



UNIVERSIDAD DE JAÉN

ÁREA DE GÉNETICA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA EXPERIMENTAL
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

TESIS DOCTORAL

INFLUENCIA DE Bud27 Y Rtr1 EN EL CICLO DE VIDA DE LOS RNA
MENSAJEROS EN *Saccharomyces cerevisiae*

PRESENTADA POR:
ABEL CUEVAS BERMÚDEZ

DIRIGIDA POR:
FRANCISCO NAVARRO GÓMEZ
ANA ISABEL GARRIDO GODINO

JAÉN, 21 de Febrero de 2018
ISBN



Universidad de Jaén

Área de Genética

Departamento de Biología Experimental

Facultad de ciencias experimentales

El Dr. Francisco Nicolás Navarro Gómez, Profesor Titular del Área de Genética de la Universidad de Jaén y la Dra. Ana Isabel Garrido Godino certifican que la Tesis Doctoral titulada: **“INFLUENCIA DE Bud27 Y Rtr1 EN EL CICLO DE VIDA DE LOS RNA MENSAJEROS EN *Saccharomyces cerevisiae*”**, que presenta Abel Cuevas Bermúdez 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.

Jaén, 21 de Febrero de 2018

Directores de la Tesis Doctoral

Dra. Ana Isabel Garrido Godino

Dr. Francisco Nicolás Navarro Gómez

Memoria presentada por el graduado

Abel Cuevas Bermúdez

Febrero de 2018

Índice

AATCGCAGT GATCGATT AGCTAGT GACGCTA AATCGCAGT GATCGATT AGCTAGT GACGCTA
ACCRACCTC GTGAGCACTT CACGAGT GCTCARCC ACCRACCTC GTGAGCACTT CACGAGT GCTCARCC

ÍNDICE

RESUMEN/SUMMARY	1
INTRODUCCIÓN	17
1 MECANISMOS DE TRANSCRIPCIÓN EN EUCARIOTAS; RNA POLIMERASAS	17
1.1 Transcripción	17
1.2 Organización y composición de las RNA pols	18
1.3 RNA polimerasa I	20
1.4 RNA polimerasa III	22
1.5 RNA polimerasas II	23
1.5.1 <i>El dominio carboxilo-terminal de Rpb1 (CTD)</i>	26
1.5.2 Rtr1/RPAP2, fosfatasa del CTD	29
1.6 Ensamblaje y transporte al núcleo de las RNA pols	31
2. LA TRANSCRIPCIÓN MEDIADA POR LA RNA POL II	33
2.1 Pre-iniciación e iniciación de la transcripción	33
2.2 Elongación en la transcripción	37
2.3 Terminación de la transcripción	40
2.4 Remodelación de la cromatina en el proceso transcripcional	42
3. CICLO DE VIDA DEL mRNA	45
3.1 Formación de la caperuza 5' en el mRNA	45
3.2 Poliadenilación del mRNA	46
3.3 Exporte del mRNA	48
3.4 Degradación del mRNA	48
3.5 Papel de Dhh1 (" <i>DEAD box Helicase Homolog</i> ") en el ciclo de vida del mRNA	50
3.6 Heterodímero Rpb4/7, y su papel en el ciclo de vida del mRNA	51

4. La Prefoldina-like Bud27	53
4.1 Papel citoplasmático de URI/Bud27	54
4.1.1 Bud27 media la biogénesis de las tres RNA pols en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54
4.1.2 Bud27 en traducción	55
4.2 Papel nuclear de URI/Bud27	56
4.3 URI/Bud27, como factor implicado en la Ruta TOR	58
OBJETIVOS/AIMS	61
MATERIALES Y MÉTODOS	67
1 Medios de cultivo	69
1.1 Medios de cultivo para <i>Escherichia coli</i>	69
1.2 Medios de cultivo para <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	69
1.3 Aminoácidos, Vitaminas y Antibióticos	69
1.3.1 Aminoácidos y Vitaminas	69
1.4 Drogas	70
2 Técnicas de manipulación en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Echerichia Coli</i>	71
2.1 Técnicas de manipulación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	71
2.1.1 Condiciones de cultivo	71
2.1.2 Transformaciones	71
2.1.3 Determinación de sexos en haploides, construcción de diploides, esporulación y selección de esporas.	77
2.2 Condiciones de cultivo en <i>Escherichia coli</i>	73
3 Técnicas de Biología Molecular	74
3.1 Técnicas de Análisis y manipulación de ácidos nucleicos	74
3.1.1 Extracción de DNA genómico en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	74

