuenta además con las proteínas Lst8, Tco89 y Kog1 en *S. cerevisiae* (Loewith and Hall, 2011). El complejo TORC1 puede existir en una forma alternativa, en la que la proteína Tor2 sustituye a Tor1 (Loewith et al., 2002). El complejo TORC1 se encuentra localizado principalmente en la membrana de la vacuola, el mayor orgánulo celular que actúa como reservorio de nutrientes (Urban et al., 2007). También se ha descrito su presencia en mitocondrias, membrana del retículo endoplasmático y en la cromatina (Desai et al., 2002; Li et al., 2006; Wei et al., 2009). Como se ha mencionado anteriormente, la actividad de la vía TOR y del complejo TORC1 está controlada por la disponibilidad de nutrientes (fuentes de nitrógeno y carbono), por señales de estrés como estrés osmótico, estrés redox o cambios de temperatura y por la exposición a drogas como la rapamicina o la clorpromazina (Loewith and Hall, 2011). Otro de los elementos que controla la actividad de TORC1 es el llamado complejo EGO (del inglés *Escape from rapamycin-induced growth arrest*) (Dubouloz et al., 2005). El complejo EGO está compuesto de cuatro subunidades (Ego1, Ego3, Gtr1 y Gtr2), responde a los niveles celulares de leucina y, al igual que TORC1, se localiza principalmente en la membrana de la vacuola (Dubouloz et al., 2005).

TORC1 controla, mediante fosforilación directa, una cascada de señalización con diversos efectores que actúan en múltiples procesos celulares. Aguas abajo de esta cascada de TOR se encuentra, entre otras proteínas, la kinasa Sch9 (Urban et al., 2007). Sch9 es sustrato directo de TORC1 y tiene importantes funciones en procesos tales como la biogénesis de ribosomas, la iniciación de la traducción o la entrada de las células en fase G<sub>0</sub> (Huber et al., 2009; Urban et al., 2007). TORC1 también modula la actividad de las fosfatasa tipo 2A, como PP2A o Sit4 (Jacinto et al., 2001; Jiang and Broach, 1999). Este control lo ejerce a través proteína esencial Tap42, el cual actúa a modo de regulador negativo (Jacinto et al., 2001; Jiang and Broach, 1999). Gracias a las dos vías de Sch9 y Tap42, la ruta TOR regula a una gran cantidad de efectores modulando su actividad a través del cambio en su estado de fosforilación. De esta forma, la vía TOR controla procesos como la síntesis de proteínas, la transcripción de numerosos genes relacionados con los procesos biosintéticos, la autofagia o el ciclo celular (Loewith and Hall, 2011). Por ejemplo TORC1 controla la actividad de Fhl1,

## Introducción

Ifh1, Sfp1 o Rap1, todos ellos importantes factores de transcripción para la biogénesis de ribosomas (Fingerman et al., 2003; Marion et al., 2004; Martin et al., 2004b; Miyoshi et al., 2003; Schawalder et al., 2004; Wade et al., 2004). También controla indirectamente, a través de la fosfatasa Sit4, la actividad del factor de transcripción Gln3, importante para la regulación de genes relacionados con el metabolismo del nitrógeno (Jacinto et al., 2001). Como se ha comentado anteriormente, TORC1 controla el estado de fosforilación de Maf1, mayoritariamente a través de Sch9 y PP4, para regular la represión de la transcripción de la ARN pol III (Oler and Cairns, 2012; Urban et al., 2007; Wei et al., 2009). Además, se ha demostrado que TORC1 se asocia directamente a la cromatina en las zonas promotoras de los genes de ADNr 35S y 5S, jugando un importante papel en su expresión (Li et al., 2006; Wei et al., 2009).

En *S. cerevisiae*, existe un parálogo del gen *TOR1*, llamado *TOR2* que codifica la kinasa Tor2 (Loewith and Hall, 2011). Como se ha comentado anteriormente, Tor2 puede intercambiarse por la proteína Tor1 en el complejo TORC1, siendo este igualmente funcional (Loewith et al., 2002). Sin embargo, la proteína Tor2 forma parte de otro complejo, donde no es intercambiable por Tor1, llamado TORC2 (Wullschleger et al., 2005). Aunque las kinasas Tor1 y Tor2 son similares, sus respectivos complejos son funcionalmente diferentes (Loewith and Hall, 2011). El complejo TORC2 está formado por las subunidades Tor2, Avo1, Avo2, Avo3, Bit61 y Lst8, y es insensible a la rapamicina (Wullschleger et al., 2005). Actúa en una única vía, donde controla la síntesis de esfingolípidos, la endocitosis de algunos sustratos y la polarización de los monómeros de actina del citoesqueleto (Loewith and Hall, 2011). Por lo tanto, las funciones del complejo TORC2 también son las de promover el crecimiento celular, y puede que actúe de algún modo coordinado con el complejo TORC1 (Loewith and Hall, 2011). Las funciones de ambos complejos en *S. cerevisiae* se muestran, de manera resumida, en la Figura I13.



**Figura I14. Resumen de las funciones de los complejos TORC1 y TORC2 en *S. cerevisiae*.** El complejo TORC1 controla y coordina procesos tales como la biogénesis de ribosomas, la traducción o la autofagia en función de la disponibilidad de nutrientes y las condiciones del medio. Por su parte, TORC2 controla principalmente la polarización de las subunidades de actina, para facilitar la expansión del citoesqueleto. Extraído de (Wullschleger et al., 2006).

## **Objetivos/Objectives**





### **OBJETIVOS**

La transcripción es un importante proceso celular que permite la expresión de los genes y que es llevado a cabo en la mayoría de eucariotas por las ARN polimerasas I, II y III. La prefoldina-like Bud27 es una proteína tipo cochaperona que interacciona física y funcionalmente con la subunidad Rpb5, común a las tres ARN polimerasas. Nuestro grupo y otros autores hemos demostrado que Bud27 interviene tanto en el ensamblaje como en la transcripción de las tres ARN polimerasas. Además, también hemos propuesto que Bud27 participa en la regulación de la transcripción a través de la vía TOR, de la cual forma parte.

Basado en todo lo anterior, en el presente trabajo nos propusimos profundizar en el papel de Bud27 como coordinador de la actividad de las tres ARN polimerasas a través de la vía TOR, con especial atención a su papel en la regulación transcripcional de la ARN pol III.

Los objetivos de este trabajo han sido:

1. Determinar el papel de Bud27 como posible coordinador de la transcripción de las tres ARN polimerasas y la biogénesis de ribosomas, a través de la ruta TOR.
2. Establecer la función de Bud27 en la regulación de la transcripción de la ARN pol III mediante su interconexión con el represor Maf1.
3. Investigar la posible función de Bud27 en la formación de los complejos transcripcionales de la ARN pol III en cromatina.

### **OBJECTIVES**

Transcription is an important cellular process that enables gene expression and is carried out in most eukaryotes by RNA polymerases I, II and III. The prefoldin-like Bud27 is a cochaperone-like protein that physically and functionally interact with Rpb5, a common subunit to all three RNA polymerases. Our group and others have shown that Bud27 is involved in both the assembly and transcription of all three RNA polymerases. In addition, we have also proposed that Bud27 participate in transcription regulation as a component of the TOR pathway.

For these reasons, we explored the role of Bud27 in coordinating the activity of the three RNA polymerases through the TOR pathway, with special attention to its role in the transcriptional regulation of RNA pol III.

The objectives of this work are:

1. To determine the role of Bud27 as a possible coordinator of the transcription of the three RNA polymerases and ribosome biogenesis, through the TOR pathway.
2. To establish the function of Bud27 in the regulation of RNA pol III transcription through its interconnection with the Maf1 repressor.
3. To investigate the possible function of Bud27 in the formation of RNA pol III transcriptional complexes in chromatin.

## **Material y métodos**





## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Los medios de cultivo y condiciones específicas de crecimiento para microorganismos en la elaboración de este trabajo se detallan a continuación:

#### **1.1. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento para *Escherichia coli***

- Medio LB (*Luria-Bertani*): Es el medio de cultivo estándar para *E. coli*. Está compuesto de triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v) y NaCl 0,5% (p/v). Para la obtención de medio sólido (LB agar), se suplementó con agar 1,5% (p/v). En función de los requerimientos experimentales, al medio se le añadió ampicilina (100 µg/ml).
- Medio SOC (*Super Optimal broth with Catabolic repressor*): Medio de cultivo típicamente empleado para la recuperación de las células tras la electroporación. Consta de triptona 2% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), MgSO<sub>4</sub> 0,48% (p/v), glucosa 0,36% (p/v), NaCl 0,05% (p/v) y KCl 0,0186% (p/v).

El cultivo de *E. coli* necesita una temperatura de 37°C. Para el cultivo líquido, las células se incuban en un matraz en agitación (180-200 rpm). En el caso de cultivos en medio sólido (LB agar), las células se incuban en placas en estufas a 37°C.

#### **1.2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento para *Saccharomyces cerevisiae***

- Medio completo YPD (*Yeast Peptone Dextrose*): Medio rico de crecimiento de levaduras. Está compuesto de glucosa 2% (p/v), peptona 2% (p/v) y extracto de levadura 1% (p/v). Para la obtención de medio sólido (YPD agar) se añadió agar 2% (p/v). Como alternativa, dependiendo de los requerimientos experimentales se sustituyó la glucosa por galactosa (YPGal).
- Medio mínimo SD (*Synthetic Dropout*): Medio mínimo de crecimiento de levaduras. Está compuesto de base de nitrógeno de levadura YNB (*Yeast Nitrogen Base*) 0,17% (p/v), glucosa 2% (p/v) y sulfato de amonio 0,5% (p/v). Para la obtención de medio sólido (SD agar) se añadió agar 2% (p/v). Este medio necesita de la adición de vitaminas y aminoácidos detallados en la Tabla MyM 1, en función de las auxotrofías y/o prototrofías de cada cepa.
- Medio de esporulación (SPO): Medio de cultivo para la esporulación de células diploides y obtención de células haploides. Contiene extracto de levadura 0,1% (p/v), glucosa 0,05% (p/v) y CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>K 1% (p/v). Para la obtención de medio sólido se añadió

## Material y métodos

agar 2% (p/v). Este medio debe suplementarse con  $\frac{1}{4}$  de las concentraciones habituales de aminoácidos (Tabla MyM 1).

Las células de *S. cerevisiae* se cultivan a temperatura permisiva de 30°C en agitación (180 rpm) o en placas en estufas. En función de las condiciones experimentales, las células se incubaron a temperaturas restrictivas de 34°C, 36°C o 37°C.

### 1.3. Aminoácidos, vitaminas, antibióticos y drogas

#### 1.3.1. Aminoácidos y vitaminas

Los aminoácidos y vitaminas empleados en este trabajo como suplementos de medios de cultivo se detallan en la Tabla MyM 1.

Aminoácidos y vitaminas	Concentración final (mg/l)
Adenina	50
Histidina	20
Leucina	150
Lisina	30
Metionina	20
Triptófano	20
Uracilo	20

Tabla MyM 1. Aminoácidos y vitaminas

#### 1.3.2. Antibióticos y drogas

- Ácido 5-fluororótico (FOA). Droga utilizada como sistema de selección en levaduras (Boeke et al., 1984), basándose en la presencia del gen *URA3* que codifica la enzima oritidina 5-fluoro-UMP fosfato descarboxilasa. Esta enzima convierte el ácido fluororótico en 5-fluoro-UMP, metabolito tóxico para la célula. Por tanto, aquellas cepas con un gen *URA3* (cromosómico o plasmídico) no podrán crecer en un medio que contenga FOA. Por su parte, las cepas que no contengan el gen *URA3* crecerán con normalidad. Mediante este mecanismo se pueden eliminar plásmidos de las células si estos contienen el gen *URA3*. El FOA se añade directamente al medio SD (suplementado con aminoácidos y vitaminas) a una concentración final de 0,5 mg/ml.
- Geneticina (G-418). Compuesto aminoglucósido producido por la bacteria *Micromonospora rhodorangea* y cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la traducción por parte del ribosoma 80S eucariota (Bar-Nun et al., 1983). Se emplea como marcador en la selección de células de eucariotas (Davies and Jimenez, 1980). Cuando se añade al medio YPD se hace a una concentración final de 200 µg/ml.

## **Material y métodos**

- Nourseotricina (ClonNat). Compuesto aminoglucósido producido por varias bacterias del género *Streptomyces*. Inhibe la síntesis de proteínas y ha sido utilizado como marcador en la selección de eucariotas (Goldstein and McCusker, 1999). Cuando se añade al medio YPD se hace a una concentración final de 200 µg/ml.
- Rapamicina. Antibiótico macrólido producido como metabolito secundario por *Streptomyces hygroscopicus* (Vezina et al., 1975). El mecanismo de actuación de la rapamicina es la inhibición de la ruta de señalización TOR (del inglés *Target Of Rapamycin*) (Raught et al., 2001). Esta droga se añadió al medio YPD o SD suplementado con aminoácidos y vitaminas a una concentración variable dependiendo de los requerimientos experimentales.
- Ácido micofenólico. Esta droga actúa reduciendo los niveles de nucleótidos presentes en la célula dificultando la elongación de la transcripción (Franklin and Cook, 1969). Se añadió al medio SD suplementado con aminoácidos y vitaminas a una concentración variable dependiendo de los requerimientos experimentales.
- Cicloheximida. Este compuesto es producido por la bacteria *Streptomyces griseus* y actúa bloqueando la actividad peptidil transferasa de la subunidad mayor del ribosoma (Siegel and Sisler, 1964). Se añadió al medio SD suplementado con aminoácidos y vitaminas a una concentración variable dependiendo de los requerimientos experimentales.
- Metil metanosulfonato (MMS). Es un agente alquilante del ADN, ampliamente utilizado para inducir daño al ADN y roturas de la doble hélice (Beranek, 1990). Se añadió al medio YPD a una concentración variable dependiendo de los requerimientos experimentales.
- Hidroxiurea (HU). Es un compuesto que reduce la disponibilidad de nucleótidos, inhibiendo la replicación del ADN y provocando roturas de la doble hélice (Koc et al., 2004). Se añadió al medio YPD a una concentración variable dependiendo de los requerimientos experimentales.
- Fleomicina. Se utiliza para inducir daño al ADN y roturas de la doble hélice (Sleigh, 1976). Se añadió al medio YPD a una concentración variable dependiendo de los requerimientos experimentales.
- 4-nitroquilona 1-óxido (4-NQO). Es una droga que mimetiza una exposición de las células a luz ultravioleta y que se emplea para producir roturas en la doble hélice de ADN y estudiar los mecanismos de reparación (Koske and Stich, 1973). Se añadió al medio YPD a una concentración variable dependiendo de los requerimientos experimentales.

### 2. Cepas, oligonucleótidos, plásmidos y anticuerpos

#### 2.1. Cepas de microorganismos

##### 2.1.1. Cepa de *Escherichia coli*

Para la electroporación de *E.coli* se empleó la cepa MC1066 (Martinez-Arias and Casadaban, 1983), cuyo genotipo se detalla a continuación: *K-12 leuB6 A(lacI<sup>POZY</sup>)X74 trpC9830 pyrF74::Tn5 (Kmi) strA*.

##### 2.1.2. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

El organismo usado en este trabajo ha sido la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, ampliamente utilizado como modelo en investigación biológica (Karathia et al., 2011). Los nombres, genotipos y procedencia de las cepas usadas en el presente trabajo se describen en la Tabla MyM 2.

Cepa	Genotipo	Origen
<b>AC1327</b>	<i>HOΔ hml::ADE1 mata::hisG hmr::ADE1 his4::NAT-leu (Xho-to Asp718) leu2::HOcs ade3::GAL::HO ade1 lys5 ura3-52 trp1::hisG pph3Δ::HPH</i>	(Villoria et al., 2019)
<b>AC1822</b>	<i>HOΔ hml::ADE1 mata::hisG hmr::ADE1 his4::NAT-leu-(Xho-to Asp718) leu2::HOcs ade3::GAL::HO ade1 lys5 ura3-52 trp1::hisG</i>	(Villoria et al., 2019)
<b>AC1468</b>	<i>HOΔ hml::ADE1 mata::hisG hmr::ADE1 his4::NAT-leu-(Xho-to Asp718) leu2::HOcs ade3::GAL::HO ade1 lys5 ura3-52 trp1::hisG rad51Δ::URA</i>	(Villoria et al., 2019)
<b>BY4741</b>	<i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 ura3-Δ0</i>	Euroscarf
<b>BY4742</b>	<i>MATα his3-Δ1 leu2-Δ0 lys2-Δ0 ura3-Δ0</i>	Euroscarf
<b>ISS2</b>	<i>MATα his3-Δ200 lys2-Δ801 ura3-Δ52 trp1-Δ63 ade2-Δ101 RPC160::13xMyc::kanMX6</i>	(Acker et al., 2014)
<b>MAF1-GFP</b>	<i>MATa his3- Δ1 leu2- Δ0 met15- Δ0 ura3- Δ0 MAF1::GFP::HIS3MX6</i>	Cedido por Dr. M. Boguta
<b>SCOC1836</b>	<i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 ura3-Δ0 IMD2::TAP::HIS3MX6</i>	Cedido por Dr. O. Calvo
<b>Y14010</b>	<i>MATα his3-Δ1 leu2-Δ0 lys2-Δ0 ura3-Δ0 YIL035C::kanMX4 (pph3::kanMX4)</i>	Euroscarf
<b>YDL150W TAP</b>	<i>MATa his3- Δ1 leu2- Δ0 met15- Δ0 ura3- Δ0 RPC53::TAP::HIS3MX6</i>	Open Biosystems

## Material y métodos

<b>YFGS3</b>	<i>MATa Ade2-1 ura3-1 his3-11 trp1-1 leu2-3, FOB1::HIS3 YFL023W::natNT2 (bud27::natNT2) número de copias ADNr ~190</i>	Este trabajo
<b>YFGS4</b>	<i>MATa ADE2-1 ura3-1 his3-11 trp1-1 leu2-3, FOB1::HIS3 YFL023W::natNT2 (bud27::natNT2) número de copias ADNr ~25</i>	Este trabajo
<b>YFNOL1</b>	<i>MAT<math>\alpha</math> his3-<math>\Delta</math>200 lys2-<math>\Delta</math>801 ura3-<math>\Delta</math>52 trp1-<math>\Delta</math>63 ade2-<math>\Delta</math>101 RPC160::13xMyc::kanMX6 YFL023W::HIS3MX6 (bud27::HIS3MX6)</i>	(Martínez-Fernández, 2016)
<b>YFN105</b>	<i>MATa his3-<math>\Delta</math>1 leu2-<math>\Delta</math>0 met15-<math>\Delta</math>0 ura3-<math>\Delta</math>0 trp1-<math>\Delta</math>63 YFL023W::kanMX4 (bud27::kanMX4)</i>	(Mirón-García et al., 2013)
<b>YFN310</b>	<i>MATa his3-<math>\Delta</math>1 leu2-<math>\Delta</math>0 ura3-<math>\Delta</math>0 trp1-<math>\Delta</math>63 RPA190::3xHA::HIS3 RPC160::13xMyc::TRP1 RPB8::TAP::HIS3MX6 YFL023W::kanMX4 (bud27::kanMX4)</i>	Este trabajo
<b>YFN311</b>	<i>MATa his3-<math>\Delta</math>1 leu2-<math>\Delta</math>0 lys2-801 trp1-<math>\Delta</math>63 ura3-52 RPA190::3xHA::HIS3 RPC160::13xMyc::TRP1 RPB8::TAP::HIS3MX6</i>	Este trabajo
<b>YFN316</b>	<i>MATa his3-<math>\Delta</math>1 leu2-<math>\Delta</math>0 lys2-801 met15-<math>\Delta</math>0 ura3-<math>\Delta</math>0 trp1-<math>\Delta</math>63 SPT5::TAP::HIS3MX6 YFL023W::kanMX4 (bud27::kanMX4)</i>	Este trabajo
<b>YFN317</b>	<i>MATa his3-<math>\Delta</math>1 leu2-<math>\Delta</math>0 met15-<math>\Delta</math>0 ura3-<math>\Delta</math>0 trp1-<math>\Delta</math>63 SPT5::TAP:: HIS3MX6</i>	Este trabajo
<b>YFN334</b>	<i>MATa his3-<math>\Delta</math>1 leu2-<math>\Delta</math>0 met15-<math>\Delta</math>0 ura3-<math>\Delta</math>0 trp1-<math>\Delta</math>63 YFL023W::kanMX4 (bud27::kanMX4) RPB8::ECFP::SpHIS5</i>	(Mirón-García et al., 2013)
<b>YFN335</b>	<i>MATa his3-<math>\Delta</math>1 leu2-<math>\Delta</math>0 met15-<math>\Delta</math>0 ura3-<math>\Delta</math>0 trp1-<math>\Delta</math>63 RPB8::ECFP::SpHIS5</i>	(Mirón-García et al., 2013)
<b>YFN683</b>	<i>MATa his3- <math>\Delta</math>1 leu2- <math>\Delta</math>0 met15- <math>\Delta</math>0 ura3- <math>\Delta</math>0 YFL023W::natNT2 (bud27::natNT2)</i>	(Martínez-Fernández, 2016)
<b>YFN684</b>	<i>MAT<math>\alpha</math> his3-<math>\Delta</math>1 leu2-<math>\Delta</math>0 lys2-<math>\Delta</math>0 ura3-<math>\Delta</math>0 YJL164C::kanMX4 (tpk1::kanMX4) YFL023W::natNT2 (bud27::natNT2)</i>	Este trabajo
<b>YFN685</b>	<i>MAT<math>\alpha</math> his3-<math>\Delta</math>1 leu2-<math>\Delta</math>0 lys2-<math>\Delta</math>0 ura3-<math>\Delta</math>0 YPL203W::kanMX4 (tpk2::kanMX4) YFL023W::natNT2 (bud27::natNT2)</i>	Este trabajo
<b>YFN686</b>	<i>MAT<math>\alpha</math> his3-<math>\Delta</math>1 leu2-<math>\Delta</math>0 lys2-<math>\Delta</math>0 ura3-<math>\Delta</math>0 YKL166C::kanMX4 (tpk3::kanMX4) YFL023W::natNT2 (bud27::natNT2)</i>	Este trabajo
<b>YFN687</b>	<i>MAT<math>\alpha</math> his3-<math>\Delta</math>1 leu2-<math>\Delta</math>0 lys2-<math>\Delta</math>0 ura3-<math>\Delta</math>0 YHR205W::kanMX4 (sch9::kanMX4) YFL023W::natNT2 (bud27::natNT2)</i>	Este trabajo
<b>YFN688</b>	<i>MAT<math>\alpha</math> his3-<math>\Delta</math>1 leu2-<math>\Delta</math>0 lys2-<math>\Delta</math>0 ura3-<math>\Delta</math>0 YAL016W::kanMX4 (tpd3::kanMX4) YFL023W::natNT2 (bud27::natNT2)</i>	Este trabajo
<b>YFN689</b>	<i>MAT<math>\alpha</math> his3-<math>\Delta</math>1 leu2-<math>\Delta</math>0 lys2-<math>\Delta</math>0 ura3-<math>\Delta</math>0 YIL035C::kanMX4 (cka1::kanMX4) YFL023W::natNT2 (bud27::natNT2)</i>	Este trabajo

## Material y métodos

<b>YFN690</b>	<i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 lys2-Δ0 ura3-Δ0 YPL180W::kanMX4 (tco89::kanMX4) YFL023W::natNT2 (bud27::natNT2)</i>	Este trabajo
<b>YFN691</b>	<i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 lys2-Δ0 ura3-Δ0 YIL035C::kanMX4 (pph3::kanMX4) YFL023W::natNT2 (bud27::natNT2)</i>	Este trabajo
<b>YFN734</b>	<i>MATa his3- Δ1 leu2- Δ0 met15- Δ0 ura3- Δ0 MAF1::GFP::HIS3MX6 YFL023W::natNT2 (bud27::natNT2)</i>	Este trabajo
<b>YFN751</b>	<i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 ura3-Δ0 PPH3::3xHA::HIS3</i>	Este trabajo
<b>YFN752</b>	<i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 ura3-Δ0 PPH3::3xHA::HIS3 YFL023W::natNT2 (bud27::natNT2)</i>	Este trabajo
<b>YFN787</b>	<i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 ura3-Δ0 PPH3::3xHA::HIS3 PSY2::13xMyc::kanMX6</i>	Este trabajo
<b>YFN788</b>	<i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 ura3-Δ0 PPH3::3xHA::HIS3 PSY2::13xMyc::kanMX6 YFL023W::natNT2 (bud27::natNT2)</i>	Este trabajo
<b>YFN800</b>	<i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 ura3-Δ0 PPH3::3xHA::HIS3 PSY2::13xMyc::kanMX6 PSY4::TAP::URA3</i>	Este trabajo
<b>YFN801</b>	<i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 ura3-Δ0 PPH3::3xHA::HIS3 PSY2::13xMyc::kanMX6 PSY4::TAP::URA3 YFL023W::natNT2 (bud27::natNT2)</i>	Este trabajo
<b>YFN802</b>	<i>HOD hml::ADE1 mata::hisG hmr::ADE1 his4::NAT-leu-(Xho-to Asp718) leu2::HOcs ade3::GAL::HO ade1 lys5 ura3-52 trp1::hisG YFL023W::kanMX4 (bud27::kanMX4)</i>	Este trabajo
<b>YFN803</b>	<i>HOD hml::ADE1 mata::hisG hmr::ADE1 his4::NAT-leu-(Xho-to Asp718) leu2::HOcs ade3::GAL::HO ade1 lys5 ura3-52 trp1::hisG pph3Δ::HPH YFL023W::kanMX4 (bud27::kanMX4)</i>	Este trabajo
<b>YFN804</b>	<i>MATa his3- Δ1 leu2- Δ0 met15- Δ0 ura3- Δ0 RPC128::TAP::URA3</i>	Este trabajo
<b>YFN805</b>	<i>MATa his3- Δ1 leu2- Δ0 met15- Δ0 ura3- Δ0 RPC128::TAP::URA3 YFL023W::natNT2 (bud27::natNT2)</i>	Este trabajo
<b>YFN813</b>	<i>MATa his3- Δ1 leu2- Δ0 met15- Δ0 ura3- Δ0 RPC53::TAP::HIS3MX6 YFL023W::kanMX4 (bud27::kanMX4)</i>	Este trabajo
<b>YFN815</b>	<i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 lys2-Δ0 ura3-Δ0 YDR007w::kanMX4 (TRP1::kanMX4) PPH3-MYC::TRP1</i>	Este trabajo
<b>YFN831</b>	<i>MATa his3-Δ1 leu2-Δ0 lys2-Δ0 ura3-Δ0 YDR007w::kanMX4 (TRP1::kanMX4) PPH3-MYC::TRP1 BUD27-LytA::HIS3</i>	Este trabajo

## Material y métodos

<b>Y11089</b>	<i>MATα his3-Δ1 leu2-Δ0 lys2-Δ0 ura3-Δ0 YPL203W::kanMX4 (tpk2::kanMX4)</i>	Euroscarf
<b>Y11261</b>	<i>MATα his3-Δ1 leu2-Δ0 lys2-Δ0 ura3-Δ0 YJL164C::kanMX4 (tpk1::kanMX4)</i>	Euroscarf
<b>Y11428</b>	<i>MATα his3-Δ1 leu2-Δ0 lys2-Δ0 ura3-Δ0 YIL035C::kanMX4 (cka1::kanMX4)</i>	Euroscarf
<b>Y12072</b>	<i>MATα his3-Δ1 leu2-Δ0 lys2-Δ0 ura3-Δ0 YPL180W::kanMX4 (tco89::kanMX4)</i>	Euroscarf
<b>Y15016</b>	<i>MATα his3-Δ1 leu2-Δ0 lys2-Δ0 ura3-Δ0 YKL166C::kanMX4 (tpk3::kanMX4)</i>	Euroscarf
<b>Y16866</b>	<i>MATα his3-Δ1 leu2-Δ0 lys2-Δ0 ura3-Δ0 YAL016W::kanMX4 (tpd3::kanMX4)</i>	Euroscarf
<b>Y17202</b>	<i>MATα his3-Δ1 leu2-Δ0 lys2-Δ0 ura3-Δ0 YDR007w::kanMX4 (TRP1::kanMX4)</i>	Euroscarf
<b>Y17797</b>	<i>MATα his3-Δ1 leu2-Δ0 lys2-Δ0 ura3-Δ0 YHR205W::kanMX4 (sch9::kanMX4)</i>	Euroscarf

Tabla MyM 2. Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo.

### 2.2. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo, clasificados por su aplicación, se encuentran en la Tabla MyM 3.

Oligonucleótido	Secuencia (5' → 3')	Gen y/o región
<b>PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)</b>		
<b>35S(prom)-501</b>	TTCCGTATTTCCGCTTCC	Promotor 35S <i>ADNr</i>
<b>35S(prom)-301</b>	CACTTGACTCCATGACTAAACCC	Promotor 35S <i>ADNr</i>
<b>35S-501</b>	ATTTCCGGCAGCAGAGAGAC	35S <i>ADNr</i> , Región 5'
<b>35S-301</b>	TTTCCCACCTATTCCCTCTTG	35S <i>ADNr</i> , Región 5'
<b>35S-502</b>	GGGTTTAGACCGTCGTGAGA	35S <i>ADNr</i> , Región 3'
<b>35S-302</b>	GCATGGATTCTGACTTAGAGG	35S <i>ADNr</i> , Región 3'
<b>18S-501</b>	CATGGCCGTTCTTAGTTGGT	18S <i>ADNr</i>
<b>18S-301</b>	ATTGCCTCAAACCTCCATCG	18S <i>ADNr</i>
<b>25S-501</b>	CAACCGGGATTGCCTTAGTA	25S <i>ADNr</i>
<b>25S-301</b>	CACGGGATTCTCACCTCTA	25S <i>ADNr</i>
<b>5S-501</b>	GCGGCCATATCTACCAGAAA	5S <i>ADNr</i>
<b>5S-301</b>	CTGAGTTTCGCGTATGGTCA	5S <i>ADNr</i>

## Material y métodos

<b>pretRNALeu3(CAA)-502</b>	GGCGCCTGATTCAAGAAATA	<i>ADNtLeu3; Por delante y dentro del intrón. Usado para analizar el pre-ARNt Leu3</i>
<b>pretRNATrp(CCA)-501</b>	CGACTCCAATTAATCTTGGAAA	<i>ADNtTrp; Por delante y dentro del intrón. Usado para analizar el pre-ARNt Trp</i>
<b>pretRNAlle(TAT)-501</b>	GGTTTCCGAAGTTTCTGTGCC	<i>ADNtIle; Por delante y dentro del intrón. Usado para analizar el pre-ARNt Ile</i>
<b>tRNALeu3(CAA)-501</b>	GGTTGTTTGGCCGAGCGGTC	<i>ADNt Leu3. Usado para ChIP</i>
<b>tRNALeu3(CAA)-503</b>	GCGCCTGATTCAAGCTCAG	<i>ADNt Leu3; antes y después del intrón. Usados para analizar el ARNt Leu3 maduro</i>
<b>tRNATrp(CCA)-502</b>	GAGCTTTGACTCCAAATCG	<i>ADNt Trp; antes y después del intrón. Usados para analizar el ARNt Trp maduro</i>
<b>tRNALeu3(CAA)-301</b>	TTCGAACTCTTGCATCTTACG	<i>ADNtLeu3; zona 3'</i>
<b>tRNATrp(CCA)-301</b>	GGAATTGAACCTGCAACCCT	<i>ADNt Trp; zona 3'</i>
<b>tRNAlle(TAT)-301</b>	GGATTGAACCCACGACGG	<i>ADNt Ile; zona 3'</i>
<b>SCR1-501</b>	CGGCCGGGATAGCACATAT	<i>SCR1</i>
<b>SCR1-301</b>	GACACACTCCATCCCCGAG	<i>SCR1</i>
<b>PMA1p-503</b>	AAAGGCCAAATATTGTATTATTTCAA	<i>PMA1, región 5'</i>
<b>PMA1p-302</b>	TTGGTGTTATAGGAAAGAAAGAGAAAA	<i>PMA1, región 3'</i>
<b>IntergChrV-F</b>	TGTTCCTTTAAGAGGTGATGGTGAT	<i>Intergénico (cromosoma V)</i>
<b>IntergChrV-R</b>	GTGCGCAGTACTTGTGAAAACC	<i>Intergénico (cromosoma V)</i>
<b>Retrotranscripción o transcripción reversa (RT)</b>		

<b>tRNA<sup>Leu</sup>-302</b>	GAGATTCGAACTCTTGCATCTT	<i>ADNt Leu3</i>
<b>tRNA<sup>Trp</sup>-302</b>	TGAAACGGACAGGAATTGAACC	<i>ADNt Trp</i>
<b>tRNA<sup>Ile</sup>-302</b>	CTCGAGGTGGGGATTGAACC	<i>ADNt Ile</i>
<b>Delección de genes mediante recombinación homóloga.</b>		
<b>BUD27-502</b>	GAGGATAGGCGATGAGCTGCTC	Promotor <i>BUD27</i>
<b>BUD27-302</b>	TCAGCAGTTCCTCTAGTTTTATATCG	Aguas abajo <i>BUD27</i>
<b>BUD27-303</b>	CGAAGACTTGACGAATAAGC	Aguas abajo <i>BUD27</i>
<b>Dbud27_Fw</b>	TGTTGACCTGAAGTCCGCAG	Promotor <i>BUD27</i>
<b>Dbud27_Rv</b>	CCTACAATCCTTACACCGAGCC	Aguas abajo <i>BUD27</i>
<b>Análisis de marcadores</b>		
<b>KANB</b>	CTGCAGCGAGGAGCCGTAAT	<i>KAN</i> ; región codificante. Cebador <i>reverse</i>
<b>KANC</b>	TGATTTTGATGACGAGCGTAAT	<i>KAN</i> ; región codificante. Cebador <i>forward</i>
<b>A1</b>	TCATCAATATCACCCCAAGC	<i>MAT</i> ; región codificante
<b>alpha1</b>	TACTTCGAAGCCTGCTTTCA	<i>MAT</i> ; región codificante
<b>MAT_reverse</b>	GCTTGTACCAGAGGAAGCAA	<i>MAT</i> ; aguas abajo del codón de STOP

Tabla MyM 3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

### 2.3. Plásmidos

Los plásmidos empleados para expresión, clonación o etiquetado de proteínas se detallan en la Tabla MyM 4.

Plásmido	Marcadores de levadura	Origen
<b>pFL44L</b>	ORI (2 $\mu$ m) <i>URA3</i>	(Bonneaud et al., 1991)
<b>pFL44L-<i>BUD27</i></b>	ORI (2 $\mu$ m) <i>URA3</i>	Este trabajo
<b>pCM189</b>	ORI (CEN) <i>URA3</i>	(Garí et al., 1997)
<b>pCM189-<i>BUD27</i></b>	ORI (CEN) <i>URA3</i>	(Mirón-García et al., 2013)
<b>pCM189-<i>BUD27-GFP</i></b>	ORI (CEN) <i>URA3</i>	(Mirón-García et al., 2013)
<b>pCM189-<i>BUD27</i><math>\Delta</math><i>NES-GFP</i></b>	ORI (CEN) <i>URA3</i>	(Mirón-García et al., 2013)
<b>pCM189-<i>BUD27</i><math>\Delta</math><i>NLS-GFP</i></b>	ORI (CEN) <i>URA3</i>	Este trabajo
<b>pFL44L-<i>RPB5</i></b>	ORI (2 $\mu$ m) <i>URA3</i>	(Rubbi et al., 1999)

<b>pBS1539</b>	Para etiquetado TAP en C-terminal. <i>URA3</i>	(Puig et al., 2001)
<b>pFAa-13Myc-kanMX6</b>	Para etiquetado 13Myc en C-terminal. <i>kanMX6</i>	(Longtine et al., 1998)
<b>pFA6a-His3MX6</b>	Para etiquetado 3HA en C-terminal. <i>His3MX6</i>	(Longtine et al., 1998)

Tabla MyM 4. Plásmidos utilizados en este trabajo.

### 2.4. Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados en este trabajo se describen en la Tabla MyM 5.

<b>Anticuerpos primarios</b>				
<b>Nombre</b>	<b>Origen</b>	<b>Epítipo</b>	<b>Diluciones y cantidades según usos</b>	<b>Referencia</b>
<b>PAP</b>	Conejo (monoclonal)	Etiqueta TAP	1:5000 para western blot	Sigma-Aldrich
<b>TAP N-ter</b>	Conejo (policlonal)	Etiqueta TAP. Región N-terminal	1:200 para inmunofluorescencia	Invitrogen
<b>c-Myc (9E10)</b>	Ratón (monoclonal)	c-Myc humana Aminoácidos 408-439	1:3000 para western blot 1:200 para inmunofluorescencia	Santa Cruz Biotechnology
<b>HA (12CA5)</b>	Ratón (monoclonal)	Etiqueta HA: YPYDVPDYA	1:1000 para western blot 2µl para IPs	Roche
<b>HA high affinity (3F10)</b>	Rata (monoclonal)	Etiqueta HA: YPYDVPDYA	1:2500 para western blot 1:200 para inmunofluorescencia	Sigma-Aldrich
<b>LytA</b>	Conejo (policlonal)	Etiqueta LytA	1:1000 para western blot 2µl para IPs	Biomedal
<b>Pgk1 (459250)</b>	Ratón (monoclonal)	3-Fosfoglicerato quinasa	1:7000 para western blot	Invitrogen
<b>Histona H3 (ab1791)</b>	Conejo (policlonal)	Extremo C-terminal (100 aa) de la histona H3 humana	1:10000 para western blot	Abcam
<b>Rpb1 (CTD)</b>	Conejo (policlonal)	Dominio C-terminal de la subunidad	1:2000 para western blot	Laboratorio del Dr. Navarro

## Material y métodos

		Rpb1 de la ARN polimerasa II (CTD) de <i>S. cerevisiae</i>		(Cuevas-Bermúdez et al., 2019)
<b>Rpa190</b>	Conejo (policlonal)	Subunidad Rpa190 de la ARN polimerasa I de <i>S. cerevisiae</i>	1:2000 para western blot	Cedido por Dr. Pierre Thuriaux
<b>Rpa34.5</b>	Conejo (policlonal)	Subunidad Rpa34.5 de la ARN polimerasa I de <i>S. cerevisiae</i>	1:3000 para western blot	Cedido por Dr. Pierre Thuriaux
<b>Rps6 (ab40820)</b>	Conejo (policlonal)	Proteína ribosomal S6 humana	1:1000 para western blot	Abcam
<b>Rps6-P (2211)</b>	Conejo (monoclonal)	Serinas 235/236 fosforiladas de la proteína ribosomal S6 humana	1:3000 para western blot	Cell Signaling Technology
<b>Maf1</b>	Conejo (policlonal)	Proteína Maf1	1:10000 para western blot	Cedido por Dr. Olivier Lefebvre
Anticuerpos secundarios				
Nombre	Conjugación	Concentración		Referencia
<b>Ratón IgG (H+L)</b>	Peroxidasa	1:10000 para western blot		BioRad
<b>Conejo IgG</b>	Peroxidasa	1:10000 para western blot		Sigma-Aldrich
<b>Rata</b>	Peroxidasa	1:5000 para western blot		Santa Cruz Biotechnology.
<b>Conejo IgG Alexa (H+L)</b>	Alexa Fluor® 546	1:200 para Inmunofluorescencia		Invitrogen
<b>Rata IgG (H+L)</b>	Alexa Fluor® 488	1:200 para Inmunofluorescencia		Invitrogen
<b>Ratón IgG (H+L)</b>	Alexa Fluor® 488	1:200 para Inmunofluorescencia		Invitrogen

Tabla MyM 5. Anticuerpos utilizados en este trabajo.

## **3. Técnicas de manipulación de microorganismos**

### **3.1. Técnicas de manipulación de *Escherichia coli*. Electroporación**

La cepa electrocompetente de *E. coli* MC1066 fue cultivada en medio líquido LB y transformada por electroporación. Para ello, se partió de 50 µl de células electrocompetentes (equivalente aproximadamente a  $10^{10}$  células/ml, en 10% de glicerol) y se añadió 1 µg de plásmido en una cubeta de electroporación estéril y fría, de 0,2 cm de anchura. Se les dio un pulso eléctrico de 4-5 milisegundos y un campo eléctrico de 12,5 kV/cm (*Micropulser<sup>TM</sup>*; *BioRad*), tras lo cual las células se resuspendieron en 1 ml de medio SOC (atemperado previamente a 37°C) y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Las células transformadas fueron sembradas en placas de LB sólido suplementado con ampicilina (100 µg/ml).

Para la obtención de células electrocompetentes, todo el procedimiento se realizó en frío. Se partió de 1 litro de cultivo bacteriano en LB en fase exponencial (D.O.<sub>600</sub>~0,5-0,6). El cultivo se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Las células se lavaron dos veces con 1 volumen de H<sub>2</sub>O MiliQ estéril fría y una vez más con 0,01 volúmenes de glicerol 10% (v/v) estéril frío. Por último, las células se resuspendieron en 1 ml de glicerol 10% (v/v) y se hicieron alícuotas de 50 µl que se congelaron rápidamente en N<sub>2</sub> líquido y se almacenaron a -80°C.

### **3.2. Técnicas de manipulación de *Saccharomyces cerevisiae***

#### **3.2.1. Transformación rápida**

Este método se empleó para la transformación de plásmidos. Para ello, se usó el método descrito previamente por Chen *et al.*, (Chen *et al.*, 1992). Se partió de 10 ml de células recogidas en fase exponencial (D.O.<sub>600</sub>~0,7-0,8) o bien directamente desde placa en el medio necesario. Las células se centrifugaron a 3000 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente, el pellet se resuspendió en 150 µl de PEG<sub>4000</sub> 40% (p/v), LiAc 0,2 M, DTT 0,05 M, y se añadieron 2 µg de ADN plasmídico. Las células se incubaron a 45°C durante 45 minutos. Después, se centrifugaron a 3000 rpm durante 2 minutos a temperatura ambiente. El pellet de células obtenido se lavó con H<sub>2</sub>O MiliQ estéril y se centrifugó en las mismas condiciones que en el paso anterior. Finalmente, las células se resuspendieron en 200 µl de H<sub>2</sub>O MiliQ estéril y se sembraron en placas con medio sólido. El medio escogido para la siembra fue el necesario para poder seleccionar transformantes.

### 3.2.2. Transformación por el método Acetato de Litio / ADN de cadena sencilla / Polietilenglicol

Este método se basa en otro previamente descrito por Gietz *et al* (Gietz et al., 1995), pero con algunas modificaciones. Este método sirve tanto para la transformación de levaduras con plásmidos como para la recombinación cromosómica con fragmentos de ADN. Se partió de un cultivo de 10 ml en fase exponencial (D.O.<sub>600</sub> ~0,6-0,8) en YPD o SD. Las células se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. El pellet obtenido se lavó primero con 0,1 volumen de H<sub>2</sub>O MiliQ estéril y después con 0,1 volumen de TE/LiAc (TE [TrisHCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH=7,5]; LiAc [LiAc 0,1 M, pH=7,5]). El pellet de células fue resuspendido en 50 µl de TE/LiAc y 300 µl de una solución 40% (p/v) PEG<sub>4000</sub>/TE/LiAc. Posteriormente se añadieron 50 µg de ADN de esperma de salmón (previamente hervido e incubado rápidamente en hielo para su desnaturalización) y 1 µg de ADN transformante (plasmídico o fragmento para recombinación). A continuación, se dio un breve vórtex y las células se incubaron durante 1 hora en un baño a 30°C. Pasado ese tiempo, se sometieron a un choque térmico de 20 minutos en un baño a 42°C. Tras el choque térmico, las células se centrifugaron y el pellet se lavó con 1 ml de H<sub>2</sub>O MiliQ estéril. Finalmente, las células se resuspendieron en 400 µl de H<sub>2</sub>O MiliQ estéril y se sembraron en placas con medio sólido. El medio en el que se sembraron fue el necesario para poder realizar la posterior selección de recombinantes/transformantes. Cuando dicho medio de selección incluía el antibiótico G-418 o nourseotricina, previamente a la siembra, las células fueron resuspendidas en 1 ml de medio YPD líquido e incubadas a 30°C en agitación durante 2 horas u *overnight*, con la finalidad de facilitar la expresión del gen de resistencia.

### 3.2.3. Preparación de células competentes y transformación por el método de Acetato de Litio / Sorbitol / Polietilenglicol

Alternativamente al método descrito en el apartado anterior, en ocasiones se utilizó este método que permite generar células competentes y guardarlas a -80°C. Para la generación de células competentes con este método, se partió de un cultivo de 50 ml en fase exponencial (D.O.<sub>600</sub> ~0,6-0,8) en YPD o SD. Las células se centrifugaron a 3000 rpm durante 3 minutos a 4°C. El pellet obtenido se lavó primero con 0,1 volumen de H<sub>2</sub>O MiliQ estéril y después con 10 ml de TE/LiAc (TE [TrisHCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH=8]; LiAc [LiAc 0,1 M, pH=8]). Las células se centrifugaron en las mismas condiciones que en el paso anterior y el pellet se resuspendió en 5 ml de TE/LiAc/Sorbitol (TE [TrisHCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH=8]; LiAc [LiAc 0,1 M, pH=8]; Sorbitol 1 M). Las células se centrifugaron en las mismas condiciones que en el paso anterior, el pellet se resuspendió en 750 µl de TE/LiAc/Sorbitol y se pasó a un tubo de 1,5 ml. Las células se centrifugaron a 3000 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente. El pellet se resuspendió en 360 µl de TE/LiAc/Sorbitol y se añadieron 50 µg de ADN

## ***Material y métodos***

de espermatozoides de salmón (previamente hervido e incubado rápidamente en hielo para su desnaturalización). En este paso se pueden hacer alícuotas de 50 µl y congelarlas hasta su uso a -80°C.

Para la transformación, se cogieron 10 µl de células competentes del paso anterior, se les añadió 100-200 ng de ADN transformante y 185 µl de una solución 40% (p/v) PEG<sub>4000</sub>/TE/LiAc. A esta mezcla se le dio un breve vórtex y se incubó durante 1 hora en un baño a 30°C. Pasado ese tiempo, a las células se les añadió 0,1 volúmenes de DMSO (20 µl) y se incubaron a 42°C durante 15 minutos en un baño. Tras el choque térmico, las células se centrifugaron y el pellet se lavó con 1 ml de H<sub>2</sub>O MiliQ estéril. Finalmente, las células se resuspendieron en 400 µl de H<sub>2</sub>O MiliQ estéril y se sembraron en placas con medio sólido. El medio en el que se sembraron fue el necesario para poder realizar la posterior selección de recombinantes/transformantes. Cuando dicho medio de selección incluía el antibiótico G-418 o nourseotricina, previamente a la siembra, las células fueron resuspendidas en 1 ml de medio YPD líquido e incubadas en un baño a 30°C durante 2 horas u *overnight*, con la finalidad de facilitar la expresión del gen de resistencia.

### 3.2.4. Generación de cepas diploides

Para la obtención de cepas diploides, se realizaron cruces entre cepas haploides de signo sexual opuesto (*MATa/MATα*). Las células de ambas cepas haploides se resuspendieron conjuntamente en 50 µl de H<sub>2</sub>O MiliQ y se depositaron 5 µl en una placa con medio rico sólido YPD, tras lo que se incubaron en una estufa a 30°C, *overnight*. La posterior selección de células diploides se hizo en base a los marcadores de auxotrofia requeridos.

### 3.2.5. Esporulación

Para la esporulación de diploides y obtención de haploides, se utilizó el medio de esporulación SPO (ver apartado 1.2.). Este medio de cultivo es pobre en fuentes de carbono y nitrógeno y otros nutrientes, lo cual obliga a las células diploides a realizar la división meiótica que da lugar a 4 células hijas haploides contenidas en un asca. Para forzar esta esporulación, las células diploides se incubaron a 30°C en medio SPO durante los días necesarios, hasta que se observaron ascas (tétradas) al microscopio.

### 3.2.6. Selección de haploides

La selección de células haploides tras la esporulación requiere en primer lugar la digestión del asca que las rodea. Para ello, se resuspendieron las ascas en 50 µl de H<sub>2</sub>O MiliQ estéril conteniendo Zimoliasa 20T (*US Biological*) a una concentración final de 1mg/ml y se incubaron en un baño a 37°C durante 30 minutos. Pasado ese tiempo, se dio un vórtex suave

con el fin de disgregar las esporas y se sembraron en el medio selectivo adecuado para la discriminación de los haploides de interés.

La comprobación de la haploidía de las células se hizo verificando su signo sexual mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos *MAT\_reverse*, *alpha1* y *A1* (Tabla MyM 3). Además, por cruce con otra cepa haploide de signo sexual opuesto, se comprobó al microscopio la formación o no de diploides y la aparición de tétradas.

### 3.2.7. Generación de nuevas cepas mediante delección de genes o etiquetado de proteínas

Tanto la delección de genes como el etiquetado se realizaron por recombinación del producto de ADN de interés amplificado por PCR con una región cromosómica de secuencia homóloga.

Para la delección de genes, se amplificó por PCR la región con el gen de resistencia a G-418 o a nourseotricina con oligonucleótidos aguas arriba del codón de inicio y aguas abajo del codón de STOP. Este amplicón de PCR contiene el gen de resistencia y está flanqueado por regiones de secuencia homóloga al gen que quiere ser delecionado. Utilizando este sistema se han generado las cepas YFGS3, YFGS4, YFN802, YFN803 y YFN813 (Tabla MyM 2): se amplificó el gen de resistencia a G-418 o a nourseotricina desde ADN genómico de otra cepa *bud27Δ::natNT2* o *bud27Δ::KanMX4* con oligonucleótidos aguas arriba y aguas debajo del gen *BUD27* (Tabla MyM 3). Las cepas generadas de esta forma se comprobaron por PCR con oligonucleótidos específicos (Tabla MyM 3) y por la resistencia correspondiente.

El etiquetado de determinadas proteínas se hizo amplificando el fragmento de ADN recombinante desde plásmidos o desde ADN genómico. El etiquetado de las cepas YFN751, YFN752, YFN787, YFN788, YFN800 y YFN801 (Tabla MyM 2) se realizó amplificando el casete correspondiente con oligonucleótidos específicos desde los plásmidos pFAa-13Myc-kanMX6 y pFA6a-His3MX6 (Longtine et al., 1998) o bien desde el plásmido pBS1539 (Puig et al., 2001) (Tabla MyM 4). El etiquetado de las cepas YFN804, YFN805, YFN809 y YFN810 se realizó amplificando por PCR un fragmento del gen de interés junto con la etiqueta y el marcador a partir de ADN genómico de una cepa preexistente, usando oligonucleótidos de la parte final de la región codificante del gen y aguas abajo de la misma. Este fragmento se recombinó en la nueva cepa para la obtención del etiquetado. Cuando se etiquetó una cepa, se comprobó posteriormente por western blot con anticuerpos específicos la correcta expresión de la proteína etiquetada.

## 4. Técnicas de Biología molecular

### 4.1. Técnicas de manipulación y análisis de ácidos nucleicos

#### 4.1.1. Extracción de ADN plasmídico de *E. coli*

Para la obtención de plásmido, se partió de 5 ml de cultivo de *E. coli* en LB con ampicilina, en agitación a 180 rpm y 37°C. La extracción se realizó utilizando el kit comercial *PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega)*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los plásmidos se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa y se cuantificaron según se indica en el apartado 4.1.6.

#### 4.1.2. Extracción de ADN genómico de *S. cerevisiae*

Para la extracción de ADN genómico se partió de un cultivo líquido de 10 ml en agitación en fase exponencial (D.O.<sub>600</sub>~0.6-0.8) que se centrifugó a 4000 rpm a temperatura ambiente durante 4 minutos para obtener el pellet de células, o bien recogiendo masa celular desde una placa con medio sólido. Las células se lavaron con 0,1 volúmenes de H<sub>2</sub>O MiliQ y se resuspendieron en 200 µl de tampón de lisis de levaduras (Triton X-100 2% (v/v), SDS 1% (p/v), NaCl 100 mM). Se añadió el equivalente a un volumen de 300 µl de perlas de vidrio (425-600 µm, *Sigma-Aldrich*) y 200 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) pH=8. Se agitó a máxima potencia a 4°C durante 4 minutos. Tras la rotura se añadieron 200 µl de tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH=8, EDTA 1 mM pH=8) y se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos a 4°C. El ADN, desde el sobrenadante, se precipitó con 1 ml de etanol absoluto frío mezclado por inversión durante unos segundos, y se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Una vez precipitado el ADN, se lavó con 1 ml de etanol al 70% (v/v), se secó y se resuspendió en 50 µl de H<sub>2</sub>O MiliQ estéril.

El ADN se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa y se cuantificó según se indica en el apartado 4.1.6.

#### 4.1.3. Extracción de ADN plasmídico de *S. cerevisiae*

Para la obtención de plásmidos desde *S. cerevisiae*, se partió de un cultivo líquido de 5 ml en agitación, en medio SD suplementado con aminoácidos dependiendo del tipo de auxotrofia y del marcador del plásmido. Las células se centrifugaron a 4000 rpm a temperatura ambiente durante 4 minutos y al pellet resultante se le añadieron 100 µl de tampón de lisis de levaduras (Triton X-100 2% (v/v), SDS 1% (p/v), NaCl 100 mM), 100 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) pH=8 y el equivalente a un volumen de 300 µl de perlas de vidrio (425-600 µm, *Sigma-Aldrich*). Se agitó a máxima potencia, a 4°C durante 2 minutos, y se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos a 4°C. La fase acuosa superior se

## **Material y métodos**

recuperó y se pasó a otro tubo, al cual se le añadieron 100 µl de H<sub>2</sub>O MiliQ estéril. A la solución resultante se le añadieron 500 µl de tampón I de lavado del kit comercial *QIAprep® Spin Miniprep Kit* (QIAGEN). Finalmente, la solución se pasó por una columna de este mismo kit y el ADN plasmídico se eluyó según las especificaciones del fabricante.

El ADN se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa y se cuantificó según se indica en el apartado 4.1.6.

### 4.1.4. Extracción de ARN de *S. cerevisiae*

Para la extracción de ARN total de *S. cerevisiae* se recogieron 50 ml de cultivo líquido en fase exponencial (D.O.<sub>600</sub>~0,6-0,7) y se centrifugaron a 3000 rpm durante 4 minutos a 4°C. Se lavaron con 10 ml de H<sub>2</sub>O MiliQ libre de RNasa y se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones. El pellet de células obtenido se pasó a un tubo de 1,5 ml y se resuspendió en 500 µl de tampón AE (NaAc 50 mM pH=5,3, EDTA 10 mM pH=8), 50 µl de SDS 10% (p/v) y 500 µl de fenol equilibrado en tampón citrato 0,1 M, pH=4,3. Se dio un vórtex breve y a continuación se sometió a una incubación de 65°C en agitación durante 4 minutos. Tras una incubación en hielo durante 2 minutos, se centrifugó a 13000 rpm y 4°C durante 2 minutos. El sobrenadante se recuperó con cuidado, se pasó a un nuevo tubo y se volvieron a añadir 500 µl de fenol equilibrado en tampón citrato 0,1 M, pH=4,3. Se centrifugó en las mismas condiciones descritas anteriormente y el sobrenadante se volvió a pasar a otro tubo nuevo. Al sobrenadante se le añadieron 500 µl de cloroformo equilibrado con etanol y tras agitación en vórtex durante 5 segundos se centrifugó a 13000 rpm y 4°C durante 1 minuto. El sobrenadante se recogió y se pasó a un nuevo tubo. Para la precipitación del ARN, se añadieron 30 µl NaAc 3 M, pH=5,3, se mezcló bien el contenido, se añadieron 750 µl de etanol absoluto frío y 4 µl de glicógeno 10 mg/ml. La mezcla se mantuvo a -20°C durante un tiempo que puede oscilar entre 20 minutos u *overnight*. Pasado ese tiempo, se centrifugó a 13000 rpm y 4°C durante 30 minutos. El pellet obtenido se resuspendió en 50 µl de H<sub>2</sub>O MiliQ libre de RNasa.

El ARN se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa y se cuantificó según se indica en el apartado 4.1.6.

### 4.1.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la realización de PCRs se emplearon dos tipos de polimerasas diferentes, dependiendo del tipo de análisis a realizar. Por un lado, se usó la ADN polimerasa *BIOTOOLS* (*BIOTOOLS B&M Labs, S.A.*) para comprobación de marcadores de cepas y otros procedimientos rutinarios. Por otro lado, para la amplificación de fragmentos de ADN para clonación o recombinación homóloga, se usó la enzima *iProof High-Fidelity DNA Polymerase* (*BioRad*). En todos los casos se siguieron las indicaciones de los fabricantes.

## **Material y métodos**

Para la comprobación rápida desde colonias de *S. cerevisiae* por PCR, parte de la misma se resuspendió en 2,4 µl de NaOH (0,02 N) y las células se congelaron en N<sub>2</sub> líquido y se incubaron posteriormente a 100°C durante 10 minutos. Este ciclo de congelación y calentamiento a 100°C se repitió tres veces. A esta solución se le añadieron los reactivos de PCR y se procedió a realizar la técnica.

El ADN se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa y se cuantificó, si era necesario, según se indica en el apartado 4.1.6.

### 4.1.6. Electroforesis y cuantificación de ácidos nucleicos

Las muestras de ácidos nucleicos obtenidas por diversos procedimientos (ADN plasmídico, ADN genómico, ARN, producto de PCR, etc.) se analizaron de forma rutinaria por electroforesis en geles de agarosa. Los geles se prepararon en tampón TAE 0,5X (Tris-acetato 20 mM, EDTA 1 mM, pH=8,5) variando la concentración de agarosa entre 0,6-3% (p/v) dependiendo de las características del ácido nucleico a analizar. Antes de cargarlas, a las muestras se les añadió un volumen de tampón de carga 6X (azul de bromofenol 0,25% (p/v), glicerol 30% (v/v)) hasta dejarlo a una concentración final de 1X. La electroforesis se realizó con el gel de agarosa dentro de una cubeta *Mini-Sub*<sup>®</sup>, *Sub-Cell*, *ReadyAgarose*<sup>™</sup> (*BioRad*) con tampón TAE 0,5X y a un voltaje variable, nunca superando los 10 V/cm de gel.

Como compuesto intercalante se usó bromuro de etidio (0,5 µg/ml), incubando el gel en esta solución durante el tiempo necesario y lavando posteriormente con agua, o *RedSafe*<sup>™</sup> (0,00005% v/v) añadido directamente sobre el gel de agarosa. Para la visualización de las muestras se empleó luz ultravioleta.

Para la cuantificación espectrofotométrica de ácidos nucleicos se utilizó el equipo *NanoVue*<sup>®</sup> *Plus Spectrophotometer* (*GE Healthcare*). La medida de absorbancia se hizo utilizando una D.O.=260 nm. Para el cálculo de la pureza, se hizo el ratio  $A_{260}/A_{280}$ . Se consideró que las muestras tenían una pureza óptima si este ratio estaba en torno a 1,8 para muestras de ADN, y en torno a 2 para muestras de ARN.

### 4.1.7. Transcripción inversa o retrotranscripción

El estudio de niveles de expresión de ARNt de este trabajo se realizó mediante retrotranscripción y análisis por PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR). Para la obtención de ADN complementario (ADNc) a partir de ARN se empleó el kit comercial *iScript*<sup>™</sup> *cDNA synthesis kit* (*BioRad*), siguiendo las especificaciones del fabricante, con algunas modificaciones: se utilizaron 500 ng de ARN (ver apartado 4.1.4.) junto con 4 µl de tampón de reacción 5x en un volumen final de 20 µl, al que se añadieron 10 pmol de cebador reverso. El cebador reverso añadido en cada reacción de retrotranscripción dependió del ARNt que se

## **Material y métodos**

quiso amplificar, aunque se pueden usar varios en paralelo, (ver Tabla MyM 3). Antes de añadir la retrotranscriptasa, el tubo que contenía el ARN, el tampón de reacción y el cebador reverso se incubó en un termobloque a 65°C durante 10 minutos. Pasado ese tiempo, el tubo se puso en hielo durante 5 minutos. A continuación, a cada tubo se le añadió la retrotranscriptasa y se llevó a cabo la reversotranscripción en un termociclador con el programa indicado por el fabricante. Acabada la retrotranscripción, al volumen de 20 µl se le añadieron 30 µl de H<sub>2</sub>O MiliQ libre de RNasa y DNasa para tener un volumen final de 50 µl.

### 4.1.8. PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)

Para el análisis por qPCR en este trabajo se utilizó el equipo *CFX384™ Real-time PCR detection systems (BioRad)*.

Para el análisis de ADNc procedente de ARNt se empleó el kit comercial *SsoFast™ EvaGreen® Supermix (BioRad)*. En un volumen final de 5 µl, se pusieron 1,5 µl de H<sub>2</sub>O MiliQ libre de RNasa y DNasa, 0,5 µl de ADNc preparado según se indica en el apartado anterior, 10 pmoles de los oligonucleótidos *Forward* y *Reverse* y 2,5 µl de mezcla de reacción del kit (2X).

Las muestras de ChIP (ver apartado 4.1.9.) fueron analizadas utilizando *SYBR® Premix Ex Taq™ (Takara)* en un volumen final de 5 µl.

### 4.1.9. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Con esta técnica se persigue analizar la densidad relativa de proteínas asociadas a regiones específicas del ADN. El protocolo de ChIP abarca varias etapas que se explican a continuación:

- Cultivo y *crosslinking*: 50 ml de cultivo en medio YPD o SD en fase exponencial (D.O.<sub>600</sub> ~0,5-0,6) se fijaron con formaldehído a una concentración final de 1% (v/v), a temperatura ambiente durante 15 minutos y agitando el matraz cada 2-3 minutos. La fijación se detuvo añadiendo 10 ml de glicina 2,5 M e incubando las células durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células se centrifugaron a 4000 rpm durante 3 minutos a 4°C y se lavaron cuatro veces con 25 ml de TBS frío (NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM pH=7,5). Los pellets de células se sumergieron en N<sub>2</sub> líquido y se congelaron hasta su uso.
- Obtención y fragmentación de cromatina (sonicación): Las células obtenidas desde 50 ml de cultivo se resuspendieron en 300 µl de tampón de lisis ChIP frío (HEPES 50 mM, EDTA 1 mM pH=8, NaCl 140 mM, Triton-X-100 1% (v/v), Desoxicolato de sodio 0,1% (p/v), PMSF 1 mM, Benzamidina 0,15% (p/v), cóctel inhibidor de proteasas (Complete, Roche)) y se transfirieron a un tubo de 1,5 ml al cual se le añadieron 300µl de perlas

## **Material y métodos**

de vidrio (425-600µm, *Sigma-Aldrich*). La mezcla fue agitada a máxima potencia durante 15 minutos a 4°C para romper las células. El tubo que contenía este primer lisado se agujereó en su base con una aguja incandescente y se centrifugó durante 1 minuto a 13000 rpm y 4°C para pasar todo su contenido a otro tubo de 1,5 ml nuevo. El extracto celular de este nuevo tubo se sonicó en el equipo *Bioruptor® UCD-200 (Diagenode)* durante 30 minutos, divididos en tres ciclos de 10 minutos a máxima potencia (30" ON, 30" OFF) y a 4°C, con intervalos de 5 minutos en hielo entre cada ciclo. Las muestras sonicadas fueron centrifugadas a 12000 rpm durante 5 minutos a 4°C, recuperando el sobrenadante (400 µl) en un nuevo tubo y congelándolo a -80°C.

- Comprobación de la cromatina: La cromatina recién fragmentada debe ser comprobada y visualizada antes de continuar con el protocolo de ChIP. Una muestra de cromatina bien sonicada debe tener fragmentos de entre 300-500 pb. Para comprobar la cromatina, a 40 µl de muestra sonicada se le añadieron 105 µl de tampón de elución (Tris-HCl 50 mM, pH=8, EDTA 10 mM pH=8, SDS 1% (p/v)) y 5 µl de RNasa A (10 mg/ml), y se incubó *overnight* en agitación (660 rpm) a 65°C. Posteriormente se añadieron 7,5 µl de proteinasa K (20 mg/ml) (*Novagen*) y se realizó una nueva incubación durante 90 minutos en agitación (660 rpm) a 37°C. Las muestras se purificaron con el kit comercial NucleoSpin® Extract II (*MACHEREY-NAGEL*), siguiendo las instrucciones del fabricante para muestras que contienen SDS. Finalmente, se resuspendieron en 30 µl de H<sub>2</sub>O MiliQ. Se analizaron 20 µl de muestra purificada en un gel de agarosa al 1,5% (p/v) con un tampón de carga con sacarosa 40% (p/v) y carente de azul de bromofenol.
- Inmunoprecipitación: Para la inmunoprecipitación (dado que los ChIps se hicieron a partir de la proteína Rpb8-TAP) se emplearon 50 µl de *Dynabeads Pan Mouse IgG (Invitrogen)* lavadas 2 veces con PBS/BSA (BSA 0,1% (p/v), NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO 1,8 mM). A continuación, las *Dynabeads* se incubaron con los extractos sonicados (previamente se separaron 10 µl para usarlos como ADN total o extracto (INPUT)), en una proporción de 50 µl de *Dynabeads*/350 µl de muestra sonicada, durante 90 minutos a 10°C en agitación (660 rpm). Las *Dynabeads* con las proteínas unidas se lavaron dos veces con tampón de lisis ChIP, dos veces con tampón de lisis ChIP suplementado con NaCl 360 mM, dos veces con tampón de lavado (Tris-HCl 10 mM pH=8, LiCl 250 mM, NP-40 0.5% (v/v), Desoxicolato de sodio 0,5% (p/v), EDTA 1 mM pH=8) y una última vez con tampón de elución (Tris-HCl 50 mM pH=8, EDTA 10 mM pH=8, SDS 1% (p/v)). Finalmente, las proteínas unidas a las *Dynabeads* se eluyeron en dos incubaciones sucesivas con 50 µl de tampón de elución, durante 10 minutos a 65°C en agitación (1200 rpm). Al eluato obtenido se añadieron 90 µl de tampón de elución, haciendo un volumen final de 190 µl. Por otro

## Material y métodos

lado, 140  $\mu$ l de tampón de elución se añadieron a los 10  $\mu$ l de INPUT que se separaron previamente. Las muestras inmunoprecipitadas y los extractos se incubaron *overnight* (no más de 16 horas) a 65°C en agitación (660 rpm). Tras la incubación, se añadieron 7,5  $\mu$ l de proteinasa K (20 mg/ml) (*Novagen*) y se realizó una nueva incubación durante 90 minutos en agitación (660 rpm) a 37°C. Las muestras fueron purificadas con el kit comercial *NucleoSpin® Extract II (MACHEREY-NAGEL)* siguiendo las instrucciones del fabricante para muestras que contienen SDS y se resuspendieron en 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O MiliQ.

- Análisis por qPCR: Para el análisis de las muestras mediante qPCR, se utilizó 1  $\mu$ l de extracto (INPUT) a una dilución 1:100 y 1  $\mu$ l de muestra de CHIP a una dilución 1:2. Se empleó la enzima *SYBR® Premix Ex Taq™ (Takara)* junto con los oligonucleótidos para amplificar la región de interés (ver Tabla MyM 3) en un volumen final de 5  $\mu$ l. Los datos de CHIP del presente trabajo se muestran como “niveles de enriquecimiento”. Para calcular el enriquecimiento, se analizó la potencia ( $\text{Log}_2$ ) de la diferencia entre el valor de Ct («*cycle threshold*») para la región intergénica (cromosoma V) y el valor de Ct del fragmento de interés, tanto en extracto (INPUT) como en la muestra de CHIP. Para la obtención de los niveles de enriquecimiento se calculó el ratio CHIP/Extracto (INPUT).

### 4.2. Técnicas de manipulación y análisis de proteínas

#### 4.2.1. Extracción y cuantificación de proteínas

Los métodos de extracción de proteínas totales dependieron de los requerimientos experimentales. Fundamentalmente se utilizaron dos métodos diferentes que se describen a continuación.

- Método del ácido tricloroacético (TCA): Para la extracción de proteínas por el método de TCA se recogieron 5 ml de cultivo celular en fase exponencial ( $\text{D.O.}_{600} \sim 0,8-1,0$ ) y se centrifugaron a 3000 rpm durante 4 minutos. El pellet de células se lavó con 1 ml de H<sub>2</sub>O MiliQ y se centrifugó en las mismas condiciones. Las células se resuspendieron en 200  $\mu$ l de TCA 20% (v/v), se añadieron 200  $\mu$ l de perlas de vidrio (425-600  $\mu$ m, *Sigma-Aldrich*) y se agitaron a máxima potencia en vórtex durante 1 minuto a 4°C. El contenido se pasó a un nuevo tubo. Al tubo inicial que contenía el pellet con la rotura celular y las perlas de vidrio se añadieron 400  $\mu$ l TCA 5% (v/v) y se agitó nuevamente a máxima potencia durante 10 segundos a temperatura ambiente para recuperar las proteínas que no hubieran sido recogidas tras la primera rotura. El contenido se pasó al nuevo tubo que contenía el sobrenadante de la primera rotura y

## Material y métodos

la mezcla se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se añadieron 10 µl Tris-HCl 1.5 M pH=8,8 y 20 µL de tampón de carga Laemmli 2X (120 mM Tris-HCl pH=8,8, 4% SDS (p/v), 4% azul de bromofenol (p/v), 2% β-mercaptoetanol (v/v), 10% glicerol (v/v)). En ocasiones, el pellet del paso anterior vira a color amarillo debido a su alta acidez. Para neutralizar dicha acidez se añaden entre 1-5 µl Tris-HCl 1,5 M pH=8,8. Las muestras fueron hervidas durante 10 minutos a 100°C, centrifugadas a 13000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente y analizadas por SDS-PAGE y western blot.

- Método estándar: Fue utilizado para preparar extractos para inmunoprecipitaciones (ver apartado 4.2.2.). Se partió, de manera estándar, de un volumen de cultivo líquido de 100 ml en fase exponencial (D.O.<sub>600</sub>~0,8-1) y las células se recogieron por centrifugación durante 5 minutos a 3000 rpm y 4°C. Se lavaron con 1 volumen de H<sub>2</sub>O MiliQ y el pellet de células se resuspendió en 300 µl de tampón de lisis (HEPES 50 mM pH=7,5, NaCl 120 mM, DTT 0.5 mM, EDTA 1 mM, CHAPS 0.3% (p/v)) suplementado con cóctel inhibidor de proteasas 1x (Complete, Roche), PMSF 0,5 mM, ortovanadato 2 mM y fluoruro sódico 1 mM, más el equivalente de 200 µl de perlas de vidrio (425-600 µm, Sigma-Aldrich). A continuación, se agitó a máxima potencia durante 15 minutos a 4°C. Tras la rotura, se procedió a centrifugación a 14000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante que se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. El sobrenadante final es el extracto de proteínas obtenido.
- Método con sonicación: Alternativamente al método anterior, para algunas inmunoprecipitaciones de este trabajo se hizo una extracción de proteínas tras un *crosslinking* previo y una sonicación posterior. Se partió de un volumen de cultivo líquido de 100 ml en fase exponencial (D.O.<sub>600</sub>~0,8-1) al que se le añadió formaldehído a una concentración final de 1% (v/v), a temperatura ambiente durante 15 minutos y agitando el matraz cada 2-3 minutos. La reacción se detuvo añadiendo Tris-glicina a una concentración final de 10 mM. Las células se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos a 4°C y el pellet se lavó tres veces con 25 ml de TBS frío (NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM pH=7,5). Para la rotura, se resuspendió el pellet de células en 300 µl de tampón de lisis ChIP frío (HEPES 50 mM, EDTA 1 mM pH=8, NaCl 140 mM, Triton-X-100 1% (v/v), Desoxicolato de sodio 0,1% (p/v), PMSF 1mM, Benzamidina 0,15% (p/v), cóctel inhibidor de proteasas (Complete, Roche) y se transfirieron a un tubo de 1,5 ml al cual se le añadieron 300µl de perlas de vidrio (425-600µm, Sigma-Aldrich). La mezcla fue agitada a máxima potencia durante 15 minutos a 4°C. El tubo que contenía este primer lisado se agujereó en su base con una aguja incandescente y se centrifugó durante 1 minuto a 13000 rpm y 4°C para pasar todo su contenido a otro tubo de 1,5 ml nuevo. El extracto celular se sonicó en el equipo *Bioruptor® UCD-200* (Diagenode)

## **Material y métodos**

durante 30 minutos divididos en tres ciclos de 10 minutos a máxima potencia (30" ON, 30" OFF) y a 4°C, con intervalos de 5 minutos en hielo entre cada ciclo. Las muestras sonicadas fueron centrifugadas a 12000 rpm durante 5 minutos a 4°C, recuperando el sobrenadante en un nuevo tubo.

### **4.2.2. Inmunoprecipitación de proteínas**

Los experimentos de inmunoprecipitación de proteínas están basados en los descritos por Soutourina *et al* (Soutourina et al., 2006) con algunas modificaciones. Para ello, se usaron 37 µl de *Dynabeads M280 sheep* anti-ratón o anti-conejo (*Invitrogen*) por muestra conteniendo 1 o 2 mg de proteína total, dependiendo del experimento. Las *Dynabeads* se lavaron con 200 µl de BSA disuelto en PBS al 0,1% (p/v) durante 5 minutos a 10°C en agitación (660 rpm) y se incubaron nuevamente con 50 µl de PBS/BSA 0,1% (p/v) durante 30 minutos a 10°C en agitación (660 rpm) para bloquearlas. A continuación, las *Dynabeads* se incubaron durante 1 hora a 10°C en agitación (660 rpm) con el volumen apropiado de anticuerpo primario (ver Tabla MyM 5) y el volumen necesario de PBS/BSA 0,1% (p/v) hasta completar 50 µl finales. Pasado ese tiempo, las *Dynabeads* conjugadas con el anticuerpo primario se lavaron 3 veces durante 5 minutos a 10°C en agitación (660 rpm) con 300 µl de tampón de lisis (HEPES 50 mM pH=7,5, NaCl 120 mM, DTT 0.5 mM, EDTA 1 mM, CHAPS 0.3% (p/v)). Tras los lavados, se incubaron con 1 o 2 mg de proteína total (dependiendo del experimento), completando hasta un volumen final de 200 µl con tampón de lisis. Esta incubación se realizó durante 3 horas, a 10°C y en agitación (660 rpm). Posteriormente, las *Dynabeads* con el extracto se lavaron 5 veces con 300 µl de tampón de lisis durante 5 minutos a 10°C en agitación (660 rpm). La elución se realizó añadiendo 19 µl de tampón de lisis y 6 µl de tampón de carga Laemmli 4x (1x: Tris-HCl 10 mM pH=6,8, SDS 2% (p/v), azul de bromofenol 0,02% (p/v), glicerol 10% (v/v), β-mercaptoetanol 0,77M). El tubo que contenía la muestra junto con los tampones de lisis y de carga fue hervido durante 10 minutos a 100°C antes de retirar las *Dynabeads* y analizar el contenido por SDS-PAGE y western blot.

En el caso de purificaciones TAP se siguió el mismo procedimiento anteriormente descrito, con algunas modificaciones. Se emplearon 50 µl de *Dynabeads Pan Mouse IgG* (*Invitrogen*) por muestra conteniendo 1 o 2 mg de proteína total, dependiendo del experimento. Las *Dynabeads* se lavaron con 200 µl de BSA disuelto en PBS al 0,1% (p/v) durante 5 minutos a 10°C en agitación (660 rpm) y se incubaron nuevamente con 50 µl de PBS/BSA 0,1% (p/v) durante 30 minutos a 10°C en agitación (660 rpm) para bloquearlas. Pasado ese tiempo, las *Dynabeads* se incubaron con 1 o 2 mg de proteína total (dependiendo del experimento), completando hasta un volumen final de 200 µl con tampón de lisis (HEPES 50 mM pH=7,5, NaCl 120 mM, DTT 0.5 mM, EDTA 1 mM, CHAPS 0.3% (p/v)). Esta incubación se realizó

## **Material y métodos**

durante 3 horas, a 10°C y en agitación (660 rpm). Posteriormente, las *Dynabeads* con el extracto se lavaron 5 veces con 300 µl de tampón de lisis durante 5 minutos a 10°C en agitación (660 rpm). La elución se realizó añadiendo 19 µl de tampón de lisis y 6 µl de tampón de carga Laemmli 4x (1x: Tris-HCl 10 mM pH=6,8, SDS 2% (p/v), azul de bromofenol 0,02% (p/v), glicerol 10% (v/v), β-mercaptoetanol 0,77M). El tubo que contenía la muestra junto con los tampones de lisis y de carga fue hervido durante 10 minutos a 100°C antes de retirar las *Dynabeads* y analizar el contenido por SDS-PAGE y western blot.

### 4.2.3. Análisis de estabilidad de complejos proteicos

El estudio de la estabilidad de complejos proteicos en el presente trabajo se realizó mediante dos métodos diferentes que se detallan a continuación. Tras la realización de cualquiera de los dos métodos, se analizaron las proteínas de interés mediante SDS-PAGE y western blot siguiendo el procedimiento habitual.

- **Incubación a 37°C:** Con la incubación del extracto a temperatura elevada (37°C) se pretende comprobar si el aumento de temperatura tiene algún efecto sobre las interacciones entre las proteínas que forman parte del complejo, y comprobar si este es más inestable. Para realizar este método, se recogieron cultivos líquidos de células en medio YPD en fase exponencial (D.O.<sub>600</sub>~0,7). Las células se centrifugaron durante 3 minutos a 3000 rpm y 4°C, se lavaron con H<sub>2</sub>O MiliQ y se hizo una extracción de proteínas siguiendo el “método estándar” (ver subapartado 4.2.1). Tras la extracción y la cuantificación de proteína total, una parte del extracto (1 o 2 mg, dependiendo del experimento) se incubó en un baño a 37°C durante 30 minutos. Pasado ese tiempo, se realizó una purificación TAP de la manera habitual (ver subapartado 4.2.2) y los resultados se analizaron por SDS-PAGE y western blot.
- **Gradiente de NaCl:** La estabilidad de complejos proteicos se estudió también realizando una purificación TAP de proteínas tras un gradiente de NaCl. Al igual que con el método anterior, con este procedimiento se pretende comprobar si el aumento en la concentración de NaCl del tampón tiene algún efecto sobre las interacciones entre las proteínas que forman parte del complejo, y comprobar si este es más inestable. Para ello, se recogieron cultivos líquidos de células en medio YPD en fase exponencial (D.O.<sub>600</sub>~0,7), se centrifugaron durante 3 minutos a 3000 rpm y 4°C, se lavaron con H<sub>2</sub>O MiliQ y se hizo una extracción de proteínas siguiendo el “método estándar” (ver subapartado 4.2.1). Tras la extracción y la cuantificación de proteína total, se realizó una purificación TAP de la manera habitual (ver subapartado 4.2.2), con pequeñas modificaciones: en lugar de los lavados antes de la elución con el tampón habitual, las *Dynabeads* con el complejo proteico unido se lavaron tres veces

## ***Material y métodos***

con el tampón de lavado habitual (HEPES 50 mM pH=7,5, DTT 0.5 mM, EDTA 1 mM, CHAPS 0.3% (p/v)), pero con concentraciones crecientes de NaCl (250 mM, 500 mM y 1M). Se guardaron alícuotas antes de comenzar los lavados de NaCl y tras terminar el último lavado, con el fin de poder comparar el complejo antes de los lavados y después. Las alícuotas antes y después de los lavados se hirvieron en tampón de carga Laemmli durante 10 minutos para eluir el complejo y poder analizar el resultado mediante SDS-PAGE y western blot.

### 4.2.4. yChEFs (yeast Chromatin Enriched Fractions)

El método de yChEFs fue desarrollado por el grupo del Dr. Navarro (Cuevas-Bermúdez et al., 2019; Cuevas-Bermúdez et al., 2020). Se fundamenta en el aislamiento y purificación de fracciones enriquecidas de cromatina para el posterior análisis de proteínas por SDS-PAGE, western blot y/o espectrometría de masas. De manera estándar, se parte de un cultivo de 100 ml en fase exponencial (D.O.<sub>600</sub> ~0,6-0,8). Las células se recogieron por centrifugación durante 5 minutos a 3000 rpm y 4°C. Se lavaron con 1 volumen de H<sub>2</sub>O MiliQ estéril y el pellet de células se resuspendió en 200 µl de Tampón 1 (HEPES 20 mM pH=8, KCl 60 mM, NaCl 15 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, ácido butírico 10 mM, Triton X-100 0,8% (v/v), sacarosa 250 mM, espermidina 2,5 mM, espermina 0,5 mM) y se añadió el equivalente a 200 µl de perlas de vidrio (425-600 µm, *Sigma-Aldrich*). Las células se agitaron en vórtex a máxima potencia durante 4 minutos a 4°C. Las muestras se centrifugaron a 500xg, durante 5 minutos a 4°C para clarificar el sobrenadante. Este paso se repitió hasta dos veces más, pasando siempre el sobrenadante a un tubo nuevo y descartando el pellet. El sobrenadante final se transfirió a un nuevo tubo y fue centrifugado a 20000xg durante 25 minutos a 4°C. El pellet (Pellet 1) obtenido se resuspendió en 200 µl de Tampón 1 y fue centrifugado en las mismas condiciones. Tras descartar el sobrenadante, el pellet obtenido (Pellet 2) se resuspendió en 200 µl de Tampón 2 (HEPES 20 mM pH=7,6, NaCl 450 mM, MgCl<sub>2</sub> 7,5 mM, EDTA 20 mM, glicerol 10% (v/v), NP-40 1% (v/v), urea 2 M, sacarosa 0,5 M, DTT 1 mM, PMSF 0,125 mM) y fue centrifugado en las mismas condiciones. Se descartó el sobrenadante y el pellet obtenido (Pellet 3), que se corresponde con la fracción cromatínica enriquecida, se resuspendió en 20 µl de tampón de carga Laemmli 1x (Tris-HCl 10 mM pH=6,8, SDS 2% (p/v), azul de bromofenol 0,02% (p/v), glicerol 10% (v/v), β-mercaptoetanol 0,77M) si se utilizaba para análisis por SDS-PAGE y western blot.

### 4.2.5. Western blot

Para el análisis de proteínas se realizó la técnica de western blot, a partir de geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) en condiciones desnaturalizantes (Laemmli, 1970). Para la preparación de los geles, de manera estándar se usó acrilamida/bis-acrilamida

## **Material y métodos**

(37,5:1) y en el caso de geles para separar proteínas fosforiladas se usó acrilamida/bis-acrilamida (33,5:0,3). Dependiendo del tamaño y características de la proteína que se quiso analizar, el porcentaje de acrilamida en el gel varió desde el 6% hasta el 15%. Para la electroforesis, se utilizó de manera estándar el sistema vertical *Mini-PROTEAN Tetra Cell* (BioRad); para la separación de proteínas fosforiladas, se empleó el sistema *DASG-250-02* (C.B.S. Scientific). La electroforesis se realizó a voltaje constante de 100V para el gel concentrador y a 200V para el gel separador, en un tampón compuesto de Tris-HCl 50 mM pH=8,3-8,6, glicina 0,38 M, SDS 0,1% (p/v). Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF Immobilon-P (Millipore<sup>®</sup>), activadas previamente durante 30 segundos con metanol a temperatura ambiente. La transferencia se realizó por electrotransferencia semiseca en un equipo *Trans-Blot Semidry Transfer Cell* (BioRad). Se emplearon ocho piezas de papel *Whatman*<sup>®</sup> del mismo tamaño, de 1 cm mayor a cada lado de la membrana, distribuidas de la siguiente forma: 3 piezas humedecidas con tampón ánodo I (Tris-HCl 0,3 M pH=10,4, metanol 10% (v/v)), 2 piezas humedecidas con tampón ánodo II (Tris-HCl 25 mM pH=10,4, metanol 10% (v/v)) y 3 piezas en tampón cátodo (Tris-HCl 25 mM pH=9,4, metanol 10% (v/v), glicina 40 mM). Se colocaron las 3 piezas del ánodo I sobre el sistema de transferencia. Sobre ellas se colocaron las 2 piezas del ánodo II y a continuación, la membrana de PVDF. Sobre esta última se dispuso el gel y por último las 3 piezas del cátodo. La transferencia se realizó a temperatura ambiente durante 45 minutos, a 2,5 mA/cm<sup>2</sup> de tamaño del papel *Whatman*<sup>®</sup> utilizado para cada transferencia. Pasados los 45 minutos se comprobó la transferencia incubando la membrana durante 5 minutos a temperatura ambiente en una solución de Rojo Ponceau (0,5% p/v) diluida en ácido acético glacial 1% (v/v) y posterior lavado con H<sub>2</sub>O destilada.

Para realizar el *blotting*, de manera estándar la membrana se bloqueó con una solución de leche en polvo desnatada al 5% (p/v) en tampón PBS-Tween (Tween 20 0,05% (p/v), NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO 1,8 mM) durante 30 minutos, en agitación y a temperatura ambiente. De manera alternativa, la membrana se bloqueó con BSA al 5% (p/v) diluido en PBS durante 30 minutos, en agitación y a temperatura ambiente. En determinadas ocasiones, el bloqueo se realizó a 4°C toda la noche. Tras el bloqueo de la membrana, esta se incubó con el anticuerpo primario (para ver las concentraciones de uso, ver Tabla MyM 5), diluido en una solución de leche en polvo desnatada 2% (p/v) en tampón PBS-Tween, durante 90 minutos a temperatura ambiente u *overnight* a 4°C. Posteriormente la membrana se lavó 3 veces (durante 10 minutos cada lavado) en agitación, a temperatura ambiente y con una solución de leche en polvo desnatada 2% (p/v) en tampón PBS-Tween. Después se incubó la membrana con el anticuerpo secundario (para ver las concentraciones de uso, ver Tabla MyM 5), diluido en tampón PBS-Tween, durante 30 minutos a temperatura ambiente. La membrana

## **Material y métodos**

se lavó 3 veces (durante 10 minutos cada lavado) en agitación y a temperatura ambiente con PBS-Tween. Para la detección quimioluminiscente se empleó el kit comercial *ECL-prime kit* (Amersham) siguiendo las especificaciones del fabricante.

En aquellos casos en los que se quiso analizar otra proteína en la misma membrana, fue necesario deshibridar. La deshibridación consiste en eliminar de la membrana los anticuerpos primarios y secundarios previamente utilizados. Para ello la membrana se incubó durante 30 minutos en una solución de Tris-HCl 62,5 mM pH=6,8, SDS 2% (p/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 100 mM, a 50°C, en un horno de hibridación y se lavaron posteriormente tres veces durante 10 minutos, a temperatura ambiente, con PBS-Tween. Tras esto, la membrana está preparada para realizar un nuevo western blot en las condiciones anteriormente descritas.

### 4.2.6. ProteomChIP

Los estudios de ProteomChIP para el análisis de los complejos transcripcionales en cromatina fueron realizados en colaboración con el grupo de investigación del Dr. Jorge Pérez Fernández en el departamento de Bioquímica III dirigido por el Profesor Herbert Tschochner, en la Universidad de Regensburg (Regensburg, Alemania). La técnica de ProteomChIP fue desarrollada por el Dr. Jorge Pérez Fernández (Bruckmann et al., 2016; Hierlmeier et al., 2013). Esta técnica permite purificar proteínas mediante cromatografía de afinidad en su ambiente cromatínico. La composición proteica de los complejos cromatínicos purificados se realizó por espectrometría de masas en tándem (MALDI-TOF/TOF). Para ello, se hizo un *crosslinking* de la muestra *in vivo*, se purificó la cromatina y se solubilizó mediante sonicación. A partir de la fracción de cromatina solubilizada se purificó la proteína de interés mediante inmunoprecipitación. Dado el fraccionamiento necesario de la cromatina para su solubilización mediante sonicación, se emplearon agentes entrecruzantes que permitieron estabilizar los complejos proteína-ADN durante todo el proceso de purificación. De forma previa al análisis por MALDI-TOF/TOF, las proteínas resultantes del proceso de purificación se trataron con tripsina y los péptidos resultantes se sometieron a un proceso de marcaje con *iTRAQ*<sup>TM</sup> (*iTRAQ*<sup>TM</sup> labelling kit, Invitrogen). Dicho marcaje consiste en la unión covalente al extremo amino terminal de los péptidos de moléculas marcadoras que confieren idéntica relación masa/carga en el espectro de masas primario. La fragmentación de los reactivos de *iTRAQ* libera grupos con diferentes relaciones masa/carga, permitiendo la cuantificación de los péptidos a los que se encontraban unidos. El protocolo de ProteomChIP comprende varias etapas que se desarrollan a continuación:

- Cultivo y *crosslinking*: de manera estándar, se partió de 1 litro de cultivo de células crecidas en medio YPD, en fase exponencial (D.O.<sub>600</sub> ~0,6-0,8). Las células se fijaron con formaldehído a una concentración final de 0.5% (v/v), a 30°C, en agitación durante

## Material y métodos

10 minutos. La reacción se detuvo añadiendo Tris/glicina a una concentración final de 10 mM. Las células se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos y el pellet se lavó dos veces con 50 ml de PBS frío y una vez con 50 ml de tampón de lisis frío (HEPES–KOH 50 mM pH=7,5, NaCl 200 mM, EDTA 0.5 mM, Triton 1% (v/v), Desoxicolato de sodio 0.1% (p/v), SDS 0.1% (p/v), Benzamidina 2 mM, PMSF 1 mM).

- Obtención y fragmentación (sonicación) de cromatina: El pellet de células se pesó en una balanza de precisión y se resuspendió en 1,5 ml de tampón de lisis (suplementado con cóctel inhibidor de proteasas (Complete, Roche) por cada gramo de células. Las células se alicuotaron en tubos de 2 ml y la lisis celular se realizó con perlas de vidrio (0,75-1 mm, Roth) en un equipo *FastPrep (MP biomedical)*, en 12 ciclos de 30 segundos a máxima velocidad a 4°C, con intervalos de 30 segundos en hielo. Tras la rotura, el tubo que contenía este primer lisado se agujereó en su base con una aguja incandescente y se centrifugó durante 1 minuto a 13000 rpm y 4°C para pasar todo su contenido a otro tubo de 1,5 ml nuevo. El extracto se centrifugó a 3000 rpm, 5 minutos, y 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con tampón de lisis (10000 rpm, 5 minutos, a 4°C). El pellet se resuspendió en 1 ml de tampón de lisis y se sonicó en el equipo *Branson Sonifier 250*, en 5 ciclos de 10 pulsos (*Microtip limit 3, 90% Duty cycle*) con intervalos de 30 segundos en hielo. El lisado se centrifugó a 10000 rpm, 10 minutos a 4°C y el sobrenadante se pasó a un nuevo tubo, guardando 30 µl para su posterior análisis por SDS-PAGE y western blot.
- Inmunoprecipitación: Para la inmunoprecipitación, se incubó el total del lisado con 200 µl de IgG de suero de conejo (I5006-100MG, *Sigma-Aldrich*) acoplado a esferas magnéticas (1mm BcMag, FC-102, *Bioclone*) durante 3 horas a 4°C en agitación. Pasado ese tiempo, las esferas magnéticas se lavaron cuatro veces con 1 ml de tampón de lisis durante 5 minutos a 4°C en agitación y dos veces más, en las mismas condiciones, con tampón AC (NH<sub>4</sub>OAc 100 mM pH=7,4, MgCl<sub>2</sub> 0.1 mM). La elución de las proteínas se realizó mediante la desnaturalización de las mismas en medio alcalino con NH<sub>4</sub>OH. Para ello se añadieron 500 µl de NH<sub>4</sub>OH 500 mM a las esferas magnéticas con las proteínas unidas y se agitaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Este paso se repitió tres veces más hasta obtenerse un volumen de elución final de 2 ml. Dichas fracciones de elución se liofilizaron durante 16 horas en una speed-vac.
- Marcaje y análisis. Previo al análisis por espectrometría de masas, los eluatos de cada muestra se marcaron con reactivos *iTRAQ™*, siguiendo las especificaciones del fabricante. Para ello, a cada muestra liofilizada se le añadieron 25 µl de *Dissolution buffer (iTRAQ™ labelling kit, Invitrogen)*. y 2 µl de *Reducing Reagent (iTRAQ™*

## **Material y métodos**

*labelling kit, Invitrogen*) y se incubaron durante 90 minutos a 60°C en agitación. Pasado ese tiempo, se añadió 1 µl de *Cysteine Blocking Reagent (iTRAQ™ labelling kit, Invitrogen)* y se incubaron las muestras durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las proteínas de la muestra fueron tratadas durante 16 horas a 37°C con 2 µl de tripsina (1mg/ml). Los reactivos de marcaje *iTRAQ™* se equilibraron con 70 µl de etanol, se añadieron a cada muestra y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, las proteínas de cada muestra estaban marcadas con un isótopo diferente. Se combinaron todas en un tubo y se liofilizaron 16 horas en una speed-vac. Las muestras liofilizadas y combinadas se disolvieron en ácido trifluoroacético 0,1% (v/v) previo a la separación de las fracciones por cromatografía líquida de alta resolución o *HPLC (High Performance Liquid Chromatography)* en un equipo *nano-flow HPLC-system (Dionex)* acoplado en línea al equipo *maxis 4G (Brukeren)* en el servicio *Biochemie-Zentrum Regensburg (BZR), Lehrstuhl Biochemie I*, de la Universidad de Regensburg (Regensburg, Alemania). El análisis estadístico de los datos de espectrometría de masas para identificar la intensidad de señal *iTRAQ* para cada péptido se realizó en el mismo servicio de la Universidad de Regensburg, tal y como se ha descrito previamente por Jakob *et al* (Jakob *et al.*, 2012).

### **5. Técnicas de microscopía**

#### **5.1. Análisis de fluorescencia *in vivo***

Para el estudio de la localización celular de proteínas etiquetadas con alguna proteína fluorescente, se partió de un cultivo líquido crecido en medio SD en fase exponencial (D.O.<sub>600</sub> ~0,5-0,8). Se recogió 1 ml del cultivo y se centrifugó a 3000 rpm durante 2 minutos a temperatura ambiente y una pequeña porción de células se resuspendieron en 3 µl de medio de montaje *Vectashield (Vector Laboratories)* con 1,25 µg/ml DAPI. El equipo utilizado para la visualización fue un microscopio de fluorescencia (*Olympus BX51*).

#### **5.2. Inmunolocalización**

Para la localización celular de la proteína de interés, se partió de 10 ml de cultivo en medio YPD, en fase exponencial (D.O.<sub>600</sub>~0,5-0,7) y se fijó con formaldehído al 3,7% en agitación durante dos horas a temperatura ambiente. Las células fijadas fueron recogidas a 3000 rpm durante 5 minutos y se lavaron dos veces con 5 ml de PBS. Seguidamente las células se resuspendieron en 500 µl de tampón fosfato-sorbitol (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 30 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 70

## **Material y métodos**

mM, Sorbitol 1,2 M). Se tomaron 200  $\mu$ l de células en tampón fosfato-sorbitol, se les añadió 3,2  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol 1,42 M y 2,5  $\mu$ l de Zimoliasa 10 mg/ml (*US Biological*) y se incubaron durante 1 hora a 30°C para obtener esferoplastos. Pasado ese tiempo, los esferoplastos se lavaron 2 veces con 500  $\mu$ l de PBS-Tween y se resuspendieron en 100  $\mu$ l de esa misma solución. 20  $\mu$ l de esferoplastos se extendieron y dejaron secar sobre un portaobjetos tratado con polilisina. Los esferoplastos fijados sobre el portaobjetos se lavaron 3 veces con 200  $\mu$ l de PBS. Se incubaron después en una cámara húmeda con 20  $\mu$ l de PBS conteniendo 1mg/ml de BSA durante 30 minutos. Se lavaron 3 veces con 200  $\mu$ l de PBS y se incubaron con 20  $\mu$ l del anticuerpo primario, diluido en PBS conteniendo 1 mg/ml BSA (para ver las concentraciones de uso, ver Tabla MyM 5) a 4°C y *overnight*. Tras 3 lavados con 200  $\mu$ l de PBS, se incubaron con 20  $\mu$ l del anticuerpo secundario fluorescente, diluido en PBS conteniendo 1 mg/ml BSA (para ver las concentraciones de uso, ver Tabla MyM 5) durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. A continuación, se lavaron 3 veces con 200  $\mu$ l de PBS y se incubaron con 20  $\mu$ l de DAPI 1  $\mu$ g/ml en PBS durante 10 minutos en oscuridad. Se lavaron 3 veces con 200  $\mu$ l de PBS, se añadieron 5  $\mu$ l de medio de montaje *Vectashield* (*Vector Laboratories*) y los portaobjetos se cubrieron con cubreobjetos para su posterior observación al microscopio de fluorescencia. Cada cubreobjetos fue sellado sobre el portaobjetos con unas gotas de esmalte de uñas convencional. La preparación puede ser guardada durante varias semanas a 4°C en una cámara húmeda en oscuridad. El equipo utilizado para la visualización fue un microscopio de fluorescencia (*Olympus BX51*).

# Resultados. Capítulo I





## RESULTADOS.

### Capítulo I. Papel de Bud27 en la transcripción de las 3 ARN polimerasas

#### 0. Antecedentes

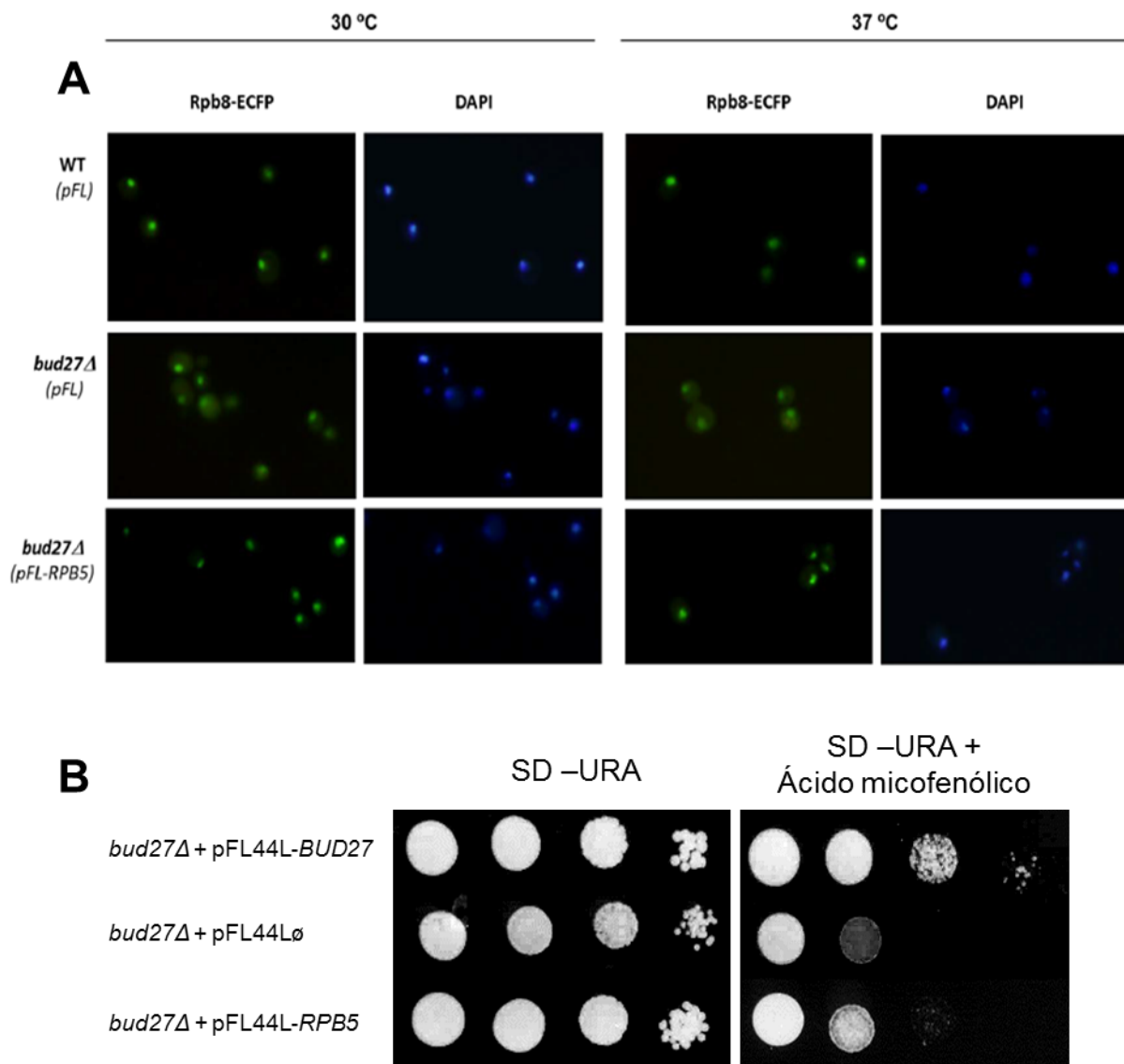
Trabajos previos del grupo del Dr. Navarro han demostrado que Bud27 participa en el ensamblaje citoplasmático de las 3 ARN polimerasas, vía Rpb5 (Mirón-García et al., 2013). Bud27 también tiene una función destacada en la elongación de la transcripción mediada por la ARN pol II ya que facilita la interacción física entre el complejo remodelador de cromatina RSC y la ARN pol II elongante (Mirón-García et al., 2014). El grupo del Dr. Navarro también ha demostrado que Bud27 se une a las regiones de ADN de los genes que codifican proteínas ribosómicas y RiBis, y que su falta conlleva una caída en los niveles de esos mismos transcritos debido a que hay una menor ocupación de la ARN pol II (Martínez-Fernández et al., 2020).

La participación de Bud27 en la transcripción no se limita únicamente al ensamblaje citoplasmático de las ARN polimerasas y la elongación de la ARN pol II. Se ha propuesto que Bud27 interviene en la transcripción de la ARN pol III favoreciendo tanto su ensamblaje citoplasmático como la interacción con RSC (Vernekar and Bhargava, 2015). En esta línea, un trabajo del grupo del Dr. Navarro demuestra, mediante *northern blot*, que la falta de Bud27 provoca una disminución en la cantidad de algunos ARNt inmaduros y maduros (Martínez-Fernández et al., 2020). Además, los experimentos de pulso-caza del mismo trabajo muestran que podría haber un defecto en la neosíntesis de transcritos de la ARN pol III (ARNt inmaduros y ARNr 5S) (Martínez-Fernández et al., 2020). Por otra parte, en estos mismos experimentos se observa un defecto en la neosíntesis del ARNr 35S así como una acumulación de algunos transcritos inmaduros como el ARNr 7S y el 27S, lo cual sugiere posibles defectos tanto en la síntesis como en el procesamiento (Martínez-Fernández et al., 2020). Todo esto apunta a que la ausencia de Bud27 también podría provocar defectos en la transcripción mediada por las ARN polimerasas I y III, además de los ya descritos para la ARN pol II.

Por otra parte, la sobreexpresión de *RPB5* en cepas carentes de Bud27 es capaz de revertir el defecto de ensamblaje de las 3 ARN polimerasas, tanto a 30°C, como ya se había demostrado (Mirón-García et al., 2013), como tras un choque térmico a 37°C (Figura R1 A). Sin embargo, la sobreexpresión de *RPB5* sólo corrige levemente la sensibilidad del mutante *bud27Δ* al ácido micofenólico (Figura R1 B), droga que reduce la disponibilidad de nucleótidos trifosfato y que se usa para identificar cepas con defectos de elongación de la transcripción (Shaw et al., 2001). Además, la sobreexpresión de *RPB5* sólo corrige parcialmente los

## Resultados. Capítulo I

defectos transcripcionales de la ARN pol III del mutante *bud27Δ* a 30°C, y no parece corregir significativamente los defectos a 37°C (Martínez-Fernández, 2016). Todos estos datos indican que Bud27 tendría una función relevante en la transcripción de las 3 ARN polimerasas más allá de su papel en el ensamblaje de las mismas. Dado que el mecanismo por el cual Bud27 modula la transcripción mediada por la ARN pol II ha sido previamente descrito por nuestro grupo, en el presente capítulo nos centraremos en abordar el impacto que tiene la falta de Bud27 en la transcripción mediada por las ARN polimerasas I y III.



**Figura R1. Análisis del efecto de la sobreexpresión de *RPB5* en el mutante *bud27Δ* en el ensamblaje de las ARN polimerasas y en la sensibilidad a ácido micofenólico.** A) Localización de la subunidad común a las tres ARN pols, Rpb8, mediante microscopía de fluorescencia en el mutante *bud27Δ* (YFN334) y su cepa isogénica silvestre (YFN335) tras la sobreexpresión de *RPB5*, tanto a 30°C como tras un choque térmico a 37°C durante 12 horas. B) Sensibilidad de la cepa mutante *bud27Δ* (YFN105) al ácido micofenólico (100 µg/ml) tras la sobreexpresión de *RPB5* o del propio gen *BUD27* (en el plásmido multicopia pFL44L), a 30°C.

La coordinación de la transcripción por parte las tres ARN polimerasas es un proceso celular esencial para asegurar una adecuada proporción de todos los transcritos necesarios para la biogénesis de ribosomas y el crecimiento celular (Barba-Aliaga et al., 2021; Lempiäinen and Shore, 2009; Mayer and Grummt, 2006). Se ha especulado que esta interconexión de las ARN polimerasas podría estar controlada por elementos de la ruta TOR, (Boguta, 2009; Laferte et al., 2006; Martin and Hall, 2005; Martin et al., 2006; Mayer and Grummt, 2006). La ruta TOR está constitutivamente activa en condiciones de crecimiento óptimas y se inhibe cuando estas son inadecuadas. Además, se ha descrito que Bud27 y su ortólogo humano, URI, estarían dentro de la vía TOR controlando la correcta expresión de genes relacionados con el metabolismo de los aminoácidos y la producción de ARNt (Gstaiger et al., 2003; Martínez-Fernández et al., 2020). Por otra parte, tanto Bud27 como URI, interaccionan física y funcionalmente con Rpb5, una de las subunidades comunes de las tres ARN polimerasas eucariotas (Dorjsuren et al., 1998; Gstaiger et al., 2003; Ito et al., 2001; Martínez-Fernández and Navarro, 2018; Mirón-García et al., 2013; Mirón-García et al., 2014; Mita et al., 2013). Puesto que Bud27 integra las funciones de interaccionar con Rpb5 y participar en la señalización de la ruta TOR, nuestra hipótesis es que Bud27 podría ser un elemento clave en la coordinación de la transcripción entre las tres ARN polimerasas a través de la ruta TOR.

### **1. Influencia de Bud27 en la transcripción mediada por la ARN pol I**

#### **1.1. Análisis de la asociación de la ARN pol I a la cromatina**

Como se ha comentado anteriormente, la falta de Bud27 provoca defectos de ensamblaje de las tres ARN polimerasas y una deslocalización parcial de estas en el citoplasma (Mirón-García et al., 2013). Además, tiene un impacto negativo en la elongación de la transcripción mediada por la ARN pol II por su deficiente asociación con RSC (Mirón-García et al., 2014). Se ha propuesto un papel similar para Bud27 en la transcripción mediada por la ARN pol III (Vernekar and Bhargava, 2015). Sin embargo, el estudio de la influencia de Bud27 sobre la transcripción mediada por la ARN polimerasa I no se ha llevado a cabo. Los datos de *northern blot* y pulso-caza del grupo del Dr. Navarro muestran que en ausencia de Bud27 se producen defectos en la neosíntesis del ARNr 35S y una acumulación de algunos transcritos inmaduros de la ARN pol I, como el ARNr 7S y el 27S (Martínez-Fernández et al., 2020).

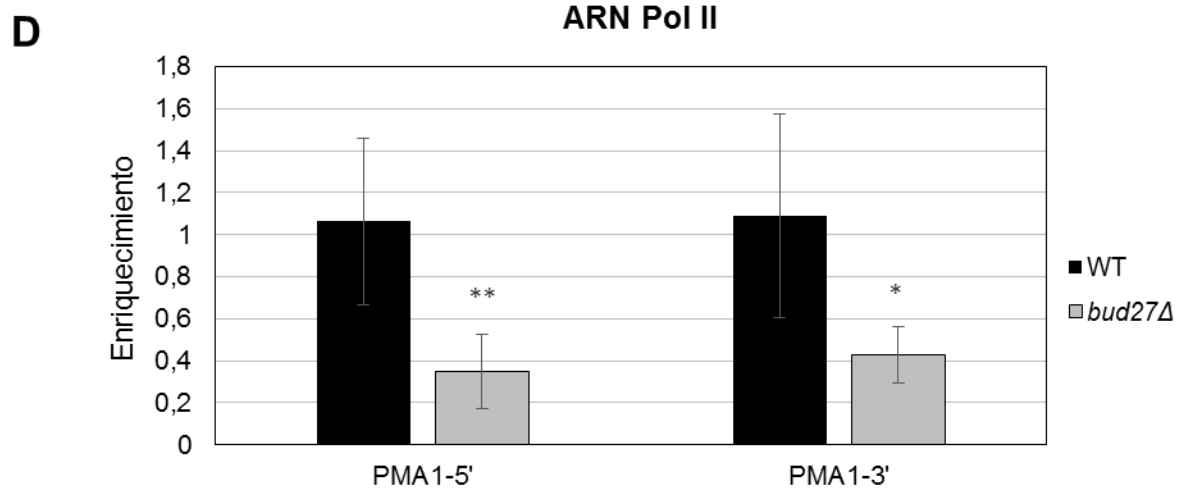
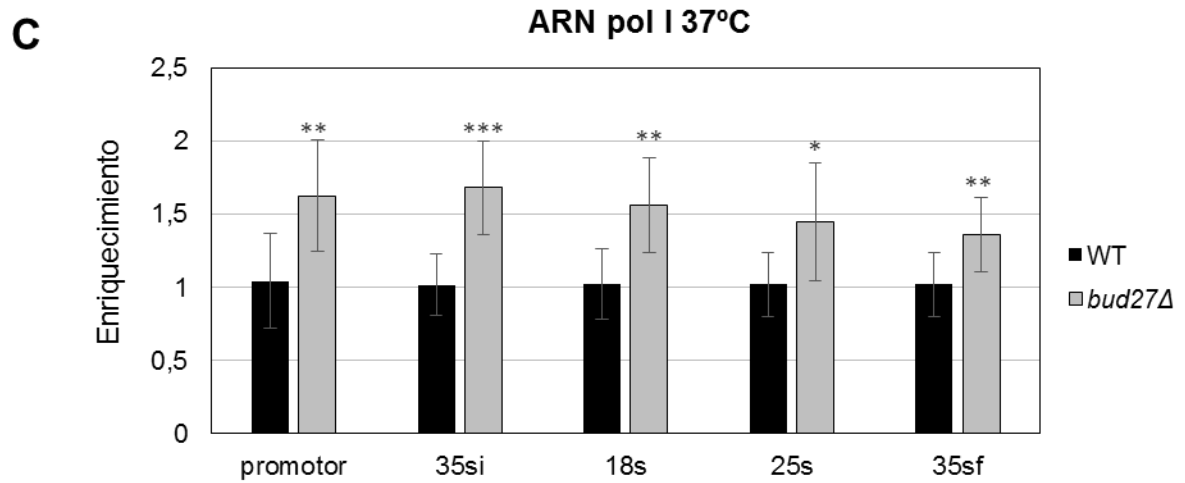
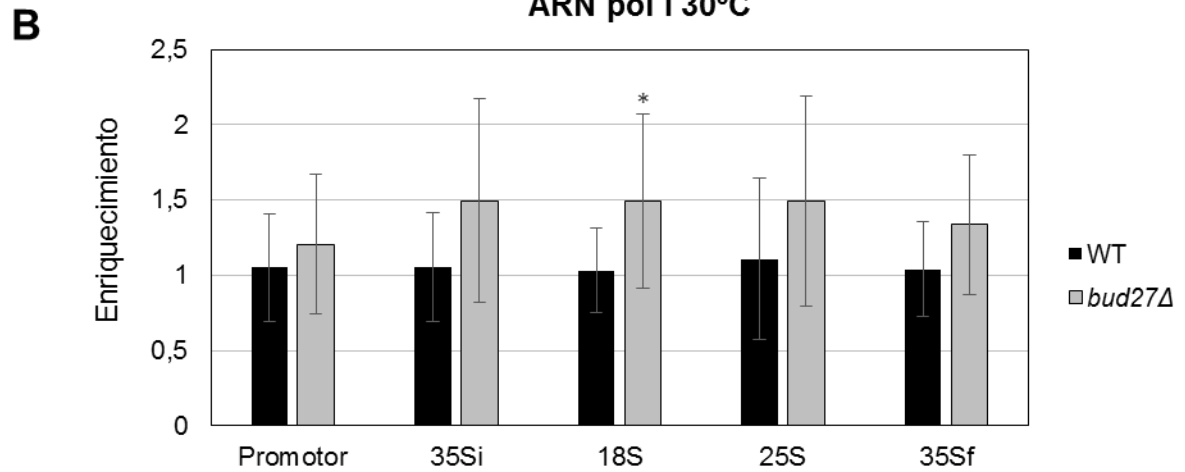
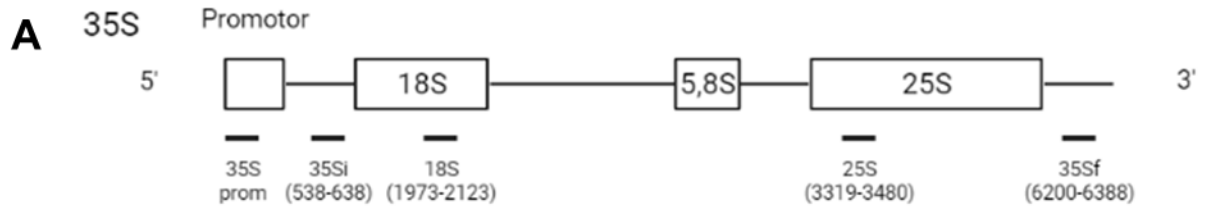
Por ello, es de interés profundizar en el papel de Bud27 sobre la transcripción de la ARN pol I. En primer lugar, decidimos analizar la ocupación de la ARN pol I en los genes de ADNr 35S en una cepa mutante *bud27Δ* mediante inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).

## Resultados. Capítulo I

Dado que se ha propuesto que el perfil transcripcional de un mutante *bud27Δ* es parcialmente similar al que se produce tras un bloqueo de la ruta TOR (Gstaiger et al., 2003; Martínez-Fernández et al., 2020), que se ha descrito que la inhibición de esta ruta conlleva una menor ocupación de la ARN pol I en los genes de ADNr 35S (Claypool et al., 2004; Torreira et al., 2017), y que la falta de Bud27 conlleva la deslocalización de la ARN pol I (Mirón-García et al., 2013), nuestra hipótesis inicial es que la falta de Bud27 provocaría una caída en la ocupación de la ARN pol I en los genes 35S.

Para contrastar nuestra hipótesis, se llevaron a cabo experimentos de ChIP en el mutante *bud27Δ* y la cepa silvestre, expresando el alelo funcional Rpb8-TAP desde su propio promotor y crecidas a temperatura permisiva. Se realizaron también experimentos de ChIP en condiciones similares tras un choque térmico de 12 horas a 37°C, debido a que los defectos en la síntesis y/o procesamiento de transcritos de la ARN pol I en el mutante *bud27Δ* se observaron a 37°C (Martínez-Fernández et al., 2020). Se analizaron diferentes regiones de la unidad transcripcional 35S con cebadores específicos, esquematizadas en la Figura R2 A. Cabe destacar que, aunque inmunoprecipitamos una subunidad común a las tres ARN polimerasas (Rpb8-TAP), dado que la fragmentación de la cromatina mediante sonicación genera fragmentos de en torno a 400 o 500 pares de bases, podemos asumir que los datos de enriquecimiento de las diferentes regiones de la unidad transcripcional 35S corresponden siempre a purificaciones de moléculas de ARN pol I. Los resultados de ChIP demuestran que a 30°C en el mutante *bud27Δ* hay mayor enriquecimiento de la ARN pol I en la zona promotora y a lo largo de toda la unidad transcripcional 35S, que es estadísticamente significativa en la zona del 18S (Figura R2 B). Esta mayor ocupación de la ARN pol I se observa en toda la unidad transcripcional 35S tras el choque térmico a 37°C (Figura R2 C). Aprovechando el uso de la subunidad común de las tres ARN polimerasas, Rpb8-TAP, y como control del experimento, se analizó la ocupación de la ARN pol II en la zona inicial y final del gen *PMA1*. El resultado demostró una menor ocupación de la ARN pol II en este gen en el mutante *bud27Δ* (Figura R2 D), tal y como se había descrito previamente (Mirón-García et al., 2014).

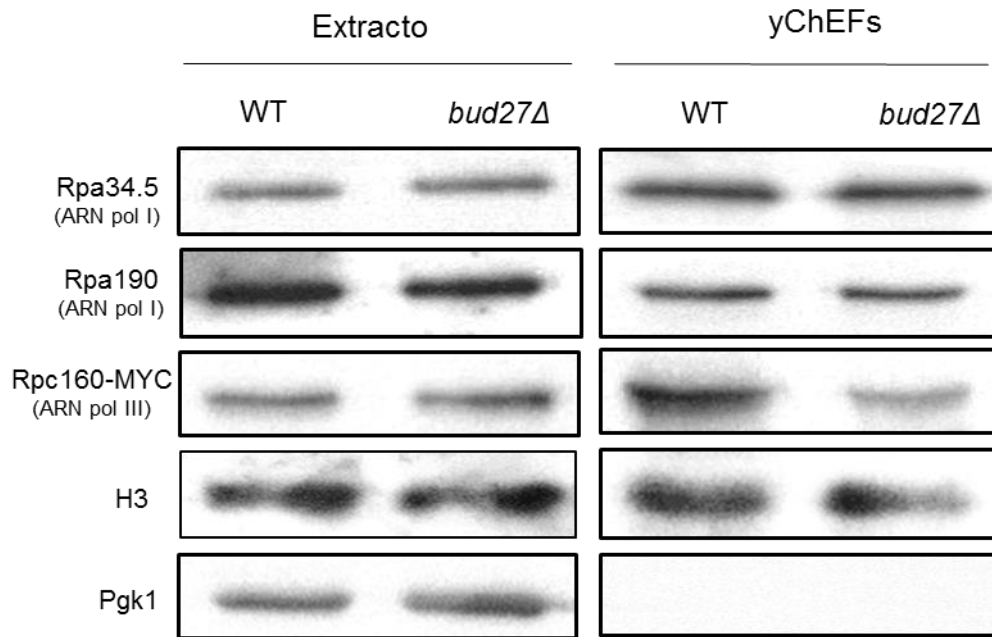
# Resultados. Capítulo I



**Figura R2. Análisis de la ocupación de la ARN pol I en la unidad transcripcional del gen de ADN<sub>r</sub> 35S mediante inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).** A) Esquema de la unidad transcripcional 35S y de los cebadores empleados en los experimentos de ChIP (para más detalles sobre los cebadores, ver Tabla MyM 3). B) Niveles de enriquecimiento de ARN pol I (Rpb8-TAP) asociada a cromatina en el mutante *bud27Δ* (YFN310) comparado con su cepa isogénica silvestre (WT; YFN311) en el gen 35S en condiciones de crecimiento permisivas (30°C). C) Niveles de enriquecimiento de ARN pol I asociada a cromatina en el mutante *bud27Δ* comparado con su cepa isogénica silvestre en el gen 35S tras un choque térmico a 37°C de 12 horas. D) Niveles de enriquecimiento de la ARN pol II asociada a cromatina en el mutante *bud27Δ* comparado con su cepa isogénica silvestre en el gen *PMA1*, utilizado como control del experimento. Los valores se presentan como la media de 3 réplicas independientes (para más detalles sobre el cálculo de los niveles de enriquecimiento, ver apartado 4.1.9. del Material y Métodos). Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas calculadas mediante la *t* de Student: (\*)  $P < 0,1$ , (\*\*)  $P < 0,05$ , (\*\*\*)  $P < 0,01$ .

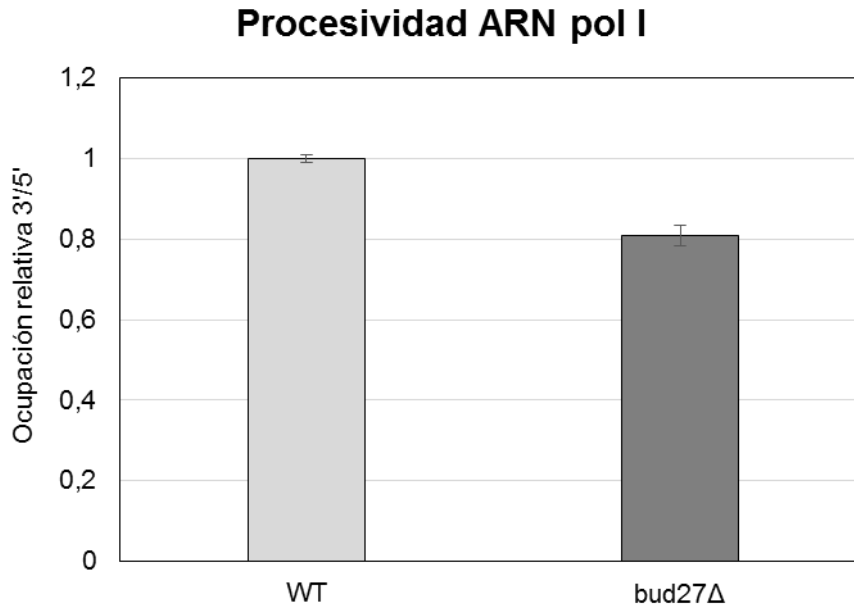
De manera contraria a lo que postulamos con nuestra hipótesis inicial, el resultado del experimento de ChIP no muestra una menor ocupación de la ARN pol I en la cromatina, sino un mayor enriquecimiento de ARN pol I asociada a lo largo del gen 35S en el mutante *bud27Δ*, más evidente a 37°C. Este resultado apunta a un papel específico de Bud27 en la transcripción de la ARN pol I, que parece ser independiente de los defectos causados por una inhibición parcial de la vía TOR (Claypool et al., 2004; Torreira et al., 2017) así como de los defectos de ensamblaje (Mirón-García et al., 2013). Curiosamente, los niveles relativos de ARN pol I decrecen en mayor medida en el mutante *bud27Δ* con respecto a la cepa silvestre desde la zona promotora hasta la zona final del gen, lo cual puede indicar defectos en la elongación de la transcripción de la ARN pol I en esta cepa.

Para confirmar los resultados obtenidos mediante ChIP, se realizó un experimento de yChEFs, que permite la obtención de fracciones enriquecidas de cromatina y el análisis de los niveles de proteínas asociadas a la cromatina mediante western blot (Cuevas-Bermúdez et al., 2019; Cuevas-Bermúdez et al., 2020). Los resultados de western blot, utilizando anticuerpos específicos frente a subunidades de la ARN pol I (Rpa34.5 y Rpa190) mostraron que la cantidad de estas proteínas asociadas a cromatina en el mutante *bud27Δ* era prácticamente idéntica a la del silvestre (Figura R3), tal y como se había observado en el experimento de ChIP (Figura R2 B). Puesto que las cepas utilizadas en este experimento contenían una versión funcional del alelo *Rpc160-MYC*, se analizó también la cantidad total de esta subunidad de la ARN pol III asociada a cromatina (resultados comentados en el apartado 2.1 dedicado a la ARN pol III).



**Figura R3. Análisis de las ARN pol I y III asociadas a la cromatina.** La cepa mutante *bud27Δ* (YFNOL1) y su isogónica silvestre (ISS2) se cultivaron en medio YPD a temperatura permisiva (30°C) y se recogieron en fase exponencial (D.O.<sub>600</sub>~0,7). Se obtuvieron fracciones cromatínicas mediante el procedimiento de yChEFs (Cuevas-Bermúdez et al., 2019) y se analizaron las proteínas Rpa34.5, Rpa190 para la ARN pol I y Rpc160 (Rpc160-MYC) para la ARN pol III, así como el control de cromatina H3 y el control de citoplasma, Pgk1, mediante SDS-PAGE y western blot.

Para intentar elucidar si hay defectos en la elongación de la transcripción de la ARN pol I en el mutante *bud27Δ*, se calculó la procesividad de la enzima usando los datos de CHIP del experimento anterior. Según se ha descrito por (Schneider et al., 2007), se puede comparar el reclutamiento de la ARN pol I entre la zona inicial y final del gen 35S para estimar su procesividad relativa. Esta se calcula como el ratio del valor de enriquecimiento entre la zona final del gen y la zona inicial. Concretamente, el cálculo de la procesividad de la ARN pol I en este trabajo se hizo a partir de los datos de ocupación de la enzima en la zona 35Sf (6200-6388) y la zona 35Si (538-638) (ver Figura R2 A). Como se puede ver en la Figura R4 la procesividad relativa de la ARN pol I del mutante *bud27Δ* es aproximadamente un 20% menor a la de la cepa silvestre.