3.1.2 Extracción de RNA en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	75
3.1.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	75
3.1.4 Reverso transcripción o retrotranscripción (RT)	76
3.1.5 PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)	76
3.1.6 Análisis mediante cuantificación y electroforesis de ácidos nucleicos	76
3.1.7 Análisis de la estabilidad de los mRNAs	77
3.1.8 Dot-blot	77
3.1.9 RNA-seq (secuenciación del RNA)	78
3.2 Técnicas de análisis proteicos	81
3.2.1 Extracción de proteínas	81
3.2.2 Análisis de proteínas por western-blot	81
3.2.3 Precipitación por TCA	83
3.2.4 Aislamiento del mRNA y análisis de las proteínas asociadas, UV-crosslinking	83
3.2.5 yChEFs (<i>yeast chromatin enrichment fraction</i>)	84
4 Determinación del tamaño y número celular mediante citometría de flujo	84
RESULTADOS	91
Capítulo I	93
Resumen	95
Artículo: A novel yeast chromatin-enriched fractions approach, y ChEFs, for chromatin-associated and RNA-dependent chromatin-associated proteome analysis	97
Capítulo II	133
ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LOS mRNA EN AUSENCIA DE <i>BUD27</i>	138
Estudio de la estabilidad de los mRNA en genes individuales en ausencia de Bud27	138
III	

Análisis del nivel de acumulación de mRNA en los genes <i>CPA2</i> , <i>HHT1</i> , <i>ACT1</i> y <i>RPB6</i> , en ausencia de Bud27	140
Estudio de la estabilidad del total de los mRNA	141
PAPEL DE Bud27 EN LOS PROCESOS DE POLIADENILACIÓN ALTERNATIVA DE LOS mRNA	143
Análisis transcriptómico del mutante <i>bud27Δ</i> y su comparación con el bloqueo de la ruta TOR por rapamicina	144
Estudio de la poliadenilación alternativa	152
Análisis de los sitios preferentes de poliadenilación	155
Análisis de sitios de poliadenilación alternativa en grupos de genes dependientes de Sth1 y genes dependientes de Gcn4	157
Estudio preliminar de la posible influencia de Pab1 en los efectos provocados por la falta de Bud27 sobre los mRNA	166
Capítulo III	169
PAPEL DE Rtr1 EN EL CICLO DE VIDA DE LOS mRNA: ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LOS mRNA	172
Estudio de la estabilidad de los mRNA en genes individuales en ausencia de Rtr1	172
Análisis del nivel de acumulación de mRNA inicial en los genes <i>HHT1</i> , <i>PMA1</i> y <i>ACT1</i> , en ausencia de Rtr1	174
Estudio de la estabilidad global de mRNA en ausencia de Rtr1	175
Estudio de la asociación de Rtr1 a los mRNA	177
Análisis de una posible coordinación entre Rtr1, Rpb4 y Dhh1	178
DISCUSIÓN	189
CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	209
BIBLIOGRAFÍA	215

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I1: Disposición estructural de la RNA pol I.	21
Figura I2: Estructura cristalográfica de la RNA pol III.	23
Figura I3: Estructura cristalográfica de la RNA pol II en elongación.	24
Figura I4: Representación esquemática del dominio carboxi-terminal (CTD).	27
Figura I5: Perfil de fosforilación de las Serinas 2, 5 y 7 del CTD de la RNA pol II en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	28
Figura I6: Estructura cristalográfica de Rtr1.	30
Figura I7: Esquema del ensamblaje secuencial de las subunidades de la RNA pol II en eucariotas.	32
Figura I8: Modelo del ensamblaje secuencial del complejo de preiniciación (PIC).	36
Figura I9: Modelo estructural de la disposición de la RNA pol II y el heterodímero Spt4/5 constituyendo el complejo elongante.	37
Figura I10: Representación esquemática de cómo los remodeladores de cromatina actúan en la reestructuración de los nucleosomas facilitando el proceso transcripcional.	43
Figura I11: Modelo para la transición de iniciación-elongación de la RNA pol II.	46
Figura I12: Tipos de poliadenilación alternativa.	47
Figura I13: Modelo del proceso de degradación citoplasmático del mRNA.	50
Figura I14: Esquema de la relación entre Rpb4/7 y los mRNA.	52
Figura I15: Esquema de los posibles complejos R2TP/PFDL.	53
Figura I16: Representación esquemática de las diversas funciones de Bud27 en el núcleo y citoplasma en <i>S. cerevisiae</i> .	57
Figura M1: Esquema general del método 3'T-fill.	79
Figura M2: Representación mediante el programa FastQC, de la disposición de los diferentes nucleótidos en el conjunto de los transcritos.	79

Figura B1: Representación de la estabilidad de los mRNA de los genes <i>CPA2</i> , <i>HHT1</i> , <i>ACT1</i> y <i>RPB6</i> .	139
Figura B2: Análisis de la acumulación de mRNA para los genes <i>CPA2</i> , <i>HHT1</i> , <i>ACT1</i> y <i>RPB6</i> .	140
Figura B3: Puesta a punto del análisis de mRNA total mediante Dot-blot con la sonda fluorescenteoligodT (oligodTCy3).	142
Figura B4: Análisis de la estabilidad de mRNA total mediante Dot-blot, en la cepa <i>bud27Δ</i> y su cepa isogénica silvestre, previo al tratamiento con tiolutina para provocar la parada transcripcional.	142
Figura B5: Análisis de la acumulación inicial del global del mRNA.	143
Figura B6: Análisis de calidad y variabilidad entre las muestras de RNAseq del mutante <i>bud27Δ</i> y silvestre tratado con rapamicina (WT + R) y silvestre sin tratamiento específico (WT).	146
Figura B7: Análisis del nivel de expresión diferencial de cada gen (acumulación de mRNA) en el mutante <i>bud27Δ</i> y en un silvestre tratado con rapamicina para bloquear la ruta TOR (WT + R), frente al silvestre (WT).	147
Figura B8: Representación mediante Diagrama de Venn de genes con acumulación de mRNA mayor y menor de 2 veces en el mutación <i>bud27Δ</i> y el bloqueo de la ruta TOR por rapamicina en una cepa silvestre frente la misma cepa silvestre sin tratamiento específico.	148
Figura B9: Análisis de sitios de poliadenilación alternativa en un mutante <i>bud27Δ</i> y tras el bloqueo de la tura TOR con rapamicina en una cepa silvestre (WT + Rapamicina) frente a la cepa silvestre sin tratamiento (WT).	154
Figura B10: Ejemplo del perfil de los sitios de poliadenilación en el mutante <i>bud27Δ</i> y en una cepa silvestre tras el bloqueo de la ruta TOR con rapamicina respecto al silvestre, a partir de análisis de RNA-Req.	155

Figura B11: Análisis de los ratios entre los niveles de poliadenilación aguas-abajo vs aguas-arriba respecto al sitio de poliadenilación preestablecido para la cepa silvestre (WT), el mutante <i>bud27Δ</i> y un silvestre bloqueando la ruta TOR con rapamicina (WT + R).	156
Figura B12: Análisis de la preferencia de los sitios de poliadenilación, aguas-arriba o aguas-abajo del sitio de poliadenilación preestablecido, en el mutante <i>bud27Δ</i> frente al silvestre (WT), y tras bloqueo de la ruta TOR con rapamicina en la cepa silvestre (WT + R) frente al silvestre (WT).	157
Figura B13: Estudio de las diferencias en los sitios de poliadenilación en el mutante <i>bud27Δ</i> respecto al silvestre (WT).	159
Figura B14: Estudio de las diferencias en los sitios de poliadenilación en el silvestre tratado con rapamicina (WT + rapamicina), respecto al silvestre (WT).	160
Figura B15: Estudio de las diferencias en los sitios de poliadenilación en el mutante <i>bud27Δ</i> y el silvestre tratado con rapamicina (WT + rapamicina), respecto al silvestre (WT).	161
Figura B16: Estudio de las diferencias, en los sitios de poliadenilación en el mutante <i>bud27Δ</i> y el silvestre tratado con rapamicina (WT + rapamicina), respecto al silvestre (WT).	163
Figura B17: Estudio de las diferencias, en los sitios de poliadenilación en el mutante <i>bud27Δ</i> y el silvestre tratado con rapamicina (WT + rapamicina), respecto al silvestre (WT).	165
Figura B18: Crecimiento del mutante <i>bud27Δ</i> y el silvestre (WT), con y sin sobreexpresión de <i>PAB1</i> .	166
Figura B19: Detección por western-blot de los niveles de Pab1 asociadas a los mRNA.	167
Figura B20: Crecimiento del mutante <i>bud27Δ</i> y el silvestre (WT), con y sin sobreexpresión de <i>PAB1</i> .	168