**Figura R4. Estimación de la procesividad de la ARN pol I en el mutante *bud27Δ* comparado con su cepa isogénica silvestre.** La procesividad relativa se estimó en base al método descrito previamente (Schneider et al., 2007), que consiste en dividir el valor de enriquecimiento de la ARN pol I en la zona final del gen 35S respecto a la zona inicial (35Sf/35Si). Se usaron los valores de los experimentos representados en la Figura R2.

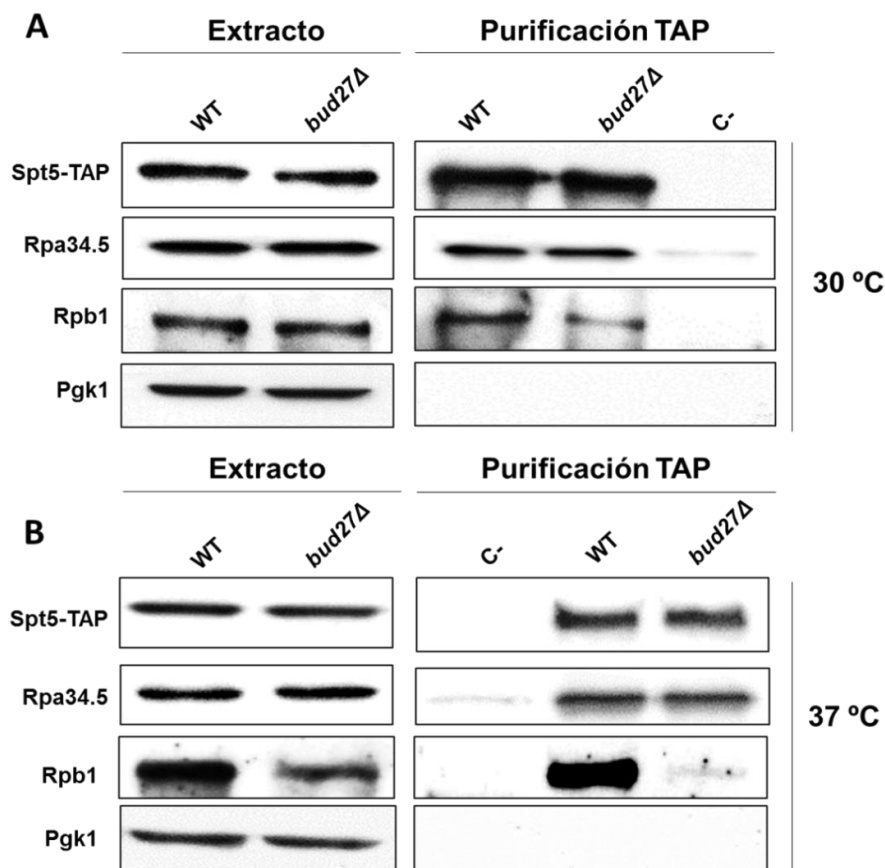
El hecho de que los resultados sugieren que la procesividad de la ARN pol I está afectada, refuerza la idea de que la falta de Bud27 podría conllevar una alteración en la elongación de la transcripción. Con el fin de intentar ahondar en el papel específico de Bud27 en la transcripción mediada por la ARN pol I, decidimos analizar la interacción entre el factor de transcripción Spt5 y la ARN pol I.

### 1.2. Análisis de la interacción entre Spt5 y la ARN pol I en el mutante *bud27Δ*

Spt5 interacciona físicamente con Spt4 formando el complejo activo Spt4/5, que actúa como un factor de elongación en la transcripción mediada por la ARN pol I y II (Hartzog and Fu, 2013; Viktorovskaya et al., 2011). Las cepas con el alelo *spt4Δ* o mutantes puntuales del gen *SPT5* tienen afectada la síntesis y procesamiento de los ARNr (Schneider et al., 2006; Viktorovskaya et al., 2011). Además, se ha descrito una interacción directa de Spt5 con la ARN pol I para promover la transcripción (Schneider et al., 2006). Con el fin de investigar si la falta de Bud27 provoca defectos en la asociación Spt5-ARN pol I, se decidió analizar la interacción física mediante copurificación TAP entre Spt5 (Spt5-TAP) y la ARN pol I en cepas *bud27Δ* y en su cepa isogénica silvestre. Para ello, se crecieron las cepas mutante *bud27Δ* (YFN316) y su isogénica silvestre (YFN317), expresando ambas un alelo funcional de Spt5-TAP en medio YPD a temperatura permisiva (30°C) o bien tras un choque térmico a 37°C durante 12 horas.

## Resultados. Capítulo I

Como se puede observar en la Figura R5, no hubo una alteración significativa en la asociación entre Spt5 y las dos proteínas de la ARN pol I analizadas (Rpa190 y Rpa34.5) en el mutante *bud27Δ* con respecto a la cepa silvestre, ni a 30 ni a 37°C. Curiosamente, la delección de *BUD27* sí provocó un defecto de asociación entre Spt5 y la subunidad mayor de la ARN pol II a 30°C (Figura R5 A), más acusada en células crecidas a 37°C (Figura R5 B), en consonancia con lo descrito previamente por el grupo del Dr. Navarro, donde se observaron defectos en la elongación de la transcripción de la ARN pol II (Mirón-García et al., 2014).

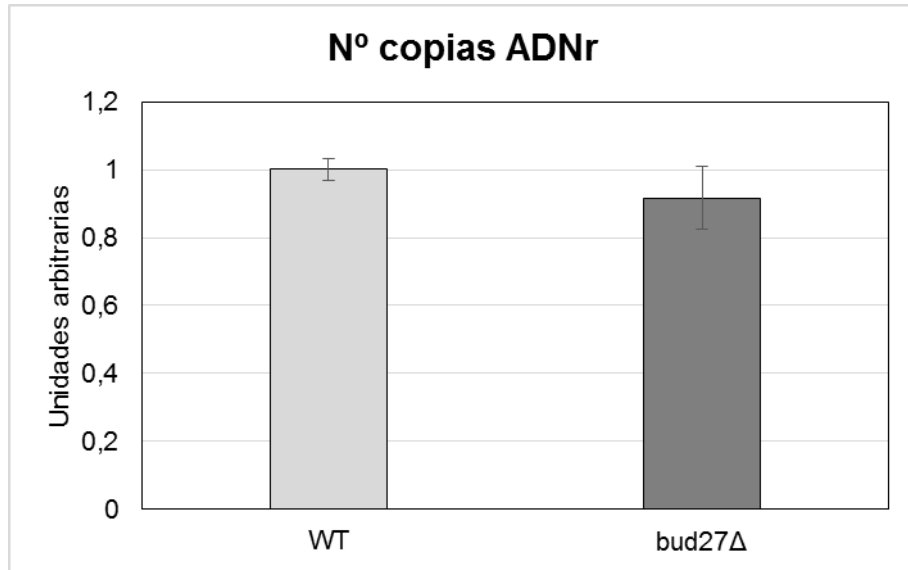


**Figura R5. Análisis de la interacción entre Spt5 y las ARN pol I y II.** A) 2 mg de proteína de la cepa mutante *bud27Δ* (YFN316) y su cepa isogénica silvestre (YFN317) cultivadas en medio YPD a 30°C hasta alcanzar la fase exponencial (D.O.<sub>600</sub>~0,7) se utilizaron para la purificación TAP (Spt5-TAP) y el resultado se analizó mediante western blot, usándose los anticuerpos anti-PAP (Spt5), anti-Rpa34.5 (ARN pol I), anti-Rpb1 (ARN pol II) y anti-Pgk1 como control. B) Experimento similar al anterior tras un choque térmico a 37°C durante 12 horas.

Estos resultados indican que Bud27 participa en la transcripción mediada por la ARN pol I a través de un mecanismo que podría ser diferente al de la ARN pol II. Con el objetivo de intentar profundizar en el mecanismo mediante el cual Bud27 podría influenciar la transcripción de la ARN pol I, decidimos analizar el impacto en el crecimiento causado por la variación del número de copias del ADNr 35S tras la delección de *BUD27*.

### 1.3. Análisis del número de copias del gen ADNr 35S en el mutante *bud27Δ*

Los experimentos de *northern blot* y pulso caza del grupo del Dr. Navarro demuestran que la falta de Bud27 conlleva una menor transcripción del ADNr (Martínez-Fernández et al., 2020). Sin embargo, los experimentos de ChIP mostrados en el apartado 1.1 del presente capítulo sugieren que hay una mayor cantidad relativa de ARN pol I en el ADNr en células carentes de Bud27. Planteamos una posibilidad que podría explicar este hecho: puede ocurrir que el mutante *bud27Δ* tenga un menor número de copias activas del gen 35S con mayor cantidad de moléculas de ARN pol I (con menor procesividad) por cada unidad transcripcional. Como paso previo para intentar responder esta disyuntiva, se estimó el número de copias del gen 35S en la cepa silvestre y en el mutante *bud27Δ* mediante qPCR, con una pareja de cebadores que amplifican la región 18S del ADNr. Para ello, se utilizaron los datos de los extractos (INPUTs) del experimento de ChIP del apartado 1.1 y los niveles del amplicón 18S se relativizaron frente a los niveles de una región intergénica del cromosoma V. Como se puede ver en la Figura R6, no se observaron diferencias significativas en la cantidad de copias del gen 35S entre el silvestre y el mutante *bud27Δ*.

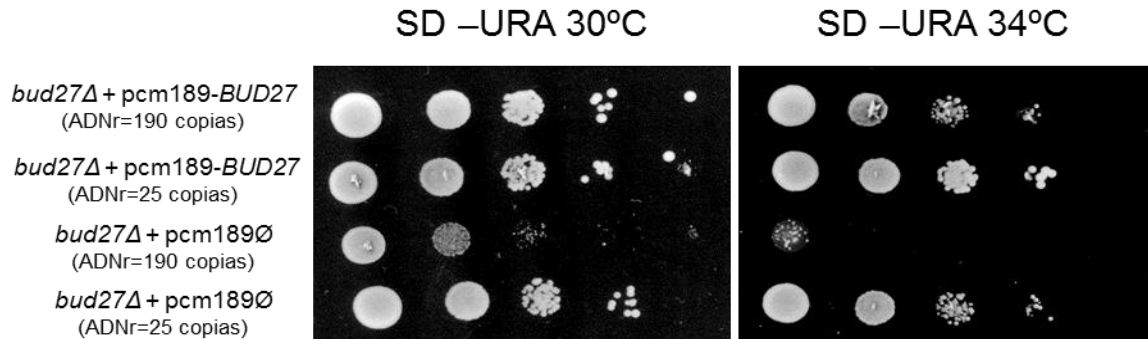


**Figura R6. Estimación del número de copias del gen 35S.** Los niveles de acumulación del amplicón 18S, obtenidos en las muestras de extractos (INPUTs) del experimento de ChIP (ver subapartado 1.1 de este capítulo), se relativizaron frente a los niveles de una región intergénica del cromosoma V. Los valores corresponden a la media y desviación típica de tres réplicas técnicas a partir de tres réplicas biológicas independientes.

Para intentar darle una explicación al mayor número de moléculas de ARN pol I en la cromatina del mutante *bud27Δ*, se decidió analizar el crecimiento de cepas con alto y bajo número de copias de ADNr (Cioci et al., 2003) tras la delección de *BUD27*. Se ha estimado que el número habitual de copias del gen 35S es de unas 150, de las cuales aproximadamente la mitad son transcripcionalmente activas (Cioci et al., 2003). El número de unidades transcripcionales del gen 35S se puede reducir hasta un mínimo de 25, aproximadamente, sin que esto afecte sustancialmente el crecimiento de las cepas (Cioci et al., 2003). La viabilidad de las cepas con bajo número de copias de ADNr se mantiene gracias a que hay una mayor cantidad de moléculas de ARN pol I por unidad transcripcional (French et al., 2003). Para el estudio a realizar, se delecionó el gen *BUD27* en una cepa con alto número de copias (ADNr  $\approx$  190 copias) y en una cepa con bajo número de copias (ADNr  $\approx$  25 copias). A continuación, las cepas construidas se transformaron con el plásmido centromérico pcm189-*BUD27* para obtener el silvestre, o con el plásmido vacío pCM189 $\emptyset$  (vacío) y se analizó el crecimiento de estas cepas a distintas temperaturas.

Tal y como puede observarse en la Figura R7, el crecimiento de la cepa mutante *bud27Δ* estaba muy afectado cuando contenía alto número de copias de ADNr, incluso a la temperatura permisiva de 30°C. Este fenotipo no se observaba en la misma cepa conteniendo el plásmido con *BUD27* (silvestre). Sorprendentemente, la delección de *BUD27* no alteró el crecimiento de la cepa con bajo número de copias de ADNr a 30°C, y tan solo levemente a 34°C, si se compara con su silvestre. Por tanto, se deduce que la reducción del número de

copias de ADNr parece favorecer el crecimiento del mutante *bud27Δ*, incluso a temperatura restrictiva.



**Figura R7. Estudio del crecimiento de las cepas mutantes *bud27Δ* con alto (yFGS3) y bajo (yFGS4) número de copias del gen ADNr 35S.** Las cepas yFGS3 e yFGS4 se transformaron con el plásmido centromérico vacío pCM189Ø o con el mismo plásmido expresando *BUD27* (pcm189-BUD27). El crecimiento se analizó mediante diluciones seriadas en medio SD (suplementado con los requerimientos para mantener los plásmidos) a 30 y 34°C.

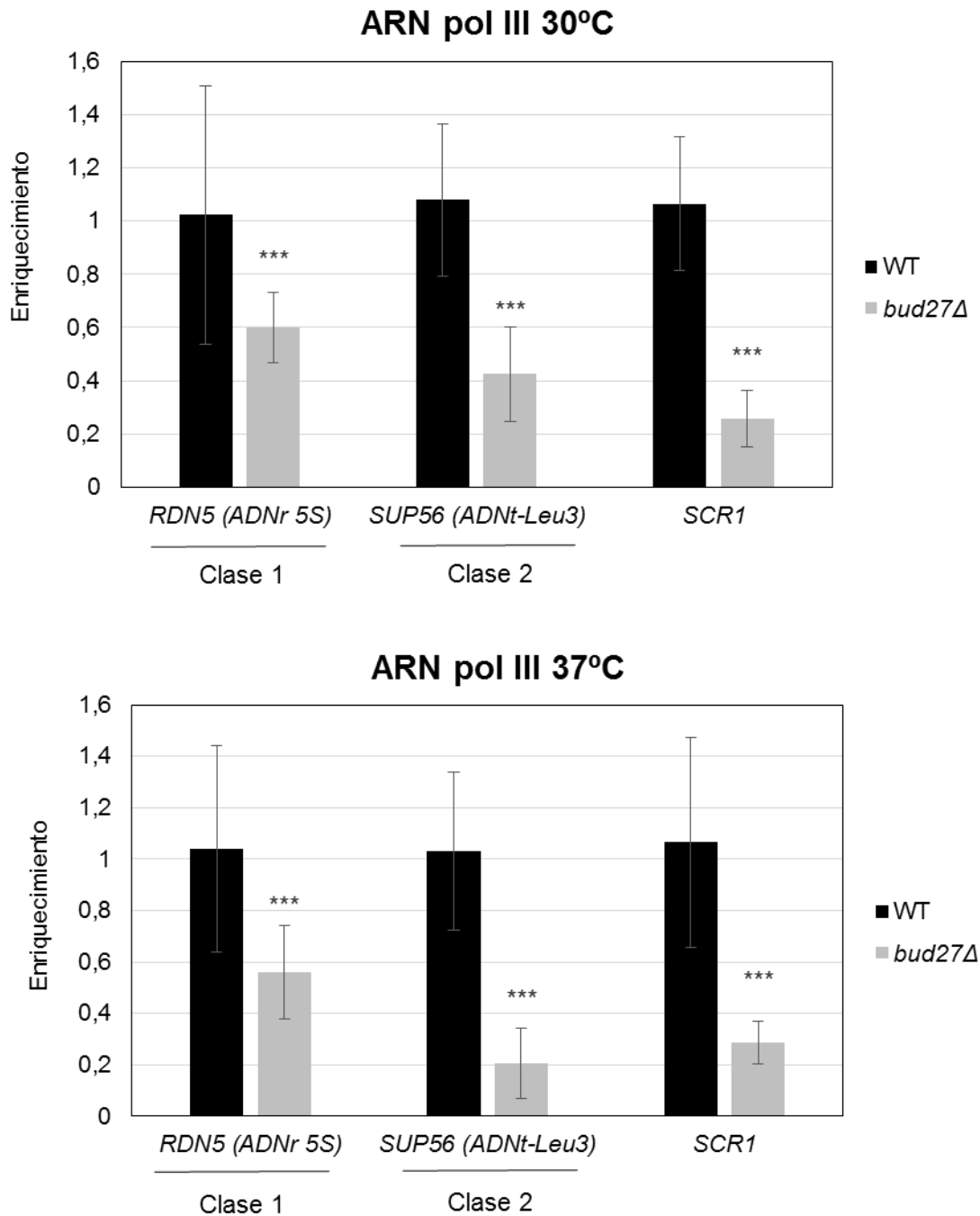
Este resultado sugiere que un mayor número de copias de ADNr, al conllevar más copias activas, afecta gravemente al crecimiento del mutante *bud27Δ*, mientras que reducir el número hasta 25 mejora su crecimiento. Probablemente, la reducción de copias de ADNr 35S favorezca un entorno cromatínico en el que las ARN polimerasas I del mutante *bud27Δ*, con una procesividad relativa más baja, puedan distribuirse y “concentrarse” entre menos copias. Aumentar el número de copias hasta 190 hace que las moléculas de ARN pol I del mutante *bud27Δ* se tenga que dispersar entre mayor número de copias. No obstante, se necesitan nuevos experimentos que permitan seguir profundizando en el papel específico de Bud27 durante el proceso transcripcional mediado por la ARN poli I y así, confirmar o desmentir las hipótesis planteadas.

Con el objetivo de continuar profundizando en la influencia de Bud27 sobre la transcripción de las tres ARN polimerasas y establecer su posible papel como coordinador de las mismas, decidimos estudiar el impacto causado por la falta de Bud27 en la transcripción mediada por la ARN pol III.

### 2. Influencia de Bud27 en la transcripción mediada por la ARN pol III

Los experimentos de *northern blot* del grupo del Dr. Navarro muestran que en el mutante *bud27Δ* hay una menor cantidad de algunos ARNt inmaduros (pre-ARNt) y maduros (Martínez-Fernández et al., 2020). Además, los experimentos de pulso-caza también demuestran que hay un defecto en la neosíntesis de los transcritos producidos por la ARN pol III (Martínez-Fernández et al., 2020). Previamente, otros autores han demostrado que la falta de Bud27 conlleva una menor síntesis de ciertos transcritos de la ARN pol III como *RPR1*, *SCR1* y *SNR6* (Vernekar and Bhargava, 2015) así como de ARNts (Gstaiger et al., 2003; Vernekar and Bhargava, 2015).

Para profundizar en el papel de Bud27 en la actividad de la ARN pol III, se decidió investigar mediante CHIP el reclutamiento de la enzima en los tres tipos diferentes de genes (tipo 1, 2 y 3), en las cepas usadas anteriormente conteniendo la subunidad Rpb8 etiquetada con TAP (Rpb8-TAP). Para ello, se cultivó el mutante *bud27Δ* y la cepa isogénica silvestre en medio rico YPD a 30°C o tras un choque térmico de 12 horas a 37°C, ya que al igual que lo que ocurre con lo descrito para la ARN pol I, algunos de los defectos transcripcionales de la ARN pol III en el mutante *bud27Δ* se observan de forma más evidente a 37°C (Martínez-Fernández et al., 2020). Los experimentos de CHIP demostraron que la ocupación de la ARN pol III en todos los tipos de genes, *RDN5* (tipo 1), *SUP56* (tL(CAA)A) (tipo 2), y *SCR1* (tipo 3) fue mucho menor en el mutante *bud27Δ* que en la cepa silvestre, siendo algo más acusado tras el choque térmico a 37°C (Figura R8). Este resultado corrobora lo descrito previamente por otros autores (Vernekar and Bhargava, 2015), demostrando que la falta de Bud27 provocaba una menor asociación de la ARN pol III con sus genes diana. Además, los resultados de CHIP también van en consonancia con los resultados de los experimentos de yChEFs de este trabajo, donde se observó a temperatura permisiva (30°C) una menor cantidad total de Rpc160 asociada a cromatina en el mutante *bud27Δ* (apartado 1.1, Figura R3).



**Figura R8. Análisis de la ocupación de la ARN pol III en los genes *RDN5* (tipo 1), *SUP56* (tL(CAA)A) (tipo 2), y *SCR1*.** Los niveles de enriquecimiento de ARN pol III (Rpb8-TAP) asociada a cromatina en el mutante *bud27Δ* (YFN310) comparado con su cepa isogénica silvestre (WT; YFN311) se midieron mediante qPCR con cebadores específicos para tres clases diferentes de genes (*RDN5*, *SUP56* y *SCR1*), en condiciones de crecimiento permisivas (30°C) o tras un choque térmico a 37°C durante 12 h. Los valores se presentan como la media de 3 réplicas independientes (para más detalles sobre el cálculo de los niveles de enriquecimiento, ver apartado 4.1.9. del Material y Métodos). Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas calculadas mediante la *t* de Student: (\*)  $P < 0,1$ , (\*\*)  $P < 0,05$ , (\*\*\*)  $P < 0,01$ .

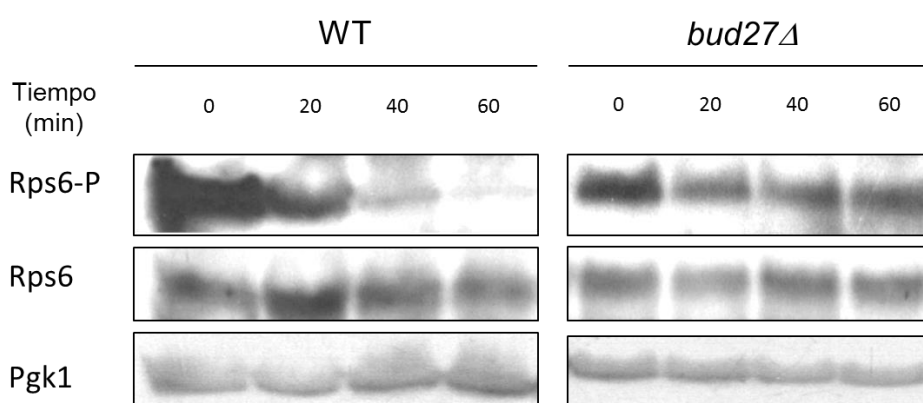
Este menor reclutamiento de la ARN pol III a los genes en el mutante *bud27Δ* puede deberse, al menos en parte, al defecto en el ensamblaje de la ARN pol III, tal y como se ha propuesto anteriormente por nosotros y otros autores (Mirón-García et al., 2013; Vernekar and Bhargava, 2015). Sin embargo, la sobreexpresión de *RPB5* corrige el defecto de ensamblaje de la ARN pol III en el mutante *bud27Δ* tanto a 30°C (Mirón-García et al., 2013) como a 37°C (Figura R1 A), y sin embargo no corrige totalmente los defectos transcripcionales ni a 30 ni a 37°C (Martínez-Fernández, 2016). Del mismo modo, tampoco se corrige la sensibilidad de la cepa mutante *bud27Δ* al ácido micofenólico (Figura R1 B). Este hecho sugiere que Bud27 podría tener un papel importante en la transcripción mediada por la ARN pol III más allá del papel que pueda tener en su ensamblaje.

### **3. Integración de la función de Bud27 con la ruta TOR mediante el estudio del estado de fosforilación de la proteína ribosómica Rps6**

En el presente capítulo, se ha mostrado que la falta de Bud27 produce defectos transcripcionales de las ARN pol I y III. Además, recientemente, el grupo del Dr. Navarro ha demostrado que la falta de Bud27 conlleva un menor reclutamiento de la ARN pol II en algunos genes de proteínas ribosómicas y de otros factores necesarios para la biosíntesis de ribosomas (*RiBis*) (Martínez-Fernández et al., 2020). Teniendo en cuenta que en *S. cerevisiae* hasta el 80% del total de la transcripción se destina a la producción de componentes para la biogénesis de ribosomas (Xiao and Grove, 2009), la consecuencia más inmediata del defecto transcripcional en las células *bud27Δ* es una menor disponibilidad de transcritos para esta función. Se ha propuesto que existe una coordinación entre la transcripción de las tres ARN polimerasas eucariotas y la ruta TOR (Boguta, 2009; Lempiäinen and Shore, 2009; Martin and Hall, 2005; Martin et al., 2006; Mayer and Grummt, 2006). De igual modo, se ha vinculado de forma directa la disponibilidad de nutrientes con la ruta TOR y la biogénesis de ribosomas (Mayer and Grummt, 2006; Schmelzle and Hall, 2000). Puesto que Bud27 se ha propuesto como un posible elemento dentro de la vía TOR (Gstaiger et al., 2003; Martínez-Fernández et al., 2020), decidimos comprobar si la influencia que ejerce sobre la transcripción de las tres ARN polimerasas y, consecuentemente, sobre la biogénesis de ribosomas, se debe, al menos parcialmente, a su papel como un factor dentro de esta ruta. Para ello, se analizó la fosforilación de la proteína ribosómica Rps6, que depende directamente de la actividad de la ruta TOR, necesaria para el crecimiento celular en *S. cerevisiae* (González et al., 2015), así como para la activación de genes requeridos para la biogénesis de ribosomas en mamíferos (Chauvin et al., 2014). En *S. cerevisiae*, Rps6 se fosforila en dos residuos (Ser232 y Ser233) por la kinasa Ypk3 cuando hay disponibilidad de nutrientes en un proceso que está bajo control directo de la vía TOR (González et al., 2015). En condiciones de bloqueo de ruta TOR, como

## Resultados. Capítulo I

la adición de rapamicina al medio o la carencia de nutrientes, Rps6 se desfosforila rápidamente (González et al., 2015). Por ello, el análisis de la fosforilación de Rps6 se ha considerado como una forma fiable de evaluar la actividad de la ruta TOR. Para analizar el impacto de la falta de Bud27 sobre la actividad kinasa de TOR, se cultivaron la cepa mutante *bud27Δ* (YFN683) y su isogénica silvestre (BY4741) en medio rico YPD y se recogieron alícuotas a diferentes tiempos (20, 40, y 60 minutos) tras la adición de rapamicina. Usando anticuerpos específicos frente a la proteína total Rps6 y su forma fosforilada (Rps6-P), mediante western blot, demostramos que antes de comenzar el tratamiento de rapamicina (Tiempo=0), la cantidad de Rps6-P era menor en el mutante *bud27Δ* que en la cepa silvestre (Figura R9). Este resultado indica que la actividad de la vía de señalización TOR, que es la que mantiene la fosforilación de Rps6, es menor cuando falta Bud27. Por otra parte, el tratamiento con rapamicina produjo la casi total desfosforilación de Rps6 tras 60 minutos de tratamiento en la cepa silvestre (Figura R9). Sin embargo, en el mutante *bud27Δ* esta desfosforilación de Rps6 se produjo de una forma mucho más lenta, puesto que seguía observándose Rps6 fosforilado incluso después de 60 minutos de tratamiento (Figura R9). Este resultado indica que también hay una alteración en el proceso de inhibición de la vía TOR en el mutante *bud27Δ*. En su conjunto, estos datos sugieren que Bud27 es una proteína fundamental tanto para la correcta actividad de la vía TOR en condiciones óptimas de crecimiento, como para su inhibición tras una situación de estrés. Este hecho puede sugerir que Bud27 podría modular la actividad de las 3 ARN polimerasas y la biogénesis de ribosomas, al menos parcialmente, a través de la ruta TOR.



**Figura R9. Análisis de la cinética de desfosforilación de Rps6 tras el tratamiento con rapamicina.** A) Extractos de proteínas con TCA de la cepa mutante *bud27Δ* y su isogénica silvestre (WT) a tiempo inicial y tras el tratamiento con rapamicina (0,4 µg/ml, 20, 40 y 60 minutos) se analizaron por western blot usando los anticuerpos anti-Rps6-P, anti-Rps6 y anti-Pgk1.

## **Resultados. Capítulo I**

Los resultados mostrados en este capítulo y los previamente publicados por el grupo del Dr. Navarro (Martínez-Fernández et al., 2020; Mirón-García et al., 2014) y otros autores (Gstaiger et al., 2003; Vernekar and Bhargava, 2015), demuestran que Bud27 participa en la transcripción de las 3 ARN polimerasas en *S. cerevisiae* y, quizás, en otros organismos. De esta manera, Bud27 podría interconectar las actividades de las tres enzimas, probablemente actuando a través de la ruta TOR. Nuestros resultados sugieren, además, que los mecanismos mediante los cuales Bud27 actúa sobre la actividad de cada una de las enzimas podrían comportar componentes diferentes. La influencia de Bud27 sobre la ARN pol II ha sido estudiada (Mirón-García et al., 2014) y sobre la ARN pol III es el objeto de los siguientes capítulos de esta tesis. Finalmente, el papel de Bud27 sobre la ARN pol I se está abordando en el grupo de investigación.



## **Resultados. Capítulo II**





### **Capítulo II Estudio de la interconexión entre la *prefoldin-like* Bud27, el represor transcripcional Maf1 y la ruta TOR**

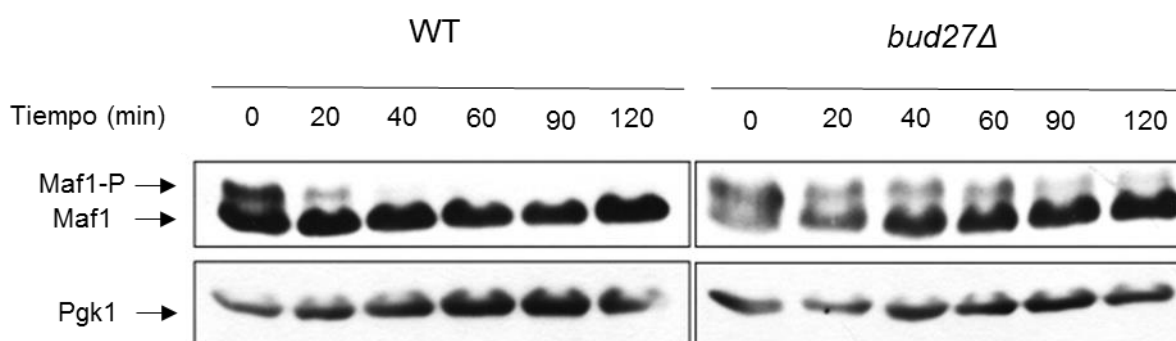
#### **0. Antecedentes**

Los resultados presentados en el capítulo I de este trabajo muestran que Bud27 modula, directa o indirectamente, la transcripción mediada por la ARN polimerasa III. Nosotros y otros autores hemos demostrado que la falta de Bud27 provoca una disminución en la acumulación de algunos transcritos de la ARN pol III (Martínez-Fernández et al., 2020; Vernekar and Bhargava, 2015). Dado que se ha propuesto que Bud27 podría ser un elemento importante en la modulación de la actividad de la ruta TOR (Gstaiger et al., 2003; Martínez-Fernández et al., 2020) y que su falta provoca defectos transcripcionales de la ARN pol III (Martínez-Fernández et al., 2020; Vernekar and Bhargava, 2015), al menos parcialmente independientes del ensamblaje de la enzima (Figura R1 B) (Martínez-Fernández, 2016), nuestra hipótesis de trabajo es que Bud27 podría estar influenciando la actividad de la ARN pol III a través de elementos reguladores. Entre estos elementos está Maf1, un regulador negativo general conservado desde levaduras hasta humanos (Pluta et al., 2001; Reina et al., 2006). En respuesta a diferentes tipos de estrés, Maf1 se desfosforila y es transportado al núcleo donde inhibe la transcripción de la ARN pol III interaccionando físicamente con ella y con subunidades del factor de transcripción TFIIB (Desai et al., 2005; Oficjalska-Pham et al., 2006; Pluta et al., 2001; Upadhya et al., 2002). Aunque el control del estado de fosforilación y la actividad de Maf1 puede implicar a diversas rutas de señalización (Upadhya et al., 2002), se ha demostrado que las kinasas y fosfatasas de la vía TOR son los que tienen una función predominante en este proceso (Oficjalska-Pham et al., 2006; Oler and Cairns, 2012; Roberts et al., 2006; Wei et al., 2009). En base a ello, en el presente capítulo abordamos el posible papel de Bud27 sobre la regulación de Maf1 en el control de la actividad de la ARN pol III.

### 1. Estudio de la influencia de Bud27 sobre la fosforilación y entrada al núcleo del represor de la ARN polimerasa III, Maf1

#### 1.1. Análisis del patrón de fosforilación y del proceso de desfosforilación de Maf1

La inhibición de la ruta de señalización TOR, que simula una situación de carencia de nutrientes, conlleva que el represor Maf1 se desfosfore en el citoplasma, pasando a su forma activa, lo que permite su entrada al núcleo, su interacción física con la ARN pol III y la represión de su actividad (Boguta, 2013; Willis et al., 2004). Dado que la falta de Bud27 mimetiza parcialmente la inhibición de la ruta TOR (Gstaiger et al., 2003; Martínez-Fernández et al., 2020), quisimos estudiar la influencia de esta proteína en la fosforilación de Maf1, su entrada al núcleo y su represión sobre la actividad de la ARN pol III. Para ello analizamos el estado de fosforilación de Maf1 en una cepa silvestre y en una cepa mutante *bud27Δ*, así como el patrón de desfosforilación tras la inhibición de la ruta TOR mediante rapamicina. Se recogieron alícuotas de ambas cepas a tiempo inicial (tiempo=0) y tras un tratamiento con rapamicina (20, 40, 60 y 120 minutos) y usando un anticuerpo específico para la proteína Maf1, se determinó su estado de fosforilación. El análisis de Maf1 por western blot revela claramente dos formas de la proteína durante la fase exponencial de crecimiento (Figura R10): la banda superior, correspondiente a la forma fosforilada e inactiva y la banda inferior, correspondiente a la forma desfosforilada y activa (representadas respectivamente como Maf1-P y Maf1 en la Figura R10). Además, se observó un ligero incremento de la forma fosforilada de Maf1 frente a la no fosforilada en el mutante *bud27Δ* con respecto a la cepa silvestre antes de comenzar el tratamiento (tiempo=0). Por otro lado, el análisis de la desfosforilación de Maf1 sugiere una ralentización en la velocidad de la cinética en la cepa mutante *bud27Δ* con respecto a la cepa isogénica silvestre durante el tratamiento con rapamicina.

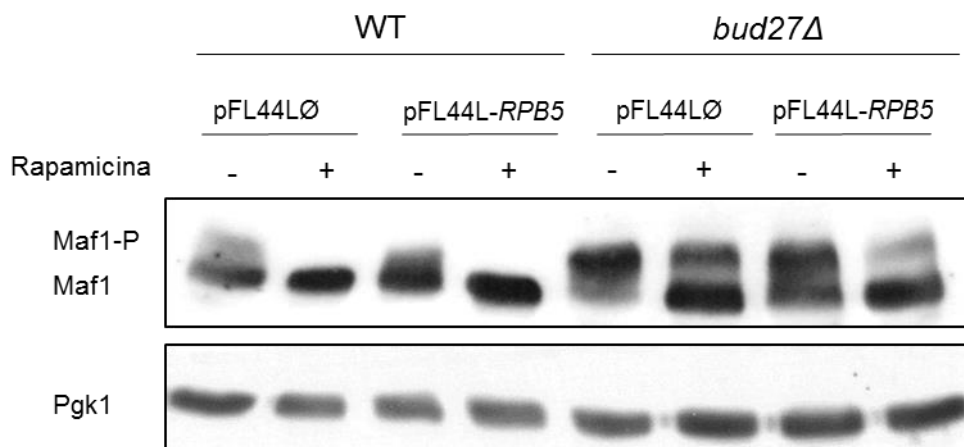


**Figura R10. Análisis de la desfosforilación de Maf1.** Extractos de proteínas (con TCA) de la cepa mutante *bud27Δ* (YFN105) y su isogénica silvestre (WT; BY4741) crecidas en medio YPD a 30°C, en fase exponencial (D.O.<sub>600</sub>~0,7), a tiempo inicial y tras el tratamiento con rapamicina (0,4 µg/ml) durante 20, 40, 60, 90 y 120 minutos fueron analizados mediante western blot usando los anticuerpos anti-Maf1 y anti-Pgk1. Las flechas señalan las formas fosforilada (superior) y desfosforilada (inferior) de Maf1.

## Resultados. Capítulo II

Nuestra hipótesis inicial de trabajo implicaba que los defectos transcripcionales de la ARN pol III provocados por la falta de Bud27 podrían estar causados por una mayor represión por parte de Maf1. Sin embargo, los resultados del experimento anterior sugieren lo contrario, ya que la falta de Bud27 conlleva una mayor proporción de la forma fosforilada (inactiva) de Maf1, tanto antes como después del tratamiento con rapamicina, con respecto a la forma desfosforilada. Por otra parte y de manera interesante, estos resultados sugieren que la carencia de Bud27 podría estar alterando la desfosforilación de Maf1 debido a una represión más lenta de la ruta TOR, o por una alteración en la actividad de la/las fosfatasa que actúan sobre Maf1.

Puesto que el mutante *bud27Δ* tiene defectos en el ensamblaje de las tres ARN polimerasas (Mirón-García et al., 2013), decidimos estudiar si el defecto en la cinética de desfosforilación de Maf1 era dependiente del defecto de ensamblaje de las ARN polimerasas. Para ello, se sobreexpresó *RPB5* en una cepa *bud27Δ* y su cepa isogénica silvestre (WT) para corregir el defecto de ensamblaje de las ARN polimerasas provocado por la falta de Bud27, tal y como se ha descrito previamente (Martínez-Fernández et al., 2020; Mirón-García et al., 2013). El análisis mediante western blot del patrón de desfosforilación de Maf1, tanto en condiciones de crecimiento exponencial como tras un tratamiento con rapamicina, demostró que la sobreexpresión de *RPB5* en la cepa silvestre no tuvo ningún efecto en la desfosforilación de Maf1 con respecto a la cepa silvestre y no corrigió el defecto de desfosforilación de Maf1 en la cepa mutante *bud27Δ* (Figura R11).

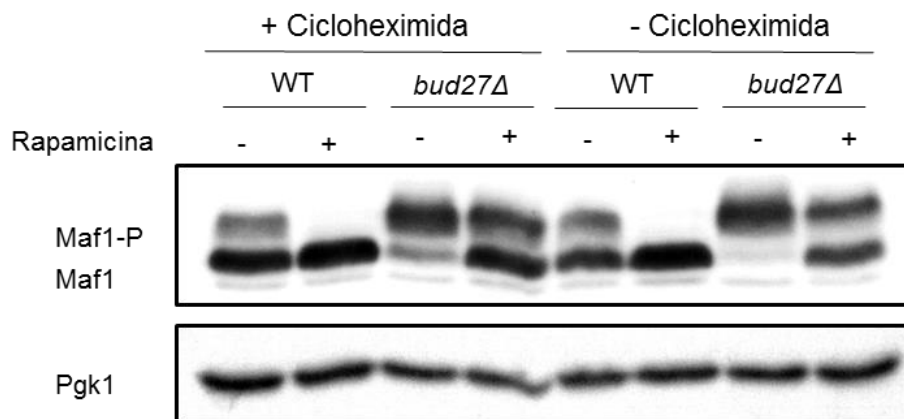


**Figura R11. Análisis de la desfosforilación de Maf1, en sobreexpresión de *RPB5*.** Extractos de las cepas silvestre WT; (BY4741) y *bud27Δ* (YFN683) transformadas con el plásmido vacío pFL44L (pFL44LØ) y con el mismo plásmido que permite sobreexpresar *RPB5* (pFL44L-*RPB5*), crecidas a 30°C en SD (suplementado con los requerimientos necesarios) hasta la fase exponencial (D.O.<sub>600</sub>~0,7) y tras el tratamiento con rapamicina (0,4 µg/ml, 1 hora). Las proteínas extraídas con TCA fueron analizadas por western blot usando los anticuerpos anti-Maf1 y anti-Pgk1.

## Resultados. Capítulo II

Los resultados muestran que el defecto en la desfosforilación de Maf1 causado por la falta de Bud27 no es una consecuencia indirecta de los defectos en ensamblaje de las ARN polimerasas.

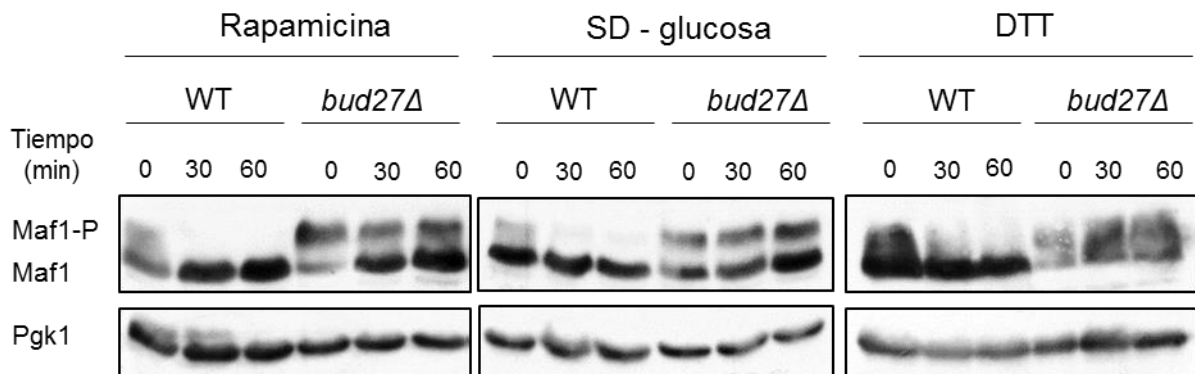
Por otra parte, se ha descrito que tras el tratamiento con rapamicina se produce una síntesis *de novo* de Maf1 (Oficjalska-Pham et al., 2006). Para analizar si se produce una acumulación de Maf1 neo-sintetizado tras el tratamiento con rapamicina en el mutante *bud27Δ*, decidimos inhibir la síntesis proteica con cicloheximida. La cicloheximida es una droga que bloquea la actividad peptidil transferasa de la subunidad mayor del ribosoma (Siegel and Sisler, 1964) y que ha sido utilizada previamente para bloquear la síntesis *de novo* de Maf1 (Oficjalska-Pham et al., 2006). Al igual que en el experimento anterior, se analizó mediante western blot el patrón de desfosforilación de Maf1 en el mutante *bud27Δ* y en su cepa isogénica silvestre, tanto en condiciones de crecimiento exponencial como tras una inhibición de la vía TOR con rapamicina, habiendo bloqueado previamente (o no) la síntesis proteica con cicloheximida. Los resultados de la Figura R12 muestran que no hay diferencias importantes en la cantidad total de Maf1, ni en su patrón de fosforilación, ni en el mutante *bud27Δ* ni en la cepa silvestre, independientemente de la presencia o no de cicloheximida en el medio.



**Figura R12. La adición de cicloheximida no altera el patrón de fosforilación de Maf1.** Extractos de las cepas silvestre (BY4741) y *bud27Δ* (YFN683), crecidas en medio YPD a 30°C hasta alcanzar la fase exponencial (D.O.<sub>600</sub>~0,7) fueron tratadas o no, según se indica, con cicloheximida (10 µg/ml, 10 minutos) para inhibir la traducción y a continuación con rapamicina (0,4 µg/ml, 1 hora). Las proteínas extraídas con TCA fueron analizadas por western blot usando los anticuerpos anti-Maf1 y anti-Pgk1.

## Resultados. Capítulo II

Maf1 es un regulador negativo de la ARN pol III, actuando como un último efector que integra las señales procedentes de diferentes rutas celulares (Ciesla et al., 2007; Oler and Cairns, 2012; Upadhyya et al., 2002). Así, la aplicación de otros tipos de estrés diferentes al bloqueo de la ruta TOR mediante rapamicina, como son la carencia de glucosa en el medio, la fase estacionaria del cultivo, el metil metanosulfonato (MMS) o el ditioneitol (DTT), entre otros, también provoca la rápida desfosforilación de Maf1 y la consecuente represión de la actividad de la ARN pol III (Oficjalska-Pham et al., 2006; Oler and Cairns, 2012; Roberts et al., 2006; Willis et al., 2004). Teniendo todo esto en cuenta, se quiso comprobar si el defecto de desfosforilación de Maf1 en las cepas carentes de Bud27 se producía también bajo el efecto de otros tipos de estrés. Para ello, células del mutante *bud27Δ* y su cepa isogénica silvestre se trataron con rapamicina (a modo de control), con ditioneitol (DTT), o se sometieron a una situación de carencia de glucosa (SD –glucosa). De las tres condiciones experimentales se recogió una alícuota antes del tratamiento (tiempo=0) y a distintos tiempos tras la aplicación del estrés (30 y 60 minutos) para analizar la cinética de desfosforilación de Maf1 mediante western blot. La Figura R13 muestra que la carencia de Bud27 provoca una alteración en la cinética de desfosforilación de Maf1 en todas las situaciones experimentales. Este resultado señala un posible papel de Bud27 como una proteína que integra diferentes señales de estrés que convergen finalmente en la correcta desfosforilación de Maf1 para coordinar la represión de la actividad de la ARN pol III.

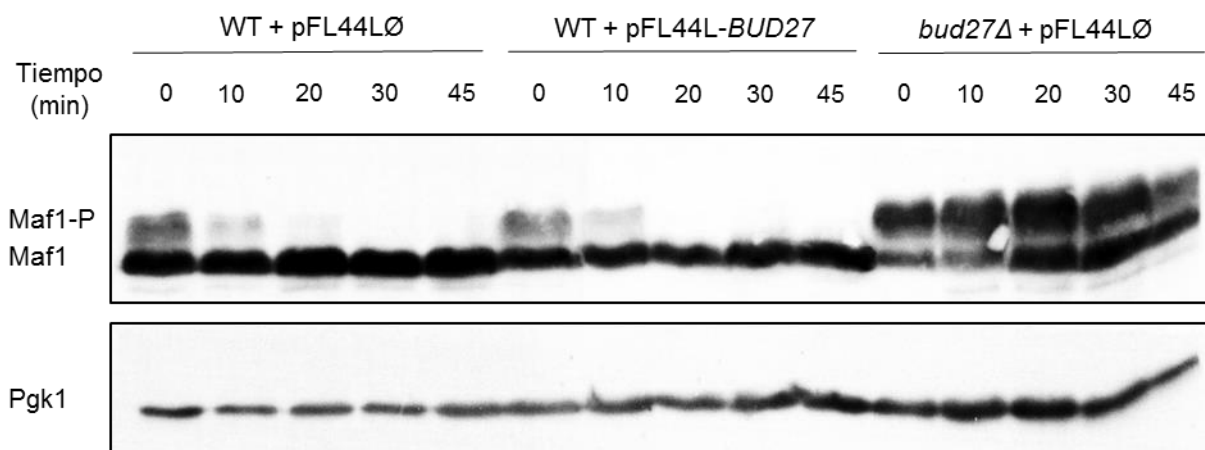


**Figura R13. Análisis de la desfosforilación de Maf1 bajo diferentes situaciones de estrés.** Extractos de las cepas silvestre (WT; BY4741) y *bud27Δ* (YFN683) crecidas en medio YPD a 30°C hasta alcanzar la fase exponencial (D.O.<sub>600</sub>~0,7) fueron tratados con rapamicina (0,4 µg/ml), lavadas y cultivadas en medio carente de glucosa (SD – glucosa) o tratadas con DTT (5mM) durante los tiempos indicados. Las proteínas extraídas con TCA fueron analizadas por western blot usando los anticuerpos anti-Maf1 y anti-Pgk1.

## Resultados. Capítulo II

Los datos mostrados hasta el momento indican que Bud27 es una proteína determinante en el control del estado de fosforilación de Maf1, siendo necesaria para integrar las diferentes señales celulares que convergen en su proceso de desfosforilación.

Dadas las alteraciones que la falta de Bud27 tiene sobre la fosforilación de Maf1, decidimos analizar las consecuencias de la sobreexpresión de *BUD27*. Se transformó una cepa silvestre con el plásmido vacío pFL44L y con el mismo plásmido sobreexpresando *BUD27* y se analizaron, mediante western blot, tanto el estado inicial de fosforilación de Maf1 (tiempo=0) como a distintos tiempos tras un tratamiento con rapamicina. Cabe indicar que la sobreexpresión de *BUD27* no provocó defectos apreciables sobre el crecimiento de estas cepas (datos no mostrados). Como se muestra en la Figura R14, no se observaron diferencias apreciables en el estado de fosforilación de Maf1 cuando se sobreexpresó *BUD27*, ni en fase exponencial (tiempo=0), ni tras el tratamiento con rapamicina.

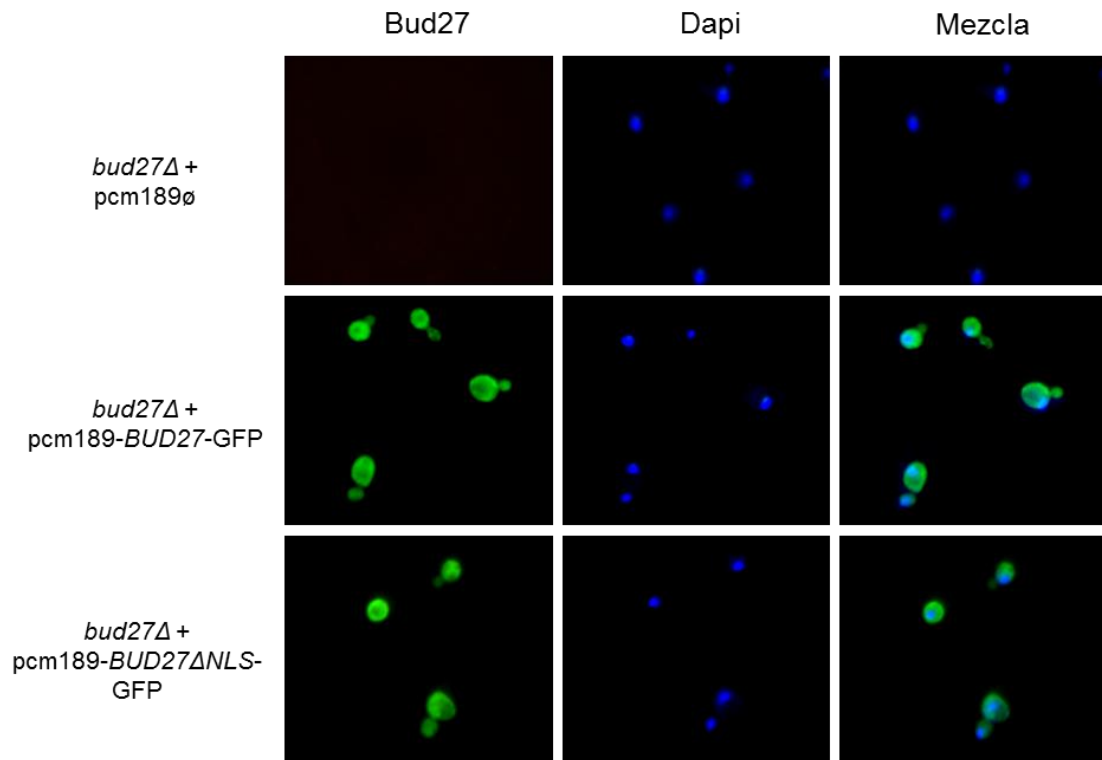


**Figura R14. Análisis de desfosforilación de Maf1 por sobreexpresión de *BUD27*.** La cepa silvestre BY4741 (WT) fue transformada con el plásmido vacío pFL44L (pFL44L $\emptyset$ ) y con el mismo plásmido que permite la sobreexpresión de *BUD27* (pFL44L-*BUD27*). La cepa *bud27* $\Delta$  (YFN683), usada como control, fue transformada con el plásmido vacío. Las cepas transformadas se cultivaron en medio SD (suplementado con los requerimientos necesarios) a 30°C hasta alcanzar la fase exponencial (D.O.<sub>600</sub>~0,6). Extractos de proteínas (con TCA) a tiempo inicial y tras el tratamiento con rapamicina (0,4  $\mu$ g/ml) durante 10, 20, 30 y 45 minutos fueron analizados por western blot usando los anticuerpos anti-Maf1 y anti-Pgk1.

Por tanto, aunque la falta de Bud27 produce una alteración en el patrón de desfosforilación de Maf1, un aumento de la expresión de *BUD27* no parece tener efecto alguno en este proceso.

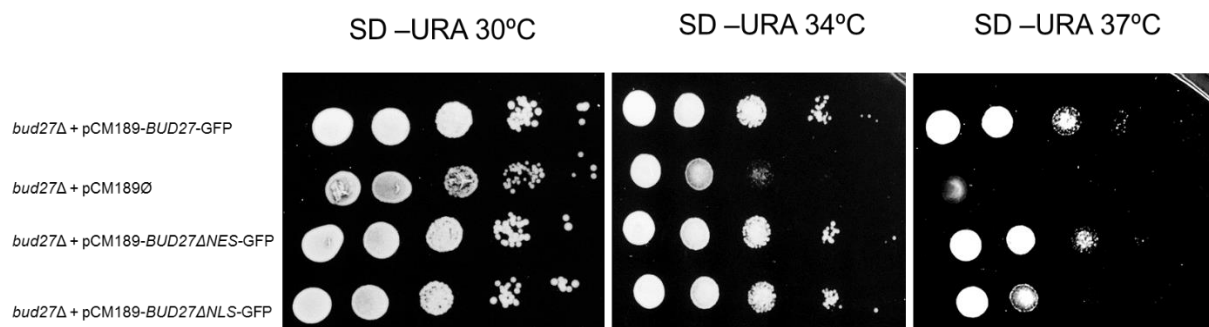
### 1.2. La fosforilación de Maf1 no depende de la localización celular de Bud27

Bud27 es una proteína que se mueve entre núcleo y citoplasma en una vía independiente de la exportina Crm1 (Mirón-García et al., 2013). Para estudiar la influencia que puede tener la localización de Bud27 sobre el estado de fosforilación de Maf1, se construyó además un plásmido (pCM189-*BUD27* $\Delta$ NLS-GFP) que contiene un alelo de *BUD27* que permite la expresión de la proteína sin el dominio de localización nuclear NLS (aminoácidos 562-595). Como se observa en la Figura R15 la falta del dominio NLS, provoca una localización mayoritariamente citoplasmática de la proteína Bud27.



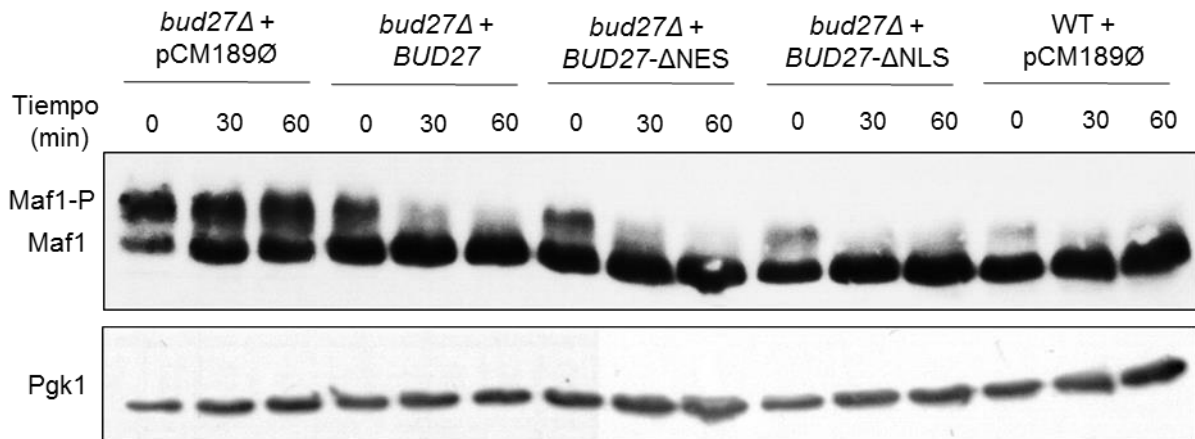
**Figura R15. Análisis *in vivo*, mediante microscopía de fluorescencia, de la localización celular de la proteína Bud27 $\Delta$ NLS-GFP.** La cepa *bud27* $\Delta$  (YFN683) fue transformada con el plásmido vacío pCM189 (pCM189 $\emptyset$ ) y con el mismo plásmido expresando los alelos *BUD27* $\Delta$ NLS-GFP y *BUD27*-GFP (control) (ver Tabla MyM 4) y se crecieron a 30°C en medio SD (suplementado con los requerimientos necesarios). Las imágenes mostradas se tomaron en el microscopio de fluorescencia OLYMPUS BX51.

En paralelo, se utilizó un plásmido que contiene un alelo de *BUD27* que permite la expresión de la proteína sin la señal de exporte nuclear y que conlleva una localización mayoritariamente nuclear de la proteína (pCM189-*BUD27* $\Delta$ NES-GFP) (Mirón-García et al., 2013) para analizar su posible efecto sobre el crecimiento. En ningún caso, estas proteínas mutantes alteran significativamente el crecimiento respecto a la proteína silvestre (Figura R16) y solo la cepa con la proteína Bud27 $\Delta$ NLS-GFP mostró una ligera termosensibilidad a 37°C.



**Figura R16. Estudio de la termosensibilidad de la cepa *bud27Δ* transformada con plásmidos que expresan diferentes alelos de *BUD27*.** La cepa *bud27Δ* (YFN683) fue transformada con el plásmido vacío pCM189 (pCM189∅) y con el mismo plásmido expresando los diferentes alelos *BUD27ΔNLS*-GFP (localización citoplasmática de Bud27), *BUD27ΔNES*-GFP (localización nuclear) y *BUD27*-GFP (control) (ver Tabla MyM 4). El crecimiento se analizó mediante diluciones seriadas en medio SD (suplementado con los requerimientos necesarios) a 30, 34 y 37°C.

Para estudiar si la localización celular de Bud27 tenía efectos importantes sobre el proceso de desfosforilación de Maf1, se transformó una cepa *bud27Δ* con el plásmido vacío pCM189 y con el mismo plásmido permitiendo la expresión de los diferentes alelos de *BUD27*: *BUD27ΔNLS*-GFP (Bud27 mayoritariamente citoplasmático) y *BUD27ΔNES*-GFP (Bud27 mayoritariamente nuclear). La cinética de desfosforilación de Maf1 se analizó mediante western blot en las cepas transformadas, a tiempo inicial (tiempo=0) y a distintos tiempos tras el tratamiento con rapamicina. Como se puede ver en la Figura R17, no hubo diferencias significativas en el patrón de fosforilación de Maf1 antes del tratamiento ni en su cinética de desfosforilación, lo que sugiere que la fosforilación y desfosforilación de Maf1 depende de la presencia de Bud27, pero no de su localización celular. No obstante, no se puede descartar que pueda haber una cierta cantidad de la proteína Bud27ΔNLS que entre al núcleo por difusión. Del mismo modo, en el caso de la proteína Bud27ΔNES, no podemos descartar que haya cierta cantidad de esta en el citoplasma.



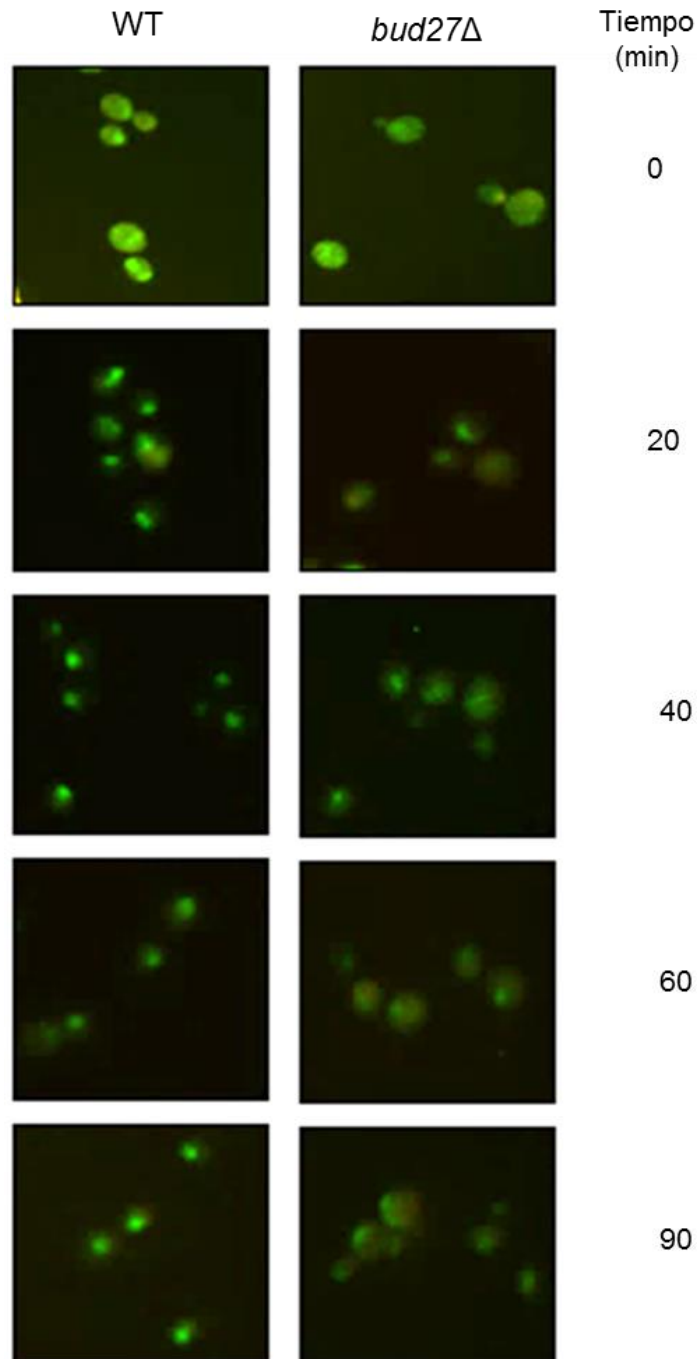
**Figura R17. La fosforilación y desfosforilación de Maf1 no depende de la localización de Bud27.** La cepa mutante *bud27Δ* (YFN683) fue transformada con el plásmido vacío pCM189 (pCM189Ø) y con el mismo plásmido expresando los alelos *BUD27ΔNLS*-GFP (localización citoplasmática de Bud27), *BUD27ΔNES*-GFP (localización nuclear) y *BUD27*-GFP (control) (ver Tabla MyM 4). La cepa silvestre BY4741 (WT), usada como control, fue transformada con el plásmido vacío. Extractos de proteínas (con TCA) a tiempo inicial y tras el tratamiento con rapamicina (0,4 µg/ml) durante 30 y 60 minutos fueron analizados por western blot usando los anticuerpos anti-Maf1 y anti-Pgk1.