Figura R1: Representación de la estabilidad de los mRNA de los genes <i>ACT1</i> , <i>HHT1</i> y <i>PMA1</i> .	173
Figura R2: Análisis de la acumulación inicial de mRNA para los genes <i>PMA1</i> , <i>HHT1</i> y <i>ACT1</i> .	174
Figura R3: Análisis de la estabilidad de mRNA total mediante Dot-blot, en la cepa <i>rtr1Δ</i> y su cepa isogénica silvestre, previo al tratamiento con tiolutina para provocar la parada transcripcional.	175
Figura R4: Análisis de la acumulación global de mRNA.	176
Figura R5: Detección por western-blot de proteínas asociadas a los mRNA purificados por el método UV-crosslinking.	178
Figura R6: Crecimiento de cepas mutantes y silvestre, a distintas temperaturas en medio rico YPD.	179
Figura R7: Detección por western-blot de proteínas asociadas a los mRNA purificados por el método UV-crosslinking en un mutante <i>rtr1Δ</i> .	180
Figura R8: Detección por western-blot de proteínas asociadas a los mRNA purificados por el método UV-crosslinking en un mutante <i>rpb4Δ</i> .	181
Figura R9: Detección por western-blot de proteínas asociadas a los mRNA purificados por el método UV-crosslinking en un mutante <i>dhh1Δ</i> .	182
Figura R10: Detección por western-blot de proteínas asociadas a la cromatina a partir del método de purificación de fracciones enriquecidas (yChEFs) en un mutante <i>rtr1Δ</i> .	183
Figura R11: Detección por western-blot de proteínas asociadas a la cromatina a partir del método de purificación de fracciones cromatínicas enriquecidas (yChEFs) en un mutante <i>rpb4Δ</i> .	184
Figura R12: Detección por western-blot de proteínas asociadas a la cromatina a partir del método de purificación de fracciones cromatínicas enriquecidas (yChEFs) en un mutante <i>dhh1Δ</i> .	185

Figura R13: Representación de los niveles de acumulación de mRNA para <i>RTR1</i> , <i>RPB4</i> y <i>DHH1</i> en los mutantes <i>rtr1Δ</i> , <i>dhh1Δ</i> y <i>rpb4Δ</i> .	186
Figura R14: Crecimiento de cepas mutantes y silvestre, a distintas temperaturas en medio rico YPD.	188
Figura D1: Modelo propuesto para la asociación tripartita entre Bud27, Rpb5 y RSC en la transcripción y poliadenilación.	202
Figura D2: Modelo propuesto para el papel de Rtr1 en el ciclo de vida de los mRNA	207
ÍNDICE DE TABLAS	
Tabla I1: Composición de las RNA pols en bacterias, arqueas y eucariotas.	19
Tabla I2: Regiones conservadas de la RNA pol II.	25
Tabla I3: Factores generales de transcripción (GTFs) implicados en la transcripción mediada por la RNA pol II en <i>S. cerevisiae</i> .	34
Tabla M1: Aminoácidos y vitaminas	69
Tabla B1: Vidas medias de los mRNA para los genes indicados.	139
Tabla B2: Análisis de las categorías funcionales de los genes con mayor o menor acumulación de mRNA en el mutante <i>bud27Δ</i> frente al silvestre, a partir de los datos procedentes del RNA-Seq.	149
Tabla B3: Análisis de las categorías funcionales de los genes con acumulación de mRNA 1 veces mayor o menor, en una cepa silvestre tratada con rapamicina para bloquear la ruta TOR frente al silvestre sin tratamiento específico, a partir de los datos procedentes del RNA-Seq.	150
Tabla B4: Análisis de las categorías funcionales de los genes comunes con acumulación de mRNA 2 veces mayor o menor entre el mutante <i>bud27Δ</i> frente a su cepa silvestre y una cepa silvestre tratada con rapamicina para bloquear la ruta TOR, frente al silvestre sin tratamiento específico.	151
Tabla R1: Vidas medias de mRNA para los genes indicados.	173

Tabla R2: Esquema del efecto provocado por la ausencia de cada una de las proteínas Rtr1, Rpb4 y Dhh1, sobre las dos restantes.	187
Tabla suplementaria M1: Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	85
Tabla suplementaria M2: Oligonucleótidos para PCR cuantitativa en tiempo real (<i>RT-qPCR</i>).	87
Tabla suplementaria M3: Oligonucleótidos para delección de genes mediante recombinación homóloga.	88
Tabla suplementaria M4: Oligonucleótidos para análisis de marcadores.	88
Tabla suplementaria M5: Anticuerpos.	89

Resumen/Summary

AATCGCAGT GATCGATT AGCTAGT GACGCTA AATCGCAGT GATCGATT AGCTAGT GACGCTA
ACCRACTC GTGAGCACTT CACGAGT GCTCARCC ACCRACTC GTGAGCACTT CACGAGT GCTCARCC

RESUMEN

Nuestro grupo de investigación a lo largo de los últimos años ha tratado de caracterizar funcionalmente la RNA polimerasa II y el papel que juegan proteínas asociadas a ella en diversos procesos como el ensamblaje, transcripción y ciclo de vida de los mRNA.

Este estudio se va a centrar en el papel de dos proteínas; Bud27, cuyo ortólogo en humanos es URI/RMP, miembro de la familia prefoldin-like de las chaperonas ATP-independientes y Rtr1, proteína ortóloga de la humana RPAP2, fosfatasa que afecta la expresión génica al modular el estado de fosforilación del dominio C-terminal, CTD, de la subunidad mayor de la RNA pol II. Ambas proteínas participan en el ensamblaje y/o transporte de la RNA pol II al núcleo.

Desarrollo de una Técnica para el análisis de fracciones de cromatina enriquecidas, yChEFs (*yeast Chromatin Enriched Fractions*)

En este trabajo se ha desarrollado una técnica de purificación de fracciones enriquecidas de cromatina en *Saccharomyces cerevisiae* denominado yChEFs (yeast Chromatin Enriched Fractions), que permite de un modo fácil, reproducible y escalable analizar las proteínas asociadas a la cromatina evitando la necesidad de realizar fracciones celulares empleando zimoliasa para obtener esferoplastos con el fin de aislar el núcleo, y además evitando procesos de solubilización o eliminación del DNA tales como la sonicación o tratamiento con DNasa. Además, se ha demostrado que la fijación proteína-DNA utilizando formaldehído, DSG (*disuccinimidyl glutarate*) y formaldehído y DSG combinado previa al desarrollo del método yChEFs, afecta a la cantidad de proteína purificada, lo que nos permite evitar este paso y facilitar el procedimiento.

La técnica yChEFs se ha utilizado para caracterizar el proteoma asociado a cromatina, identificándose 750 proteínas, siendo muchas de ellas las proteínas descritas de manera general de unión a cromatina en *S. cerevisiae* y otros organismos incluyendo las histonas y variantes de histonas (Boulard et al., 2007). Encontramos proteínas que se corresponden mayoritariamente con categorías funcionales de procesos biológicos de la

cromatina (ensamblaje y desensamblaje, remodelación, organización y modificación de cromatina) y transcripción o procesamiento del RNA entre otros (Tabla 1 del artículo).

Este procedimiento nos ha permitido caracterizar también el proteoma asociado a cromatina dependiente de RNA y se han identificado 554 proteínas. Aproximadamente 200 proteínas se asocian a la cromatina de manera claramente dependiente de RNA, perteneciendo estas mayoritariamente a categorías funcionales de procesamiento de RNA, transcripción, metabolismo de ncRNA, nucleosomas y remodelación de cromatina (Tabla 2 del artículo). De entre estas proteínas, de manera interesante, encontramos subunidades de las 3 RNA polimerasas y proteínas implicadas en los procesos de degradación de mRNA, tales como Dcp2, Xrn1, Dhh1 y Pbp1.

Este método se ha comparado con otras técnicas descritas previamente (Carrillo et al., 2010) y (Lambert et al., 2010) para el aislamiento de proteínas asociadas a la cromatina. La comparación con el método de Carrillo y colaboradores muestra un solapamiento de aproximadamente un 76 %. Cuando se compara con el interactoma analizado por Lambert y colaboradores también se observa un solapamiento importante, teniendo en cuenta que ese procedimiento es la suma de los análisis de interacción de un conjunto de proteínas nucleares seleccionadas.

En conjunto, nuestros datos validan el método yChEFs como una técnica para el análisis de proteínas asociadas a la cromatina en *S. cerevisiae*, permitiendo incluso analizar proteínas que se unen de manera lábil o transitoria a la misma.

INFLUENCIA DE BUD27 EN EL CICLO DE VIDA DEL mRNA

Bud27 (cuyo ortólogo en humanos es URI/RMP) es una prefoldina no convencional que actúa como chaperona en una vía independiente de ATP (Gstaiger et al., 2003). Bud27 media el ensamblaje citoplasmático de las tres RNA polimerasas en un proceso dependiente de Rpb5 en *S. cerevisiae* (Mirón-García et al., 2013) y participa en la elongación de la transcripción mediando la correcta asociación y/o función del complejo remodelador de cromatina RSC a la RNA pol II (Mirón-García et al., 2014). De igual manera, se ha determinado la asociación entre Bud27 y RSC en relación a la RNA pol III (Vernekar and Bhargava, 2015). Además, URI y Bud27, en humanos y levaduras, están relacionados

con la ruta de transducción de señales TOR (por “*target of Rapamycin*”), de respuesta a nutrientes (Gstaiger et al., 2003).

En este trabajo demostramos el papel de Bud27 en el ciclo de vida del mRNA modulando positivamente la estabilidad del mRNA, provocando la ausencia de Bud27 un incremento en la velocidad de degradación de los mismos (Figura B1 y B4, Tabla B1). La falta de Bud27 parece provocar una respuesta homeostática celular ya que los niveles de acumulación de mRNA no se corresponden con la disminución de estabilidad global de los transcritos, sino que existe una cierta compensación de la cantidad global, no observándose variaciones importantes respecto a una cepa silvestre (Figura B2 y B5).