### 1.3. La entrada de Maf1 al núcleo depende de Bud27

Maf1 es una proteína que, al igual que Bud27, se mueve entre núcleo y citoplasma (Graczyk et al., 2011; Moir et al., 2006; Oficjalska-Pham et al., 2006; Oler and Cairns, 2012; Roberts et al., 2006). En condiciones favorables de crecimiento, Maf1 se encuentra localizado principalmente en el citoplasma, aunque una pequeña proporción es nuclear (Moir et al., 2006; Oficjalska-Pham et al., 2006). El control de la localización citoplasmática de Maf1 ocurre a través de dos mecanismos: por un lado, la inactivación mediante fosforilación de algunos residuos de su dominio de localización nuclear (NLS), y por otro, el exporte desde el núcleo de la forma fosforilada de Maf1 por parte de Msn5 (Moir et al., 2006; Towpik et al., 2008). Para determinar si la alteración en el patrón de fosforilación de Maf1 y de la ralentización de la cinética de desfosforilación tras la represión de la ruta TOR en el mutante *bud27Δ* provocan una alteración de la entrada de Maf1 al núcleo desde el citoplasma, se analizó la localización de Maf1 *in vivo*, en condiciones de crecimiento permisivo y tras la adición de rapamicina, en una cepa mutante *bud27Δ* y en su cepa isogénica silvestre, ambas expresando un alelo funcional de *MAF1* fusionado a GFP. Maf1 mostró una localización mayoritariamente citoplasmática en condiciones de crecimiento permisivo antes del tratamiento, tanto en la cepa silvestre como en el mutante *bud27Δ* (Figura R18). La adición de rapamicina provocó la rápida translocación de Maf1 al núcleo en la cepa silvestre (20-40 minutos). Sin embargo, la translocación de Maf1 al núcleo es más lenta en el mutante *bud27Δ*, permaneciendo tras 90 minutos de tratamiento una proporción importante de Maf1 en el citoplasma. Estos resultados

## Resultados. Capítulo II

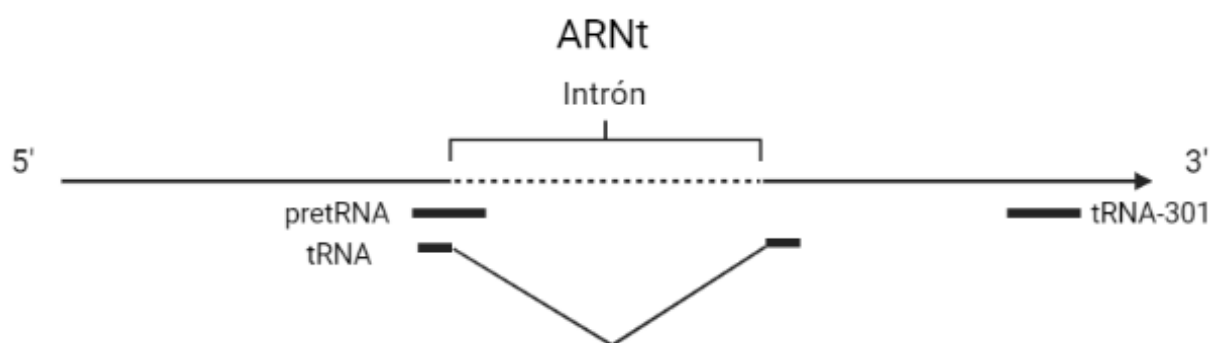
concuerdan con datos previos de inmunolocalización de Maf1 generados en el grupo del Dr. Navarro que mostraban que tanto en fase exponencial como tras el tratamiento con rapamicina, las cepas mutantes carentes de Bud27 presentaban una menor cantidad de núcleos con Maf1 que la cepa isogénica silvestre (Martínez-Fernández, 2016).



**Figura R18. Análisis in vivo de la localización celular de Maf1.** La cepa mutante *bud27*Δ (YFN734) y su isogénica silvestre expresando el alelo funcional MAF1-GFP se cultivaron en medio YPD a 30°C hasta alcanzar la fase exponencial (D.O.<sub>600</sub>~0,6). La localización de Maf1 se analizó mediante microscopía de fluorescencia a tiempo inicial (tiempo=0) y tras el tratamiento con rapamicina (0,4 µg/ml) distintos tiempos (20, 40, 60 y 90 minutos). Las imágenes mostradas se tomaron en el microscopio de fluorescencia OLYMPUS BX51.

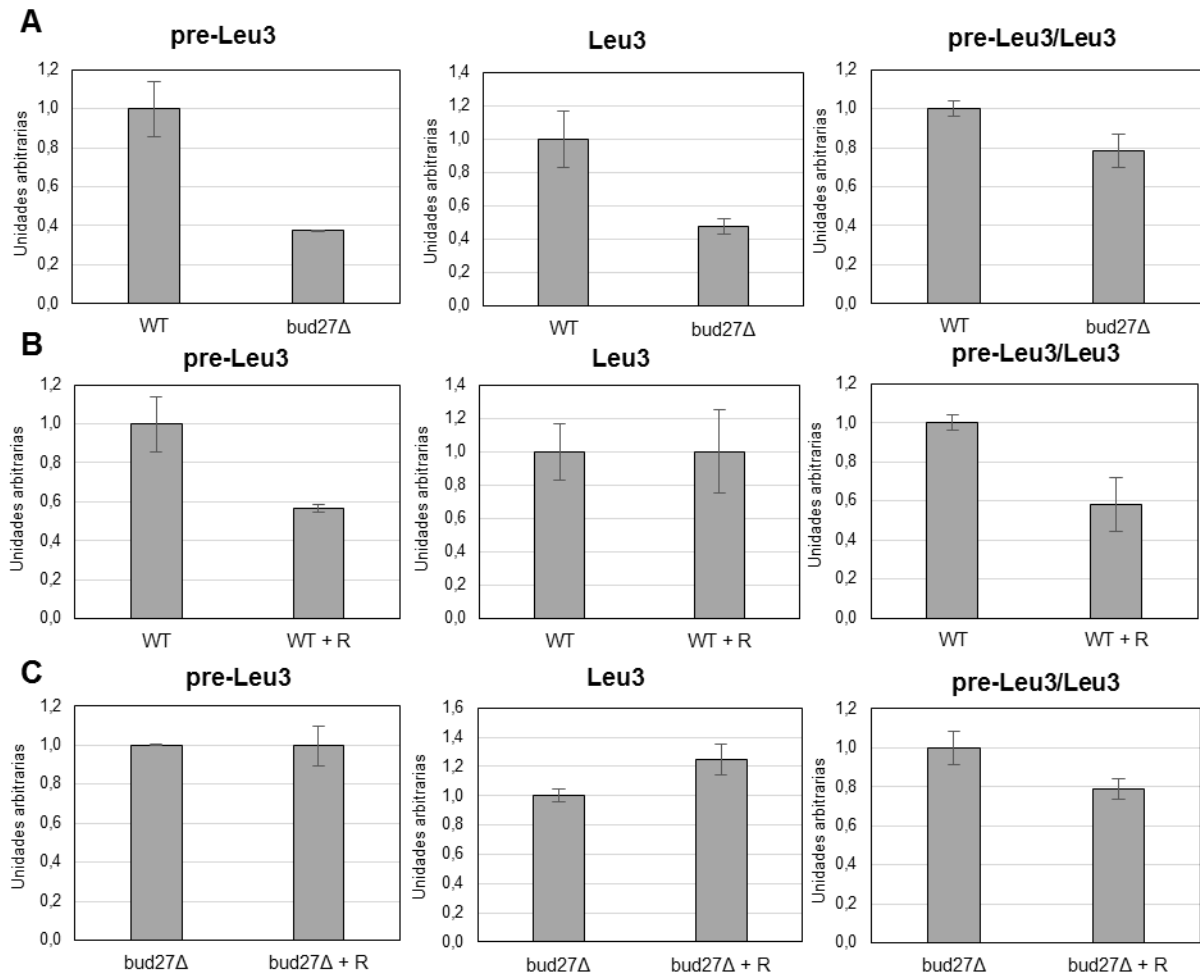
### 1.4. Análisis de los niveles de ARNt tras la inhibición de la vía TOR

Teniendo en cuenta estos resultados, en un mutante *bud27Δ* cabría esperar una menor represión de la transcripción mediada por la ARN pol III tras una inhibición de la vía TOR dada la menor entrada de Maf1 desfosforilada al núcleo para ejercer la regulación negativa. Para analizar el proceso de represión de la ARN pol III tras una situación de bloqueo de la vía TOR en células carentes de *BUD27*, se analizaron mediante RT-qPCR los niveles de acumulación de las formas maduras e inmaduras del ARNt-Leu3 (CAA), utilizándose diferentes parejas de cebadores para detectar cada una de ellas (Figura R19).



**Figura R19. Esquema general de las zonas de hibridación de los cebadores utilizados en los ensayos de RT-qPCR para detectar formas inmaduras (pre-ARNt) y maduras (ARNt).** Los nombres pretRNA y tRNA sirven para referirse a cualquiera de los cebadores *Forward* utilizados en la qPCR. El cebador representado en el esquema como tRNA-301 se refiere a los cebadores *Reverse* utilizados. Para más información sobre los cebadores empleados, ver Tabla MyM 3.

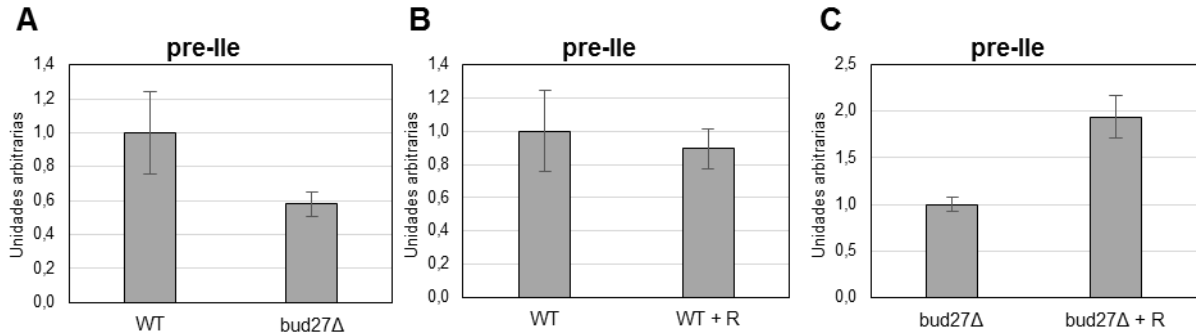
Como se puede ver en la Figura R20 A, al comparar el mutante *bud27Δ* con su cepa isogénica silvestre, tanto los niveles de la forma inmadura como de la forma madura del ARNt-Leu3 (CAA) fueron inferiores. Este resultado confirma lo que se había constatado previamente por *northern blot* (Martínez-Fernández et al., 2020) y están en consonancia con los datos previos de ChIP de la ARN pol III (Figura R8). Por otra parte, el tratamiento con rapamicina provocó una disminución de los niveles del precursor de ARNt de leucina (pre-Leu3) en la cepa silvestre, probablemente como resultado de la represión de la actividad de la ARN pol III (Oficjalska-Pham et al., 2006; Upadhyya et al., 2002), aunque no produjo una caída en los niveles del ARNt-Leu maduro (Leu3), debido quizá a su estabilidad (Figura R20 B). Sin embargo, esta posible respuesta de represión de la ARN polimerasa III tras la adición de rapamicina no parece observarse en el mutante *bud27Δ* (Figura R20 C).



**Figura R20. Análisis de los niveles de acumulación de las formas inmadura (pre-Leu3) y madura (Leu3) del ARNt-Leu3 (CAA) mediante RT-qPCR.** A) Niveles de expresión de ARNt-Leu3 (CAA) inmaduro (pre-Leu3) y maduro (Leu3) del mutante *bud27Δ* (YFN683) y de su cepa isogénica silvestre (WT; BY4741), crecidas en medio SD (suplementado con los requerimientos necesarios) a 30°C hasta alcanzar la fase exponencial (D.O.<sub>600</sub>~0,7). B) Niveles de expresión de ARNt-Leu3 (CAA) inmaduro (pre-Leu3) y maduro (Leu3) de la cepa silvestre BY4741, crecida en medio SD (suplementado con los requerimientos necesarios) a 30°C hasta alcanzar la fase exponencial (D.O.<sub>600</sub>~0,7), WT, y tras el tratamiento con rapamicina (0,4 μg/ml, 1 hora), WT + R. C) Niveles de expresión de ARNt-Leu3 (CAA) inmaduro (pre-Leu3) y maduro (Leu3) de la cepa mutante *bud27Δ* (YFN683) crecida en medio SD (suplementado con los requerimientos necesarios) a 30°C hasta alcanzar la fase exponencial (D.O.<sub>600</sub>~0,7), *bud27Δ*, y tras el tratamiento con rapamicina (0,4 μg/ml, 1 hora), *bud27Δ* + R. En todos los casos, los valores están relativizados frente a los niveles de acumulación del ARNr 18S y muestran la media de dos réplicas biológicas independientes.

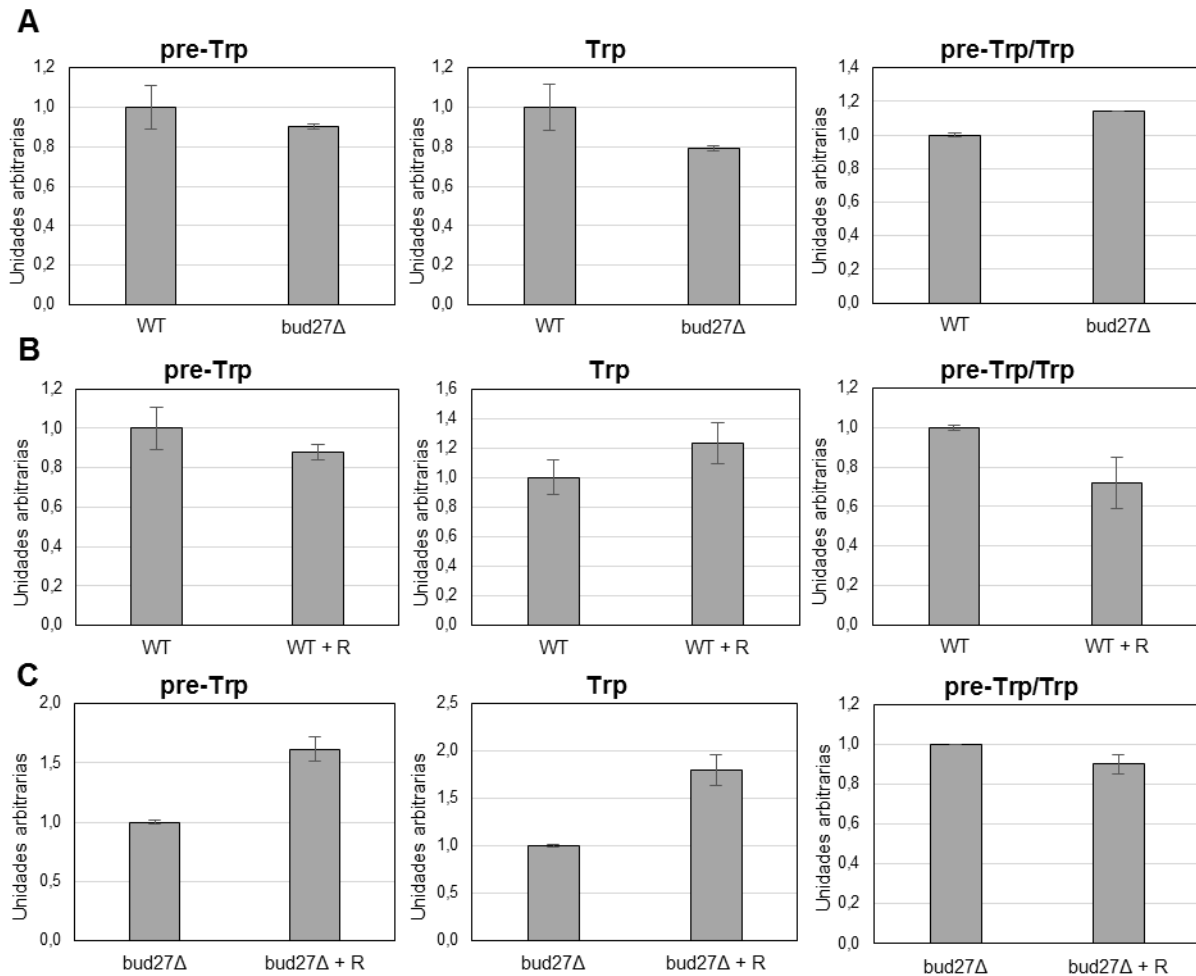
Resultados similares se observaron, aunque con diferencias, analizando la forma inmadura del ARNt-Ile (TAT), mostrando una menor acumulación del mismo en el mutante *bud27Δ* (Figura R21 A). Un resultado similar, aunque no idéntico, se observó mediante *northern blot* (Martínez-Fernández et al., 2020). Sin embargo, la adición de rapamicina no mostró un descenso significativo en la cantidad de pre-Ile en la cepa silvestre (Figura R21 B), debido probablemente a que la represión por parte de Maf1 tras un bloqueo de TOR no se da en todos los ADNts por igual (Ciesla et al., 2007; Turowski et al., 2016). De manera

interesante, la adición de rapamicina en la cepa mutante *bud27Δ* provocó una acumulación del transcrito pre-Ile (Figura R21 C). Aunque los datos no muestran la represión clara de la ARN pol III, la acumulación de este pre-ARNt en el mutante, sugiere un fenómeno diferencial entre la actividad de esta enzima entre el mutante y el silvestre.



**Figura R21. Análisis de los niveles de expresión de la forma inmadura del ARNt-Ile (TAT) mediante RT-qPCR.** A) Niveles de expresión del ARNt-Ile inmaduro (pre-Ile) del mutante *bud27Δ* (YFN683) y de su cepa isogénica silvestre (WT; BY4741) crecidas en medio SD (suplementado con los requerimientos necesarios) a 30°C hasta alcanzar la fase exponencial (D.O.<sub>600</sub>~0,7). B) Niveles de expresión del ARNt-Ile inmaduro (pre-Ile) de la cepa silvestre BY4741, WT, crecida en medio SD (suplementado con los requerimientos necesarios) a 30°C hasta alcanzar la fase exponencial (D.O.<sub>600</sub>~0,7) y tras el tratamiento con rapamicina (0,4 µg/ml, 1 hora), WT + R. C) Niveles de expresión acumulación del ARNt-Ile inmaduro (pre-Ile) de la cepa mutante *bud27Δ* (YFN683) crecida en medio SD (suplementado con los requerimientos necesarios) a 30°C hasta alcanzar la fase exponencial (D.O.<sub>600</sub>~0,7), *bud27Δ*, y tras el tratamiento con rapamicina (0,4 µg/ml, 1 hora), *bud27Δ* + R. En todos los casos, los valores están relativizados frente a los niveles de expresión del ARNr 18S y muestran la media de dos réplicas biológicas independientes.

Por último, analizamos también los niveles de expresión de las formas madura e inmadura del ARNt-Trp (CCA). En estos ensayos no se observaron diferencias importantes ni en la forma inmadura ni en la madura del transcrito ARNt-Trp entre el mutante *bud27Δ* y la cepa isogénica silvestre (Figura R22 A). Al igual que en el caso anterior, la adición de rapamicina no produjo una caída significativa en los niveles de pre-Trp en la cepa silvestre (Figura R22 B) aunque sí produjo una acumulación de pre-Trp y de la forma madura en la cepa mutante *bud27Δ* (Figura R22 C), sugiriendo de nuevo una respuesta diferencial de la actividad de la ARN pol III entre el mutante y el silvestre en condiciones de adición de rapamicina.



**Figura R22. Análisis de los niveles de expresión de las formas inmadura (pre-Trp) y madura (Trp) del ARNt-Trp (CCA) mediante RT-qPCR.** A) Niveles de expresión de ARNt-Trp inmaduro (pre-Trp) y maduro (Trp) del mutante *bud27Δ* (YFN683) y de su isogénica silvestre (WT; BY4741) crecidas en medio SD (suplementado con los requerimientos necesarios) a 30°C hasta alcanzar la fase exponencial (D.O.<sub>600</sub>~0,7). B) Niveles de expresión de ARNt-Trp inmaduro (pre-Trp) y maduro (Trp) de la cepa silvestre BY4741, WT, crecida en medio SD (suplementado con los requerimientos necesarios) a 30°C hasta alcanzar la fase exponencial (D.O.<sub>600</sub>~0,7) y tras el tratamiento con rapamicina (0,4 μg/ml, 1 hora), WT + R. C) Niveles de expresión de ARNt-Trp inmaduro (pre-Trp) y maduro (Trp) de la cepa mutante *bud27Δ* (YFN683) crecida en medio SD (suplementado con aminoácidos) a 30°C hasta alcanzar la fase exponencial (D.O.<sub>600</sub>~0,7), *bud27Δ*, y tras el tratamiento con rapamicina (0,4 μg/ml, 1 hora), *bud27Δ* + R. En todos los casos, los valores están relativizados frente a los niveles de expresión del ARNr 18S y muestran la media de dos réplicas biológicas independientes.

Estos resultados, en su conjunto, parecen indicar que el proceso de represión de la ARN pol III tras una inhibición de la ruta TOR podría estar alterado en el mutante *bud27Δ*. Los resultados del análisis para ARNt inmaduro de isoleucina (pre-Ile) y para ARNt de Trp (pre-Trp) sugieren que la transcripción de la ARN pol III no es igual para todos los ARNt, ni todos los transcritos de la ARN pol III sufren el mismo proceso de maduración y acumulación, tal y como se ha hipotetizado previamente por otros autores (Ciesla et al., 2007; Turowski et al., 2016).

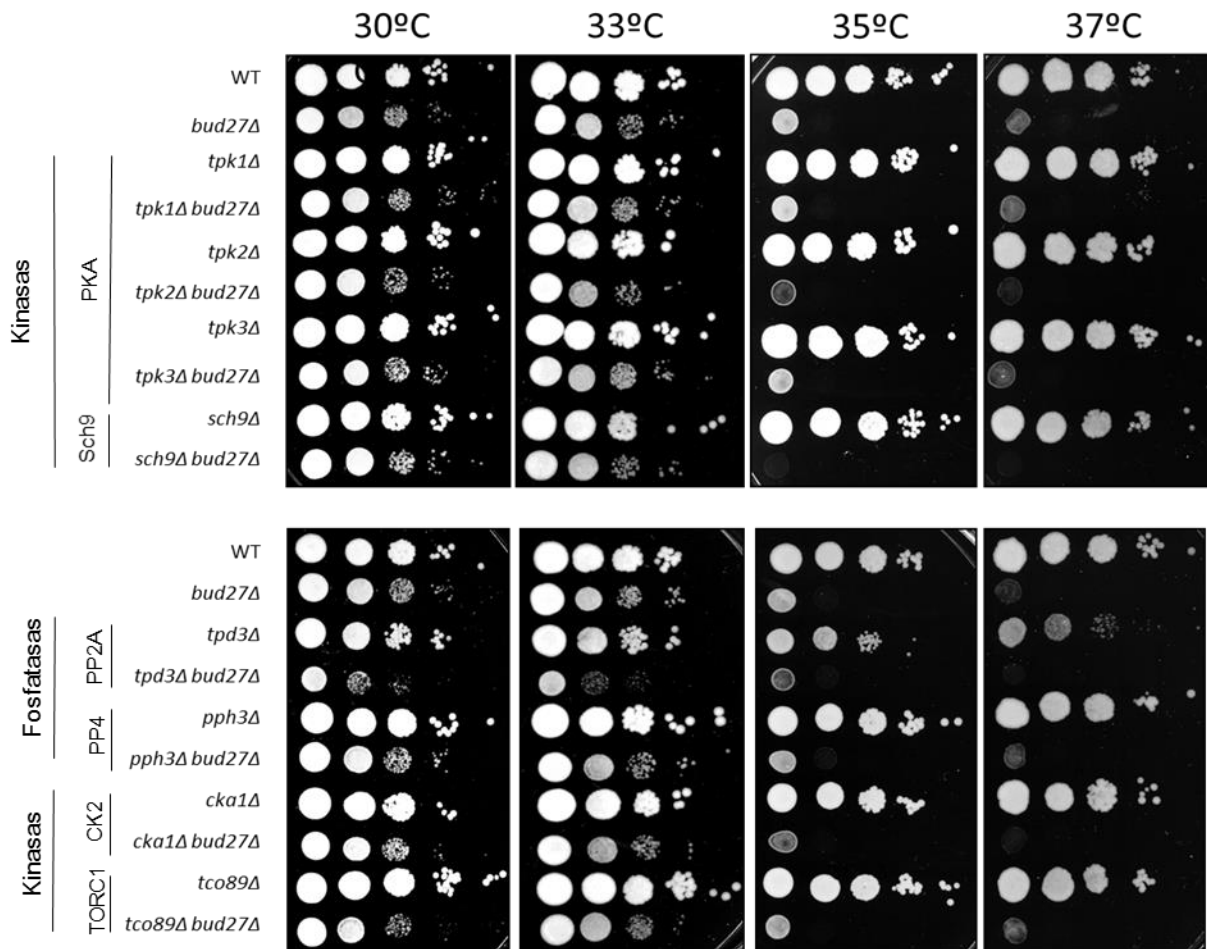
Los posibles defectos en la represión de la actividad de la ARN pol III en el mutante *bud27Δ* podrían deberse, al menos en parte, a la alteración en la desfosforilación y entrada al núcleo de Maf1 tras una inhibición de la vía TOR. Estos resultados sugieren que los defectos en la regulación de Maf1 se traducen en un defecto en la represión de la ARN pol III en el mutante *bud27Δ*.

### **2. Estudio de la relación entre Bud27 y Maf1 con la ruta de señalización TOR**

Los datos mostrados en el capítulo anterior demuestran que hay una alteración del estado de fosforilación de Maf1 en células carentes de Bud27. Como se ha mencionado anteriormente, la actividad de Maf1 se controla tanto por su localización como por su estado de fosforilación, siendo este último el proceso determinante (Roberts et al., 2006; Towpik et al., 2008). Esta fosforilación de Maf1 está controlada por un balance entre kinasas y fosfatasas, componente de la ruta TOR, siendo unas más activas que otras dependiendo de las condiciones de crecimiento (Moir and Willis, 2013). Se ha descrito que Maf1 es sustrato de diferentes kinasas, aunque ninguna de ellas parece ser predominante o mayoritaria. Entre estas kinasas encontramos Sch9, PKA (*Protein Kinase A*), CK2 (*Casein Kinase 2*) y TORC1, aunque es posible que existan otras (Graczyk et al., 2011; Lee et al., 2009; Moir et al., 2006; Wei et al., 2009). La primera fosfatasa propuesta como regulador de Maf1 es PP2A (*Protein Phosphatase Type 2A*), actuando bajo situaciones de estrés y, por tanto, controlando indirectamente la represión de la actividad de la ARN pol III (Oficjalska-Pham et al., 2006). Sin embargo, otro estudio más reciente pone de manifiesto que sería PP4 (*Protein Phosphatase 4*), y no PP2A, la principal fosfatasa de Maf1 (Oler and Cairns, 2012).

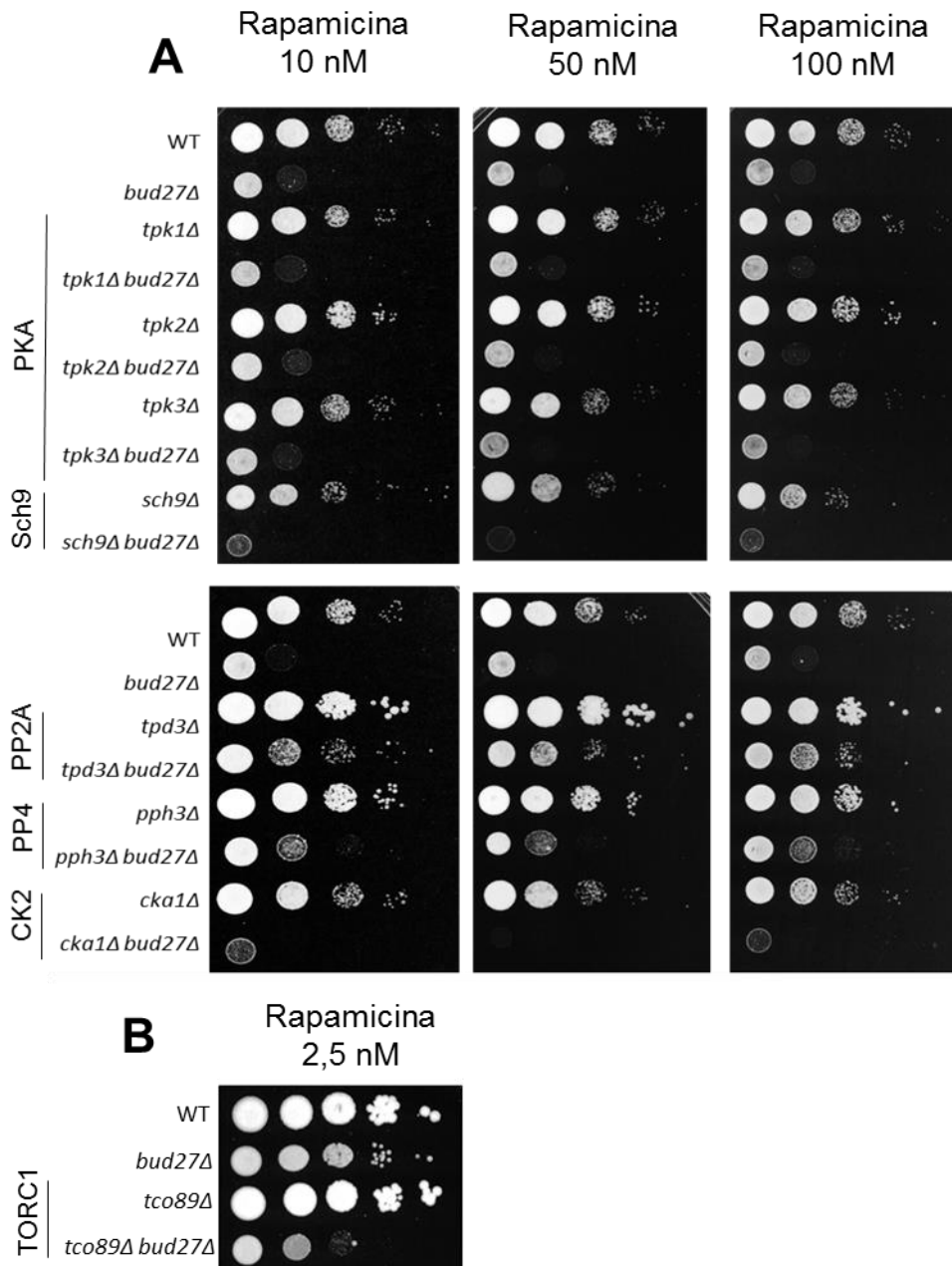
#### **2.1. Análisis de interacciones genéticas**

Para poder profundizar en el conocimiento del rol de Bud27 sobre la actividad de Maf1, se analizaron las interacciones genéticas entre *BUD27* y los genes para las potenciales kinasas y fosfatasas de Maf1. Nuestro análisis de crecimiento, mediante diluciones seriadas, sugiere interacciones genéticas negativas entre *BUD27* y el gen para la kinasa Sch9, *SCH9* (Figura R23) y más sutiles, entre *BUD27* y *TPK2* (kinasa PKA) y entre *BUD27* y *TPD3* (fosfatasa PP2A), (Figura R23).



**Figura R23. Estudio del crecimiento del mutante *bud27Δ* y mutantes de genes para distintas kinasas y fosfatasas de la vía TOR.** El crecimiento de varias cepas mutantes simples de kinasas y fosfatasas de la vía TOR, de *bud27Δ* y de los dobles mutantes, se analizó mediante diluciones seriadas en medio YPD a 30, 33, 35 y 37°C (ver Tabla MyM 2 para más información sobre las cepas usadas en este ensayo).

Por otro lado, se analizó el crecimiento de estas mismas cepas en medios conteniendo rapamicina (Figura R24). Los resultados indicaron nuevamente interacciones genéticas negativas entre *BUD27* y *SCH9*, así como entre *BUD27* y el gen *CKA1* para la kinasa CK2, a todas las concentraciones de rapamicina (Figura R24 A). Curiosamente, los datos sugieren interacciones genéticas positivas entre *BUD27* y los genes *PPH3* y *TPD3* de los complejos fosfatasas PP4 y PP2A, respectivamente (Figura R24 A). Por último, se observó interacción genética negativa entre *BUD27* y el gen de Tco89, que forma parte del complejo TORC1, *TCO89* (Figura R24 B). En este último caso, se rebajó la concentración de porque el mutante *tco89Δ* presenta una alta sensibilidad a rapamicina (Reinke et al., 2004).



**Figura R24. Estudio del crecimiento del mutante *bud27Δ* y mutantes de genes para distintas kinasas y fosfatasa de la vía TOR.** El crecimiento de varias cepas mutantes simples de kinasas y fosfatasa de la vía TOR, de *bud27Δ* y de los dobles mutantes se analizó mediante diluciones seriadas en medio YPD al que se le añadió rapamicina a diferentes concentraciones (2,5, 10, 50 y 100 nM). Para más información sobre las cepas usadas en este ensayo, ver Tabla MyM 2.

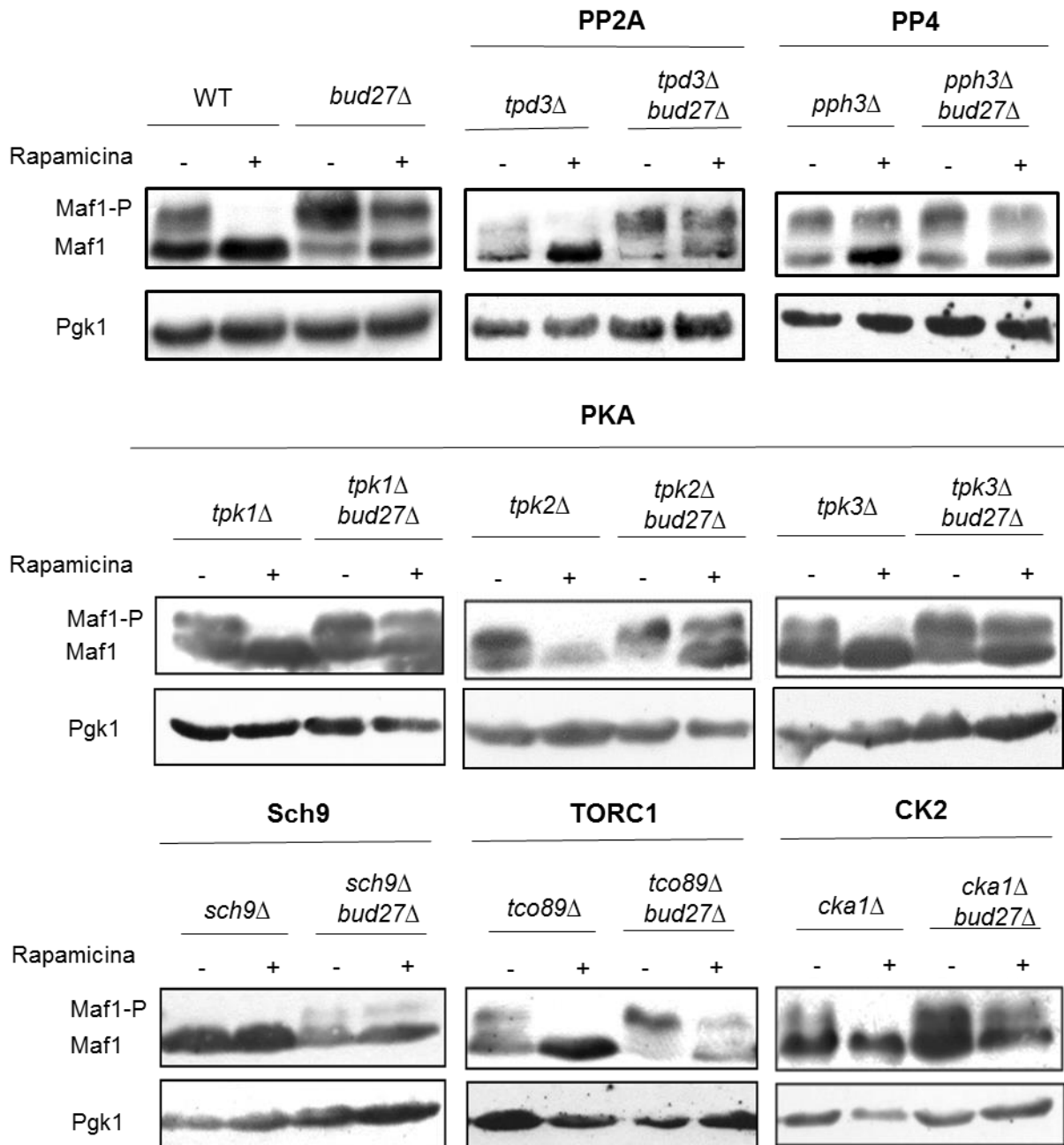
En conjunto, las interacciones genéticas mostradas, sugieren que Bud27 podría actuar en la vía TOR, quizá conjuntamente con algunos de sus efectores implicados en la fosforilación y desfosforilación de Maf1.

### 2.2. Análisis del patrón de fosforilación de Maf1

Para ahondar en la relación funcional de estos efectores de la vía TOR con Maf1 y su posible relación con Bud27, se procedió al análisis del perfil de desfosforilación de Maf1 tras un tratamiento con rapamicina en todas las cepas mutantes simples y dobles utilizadas en los ensayos anteriores.

Los resultados del western blot muestran, en primer lugar, que la principal fosfatasa de Maf1 es PP4 (Pph3) y no PP2A, tal y como estaba descrito previamente por otros autores (Oler and Cairns, 2012) (Figura R25). El análisis de Maf1 en el mutante simple de la kinasa Sch9 (*sch9Δ*), mostró que la banda superior (forma fosforilada) no aparece, lo cual sugiere que Sch9 podría ser la kinasa principal de Maf1, coincidiendo con lo propuesto previamente por otros autores (Huber et al., 2009). Por otra parte, el mutante simple *bud27Δ* presenta un patrón de bandas de Maf1 muy similar al del mutante *pph3Δ*, que además es muy similar al del doble mutante *pph3Δ bud27Δ* (Figura R25). Este resultado sugiere que tanto Bud27 como Pph3 (PP4) podrían estar actuando conjuntamente en la regulación del estado de fosforilación de Maf1.

## Resultados. Capítulo II

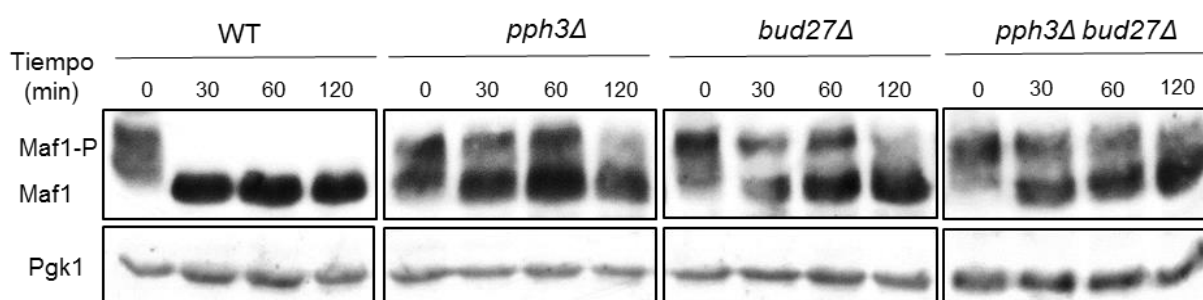


**Figura R25. Estudio del perfil de desfosforilación de Maf1 en el mutante *bud27Δ*, en mutantes de kinasas y fosfatasa de la vía TOR y en mutantes dobles.** Extractos de proteínas (con TCA) de las diferentes cepas, crecidas en YPD a 30°C hasta alcanzar la fase exponencial (D.O.<sub>600</sub>~0,7), con o sin rapamicina (0,4 µg/ml, 30 minutos), fueron analizados por western blot usando los anticuerpos anti-Maf1 y anti-Pgk1.

El hecho de que la delección de *BUD27* provoque una alteración del patrón de fosforilación de Maf1 similar a la delección de *PPH3* y a la observada en el doble mutante *pph3Δ bud27Δ*, sugiere que ambas proteínas actuarían sobre Maf1 a través de la misma vía para mediar la desfosforilación de la proteína y con ello, modular su entrada al núcleo y la represión de la ARN pol III.

## Resultados. Capítulo II

Con objeto de profundizar en el estudio de la conexión entre Bud27 y Pph3 (fosfatasa PP4) analizamos la cinética de desfosforilación de Maf1 en el doble mutante *pph3Δ bud27Δ* en comparación con los mutantes simples y con la cepa silvestre. Como se observa en la Figura R26 la cinética de desfosforilación de Maf1 a lo largo del tiempo es muy similar tanto en el mutante doble como en los mutantes simples. Los resultados de este experimento parecen confirmar que tanto Bud27 como Pph3 actúan conjuntamente en la desfosforilación de Maf1 tras una situación de estrés como el bloqueo de la ruta TOR con rapamicina.



**Figura R26. Análisis de la cinética de desfosforilación de Maf1 en cepas mutantes simples *bud27Δ* y *pph3Δ* y de la cepa doble mutante *pph3Δ bud27Δ* tras el tratamiento con rapamicina.** La cepa mutante *pph3Δ* (Y14010), la cepa mutante *bud27Δ* (YFN683), la doble mutante *pph3Δ bud27Δ* (YFN691) y la cepa silvestre (WT; BY4741) fueron crecidas en medio YPD a 30°C hasta alcanzar la fase exponencial D.O.<sub>600</sub>~0,7 y tratadas con rapamicina (0,4 µg/ml). Se recogieron alícuotas a tiempo inicial (tiempo=0, antes del tratamiento) y a varios tiempos tras el tratamiento (30, 60 y 120 minutos). Las proteínas se extrajeron por el método de TCA y fueron analizadas mediante western blot con los anticuerpos anti-Maf1 y anti-Pgk1.

Los datos obtenidos del western blot parecen estar en acuerdo con la interacción genética entre *BUD27* y *PPH3* en condiciones de crecimiento con rapamicina.

En conjunto, los datos presentados sugieren que Bud27 podría estar cooperando con la fosfatasa PP4 para realizar la desfosforilación de Maf1 y por tanto regular la represión de la actividad de la ARN pol III.

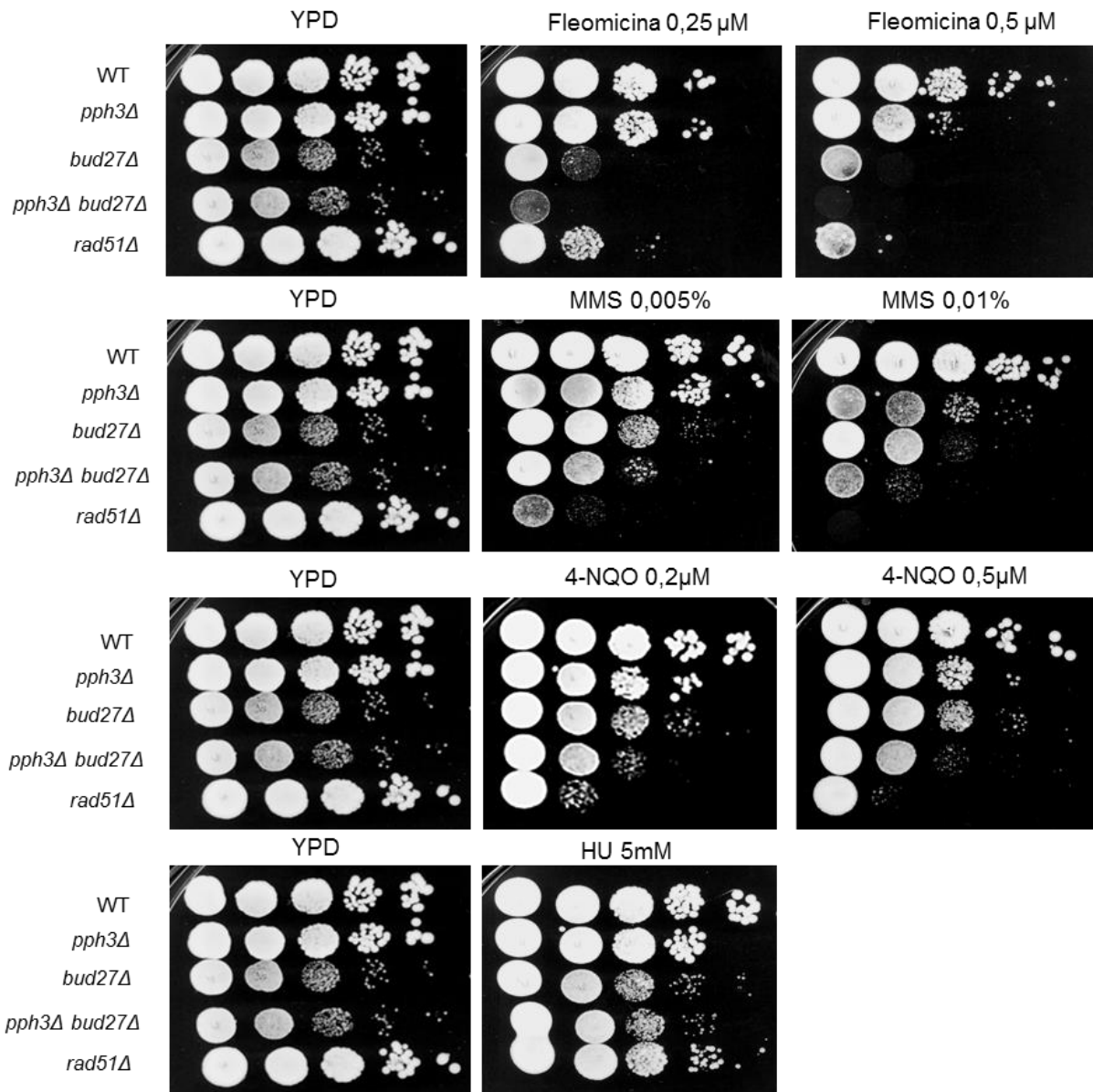
### **3. Estudio de la relación funcional entre Bud27 y PP4**

Como se ha mostrado en los apartados anteriores, la falta de Bud27 provoca una alteración en la cinética de desfosforilación de Maf1 en condiciones de represión de la vía TOR. Los datos indican que esta alteración parece depender, por lo menos en parte, de una posible conexión funcional entre Bud27 y el complejo fosfatasa PP4. Si bien se ha descrito que la acción de Pph3 sobre Maf1 es directa (Oler and Cairns, 2012) no sabemos qué función ejerce Bud27 y si este regula o influye en la actividad fosfatasa de PP4.

## Resultados. Capítulo II

Para tratar de dilucidar esta cuestión, nos preguntamos si la alteración de la actividad de PP4 en los mutantes *bud27Δ* es un efecto específico sobre Maf1 o si, por el contrario, se trata de un defecto general. Para ello, analizamos el efecto de la delección de *BUD27* sobre la actividad de PP4 en otra de sus dianas conocidas (Park and Lee, 2020), concretamente Rad53, una proteína implicada en la reparación de las roturas de la doble hélice del ADN y en el restablecimiento del ciclo celular (Hustedt et al., 2015; O'Neill et al., 2007; Villoria et al., 2019). Se ha descrito que las cepas carentes de la subunidad catalítica de PP4, Pph3 (*pph3Δ*), son hipersensibles a drogas que provocan roturas en la doble hélice de ADN o DSBs (del inglés Double Strand Breaks) (O'Neill et al., 2007; Villoria et al., 2019). Por lo tanto, como primera aproximación decidimos analizar la sensibilidad de la cepa mutante *bud27Δ* y del doble mutante *pph3Δ bud27Δ* a drogas que producen roturas de la doble hélice del ADN.

Como puede observarse en la Figura R27, la cepa *pph3Δ* mostró mayor sensibilidad que la cepa silvestre a todas las drogas y a todas las concentraciones, excepto a hidroxiurea, tal y como se ha descrito previamente (Villoria et al., 2019). De manera interesante, los resultados mostraron que la cepa *bud27Δ* también presentó sensibilidad a estas drogas y tampoco era sensible a hidroxiurea. Además, en los dobles mutantes *pph3Δ bud27Δ* la sensibilidad a las drogas se incrementó. Como cabía esperar, el mutante *rad51Δ* mostró sensibilidad a todas las drogas, aunque con poco efecto en el caso de la hidroxiurea (Villoria et al., 2019). Cabe destacar el hecho de que los mutante *bud27Δ* y *pph3Δ bud27Δ* parecen más sensibles a fleominica que el propio mutante *rad51Δ*.

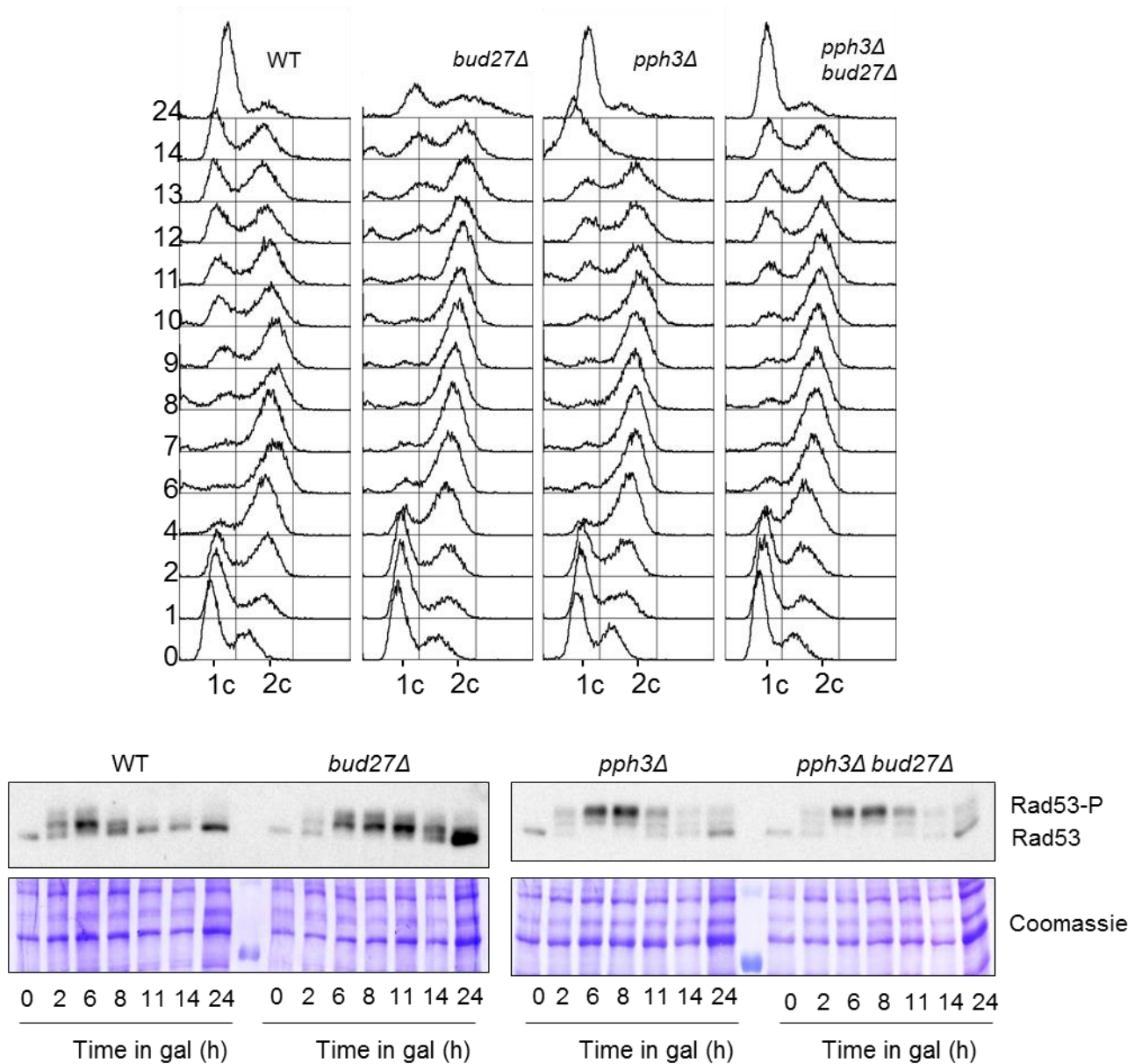


**Figura R27. Estudio de la sensibilidad a drogas que provocan daño en ADN.** El crecimiento de las cepas *pph3Δ* (AC1327), *bud27Δ* (YFN802), *pph3Δ bud27Δ* (YFN803) y de la cepa isogénica silvestre (WT; AC1822), así como de la cepa utilizada como control *rad51Δ* (AC1468) se analizó mediante diluciones seriadas en medio YPD, a 30°C, al que se le añadió fleomicina (0,25 y 0,5  $\mu$ M), metilmetanosulfonato (MMS, 0,005% y 0,01% v/v), 4-nitroquilona 1-óxido (4-NQO, 0,25 y 0,5  $\mu$ M) o hidroxurea (HU, 5mM). Ver subapartado 1.3.2 del Material y Métodos para más información sobre las drogas utilizadas.

Una vez demostrado que la falta de Bud27 también afecta el crecimiento en presencia de drogas que producen daño en el ADN, decidimos analizar la cinética de desfosforilación de Rad53, diana de PP4, tras inducir una situación de daño en el ADN. Para ello, las cepas utilizadas en este experimento se cultivan en medio con galactosa (YPGal) para inducir cortes en la doble hélice de ADN ya que contienen la endonucleasa HO controlada por el promotor *GAL1*. De esta forma se facilita que tras una inducción de la expresión del gen para HO, por

## **Resultados. Capítulo II**

galactosa, se produzcan cortes en el ADN, allá donde estén presentes las dianas y que las células activen los sistemas de reparación de DSBs. Como se puede ver en la Figura R28, en la cepa silvestre se produce una parada del ciclo celular en fase S tras inducir el daño, lo que conlleva la fosforilación de Rad53. La salida de la fase S comienza tras 8-9 horas, a la vez que se produce la desfosforilación de Rad53. Sin embargo, tanto los mutantes simples *pph3Δ* y *bud27Δ*, como el doble *pph3Δ bud27Δ*, tienen una parada en fase S más larga tras la inducción del daño, si bien esta parece producirse a un tiempo similar al silvestre. La salida de fase S más lenta va acompañada también de una ralentización de la cinética desfosforilación de Rad53 en todos los mutantes. El patrón de desfosforilación observado para el mutante *pph3Δ* se corresponde con lo descrito previamente (Hustedt et al., 2015; O'Neill et al., 2007; Villoria et al., 2019). Por su parte, también se observó una ralentización en la desfosforilación de Rad53 en el mutante *bud27Δ*, aunque esta no fue idéntica a la cinética del mutante *pph3Δ* (Figura R28). Curiosamente, el patrón de desfosforilación en el mutante doble *pph3Δ bud27Δ* es muy similar al del mutante *pph3Δ*, lo que sugiere que Pph3 parece ser un elemento principal en este proceso y Bud27, podría tener una función adicional, incluso como regulador de PP4 (Figura R28).



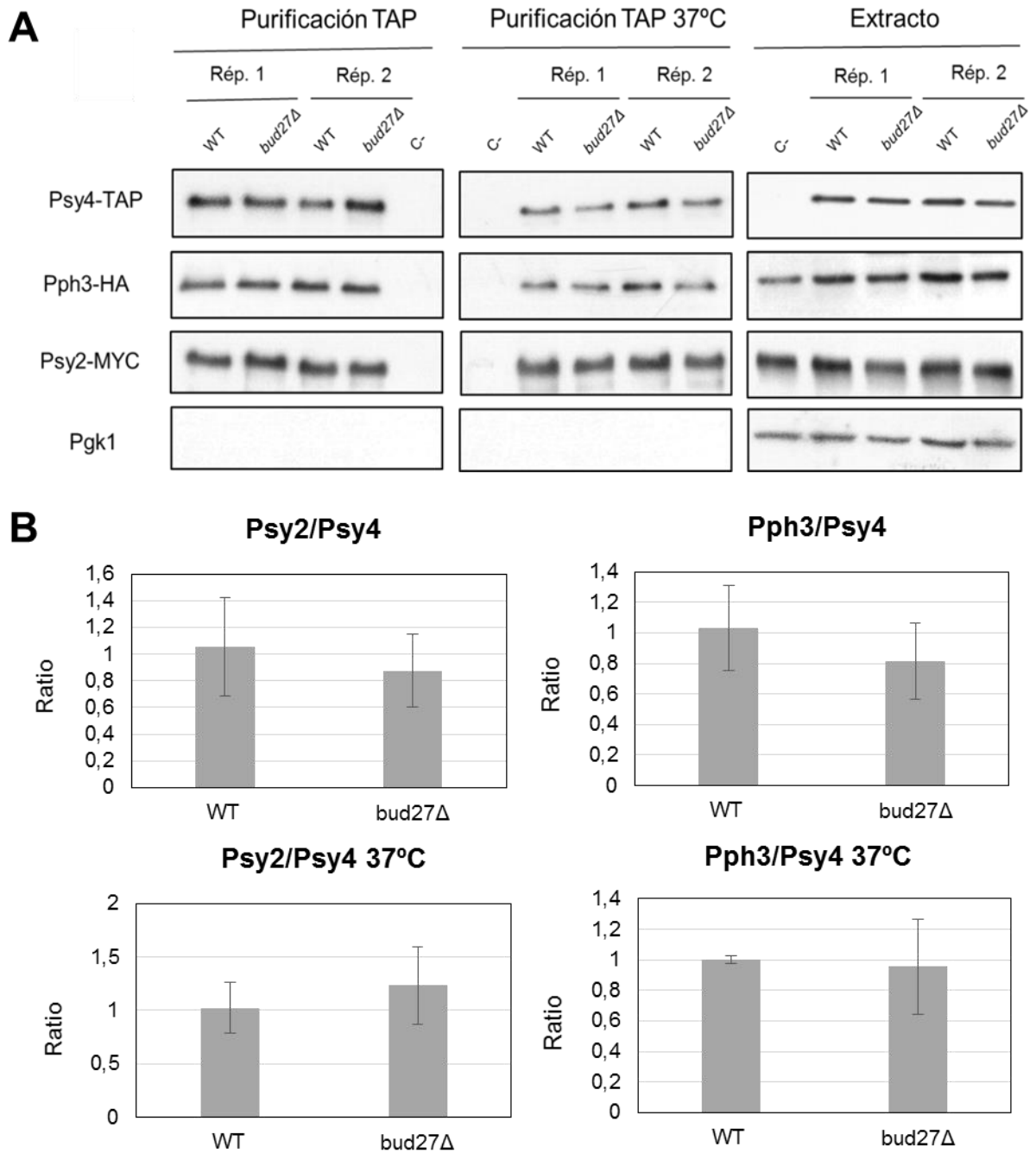
**Figura R28. Estudio de la respuesta a daño en el ADN dependiente de Bud27 y PP4.** A). Análisis de las fases del ciclo celular de las cepas mutantes y de su cepa isogénica silvestre durante el daño en el ADN, analizado por citometría de flujo. Las cepas *pph3Δ* (AC1327), *bud27Δ* (YFN802), *pph3Δ bud27Δ* (YFN803) y su cepa isogénica silvestre (AC1822) se cultivaron en medio YPD hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento (D.O.<sub>600</sub>~0,6) y se pasaron a medio YPGal para inducir los cortes en el ADN por la endonucleasa HO. B) Análisis de la cinética de fosforilación y desfosforilación de Rad53 tras la inducción del daño al ADN. Siguiendo el mismo procedimiento experimental anterior, se recogieron alícuotas para hacer extracción de proteínas (con TCA) y analizar por SDS-PAGE y western blot con el anticuerpo específico anti-Rad53. Las membranas se tiñeron después con azul coomassie como control de carga.

Los experimentos de sensibilidad a drogas genotóxicas y los defectos en la desfosforilación de Rad53 tras provocar un daño en el ADN indican, en conjunto, que la falta de Bud27 altera la función de PP4 de una forma más general, y no solamente de manera específica sobre Maf1. Esto sugiere que Bud27 podría actuar como un regulador/modulador

de la actividad de PP4. Estos resultados nos llevan a estudiar la conexión entre Bud27 y la función de PP4.

#### **4. Análisis del papel de Bud27 como posible cochaperona en el ensamblaje y/o estabilidad del complejo PP4**

Bud27 (también URI) es una *prefoldin-like* para la que se ha propuesto un papel como cochaperona en múltiples procesos (Martínez-Fernández et al., 2015; Martínez-Fernández et al., 2018; Millán-Zambrano and Chávez, 2014). De hecho, el grupo del Dr. Navarro demostró el papel de Bud27 en el ensamblaje citoplasmático de las 3 ARN polimerasas (Mirón-García et al., 2013). En la misma línea, URI forma parte del complejo R2TP/*prefoldin-like* en humanos, que ha sido relacionado con el ensamblaje citoplasmático de la ARN polimerasa II (Mita et al., 2013). Además, se ha demostrado interacción directa de Bud27 con algunas chaperonas como Ssb1 (Deplazes et al., 2009). Bajo esta premisa, nuestra hipótesis inicial es que Bud27, en su función cochaperona, pudiera estar mediando el ensamblaje del complejo PP4 y, por tanto, regulando su actividad. De las 3 subunidades del complejo PP4, la subunidad reguladora Psy2 se asocia de forma estable con la subunidad catalítica Pph3, siendo imprescindible para la actividad de PP4 (Gingras et al., 2005; Hustedt et al., 2015; Keogh et al., 2006; Oler and Cairns, 2012; O'Neill et al., 2007). Psy4 también forma parte del complejo PP4, aunque su función podría ser simplemente la de conferir cierta especificidad por algunos sustratos como H2A (Keogh et al., 2006). Dado que no existe información acerca del proceso de biogénesis y ensamblaje del complejo PP4, como primera aproximación decidimos purificar el complejo completo PP4 (Pph3-Psy2-Psy4), usando Psy4-TAP, en un mutante carente de Bud27 y en la cepa silvestre, con el fin de detectar posibles alteraciones en la estequiometría del mismo, que pudiera ser indicativo de alteraciones de su estabilidad. Como puede verse en la Figura R29, no se observaron diferencias importantes en los niveles de las diferentes proteínas del complejo PP4 en el mutante *bud27Δ* respecto a la cepa silvestre. De igual manera, los experimentos realizados tras la incubación de los extractos a 37°C previo a la purificación del complejo PP4, no mostraron variaciones significativas.

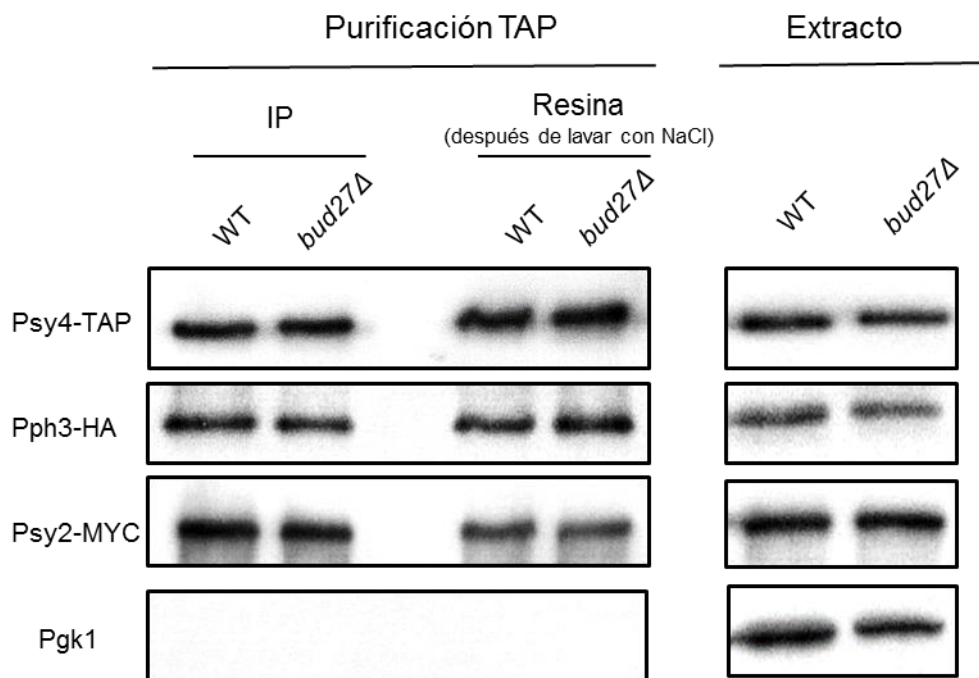


**Figura R29. Purificación del complejo PP4 en cepas *bud27Δ* y silvestre mediante purificación TAP.** A) 1 mg de proteína total de la cepa *bud27Δ* (YFN801) y su cepa isogénica silvestre (WT; YFN800), crecidas en medio YPD a 30°C hasta llegar a fase exponencial (D.O.<sub>600</sub>~0,7), se utilizaron para la purificación TAP directamente tras la extracción o tras haber sido incubados previamente a 37°C durante 30 minutos. Se analizó el resultado de las purificaciones mediante western blot utilizando los anticuerpos anti-PAP (Psy4-TAP), anti-HA (Pph3-HA), anti-MYC (Psy2-MYC) y anti-Pgk1 (ver subapartado 4.2.3. de Material y Métodos para más información sobre el procedimiento experimental). B) Cuantificación relativa de la intensidad de las bandas con el software TOTAL LAB. Los valores se presentan como el ratio de cada proteína frente a la proteína purificada (Psy4-TAP), a partir de cuatro réplicas biológicas independientes. No se observaron diferencias significativas, mediante el análisis por *t de Student*.

## Resultados. Capítulo II

Los resultados mostrados indican que no hay alteraciones en la estequiometría de los componentes del complejo PP4 cuando falta Bud27, y sugieren que la estabilidad del complejo PP4 tampoco se ve alterada.

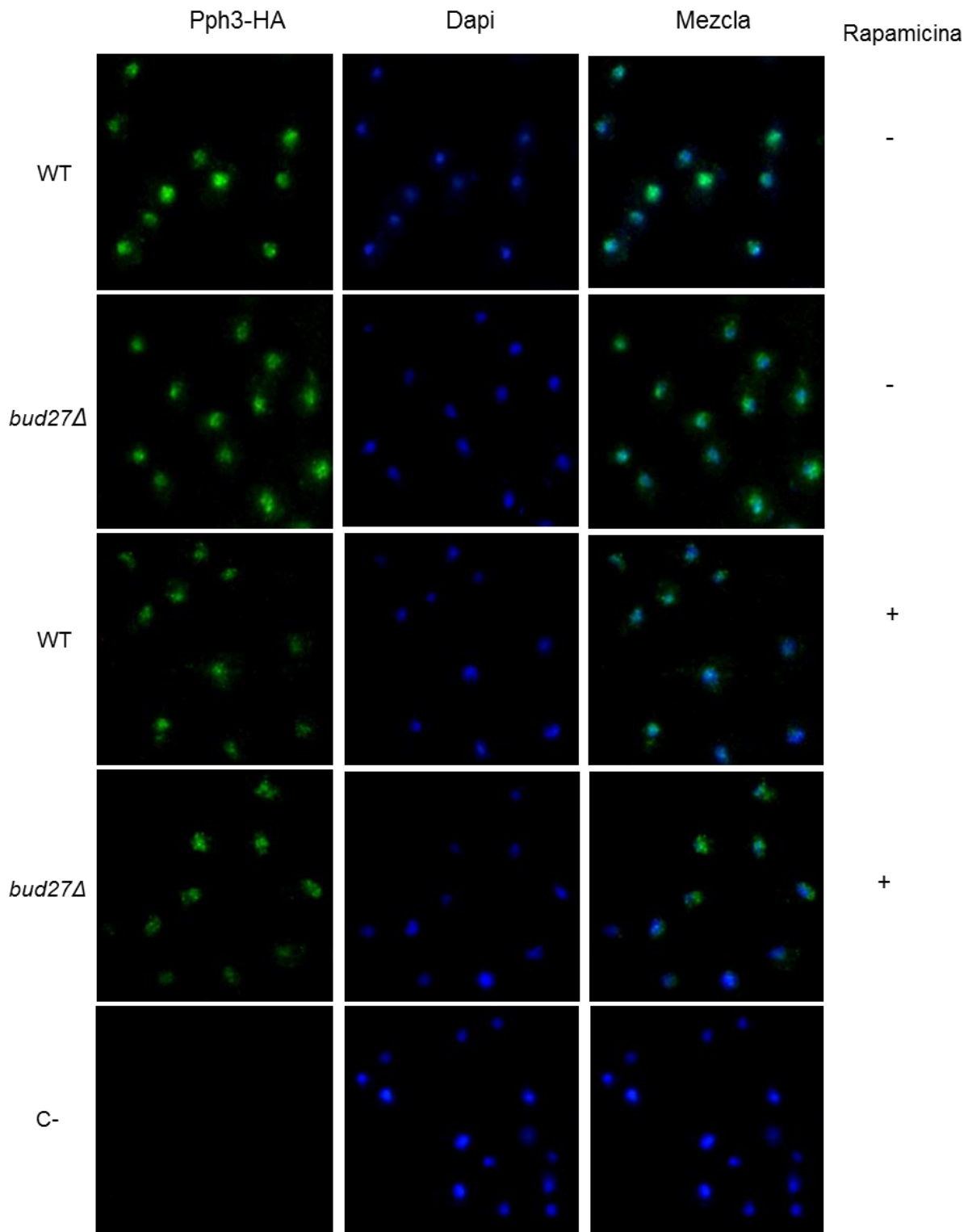
Para analizar en más detalle un posible efecto en la estabilidad de PP4, se realizó una purificación del complejo (Psy4-TAP) utilizando un gradiente de NaCl. Nuestra hipótesis era que, si el complejo era más inestable en el mutante *bud27Δ*, las subunidades del complejo PP4 se desensamblarían, por lo menos parcialmente, a medida que se realizan lavados con concentraciones crecientes de NaCl durante la purificación. Sin embargo, como puede observarse en la Figura R30, la cantidad de las diferentes proteínas del complejo PP4 purificado antes de los lavados y tras el gradiente con NaCl fue equivalente, tanto en el silvestre como en el mutante *bud27Δ*, lo que indica que la estabilidad del heterotrímero PP4 no parece estar alterada de forma importante cuando falta Bud27.



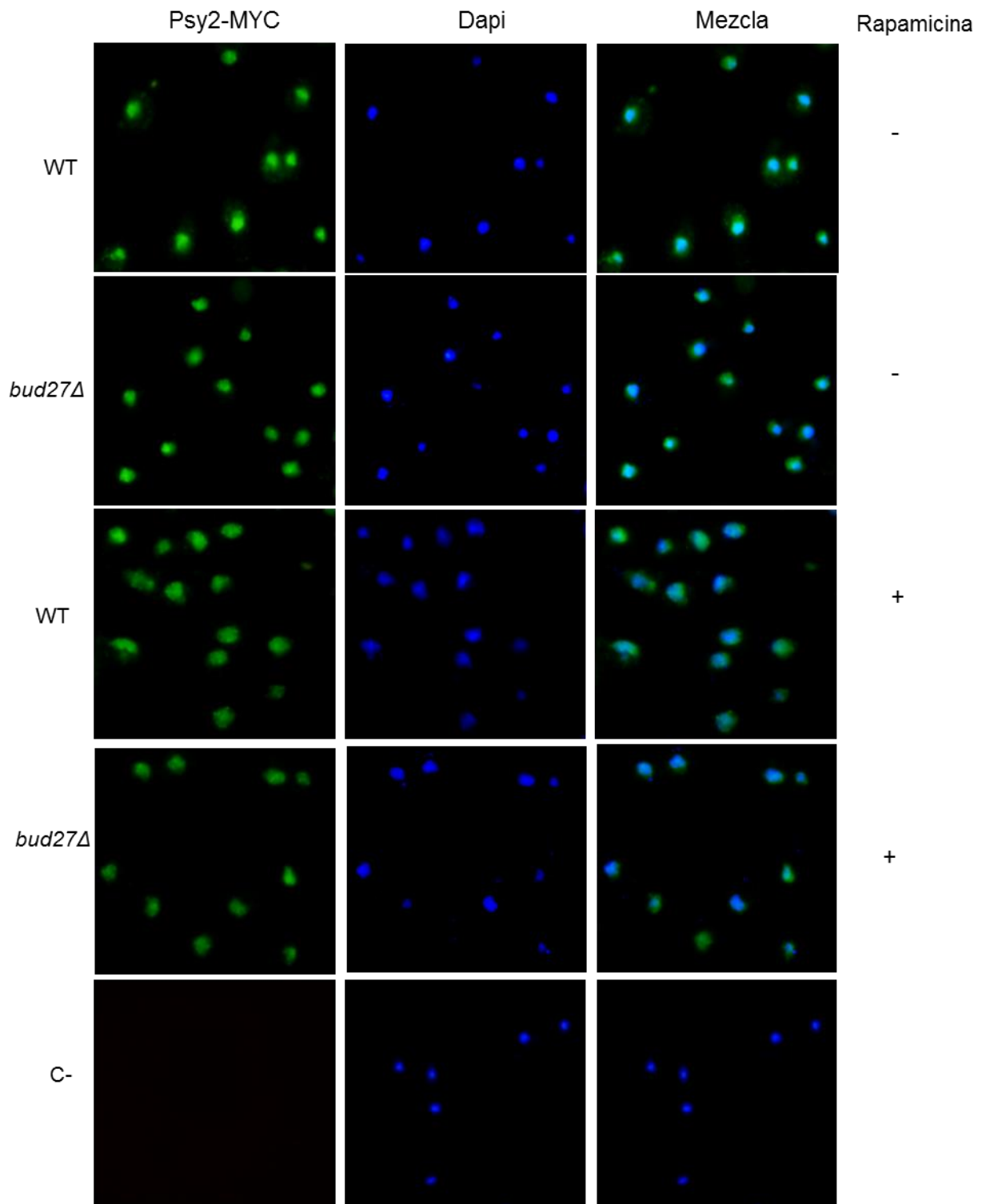
**Figura R30. Análisis de la estabilidad del complejo PP4 en cepas *bud27Δ* y silvestre.** 2 mg de proteína total de las cepas *bud27Δ* (YFN801) y su cepa isogénica silvestre (WT; YFN800) crecidas en medio YPD a 30°C hasta llegar a fase exponencial (D.O.<sub>600</sub>~0,7), se utilizaron para la purificación TAP siguiendo el procedimiento habitual o una modificación del mismo, lavando la IP con concentraciones crecientes de NaCl (250 mM, 500 mM y 1M) (ver subapartados 4.2.2 y 4.2.3 de Material y Métodos para más información sobre el procedimiento experimental). Se analizó el resultado de las purificaciones mediante western blot utilizando los anticuerpos anti-PAP (Psy4-TAP), anti-HA (Pph3-HA), anti-MYC (Psy2-MYC) y anti-Pgk1

### 5. Localización del complejo PP4 en ausencia de Bud27

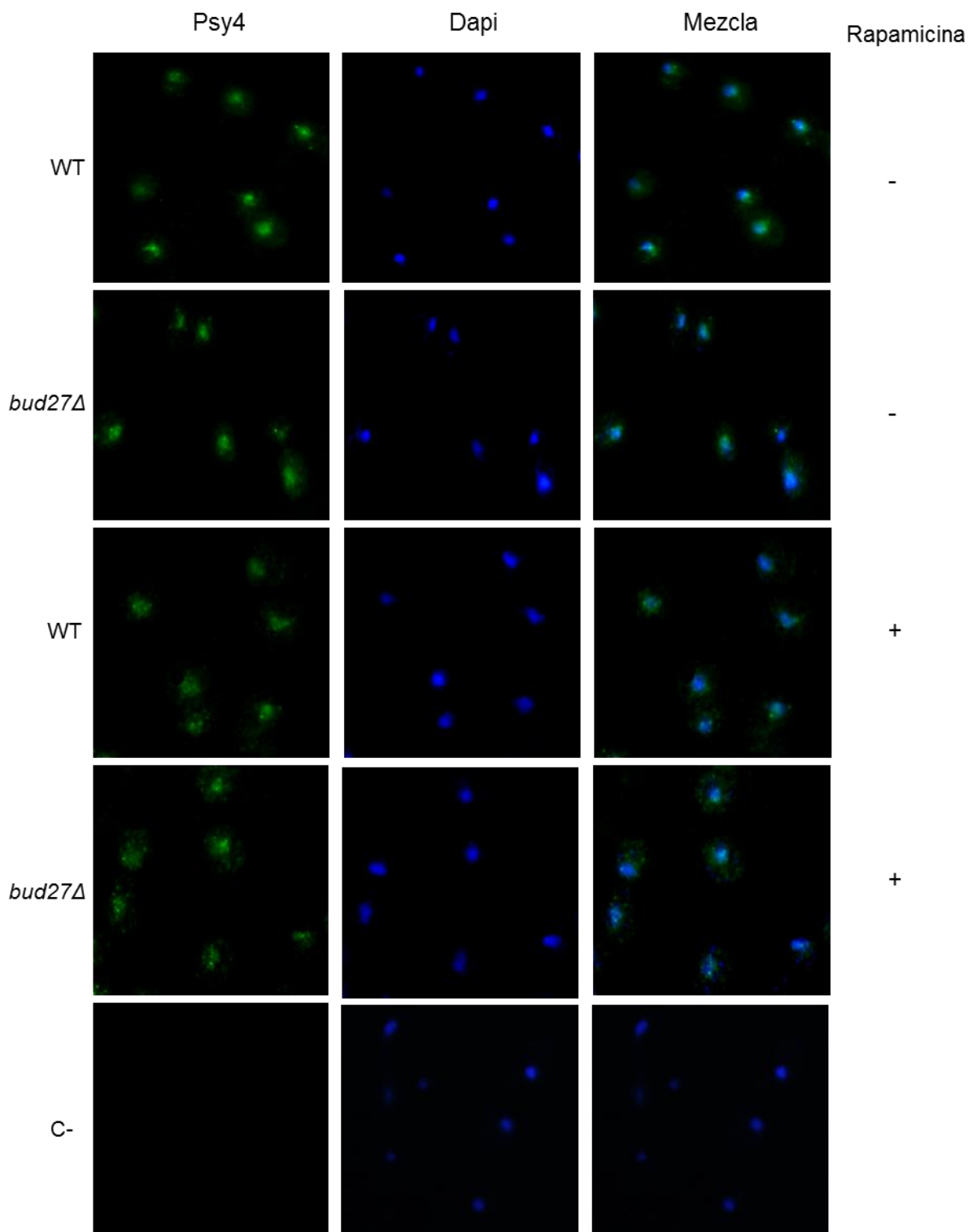
Uno de los mecanismos que regulan de manera precisa la actividad de las fosfatasa *in vivo* es su localización subcelular (Heideker et al., 2007; Park and Lee, 2020). Se ha demostrado que la subunidad Psy4 tiene una distribución núcleo-citoplasmática, aunque es mayoritariamente nuclear (Kosugi et al., 2009). En la misma línea, la subunidad reguladora Psy2 tiene una localización predominantemente nuclear (Keogh et al., 2006; Oler and Cairns, 2012). De hecho, muchos de los sustratos de PP4 identificados hasta la fecha son nucleares, como Rad53, Mth1 o la histona H2A (Keogh et al., 2006; Ma et al., 2014; O'Neill et al., 2007) (Keogh et al., 2006; Kosugi et al., 2009; Oler and Cairns, 2012). En base a ello, decidimos investigar la localización subcelular del complejo PP4 cuando falta Bud27. Para ello se realizaron experimentos de inmunofluorescencia para observar las subunidades del complejo PP4, tanto en una cepa silvestre como en un mutante *bud27Δ*, ambas conteniendo todas las subunidades con diferentes etiquetas (Pph3-HA, Psy2-MYC, Psy4-TAP), en condiciones permisivas o tras un tratamiento con rapamicina para bloquear la ruta TOR e inducir la actividad fosfatasa de PP4, por lo menos para Maf1. Los resultados de los experimentos de inmunolocalización mostraron localización nuclear de la subunidad catalítica Pph3 tanto en el silvestre como en la cepa *bud27Δ* y no se observaron diferencias importantes en la localización de esta subunidad tras el tratamiento con rapamicina (Figura R31). De igual forma, la subunidad Psy2 también mostró localización nuclear en ambas cepas coincidiendo con lo descrito previamente (Hustedt et al., 2015; Oler and Cairns, 2012), y tampoco hubo diferencias tras el tratamiento con rapamicina (Figura R32). Por su parte, la localización de la subunidad Psy4 era mayoritariamente nuclear tanto en la cepa silvestre como en la mutante *bud27Δ*, al igual que las otras dos subunidades del complejo PP4. De manera interesante, parte de Psy4 se distribuye en el citoplasma tras el tratamiento con rapamicina tanto en silvestre como en mutante (Figura R33). Se ha descrito previamente que la localización de Psy4 es núcleo-citoplasmática, y que esta podría depender de la fase del ciclo celular en la que se encuentre la célula (Kosugi et al., 2009). La diferencia observada en la localización de Psy4 tras el tratamiento de rapamicina podría deberse principalmente a los cambios en la fase del ciclo celular que produce este antibiótico, ya que provoca una cierta parada de las células en fase la G<sub>1</sub> del ciclo celular (Heitman et al., 1991; Zaragoza et al., 1998).



**Figura R31. Inmunolocalización de la subunidad Pph3-HA mediante microscopía de fluorescencia.** Inmunolocalización de Pph3-HA en el mutante *bud27Δ* (YFN801) y su cepa isogénica silvestre (WT; YFN800), crecidas en medio YPD a 30°C hasta alcanzar la fase exponencial (D.O.<sub>600</sub>~0,7) y tras el tratamiento con rapamicina (0,4 µg/ml, 1 hora). Para la detección de Pph3, se utilizó el anticuerpo anti-HA high affinity (3F10) (ver Tabla MyM 5). Como control se utilizó una cepa sin etiqueta (BY4741) crecida en las mismas condiciones. Las imágenes mostradas se tomaron en el microscopio de fluorescencia OLYMPUS BX51.



**Figura R32. Inmunolocalización de la subunidad Psy2 mediante microscopía de fluorescencia.** Inmunolocalización de Psy2-MYC en el mutante *bud27Δ* (YFN801) y su cepa isogénica silvestre (WT; YFN800), crecidas en medio YPD a 30°C hasta alcanzar la fase exponencial (D.O.<sub>600</sub>~0,7) y tras el tratamiento con rapamicina (0,4 µg/ml, 1 hora). Para la detección de Psy2, se utilizó el anticuerpo anti-MYC (ver Tabla MyM 5). Como control se utilizó una cepa sin etiqueta (BY4741) crecida en las mismas condiciones. Las imágenes mostradas se tomaron en el microscopio de fluorescencia OLYMPUS BX51.



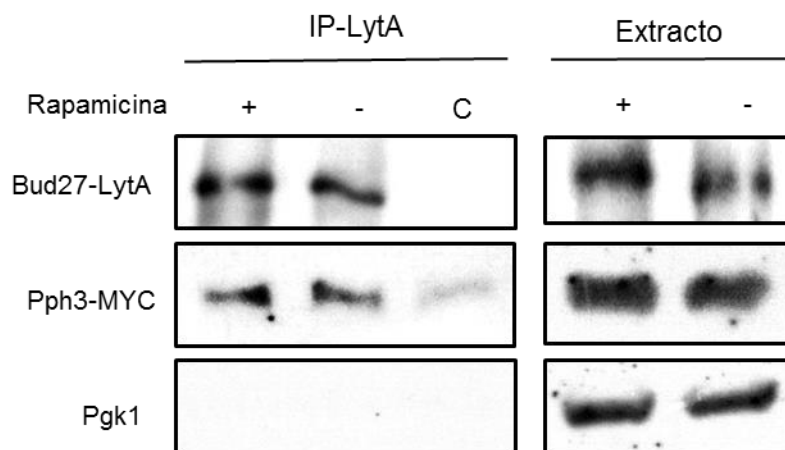
**Figura R33. Inmunolocalización de la subunidad Psy4 mediante microscopía de fluorescencia.** Inmunolocalización de Psy4-TAP en el mutante *bud27Δ* (YFN801) y su cepa isogénica silvestre (WT; YFN800), crecidas en medio YPD a 30°C hasta alcanzar la fase exponencial (D.O.<sub>600</sub>~0,7) y tras el tratamiento con rapamicina (0,4 µg/ml, 1 hora). Para la detección de Psy4, se utilizó el anticuerpo anti-TAP N-terminal (ver Tabla MyM 5). Como control se utilizó una cepa sin etiqueta (BY4741) crecida en las mismas condiciones. Las imágenes mostradas se tomaron en el microscopio de fluorescencia OLYMPUS BX51.

En su conjunto, estos datos muestran que el complejo PP4 es mayoritariamente nuclear, tal y como se ha mostrado para Psy2 y Psy4 (Keogh et al., 2006; Oler and Cairns, 2012), y su localización no se ve afectada por la falta de Bud27, ni en condiciones de crecimiento exponencial ni tras el bloqueo de la vía TOR con rapamicina.

### **6. Interacción física entre Bud27 y PP4**

En el presente trabajo se ha demostrado que la falta de Bud27 provoca que la actividad de la fosfatasa PP4 sobre el regulador negativo Maf1 esté alterada. Esta alteración de la actividad tiene como consecuencia que la represión de la actividad de la ARN pol III tras un bloqueo de la ruta TOR no se realice de la forma adecuada. Además, nuestros datos indican que el efecto de Bud27 sobre la fosfatasa PP4 no es específico para Maf1. Teniendo en cuenta los datos presentados, Bud27 podría modular de forma directa la actividad de PP4, posiblemente a través de la ruta TOR.

En este apartado intentamos ahondar en el mecanismo de acción de Bud27 sobre PP4 con la hipótesis de que Bud27 pudiera actuar como un factor regulador de PP4, modulando directamente su actividad fosfatasa. De hecho, se ha demostrado que URI, en humanos, se asocia físicamente a la fosfatasa PP2A, controlando de forma directa su actividad sobre algunos sustratos (Mita et al., 2016). Para estudiar nuestra hipótesis, analizamos mediante co-inmunoprecipitación la posible interacción entre Bud27 y Pph3. Estos experimentos conllevan una diferencia respecto a los experimentos previos de inmunoprecipitación o purificación que consiste en un breve *crosslinking* antes de recoger las células. Además, la rotura celular y extracción de proteínas previas a la inmunoprecipitación se realizó incluyendo una etapa de sonicación, siguiendo los procedimientos previamente descritos por Oler y Cairns para analizar la interacción entre PP4 y Maf1 (Oler and Cairns, 2012). Como puede observarse en la Figura R34, existe interacción física entre Bud27 y Pph3, tanto en condiciones de crecimiento permisivo como tras el bloqueo de la vía TOR con rapamicina.



**Figura R34. Estudio de la interacción entre Bud27 y Pph3.** 2 mg de proteína de la cepa YFN831 (expresando Bud27-LytA y Pph3-MYC) crecidas en medio YPD a 30°C hasta alcanzar una D.O.<sub>600</sub>~0,6, y tras el tratamiento con rapamicina (0,4 µg/ml, 1 hora), fueron usados para inmunoprecipitar Bud27-LytA y analizar la interacción con Pph3-MYC. Como control negativo, se utilizó la cepa YFN815 (expresando Pph3-MYC) crecida en las mismas condiciones. Se realizaron los experimentos utilizando crosslinking con formaldehído 1% durante 15 minutos a temperatura ambiente y sonicación para la rotura celular (ver subapartado 4.2.1 del Material y Métodos para más información). Western blot con los anticuerpos anti-LytA, anti-MYC y anti-Pgk1.

Estos resultados sugieren que Bud27 a través de su unión a Pph3 podría estar modulando la actividad de PP4, facilitando el reclutamiento de sus sustratos como Maf1, al igual que ocurre con URI y PP2A en humanos (Mita et al., 2016). La posibilidad de que existan una interacción tripartita entre Bud27, PP4 y Maf1 no ha podido ser corroborada y es objeto de estudios futuros.



## **Resultados. Capítulo III**





### Capítulo III. Análisis de complejos transcripcionales de la ARN polimerasa III

#### 0. Antecedentes

La prefoldina-*like* Bud27 en levaduras y su ortólogo URI en humanos interaccionan física y funcionalmente con Rpb5, una subunidad común de las tres ARN polimerasas eucariotas (Dorjsuren et al., 1998; Gstaiger et al., 2003; Mirón-García et al., 2013; Mirón-García et al., 2014; Mita et al., 2013). Trabajos previos del grupo del Dr. Navarro demuestran que Bud27 media el ensamblaje citoplasmático de las 3 ARN polimerasas en un proceso dependiente de Rpb5 (Mirón-García et al., 2013). Bud27 no solo participa en este proceso, sino que también tiene un papel en la elongación de la transcripción de la ARN pol II, gracias a que facilita la interacción de esta con RSC (Mirón-García et al., 2014), y en la transcripción de la ARN pol III, también en relación con este mismo complejo remodelador de cromatina (Vernekar and Bhargava, 2015).

En el capítulo I de Resultados del presente trabajo hemos mostrado que la falta de Bud27 provoca defectos transcripcionales de la ARN pol III (Martínez-Fernández et al., 2020), corroborando los estudios previos de otros autores (Vernekar and Bhargava, 2015). Datos previos del grupo del Dr. Navarro demuestran que, aunque la sobreexpresión de *RPB5* en el mutante *bud27Δ* es capaz de corregir los defectos de ensamblaje de las tres ARN polimerasas (Figura R1 A; Mirón-García et al., 2013), no corrige de manera general los defectos transcripcionales de la ARN pol III (Martínez-Fernández, 2016), ni la sensibilidad al ácido micofenólico (ver Figura R1 B). Además, en el capítulo II de Resultados también se ha mostrado que la falta de Bud27 provoca una alteración del proceso de represión de la ARN pol III mediado por Maf1. Todos estos datos sugieren un importante papel de Bud27 sobre la actividad global de la ARN pol III. En el presente capítulo se aborda el estudio de los complejos transcripcionales de la ARN pol III en ausencia de Bud27 mediante el análisis de la composición proteica de la cromatina en el entorno de la ARN pol III. Para ello, se llevaron a cabo análisis mediante espectrometría de masas cuantitativa con *iTRAQ*<sup>TM</sup>, en el grupo del Doctor Jorge Pérez Fernández en el departamento de Bioquímica III de la Universidad de Regensburg (Alemania), dirigido por el Profesor Herbert Tschochner.

### 1. Análisis de la estequiometría de la ARN pol III

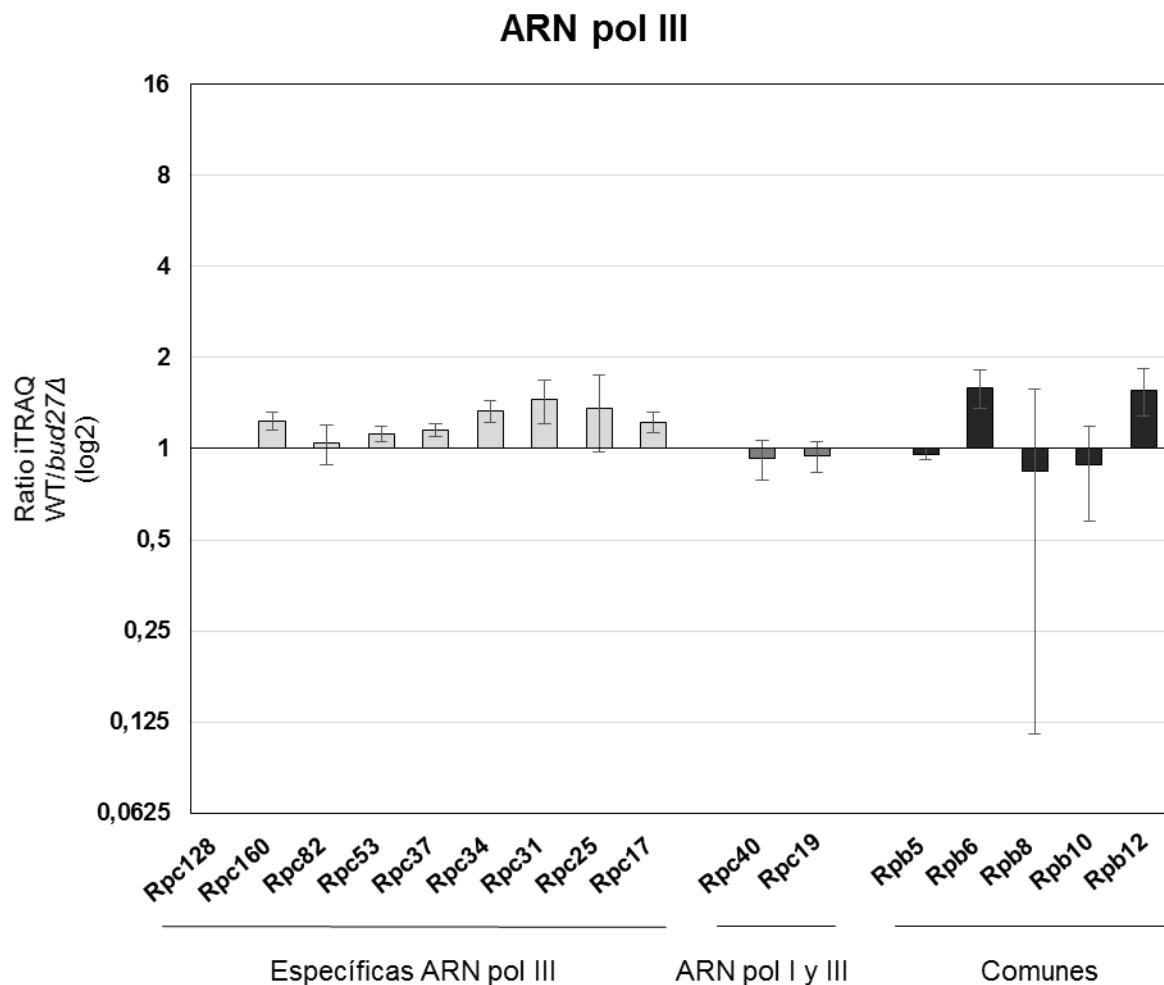
Para determinar el papel de Bud27 sobre la transcripción mediada por la ARN pol III, se analizaron mediante ProteomChIP y espectrometría de masas cuantitativa los complejos transcripcionales de la ARN pol III en el mutante *bud27Δ*, en comparación con la cepa isogénica silvestre. La técnica de ProteomChIP permite la purificación de complejos proteicos en cromatina y su análisis mediante espectrometría de masas (Hierlmeier et al., 2013). Para ello, se generaron cepas silvestres y carentes de Bud27 conteniendo una versión funcional de Rpc128, segunda subunidad mayor de la ARN pol III, etiquetada con TAP, Rpc128-TAP. Utilizando la técnica de ProteomChIP se solubilizó la cromatina presente en extractos celulares obtenidos tras un *crosslinking* con formaldehído y se purificó la subunidad Rpc128-TAP con IgG de conejo acoplada a esferas magnéticas. En este sentido, cabe destacar que el *crosslinking* al que se someten las muestras antes de ser analizadas por espectrometría de masas, supone que también se puedan identificar proteínas de regiones próximas a la proteína purificada, en este caso la subunidad Rpc128 de la ARN pol III. Tras la elución, las muestras se trataron con tripsina y los péptidos se marcaron con los reactivos *iTRAQ*<sup>TM</sup> de forma previa a su separación mediante cromatografía líquida de alta resolución y posterior análisis por espectrometría de masas en tándem. El marcaje de las muestras con *iTRAQ*<sup>TM</sup> permitió la posterior cuantificación relativa de la intensidad de la señal para cada péptido identificado (Jakob et al., 2012).

Tras la inmunoprecipitación de Rpc128-TAP, el análisis por espectrometría de masas en tándem permitió identificar un total de 896 proteínas, sin aplicar ningún tipo de filtrado inicial, más allá de los utilizados por el servicio *Biochemie-Zentrum Regensburg (BZR), Lehrstuhl Biochemie I*, de la Universidad de Regensburg (Jakob et al., 2012). En primer lugar, dirigimos nuestro objetivo hacia el estudio de la estequiometría de la ARN pol III. En este caso vamos a analizar los datos de manera dirigida sin aplicar ningún filtro y sin tener en cuenta el número de péptidos identificados ni las desviaciones estándar de la media del ratio *iTRAQ* WT/*bud27Δ* de cada proteína. Identificamos 16 subunidades de las 17 que conforman la enzima y que se detallan en la Tabla R1, quedando únicamente sin detectarse la subunidad de menor peso molecular, Rpc11. De entre todas ellas, 5 subunidades son comunes a las tres ARN polimerasas (Rpb5, Rpb6, Rpb8, Rpb10 y Rpb12) y 2 subunidades, Rpc40 y Rpc19, son comunes entre las ARN polimerasas I y III (Tabla R1).

Nombre	Nº de péptidos	Coverage (%)	Descripción
<b>Rpc128</b>	22	19	ARN pol III
<b>Rpc160</b>	38	24	ARN pol III
<b>Rpc82</b>	14	22	ARN pol III
<b>Rpc53</b>	8	22	ARN pol III
<b>Rpc37</b>	4	17	ARN pol III
<b>Rpc34</b>	4	10	ARN pol III
<b>Rpc31</b>	4	21	ARN pol III
<b>Rpc25</b>	1	4	ARN pol III
<b>Rpc17</b>	6	28	ARN pol III
<b>Rpc40</b>	10	30	ARN pol I y III
<b>Rpc19</b>	1	8	ARN pol I y III
<b>Rpb5</b>	4	27	Común
<b>Rpb6</b>	2	12	Común
<b>Rpb8</b>	1	10	Común
<b>Rpb10</b>	2	17	Común
<b>Rpb12</b>	1	11	Común

**Tabla R1. Subunidades de la ARN pol III identificadas tras la purificación de Rpc128-TAP mediante ProteomChIP y espectrometría de masas.** La cepa mutante *bud27Δ* (YFN805) y su cepa isogénica silvestre (YFN806) se cultivaron en medio YPD líquido a temperatura permisiva (30°C) y se recogieron las células en fase exponencial (D.O.<sub>600</sub>~0,7). La subunidad Rpc128-TAP asociada a cromatina se purificó mediante la técnica ProteomChIP, se realizó un marcaje de las muestras con *iTRAQ*<sup>TM</sup> (ver subapartado 4.2.6 del Material y Métodos) y los resultados se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas en tándem (HPLC-MALDI-TOF/TOF).

El marcaje de los péptidos de cada muestra con *iTRAQ*<sup>TM</sup> nos permitió realizar una cuantificación relativa de la abundancia de cada péptido en las diferentes purificaciones, y con ello, de cada proteína identificada (Jakob et al., 2012). La cuantificación de la señal relativa a las subunidades específicas de la ARN pol III mostró que no había diferencias importantes entre la cepa silvestre y el mutante *bud27Δ*, ya que no observamos diferencias mayores de 2 o inferiores a 0,5 (Figura R35). Del mismo modo, tampoco se observaron diferencias importantes en la cuantificación de las subunidades comunes de la ARN pol I y III entre la cepa silvestre y el mutante *bud27Δ* (Figura R35). Por último, la cuantificación de las subunidades comunes de las tres ARN polimerasas tampoco mostró diferencias importantes (mayores que 2 o inferiores a 0,5). Curiosamente, las subunidades Rpb6 y Rpb12 parecen estar ligeramente más enriquecidas en la cepa silvestre, con ratios *iTRAQ* WT/*bud27Δ* de 1,6 aproximadamente para ambas proteínas (Figura R35). No obstante, esta menor presencia de algunas subunidades de la ARN pol III en cromatina podría sugerir una enzima más inestable en el mutante *bud27Δ*, lo cual será objeto de estudios futuros.



**Figura R35. Análisis de la estequiometría de las subunidades de la enzima ARN pol III identificadas mediante espectrometría de masas cuantitativa.** La cepa mutante *bud27Δ* (YFN805) y su cepa isogénica silvestre (YFN806) se cultivaron en medio YPD líquido a temperatura permisiva (30°C) y se recogieron en fase exponencial (D.O.<sub>600</sub>~0,7). La subunidad Rpc128-TAP asociada a cromatina se purificó mediante la técnica ProteomChIP, se realizó un marcaje de las muestras con *iTRAQ*<sup>TM</sup> (ver subapartado 4.2.6 del Material y Métodos) y los resultados se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas en tándem (HPLC-MALDI-TOF/TOF). Los resultados de cada muestra analizada se normalizaron frente al valor de Rpc128-TAP. Se muestran los resultados como la media del ratio del valor detectado con el marcaje entre silvestre/mutante *bud27Δ* (WT/*bud27Δ*) de dos réplicas biológicas independientes.

Los datos en su conjunto sugieren que la falta de Bud27 no provocaría cambios sustanciales en la estequiometría de la ARN pol III en el complejo transcripcional asociado a cromatina.

Con el objetivo de seguir profundizando en el análisis de los complejos transcripcionales de la ARN pol III, se decidió analizar, de manera dirigida a partir de los datos proteómicos obtenidos, aquellas proteínas consideradas como factores de transcripción de la ARN pol III.

### 2. Análisis de los factores de transcripción de la ARN pol III

Además de estudiar el impacto que la falta de Bud27 puede causar en la composición y la estequiometría de la ARN pol III, también analizamos los factores de transcripción basales, con objeto de comprobar si pudiera haber alguna alteración que explicase los defectos transcripcionales observados en el mutante *bud27Δ* y establecer hipótesis para estudios futuros. En la técnica de ProteomChIP el *crosslinking* al que se someten los cultivos conlleva la fijación de las proteínas entre ellas y con el ADN, lo que nos permite, no solo estudiar la enzima sino también los complejos proteicos adyacentes (Hierlmeier et al., 2013). Al igual que con las subunidades de la enzima ARN pol III, para el análisis de los factores de transcripción basales no se aplicó ningún filtrado de los datos proteómicos, sino que se comparó la señal iTRAQ de cada factor identificado en el silvestre con respecto al mutante *bud27Δ* (ratio iTRAQ WT/*bud27Δ*).

De todas las proteínas que forman los factores de transcripción basales de la ARN pol III, las que se identificaron en nuestro análisis de ProteomChIP y espectrometría de masas se detallan en la Tabla R2.

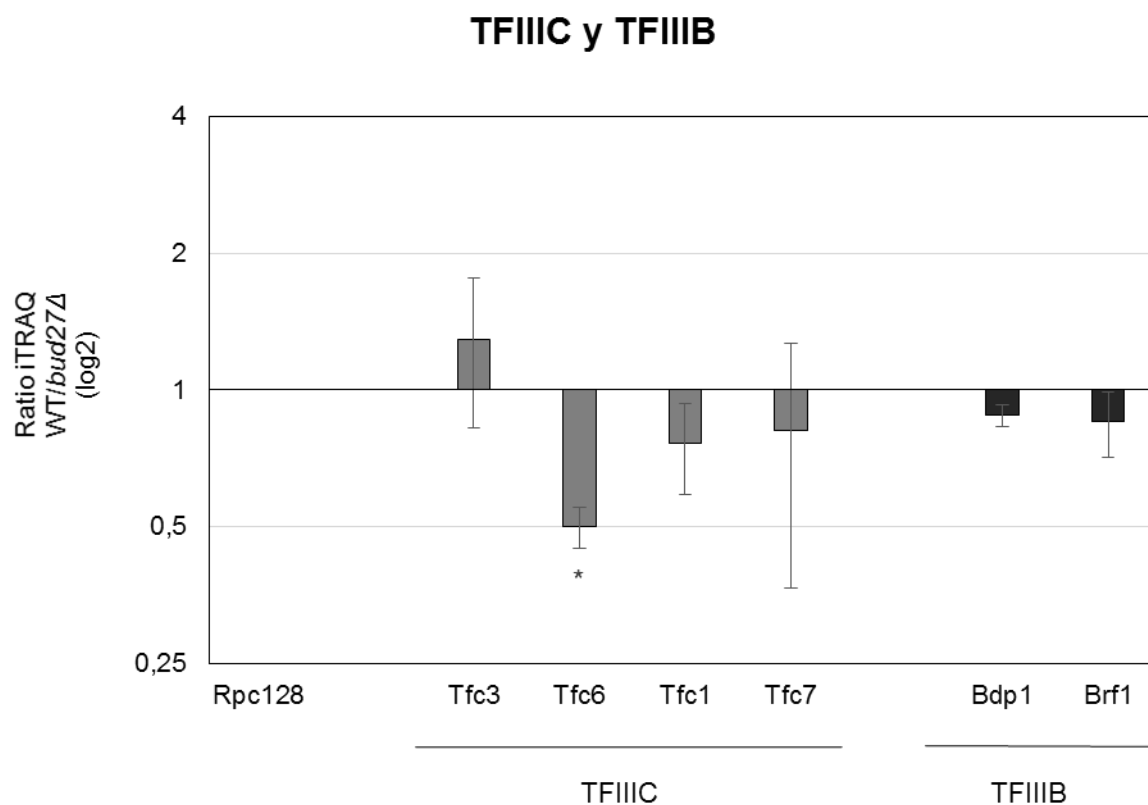
Nombre	Nº de péptidos	Coverage (%)	Descripción
Tfc3	1	1	TFIIIC
Tfc7	2	7	TFIIIC
Tfc1	2	3	TFIIIC
Tfc6	2	4	TFIIIC
Bdp1	7	14	TFIIIB
Brf1	2	6	TFIIIB

**Tabla R2. Subunidades de los factores de transcripción basales de la ARN pol III identificadas tras la purificación de Rpc128-TAP mediante ProteomChIP y espectrometría de masas.** La cepa mutante *bud27Δ* (YFN805) y su cepa isogénica silvestre (YFN806) se cultivaron en medio YPD líquido a temperatura permisiva (30°C) y se recogieron las células en fase exponencial (D.O.<sub>600</sub>~0,7). La subunidad Rpc128-TAP asociada a cromatina se purificó mediante la técnica ProteomChIP, se realizó un marcaje de las muestras con *iTRAQ*<sup>TM</sup> (ver subapartado 4.2.6 del Material y Métodos) y los resultados se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas en tándem (HPLC-MALDI-TOF/TOF).

Como puede observarse en la Tabla R2, se han identificado proteínas de los factores de transcripción basales TFIIIC y TFIIIB, necesarios para la expresión de todos los tipos de genes que transcribe la ARN pol III (Acker et al., 2013; Schramm and Hernandez, 2002; Turowski and Tollervey, 2016). En concreto, se han identificado cuatro de los seis factores que forman TFIIIC, y dos de los tres que forman TFIIIB (Tabla R2). El factor de transcripción basal Spt15 o proteína de unión a TATA, a pesar de ser un factor general de las tres ARN

polimerasas, no se ha identificado. Del mismo modo, tampoco se ha identificado la proteína Pzf1 o TFIIIA, necesaria para la transcripción del gen *RDN5*.

La cuantificación de la señal de iTRAQ de los factores de transcripción basales de la ARN pol III identificados mostró un menor enriquecimiento de la subunidad Tfc6 de TFIIIC en las muestras de las cepas silvestres comparadas con el mutante *bud27Δ* (ratio iTRAQ WT/*bud27Δ* = 0,49), mientras que las otras tres subunidades del complejo TFIIIC identificadas (Tfc3, Tfc1 y Tfc7) se mantuvieron sin variaciones importantes (Figura R36). Tampoco se observaron diferencias considerables para las subunidades de TFIIIB (Bdp1 y Brf1) entre la cepa silvestre y el mutante *bud27Δ* (Figura R36).



**Figura R36. Análisis de la estequiometría de los factores de transcripción basales de la ARN pol III identificados mediante espectrometría de masas cuantitativa.** La cepa mutante *bud27Δ* (YFN805) y su cepa isogénica silvestre (YFN806) se cultivaron en medio YPD líquido a temperatura permisiva (30°C) y se recogieron en fase exponencial (D.O.<sub>600</sub>~0,7). La subunidad Rpc128-TAP asociada a cromatina se purificó mediante la técnica ProteomChIP, se realizó un marcaje de las muestras con *iTRAQ*<sup>TM</sup> (ver subapartado 4.2.6 del Material y Métodos) y los resultados se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas en tándem (HPLC-MALDI-TOF/TOF). Los resultados de cada muestra analizada se normalizaron frente al valor de Rpc128-TAP. Se muestran los resultados como la media del ratio del valor detectado con el marcaje entre silvestre/mutante *bud27Δ* (WT/*bud27Δ*) de dos réplicas biológicas independientes. Los asteriscos indican ratios iTRAQ de WT/*bud27Δ* por debajo de 0,5 para la proteína en cuestión.

Los resultados mostrados en este apartado podrían sugerir que la ausencia de Bud27 provocaría una alteración en el correcto reclutamiento de TFIIIC a los promotores de genes transcritos por la ARN pol III o bien defectos en la interacción de las distintas subunidades que forman el TFIIIC. Por otro lado, los resultados no sugieren variaciones importantes en TFIIIB asociado al complejo transcripcional. Son necesarios nuevos experimentos para corroborar estos datos y analizar su impacto en la transcripción.

### **3. Análisis de otros elementos relacionados con la transcripción de la ARN pol III**

Dado que la técnica de ProteomChIP nos permite estudiar otras proteínas asociadas a la cromatina, además de la ARN pol III y sus factores de transcripción, decidimos analizar otros elementos relacionados con la transcripción de la ARN pol III y comprobar si hubiera alguna alteración cuando falta Bud27 que permita explicar los defectos transcripcionales observados en el mutante *bud27Δ*. En nuestro análisis de ProteomChIP se identificaron algunas de las proteínas descritas en la bibliografía que podrían estar relacionadas con la transcripción de la ARN pol III (Acker et al., 2013; Turowski and Tollervey, 2016) que se detallan a continuación.

Sub1 es una proteína descrita con un posible papel en el proceso de transcripción de la ARN pol III, ya que se ha sugerido que pueda intervenir en el reciclaje de la ARN pol III desde la región terminadora hasta la zona promotora (Acker et al., 2014; Conesa and Acker, 2010; Rosonina et al., 2009; Tavenet et al., 2009). Sin embargo, no se detectó Sub1 en nuestro análisis de ProteomChIP. Por su parte, Maf1 es el único regulador negativo conocido de la ARN pol III (Boguta, 2013), aunque tampoco se identificó en nuestro análisis de ProteomChIP.

La proteína de unión a ARN, Nab2, se ha propuesto como un factor que puede modular positivamente la transcripción de la ARN pol III gracias a que favorecería la interacción de TFIIIB con el promotor, además de unirse físicamente a la ARN pol III y a TFIIIB (Reuter et al., 2015). También se han identificado elementos del complejo FACT, el cual se ha relacionado con el posicionamiento de nucleosomas en genes ADNts y con la expresión de esos mismos genes (Mahapatra et al., 2011; Shukla et al., 2020). El complejo FACT está formado por tres proteínas (Formosa et al., 2001), de las cuales se han identificado dos en nuestro análisis de ProteomChIP: Pob3 y Spt16. También se han detectado algunas subunidades del complejo remodelador de cromatina ATP-dependiente RSC, incluida la subunidad catalítica Sth1. Se ha descrito que hay una elevada ocupación del complejo RSC en los genes ADNts (Ng et al., 2002) y se ha propuesto que el complejo RSC favorecería una menor ocupación de nucleosomas que favorezca la actividad transcripcional de la ARN pol III (Parnell et al., 2008). Finalmente, se han identificado factores relacionados con la degradación

## Resultados. Capítulo III

de ARNts, como Rat1. Se ha descrito que la exonucleasa 5' → 3' nuclear, Rat1, degrada los ARNts inestables (Chernyakov et al., 2008). Aunque todas estas proteínas se han identificado en nuestros análisis de ProteomChIP, sus valores medios de iTRAQ WT/*bud27Δ*, junto con los valores de desviación estándar sugieren que no hay diferencias importantes entre el silvestre y el mutante *bud27Δ* (datos no mostrados).

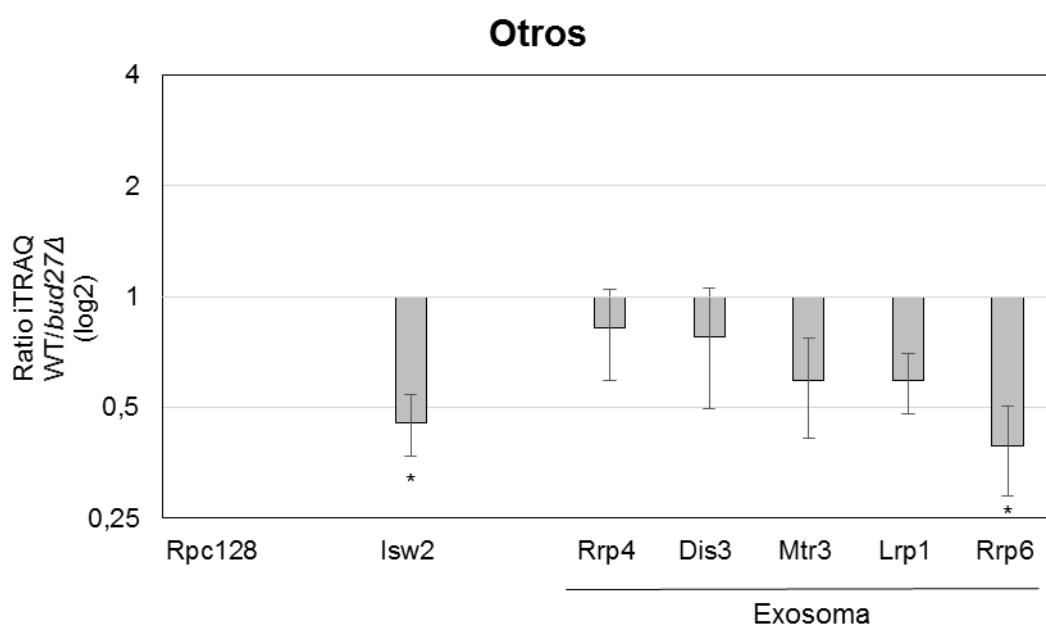
Por otra parte, se identificó el factor remodelador de cromatina Isw2 (Tabla R3), que es reclutado en los genes ADNts por TFIIIB y podría tener una función en el posicionamiento de nucleosomas y la represión de la transcripción (Whitehouse and Tsukiyama, 2006; Yadon et al., 2010). Por otro lado, se han identificado cinco proteínas del complejo exosoma (Tabla R3), el cual se encuentra distribuido por toda la célula, incluido el nucleolo, en *S. cerevisiae* (Kilchert et al., 2016). Las subunidades que lo forman varían en función de la localización celular del exosoma, existiendo algunas que son únicamente nucleares, como Rrp6 o Lrp1 (Kilchert et al., 2016). De las cinco subunidades identificadas del complejo exosoma en nuestro análisis de ProteomChIP, dos de ellas son exclusivamente nucleares (Tabla R3).

Nombre	Nº de péptidos	Coverage (%)	Descripción
Isw2	1	1	Factor remodelador de cromatina
Rrp4	2	7	Exosoma
Dis3	4	5	Exosoma
Mtr3	1	6	Exosoma
Lrp1	3	21	Exosoma (nuclear)
Rrp6	1	2	Exosoma (nuclear)

**Tabla R3. Otras proteínas relacionadas con la transcripción de la ARN pol III o el metabolismo de los ARNts identificadas tras la purificación de Rpc128-TAP mediante ProteomChIP y espectrometría de masas.** La cepa mutante *bud27Δ* (YFN805) y su cepa isogénica silvestre (YFN806) se cultivaron en medio YPD líquido a temperatura permisiva (30°C) y se recogieron las células en fase exponencial (D.O.<sub>600</sub>~0,7). La subunidad Rpc128-TAP asociada a cromatina se purificó mediante la técnica ProteomChIP, se realizó un marcaje de las muestras con *iTRAQ*<sup>TM</sup> (ver subapartado 4.2.6 del Material y Métodos) y los resultados se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas en tándem (HPLC-MALDI-TOF/TOF).

La cuantificación de la señal con iTRAQ mostró que había mayor cantidad relativa de Isw2 en la cepa mutante *bud27Δ* que en la cepa silvestre, con un ratio WT/*bud27Δ* de 0,45. (Figura R37). Un mayor enriquecimiento de Isw2 en las zonas próximas a la ARN pol III del mutante *bud27Δ* podría sugerir mayor posicionamiento de nucleosomas y, posiblemente, represión de esos genes (Yadon et al., 2010). Sin embargo, cabe destacar que solo se identificó un péptido de Isw2 (Tabla R3), por lo que sería necesario plantear nuevos experimentos que puedan confirmar o desmentir si la falta de Bud27 provoca una mayor acumulación de Isw2 en los genes ADNts, lo cual podría explicar, al menos en parte, los

defectos en la transcripción de la ARN pol III en el mutante *bud27Δ*. Por otra parte, la cuantificación con iTRAQ mostró que de las cinco subunidades identificadas del complejo exosoma, la proteína Rrp6 estaba en mayor cantidad relativa en el mutante *bud27Δ*, con un ratio WT/*bud27Δ* de 0,39 (Figura R37), aunque tan solo se identificó un péptido (Tabla R3). Las demás subunidades del complejo exosoma se muestran también en el gráfico (Figura R37), aunque no se observaron diferencias importantes entre el mutante *bud27Δ* y la cepa silvestre. Cabe destacar que Rrp6 es exclusivamente nuclear (Kilchert et al., 2016). Estos datos podrían indicar que la falta de Bud27 podría estar relacionada con una mayor tasa de degradación de ARNts.



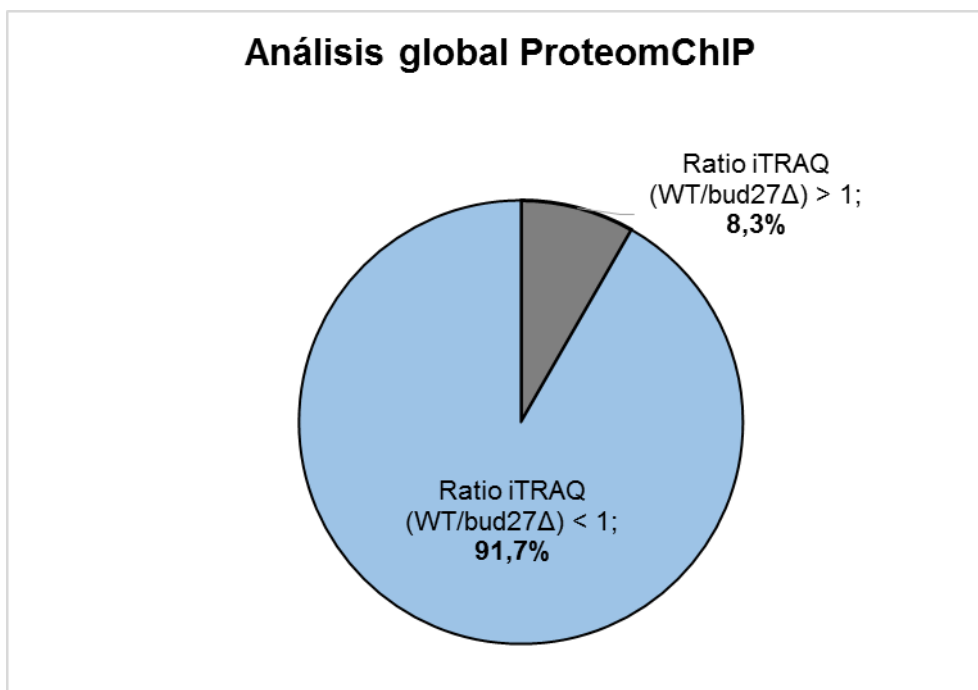
**Figura R37. Análisis de los niveles de otras proteínas relacionadas con la transcripción de la ARN pol III o el metabolismo de los ARNts.** La cepa mutante *bud27Δ* (YFN805) y su isogénica silvestre (YFN806) se cultivaron en medio YPD líquido a temperatura permisiva (30°C) y se recogieron cuando alcanzaron la fase exponencial (D.O.<sub>600</sub>~0,7). La subunidad Rpc128-TAP asociada a cromatina se purificó mediante la técnica ProteomChIP, se realizó un marcaje de las muestras con *iTRAQ*<sup>TM</sup> (ver subapartado 4.2.6 del Material y Métodos) y los resultados se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas en tándem (HPLC-MALDI-TOF/TOF). Los resultados de cada muestra analizada se normalizaron frente al valor de Rpc128-TAP. Se muestran los resultados como la media del ratio del valor detectado con el marcaje entre silvestre/mutante *bud27Δ* (WT/*bud27Δ*) de dos réplicas biológicas independientes. Los asteriscos indican ratios iTRAQ de WT/*bud27Δ* por debajo de 0,5 para la proteína en cuestión.

Estos datos en su conjunto parecen sugerir que la ausencia de Bud27 puede provocar un mayor posicionamiento de nucleosomas y, además, mayor tasa de degradación de los transcritos de la ARN pol III. De nuevo, hacen falta nuevos experimentos a realizar en un futuro que permitan corroborar estas hipótesis.

### 4. Análisis global de los datos de ProteomChIP y generación de categorías funcionales

Una vez hemos analizado la estequiometría de la ARN pol III, los factores de transcripción basales, así como otras proteínas relacionadas con el proceso transcripcional o la degradación de transcritos, decidimos hacer un análisis global de los datos con la finalidad de identificar categorías funcionales relacionadas con aquellas proteínas que mostraron mayor variación en el ratio iTRAQ de WT/*bud27Δ*, independientemente de las indicadas en los apartados anteriores. En este caso y a diferencia de los estudios realizados anteriormente en este mismo capítulo, antes de comenzar el análisis global de los datos proteómicos se realizó un procesamiento previo de los mismos en el que se excluyeron aquellas proteínas que fueron identificadas con un solo péptido. Así, de las 896 proteínas identificadas por espectrometría de masas inicialmente, 533 contenían al menos dos péptidos. A estas proteínas se les realizó un primer filtrado con FunSpec para identificar proteínas ribosómicas y otras con localización citosólica o mitocondrial, consideradas como contaminantes del experimento. De esta manera se eliminaron un total de 116 proteínas pertenecientes a las categorías *cytosol* [GO:0005829], *mitochondrial nucleoid* [GO:0042645], *cytosolic small ribosomal subunit* [GO:0022627] y *cytosolic large ribosomal subunit* [GO:0022625], que fueron descartadas del estudio, aunque no se puede descartar que alguna de ellas se mueva entre núcleo y citoplasma. A continuación, para eliminar las proteínas con valores de iTRAQ muy variables, se descartaron aquellas cuyo valor de desviación típica fue mayor a un 25% del valor de la media de las dos réplicas del ratio de iTRAQ (WT/*bud27Δ*), quedando un total de 267 proteínas.

Tras este primer filtrado de los datos se observó que las proteínas identificadas por espectrometría de masas tras los experimentos de ProteomChIP estaban, en general, enriquecidas en el mutante *bud27Δ* (Figura R38). La media del conjunto de los ratios iTRAQ (WT/*bud27Δ*) tras haber normalizado frente al control (Rpc128-TAP) de las proteínas del experimento de ProteomChIP fue de  $0,714 \pm 0,235$ , lo cual significa que las muestras del mutante *bud27Δ* contenían, de manera general, mayor cantidad de todas las proteínas identificadas. Concretamente, se encontraron 22 proteínas cuya media del ratio iTRAQ (WT/*bud27Δ*) estaba por encima de 1 y 244 proteínas por debajo. Expresado en porcentaje, el 91,7% de las proteínas presentaron una media del ratio iTRAQ (WT/*bud27Δ*) por debajo de 1 y el 8,3% restante, por encima de 1 (Figura R38). Aunque no podemos descartar que se trate de una cuestión técnica al realizar los experimentos, una posibilidad que permitiría explicar este hecho es que la falta de Bud27 esté provocando alteraciones en la composición de la cromatina, haciendo que el mutante *bud27Δ* tenga una mayor cantidad relativa de proteínas en el entorno de la ARN pol III.