Se ha relacionado tanto a Bud27 como a su ortólogo URI con la ruta TOR (Gstaiger et al., 2003). El bloqueo de la ruta TOR, tras el tratamiento con rapamicina, produce la desestabilización de los transcritos debido a un acortamiento en las colas de poli(A) (Albig y Decker, 2001). Datos de nuestro grupo muestran que la sobreexpresión de *PAB1* corrige el fenotipo de termosensibilidad del mutante *bud27Δ* (Figura B18). *PAB1* codifica la proteína Pab1 de unión a las colas de poli(A), relacionada con el control del tamaño de las mismas y participa en procesos de deadenilación de los transcritos (revisado en (Parker, 2012)). Además, uno de los motivos que provoca inestabilidad en los transcritos es la existencia de “poliadenilación alternativa” (Geisberg et al., 2014).

Se ha analizado el perfil de poliadenilación en una cepa carente de Bud27 así como en una cepa silvestre tratada con rapamicina para bloquear la ruta TOR, a partir de datos de RNA-seq. Para ello ha sido crucial la formación en técnicas bioinformáticas adquiridas en el laboratorio del Dr. Vicent Pelechano en el Karolinska Institute (Estocolmo, Suecia). Previamente se realizaron análisis transcriptómicos de los datos obtenidos mediante RNAseq. De manera interesante, tras un análisis de las categorías funcionales de los genes cuya acumulación se encontraba alterada en el mutante *bud27Δ* y en un silvestre tras bloqueo de la ruta TOR, en ambos casos respecto a la cepa silvestre sin tratamiento específico, encontramos grupos de genes relacionados con el factor de transcripción Gcn4 y con procesos biológicos implicados en traducción, transporte nuclear, localización del RNA, transporte de RNA y su exportación desde el núcleo, exportación de rRNA desde el núcleo y biogénesis de ribosomas, entre otros (Tabla B2, B3 y B4).

Los análisis de la posible alteración en los sitios de poliadenilación en el mutante *bud27Δ* y el silvestre tratado con rapamicina bloqueando la ruta TOR, para el global de los genes, mostraron una variación en la poliadenilación alternativa significativa respecto al silvestre (Figura B9). Estas variaciones son preferentes en el grupo de genes dependiente de Sth1 (Figura B17). Por el contrario, no se detectaron variaciones significativas asociadas directamente a los genes dependientes de Gcn4 (Figura B17).

Se ha descrito en células humanas que el posicionamiento de los nucleosomas pueden alterar la poliadenilación de los genes y el reclutamiento de la maquinaria de poliadenilación al mRNA naciente (Jordán-Pla et al., 2014; Luco et al., 2011; McCracken et al., 1997). Así mismo, se ha demostrado el importante papel de la poliadenilación en la eficiencia de la terminación de la transcripción mediada por la RNA pol II (Gromak et al., 2006; Plant et al., 2005). Curiosamente, nuestros datos preliminares muestran una acumulación de la RNA pol II en la región TTS (sitio de terminación de la transcripción) en el mutante *bud27Δ*. Por otro lado, la falta de Bud27 provoca un aumento en ocupación de histonas en los genes y una caída de Sth1 hacia la región 3' de los mismos (Martínez-Fernández, en preparación). Estos datos y los previamente descritos por nuestro grupo sobre una asociación tripartita funcional entre Bud27, Rpb5 y Sth1 (componente de RSC) (Mirón-García et al., 2014), nos llevan a sugerir que la falta de Bud27 podría provocar un defecto en el posicionamiento de los nucleosomas o en la dinámica de la cromatina que podría conllevar alteraciones en la poliadenilación alternativa, alterando la estabilidad de los transcritos.

Asimismo, el paralelismo entre los datos presentados en carencia de Bud27 y en bloqueo de la ruta TOR sugiere que Bud27 tendría un papel importante en dicha ruta, regulando los procesos descritos. De hecho, el bloqueo de esta ruta tanto en la levadura *S. cerevisiae* como en células humanas, conlleva una disminución en los niveles intracelulares de proteína Bud27 y URI. Esto podría estar relacionado con los efectos observados en un mutante *bud27Δ* (Gstaiger et al., 2003; Martínez-Fernández, en preparación).

INFLUENCIA DE Rtr1 EN EL CICLO DE VIDA DEL mRNA

Rtr1, proteína ortóloga de la humana RPAP2, es una fosfatasa del CTD con un papel en la transición de la iniciación a la elongación de la transcripción mediada por la RNA pol II, promoviendo la desfosforilación del CTD-Ser5P en la región 5' de los genes previa a su fosforilación en el CTD-Ser2 (Buratowski, 2009). La falta de Rtr1 provoca defectos transcripcionales, resultando en una acumulación de CTD-Ser5P en la región codificante de los genes (Gibney et al., 2008; Mosley et al., 2013). Se ha sugerido el papel tanto de Rtr1 como de RPAP2 en el ensamblaje y transporte de la RNA pol II al núcleo (Forget et al., 2013; Gómez-Navarro and Estruch, 2015). Así mismo se ha descrito el papel de Rtr1 favoreciendo la degradación de su propio transcrito (Hodko et al., 2016).