**Figura R38. Representación gráfica del análisis global de los niveles de las proteínas identificadas mediante ProteomChIP y espectrometría de masas.** Aquellas proteínas identificadas con al menos dos péptidos (533 proteínas) se analizaron con FunSpec para eliminar las pertenecientes a las categorías pertenecientes a *cytosol* [GO:0005829], *mitochondrial nucleoid* [GO:0042645], *cytosolic small ribosomal subunit* [GO:0022627] y *cytosolic large ribosomal subunit* [GO:0022625], consideradas como contaminantes. De las restantes (417 proteínas), se eliminaron del análisis global aquellas cuyo valor de desviación típica superó el 25% del valor de la media aritmética para esa proteína, quedando un total de 267 proteínas. De estas 267, el 91,7% presentaron una media del ratio iTRAQ (WT/bud27Δ) por debajo de 1, y el 8,3% restante por encima de 1. En la figura se esquematiza el porcentaje de proteínas cuyo ratio iTRAQ (WT/bud27Δ) estaba por debajo de 1 (azul) o por encima (gris).

Los resultados del análisis muestran que existe una mayor cantidad relativa de casi todas las proteínas identificadas en el entorno de la ARN pol III en el mutante *bud27Δ*.

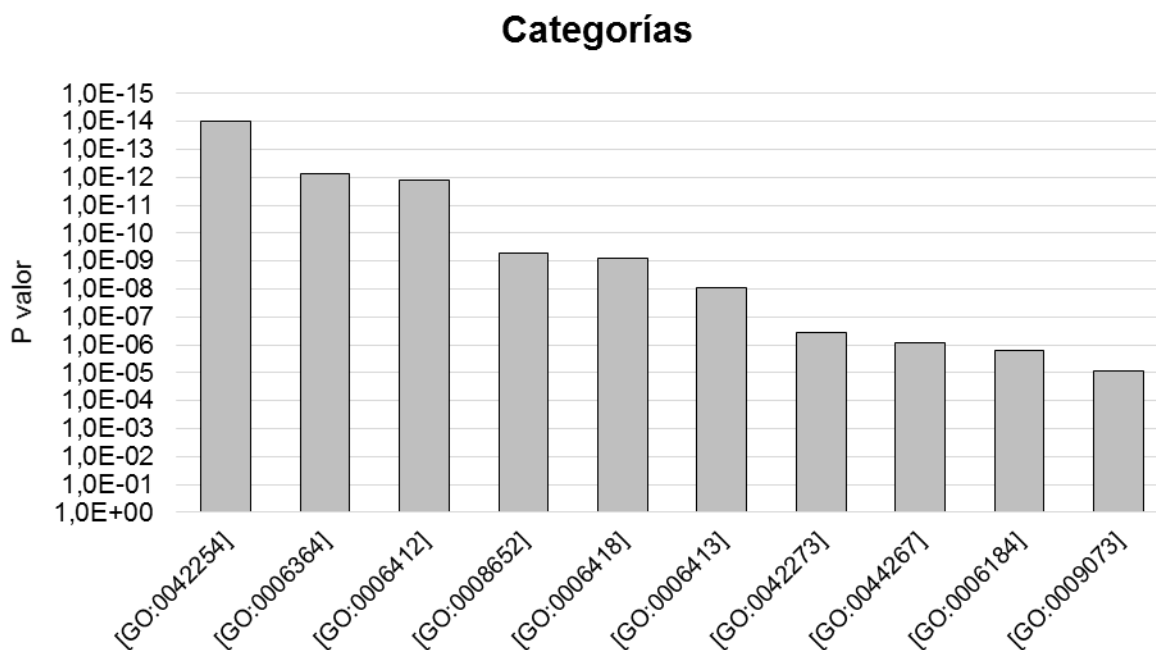
Previamente, otros autores han caracterizado un interactoma de los complejos transcripcionales de la ARN pol III, tanto en condiciones permisivas de crecimiento como en carencia de nutrientes (Bhalla et al., 2019). En este estudio purifican la ARN pol III y también los factores de transcripción basales TFIIIC y TFIIIB. En nuestro análisis global de ProteomChIP, se han identificado 46 proteínas comunes con este análisis (datos no mostrados). Sin embargo, el empleo de diferentes metodologías impide una comparación más profunda con nuestros datos, además de que en dicho trabajo se purifican los complejos desde extracto total, mientras que nuestro análisis se realiza sobre complejos transcripcionales en cromatina.

De entre aquellas proteínas enriquecidas en el silvestre con respecto al mutante *bud27Δ* (ratio iTRAQ WT/*bud27Δ* > 1), no se encontró ninguna cuyo valor fuese 2 veces o

## Resultados. Capítulo III

más. De las proteínas enriquecidas en el silvestre se identificaron tres cuyo valor aumentó 1,5 veces: Fun30, Nog1 y Rpb6. Fun30 es un factor remodelador de cromatina ATP-dependiente, con funciones importantes en el posicionamiento de nucleosomas en las zonas centroméricas y en el silenciamiento de los genes de ADN<sub>r</sub> (Awad et al., 2010; Durand-Dubief et al., 2012; Neves-Costa et al., 2009). Por su parte, Nog1 es una proteína esencial con localización nucleolar que forma parte de las partículas pre-ribosómicas 66S, participando en su ensamblaje (Kallstrom et al., 2003). Por último, tal y como se ha comentado anteriormente, la subunidad común de las ARN polimerasas Rpb6 parece tener mayor nivel relativo en el silvestre con respecto al mutante *bud27Δ*.

Teniendo en cuenta que los datos proteómicos muestran que, en general, hay un mayor enriquecimiento de casi todas las proteínas analizadas en las muestras del mutante *bud27Δ* (Figura R38), se decidió hacer un estudio de categorías funcionales (procesos biológicos) mediante FunSpec con aquellas proteínas enriquecidas en el mutante *bud27Δ* con respecto al silvestre. Los análisis globales para aquellas proteínas con un ratio iTRAQ WT/*bud27Δ* inferior a 0,5 permitieron identificar muy pocas proteínas. Por esta razón, se decidió hacer el análisis de categorías funcionales con aquellas proteínas cuyos ratios iTRAQ (WT/*bud27Δ*) fue igual o inferior a 0,75, es decir, al menos 1,5 veces enriquecida en el mutante *bud27Δ* con respecto al silvestre. De esta manera, de las 267 proteínas utilizadas para el análisis global de los datos, se utilizaron un total de 179 proteínas en nuestro análisis de categorías funcionales con el programa FunSpec, en el que se utilizaron los parámetros estándar (*p-value cutoff* =0,01; un 99% de confianza en la identificación de categorías). Las proteínas incluidas en el análisis con FunSpec, sus ratios iTRAQ (WT/*bud27Δ*) así como su desviación estándar se resumen en la Tabla suplementaria S1. Del análisis con FunSpec se han identificado las diferentes categorías funcionales (procesos biológicos) que se muestran en la Figura R39.



Proceso biológico	Descripción
[GO:0042254]	Biogénesis ribosomal
[GO:0006364]	Procesamiento de ARNrs
[GO:0006412]	Traducción
[GO:0008652]	Biosíntesis de aminoácidos
[GO:0006418]	Aminoacilación de ARNts para la traducción
[GO:0006413]	Iniciación de la traducción
[GO:0042273]	Biogénesis de la subunidad mayor ribosomal
[GO:0044267]	Metabolismo de proteínas
[GO:0006184]	Catabolismo de GTP
[GO:0009073]	Biosíntesis de aminoácidos aromáticos

**Figura R39. Análisis de categorías funcionales (GO procesos biológicos) a partir de los datos obtenidos de los experimentos de ProteomChIP.** Categorías funcionales de las proteínas utilizadas para el estudio, establecidas con el programa FunSpec utilizando los parámetros estándar ( $p$ -value cutoff =0,01) (ver Tabla S1). Aquellas proteínas identificadas con al menos dos péptidos (533 proteínas) se analizaron previamente con FunSpec para eliminar las pertenecientes a las categorías pertenecientes a citosol [GO:0005829], *mitochondrial nucleoid* [GO:0042645], *cytosolic small ribosomal subunit* [GO:0022627] y *cytosolic large ribosomal subunit* [GO:0022625], consideradas como contaminantes. De las restantes (417 proteínas), se eliminaron del análisis global aquellas cuyo valor de desviación típica superó el 25% del valor de la media aritmética para esa proteína, quedando un total de 267 proteínas. Para el análisis, se han utilizado aquellas proteínas cuyos ratios iTRAQ (WT/*bud27Δ*) fue igual o inferior a 0,75, es decir, al menos 1,5 veces enriquecida en el mutante *bud27Δ* con respecto al silvestre (179 proteínas). Se han seleccionado aquellas categorías funcionales cuyo p-valor es menor de  $10^{-5}$ .

## **Resultados. Capítulo III**

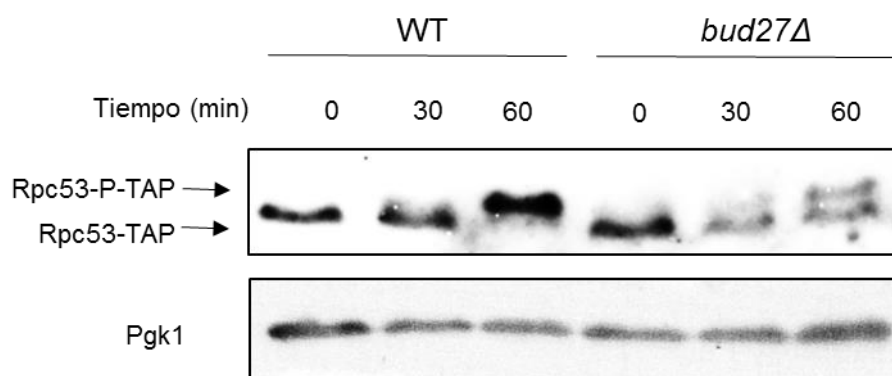
Las categorías funcionales identificadas con FunSpec con menor p-valor son “Biogénesis de ribosomas” y “Procesamiento de ARNs”, aunque también se han identificado las categorías de “Traducción”, “Biosíntesis de aminoácidos” y “Aminoacilación de ARNs para la traducción”, más relacionadas con el propio proceso celular de la traducción. La localización subcelular predominante de las 179 proteínas utilizadas para el análisis con FunSpec fue “Nucleolo”, con un p-valor de  $5,562^{-14}$  (datos no mostrados). En concordancia, un estudio sobre el interactoma de la ARN pol III mostró un resultado similar (Bhalla et al., 2019). De entre los complejos celulares identificados, el que tuvo un p-valor más bajo fue el “Complex Number 149” (p-valor =  $1^{-14}$ ), relacionado con el metabolismo del ARNr, seguido del “Complex Number 195” (p-valor =  $8,293^{-14}$ ), relacionado con transcripción y mantenimiento de la estructura cromatínica (datos no mostrados).

### **5. Estudio de la influencia de Bud27 sobre la fosforilación de la subunidad Rpc53**

Tal y como se ha mostrado en el capítulo I de Resultados del presente trabajo, Bud27 influencia la transcripción mediada por la ARN pol III. Hemos demostrado, al igual que otros autores, que la falta de Bud27 conlleva una disminución en la acumulación de algunos transcritos de la ARN pol III (Gstaiger et al., 2003; Martínez-Fernández et al., 2020; Vernekar and Bhargava, 2015). Por otra parte, en el capítulo II se ha mostrado que Bud27 también modula la actividad de Maf1, único regulador negativo conocido de la ARN pol III. Sin embargo y de manera contraria a nuestra hipótesis inicial, el impacto de la falta de Bud27 sobre la ARN pol III no parece ocurrir a través del represor Maf1. Aunque se ha considerado a Maf1 como el único regulador negativo de la ARN pol III (Boguta, 2013; Willis et al., 2004), se han descrito otros elementos de la propia enzima, así como de TFIIIB que podrían tener también una función reguladora (Lee et al., 2015). Concretamente, se ha descrito que la subunidad Rpc53 se fosforila en diferentes condiciones de estrés, y que esta fosforilación tiene una consecuencia directa en la represión de la transcripción de la ARN pol III, facilitando su interacción con Maf1 (Lee et al., 2012). Dado que la falta de Bud27 produce defectos transcripcionales en la ARN pol III, decidimos investigar si este hecho podía deberse, al menos en parte, a un mayor estado de fosforilación de la subunidad Rpc53 y por tanto a una mayor represión a través de ese mecanismo. Para ello, analizamos el estado de fosforilación de la proteína Rpc53, expresada desde un alelo funcional con etiqueta TAP (Rpc53-TAP) en condiciones óptimas de crecimiento y tras un tratamiento con rapamicina a diferentes tiempos. En la Figura R40 se muestra que, en condiciones permisivas de crecimiento, la subunidad Rpc53 se encuentra desfosforilada en el mutante *bud27Δ* y en la cepa isogénica silvestre. Tal y como se ha descrito previamente (Lee et al., 2012), la proteína Rpc53 de la cepa silvestre se fosforila tras el tratamiento con rapamicina durante una hora, indicando un estado reprimido

## Resultados. Capítulo III

de la ARN pol III (Figura R40). De manera interesante, observamos una cinética de fosforilación de Rpc53 más lenta en el mutante *bud27Δ* (Figura R40). Este resultado va en línea con lo expuesto en el capítulo II de Resultados, donde se ha mostrado que la desfosforilación de Maf1 y la represión de la ARN pol III tras un bloqueo de la vía TOR en el mutante *bud27Δ* está alterada. Estos resultados indican la necesidad de realizar un estudio más detallado de la subunidad Rpc53 y su cinética de fosforilación en una situación de ausencia de Bud27.



**Figura R40. Análisis de la fosforilación de Rpc53.** Extractos de proteínas (con TCA) de la cepa mutante *bud27Δ* (YFN813) y su cepa isogénica silvestre (WT; YDL150W TAP) crecidas en medio YPD a 30°C, a tiempo inicial y tras el tratamiento con rapamicina (0,4 µg/ml) durante 30 y 60 minutos fueron analizados mediante western blot con los anticuerpos anti-PAP y anti-Pgk1. Las flechas señalan las formas fosforilada (superior) y desfosforilada (inferior) de Rpc53.

Todos estos datos en su conjunto muestran que la falta de Bud27 podría provocar defectos en los factores de transcripción basales de la ARN pol III como TFIIC, además de otras alteraciones en proteínas relacionadas con el proceso transcripcional o la degradación de transcritos como Isw2 o componentes del complejo exosoma. Asimismo, los defectos observados durante el proceso de fosforilación de Rpc53 sugieren, al igual que lo propuesto en el capítulo II del presente trabajo, que el proceso de represión de la ARN pol III podría estar alterado por la ausencia de Bud27.



## Resultados. Capítulo III

Nombre	Media (WT/ <i>bud27Δ</i> )	Desviación típica	Nombre	Media (WT/ <i>bud27Δ</i> )	Desviación típica
His4	0,237	0,035	Sam1	0,485	0,052
Cpa2	0,244	0,015	Ssz1	0,491	0,110
Lys1	0,288	0,052	Erg9	0,495	0,056
Por1	0,318	0,068	Tfc6	0,499	0,051
Leu4	0,327	0,019	Taf5	0,502	0,054
Aro8	0,329	0,071	Imp4	0,505	0,066
Leu1	0,341	0,056	Cct7	0,514	0,128
Ubr1	0,352	0,069	Pma1	0,515	0,116
Trp5	0,364	0,008	Glt1	0,518	0,085
Gpp1	0,376	0,054	Nop4	0,521	0,116
Krs1	0,378	0,016	Sse1	0,523	0,060
Yhr020W	0,383	0,065	Pdr5	0,524	0,043
Hts1	0,389	0,079	Aro1	0,525	0,017
Trp4	0,395	0,059	Wrs1	0,526	0,052
Sec18	0,397	0,052	Cam1	0,527	0,116
Aro2	0,399	0,062	Vps1	0,528	0,065
Ilv2	0,403	0,057	Gus1	0,532	0,074
Asn1	0,406	0,101	Ala1	0,532	0,111
Utr1	0,423	0,105	Dhh1	0,535	0,110
Ydr341C	0,426	0,086	Ado1	0,547	0,096
Cdc60	0,446	0,059	Ubp10	0,548	0,123
Mae1	0,448	0,110	Pfk1	0,558	0,067
Ald5	0,449	0,083	Cct8	0,562	0,131
Hom3	0,454	0,032	Vas1	0,564	0,066
Paa1	0,456	0,076	Cpr1	0,569	0,132
Tys1	0,460	0,079	Vma1	0,569	0,106
Ade8	0,464	0,041	Tif5	0,570	0,046
Shm2	0,467	0,079	Ilv3	0,574	0,060
Trp2	0,470	0,055	Hta1	0,574	0,124
Mes1	0,470	0,088	Hta2	0,574	0,124
Ygr054W	0,474	0,099	Trm8	0,574	0,065
Abp1	0,477	0,084	Rpn1	0,579	0,065
Rnr4	0,479	0,103	Ynl01	0,581	0,096

## Resultados. Capítulo III

Hsp10	0,583	0,140	Fsh3	0,632	0,117
Tef1	0,583	0,111	Act1	0,633	0,095
Zpr1	0,585	0,031	Ola1	0,634	0,110
Zuo1	0,586	0,113	Hek2	0,634	0,146
Gfa1	0,587	0,106	Cdc33	0,634	0,113
Dpm1	0,587	0,126	Atp2	0,635	0,110
Lsg1	0,595	0,127	Sec28	0,636	0,073
Num1	0,597	0,034	Gsp1	0,636	0,028
Enp2	0,599	0,147	Gsp2	0,636	0,028
Lrp1	0,599	0,111	Rfa1	0,637	0,094
Idh2	0,601	0,087	Ydj1	0,639	0,074
Stm1	0,603	0,142	Gcd11	0,654	0,110
Arg7	0,608	0,147	Rpa190	0,655	0,158
Lia1	0,609	0,040	Sec24	0,657	0,084
Bms1	0,609	0,066	Egd2	0,657	0,119
Yef3	0,610	0,070	Utp5	0,658	0,144
Prt1	0,612	0,052	Tpa1	0,658	0,099
Asn2	0,612	0,105	Rpn7	0,659	0,100
Rpa34	0,612	0,118	Fun12	0,663	0,132
Shm1	0,612	0,112	Nop56	0,663	0,103
Pab1	0,614	0,044	Faa4	0,664	0,023
Rpp0	0,615	0,055	Erb1	0,665	0,115
Bfr1	0,615	0,055	Rpt4	0,666	0,075
Ths1	0,620	0,095	Ura2	0,666	0,054
Gnd1	0,622	0,114	Utp21	0,670	0,115
Ymr17	0,623	0,059	Frs1	0,672	0,143
Spt6	0,623	0,151	Cct2	0,674	0,018
Emg1	0,625	0,085	Scp16	0,675	0,114
Sin3	0,626	0,137	Eft1	0,676	0,111
Get3	0,626	0,094	Gdh1	0,678	0,054
Cct6	0,628	0,086	Rli1	0,681	0,105
Ade12	0,628	0,156	Myo2	0,681	0,101
Rrp15	0,686	0,107	Pol5	0,718	0,031
Gua1	0,686	0,053	Brx1	0,719	0,145

<b>Nsa1</b>	0,687	0,087	<b>Puf6</b>	0,722	0,069
<b>Pre7</b>	0,687	0,017	<b>Pfk2</b>	0,724	0,118
<b>Noc3</b>	0,687	0,164	<b>Rpg1</b>	0,725	0,133
<b>Imd4</b>	0,687	0,145	<b>Ecm29</b>	0,726	0,080
<b>Rpa135</b>	0,689	0,090	<b>Pet9</b>	0,727	0,102
<b>Nhp2</b>	0,690	0,022	<b>Ugp1</b>	0,728	0,045
<b>Lsb3</b>	0,693	0,118	<b>Cpr6</b>	0,731	0,098
<b>Zeo1</b>	0,694	0,132	<b>Pus1</b>	0,734	0,042
<b>Nop2</b>	0,694	0,138	<b>Krr1</b>	0,734	0,148
<b>Def1</b>	0,695	0,159	<b>Chc1</b>	0,734	0,088
<b>Nsa2</b>	0,699	0,079	<b>Rvb2</b>	0,735	0,103
<b>Ded1</b>	0,700	0,095	<b>Rmt2</b>	0,737	0,096
<b>Tma46</b>	0,705	0,154	<b>Srp68</b>	0,739	0,181
<b>Nop58</b>	0,707	0,072	<b>Hhf1</b>	0,740	0,142
<b>Nug1</b>	0,707	0,160	<b>Utp22</b>	0,740	0,073
<b>Ssa1</b>	0,709	0,118	<b>Rpb2</b>	0,741	0,044
<b>Tif4631</b>	0,711	0,139	<b>Sgv1</b>	0,745	0,109
<b>Prs3</b>	0,711	0,132	<b>Mrt4</b>	0,747	0,047
<b>Rlp7</b>	0,711	0,152	<b>Sah1</b>	0,749	0,131
<b>Loc1</b>	0,713	0,139	<b>Mpp10</b>	0,749	0,137
<b>Ssf1</b>	0,714	0,001	<b>Sar1</b>	0,749	0,081
<b>Dbp9</b>	0,715	0,091			

**Tabla S1. Listado de proteínas utilizadas para el análisis de categorías funcionales con FunSpec.** Las proteínas identificadas en los experimentos de ProteomChIP y espectrometría de masas se filtraron para eliminar aquellas que sólo fueron identificadas con un péptido, las que se encontraban en las categorías *cytosol* [GO:0005829], *mitochondrial nucleoid* [GO:0042645], *cytosolic small ribosomal subunit* [GO:0022627] y *cytosolic large ribosomal subunit* [GO:0022625] por ser consideradas como contaminantes y aquellas cuyo valor de desviación superó el 25% del valor de la media. De las proteínas restantes (267 proteínas) se utilizaron para el análisis con FunSpec aquellas cuyos ratios iTRAQ (WT/*bud27Δ*) fue igual o inferior a 0,75, es decir, al menos 1,5 veces enriquecida en el mutante *bud27Δ* con respecto al silvestre (179 proteínas). Las proteínas seleccionadas para el análisis de categorías funcionales con FunSpec, se muestran en la tabla ordenadas de menor a mayor según el valor de la media iTRAQ WT/*bud27Δ* de dos réplicas biológicas independientes, indicando además, su desviación típica.



## Discusión





### **DISCUSIÓN**

#### **Bud27 influye en la transcripción de las tres ARN polimerasas y en la biogénesis de ribosomas, probablemente a través de la vía TOR**

Los trabajos previos del grupo del Dr. Navarro demuestran que Bud27 participa en el ensamblaje citoplasmático de las tres ARN polimerasas vía Rpb5 (Mirón-García et al., 2013). Los trabajos del grupo y de otros autores también muestran que Bud27 forma parte de la ruta de señalización TOR (Gstaiger et al., 2003; Martínez-Fernández et al., 2020). Además de estas alteraciones, en el presente trabajo se muestran evidencias de que la falta de Bud27 provoca defectos transcripcionales de las tres ARN polimerasas. De este modo, Bud27 podría actuar como un coordinador de la transcripción de las tres ARN polimerasas, posiblemente a través de la vía TOR, para favorecer la biogénesis de ribosomas, tal y como se desarrolla a continuación.

El papel de Bud27 en la transcripción mediada por la ARN pol II ya ha sido estudiado previamente por el grupo del Dr. Navarro. Bud27 modula la elongación de la transcripción gracias a que facilita la interacción de la ARN pol II con el remodelador de cromatina RSC, probablemente a través de una asociación tripartita Rpb5-Bud27-RSC (Mirón-García et al., 2014). En la misma línea, experimentos de ChIP-seq muestran que Bud27 se asocia a los promotores de los genes de proteínas ribosómicas y RiBis (*Ribosomal Biogenesis*) y que su ausencia provoca una menor ocupación de la ARN pol II en esos mismos genes así, como una menor cantidad de esos transcritos (Martínez-Fernández et al., 2020). Corroborando lo anterior, en el presente trabajo se ha mostrado que la ausencia de Bud27 produce una pérdida de interacción física entre la ARN pol II y el factor de elongación Spt5, lo cual refuerza la idea de Bud27 como una proteína importante en el proceso transcripcional de la ARN pol II (Figura R5).

Por otra parte, la ausencia de Bud27 produce un defecto en la síntesis del ARNr 5S (Martínez-Fernández et al., 2020) y también en la síntesis y/o procesamiento de los ARNts (Figura R20 A, Figura R21 A) (Martínez-Fernández et al., 2020), lo cual sugiere defectos en la transcripción de la ARN pol III, de acuerdo con lo observado previamente por otros autores (Gstaiger et al., 2003; Vernekar and Bhargava, 2015). Se ha propuesto que Bud27 modularía la transcripción de la ARN pol III mediante un mecanismo similar al de la ARN pol II, promoviendo su asociación con RSC (Vernekar and Bhargava, 2015). Nuestros experimentos demuestran que en el mutante *bud27Δ* hay una menor ocupación de la ARN pol III en los tres tipos de genes transcritos por la enzima, en consonancia con otros autores (Vernekar and Bhargava, 2015), lo que podría sugerir que los defectos transcripcionales están

mayoritariamente causados por una menor cantidad total de enzima activa en la cromatina. Sin embargo, aunque la sobreexpresión de *RPB5* puede corregir las alteraciones en el ensamblaje de las ARN polimerasas (Figura R1 A) (Mirón-García et al., 2013), solo corrige parcialmente los defectos transcripcionales de la ARN pol III a 30°C y no los corrige a 37°C (Martínez-Fernández, 2016). Del mismo modo, dicha sobreexpresión tampoco corrige completamente la sensibilidad del mutante *bud27Δ* al ácido micofenólico (Figura R1 B), droga empleada para detectar cepas con defectos de elongación de la transcripción ya que reduce la disponibilidad de nucleótidos trifosfato para tal fin (Shaw et al., 2001). Por lo tanto, nuestra conclusión es que los defectos transcripcionales de la ARN pol III en el mutante *bud27Δ* no parecen ser exclusivamente una consecuencia de la alteración en el ensamblaje de las ARN polimerasas. Las propuestas del posible papel concreto de Bud27 sobre la transcripción de la ARN pol III se desarrollan con mayor detalle en los siguientes capítulos, dedicados tanto a la regulación de la transcripción a través del represor Maf1, como a las alteraciones en la propia maquinaria transcripcional de la ARN pol III.

Curiosamente, Bud27 parece modular la transcripción de manera diferente para cada una de las ARN polimerasas. En el caso de la ARN pol I, la delección de *BUD27* provoca una acumulación de algunos transcritos inmaduros como el ARNr 27S o el ARNr 7S (Martínez-Fernández et al., 2020), que ponen de manifiesto un defecto en la síntesis del ARNr 35S o bien en su procesamiento, ya que ambos procesos están funcionalmente acoplados (Schneider et al., 2007; Schneider et al., 2006; Scull and Schneider, 2019). Al contrario que para las ARN polimerasas II y III, estos defectos del mutante *bud27Δ* no van acompañados de menores niveles relativos de la ARN pol I en el ADNr 35S (35S), sino, incluso, de una ligera acumulación de esta (Figura R2 B), mayor tras un choque térmico a 37°C (Figura R2 C). Además, aunque se ha descrito que la transcripción de la ARN pol I depende del factor de transcripción Spt4/5 (Hartzog and Fu, 2013) y que existe una interacción física entre estos elementos y la enzima (Schneider et al., 2006), la ausencia de Bud27 no alteró esta asociación (Figura R5). Estos datos hacen sospechar que el mecanismo por el cual Bud27 participa en la transcripción de la ARN pol I podría ser sustancialmente diferente al de las ARN polimerasas II y III. En este contexto, se pueden plantear diferentes hipótesis que permitan explicar los defectos transcripcionales de la ARN pol I en el mutante *bud27Δ*: que la falta de Bud27 conlleve un menor número de copias activas de ADNr 35S y/o que la ausencia de Bud27 provoque defectos en la elongación de la transcripción y que esto pueda estar asociado a RSC, otros factores remodeladores de cromatina u otras proteínas implicadas.

Se ha demostrado que la falta de Bud27 produce un defecto en el ensamblaje de las tres ARN polimerasas (Mirón-García et al., 2013), por lo que cabría esperar que hubiese menos en el núcleo, con una menor ocupación en las unidades transcripcionales del 35S. Sin

embargo, los experimentos de ChIP realizados en este trabajo parecen contradecir este hecho, puesto que se observa una mayor cantidad relativa de la ARN pol I en el ADNr 35S (Figuras R2 B y C). Teniendo en cuenta estos resultados, el mutante *bud27Δ* podría tener alterada la estructura de la cromatina conllevando un menor número de copias transcripcionalmente activas de ADNr 35S. En este sentido, datos de MNasa-seq del grupo del Dr. Navarro apuntan a una conformación anormal de la cromatina en estas regiones (datos no publicados). Aunque el defecto de ensamblaje de la ARN pol I en el mutante *bud27Δ* conlleve que haya menor cantidad de enzimas en el núcleo, el hecho de que estas deban repartirse entre un menor número de copias 35S activas, podría explicar que en los experimentos de ChIP se observe una mayor cantidad relativa de ARN pol I en el ADNr 35S. Se ha demostrado que al reducir el número de copias de ADNr, estas contienen mayor cantidad de ARN pol I por unidad transcripcional (Albert et al., 2011; Cioci et al., 2003; French et al., 2003). En este sentido, se ha estimado que el número de copias de ADNr 35S en *S. cerevisiae* está en torno a 150 y que aproximadamente la mitad de ellas son transcripcionalmente activas (Albert et al., 2011; Cioci et al., 2003). Cabe destacar que no parece alterada el número de copias totales de ADNr 35S en ausencia de Bud27 en el análisis mediante qPCR (Figura R6). Sin embargo, esta estimación no nos da información sobre el número de copias activas. La hipótesis planteada queda reforzada por el hecho de que reducir el número de copias del gen 35S hasta 25 copias en el mutante *bud27Δ*, todas ellas transcripcionalmente activas según se demuestra en trabajos previos (Cioci et al., 2003), recupera de manera considerable los defectos de crecimiento. Sin embargo, aumentar el número de copias totales del gen 35S hasta 190, de las cuales aproximadamente la mitad serían activas, agrava el crecimiento del mutante *bud27Δ*, incluso a la temperatura permisiva de 30°C (Figura R7). Es decir, en condiciones de menor número de copias de ADNr 35S, la menor cantidad de ARN pol I en el núcleo del mutante *bud27Δ* deja de ser un factor limitante. El hecho de que un mayor número de copias del gen 35S perjudique gravemente el crecimiento del mutante *bud27Δ* podría conllevar una reducción en el número de copias activas del gen 35S para compensar la menor cantidad de ARN pol I en el núcleo y poder sobrevivir. De hecho, la variación en el número de copias activas de ADNr 35S está altamente regulada para mantenerse en unos rangos que sean homeostáticos para las células en función de las necesidades fisiológicas (Dammann et al., 1993; French et al., 2003; Murayama et al., 2008; Nelson et al., 2019). En este sentido, se ha demostrado que en condiciones óptimas de crecimiento, Tor1 se asocia a los promotores de los genes 35S (Li et al., 2006) y que la inhibición de la vía TOR provoca cambios en la estructura del nucléolo y posiblemente desacetilación de histonas, compactación de la cromatina y silenciamiento de ADNr (Tsang et al., 2003). Teniendo en cuenta que la ausencia de Bud27 mimetiza parcialmente un bloqueo de la vía TOR (Gstaiger et al., 2003; Martínez-Fernández et al., 2020), sería interesante

estudiar si Bud27 altera, al menos parcialmente, el número de copias activas de ADNr 35S para modular la transcripción de la ARN pol I. Independientemente del número de copias activas del gen 35S, nuestros datos apuntan a posibles defectos en la procesividad de la ARN pol I (Figura R5). No se pueden descartar defectos adicionales en la estabilidad y/o conformación de la enzima ARN pol I, haciendo que esta transcriba más lentamente y se acumule a lo largo de cada unidad transcripcional, afectando la procesividad de la misma y la elongación de la transcripción, aunque esto también puede ser resultado de la alteración de la estructura cromatínica. En este sentido se ha propuesto que una menor procesividad de la ARN pol I podría conllevar defectos en la elongación de la transcripción (Schneider et al., 2007).

Por otra parte, teniendo en cuenta que se ha propuesto un modelo en el que Bud27 participaría en la elongación de la transcripción de la ARN pol II probablemente a través de una asociación tripartita Bud27-Rpb5-RSC (Mirón-García et al., 2014), y un mecanismo parecido en el caso de la ARN pol III (Vernekar and Bhargava, 2015), es posible que Bud27 actúe mediante un mecanismo similar sobre la transcripción llevada a cabo por la ARN pol I. Dado que la interacción Rpb5-RSC es necesaria para la transcripción de las tres ARN polimerasas (Soutourina et al., 2006), que Bud27 interacciona física y funcionalmente con Rpb5 (Dorjsuren et al., 1998; Gstaiger et al., 2003; Ito et al., 2001; Mirón-García et al., 2013; Mirón-García et al., 2014) y que se ha descrito interacción física entre Bud27 y la ARN pol I (Mirón-García et al., 2013), es probable que Bud27 pudiera ejercer su función facilitando la interacción entre RSC y la ARN pol I a través de Rpb5. Otra posible hipótesis que pueda explicar los defectos en la síntesis del ADNr 35S provocados por la falta de Bud27 es que se produzca una menor asociación de la ARN pol I con otros factores como el complejo remodelador de cromatina ATP-dependiente SWI/SNF. En este sentido, mutantes del complejo SWI/SNF, como *snf6Δ*, muestran alteraciones de la transcripción mediada por la ARN pol I muy similares a las que presenta el mutante *bud27Δ*, es decir, defectos en la elongación de la transcripción sin que haya menor ocupación de la ARN pol I en el ADNr 35S, así como un posible defecto en el procesamiento de los transcritos (Zhang et al., 2013). De igual modo, los datos mostrados en este trabajo tampoco permiten descartar que la falta de Bud27 provoque una alteración en la asociación al ADNr 35S de otros factores de transcripción importantes de la ARN pol I, como Hmo1 o Rrn3 (Blattner et al., 2011; Claypool et al., 2004; Hall et al., 2006; Reiter et al., 2011).

Teniendo en cuenta todos los resultados presentados en este trabajo, consideramos que el escenario más probable es que Bud27 module el número de copias activas de ADNr a través de la ruta TOR y/o que participe en la transcripción de la ARN pol I vía RSC u otros factores remodeladores de cromatina. Sin embargo, aunque se ha descrito que los procesos

de transcripción por parte de la ARN pol I y procesamiento de los transcritos están funcionalmente acoplados (Schneider et al., 2007; Schneider et al., 2006; Scull and Schneider, 2019), nuestros datos no permiten descartar que también haya defectos en el procesamiento de los mismos.

Puesto que la delección de *BUD27* conlleva defectos transcripcionales de las tres ARN polimerasas (Martínez-Fernández et al., 2020; Mirón-García et al., 2014; Vernekar and Bhargava, 2015), la consecuencia más evidente es la falta de transcritos para la biogénesis de ribosomas. De acuerdo con esto, nosotros y otros autores hemos demostrado que el mutante *bud27Δ* presenta un perfil de polisomas anormal (Deplazes et al., 2009; Martínez-Fernández et al., 2020; Vernekar and Bhargava, 2015) además de otros defectos en la iniciación de la traducción (Deplazes et al., 2009). De manera interesante, en un reciente escrutinio de supresión génica en el mutante *bud27Δ*, se han identificado varios genes de proteínas ribosómicas de la subunidad mayor (RPLs) así como algún de RiBi que corrigen parcialmente su defecto de termosensibilidad a 37°C (datos no mostrados).

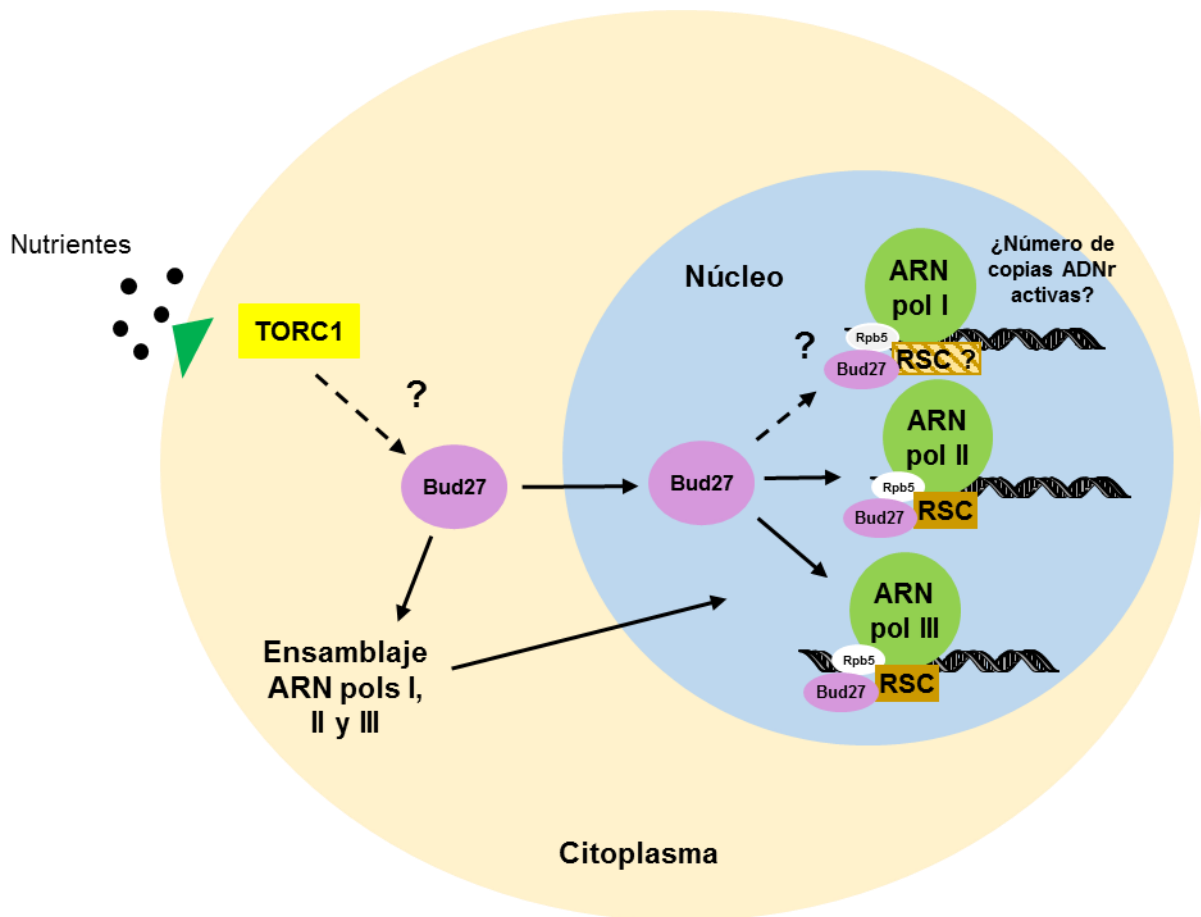
Para asegurar una proporción adecuada de todos los transcritos necesarios para la biogénesis de ribosomas y el crecimiento celular en condiciones óptimas de crecimiento, es imprescindible una estrecha regulación e interconexión de la actividad de las tres ARN polimerasas (Barba-Aliaga et al., 2021; Lempiäinen and Shore, 2009; Mayer and Grummt, 2006). De hecho, en *S. cerevisiae* se ha descrito la existencia de un *cross-talk* entre las ARN polimerasas I y III para la síntesis de ARNr 35S, ARNr 5S y ARNts (Briand et al., 2001; Laferte et al., 2006), entre las ARN polimerasas I y II para coordinar la síntesis de ARNrs y proteínas ribosómicas (Michels and Hernandez, 2006; Rudra et al., 2007) y también se ha sugerido entre las ARN polimerasas II y III (Bhalla et al., 2019; Bhargava, 2021). Se ha propuesto que la coordinación de las tres ARN polimerasas, necesaria para la biogénesis de ribosomas, estaría controlada por elementos de la vía TOR, puesto que es la principal ruta de señalización que vincula la disponibilidad de nutrientes con la transcripción (Boguta, 2009; Lempiäinen and Shore, 2009; Martin and Hall, 2005; Martin et al., 2006; Mayer and Grummt, 2006; Warner, 1999). Dadas las similitudes en el perfil transcripcional entre un mutante *bud27Δ* y la inhibición de la vía TOR en una cepa silvestre, se ha propuesto que Bud27 podría ser un elemento de esta ruta (Gstaiger et al., 2003; Martínez-Fernández et al., 2020). De igual manera, el ortólogo humano de Bud27, URI, participa en la vía TOR (Gstaiger et al., 2003). Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho de que la falta de Bud27 produce una alteración en el patrón de fosforilación de Rps6, proteína utilizada como marcador de la actividad de la ruta TOR y que indica que esta es constitutivamente menos activa (Figura R9). Este hecho, sumado a que tanto Bud27 como URI interaccionan física y funcionalmente con Rpb5 (Dorjsuren et al., 1998; Gstaiger et al., 2003; Mirón-García et al., 2013; Mirón-García et al., 2014; Mita et al., 2013),

subunidad común de las tres ARN polimerasas (Zaros et al., 2007), convierten a Bud27 en un candidato ideal para ejercer la función de coordinar la transcripción de las tres ARN polimerasas para la biogénesis de ribosomas. Es probable que esta coordinación por parte de Bud27 tenga lugar gracias a su interacción con Rpb5, y, al menos parcialmente, a través de la señalización de la vía TOR. Sin embargo, aunque existe bastante similitud en el perfil transcripcional entre una situación de inhibición de la vía TOR y un mutante *bud27Δ* (Gstaiger et al., 2003; Martínez-Fernández et al., 2020), puede que Bud27 ejerza funciones específicas en la transcripción independientemente de la regulación por parte de la vía TOR. Como se ha comentado anteriormente, la ausencia de Bud27 conlleva una mayor cantidad relativa de ARN pol I en las unidades transcripcionales de ADNr 35S (Figura R2 B y C), mientras que una inhibición de la vía TOR por carencia de nutrientes o rapamicina produce una clara disminución de la ocupación de la ARN pol I (Claypool et al., 2004; Torreira et al., 2017; Tsang et al., 2003). Esto podría indicar que Bud27 coordina la actividad de las tres ARN polimerasas mayoritariamente a través de la vía TOR, aunque quizá tenga funciones específicas e independientes de esta ruta para regular la transcripción.

Se han propuesto algunas proteínas que pudieran actuar como puntos de control o “*checkpoints*” de la biogénesis de ribosomas, la mayoría de ellas factores de transcripción controlados a través de la vía TOR. Entre ellos se encuentran Fhl1, Ifh1, Sfp1 o Rap1 (Fingerman et al., 2003; Marion et al., 2004; Martin et al., 2004; Miyoshi et al., 2003; Schawalder et al., 2004; Wade et al., 2004). Se ha especulado que algunos elementos comunes a la transcripción de las tres ARN polimerasas como la proteína de unión a TATA o TBP (*TATA Binding Protein*) o las subunidades comunes de las tres enzimas podrían ser la base para establecer mecanismos de coordinación de la actividad de las 3 ARN pols (Barba-Aliaga et al., 2021; Lempiäinen and Shore, 2009). La *prefoldina-like* Bud27 no sólo participa en el ensamblaje de las tres ARN polimerasas (Garrido-Godino et al., 2022; Mirón-García et al., 2013), sino que cumple varios de los requisitos mencionados para poder realizar la función de coordinación transcripcional de las mismas: interacciona con una subunidad común de las tres enzimas (Dorjsuren et al., 1998; Gstaiger et al., 2003; Mirón-García et al., 2013) y es un elemento de la ruta TOR (Gstaiger et al., 2003; Martínez-Fernández et al., 2020).

A continuación se presenta un modelo en el que se resume el papel de Bud27 en la coordinación de la actividad de las tres ARN polimerasas (Figura D1). Por una parte, Bud27 favorece la biogénesis y el ensamblaje de las tres ARN polimerasas en el citoplasma previo a su entrada al núcleo (Mirón-García et al., 2013). Por otra parte, en este trabajo y en trabajos previos de nuestro grupo (Martínez-Fernández et al., 2020; Mirón-García et al., 2014) y otros autores (Vernekar and Bhargava, 2015) se demuestra que Bud27 participa en la transcripción de las tres ARN polimerasas, tal vez mediante mecanismos diferentes y posiblemente gracias

a su interacción con Rpb5. Todo esto indica que Bud27 actúa como un coordinador de la actividad de las tres ARN polimerasas, al menos parcialmente a través de la vía TOR, para modular la biogénesis de ribosomas.



**Figura D1. Modelo propuesto del papel de Bud27 como coordinador de la actividad de las tres ARN polimerasas.** En condiciones de disponibilidad de nutrientes, la ruta TOR está activa, lo cual probablemente promueve la actividad de Bud27. En esas condiciones, Bud27 participa en la transcripción de la ARN pol II a través de su interacción con Rpb5-RSC (Mirón-García et al., 2014), y en la transcripción de la ARN pol III gracias a su interacción con RSC (Vernekar and Bhargava, 2015). Bud27 podría participar en la transcripción de la ARN pol I a través de RSC, otros remodeladores de cromatina o bien proteínas que afecten al contexto cromatínico y/o modulando el número de copias activas de ADNr 35S. Además, Bud27 participa en el ensamblaje citoplasmático de las tres ARN polimerasas vía Rpb5 (Mirón-García et al., 2013). Las flechas representan interacciones físicas o relaciones funcionales y las flechas discontinuas se utilizan cuando se desconoce el mecanismo exacto de acción. Los signos de interrogación (?) representan mecanismos de regulación desconocidos.

### **Bud27 modula la represión de la ARN pol III a través de la fosfatasa de Maf1, PP4**

Trabajos previos del grupo del Dr. Navarro y de otros autores demuestran que la ausencia de Bud27 provoca una menor síntesis de transcritos de la ARN pol III (Martínez-Fernández et al., 2020; Vernekar and Bhargava, 2015). En línea con lo anterior, en el capítulo I de Resultados del presente trabajo se ha mostrado que la ausencia de Bud27 provoca una menor ocupación de la ARN pol III en los tres tipos de genes que transcribe (Figura R8 y R3). Dado que el mutante *bud27Δ* presenta defectos en el ensamblaje de las tres ARN polimerasas, parte de los defectos en la transcripción de la ARN pol III podrían ser una consecuencia indirecta de la deslocalización citoplasmática de la enzima (Mirón-García et al., 2013). Sin embargo, datos previos del grupo del Dr. Navarro muestran que, aunque la alteración en el ensamblaje de la ARN pol III se corrige gracias a la sobreexpresión de *RPB5* (Mirón-García et al., 2013) (Figura R1 A), esta no corrigió totalmente los defectos transcripcionales del mutante *bud27Δ* (Martínez-Fernández et al., 2020). Este hecho sugiere que Bud27 participa en la transcripción mediada por la ARN pol III más allá del papel que tiene en el ensamblaje.

Teniendo en cuenta que Bud27 podría ser un elemento importante de la vía TOR (Gstaiger et al., 2003; Martínez-Fernández et al., 2020), una posibilidad sería que los defectos transcripcionales mencionados anteriormente puedan estar causados por una mayor actividad de Maf1, único represor conocido de la ARN pol III. Sin embargo, la desfosforilación de Maf1, que es necesaria para la activación de esta proteína, su entrada al núcleo y la represión de la ARN pol III (Oficjalska-Pham et al., 2006; Oler and Cairns, 2012; Pluta et al., 2001; Roberts et al., 2006; Vannini et al., 2010) ocurre de manera más lenta tras el bloqueo de la vía TOR en ausencia de Bud27, además de que en condiciones de crecimiento permisivo en células *bud27Δ* hay una mayor proporción de la forma fosforilada o inactiva de Maf1 (Figuras R10, R11, R12). En consonancia, también se observó una traslocación de Maf1 al núcleo más lenta de lo que se observa en una cepa silvestre tras el tratamiento con rapamicina (Figura R18). Corroborando lo anterior, datos de inmunolocalización del grupo del Dr. Navarro mostraron que la falta de Bud27 conlleva una menor cantidad de Maf1 en los núcleos en mutantes *bud27Δ*, antes y después del tratamiento con rapamicina (Martínez-Fernández, 2016). En consecuencia, la menor desfosforilación de Maf1 y su menor entrada al núcleo tras la represión de la ruta TOR, no parecen ser responsables de una represión de la actividad de la ARN pol III en carencia de Bud27, según el modo de acción de esta proteína en células silvestres (Oficjalska-Pham et al., 2006; Oler and Cairns, 2012; Roberts et al., 2006). De hecho, nuestros experimentos de RT-qPCR en condiciones de bloqueo de la vía TOR con

rapamicina parecen confirmar estos datos, sugiriendo, efectivamente una menor represión de la ARN pol III cuando falta Bud27 (Figura R20, R21, R22), a diferencia de lo que ocurre para una cepa silvestre (Ciesla et al., 2007; Turowski et al., 2016; Upadhyya et al., 2002).

Teniendo en cuenta todo lo anterior y contrariamente a nuestra hipótesis inicial, los defectos en la transcripción de la ARN pol III en el mutante *bud27Δ* no parecen estar causados por una mayor represión por parte del regulador negativo Maf1. De manera interesante, los datos mostrados en este trabajo parecen indicar que Bud27 es una proteína con dos funciones bien diferenciadas durante proceso transcripcional de la ARN pol III. Por un lado, nuestro grupo y otros autores hemos demostrado que es necesaria para el ensamblaje citoplasmático de la enzima (Mirón-García et al., 2013; Vernekar and Bhargava, 2015) y para la transcripción cuando las condiciones de crecimiento son óptimas (Este trabajo) (Gstaiger et al., 2003; Vernekar and Bhargava, 2015). Por otro lado, Bud27 tendría un papel fundamental en el control de la actividad de Maf1 y la represión de la ARN pol III, posiblemente a través de la ruta TOR.

Nuestros análisis de interacciones genéticas entre *BUD27* y genes para varias kinasas y fosfatasa de la vía TOR mostraron resultados antagónicos, lo cual es lógico teniendo en cuenta que realizan funciones opuestas dentro de la ruta. Los análisis de western blot de las cinéticas de desfosforilación de Maf1 tras el tratamiento con rapamicina mostraron que Bud27 podría estar actuando conjuntamente con Pph3, componente de la fosfatasa PP4, para el control de la represión de la ARN pol III. El complejo PP4 ha sido descrito como la principal fosfatasa de Maf1 (Oler and Cairns, 2012). Se ha propuesto que los mutantes de la subunidad catalítica (*pph3Δ*) y de la subunidad reguladora (*psy2Δ*) del complejo PP4 presentan una cinética de desfosforilación y entrada al núcleo de Maf1 alteradas así como incapacidad para reprimir correctamente la transcripción de la ARN pol III (Oler and Cairns, 2012), fenotipos que son muy similares a los observados en el mutante *bud27Δ* en este trabajo. Este hecho refuerza nuestra hipótesis de que Bud27 estaría actuando junto con el complejo PP4 en la desfosforilación de Maf1 y su entrada al núcleo para mediar la represión de la ARN pol III.

Maf1 es el único regulador negativo conocido de la ARN pol III, siendo su desfosforilación y entrada al núcleo controladas principalmente por la vía TOR (Boguta, 2013; Upadhyya et al., 2002; Willis et al., 2004). Sin embargo, se ha descrito que Maf1 se modula por varias señales diferentes de estrés para reprimir a la ARN pol III (Ciesla et al., 2007; Upadhyya et al., 2002) y que su desfosforilación en todas esas situaciones es llevada a cabo por la fosfatasa PP4 (Oler and Cairns, 2012). En el presente trabajo, se ha mostrado cómo la desfosforilación de Maf1 tras la aplicación de otros tipos de estrés diferentes a la inhibición de la vía TOR con rapamicina también requiere de Bud27 para llevarse a cabo correctamente

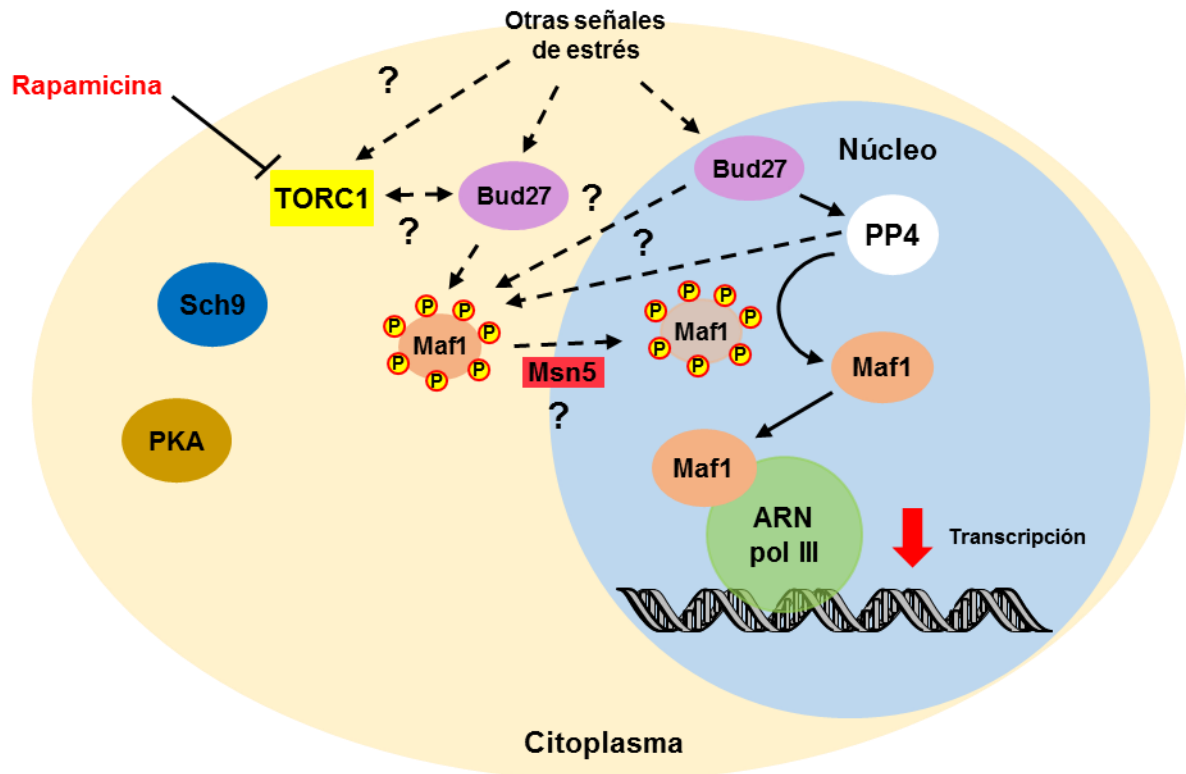
(Figura R13). Esto sugiere que Bud27 podría modular la actividad de PP4 a través de la ruta TOR, aunque quizá también actúe integrando y coordinando diferentes señales de estrés, que pueden ser independientes de la vía TOR y que convergen en la represión de la ARN pol III.

Los datos presentados en este trabajo también sugieren que la regulación ejercida por Bud27 sobre PP4 podría no ser exclusiva sobre Maf1, sino tener un efecto más general sobre otros de sus sustratos (Figura R27, R28). PP4 participa en la reparación del ADN y el restablecimiento del ciclo celular gracias a su acción fosfatasa sobre Rad53 (Hustedt et al., 2015; O'Neill et al., 2007; Villoria et al., 2019). Nuestros experimentos mostrando la alteración en la desfosforilación de Rad53 tras una situación de daño en el ADN, sugieren que Bud27 podría actuar conjuntamente con PP4 en diversos procesos celulares. Sin embargo, dado que se han descrito otras fosfatasas de Rad53 como PP2C o Glc7 (Bazzi et al., 2010; Leroy et al., 2003), no podemos descartar que Bud27 esté influenciado a todas o algunas de ellas.

Tradicionalmente, por estudios *in vitro*, se ha considerado que las fosfatasas actúan de manera general, con poca especificidad (Heideker et al., 2007). En cambio, los trabajos de los últimos años ponen de manifiesto que las fosfatasas están sujetas a una regulación altamente controlada, que involucra diferentes mecanismos (Heideker et al., 2007). En cuanto a PP4, se desconocen muchos de los aspectos de su regulación. En línea con otros autores, nuestros datos demuestran que el complejo PP4 es nuclear, incluso después de un tratamiento con rapamicina, y Bud27 no parece modular la actividad de la fosfatasa mediando su localización. De igual manera, nuestros datos tampoco sugieren que Bud27, aun a pesar de funcionar como posible cochaperona (Martínez-Fernández et al., 2015; Martínez-Fernández et al., 2018; Millán-Zambrano and Chávez, 2014), module la estequiometría y/o estabilidad del complejo PP4. se han descrito algunas proteínas que interaccionan con la subunidad catalítica Pph3 y que podrían actuar como factores reguladores de PP4. La más relevante es Psy2, componente del complejo, que se une de manera estable y permanente a Pph3 y que es necesaria para la desfosforilación de todos los sustratos de PP4, incluido Maf1 (Gingras et al., 2005; Hustedt et al., 2015; Keogh et al., 2006; Oler and Cairns, 2012; O'Neill et al., 2007). Existen otras proteínas como Psy4 (componente del complejo), Tip41 o Rrd1, que también podrían cumplir funciones reguladoras en la desfosforilación de algunos sustratos (Gingras et al., 2005; Keogh et al., 2006; Oler and Cairns, 2012; Van Hoof et al., 2005). Teniendo en cuenta que Bud27 no parece modular la actividad de PP4 mediante ninguno de los mecanismos anteriormente comentados, podemos sugerir que Bud27 actúe como una proteína reguladora directamente sobre la fosfatasa PP4, quizá controlando su actividad de manera general y posiblemente a través de la vía TOR. Bud27 se asocia físicamente a Pph3, lo que refuerza la hipótesis de que podría ejercer su función de manera directa (Figura R34). No podemos descartar que este mecanismo suponga una interacción tripartita Bud27-PP4-

Maf1, en concordancia con los datos que demuestran la interacción física entre PP4 y Maf1 (Oler and Cairns, 2012). Cabe destacar que no hemos sido capaces de identificar las interacciones entre PP4 y Maf1 ni entre Bud27 y Maf1. Dado que las fosfatasa han evolucionado para reconocer una gran cantidad de sustratos diferentes a través de su asociación con las subunidades reguladoras (Heideker et al., 2007), es probable que Bud27 haya adquirido una función como efector de la vía TOR para el control de la actividad de Maf1 y la represión de la ARN pol III, interaccionando para ello de forma directa con PP4 (Figura D2).

Los datos mostrados en su conjunto, nos permiten proponer un modelo sobre el mecanismo de acción de Bud27 y PP4 en el control de Maf1 y la consecuente represión de la actividad de la ARN pol III que se presenta y se explica en la Figura D2. Bud27 actuaría como una proteína reguladora ayudando a PP4 en el reconocimiento e interacción con Maf1. Dicha regulación podría ocurrir gracias a modificaciones postraduccionales, a través de la ruta TOR, en Bud27, en PP4, o en ambas. De hecho, se ha propuesto que el ortólogo humano de Bud27, URI, es una diana de la kinasa mTORC1 y que se desfosforila tras un bloqueo de la vía TOR (Gstaiger et al., 2003). En consonancia, un análisis bioinformático de la secuencia de aminoácidos de Bud27 con los programas *Musite* y *NetPhos* 3.1 muestra posibles residuos fosforilables (datos no mostrados). Por otra parte, la inhibición prolongada de la ruta TOR hace que Bud27 se degrade (Gstaiger et al., 2003). Posiblemente, tanto las modificaciones postraduccionales de Bud27 como su degradación tras un bloqueo de la vía TOR sean mecanismos de regulación sobre Bud27 que, en última instancia, modulen la actividad de Maf1 y la ARN pol III. Alternativamente a este mecanismo, otra posibilidad es que Bud27 active a PP4 a través de cambios conformacionales en el complejo que permitan su actividad fosfatasa sobre los sustratos, ya que se ha propuesto que Bud27 podría actuar como cochaperona en diversos procesos celulares (Martínez-Fernández et al., 2015; Martínez-Fernández et al., 2018; Millán-Zambrano and Chávez, 2014).



**Figura D2. Modelo propuesto del papel de Bud27 como regulador de la represión de la ARN pol III a través de la vía TOR, mediante su cooperación con PP4.** Cuando la vía TOR se inhibe, las kinasas de Maf1, Sch9 y PKA, se inactivan, se favorece la entrada de Maf1 al núcleo, probablemente a través de Msn5, que además se encarga de exportar del núcleo a Maf1 cuando este está fosforilado, en un proceso que depende de la actividad de PP4 y Bud27. En el núcleo Maf1 es desfosforilado mayoritariamente por PP4, siendo este último activado gracias a Bud27. De esta manera, Maf1 puede unirse físicamente a la ARN pol III y reprimir la transcripción. Dado que no podemos excluir una función citoplasmática de Bud27 en este proceso, también está representado en el citoplasma. Las flechas representan interacciones físicas o funcionales. Las barras con forma de “T” representan inhibición en la actividad de la proteína diana. Las flechas discontinuas indican posibles interacciones o relaciones funcionales. Los signos de interrogación (?) representan mecanismos de regulación desconocidos.

### **Bud27 podría participar en la formación de los complejos transcripcionales de la ARN pol III**

El grupo del Dr. Navarro y otros autores han demostrado que Bud27 es necesario tanto para el ensamblaje de la ARN pol III como para la transcripción mediada por la enzima (Martínez-Fernández et al., 2020; Vernekar and Bhargava, 2015). Datos previos del grupo del Dr. Navarro apuntan a que los defectos transcripcionales de la ARN pol III provocados por la ausencia de Bud27 no parecen estar ligados a su incorrecto ensamblaje y no se corrigen por la sobreexpresión de *RPB5* (Martínez-Fernández, 2016). Además, los datos mostrados en esta tesis evidencian que esos defectos transcripcionales no son causados por una mayor represión por parte del regulador negativo Maf1. Teniendo en cuenta estos antecedentes, cabría esperar un papel más directo de Bud27 sobre la transcripción de la ARN pol III, probablemente alterando los complejos transcripcionales.