En este trabajo demostramos el papel de Rtr1 en el ciclo de vida del mRNA modulando negativamente la estabilidad del mRNA; la ausencia de Rtr1 provoca una disminución en la velocidad de degradación del mRNA (Figura R1 y R3, Tabla R1). La acumulación de mRNA observada en el mutante *rtr1Δ* no se correlaciona con el aumento de estabilidad de los mRNA. Este hecho sugiere un comportamiento homeostático de la célula, probablemente por una reducción en los niveles de transcripción (Figura R2 y R4).

Se ha descrito una interacción genética entre *RTR1* y *RPB4* y una interacción funcional entre ambas proteínas (Gibney et al., 2008). Existe una impronta cotranscripcional de Rpb4 sobre los mRNA, (Goler-Baron et al., 2008); Collier and Parker, 2005; Lotan et al., 2005), que podría favorecer el reclutamiento de la maquinaria de degradación a los mRNA (Lotan et al., 2005). De igual modo, la ausencia de Rpb4 provoca una mayor estabilidad en los transcritos (Garrido-Godino et al., 2016). Estos datos sugieren un papel coordinado entre Rtr1 y Rpb4 en la modulación de la estabilidad del mRNA. De igual modo, se ha propuesto una interacción Rtr1-Dhh1 (exonucleasa de mRNA), involucrada en la modulación de la degradación del transcrito de *RTR1* (Hodko et al., 2016). Tal y como ocurre con Rtr1 y Rpb4, la ausencia de Dhh1 provoca un aumento de la estabilidad de los transcritos (Collier et al., 2001).

A partir de este conjunto de datos nos planteamos la existencia de una posible coordinación entre Rtr1, Rpb4 y Dhh1 para modular la estabilidad de los transcritos

probablemente a través de su asociación a los mRNA. En este trabajo se ha determinado que en ausencia de Rtr1 disminuyen los niveles de Rpb4 asociado a los mRNA, no variando los niveles de Dhh1. A su vez, la ausencia de Rpb4 conlleva disminución de los niveles de Rtr1 y Dhh1 asociados a los mRNA; y la ausencia de Dhh1 provoca disminución de los niveles de Rtr1 y Rpb4 asociados a los mRNA. Teniendo en cuenta el proceso cotranscripcional de unión de Rpb4 a los transcritos (Coller and Parker, 2005; Goler-Baron et al., 2008; Lotan et al., 2005), nos planteamos que esta unión cotranscripcional podría estar ocurriendo también para Rtr1 y Dhh1. De hecho, los resultados muestran que los niveles de Rtr1, Rpb4 y Dhh1 asociados a la cromatina, en ausencia de cada una de ellas, tienen el mismo comportamiento que el observado en cuanto a su asociación a los mRNA. Estos datos sugieren que la interacción de estas proteínas y el mRNA podría ocurrir en el contexto de la cromatina. Dado el papel sugerido para Rtr1 en el ensamblaje y transporte de la RNA pol II al núcleo (Forget et al., 2013; Gómez-Navarro and Estruch, 2015), los datos de nuestro grupo que muestran un defecto de ensamblaje de Rpb4 a la RNA pol II (Garrido-Godino, en preparación) y el papel de Rpb4 en la estabilidad de los mRNA, sugerimos que el incremento de estabilidad de los mRNA observado en ausencia de Rtr1 podría deberse, de manera indirecta, al defecto de ensamblaje de la RNA pol II. Como consecuencia de este déficit, el paso cotranscripcional de Rpb4 a los mRNA se vería alterado, favoreciéndose el aumento de población de mRNA sin Rpb4 asociado, desfavoreciendo de esta forma el reclutamiento de la maquinaria de degradación del mRNA y por tanto, aumentando la estabilidad de los mRNA. De igual manera, la ausencia de Dhh1 que provoca disminución en los niveles de Rtr1 podría conllevar defectos similares de ensamblaje y como consecuencia, al aumento, en parte, de la estabilidad de los mRNA. En este caso, la falta de Dhh1 conlleva un aumento general de la estabilidad de los mRNA al disminuir la actividad de parte de la maquinaria de degradación de los mismos. En cualquier caso, no podemos descartar un papel directo de Rtr1 en la estabilidad de los mRNA, quizá mediante su asociación con Dhh1 y Rpb4.