Numerosos autores proponen que la biogénesis y ensamblaje de las ARN polimerasas ocurren en el citoplasma, de manera previa al importe nuclear (Boulon et al., 2010; Garrido-Godino et al., 2022; Garrido-Godino et al., 2021; Gómez-Navarro and Estruch, 2015; Mirón-García et al., 2013; Wild and Cramer, 2012). De este modo, cabría esperar que la ARN pol III presente en cromatina estuviese completa, sin alteraciones sustanciales en la estequiometría de sus subunidades. Nuestros datos de ProteomChIP apuntan a que podría haber algunos defectos asociados a las subunidades comunes Rpb6 y Rpb12. Esto sugiere que la ARN pol III asociada a la cromatina podría estar mal ensamblada y con una conformación inadecuada, en línea con lo propuesto previamente para la ARN pol II (Mirón-García et al., 2014). Se ha demostrado que Rpb6 es fundamental para el ensamblaje y la estabilidad de las subunidades mayores en las ARN polimerasas I y II (Nouraini et al., 1996). La subunidad Rpb6 se sitúa cerca de Rpb5 en la estructura de la ARN pol III y ambas forman parte del núcleo de la enzima (Fernández-Tornero et al., 2011; Hoffmann et al., 2015; Wu et al., 2012). Además, la ausencia de Bud27 provoca un defecto de ensamblaje de las subunidades Rpb5 y Rpb6 en las tres ARN polimerasas (Mirón-García et al., 2013). Podríamos especular que en células carentes de Bud27 hay una enzima más inestable, lo cual afectaría el proceso transcripcional. No obstante, esta hipótesis requiere ser explorada.

Previamente, Vernekar *et al* han propuesto que la ausencia de Bud27 provoca alteraciones en la estequiometría de las subunidades de la ARN pol III tanto nuclear como citoplasmática (Vernekar and Bhargava, 2015), lo cual parece contradecir nuestros resultados de ProteomChIP (Figura R35). Sin embargo, los datos presentados en el trabajo de Vernekar *et al* difieren sustancialmente de los nuestros, ya que en su estudios presentan como “ARN

pol III nuclear” la enzima procedente de la inmunoprecipitación hecha a partir de un extracto celular total, asumiendo que toda la enzima presente en dicho extracto está ensamblada y en el núcleo (Vernekar and Bhargava, 2015). Sin embargo, si bien en el caso de las cepas silvestres esto parece ser cierto, en el mutante *bud27Δ* existe una alteración en el ensamblaje y una gran parte de la ARN pol III está deslocalizada en el citoplasma. En nuestro análisis de ProteomChIP, la enzima purificada se corresponde exclusivamente con la asociada a la cromatina (Bruckmann et al., 2016; Hierlmeier et al., 2013). Es probable que las diferencias en los resultados de estequiometría de subunidades de la ARN pol III presentados en este trabajo y los de Vernekar *et al* sean fruto de las distintas metodologías empleadas.

La ARN pol III necesita del reclutamiento previo de factores de transcripción en sus genes diana para poder comenzar la transcripción (Abascal-Palacios et al., 2018; Acker et al., 2013; Dieci et al., 2013; Turowski and Tollervey, 2016). Nuestros datos indican una mayor cantidad de la subunidad Tfc6 del complejo TFIIIC en el mutante *bud27Δ*, lo que sugiere que podrían existir alteraciones en el reclutamiento de TFIIIC en los promotores de los genes, o bien alteraciones en las interacciones de las distintas subunidades que forman el complejo (Figura R36). La subunidad Tfc6 participa en el reconocimiento de la caja B (“B box”), presente en todos los genes de la ARN pol III, excepto en el gen *RDN5*, y también en la formación de los complejos de preiniciación reclutando al complejo TFIIIB aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción (Arrebola et al., 1998; Kassavetis et al., 1989). Una cantidad anormal de Tfc6 podría indicar un reconocimiento alterado de los promotores y posiblemente defectos en el reclutamiento de las subunidades del complejo TFIIIB. Por otra parte, estudios *in vitro* sugieren que durante la elongación de la transcripción de la ARN pol III, el complejo TFIIIC se disociaría del ADN a medida que la enzima avanza y completa la síntesis de los transcritos (Bardleben et al., 1994; Kassavetis et al., 1990; Roberts et al., 2003). Ciertos estudios indican que la cantidad total del complejo TFIIIC asociado a la cromatina es menor que la del complejo TFIIIB o la de la ARN pol III, lo cual sugiere que el complejo TFIIIC podría disociarse durante la elongación y funcionar únicamente como un elemento que facilitaría el reclutamiento de los demás factores en el primer ciclo de transcripción (Cieśła et al., 2018; Harismendy et al., 2003; Roberts et al., 2003; Soragni and Kassavetis, 2008). De ser así, si en el entorno de la ARN pol III del mutante *bud27Δ* se encuentra una mayor cantidad relativa de Tfc6, podría ser indicativo de un defecto de disociación. En último término, esto podría significar defectos en la elongación de la transcripción, provocados, tal vez, por una ARN pol III inestable o con una conformación alterada.

Ciertos estudios muestran que la represión de la transcripción de la ARN pol III por carencia de nutrientes produce una menor ocupación de esta en los genes y un incremento de la asociación del complejo TFIIIC (Cieśła et al., 2018; Roberts et al., 2006; Roberts et al.,

2003). No se puede descartar que la mayor asociación de Tfc6 en la cromatina del mutante *bud27Δ* se produzca debido a una inactivación parcial de la ruta TOR, similar a la que ocurre en una situación de represión por rapamicina o por carencia de nutrientes (Este trabajo; (Gstaiger et al., 2003; Martínez-Fernández et al., 2020). Sin embargo, esta posibilidad es quizá la menos probable, debido a que Bud27 es un elemento imprescindible para la correcta represión de la transcripción mediada por la ARN pol III (Capítulo II de este trabajo).

Los datos del análisis proteómico muestran un enriquecimiento general de casi todas las proteínas en el entorno cromatínico de la ARN pol III cuando falta Bud27 (Figura R38). Esto podría sugerir que la ausencia de Bud27 provocaría alteraciones en la estructura cromatínica que conducirían a una mayor cantidad relativa de proteínas en las regiones próximas a la ARN pol III. En este sentido, se ha propuesto que Bud27 actúa facilitando la interacción de la ARN pol III con el remodelador de cromatina RSC para promover la transcripción, y que su ausencia provoca una mayor ocupación de nucleosomas (Vernekar and Bhargava, 2015). Curiosamente, nuestros datos de ProteomChIP muestran que el mutante *bud27Δ* tiene una mayor cantidad relativa del remodelador de cromatina Isw2 en el entorno de la ARN pol III (Figura R37). La presencia de Isw2 se ha asociado a una mayor represión, ya que su función sería la de reclutar nucleosomas y compactar la cromatina (Whitehouse and Tsukiyama, 2006; Yadon et al., 2010). Además, se ha propuesto que la transcripción mediada por la ARN pol III depende directamente de la estructura de la cromatina en las zonas adyacentes a los genes (Shukla and Bhargava, 2018; Yadon et al., 2010). En concordancia, datos de MNasa-seq de nuestro grupo sugieren que la falta de Bud27 provoca un mayor posicionamiento de nucleosomas aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción en los genes para ARNts, lo que podría indicar una mayor compactación de la cromatina y mayor represión en esas zonas (datos no publicados). Curiosamente, el reclutamiento de Isw2 se ha demostrado que ocurre preferentemente aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción en los genes para ARNts (Kumar and Bhargava, 2013). Teniendo en cuenta todo esto, podría ocurrir que la función de Bud27 sea la de favorecer una correcta estructura de la cromatina en los genes diana de la ARN pol III.

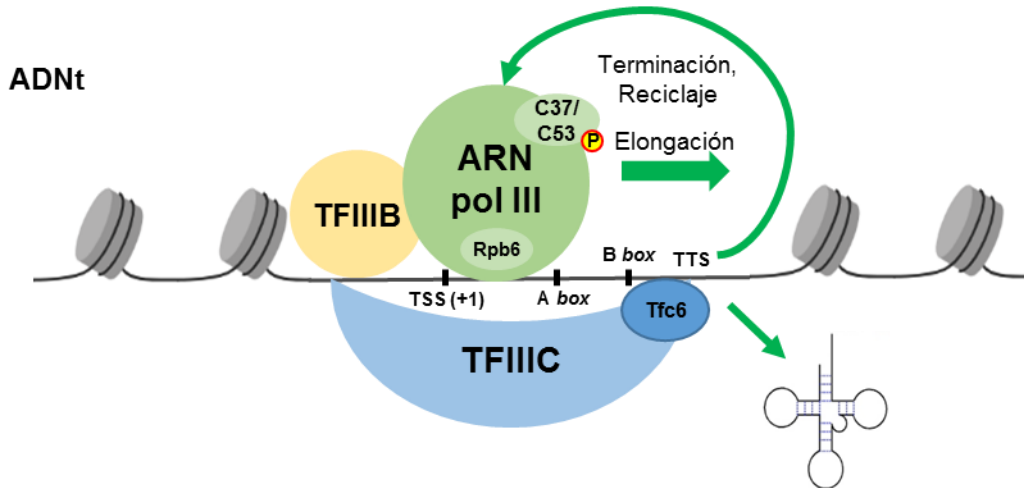
La regulación de la actividad de la ARN pol III, depende en parte de la fosforilación de la subunidad Rpc53 por las kinasas Mck1 y Kns1 en respuesta a diferentes tipos de estrés (Lee et al., 2012). Esta fosforilación de Rpc53 facilita la interacción de la ARN pol III con Maf1, permitiendo la represión de la transcripción (Lee et al., 2012). Aunque no se observó hiperfosforilación de Rpc53 en el mutante *bud27Δ* que sugiriese mayor represión de la ARN pol III, sí que se observó un proceso de fosforilación ralentizado en situación de bloqueo de la ruta TOR por rapamicina (Figura R40). Este resultado va en consonancia con lo mostrado anteriormente en el capítulo II, reforzando la idea de que Bud27 es una proteína imprescindible

para la correcta represión de la ARN pol III. De esta manera, además de ser fundamental para la desfosforilación de Maf1 y su entrada al núcleo, Bud27 podría ser necesario para la fosforilación de Rpc53, permitiendo la completa represión de la ARN pol III. No podemos descartar que el defecto en la fosforilación de Rpc53 pueda ser causado por la ralentización en la cinética de fosforilación por parte de las kinasas Kns1 y Mck1, cuya actividad está controlada por la ruta TOR (Lee et al., 2012), dado que Bud27 es componente de dicha ruta de señalización (Gstaiger et al., 2003; Martínez-Fernández et al., 2020). Además, en un estudio de supresión génica realizado en el mutante *bud27Δ*, se ha identificado el gen *SUN4* (datos no mostrados). La proteína Sun4 interacciona físicamente con la kinasa de Rpc53, Mck1, además de realizar otras funciones celulares (Ptacek et al., 2005). Otra posibilidad es que exista un ensamblaje anormal de la subunidad Rpc53 con el resto de la ARN pol III o una alteración en la conformación que dificulte la fosforilación de esta proteína. Si la subunidad Rpc53 está mal ensamblada y la conformación de la ARN pol III estuviera alterada por la falta de Bud27, podrían ocurrir defectos en la elongación o bien defectos en el reconocimiento de la señal de terminación y el reciclaje de la enzima. En consonancia con esto, la subunidad Rpc53 interacciona directamente con la subunidad Rpc37, y el dímero Rpc37/Rpc53 tiene un importante papel en el reconocimiento de la señal de terminación de los genes, facilitando junto con Rpc11 el reciclaje de la ARN pol III en el promotor (Landrieux et al., 2006; Vannini et al., 2010). El dímero Rpc37/Rpc53 también tiene una importante función en la elongación de la transcripción (Kassavetis et al., 2010). Por otro lado, estudios *in vitro* demuestran que los defectos en el reconocimiento de la señal de terminación por parte de una ARN pol III sin el dímero Rpc37/Rpc53 provoca una mayor síntesis de transcritos *readthrough* o aberrantes (Landrieux et al., 2006). Estos transcritos aberrantes son degradados por el exosoma, evitando su acumulación (Turowski et al., 2016). Curiosamente, en nuestro análisis de ProteomChIP se observó una mayor cantidad relativa de la subunidad Rrp6 del exosoma nuclear en el entorno de la ARN pol III del mutante *bud27Δ*, así como posibles alteraciones, aunque no significativas, en otras subunidades de este mismo complejo (Figura R37). Además, la subunidad Tfc6 del complejo TFIIC, cuyos valores de cantidad relativa están aumentados en el entorno de la ARN pol III del mutante *bud27Δ* según nuestros datos de ProteomChIP (Figura R36), se une a la región terminadora de los genes y se ha sugerido que podría tener funciones relacionadas con el proceso de terminación (Braun et al., 1992; Nagarajavel et al., 2013). Teniendo en cuenta todo lo anterior, podríamos especular que la ausencia de Bud27 provocaría defectos en la conformación y la estabilidad de la ARN pol III, cuya consecuencia sería un posicionamiento anormal del dímero Rpc37/Rpc53, un mal reconocimiento de la señal de terminación de los genes, con posibles efectos en el reciclaje de la enzima y en la elongación, y una posible síntesis excesiva de transcritos aberrantes que serían degradados por el exosoma nuclear.

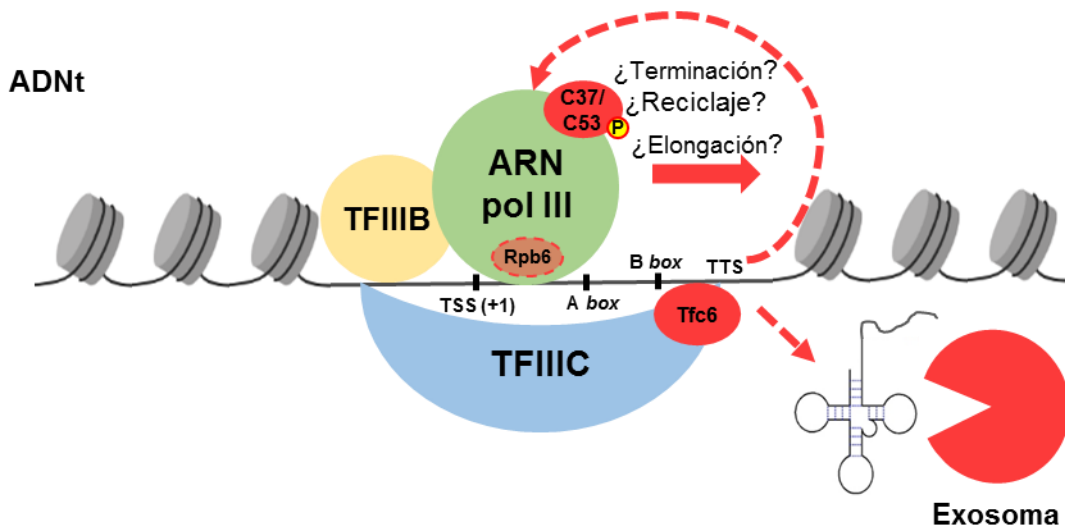
## ***Discusión***

A continuación, se presenta un modelo del proceso transcripcional de la ARN pol III en el mutante *bud27Δ* que se explica en la Figura D3. Como se ha mencionado anteriormente, la falta de Bud27 podría provocar una mayor compactación de la cromatina y mayor posicionamiento de nucleosomas, inestabilidad de la enzima y/o defectos en el reconocimiento de la señal de terminación por un mal ensamblaje del dímero Rpc37/Rpc53 y una mayor cantidad de Tfc6 asociado a cromatina. Además, puede haber una mayor tasa de degradación de transcritos aberrantes. No obstante, tampoco se pueden descartar defectos adicionales en la elongación y en el reciclaje de la ARN pol III.

**A Silvestre**



**B bud27Δ**



**Figura D3. Modelo propuesto sobre el proceso transcripcional de la ARN pol III en un ADNt en el mutante *bud27Δ*.** A) En la cepa silvestre, el factor de transcripción TFIIC reconoce las cajas A y B y recluta al complejo TFIIB aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción (TSS +1) (Acker et al., 2013). Entonces, se recluta la ARN pol III y comienza la elongación (Acker et al., 2013; Turowski and Tollervey, 2016). La ARN pol III reconoce la señal de terminación (TTS) gracias al dímero Rpc37/Rpc53, se libera el transcrito y se recicla al TSS para comenzar un nuevo ciclo (Dieci et al., 2013; Landrieux et al., 2006). B) La ausencia de Bud27 provoca una mayor compactación de la cromatina conllevando a una menor asociación de ARN pol III y factores de transcripción a los genes. También podría alterar la inestabilidad de la ARN pol III, alterando la asociación correcta de algunas subunidades como Rpb6, representada con un fondo más claro. Del mismo modo, el dímero Rpc37/Rpc53 puede tener un ensamblaje defectuoso, haciendo que la ARN pol III no reconozca la señal de terminación adecuadamente. Tampoco pueden descartarse defectos durante la elongación y/o el reciclaje de la ARN pol III. En estas condiciones podrían generarse una mayor cantidad de transcritos aberrantes, que serían degradados por el exosoma. Las flechas discontinuas representan posibles alteraciones en las etapas de la transcripción. Los factores de color rojo indican alteraciones según nuestros datos. El grupo fosfato, representado con una "P" sobre la proteína Rpc53, indica que se trata de una fosfoproteína (Lee et al., 2012).

## **Conclusiones/Conclusions**





## **CONCLUSIONES**

### **Primera conclusión**

Bud27 participa en la transcripción de las tres ARN polimerasas, probablemente a través de mecanismos que en algunos casos pueden diferir para cada una de ellas. Bud27 coordina la transcripción de las tres ARN polimerasas para promover la biogénesis de ribosomas, probablemente gracias a su asociación con la subunidad común Rpb5 y, al menos parcialmente, a través de la vía TOR.

### **Segunda conclusión**

Bud27 participa en la transcripción mediada por la ARN pol I, probablemente, influyendo en su procesividad. No podemos descartar que este papel lo ejerza facilitando la asociación de la ARN pol I con los factores de transcripción y/o con los remodeladores de cromatina, al igual que ocurre para las ARN pol II y III con el remodelador RSC. Tampoco podemos descartar que Bud27 participe en el procesamiento de los transcritos sintetizados por la ARN pol I. Además, la falta de Bud27 agrava el crecimiento de una cepa con alto número de copias de ADN<sub>r</sub>, lo que podría sugerir alteración en el número de copias activas de ADN<sub>r</sub> y posibles defectos en la formación del nucleolo.

### **Tercera conclusión**

Bud27 se asocia a la fosfatasa PP4 y controla el estado de fosforilación del regulador negativo Maf1 y su translocación al núcleo. Es probable que Bud27 ejerza esta función a través de una interacción tripartita Bud27-PP4-Maf1, regulada por la vía TOR. Por lo tanto, Bud27 es un elemento clave en la modulación de la actividad de Maf1 y en la represión de la ARN pol III.

### **Cuarta conclusión**

Los estudios de proteómica cuantitativa sugieren que la ausencia de Bud27 podría provocar alteraciones en los complejos transcripcionales de la ARN pol III. Estas alteraciones podrían implicar, posibles defectos en la elongación, terminación y/o reciclaje de la ARN pol III. No podemos descartar que la ausencia de Bud27 conlleve alteraciones adicionales en la conformación de la cromatina y que afecte a la degradación de transcritos sintetizados por la ARN pol III.

## **CONCLUSIONS**

### **First conclusion**

Bud27 participates in the transcription of all three RNA polymerases, probably through mechanisms that may differ, in some cases, for each of them. Bud27 coordinates the transcription of the three RNA polymerases to promote ribosome biogenesis, probably through its association with the common subunit Rpb5 and, at least partially, through the TOR pathway.

### **Second conclusion**

Bud27 participates in RNA pol I-mediated transcription, probably by influencing its processivity. We cannot rule out that it exerts this role by facilitating the association of RNA pol I with transcription factors and/or chromatin remodelers, as is the case for RNA pol II and III with the RSC remodeler. We also cannot rule out that Bud27 participates in the processing of transcripts synthesized by RNA pol I. In addition, the lack of Bud27 aggravates the growth of a high rDNA copy number strain, which could suggest alteration in the number of active rDNA copies and possible defects in nucleolus formation.

### **Third conclusion**

Bud27 associates with the phosphatase PP4 and controls the phosphorylation status of the negative regulator Maf1 and its translocation into the nucleus. It is likely that Bud27 exerts this function through a tripartite Bud27-PP4-Maf1 interaction, regulated by the TOR pathway. Therefore, Bud27 is a key player in the modulation of Maf1 activity and repression of RNA pol III.

### **Fourth conclusion**

Quantitative proteomic approaches suggest that the absence of Bud27 would cause changes in the composition of RNA pol III transcriptional complexes. These alterations could imply defects in RNA pol III elongation, termination and/or recycling. We cannot rule out that the absence of Bud27 leads to additional alterations in chromatin conformation and affects the degradation of transcripts synthesized by RNA pol III.



## **Bibliografía**





## BIBLIOGRAFÍA

- Aasland, R.; Stewart, A. F.; Gibson, T. The SANT domain: a putative DNA-binding domain in the SWI-SNF and ADA complexes, the transcriptional corepressor N-CoR and TFIIIB. *Trends Biochem. Sci.* **1996**, *3*, 87-88.
- Abascal-Palacios, G.; Ramsay, E. P.; Beuron, F.; Morris, E.; Vannini, A. Structural basis of RNA polymerase III transcription initiation. *Nature* **2018**, *553*, 301-306.
- Acker, J.; Conesa, C.; Lefebvre, O. Yeast RNA polymerase III transcription factors and effectors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* **2013**, *1829*, 283-295.
- Acker, J.; Nguyen, N.; Vandamme, M.; Tavenet, A.; Briand-Suleau, A.; Conesa, C. Sub1 and Maf1, two effectors of RNA polymerase III, are involved in the yeast quiescence cycle. *PLoS One* **2014**, *9*, e114587.
- Albanese, V.; Yam, A. Y.; Baughman, J.; Parnot, C.; Frydman, J. Systems analyses reveal two chaperone networks with distinct functions in eukaryotic cells. *Cell* **2006**, *124*, 75-88.
- Albert, B.; Léger-Silvestre, I.; Normand, C.; Ostermaier, M. K.; Pérez-Fernández, J.; Panov, K. I.; Zomerdijk, J. C.; Schultz, P.; Gadal, O. RNA polymerase I-specific subunits promote polymerase clustering to enhance the rRNA gene transcription cycle. *J. Cell Biol.* **2011**, *192*, 277-293.
- Anderson, J. T.; Wilson, S. M.; Datar, K. V.; Swanson, M. S. NAB2: a yeast nuclear polyadenylated RNA-binding protein essential for cell viability. *Mol. Cell. Biol.* **1993**, *13*, 2730-2741.
- Arimbasseri, A. G.; Maraia, R. J. RNA polymerase III advances: structural and tRNA functional views. *Trends Biochem. Sci.* **2016**, *41*, 546-559.
- Arimbasseri, A. G.; Maraia, R. J. Mechanism of transcription termination by RNA polymerase III utilizes a non-template strand sequence-specific signal element. *Mol. Cell* **2015**, *58*, 1124-1132.
- Arimbasseri, A. G.; Rijal, K.; Maraia, R. J. Transcription termination by the eukaryotic RNA polymerase III. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* **2013**, *1829*, 318-330.
- Armache, K.; Mitterweger, S.; Meinhart, A.; Cramer, P. Structures of complete RNA polymerase II and its subcomplex, Rpb4/7. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 7131-7134.
- Arrebola, R.; Manaud, N.; Rozenfeld, S.; Marsolier, M.; Lefebvre, O.; Carles, C.; Thuriaux, P.; Conesa, C.; Sentenac, A.  $\tau$ 91, an essential subunit of yeast transcription factor IIIC, cooperates with  $\tau$ 138 in DNA binding. *Mol. Cell. Biol.* **1998**, *18*, 1-9.

- Awad, S.; Ryan, D.; Prochasson, P.; Owen-Hughes, T.; Hassan, A. H. The Snf2 homolog Fun30 acts as a homodimeric ATP-dependent chromatin-remodeling enzyme. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 9477-9484.
- Barba-Aliaga, M.; Alepuz, P.; Pérez-Ortín, J. E. Eukaryotic RNA polymerases: the many ways to transcribe a gene. *Frontiers in Molecular Biosciences* **2021**, *8*.
- Bardeleben, C.; Kassavetis, G. A.; Geiduschek, E. P. Encounters of *Saccharomyces cerevisiae* RNA Polymerase III with its Transcription Factors during RNA Chain Elongation. *J. Mol. Biol.* **1994**, *235*, 1193-1205.
- Bar-Nun, S.; Shneyour, Y.; Beckmann, J. S. G-418, an elongation inhibitor of 80 S ribosomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression* **1983**, *741*, 123-127.
- Bazzi, M.; Mantiero, D.; Trovesi, C.; Lucchini, G.; Longhese, M. P. Dephosphorylation of  $\gamma$ H2A by Glc7/protein phosphatase 1 promotes recovery from inhibition of DNA replication. *Mol. Cell. Biol.* **2010**, *30*, 131-145.
- Bedwell, G. J.; Appling, F. D.; Anderson, S. J.; Schneider, D. A. Efficient transcription by RNA polymerase I using recombinant core factor. *Gene* **2012**, *492*, 94-99.
- Beranek, D. T. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **1990**, *231*, 11-30.
- Berger, A. B.; Decourty, L.; Badis, G.; Nehrbass, U.; Jacquier, A.; Gadai, O. Hmo1 is required for TOR-dependent regulation of ribosomal protein gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* **2007**, *27*, 8015-8026.
- Bhalla, P.; Vernekar, D. V.; Gilquin, B.; Couté, Y.; Bhargava, P. Interactome of the yeast RNA polymerase III transcription machinery constitutes several chromatin modifiers and regulators of the genes transcribed by RNA polymerase II. *Gene* **2019**, *702*, 205-214.
- Bhargava, P. Regulatory networking of the three RNA polymerases helps the eukaryotic cells cope with environmental stress. *Curr. Genet.* **2021**, *67*, 595-603.
- Bhargava, P. Epigenetic regulation of transcription by RNA polymerase III. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* **2013**, *1829*, 1015-1025.
- Blattner, C.; Jennebach, S.; Herzog, F.; Mayer, A.; Cheung, A. C.; Witte, G.; Lorenzen, K.; Hopfner, K. P.; Heck, A. J.; Aebersold, R.; Cramer, P. Molecular basis of Rrn3-regulated RNA polymerase I initiation and cell growth. *Genes Dev.* **2011**, *25*, 2093-2105.
- Boeke, J. D.; La Croute, F.; Fink, G. R. A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Molecular and General Genetics MGG* **1984**, *197*, 345-346.

- Boguta, M. Control of RNA polymerases I and III by the TOR signaling pathway. *Cell Cycle* **2009**, *8*, 4023-4028.
- Boguta, M.; Czerska, K.; Żołądek, T. Mutation in a new gene MAF1 affects tRNA suppressor efficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **1997**, *185*, 291-296.
- Boguta, M. Maf1, a general negative regulator of RNA polymerase III in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **2013**, *1829*, 376-384.
- Bonneaud, N.; Ozier- Kalogeropoulos, O.; Li, G.; Labouesse, M.; Minvielle- Sebastia, L.; Lacroute, F. A family of low and high copy replicative, integrative and single- stranded *S. cerevisiae*/E. coli shuttle vectors. *Yeast* **1991**, *7*, 609-615.
- Boulon, S.; Pradet-Balade, B.; Verheggen, C.; Molle, D.; Boireau, S.; Georgieva, M.; Azzag, K.; Robert, M.; Ahmad, Y.; Neel, H. HSP90 and its R2TP/Prefoldin-like cochaperone are involved in the cytoplasmic assembly of RNA polymerase II. *Mol. Cell* **2010**, *39*, 912-924.
- Braglia, P.; Dugas, S. L.; Donze, D.; Dieci, G. Requirement of Nhp6 proteins for transcription of a subset of tRNA genes and heterochromatin barrier function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **2007**, *27*, 1545-1557.
- Braglia, P.; Percudani, R.; Dieci, G. Sequence context effects on oligo(dT) termination signal recognition by *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 19551-19562.
- Braun, B. R.; Bartholomew, B.; Kassavetis, G. A.; Geiduschek, E. P. Topography of transcription factor complexes on the *Saccharomyces cerevisiae* 5 S RNA gene. *J. Mol. Biol.* **1992**, *228*, 1063-1077.
- Braun, B. R.; Riggs, D. L.; Kassavetis, G. A.; Geiduschek, E. P. Multiple states of protein-DNA interaction in the assembly of transcription complexes on *Saccharomyces cerevisiae* 5S ribosomal RNA genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1989**, *86*, 2530-2534.
- Briand, J.; Navarro, F.; Gadal, O.; Thuriaux, P. Cross talk between tRNA and rRNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **2001**, *21*, 189-195.
- Bruckmann, A.; Linnemann, J.; Perez-Fernandez, J. In *Purification of RNA Polymerase I-Associated Chromatin from Yeast Cells*; The Nucleolus; Springer: 2016; pp 213-223.
- Brun, I.; Sentenac, A.; Werner, M. Dual role of the C34 subunit of RNA polymerase III in transcription initiation. *EMBO J.* **1997**, *16*, 5730-5741.
- Burén, S.; Gomes, A. L.; Teijeiro, A.; Fawal, M.; Yilmaz, M.; Tummala, K. S.; Perez, M.; Rodriguez-Justo, M.; Campos-Olivas, R.; Megías, D. Regulation of OGT by URI in response to glucose confers c-MYC-dependent survival mechanisms. *Cancer cell* **2016**, *30*, 290-307.

- Cairns, B. R.; Lorch, Y.; Li, Y.; Zhang, M.; Lacomis, L.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Du, J.; Laurent, B.; Kornberg, R. D. RSC, an essential, abundant chromatin-remodeling complex. *Cell* **1996**, *87*, 1249-1260.
- Calvo, O.; García, A. RNA polymerase II phosphorylation and gene expression regulation. *Protein Phosphorylation in Human Health* **2012**, 151-194.
- Camier, S.; Dechampsme, A. M.; Sentenac, A. The only essential function of TFIIIA in yeast is the transcription of 5S rRNA genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 9338-9342.
- Carter, R.; Drouin, G. The increase in the number of subunits in eukaryotic RNA polymerase III relative to RNA polymerase II is due to the permanent recruitment of general transcription factors. *Mol. Biol. Evol.* **2010**, *27*, 1035-1043.
- Challice, J.; Segall, J. Transcription of the 5 S rRNA gene of *Saccharomyces cerevisiae* requires a promoter element at 1 and a 14-base pair internal control region. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 20060-20067.
- Chapman, R. D.; Heidemann, M.; Hintermair, C.; Eick, D. Molecular evolution of the RNA polymerase II CTD. *Trends in Genetics* **2008**, *24*, 289-296.
- Chauvin, C.; Koka, V.; Nouschi, A.; Mieulet, V.; Hoareau-Aveilla, C.; Dreazen, A.; Cagnard, N.; Carpentier, W.; Kiss, T.; Meyuhas, O. Ribosomal protein S6 kinase activity controls the ribosome biogenesis transcriptional program. *Oncogene* **2014**, *33*, 474-483.
- Chédin, S.; Laferté, A.; Hoang, T.; Lafontaine, D. L.; Riva, M.; Carles, C. Is ribosome synthesis controlled by pol I transcription? *Cell Cycle* **2007**, *6*, 11-15.
- Chen, D.; Yang, B.; Kuo, T. One-step transformation of yeast in stationary phase. *Curr. Genet.* **1992**, *21*, 83-84.
- Chernyakov, I.; Whipple, J. M.; Kotelawala, L.; Grayhack, E. J.; Phizicky, E. M. Degradation of several hypomodified mature tRNA species in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by Met22 and the 5'-3' exonucleases Rat1 and Xrn1. *Genes Dev.* **2008**, *22*, 1369-1380.
- Choder, M. Rpb4 and Rpb7: subunits of RNA polymerase II and beyond. *Trends Biochem. Sci.* **2004**, *29*, 674-681.
- Cieśla, M.; Makala, E.; Płonka, M.; Bazan, R.; Gewartowski, K.; Dziembowski, A.; Boguta, M. Rbs1, a new protein implicated in RNA polymerase III biogenesis in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **2015**, *35*, 1169-1181.
- Cieśla, M.; Skowronek, E.; Boguta, M. Function of TFIIIC, RNA polymerase III initiation factor, in activation and repression of tRNA gene transcription. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 9444-9455.

- Ciesla, M.; Towpik, J.; Graczyk, D.; Oficjalska-Pham, D.; Harismendy, O.; Suleau, A.; Balicki, K.; Conesa, C.; Lefebvre, O.; Boguta, M. Maf1 is involved in coupling carbon metabolism to RNA polymerase III transcription. *Mol. Cell. Biol.* **2007**, *27*, 7693-7702.
- Cioci, F.; Vu, L.; Eliason, K.; Oakes, M.; Siddiqi, I. N.; Nomura, M. Silencing in yeast rDNA chromatin: reciprocal relationship in gene expression between RNA polymerase I and II. *Mol. Cell* **2003**, *12*, 135-145.
- Claypool, J. A.; French, S. L.; Johzuka, K.; Eliason, K.; Vu, L.; Dodd, J. A.; Beyer, A. L.; Nomura, M. Tor pathway regulates Rrn3p-dependent recruitment of yeast RNA polymerase I to the promoter but does not participate in alteration of the number of active genes. *Mol. Biol. Cell* **2004**, *15*, 946-956.
- Cohen, P. T.; Philp, A.; Vázquez-Martin, C. Protein phosphatase 4—from obscurity to vital functions. *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 3278-3286.
- Colgan, D. F.; Manley, J. L. Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes Dev.* **1997**, *11*, 2755-2766.
- Collins, S. R.; Miller, K. M.; Maas, N. L.; Roguev, A.; Fillingham, J.; Chu, C. S.; Schuldiner, M.; Gebbia, M.; Recht, J.; Shales, M. Functional dissection of protein complexes involved in yeast chromosome biology using a genetic interaction map. *Nature* **2007**, *446*, 806-810.
- Conesa, C.; Acker, J. Sub1/PC4 a chromatin associated protein with multiple functions in transcription. *RNA biology* **2010**, *7*, 287-290.
- Cramer, P.; Armache, K.; Baumli, S.; Benkert, S.; Brueckner, F.; Buchen, C.; Damsma, G. E.; Dengl, S.; Geiger, S. R.; Jasiak, A. J. Structure of eukaryotic RNA polymerases. *Annu.Rev.Biophys.* **2008**, *37*, 337-352.
- Cramer, P.; Bushnell, D. A.; Fu, J.; Gnatt, A. L.; Maier-Davis, B.; Thompson, N. E.; Burgess, R. R.; Edwards, A. M.; David, P. R.; Kornberg, R. D. Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science* **2000**, *288*, 640-649.
- Cramer, P.; Bushnell, D. A.; Kornberg, R. D. Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 Ångstrom resolution. *Science* **2001**, *292*, 1863-1876.
- Crespo, J. L.; Hall, M. N. Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2002**, *66*, 579-591.
- Cuesta, R.; Hinnebusch, A. G.; Tamame, M. Identification of GCD14 and GCD15, novel genes required for translational repression of GCN4 mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **1998**, *148*, 1007-1020.

- Cuevas-Bermúdez, A.; Garrido-Godino, A. I.; Gutiérrez-Santiago, F.; Navarro, F. A Yeast Chromatin-enriched Fractions Purification Approach, yChEFs, from *Saccharomyces cerevisiae*. *Bio-protocol* **2020**, *10*.
- Cuevas-Bermúdez, A.; Garrido-Godino, A. I.; Navarro, F. A novel yeast chromatin-enriched fractions purification approach, yChEFs, for the chromatin-associated protein analysis used for chromatin-associated and RNA-dependent chromatin-associated proteome studies from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene Reports* **2019**, *16*, 100450.
- Czeko, E.; Seizl, M.; Augsberger, C.; Mielke, T.; Cramer, P. Iwr1 directs RNA polymerase II nuclear import. *Mol. Cell* **2011**, *42*, 261-266.
- D'Arcy, S.; Luger, K. Understanding histone acetyltransferase Rtt109 structure and function: how many chaperones does it take? *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2011**, *21*, 728-734.
- Dammann, R.; Lucchini, R.; Koller, T.; Sogo, J. M. Chromatin structures and transcription of rDNA in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 2331-2338.
- Darzacq, X.; Shav-Tal, Y.; De Turris, V.; Brody, Y.; Shenoy, S. M.; Phair, R. D.; Singer, R. H. In vivo dynamics of RNA polymerase II transcription. *Nature structural & molecular biology* **2007**, *14*, 796-806.
- Davies, J.; Jimenez, A. A new selective agent for eukaryotic cloning vectors. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1980**, *29*, 1089-1092.
- Delgermaa, L.; Hayashi, N.; Dorjsuren, D.; Nomura, T.; Thuy, L. T.; Murakami, S. Subcellular localization of RPB5-mediating protein and its putative functional partner. *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 8556-8566.
- Deplazes, A.; Möckli, N.; Luke, B.; Auerbach, D.; Peter, M. Yeast Uri1p promotes translation initiation and may provide a link to cotranslational quality control. *EMBO J.* **2009**, *28*, 1429-1441.
- Deprez, E.; Arrebola, R.; Conesa, C.; Sentenac, A. A subunit of yeast TFIIC participates in the recruitment of TATA-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* **1999**, *19*, 8042-8051.
- Desai, B. N.; Myers, B. R.; Schreiber, S. L. FKBP12-rapamycin-associated protein associates with mitochondria and senses osmotic stress via mitochondrial dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, *99*, 4319-4324.
- Desai, N.; Lee, J.; Upadhyay, R.; Chu, Y.; Moir, R. D.; Willis, I. M. Two steps in Maf1-dependent repression of transcription by RNA polymerase III. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 6455-6462.
- Dhillon, N.; Raab, J.; Guzzo, J.; Szyjka, S. J.; Gangadharan, S.; Aparicio, O. M.; Andrews, B.; Kamakaka, R. T. DNA polymerase  $\epsilon$ , acetylases and remodellers cooperate to form a specialized chromatin structure at a tRNA insulator. *EMBO J.* **2009**, *28*, 2583-2600.

- Dieci, G.; Bosio, M. C.; Fermi, B.; Ferrari, R. Transcription reinitiation by RNA polymerase III. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* **2013**, *1829*, 331-341.
- Dieci, G.; Duimio, L.; Coda-Zabetta, F.; Sprague, K.; Ottonello, S. A novel RNA polymerase III transcription factor fraction that is not required for template commitment. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 11199-11207.
- Dieci, G.; Giuliodori, S.; Catellani, M.; Percudani, R.; Ottonello, S. Intragenic Promoter Adaptation and Facilitated RNA Polymerase III Recycling in the Transcription of SCR1, the 7SL RNA Gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 6903-6914.
- Dieci, G.; Ruotolo, R.; Braglia, P.; Carles, C.; Carpentieri, A.; Amoresano, A.; Ottonello, S. Positive modulation of RNA polymerase III transcription by ribosomal proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *379*, 489-493.
- Dorjsuren, D.; Lin, Y.; Wei, W.; Yamashita, T.; Nomura, T.; Hayashi, N.; Murakami, S. RMP, a novel RNA polymerase II subunit 5-interacting protein, counteracts transactivation by hepatitis B virus X protein. *Mol. Cell. Biol.* **1998**, *18*, 7546-7555.
- Dubouloz, F.; Deloche, O.; Wanke, V.; Camerani, E.; De Virgilio, C. The TOR and EGO protein complexes orchestrate microautophagy in yeast. *Mol. Cell* **2005**, *19*, 15-26.
- Ducrot, C.; Lefebvre, O.; Landrieux, E.; Guirouilh-Barbat, J.; Sentenac, A.; Acker, J. Reconstitution of the yeast RNA polymerase III transcription system with all recombinant factors. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 11685-11692.
- Dumay-Odelot, H.; Acker, J.; Arrebola, R.; Sentenac, A.; Marck, C. Multiple roles of the  $\tau$ 131 subunit of yeast transcription factor III C (TFIIIC) in TFIIIB assembly. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 298-308.
- Dundr, M.; Hoffmann-Rohrer, U.; Hu, Q.; Grummt, I.; Rothblum, L. I.; Phair, R. D.; Misteli, T. A kinetic framework for a mammalian RNA polymerase in vivo. *Science* **2002**, *298*, 1623-1626.
- Durand-Dubief, M.; Will, W. R.; Petrini, E.; Theodorou, D.; Harris, R. R.; Crawford, M. R.; Paszkiewicz, K.; Krueger, F.; Corraera, R. M.; Vetter, A. T. SWI/SNF-like chromatin remodeling factor Fun30 supports point centromere function in *S. cerevisiae*. **2012**.
- Eick, D.; Geyer, M. The RNA polymerase II carboxy-terminal domain (CTD) code. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 8456-8490.
- Engel, C.; Sainsbury, S.; Cheung, A. C.; Kostrewa, D.; Cramer, P. RNA polymerase I structure and transcription regulation. *Nature* **2013**, *502*, 650-655.
- Esser, K.; Lemke, P. A. *The mycota: A comprehensive treatise of Fungi as experimental systems for basic and applied research*. Springer: 1994; .

- Fernández-Tornero, C.; Böttcher, B.; Rashid, U. J.; Müller, C. W. Analyzing RNA polymerase III by electron cryomicroscopy. *RNA biology* **2011**, *8*, 760-765.
- Fernández-Tornero, C.; Moreno-Morcillo, M.; Rashid, U. J.; Taylor, N. M.; Ruiz, F. M.; Gruene, T.; Legrand, P.; Steuerwald, U.; Müller, C. W. Crystal structure of the 14-subunit RNA polymerase I. *Nature* **2013**, *502*, 644-649.
- Ferrari, R.; Rivetti, C.; Acker, J.; Dieci, G. Distinct roles of transcription factors TFIIIB and TFIIIC in RNA polymerase III transcription reinitiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2004**, *101*, 13442-13447.
- Fingerman, I.; Nagaraj, V.; Norris, D.; Vershon, A. K. Sfp1 plays a key role in yeast ribosome biogenesis. *Eukaryotic cell* **2003**, *2*, 1061-1068.
- Formosa, T.; Eriksson, P.; Wittmeyer, J.; Ginn, J.; Yu, Y.; Stillman, D. J. Spt16–Pob3 and the HMG protein Nhp6 combine to form the nucleosome-binding factor SPN. *EMBO J.* **2001**, *20*, 3506-3517.
- Franklin, T.; Cook, J. M. The inhibition of nucleic acid synthesis by mycophenolic acid. *Biochem. J.* **1969**, *113*, 515-524.
- French, S. L.; Osheim, Y. N.; Cioci, F.; Nomura, M.; Beyer, A. L. In exponentially growing *Saccharomyces cerevisiae* cells, rRNA synthesis is determined by the summed RNA polymerase I loading rate rather than by the number of active genes. *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23*, 1558-1568.
- Frydman, J. Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70*, 603-647.
- Futcher, A.; Cox, B. Maintenance of the 2 microns circle plasmid in populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **1983**, *154*, 612-622.
- Gabrielsen, O. S.; Marzouki, N.; Ruet, A.; Sentenac, A.; Fromageot, P. Two polypeptide chains in yeast transcription factor tau interact with DNA. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 7505-7511.
- Garí, E.; Piedrafita, L.; Aldea, M.; Herrero, E. A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **1997**, *13*, 837-848.
- Garrido-Godino, A.; Cuevas-Bermúdez, A.; Gutiérrez-Santiago, F.; Mota-Trujillo, M.; Navarro, F. RNA polymerase II assembly and mRNA decay regulation are mediated and interconnected via CTD Ser5P phosphatase Rtr1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**.
- Garrido-Godino, A. I.; Gutiérrez-Santiago, F.; Navarro, F. Biogenesis of RNA polymerases in yeast. *Frontiers in Molecular Biosciences* **2021**, *8*.

- Geissler, S.; Siegers, K.; Schiebel, E. A novel protein complex promoting formation of functional  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tubulin. *EMBO J.* **1998**, *17*, 952-966.
- Ghavi-Helm, Y.; Michaut, M.; Acker, J.; Aude, J. C.; Thuriaux, P.; Werner, M.; Soutourina, J. Genome-wide location analysis reveals a role of TFIIIS in RNA polymerase III transcription. *Genes Dev.* **2008**, *22*, 1934-1947.
- Ghosh, A.; Lima, C. D. Enzymology of RNA cap synthesis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* **2010**, *1*, 152-172.
- Gietz, R. D.; Schiestl, R. H.; Willems, A. R.; Woods, R. A. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* **1995**, *11*, 355-360.
- Gingras, A. C.; Caballero, M.; Zarske, M.; Sanchez, A.; Hazbun, T. R.; Fields, S.; Sonenberg, N.; Hafen, E.; Raught, B.; Aebersold, R. A novel, evolutionarily conserved protein phosphatase complex involved in cisplatin sensitivity. *Mol. Cell. Proteomics* **2005**, *4*, 1725-1740.
- Goffeau, A.; Aert, R.; Agostini-Carbone, M.; Ahmed, A.; Aigle, M.; Alberghina, L.; Albermann, K.; Albers, M. c.; Aldea, M.; Alexandraki, D. The yeast genome directory. *Nature* **1997**, *387*, 5-6.
- Goldstein, A. L.; McCusker, J. H. Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **1999**, *15*, 1541-1553.
- Gómez-Herreros, F.; de Miguel-Jiménez, L.; Millán-Zambrano, G.; Peñate, X.; Delgado-Ramos, L.; Muñoz-Centeno, M. C.; Chávez, S. One step back before moving forward: regulation of transcription elongation by arrest and backtracking. *FEBS Lett.* **2012**, *586*, 2820-2825.
- Gómez-Navarro, N.; Estruch, F. Different pathways for the nuclear import of yeast RNA polymerase II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* **2015**, *1849*, 1354-1362.
- Gómez-Navarro, N.; Peiró-Chova, L.; Rodríguez-Navarro, S.; Polaina, J.; Estruch, F. Rtp1p is a karyopherin-like protein required for RNA polymerase II biogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **2013**, *33*, 1756-1767.
- González, A.; Shimobayashi, M.; Eisenberg, T.; Merle, D. A.; Pendl, T.; Hall, M. N.; Moustafa, T. TORC1 promotes phosphorylation of ribosomal protein S6 via the AGC kinase Ypk3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS one* **2015**, *10*, e0120250.
- Graczyk, D.; Debski, J.; Muszynska, G.; Bretner, M.; Lefebvre, O.; Boguta, M. Casein kinase II-mediated phosphorylation of general repressor Maf1 triggers RNA polymerase III activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 4926-4931.

- Gstaiger, M.; Luke, B.; Hess, D.; Oakeley, E. J.; Wirbelauer, C.; Blondel, M.; Vigneron, M.; Peter, M.; Krek, W. Control of nutrient-sensitive transcription programs by the unconventional prefoldin URI. *Science* **2003**, *302*, 1208-1212.
- Haag, J. R.; Pikaard, C. S. Multisubunit RNA polymerases IV and V: purveyors of non-coding RNA for plant gene silencing. *Nature reviews Molecular cell biology* **2011**, *12*, 483-492.
- Hall, D. B.; Wade, J. T.; Struhl, K. An HMG protein, Hmo1, associates with promoters of many ribosomal protein genes and throughout the rRNA gene locus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **2006**, *26*, 3672-3679.
- Hardeland, U.; Hurt, E. Coordinated nuclear import of RNA polymerase III subunits. *Traffic* **2006**, *7*, 465-473.
- Hardwick, J. S.; Kuruvilla, F. G.; Tong, J. K.; Shamji, A. F.; Schreiber, S. L. Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signaling pathways directly controlled by the Tor proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 14866-14870.
- Harismendy, O.; Gendrel, C.; Soularue, P.; Gidrol, X.; Sentenac, A.; Werner, M.; Lefebvre, O. Genome-wide location of yeast RNA polymerase III transcription machinery. *EMBO J.* **2003**, *22*, 4738-4747.
- Hartzog, G. A.; Fu, J. The Spt4–Spt5 complex: A multi-faceted regulator of transcription elongation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* **2013**, *1829*, 105-115.
- Heideker, J.; Lis, E. T.; Romesberg, F. E. Phosphatases, DNA damage checkpoints and checkpoint deactivation. *Cell cycle* **2007**, *6*, 3058-3064.
- Heitman, J.; Movva, N. R.; Hall, M. N. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* **1991**, *253*, 905-909.
- Herskowitz, I. Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **1988**, *52*, 536-553.
- Hierlmeier, T.; Merl, J.; Sauert, M.; Perez-Fernandez, J.; Schultz, P.; Bruckmann, A.; Hamperl, S.; Ohmayer, U.; Rachel, R.; Jacob, A. Rrp5p, Noc1p and Noc2p form a protein module which is part of early large ribosomal subunit precursors in *S. cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 1191-1210.
- Hinnebusch, A. G. Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* **2005**, *59*, 407-450.
- Hoffmann, N. A.; Jakobi, A. J.; Moreno-Morcillo, M.; Glatt, S.; Kosinski, J.; Hagen, W. J.; Sachse, C.; Müller, C. W. Molecular structures of unbound and transcribing RNA polymerase III. *Nature* **2015**, *528*, 231-236.

- Hořejší, Z.; Takai, H.; Adelman, C. A.; Collis, S. J.; Flynn, H.; Maslen, S.; Skehel, J. M.; de Lange, T.; Boulton, S. J. CK2 phospho-dependent binding of R2TP complex to TEL2 is essential for mTOR and SMG1 stability. *Mol. Cell* **2010**, *39*, 839-850.
- Houseley, J.; Tollervey, D. The many pathways of RNA degradation. *Cell* **2009**, *136*, 763-776.
- Hsu, P. L.; Yang, F.; Smith-Kinnaman, W.; Yang, W.; Song, J.; Mosley, A. L.; Varani, G. Rtr1 is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates Tyr1 and Ser5 on the RNA polymerase II CTD. *J. Mol. Biol.* **2014**, *426*, 2970-2981.
- Huang, Y.; Intine, R. V.; Mozlin, A.; Hasson, S.; Maraia, R. J. Mutations in the RNA polymerase III subunit Rpc11p that decrease RNA 3' cleavage activity increase 3'-terminal oligo (U) length and La-dependent tRNA processing. *Mol. Cell. Biol.* **2005**, *25*, 621-636.
- Huber, A.; Bodenmiller, B.; Uotila, A.; Stahl, M.; Wanka, S.; Gerrits, B.; Aebersold, R.; Loewith, R. Characterization of the rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that Sch9 is a central coordinator of protein synthesis. *Genes Dev.* **2009**, *23*, 1929-1943.
- Huet, J.; Conesa, C.; Manaud, N.; Chaussivert, N.; Sentenac, A. Interactions between yeast TFIIIB components. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 2282-2288.
- Hustedt, N.; Seeber, A.; Sack, R.; Tsai-Pflugfelder, M.; Bhullar, B.; Vlaming, H.; van Leeuwen, F.; Guénolé, A.; van Attikum, H.; Srivas, R. Yeast PP4 interacts with ATR homolog Ddc2-Mec1 and regulates checkpoint signaling. *Mol. Cell* **2015**, *57*, 273-289.
- Ito, T.; Chiba, T.; Ozawa, R.; Yoshida, M.; Hattori, M.; Sakaki, Y. A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 4569-4574.
- Jacinto, E.; Guo, B.; Arndt, K. T.; Schmelzle, T.; Hall, M. N. TIP41 interacts with TAP42 and negatively regulates the TOR signaling pathway. *Mol. Cell* **2001**, *8*, 1017-1026.
- Jakob, S.; Ohmayer, U.; Neueder, A.; Hierlmeier, T.; Perez-Fernandez, J.; Hochmuth, E.; Deutzmann, R.; Griesenbeck, J.; Tschochner, H.; Milkereit, P. Interrelationships between yeast ribosomal protein assembly events and transient ribosome biogenesis factors interactions in early pre-ribosomes. *PLoS One* **2012**, *7*, e32552.
- Jiang, Y.; Broach, J. R. Tor proteins and protein phosphatase 2A reciprocally regulate Tap42 in controlling cell growth in yeast. *EMBO J.* **1999**, *18*, 2782-2792.
- Jope, R. S.; Johnson, G. V. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem. Sci.* **2004**, *29*, 95-102.
- Kachroo, A. H.; Laurent, J. M.; Yellman, C. M.; Meyer, A. G.; Wilke, C. O.; Marcotte, E. M. Systematic humanization of yeast genes reveals conserved functions and genetic modularity. *Science* **2015**, *348*, 921-925.

- Kakahara, Y.; Houry, W. A. The R2TP complex: discovery and functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* **2012**, *1823*, 101-107.
- Kallstrom, G.; Hedges, J.; Johnson, A. The putative GTPases Nog1p and Lsg1p are required for 60S ribosomal subunit biogenesis and are localized to the nucleus and cytoplasm, respectively. *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23*, 4344-4355.
- Karathia, H.; Vilaprinyo, E.; Sorribas, A.; Alves, R. *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: a comparative study. *PLoS one* **2011**, *6*, e16015.
- Kassavetis, G. A.; Braun, B. R.; Nguyen, L. H.; Geiduschek, E. P. *S. cerevisiae* TFIIIB is the transcription initiation factor proper of RNA polymerase III, while TFIIIA and TFIIIC are assembly factors. *Cell* **1990**, *60*, 235-245.
- Kassavetis, G. A.; Kumar, A.; Ramirez, E.; Geiduschek, E. P. Functional and structural organization of Brf, the TFIIIB-related component of the RNA polymerase III transcription initiation complex. *Mol. Cell. Biol.* **1998**, *18*, 5587-5599.
- Kassavetis, G. A.; Letts, G. A.; Geiduschek, E. P. The RNA polymerase III transcription initiation factor TFIIIB participates in two steps of promoter opening. *EMBO J.* **2001**, *20*, 2823-2834.
- Kassavetis, G. A.; Prakash, P.; Shim, E. The C53/C37 subcomplex of RNA polymerase III lies near the active site and participates in promoter opening. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 2695-2706.
- Kassavetis, G. A.; Riggs, D. L.; Negri, R.; Nguyen, L. H.; Geiduschek, E. P. Transcription factor III B generates extended DNA interactions in RNA polymerase III transcription complexes on tRNA genes. *Mol. Cell. Biol.* **1989**, *9*, 2551-2566.
- Keener, J.; Josaitis, C. A.; Dodd, J. A.; Nomura, M. Reconstitution of yeast RNA polymerase I transcription in vitro from purified components. TATA-binding protein is not required for basal transcription. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 33795-33802.
- Keogh, M.; Kim, J.; Downey, M.; Fillingham, J.; Chowdhury, D.; Harrison, J. C.; Onishi, M.; Datta, N.; Galicia, S.; Emili, A. A phosphatase complex that dephosphorylates  $\gamma$ H2AX regulates DNA damage checkpoint recovery. *Nature* **2006**, *439*, 497-501.
- Khanna, A.; Pradhan, A.; Curran, S. P. Emerging roles for Maf1 beyond the regulation of RNA polymerase III activity. *J. Mol. Biol.* **2015**, *427*, 2577-2585.
- Kilchert, C.; Wittmann, S.; Vasiljeva, L. The regulation and functions of the nuclear RNA exosome complex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2016**, *17*, 227-239.
- Kirchner, J.; Vissi, E.; Gross, S.; Szoor, B.; Rudenko, A.; Alphey, L.; White-Cooper, H. *Drosophila* Uri, a PP1 $\alpha$  binding protein, is essential for viability, maintenance of DNA integrity and normal transcriptional activity. *BMC molecular biology* **2008**, *9*, 1-17.

- Koc, A.; Wheeler, L. J.; Mathews, C. K.; Merrill, G. F. Hydroxyurea arrests DNA replication by a mechanism that preserves basal dNTP pools. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 223-230.
- Koske, R.; Stich, H. A sensitive yeast assay for carcinogenic nitroquinoline oxides. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **1973**, *19*, 265-268.
- Kosugi, S.; Hasebe, M.; Tomita, M.; Yanagawa, H. Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 10171-10176.
- Kruk, J. A.; Dutta, A.; Fu, J.; Gilmour, D. S.; Reese, J. C. The multifunctional Ccr4–Not complex directly promotes transcription elongation. *Genes Dev.* **2011**, *25*, 581-593.
- Kubota, H.; Hynes, G.; Carne, A.; Ashworth, A.; Willison, K. Identification of six Tcp-1-related genes encoding divergent subunits of the TCP-1-containing chaperonin. *Current Biology* **1994**, *4*, 89-99.
- Kuhn, C.; Geiger, S. R.; Baumli, S.; Gartmann, M.; Gerber, J.; Jennebach, S.; Mielke, T.; Tschochner, H.; Beckmann, R.; Cramer, P. Functional architecture of RNA polymerase I. *Cell* **2007**, *131*, 1260-1272.
- Kumar, Y.; Bhargava, P. A unique nucleosome arrangement, maintained actively by chromatin remodelers facilitates transcription of yeast tRNA genes. *BMC Genomics* **2013**, *14*, 1-13.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680-685.
- Laferte, A.; Favry, E.; Sentenac, A.; Riva, M.; Carles, C.; Chedin, S. The transcriptional activity of RNA polymerase I is a key determinant for the level of all ribosome components. *Genes Dev.* **2006**, *20*, 2030-2040.
- Landrieux, E.; Alic, N.; Ducrot, C.; Acker, J.; Riva, M.; Carles, C. A subcomplex of RNA polymerase III subunits involved in transcription termination and reinitiation. *EMBO J.* **2006**, *25*, 118-128.
- Lang, W. H.; Reeder, R. H. Transcription termination of RNA polymerase I due to a T-rich element interacting with Reb1p. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 9781-9785.
- Lassar, A. B.; Martin, P. L.; Roeder, R. G. Transcription of class III genes: formation of preinitiation complexes. *Science* **1983**, *222*, 740-748.
- Lee, J.; Moir, R. D.; McIntosh, K. B.; Willis, I. M. TOR signaling regulates ribosome and tRNA synthesis via LAMMER/Clk and GSK-3 family kinases. *Mol. Cell* **2012**, *45*, 836-843.
- Lee, J.; Moir, R. D.; Willis, I. M. Differential phosphorylation of RNA polymerase III and the initiation factor TFIIB in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS one* **2015**, *10*, e0127225.

- Lee, J.; Moir, R. D.; Willis, I. M. Regulation of RNA polymerase III transcription involves SCH9-dependent and SCH9-independent branches of the target of rapamycin (TOR) pathway. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 12604-12608.
- Lempiäinen, H.; Shore, D. Growth control and ribosome biogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2009**, *21*, 855-863.
- Leroux, M. R.; Fändrich, M.; Klunker, D.; Siegers, K.; Lupas, A. N.; Brown, J. R.; Schiebel, E.; Dobson, C. M.; Hartl, F. U. MtGimC, a novel archaeal chaperone related to the eukaryotic chaperonin cofactor GimC/prefoldin. *EMBO J.* **1999**, *18*, 6730-6743.
- Leroy, C.; Lee, S. E.; Vaze, M. B.; Ochsenbien, F.; Guerois, R.; Haber, J. E.; Marsolier-Kergoat, M. PP2C phosphatases Ptc2 and Ptc3 are required for DNA checkpoint inactivation after a double-strand break. *Mol. Cell* **2003**, *11*, 827-835.
- Leśniewska, E.; Boguta, M. Novel layers of RNA polymerase III control affecting tRNA gene transcription in eukaryotes. *Open biology* **2017**, *7*, 170001.
- Li, H.; Tsang, C. K.; Watkins, M.; Bertram, P. G.; Zheng, X. Nutrient regulates Tor1 nuclear localization and association with rDNA promoter. *Nature* **2006**, *442*, 1058-1061.
- Loewith, R.; Hall, M. N. Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. *Genetics* **2011**, *189*, 1177-1201.
- Loewith, R.; Jacinto, E.; Wullschleger, S.; Lorberg, A.; Crespo, J. L.; Bonenfant, D.; Oppliger, W.; Jenoe, P.; Hall, M. N. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol. Cell* **2002**, *10*, 457-468.
- Longtine, M. S.; Mckenzie III, A.; Demarini, D. J.; Shah, N. G.; Wach, A.; Brachat, A.; Philippsen, P.; Pringle, J. R. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **1998**, *14*, 953-961.
- Lorenzen, K.; Vannini, A.; Cramer, P.; Heck, A. J. Structural biology of RNA polymerase III: mass spectrometry elucidates subcomplex architecture. *Structure* **2007**, *15*, 1237-1245.
- Ma, H.; Han, B.; Guaderrama, M.; Aslanian, A.; Yates III, J. R.; Hunter, T.; Wittenberg, C. Psy2 targets the PP4 family phosphatase Pph3 to dephosphorylate Mth1 and repress glucose transporter gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **2014**, *34*, 452-463.
- Mahapatra, S.; Dewari, P. S.; Bhardwaj, A.; Bhargava, P. Yeast H2A. Z, FACT complex and RSC regulate transcription of tRNA gene through differential dynamics of flanking nucleosomes. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 4023-4034.
- Mandel, C. R.; Bai, Y.; Tong, L. Protein factors in pre-mRNA 3'-end processing. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2008**, *65*, 1099-1122.

- Marion, R. M.; Regev, A.; Segal, E.; Barash, Y.; Koller, D.; Friedman, N.; O'Shea, E. K. Sfp1 is a stress- and nutrient-sensitive regulator of ribosomal protein gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 14315-14322.
- Marsolier, M.; Tanaka, S.; Livingstone-Zatchej, M.; Grunstein, M.; Thoma, F.; Sentenac, A. Reciprocal interferences between nucleosomal organization and transcriptional activity of the yeast SNR6 gene. *Genes Dev.* **1995**, *9*, 410-422.
- Martin, D. E.; Hall, M. N. The expanding TOR signaling network. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2005**, *17*, 158-166.
- Martin, D. E.; Powers, T.; Hall, M. N. Regulation of ribosome biogenesis: where is TOR? *Cell metabolism* **2006**, *4*, 259-260.
- Martin, D. E.; Soulard, A.; Hall, M. N. TOR regulates ribosomal protein gene expression via PKA and the Forkhead transcription factor FHL1. *Cell* **2004a**, *119*, 969-979.
- Martin, D. E.; Soulard, A.; Hall, M. N. TOR regulates ribosomal protein gene expression via PKA and the Forkhead transcription factor FHL1. *Cell* **2004b**, *119*, 969-979.
- Martinez-Arias, A. E.; Casadaban, M. J. Fusion of the *Saccharomyces cerevisiae* leu2 gene to an Escherichia coli beta-galactosidase gene. *Mol. Cell. Biol.* **1983**, *3*, 580-586.
- Martínez-Fernández, V. Rpb5 y bud27, dos proteínas coordinadas en el proceso de transcripción. *Rpb5 y bud27, dos proteínas coordinadas en el proceso de transcripción* **2016**.
- Martínez-Fernández, V.; Cuevas-Bermúdez, A.; Gutiérrez-Santiago, F.; Garrido-Godino, A. I.; Rodríguez-Galán, O.; Jordán-Pla, A.; Lois, S.; Triviño, J. C.; de la Cruz, J.; Navarro, F. Prefoldin-like Bud27 influences the transcription of ribosomal components and ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* **2020**, *26*, 1360-1379.
- Martínez-Fernández, V.; Garrido-Godino, A. I.; Cuevas-Bermudez, A.; Navarro, F. The yeast prefoldin Bud27. *Prefoldins: the new chaperones* **2018a**, 109-118.
- Martínez-Fernández, V.; Garrido-Godino, A. I.; Cuevas-Bermúdez, A.; Navarro, F. Cytoplasmic and nuclear functions for the prefoldin-like URI/Bud27. *New Research On Molecular Chaperones* **2015**, 57-73.
- Martínez-Fernández, V.; Garrido-Godino, A. I.; Mirón-García, M. C.; Begley, V.; Fernández-Pévida, A.; de la Cruz, J.; Chávez, S.; Navarro, F. Rpb5 modulates the RNA polymerase II transition from initiation to elongation by influencing Spt5 association and backtracking. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* **2018b**, *1861*, 1-13.
- Martinez-Fernandez, V.; Navarro, F. Rpb5, a subunit shared by eukaryotic RNA polymerases, cooperates with prefoldin-like Bud27/URI. *AIMS Genet.* **2018**, *5*, 63-74.

- Mayer, A.; Heidemann, M.; Lidschreiber, M.; Schrieck, A.; Sun, M.; Hintermair, C.; Kremmer, E.; Eick, D.; Cramer, P. CTD tyrosine phosphorylation impairs termination factor recruitment to RNA polymerase II. *Science* **2012**, *336*, 1723-1725.
- Mayer, C.; Grummt, I. Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases. *Oncogene* **2006**, *25*, 6384-6391.
- Michels, A. A.; Hernandez, N. Does Pol I talk to Pol II? Coordination of RNA polymerases in ribosome biogenesis. *Genes Dev.* **2006**, *20*, 1982-1985.
- Milkereit, P.; Schultz, P.; Tschochner, H. Resolution of RNA Polymerase I into dimers and monomers and their function in transcription. *Biol. Chem.* **1997**, *378*, 1433-1444.
- Millán-Zambrano, G.; Chávez, S. Nuclear functions of prefoldin. *Open biology* **2014**, *4*, 140085.
- Millán-Zambrano, G.; Rodríguez-Gil, A.; Peñate, X.; de Miguel-Jiménez, L.; Morillo-Huesca, M.; Krogan, N.; Chávez, S. The prefoldin complex regulates chromatin dynamics during transcription elongation. *PLoS genetics* **2013**, *9*, e1003776.
- Mirón-García, M. C.; Garrido-Godino, A. I.; Garcia-Molinero, V.; Hernandez-Torres, F.; Rodriguez-Navarro, S.; Navarro, F. The prefoldin bud27 mediates the assembly of the eukaryotic RNA polymerases in an rpb5-dependent manner. *PLoS genetics* **2013**, *9*, e1003297.
- Mirón-García, M. C.; Garrido-Godino, A. I.; Martínez-Fernández, V.; Fernández-Pevida, A.; Cuevas-Bermúdez, A.; Martín-Expósito, M.; Chávez, S.; de la Cruz, J.; Navarro, F. The yeast prefoldin-like URI-orthologue Bud27 associates with the RSC nucleosome remodeler and modulates transcription. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 9666-9676.
- Mita, P.; Savas, J. N.; Djouder, N.; Yates III, J. R.; Ha, S.; Ruoff, R.; Schafler, E. D.; Nwachukwu, J. C.; Tanese, N.; Cowan, N. J. Regulation of androgen receptor-mediated transcription by RPB5 binding protein URI/RMP. *Mol. Cell. Biol.* **2011**, *31*, 3639-3652.
- Mita, P.; Savas, J. N.; Ha, S.; Djouder, N.; Yates III, J. R.; Logan, S. K. Analysis of URI nuclear interaction with RPB5 and components of the R2TP/prefoldin-like complex. *PLoS One* **2013**, *8*, e63879.
- Mita, P.; Savas, J. N.; Briggs, E. M.; Ha, S.; Gnanakkan, V.; Yates, J. R.,3rd; Robins, D. M.; David, G.; Boeke, J. D.; Garabedian, M. J.; Logan, S. K. URI Regulates KAP1 Phosphorylation and Transcriptional Repression via PP2A Phosphatase in Prostate Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 25516-25528.
- Miyoshi, K.; Shirai, C.; Mizuta, K. Transcription of genes encoding trans-acting factors required for rRNA maturation/ribosomal subunit assembly is coordinately regulated with ribosomal protein genes and involves Rap1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 1969-1973.

- Möckli, N.; Deplazes, A.; Hassa, P. O.; Zhang, Z.; Peter, M.; Hottiger, M. O.; Stagljar, I.; Auerbach, D. Yeast split-ubiquitin-based cytosolic screening system to detect interactions between transcriptionally active proteins. *BioTechniques* **2007**, *42*, 725-730.
- Moir, R. D.; Willis, I. M. Regulation of pol III transcription by nutrient and stress signaling pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* **2013**, *1829*, 361-375.
- Moir, R. D.; Lee, J.; Haeusler, R. A.; Desai, N.; Engelke, D. R.; Willis, I. M. Protein kinase A regulates RNA polymerase III transcription through the nuclear localization of Maf1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 15044-15049.
- Mosley, A. L.; Pattenden, S. G.; Carey, M.; Venkatesh, S.; Gilmore, J. M.; Florens, L.; Workman, J. L.; Washburn, M. P. Rtr1 is a CTD phosphatase that regulates RNA polymerase II during the transition from serine 5 to serine 2 phosphorylation. *Mol. Cell* **2009**, *34*, 168-178.
- Mou, Z.; Kenny, A. E.; Curcio, M. J. Hos2 and Set3 promote integration of Ty1 retrotransposons at tRNA genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **2006**, *172*, 2157-2167.
- Muñoz-Galván, S.; Jimeno, S.; Rothstein, R.; Aguilera, A. Histone H3K56 acetylation, Rad52, and non-DNA repair factors control double-strand break repair choice with the sister chromatid. *PLoS genetics* **2013**, *9*, e1003237.
- Murawski, M.; Szcześniak, B.; Zoładek, T.; Hopper, A. K.; Martin, N. C.; Boguta, M. maf1 mutation alters the subcellular localization of the Mod5 protein in yeast. *Acta Biochim. Pol.* **1994**, *41*, 441-448.
- Murayama, A.; Ohmori, K.; Fujimura, A.; Minami, H.; Yasuzawa-Tanaka, K.; Kuroda, T.; Oie, S.; Daitoku, H.; Okuwaki, M.; Nagata, K. Epigenetic control of rDNA loci in response to intracellular energy status. *Cell* **2008**, *133*, 627-639.
- Nagarajavel, V.; Iben, J. R.; Howard, B. H.; Maraia, R. J.; Clark, D. J. Global 'bootprinting' reveals the elastic architecture of the yeast TFIIIB–TFIIIC transcription complex in vivo. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 8135-8143.
- Nelson, J. O.; Watase, G. J.; Warsinger-Pepe, N.; Yamashita, Y. M. Mechanisms of rDNA copy number maintenance. *Trends in Genetics* **2019**, *35*, 734-742.
- Neves-Costa, A.; Will, W. R.; Vetter, A. T.; Miller, J. R.; Varga-Weisz, P. The SNF2-family member Fun30 promotes gene silencing in heterochromatic loci. *PLoS One* **2009**, *4*, e8111.
- Ng, H. H.; Robert, F.; Young, R. A.; Struhl, K. Genome-wide location and regulated recruitment of the RSC nucleosome-remodeling complex. *Genes Dev.* **2002a**, *16*, 806-819.

- Ng, H. H.; Robert, F.; Young, R. A.; Struhl, K. Genome-wide location and regulated recruitment of the RSC nucleosome-remodeling complex. *Genes Dev.* **2002b**, *16*, 806-819.
- Ni, L.; Snyder, M. A genomic study of the bipolar bud site selection pattern in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **2001**, *12*, 2147-2170.
- Nouraini, S.; Archambault, J.; Friesen, J. D. Rpo26p, a subunit common to yeast RNA polymerases, is essential for the assembly of RNA polymerases I and II and for the stability of the largest subunits of these enzymes. *Mol. Cell. Biol.* **1996**, *16*, 5985-5996.
- Oficjalska-Pham, D.; Harismendy, O.; Smagowicz, W. J.; de Peredo, A. G.; Boguta, M.; Sentenac, A.; Lefebvre, O. General repression of RNA polymerase III transcription is triggered by protein phosphatase type 2A-mediated dephosphorylation of Maf1. *Mol. Cell* **2006**, *22*, 623-632.
- Oler, A. J.; Cairns, B. R. PP4 dephosphorylates Maf1 to couple multiple stress conditions to RNA polymerase III repression. *EMBO J.* **2012**, *31*, 1440-1452.
- O'Neill, B. M.; Szyjka, S. J.; Lis, E. T.; Bailey, A. O.; Yates, J. R., 3rd; Aparicio, O. M.; Romesberg, F. E. Pph3-Psy2 is a phosphatase complex required for Rad53 dephosphorylation and replication fork restart during recovery from DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 9290-9295.
- Orioli, A.; Pascali, C.; Pagano, A.; Teichmann, M.; Dieci, G. RNA polymerase III transcription control elements: themes and variations. *Gene* **2012**, *493*, 185-194.
- Padmanabha, R.; Gehrung, S.; Snyder, M. The KNS1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a nonessential protein kinase homologue that is distantly related to members of the CDC28/cdc2 gene family. *Molecular and General Genetics MGG* **1991**, *229*, 1-9.
- Park, J.; Lee, D. H. Functional roles of protein phosphatase 4 in multiple aspects of cellular physiology: a friend and a foe. *BMB Rep.* **2020**, *53*, 181-190.
- Parnell, T. J.; Huff, J. T.; Cairns, B. R. RSC regulates nucleosome positioning at Pol II genes and density at Pol III genes. *EMBO J.* **2008a**, *27*, 100-110.
- Parnell, T. J.; Huff, J. T.; Cairns, B. R. RSC regulates nucleosome positioning at Pol II genes and density at Pol III genes. *EMBO J.* **2008b**, *27*, 100-110.
- Parusel, C. T.; Kritikou, E. A.; Hengartner, M. O.; Krek, W.; Gotta, M. URI-1 is required for DNA stability in *C. elegans*. **2006**.
- Pavesi, A.; Conterio, F.; Bolchi, A.; Dieci, G.; Ottonello, S. Identification of new eukaryotic tRNA genes in genomic DNA databases by a multistep weight matrix analysis of transcriptional control regions. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 1247-1256.

- Peyroche, G.; Levillain, E.; Siaux, M.; Callebaut, I.; Schultz, P.; Sentenac, A.; Riva, M.; Carles, C. The A14–A43 heterodimer subunit in yeast RNA pol I and their relationship to Rpb4–Rpb7 pol II subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, *99*, 14670-14675.
- Peyroche, G.; Milkereit, P.; Bischler, N.; Tschochner, H.; Schultz, P.; Sentenac, A.; Carles, C.; Riva, M. The recruitment of RNA polymerase I on rDNA is mediated by the interaction of the A43 subunit with Rrn3. *EMBO J.* **2000**, *19*, 5473-5482.
- Planta, R.; Raue, H. Control of ribosome biogenesis in yeast. *Trends in Genetics* **1988**, *4*, 64-68.
- Plaschka, C.; Newman, A. J.; Nagai, K. Structural basis of nuclear pre-mRNA splicing: lessons from yeast. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2019**, *11*, a032391.
- Pluta, K.; Lefebvre, O.; Martin, N. C.; Smagowicz, W. J.; Stanford, D. R.; Ellis, S. R.; Hopper, A. K.; Sentenac, A.; Boguta, M. Maf1p, a negative effector of RNA polymerase III in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **2001**, *21*, 5031-5040.
- Powers, T.; Walter, P. Regulation of ribosome biogenesis by the rapamycin-sensitive TOR-signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **1999**, *10*, 987-1000.
- Ptacek, J.; Devgan, G.; Michaud, G.; Zhu, H.; Zhu, X.; Fasolo, J.; Guo, H.; Jona, G.; Breitskreutz, A.; Sopko, R. Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature* **2005**, *438*, 679-684.
- Puig, O.; Caspary, F.; Rigaut, G.; Rutz, B.; Bouveret, E.; Bragado-Nilsson, E.; Wilm, M.; Séraphin, B. The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* **2001**, *24*, 218-229.
- Raué, H.; Planta, R. Ribosome biogenesis in yeast. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **1991**, *41*, 89-129.
- Raught, B.; Gingras, A. C.; Sonenberg, N. The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 7037-7044.
- Reeder, R. H.; Guevara, P.; Roan, J. G. *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase I terminates transcription at the Reb1 terminator in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **1999**, *19*, 7369-7376.
- Reina, J. H.; Azzouz, T. N.; Hernandez, N. Maf1, a new player in the regulation of human RNA polymerase III transcription. *PloS one* **2006**, *1*, e134.
- Reinke, A.; Anderson, S.; McCaffery, J. M.; Yates, J., 3rd; Aronova, S.; Chu, S.; Fairclough, S.; Iverson, C.; Wedaman, K. P.; Powers, T. TOR complex 1 includes a novel component, Tco89p (YPL180w), and cooperates with Ssd1p to maintain cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 14752-14762.

- Reiter, A.; Steinbauer, R.; Philippi, A.; Gerber, J.; Tschochner, H.; Milkereit, P.; Griesenbeck, J. Reduction in ribosomal protein synthesis is sufficient to explain major effects on ribosome production after short-term TOR inactivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **2011**, *31*, 803-817.
- Reuter, L. M.; Meinel, D. M.; Strasser, K. The poly(A)-binding protein Nab2 functions in RNA polymerase III transcription. *Genes Dev.* **2015**, *29*, 1565-1575.
- Roberts, D. N.; Wilson, B.; Huff, J. T.; Stewart, A. J.; Cairns, B. R. Dephosphorylation and genome-wide association of Maf1 with Pol III-transcribed genes during repression. *Mol. Cell* **2006a**, *22*, 633-644.
- Roberts, S. G.; Weinzierl, R. O.; White, R. J.; Russell, J.; Zomerdijk, J. C. In *In The RNA polymerase I transcription machinery*; Biochemical Society Symposia; Portland Press: 2006b; Vol. 73, pp 203-216.
- Roberts, D. N.; Stewart, A. J.; Huff, J. T.; Cairns, B. R. The RNA polymerase III transcriptome revealed by genome-wide localization and activity-occupancy relationships. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 14695-14700.
- Rosonina, E.; Willis, I. M.; Manley, J. L. Sub1 functions in osmoregulation and in transcription by both RNA polymerases II and III. *Mol. Cell. Biol.* **2009**, *29*, 2308-2321.
- Rowland, O.; Segall, J. A hydrophobic segment within the 81-amino-acid domain of TFIIIA from *Saccharomyces cerevisiae* is essential for its transcription factor activity. *Mol. Cell. Biol.* **1998**, *18*, 420-432.
- Rubbi, L.; Labarre-Mariotte, S.; Chedin, S.; Thuriaux, P. Functional characterization of ABC10alpha, an essential polypeptide shared by all three forms of eukaryotic DNA-dependent RNA polymerases. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 31485-31492.
- Rudra, D.; Mallick, J.; Zhao, Y.; Warner, J. R. Potential interface between ribosomal protein production and pre-rRNA processing. *Mol. Cell. Biol.* **2007**, *27*, 4815-4824.
- Rudra, D.; Zhao, Y.; Warner, J. R. Central role of Lfh1p–Fhl1p interaction in the synthesis of yeast ribosomal proteins. *EMBO J.* **2005**, *24*, 533-542.
- Ruet, A.; Camier, S.; Smagowicz, W.; Sentenac, A.; Fromageot, P. Isolation of a class C transcription factor which forms a stable complex with tRNA genes. *EMBO J.* **1984**, *3*, 343-350.
- Rufiange, A.; Jacques, P.; Bhat, W.; Robert, F.; Nourani, A. Genome-wide replication-independent histone H3 exchange occurs predominantly at promoters and implicates H3 K56 acetylation and Asf1. *Mol. Cell* **2007**, *27*, 393-405.
- Rüth, J.; Conesa, C.; Dieci, G.; Lefebvre, O.; Düsterhöft, A.; Ottonello, S.; Sentenac, A. A suppressor of mutations in the class III transcription system encodes a component of yeast TFIIIB. *EMBO J.* **1996**, *15*, 1941-1949.

- Saha, A.; Wittmeyer, J.; Cairns, B. R. Chromatin remodeling through directional DNA translocation from an internal nucleosomal site. *Nature structural & molecular biology* **2005**, *12*, 747-755.
- Satyanarayana, T.; Kunze, G. *Yeast biotechnology: diversity and applications*; Springer: 2009; Vol. 78.
- Schawalder, S. B.; Kabani, M.; Howald, I.; Choudhury, U.; Werner, M.; Shore, D. Growth-regulated recruitment of the essential yeast ribosomal protein gene activator Ifh1. *Nature* **2004**, *432*, 1058-1061.
- Schmelzle, T.; Hall, M. N. TOR, a central controller of cell growth. *Cell* **2000a**, *103*, 253-262.
- Schmelzle, T.; Hall, M. N. TOR, a central controller of cell growth. *Cell* **2000b**, *103*, 253-262.
- Schneider, D. A.; Michel, A.; Sikes, M. L.; Vu, L.; Dodd, J. A.; Salgia, S.; Osheim, Y. N.; Beyer, A. L.; Nomura, M. Transcription elongation by RNA polymerase I is linked to efficient rRNA processing and ribosome assembly. *Mol. Cell* **2007**, *26*, 217-229.
- Schneider, D. A.; Nomura, M. RNA polymerase I remains intact without subunit exchange through multiple rounds of transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2004**, *101*, 15112-15117.
- Schneider, D. A.; French, S. L.; Osheim, Y. N.; Bailey, A. O.; Vu, L.; Dodd, J.; Yates, J. R.; Beyer, A. L.; Nomura, M. RNA polymerase II elongation factors Spt4p and Spt5p play roles in transcription elongation by RNA polymerase I and rRNA processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 12707-12712.
- Schramm, L.; Hernandez, N. Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes Dev.* **2002**, *16*, 2593-2620.
- Schultz, P.; Marzouki, N.; Marck, C.; Ruet, A.; Oudet, P.; Sentenac, A. The two DNA-binding domains of yeast transcription factor tau as observed by scanning transmission electron microscopy. *EMBO J.* **1989**, *8*, 3815-3824.
- Schwabish, M. A.; Struhl, K. Asf1 mediates histone eviction and deposition during elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell* **2006**, *22*, 415-422.
- Schwer, B.; Mao, X.; Shuman, S. Accelerated mRNA decay in conditional mutants of yeast mRNA capping enzyme. *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 2050-2057.
- Scull, C. E.; Schneider, D. A. Coordinated control of rRNA processing by RNA polymerase I. *Trends in Genetics* **2019**, *35*, 724-733.
- Selth, L. A.; Lorch, Y.; Ocampo-Hafalla, M. T.; Mitter, R.; Shales, M.; Krogan, N. J.; Kornberg, R. D.; Svejstrup, J. Q. An rtt109-independent role for vps75 in transcription-associated nucleosome dynamics. *Mol. Cell. Biol.* **2009**, *29*, 4220-4234.

- Shandilya, J.; Roberts, S. G. The transcription cycle in eukaryotes: from productive initiation to RNA polymerase II recycling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* **2012**, *1819*, 391-400.
- Shaw, R. J.; Wilson, J. L.; Smith, K. T.; Reines, D. Regulation of an IMP dehydrogenase gene and its overexpression in drug-sensitive transcription elongation mutants of yeast. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 32905-32916.
- Shivaswamy, S.; Kassavetis, G. A.; Bhargava, P. High-level activation of transcription of the yeast U6 snRNA gene in chromatin by the basal RNA polymerase III transcription factor TFIIC. *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 3596-3606.
- Shukla, A.; Bhargava, P. Regulation of tRNA gene transcription by the chromatin structure and nucleosome dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* **2018**, *1861*, 295-309.
- Shukla, A.; Bhalla, P.; Potdar, P. K.; Jampala, P.; Bhargava, P. Transcription-dependent enrichment of the yeast FACT complex influences nucleosome dynamics on the RNA polymerase III-transcribed genes. *RNA* **2020**.
- Siaut, M.; Zaros, C.; Levivier, E.; Ferri, M.; Court, M.; Werner, M.; Callebaut, I.; Thuriaux, P.; Sentenac, A.; Conesa, C. An Rpb4/Rpb7-like complex in yeast RNA polymerase III contains the orthologue of mammalian CGRP-RCP. *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23*, 195-205.
- Siegel, M. R.; Sisler, H. D. Site of action of cycloheximide in cells of *Saccharomyces pastorianus*: II. The nature of inhibition of protein synthesis in a cell-free system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Specialized Section on Nucleic Acids and Related Subjects* **1964**, *87*, 83-89.
- Sims, R. J.; Belotserkovskaya, R.; Reinberg, D. Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it. *Genes Dev.* **2004**, *18*, 2437-2468.
- Sleigh, M. The mechanism of DNA breakage by phleomycin in vitro. *Nucleic Acids Res.* **1976**, *3*, 891-902.
- Smolle, M.; Workman, J. L. Transcription-associated histone modifications and cryptic transcription. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* **2013**, *1829*, 84-97.
- Sonenberg, N.; Hinnebusch, A. G. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* **2009**, *136*, 731-745.
- Soragni, E.; Kassavetis, G. A. Absolute gene occupancies by RNA polymerase III, TFIIB, and TFIIC in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 26568-26576.
- Soutourina, J.; Bordas-Le Floch, V.; Gendrel, G.; Flores, A.; Ducrot, C.; Dumay-Odelot, H.; Soularue, P.; Navarro, F.; Cairns, B. R.; Lefebvre, O. Rsc4 connects the chromatin remodeler RSC to RNA polymerases. *Mol. Cell. Biol.* **2006**, *26*, 4920-4933.

- Staresincic, L.; Walker, J.; Dirac-Svejstrup, A. B.; Mitter, R.; Svejstrup, J. Q. GTP-dependent binding and nuclear transport of RNA polymerase II by Npa3 protein. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 35553-35561.
- Steinmetz, E. J.; Brow, D. A. Repression of gene expression by an exogenous sequence element acting in concert with a heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-like protein, Nrd1, and the putative helicase Sen1. *Mol. Cell. Biol.* **1996**, *16*, 6993-7003.
- Tavenet, A.; Suleau, A.; Dubreuil, G.; Ferrari, R.; Ducrot, C.; Michaut, M.; Aude, J. C.; Dieci, G.; Lefebvre, O.; Conesa, C.; Acker, J. Genome-wide location analysis reveals a role for Sub1 in RNA polymerase III transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 14265-14270.
- Theurillat, J.; Metzler, S. C.; Henzi, N.; Djouder, N.; Helbling, M.; Zimmermann, A.; Jacob, F.; Soltermann, A.; Caduff, R.; Heinzelmann-Schwarz, V. URI is an oncogene amplified in ovarian cancer cells and is required for their survival. *Cancer cell* **2011**, *19*, 317-332.
- Tirosh, I.; Sigal, N.; Barkai, N. Widespread remodeling of mid-coding sequence nucleosomes by Isw1. *Genome Biol.* **2010**, *11*, 1-13.
- Torreira, E.; Louro, J. A.; Pazos, I.; Gonzalez-Polo, N.; Gil-Carton, D.; Duran, A. G.; Tosi, S.; Gallego, O.; Calvo, O.; Fernández-Tornero, C. The dynamic assembly of distinct RNA polymerase I complexes modulates rDNA transcription. *Elife* **2017**, *6*, e20832.
- Towpik, J.; Graczyk, D.; Gajda, A.; Lefebvre, O.; Boguta, M. Derepression of RNA polymerase III transcription by phosphorylation and nuclear export of its negative regulator, Maf1. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 17168-17174.
- Tronnorsjö, S.; Hanefalk, C.; Balciunas, D.; Hu, G.; Nordberg, N.; Murén, E.; Ronne, H. The jmjN and jmjC domains of the yeast zinc finger protein Gis1 interact with 19 proteins involved in transcription, sumoylation and DNA repair. *Molecular Genetics and Genomics* **2007**, *277*, 57-70.
- Tsang, C. K.; Bertram, P. G.; Ai, W.; Drenan, R.; Zheng, X. S. Chromatin-mediated regulation of nucleolar structure and RNA Pol I localization by TOR. *EMBO J.* **2003**, *22*, 6045-6056.
- Tummala, K. S.; Gomes, A. L.; Yilmaz, M.; Graña, O.; Bakiri, L.; Ruppen, I.; Ximénez-Embún, P.; Sheshappanavar, V.; Rodriguez-Justo, M.; Pisano, D. G. Inhibition of de novo NAD synthesis by oncogenic URI causes liver tumorigenesis through DNA damage. *Cancer cell* **2014**, *26*, 826-839.
- Turowski, T. W.; Boguta, M. Specific Features of RNA Polymerases I and III: Structure and Assembly. *Frontiers in Molecular Biosciences* **2021**, *8*, 349.
- Turowski, T. W.; Tollervey, D. Transcription by RNA polymerase III: insights into mechanism and regulation. *Biochem. Soc. Trans.* **2016**, *44*, 1367-1375.

- Turowski, T. W.; Lesniewska, E.; Delan-Forino, C.; Sayou, C.; Boguta, M.; Tollervey, D. Global analysis of transcriptionally engaged yeast RNA polymerase III reveals extended tRNA transcripts. *Genome Res.* **2016**, *26*, 933-944.
- Upadhyaya, R.; Lee, J.; Willis, I. M. Maf1 is an essential mediator of diverse signals that repress RNA polymerase III transcription. *Mol. Cell* **2002**, *10*, 1489-1494.
- Urban, J.; Soulard, A.; Huber, A.; Lippman, S.; Mukhopadhyay, D.; Deloche, O.; Wanke, V.; Anrather, D.; Ammerer, G.; Riezman, H. Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell* **2007**, *26*, 663-674.
- Vainberg, I. E.; Lewis, S. A.; Rommelaere, H.; Ampe, C.; Vandekerckhove, J.; Klein, H. L.; Cowan, N. J. Prefoldin, a chaperone that delivers unfolded proteins to cytosolic chaperonin. *Cell* **1998**, *93*, 863-873.
- Van Hoof, C.; Martens, E.; Longin, S.; Jordens, J.; Stevens, I.; Janssens, V.; Goris, J. Specific interactions of PP2A and PP2A-like phosphatases with the yeast PTPA homologues, Ypa1 and Ypa2. *Biochem. J.* **2005**, *386*, 93-102.
- Vannini, A.; Ringel, R.; Kusser, A. G.; Berninghausen, O.; Kassavetis, G. A.; Cramer, P. Molecular basis of RNA polymerase III transcription repression by Maf1. *Cell* **2010**, *143*, 59-70.
- Venters, B. J.; Wachi, S.; Mavrich, T. N.; Andersen, B. E.; Jena, P.; Sinnamon, A. J.; Jain, P.; Rolleri, N. S.; Jiang, C.; Hemeryck-Walsh, C. A comprehensive genomic binding map of gene and chromatin regulatory proteins in *Saccharomyces*. *Mol. Cell* **2011**, *41*, 480-492.
- Vernekar, D. V.; Bhargava, P. Yeast Bud27 modulates the biogenesis of Rpc128 and Rpc160 subunits and the assembly of RNA polymerase III. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* **2015**, *1849*, 1340-1353.
- Vezina, C.; Kudelski, A.; Sehgal, S. Rapamycin (AY-22, 989), a new antifungal antibiotic I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J. Antibiot.* **1975**, *28*, 721-726.
- Viktorovskaya, O. V.; Appling, F. D.; Schneider, D. A. Yeast transcription elongation factor Spt5 associates with RNA polymerase I and RNA polymerase II directly. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 18825-18833.
- Villoria, M. T.; Gutiérrez-Escribano, P.; Alonso-Rodríguez, E.; Ramos, F.; Merino, E.; Campos, A.; Montoya, A.; Kramer, H.; Aragón, L.; Clemente-Blanco, A. PP4 phosphatase cooperates in recombinational DNA repair by enhancing double-strand break end resection. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, 10706-10727.
- Wade, J. T.; Hall, D. B.; Struhl, K. The transcription factor Lfh1 is a key regulator of yeast ribosomal protein genes. *Nature* **2004**, *432*, 1054-1058.

- Wang, Z.; Roeder, R. G. DNA topoisomerase I and PC4 can interact with human TFIIIC to promote both accurate termination and transcription reinitiation by RNA polymerase III. *Mol. Cell* **1998**, *1*, 749-757.
- Warner, J. R. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem. Sci.* **1999**, *24*, 437-440.
- Warner, J. R. Synthesis of ribosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **1989**, *53*, 256-271.
- Wei, W.; Gu, J. X.; Zhu, C. Q.; Sun, F. Y.; Dorjsuren, D.; Lin, Y.; Murakami, S. Interaction with general transcription factor IIF (TFIIF) is required for the suppression of activated transcription by RPB5-mediated protein (RMP). *Cell Res.* **2003**, *13*, 111-120.
- Wei, Y.; Tsang, C. K.; Zheng, X. S. Mechanisms of regulation of RNA polymerase III-dependent transcription by TORC1. *EMBO J.* **2009**, *28*, 2220-2230.
- Werner, F. Structural evolution of multisubunit RNA polymerases. *Trends Microbiol.* **2008**, *16*, 247-250.
- Werner, F.; Grohmann, D. Evolution of multisubunit RNA polymerases in the three domains of life. *Nature Reviews Microbiology* **2011**, *9*, 85-98.
- Whitehouse, I.; Tsukiyama, T. Antagonistic forces that position nucleosomes in vivo. *Nature structural & molecular biology* **2006**, *13*, 633-640.
- Wild, T.; Cramer, P. Biogenesis of multisubunit RNA polymerases. *Trends Biochem. Sci.* **2012**, *37*, 99-105.
- Willis, I. M.; Desai, N.; Upadhyay, R. Signaling repression of transcription by RNA polymerase III in yeast. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **2004**, *77*, 323-353.
- Woychik, N. A.; Young, R. A. Genes encoding transcription factor IIIA and the RNA polymerase common subunit RPB6 are divergently transcribed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1992**, *89*, 3999-4003.
- Woychik, N. A.; Young, R. A. RNA polymerase II: subunit structure and function. *Trends Biochem. Sci.* **1990**, *15*, 347-351.
- Woychik, N. A.; Liao, S. M.; Kolodziej, P. A.; Young, R. A. Subunits shared by eukaryotic nuclear RNA polymerases. *Genes Dev.* **1990**, *4*, 313-323.
- Wu, C. C.; Herzog, F.; Jennebach, S.; Lin, Y. C.; Pai, C. Y.; Aebersold, R.; Cramer, P.; Chen, H. T. RNA polymerase III subunit architecture and implications for open promoter complex formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 19232-19237.
- Wullschleger, S.; Loewith, R.; Hall, M. N. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **2006**, *124*, 471-484.

- Wullschleger, S.; Loewith, R.; Oppliger, W.; Hall, M. N. Molecular organization of target of rapamycin complex 2. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 30697-30704.
- Xiao, L.; Grove, A. Coordination of ribosomal protein and ribosomal RNA gene expression in response to TOR signaling. *Curr. Genomics* **2009**, *10*, 198-205.
- Xie, D.; Zhao, X.; Ma, L.; Wang, L.; Li, P.; Cheng, H.; Li, Z.; Zeng, P.; Zhang, J.; Zeng, F. Rba50 and Gpn2 recruit the second largest subunits for the assembly of RNA polymerase II and III. *Int. J. Biol. Macromol.* **2022**, *204*, 565-575.
- Yadon, A. N.; Van de Mark, D.; Basom, R.; Delrow, J.; Whitehouse, I.; Tsukiyama, T. Chromatin remodeling around nucleosome-free regions leads to repression of noncoding RNA transcription. *Mol. Cell. Biol.* **2010**, *30*, 5110-5122.
- Yang, X.; Seto, E. The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nature reviews Molecular cell biology* **2008**, *9*, 206-218.
- Zaragoza, D.; Ghavidel, A.; Heitman, J.; Schultz, M. C. Rapamycin induces the G0 program of transcriptional repression in yeast by interfering with the TOR signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* **1998**, *18*, 4463-4470.
- Zaros, C.; Briand, J.; Boulard, Y.; Labarre-Mariotte, S.; Garcia-Lopez, M. C.; Thuriaux, P.; Navarro, F. Functional organization of the Rpb5 subunit shared by the three yeast RNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 634-647.
- Zaros, C.; Thuriaux, P. Rpc25, a conserved RNA polymerase III subunit, is critical for transcription initiation. *Mol. Microbiol.* **2005**, *55*, 104-114.
- Zentner, G. E.; Tsukiyama, T.; Henikoff, S. ISWI and CHD chromatin remodelers bind promoters but act in gene bodies. *PLoS genetics* **2013**, *9*, e1003317.
- Zhang, Y.; Anderson, S. J.; French, S. L.; Sikes, M. L.; Viktorovskaya, O. V.; Huband, J.; Holcomb, K.; Hartman IV, J. L.; Beyer, A. L.; Schneider, D. A. The SWI/SNF chromatin remodeling complex influences transcription by RNA polymerase I in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS one* **2013**, *8*, e56793.

## **Anexos**





## **ANEXO I. Currículum vitae**

### **Datos personales:**

**Apellidos y nombre:** Gutiérrez Santiago, Francisco

**DNI:** 77365181-N

**Dirección:** Calle Emilia Pardo Nº2, Martos, Jaén

**Fecha de nacimiento:** 04/08/1994

**Correo electrónico:** [fgutierr@ujaen.es](mailto:fgutierr@ujaen.es)

### **Formación académica:**

- Doctorado en Biología molecular y celular.  
Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Jaén  
Actualidad
- Máster en Biotecnología y Biomedicina  
Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Jaén  
Junio de 2017
- Grado en Biología  
Especialidad Molecular y clínica  
Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Jaén  
Julio de 2016
- First Certificate in English (Cambridge). Council of Europe Level B2.  
Julio de 2017

### **Otras actividades de carácter científico o profesional:**

**Posición:** Becario de Acción 4. Ayudas predoctorales para la formación del personal investigador de la Universidad de Jaén. Plan 2017-2019

**Institución:** Área de Genética. Departamento de Biología Experimental. Universidad de Jaén

**Fecha:** Noviembre de 2017 hasta Marzo de 2022

**Posición:** Becario EMBO-Scientific Exchange Grant, para estancias predoctorales en centros extranjeros

**Institución:** Universidad de Regensburg

**Fecha:** Septiembre de 2020 hasta Diciembre de 2020

**Posición:** Becario Ícaro. Colaborador de investigación

**Institución:** Área de Inmunología. Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad de Jaén

**Fecha:** Diciembre de 2016 hasta Junio de 2017

**Posición:** Becario de Colaboración del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte

**Institución:** Área de Inmunología. Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad de Jaén

**Fecha:** Septiembre de 2015 hasta Julio de 2016

### **Participación en proyectos de investigación financiados**

**Proyecto:** Homeostasia y recambio molecular en el dogma central: aproximaciones proteómicas, respuesta al estrés y contribución del complejo *prefoldin-like* Bud27/URI.

**Organismo financiador:** Ministerio de Economía y Competitividad

**Código:** BFU2016-77728-C3-2-P

**Fecha:** Enero de 2017 hasta Diciembre de 2020

### **Publicaciones**

**Título:** Prefoldin-like Bud27 influences the transcription of ribosomal components and ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*

**Autores:** Verónica Martínez-Fernández\*, Abel Cuevas-Bermúdez\*, Francisco Gutiérrez-Santiago\*, Ana I. Garrido-Godino, Olga Rodríguez-Galán, Antonio Jordán-Pla, Sergio Lois, Juan C. Triviño, Jesús de la Cruz, and Francisco Navarro

**Año de publicación:** 2020

**Revista/Libro:** RNA

**Título:** A Yeast Chromatin-enriched Fractions Purification Approach, yChEFs, from *Saccharomyces cerevisiae*

**Autores:** Abel Cuevas-Bermúdez, Ana I. Garrido-Godino, Francisco Gutiérrez-Santiago, and Francisco Navarro

**Año de publicación:** 2020

**Revista/Libro:** Bio-protocol

**Título:** Rpb4 and Puf3 imprint and post-transcriptionally control the stability of a common set of mRNAs in yeast

**Autores:** A.I. Garrido-Godino, I. Gupta, F. Gutiérrez-Santiago, A.B. Martínez-Padilla, A. Alekseenko, L.M. Steinmetz, J.E. Pérez-Ortín, V. Pelechano & F. Navarro

**Año de publicación:** 2021

**Revista/Libro:** RNA Biology

**Título:** Biogenesis of RNA Polymerases in Yeast

**Autores:** Garrido-Godino, A.I., Gutiérrez-Santiago, F., Navarro, F.

**Año de publicación:** 2021

**Revista/Libro:** Frontiers in Molecular Biosciences

**Título:** The Association of Rpb4 with RNA Polymerase II Depends on CTD Ser5P Phosphatase Rtr1 and Influences mRNA Decay in *Saccharomyces cerevisiae*

**Autores:** Garrido-Godino, A.I., Cuevas-Bermúdez, A., Gutiérrez-Santiago, F., Mota-Trujillo, M.C., Navarro, F.

**Año de publicación:** 2022

**Revista/Libro:** International Journal of Molecular Sciences

**Título:** Synergistic Effect of Squalene and Hydroxytyrosol on Highly Invasive MDA-MB-231 Breast Cancer Cells

**Autores:** Sánchez-Quesada, C., Gutiérrez-Santiago, F., Rodríguez-García, C., Gaforio, J.J

**Año de publicación:** 2022

**Revista/Libro:** Nutrients

**Título:** Rpb4/7, a key element of RNA pol II to coordinate mRNA synthesis in the nucleus with cytoplasmic functions in *Saccharomyces cerevisiae*

**Autores:** Ana I Garrido-godino, Manuel Martín-Expósito, Francisco Gutiérrez-Santiago, Jorge Perez-Fernandez, Francisco Navarro

**Año de publicación:** Enviado/Submitted

**Revista/Libro:** BBA - Gene Regulatory Mechanisms

### Comunicaciones a congresos

**Título:** Rpb5 modulates the RNA polymerase II transition from initiation to elongation by influencing Spt5 association and backtracking

**Autores:** Francisco Gutiérrez-Santiago, Verónica Martínez-Fernández, Ana Isabel Garrido-Godino, Victoria Begley, Antonio Fernández-Pévida, Abel Cuevas-Bermúdez, Jesús de la Cruz, Sebastián Chávez, and Francisco Navarro

**Congreso:** Gene transcription in yeast: From global analyses to single cells

**Lugar:** Sant Feliu de Guixols, España

**Fecha:** Junio de 2018

**Título:** Bud27 and its role in RNA pol III transcription

**Autores:** Francisco Gutiérrez-Santiago, Ana Isabel Garrido-Godino, Manuel Martín-Expósito, Jorge Pérez-Fernández and Francisco Navarro

**Congreso:** OddPols 2021: International Conference on Transcription Mechanism and Regulation.

**Lugar:** Universidad de Colorado, Denver (virtual)

**Fecha:** Junio de 2021

## ANEXO II. Publicaciones

## Prefoldin-like Bud27 influences the transcription of ribosomal components and ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*

VERÓNICA MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ,<sup>1,7,8</sup> ABEL CUEVAS-BERMÚDEZ,<sup>1,8</sup> FRANCISCO GUTIÉRREZ-SANTIAGO,<sup>1,8</sup> ANA I. GARRIDO-GODINO,<sup>1</sup> OLGA RODRÍGUEZ-GALÁN,<sup>2,3</sup> ANTONIO JORDÁN-PLA,<sup>4</sup> SERGIO LOIS,<sup>5</sup> JUAN C. TRIVIÑO,<sup>5</sup> JESÚS DE LA CRUZ,<sup>2,3</sup> and FRANCISCO NAVARRO<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología Experimental-Genética, Universidad de Jaén, Paraje de las Lagunillas, s/n, E-23071, Jaén, Spain

<sup>2</sup>Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, E-41013 Seville, Spain

<sup>3</sup>Departamento de Genética, Universidad de Sevilla, E-41012 Seville, Spain

<sup>4</sup>ERI Biotechmed, Facultad de Biológicas, Universitat de València, E-46100 Burjassot, Valencia, Spain

<sup>5</sup>Sistemas Genómicos. Ronda de Guglielmo Marconi, 6, 46980 Paterna, Valencia, Spain

<sup>6</sup>Centro de Estudios Avanzados en Aceite de Oliva y Olivar, Universidad de Jaén, Paraje de las Lagunillas, s/n, E-23071, Jaén, Spain

### ABSTRACT

Understanding the functional connection that occurs for the three nuclear RNA polymerases to synthesize ribosome components during the ribosome biogenesis process has been the focal point of extensive research. To preserve correct homeostasis on the production of ribosomal components, cells might require the existence of proteins that target a common subunit of these RNA polymerases to impact their respective activities. This work describes how the yeast prefoldin-like Bud27 protein, which physically interacts with the Rpb5 common subunit of the three RNA polymerases, is able to modulate the transcription mediated by the RNA polymerase I, likely by influencing transcription elongation, the transcription of the RNA polymerase III, and the processing of ribosomal RNA. Bud27 also regulates both RNA polymerase II-dependent transcription of ribosomal proteins and ribosome biogenesis regulon genes, likely by occupying their DNA ORFs, and the processing of the corresponding mRNAs. With RNA polymerase II, this association occurs in a transcription rate-dependent manner. Our data also indicate that Bud27 inactivation alters the phosphorylation kinetics of ribosomal protein S6, a read-out of TORC1 activity. We conclude that Bud27 impacts the homeostasis of the ribosome biogenesis process by regulating the activity of the three RNA polymerases and, in this way, the synthesis of ribosomal components. This quite likely occurs through a functional connection of Bud27 with the TOR signaling pathway.

**Keywords:** prefoldin-like; transcription; RNA polymerases; ribosome biogenesis; *Saccharomyces cerevisiae*

### INTRODUCTION

In many eukaryotes, there are three nuclear RNA polymerases (RNA Pol I, II, III) responsible for synthesizing cellular RNAs. In plants, two other RNA pols, RNA Pol IV and V, have been described (Kwapisz et al. 2008; Haag and Pikaard 2011; Haag et al. 2014; Cuevas-Bermúdez et al. 2017). In yeast, 80% of transcriptional activity, and 50% in proliferating mammalian cells, is dedicated to the syn-

thesis of ribosomal components (Xiao and Grove 2009); in yeast, this corresponds to the synthesis of the precursor of rRNA 35S by RNA Pol I, which generates the mature 18S, 25S, and 5.8S ribosomal RNAs (rRNAs), the synthesis of 5S rRNA by RNA Pol III, the expression of the mRNAs corresponding to all ribosomal proteins (RPs), and the synthesis of more than 250 proteins and 80 small nucleolar RNAs (snoRNAs) trans-acting factors mediated by RNA Pol II (Loewith and Hall 2011; Jakob et al. 2012; de la Cruz et al. 2018). This complex transcriptional activity,

<sup>7</sup>Present address: Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Univ. Paris Sud, University Paris Saclay, F-91198 Gif-sur-Yvette cedex, France

<sup>8</sup>These authors contributed equally to this work.

Corresponding author: fngomez@ujaen.es

Article is online at <http://www.majournal.org/cgi/doi/10.1261/ma.075507.120>.

© 2020 Martínez-Fernández et al. This article is distributed exclusively by the RNA Society for the first 12 months after the full-issue publication date (see <http://majournal.cshlp.org/site/misc/terms.xhtml>). After 12 months, it is available under a Creative Commons License (Attribution-NonCommercial 4.0 International), as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.



# Biogenesis of RNA Polymerases in Yeast

Ana I. Garrido-Godino<sup>1</sup>, Francisco Gutiérrez-Santiago<sup>1</sup> and Francisco Navarro<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biología Experimental-Genética, Universidad de Jaén, Jaén, Spain, <sup>2</sup> Centro de Estudios Avanzados en Aceite de Oliva y Olivar, Universidad de Jaén, Jaén, Spain

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Teng Ma,  
Capital Medical University, China

### Reviewed by:

Magdalena Boguta,  
Institute of Biochemistry  
and Biophysics (PAN), Poland  
Mehdi Kabani,  
Centre National de la Recherche  
Scientifique (CNRS), France

### \*Correspondence:

Francisco Navarro  
fngomez@ujaen.es

### Specialty section:

This article was submitted to  
Protein and RNA Networks,  
a section of the journal  
Frontiers in Molecular Biosciences

Received: 18 February 2021

Accepted: 31 March 2021

Published: 28 April 2021

### Citation:

Garrido-Godino AI,  
Gutiérrez-Santiago F and Navarro F  
(2021) Biogenesis of RNA  
Polymerases in Yeast.  
*Front. Mol. Biosci.* 8:689300.  
doi: 10.3389/fmmb.2021.689300

Eukaryotic RNA polymerases (RNA pols) transcriptional processes have been extensively investigated, and the structural analysis of eukaryotic RNA pols has been explored. However, the global assembly and biogenesis of these heteromultimeric complexes have been narrowly studied. Despite nuclear transcription being carried out by three RNA polymerases in eukaryotes (five in plants) with specificity in the synthesis of different RNA types, the biogenesis process has been proposed to be similar, at least for RNA pol II, to that of bacteria, which contains only one RNA pol. The formation of three different interacting subassembly complexes to conform the complete enzyme in the cytoplasm, prior to its nuclear import, has been assumed. In *Saccharomyces cerevisiae*, recent studies have examined in depth the biogenesis of RNA polymerases by characterizing some elements involved in the assembly of these multisubunit complexes, some of which are conserved in humans. This study reviews the latest studies governing the mechanisms and proteins described as being involved in the biogenesis of RNA polymerases in yeast.

**Keywords:** RNA polymerases, biogenesis, assembly, transcription, yeast







## INTRODUCTION

Transcription is the most studied step of the gene expression catalyzed by RNA polymerases (RNA pols). Eukaryotes contain at least three RNA pols (RNA pols I, II, III), while archaea and bacteria consist of a single enzyme (Werner and Grohmann, 2011). In addition, two additional RNA pols have been described to be present in plants (RNA pols IV and V) (Wierzbicki et al., 2008; Haag and Pikaard, 2011; Haag et al., 2014). Although single-subunit RNA pols exist (as in bacteriophage T7) (Kwapisz et al., 2008), the bacterial, archaeal, and eukaryotic RNA pols are heteromultimeric complexes (Werner and Grohmann, 2011; Cramer, 2019). In eukaryotes, RNA pol I comprises 14 subunits and synthesizes a precursor of the three largest rRNAs (Werner et al., 2009; Lane et al., 2011; Werner and Grohmann, 2011; Moreno-Morcillo et al., 2014). RNA pol II contains 12 subunits and is responsible for the transcription of mRNAs and some non-coding RNAs (Armache et al., 2003, 2005; Werner and Grohmann, 2011). RNA pol III is composed of 17 subunits and catalyzes the synthesis of tRNAs and 5S rRNA, as well as other non-coding RNAs (Werner et al., 2009; Fernández-Tornero et al., 2011; Lane et al., 2011; Werner and Grohmann, 2011; Dieci et al., 2012; Khatter et al., 2017).

## RESEARCH PAPER



## Rpb4 and Puf3 imprint and post-transcriptionally control the stability of a common set of mRNAs in yeast

A.I. Garrido-Godino <sup>a</sup>, I. Gupta <sup>b</sup>, F. Gutiérrez-Santiago<sup>a</sup>, A.B. Martínez-Padilla<sup>a</sup>, A. Alekseenko <sup>c</sup>, L.M. Steinmetz<sup>d,e,f</sup>, J.E. Pérez-Ortín <sup>g</sup>, V. Pelechano <sup>c</sup>, and F. Navarro <sup>a,h</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Biología Experimental-Genética, Universidad de Jaén, Jaén, Spain; <sup>b</sup>Department of Biochemical Engineering and Biotechnology, IIT Delhi, Hauz Khas, India; <sup>c</sup>SciLifeLab, Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology, Karolinska Institutet, Solna, Sweden; <sup>d</sup>European Molecular Biology Laboratory (EMBL), Genome Biology Unit, Heidelberg, Germany; <sup>e</sup>Stanford Genome Technology Center, Stanford University, Palo Alto, CA, USA; <sup>f</sup>Department of Genetics, School of Medicine, Stanford University, Stanford, CA, USA; <sup>g</sup>E.R.I. Biotechmed, Facultad de Biológicas, Universitat de València, Burjassot, Spain; <sup>h</sup>Centro de Estudios Avanzados en Aceite de Oliva y Olivar, Universidad de Jaén, Jaén, Spain

### ABSTRACT

Gene expression involving RNA polymerase II is regulated by the concerted interplay between mRNA synthesis and degradation, crosstalk in which mRNA decay machinery and transcription machinery respectively impact transcription and mRNA stability. Rpb4, and likely dimer Rpb4/7, seem the central components of the RNA pol II governing these processes. In this work we unravel the molecular mechanisms participated by Rpb4 that mediate the posttranscriptional events regulating mRNA imprinting and stability. By RIP-Seq, we analysed genome-wide the association of Rpb4 with mRNAs and demonstrated that it targeted a large population of more than 1400 transcripts. A group of these mRNAs was also the target of the RNA binding protein, Puf3. We demonstrated that Rpb4 and Puf3 physically, genetically, and functionally interact and also affect mRNA stability, and likely the imprinting, of a common group of mRNAs. Furthermore, the Rpb4 and Puf3 association with mRNAs depends on one another. We also demonstrated, for the first time, that Puf3 associates with chromatin in an Rpb4-dependent manner. Our data also suggest that Rpb4 could be a key element of the RNA pol II that coordinates mRNA synthesis, imprinting and stability in cooperation with RBPs.

### ARTICLE HISTORY

Received 24 July 2020  
Revised 14 September 2020  
Accepted 15 October 2020

### KEYWORDS

RNA polymerase II; Puf3;  
Rbp; mRNA imprinting;  
mRNA decay; *Saccharomyces cerevisiae*

### Introduction



Gene expression is a highly regulated process that comprises several coordinated steps to ensure appropriate mRNA levels, and is determined by two different processes: mRNA synthesis and decay. Both processes occur mainly in different cell locations and need a high coordination. Changes in mRNA levels are determined by their transcription and degradation rates, and the parallel co-regulation of global mRNA synthesis and decay is important to maintain mRNA homeostasis [1–4].


mRNA imprinting, defined by M. Choder as the co-transcriptional association of a protein to an mRNA that lasts throughout the mRNA lifetime and is required for proper regulation of all major stages that the mRNA undergoes [5], is crucial for coordinating transcription in the nucleus and the decay that occurs mainly in the cytoplasm [1,5–11]. Two RNA polymerase II subunits, Rpb4 and Rpb7, correspond to these mRNA imprinting proteins interconnecting both processes.

Rpb4 and Rpb7 bind mRNA in the RNA pol II context during transcription and remain associated with mRNA throughout its life by regulating processes such as export, translation and decay [9,12–16]. Rpb4 has been proposed to interact with mRNA in an Rpb7 dependent manner [7,9,17,18]. The Rpb4/7 dimer participates in several transcription steps, such as transcription initiation [19] and elongation [20], and

dissociates from the RNA pol II core by interacting with mRNA during transcription [7,10,13], although this statement is not unanimously accepted [7,9,17,18,21]. Furthermore Rpb4 participates in transcription termination and gene looping [22]. Rpb4-mediated mRNA decay probably occurs by interacting with mRNA decay machinery elements, such as Pat1-Lsm1/7 [14]. Under optimal growth conditions, Rpb4 serves as a key protein to globally modulate mRNA stability and to coordinate transcription and decay [13]. Furthermore, Rpb4-mediated post-transcriptional regulation also plays a major role in controlling the Environmental Stress Response (ESR) at both the transcription and mRNA decay levels [13]. A recent study has demonstrated that disturbing Rpb4 dissociation from RNA pol II compromises the posttranscriptional roles of Rpb4 and leads to translation and mRNA decay defects [17].

Rpb4 acts as an RNA binding protein (RBP) by regulating gene expression from mRNA synthesis to mRNA degradation [23]. Rpb4, and also Rpb7, are examples of RNA pol II components that act as RBPs [7,9,17,18,23]. However, other RBPs associated with transcription machinery have been described, such as transcription elongation factors Spt4/5 [23], elements of the decaysome complex involved in mRNA degradation like Xrn1, Ccr4 or Dhh1 [4,8,24], or the Cbc elements of mRNA capping machinery [25]. RBPs are elements that govern the post-transcriptional regulation of the

**CONTACT** F. Navarro  [fnagomez@ujaen.es](mailto:fnagomez@ujaen.es)  Departamento de Biología Experimental-Genética, Universidad de Jaén, Jaén E-23071, Spain

 Supplemental data for this article can be accessed here.

© 2020 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

A Yeast Chromatin-enriched Fractions Purification Approach,  
yChEFs, from *Saccharomyces cerevisiae*

Abel Cuevas-Bermúdez<sup>1</sup>, Ana I. Garrido-Godino<sup>1</sup>, Francisco Gutiérrez-Santiago<sup>1</sup>  
and Francisco Navarro<sup>1, 2, \*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología Experimental-Genética, Universidad de Jaén, Jaén, Spain; <sup>2</sup>Centro de Estudios Avanzados en Aceite de Oliva y Olivar. Universidad de Jaén, Paraje de las Lagunillas, s/n, E-23071, Jaén, Spain

\*For correspondence: [fnqomez@ujaen.es](mailto:fnqomez@ujaen.es)

**[Abstract]** We have adapted a previous procedure and improved an approach that we named yChEFs (yeast Chromatin Enriched Fractions) for purifying chromatin fractions. This methodology allows the easy, reproducible and scalable recovery of proteins associated with chromatin. By using yChEFs, we bypass subcellular fractionation requirements involved when using zymolyase to obtain the spheroplast, which is employed in many other procedures. Employing small amount of culture cells and small volumes of solutions during the yChEFs procedure is very useful to allow many samples to be handled at the same time, and also reduces costs and efforts. The purified proteins associated with chromatin fractions obtained by yChEFs can be analyzed by Western blot (Figure 1) or combined with mass spectrometry for proteomic analyses.

**Keywords:** Chromatin, Proteins, Yeast, Mass spectrometry, *Saccharomyces cerevisiae*

**[Background]** DNA-protein macrocomplexes are usually insoluble and lost while obtaining chromatin fractions (Lambert *et al.*, 2009). To maximize DNA-protein recovery, cellular fractionation has been used in several organisms, such as *Xenopus* (Liang and Stillman, 1997; Khoudoli *et al.*, 2008), *Caenorhabditis elegans* (Chu *et al.*, 2006), humans (Du *et al.*, 2006; Foltz *et al.*, 2006; Foltz *et al.*, 2009), rice (Tan *et al.*, 2007) or budding yeast (Frei and Gasser, 2000; Kubota *et al.*, 2011). In most cases, these studies have been accompanied by proteomic analyses conducted by mass spectrometry, including quantitative mass spectrometry (Kubota *et al.*, 2011; Lambert *et al.*, 2012). The chromatin immunoprecipitation method (ChIP) emerged as an alternative to the above-mentioned approaches and allows interactions to be identified between protein and genomic DNA regions (Aparicio *et al.*, 2004). However, the use of formaldehyde for *in vivo* crosslinking renders this method less efficient for proteomic analyses (Metz *et al.*, 2004). ChIP combined with mass spectrometry has also been used in mouse embryonic stem cells or other model organisms (Lambert *et al.*, 2010; Engelen *et al.*, 2015). Notably a method based on ChIP, termed mChIP, has also been developed including protein affinity purification from chromatin that is most useful for mass spectrometry analyses (Lambert *et al.*, 2009 and 2010).

In budding yeast, many procedures use cell fractionation by including additional steps of zymolyase treatment to lyse cell wall of viable yeast cells and then, to obtain the spheroplast before nucleus and cytoplasm separation (Liang and Stillman, 1997; Frei and Gasser, 2000; Kubota *et al.*, 2011). Finally, a



## Article

# The Association of Rpb4 with RNA Polymerase II Depends on CTD Ser5P Phosphatase Rtr1 and Influences mRNA Decay in *Saccharomyces cerevisiae*

Ana I. Garrido-Godino <sup>1</sup> , Abel Cuevas-Bermúdez <sup>1</sup>, Francisco Gutiérrez-Santiago <sup>1</sup> ,  
María del Carmen Mota-Trujillo <sup>1</sup> and Francisco Navarro <sup>1,2,\*</sup>

- <sup>1</sup> Departamento de Biología Experimental-Genética, Universidad de Jaén, Paraje de las Lagunillas, s/n, E-23071 Jaén, Spain; aggodino@ujaen.es (A.I.G.-G.); acuevas@ujaen.es (A.C.-B.); fgutierr@ujaen.es (F.G.-S.); mcmt0005@red.ujaen.es (M.d.C.M.-T.)
- <sup>2</sup> Centro de Estudios Avanzados en Aceite de Oliva y Olivar, Universidad de Jaén, Paraje de las Lagunillas, s/n, E-23071 Jaén, Spain
- \* Correspondence: fngomez@ujaen.es; Tel.: +34-953-212-771; Fax: +34-953-211-875



Citation: Garrido-Godino, A.I.; Cuevas-Bermúdez, A.; Gutiérrez-Santiago, F.; Mota-Trujillo, M.d.C.; Navarro, F. The Association of Rpb4 with RNA Polymerase II Depends on CTD Ser5P Phosphatase Rtr1 and Influences mRNA Decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 2002. <https://doi.org/10.3390/ijms23042002>

Academic Editor: Hidehisa Takahashi

Received: 29 October 2021

Accepted: 7 February 2022

Published: 11 February 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Rtr1 is an RNA polymerase II (RNA pol II) CTD-phosphatase that influences gene expression during the transition from transcription initiation to elongation and during transcription termination. Rtr1 interacts with the RNA pol II and this interaction depends on the phosphorylation state of the CTD of Rpb1, which may influence dissociation of the heterodimer Rpb4/7 during transcription. In addition, Rtr1 was proposed as an RNA pol II import factor in RNA pol II biogenesis and participates in mRNA decay by autoregulating the turnover of its own mRNA. Our work shows that Rtr1 acts in RNA pol II assembly by mediating the Rpb4/7 association with the rest of the enzyme. *RTR1* deletion alters RNA pol II assembly and increases the amount of RNA pol II associated with the chromatin that lacks Rpb4, decreasing Rpb4-mRNA imprinting and, consequently, increasing mRNA stability. Thus, Rtr1 interplays RNA pol II biogenesis and mRNA decay regulation. Our data also indicate that Rtr1 mediates mRNA decay regulation more broadly than previously proposed by cooperating with Rpb4. Interestingly, our data include new layers in the mechanisms of gene regulation and in the crosstalk between mRNA synthesis and decay by demonstrating how the association of Rpb4/7 to the RNA pol II influences mRNA decay.

**Keywords:** transcription; RNA polymerases; biogenesis; mRNA stability; Rtr1 CTD phosphatase; *Saccharomyces cerevisiae*

## 1. Introduction

RNA polymerase II (RNA pol II) is composed of a 10-subunit core polymerase and the dissociable heterodimer Rpb4 and Rpb7 in *Saccharomyces cerevisiae* [1–3]. Rpb4/7 participates in different steps of transcription, such as initiation, elongation, termination, and polyadenylation, as well as gene looping and dephosphorylation of the CTD of Rpb1 [4–10]. Furthermore, Rpb4/7 binds mRNA cotranscriptionally, influencing mRNA export, translation, and decay [11–18]. Rpb4 and Rpb7 act as RNA binding proteins (RBP) and associate with regulatory factors such as Pat1, Lsm2, Puf3 or Not5 to link mRNA synthesis and decay [14–16,19,20]. Interestingly, post-translational modifications of Rpb4/7 are required to connect transcription with post-transcriptional mechanisms [21,22].

It is assumed that gene expression ensures appropriate mRNA levels, which maintains mRNA homeostasis by coordinating transcription in the nucleus, and mRNA decay, which occurs mainly in the cytoplasm [23–26]. Some authors define gene expression as a circular process during which the synthesis and degradation of mRNAs are coordinated in a process called the crosstalk of mRNA, which extends the classic view of the Central Dogma of the Molecular Biology [13,18,25,27–30]. During this process, the mRNA decay

**Rpb4/7, a key element of RNA pol II to coordinate mRNA synthesis in the nucleus with cytoplasmic functions in *Saccharomyces cerevisiae*.**

**Garrido-Godino, A.I.<sup>1§</sup>, Martín-Expósito, M.<sup>1§</sup>, Gutiérrez-Santiago F.<sup>1 §</sup>, Pérez-Fernández, J.<sup>1\*</sup> and Navarro F.<sup>1,2\*</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Biología Experimental-Genética; <sup>2</sup>Centro de Estudios Avanzados en Aceite de Oliva y Olivar. Universidad de Jaén, Paraje de las Lagunillas, s/n, E-23071, Jaén, Spain.

\* Co-corresponding authors

§ Co-authors

Gene expression is a complex phenomenon that depends on multiple protein complexes, including RNA polymerases (RNA pols). In eukaryotes, bacteria, and archaea, RNA pols are heteromultimeric complexes which, in collaboration with a large set of proteins, constitute transcriptional machineries [1, 2]. RNA pol II, which transcribes mRNAs and several noncoding RNAs, comprises 12 subunits organized in a 10-subunit core, and the heterodimer Rpb4 and Rpb7 (Rpb4/7) [3, 4]. Rpb4 and Rpb7 are indispensable for cell survival in eukaryotes [5-11]. However, in *Saccharomyces cerevisiae*, Rpb4 is dispensable under permissive conditions [12-17], but is essential together with Rpb7 in stress tolerance [6]. Interestingly, *RPB7* overexpression overcomes the lethality of mutant *rpb4Δ* under some stress conditions [18]. Rpb4 and Rpb7 show substoichiometric levels compared to other RNA pol II subunits in *S. cerevisiae* [19], which could be related to the dissociation of the heterodimer from the 10-subunit core complex observed only in *S. cerevisiae* [15, 16, 20-22]. Only ~20% of RNA pol II complexes contain Rpb4/7 in proliferating cells [22], which suggests that this interaction occurs only in some transcription steps.

Rpb4 assembles with RNA pol II in the cytoplasm before the enzyme translocates to the nucleus, a process that requires the action of Rtr1 [23]. Furthermore, Rpb4/7 shuttles