SUMMARY

Our research group try to functionally characterize the RNA polymerase II and the role played by their associated proteins in several processes, such as the RNA pol assembly, transcription and mRNA life cycle.

This study will focus on the role of two proteins; Bud27, whose human orthologue is URI/RMP, member of the prefoldin-like family ATP-independent chaperones and Rtr1, orthologous protein of human RPAP2, phosphatase that affects gene expression by modulating the phosphorylation state of the C-domain terminal, CTD, of the major subunit of RNA pol II. Both proteins participate in the assembly and/or transport of RNA pol II to the nucleus.

A method for the analysis of chromatin enriched fractions, yChEFs (yeast Chromatin Enriched Fractions)

We have developed a technique for purification of chromatin enriched fractions from *Saccharomyces cerevisia*, named yChEFs (yeast Chromatin Enriched Fractions). This method allows to analyze the chromatin-associated proteins in an easy, reproducible and scalable way, avoiding the necessity of cell fractionation and DNA solubilization. In addition, protein-DNA crosslinking with formaldehyde, DSG (disuccinimidyl glutarate) or both prior yChEFs procedure, affects the amount of purified protein. It allows us to avoid this step and to facilitate the procedure.

yChEFs has been used to characterize the chromatin-associated proteome, identifying 750 proteins, many of them being proteins described in as binding to chromatin in *S. cerevisiae* and other organisms, including histones and histone variants (Boulard et al. ., 2007). Those proteins correspond mainly to functional categories (biological processes) related with chromatin (assembly and disassembly, remodeling, organization and modification of chromatin) and transcription or processing of RNA, among others (Table 1 of the paper).

SUMMARY

This procedure has allowed us to also characterize the RNA-dependent chromatin-associated proteome. We identified 554 proteins, among them about 200 whose association with the chromatin is clearly dependent on RNA. Those correspond mainly with functional categories related with RNA processing, transcription, metabolism of ncRNA, nucleosomes and chromatin remodeling (Table 2 of the paper). Among these proteins, notably, we found subunits of the 3 RNA polymerases and proteins involved in mRNA degradation, such as Dcp2, Xrn1, Dhh1 and Pbp1.

This method has been compared with other previously described techniques (Carrillo et al., 2010; Lambert et al., 2010) used for chromatin-associated proteins isolation. The comparison with the method of Carrillo and collaborators show 76% overlapping. The comparison with the interactome described by Lambert and collaborators, showed also an important coincidence.

Taking together, our data validates the method yChEFs as a good technique for the analysis of chromatin-associated proteins in *S. cerevisiae*, allowing also to identify weakly or transiently chromatin-bound proteins.

INFLUENCE OF Bud27 ON THE mRNA LIFE CYCLE

Bud27 (whose orthologue in humans is URI/RMP) is an unconventional prefoldin acting as chaperone in an ATP-independent pathway (Gstaiger et al., 2003). Bud27 mediates the cytoplasmic assembly of the three RNA pols in an Rpb5-dependent manner in *S. cerevisiae* (Mirón-García et al., 2013) and participates in the transcription elongation mediating the correct association and/or function of the remodeling complex of RSC chromatin to RNA pol II (Mirón-García et al., 2014). Similarly, the association between Bud27 and RSC and their relationship with the RNA pol III have been determined (Vernekar and Bhargava, 2015). In addition, URI and Bud27, in humans and yeast, participate in TOR pathway (for "target of Rapamycin") (Gstaiger et al., 2003).

In this work we have demonstrated the role of Bud27 in the mRNA life cycle by positively modulating the mRNA stability; the inactivation of Bud27 leads to an increase in mRNA degradation rate (Figure B1 and B4, Table B1). The lack of Bud27 seems to provoke

a homeostatic cellular response. In fact mRNA accumulation does not correspond with the overall decrease in mRNA stability, and global mRNA amount is similar to this in a wild-type strain (Figure B2 and B5).

Bud27 and URI ortholog have been related with TOR pathway (Gstaiger et al., 2003). Blocking TOR pathway, leads to mRNA destabilization due to poly(A) tails shortening (Albig and Decker, 2001). Data from our group have shown that *PAB1* overexpression overcomes the thermosensitivity of the *bud27Δ* mutant strain (Figure B18). *PAB1* encodes the Pab1 protein that binds poly(A) tails. In addition Pab1 is related to poly(A) tails size control and participates in mRNA deadenylation (reviewed in (Parker, 2012)). Moreover, one of the reasons causing mRNA instability is the "alternative polyadenylation" (Geisberg et al., 2014).

The polyadenylation profiles caused by lack of Bud27 and by blocking the TOR pathway have been analyzed from RNA-seq data. To do so, training in bioinformatics techniques acquired in the laboratory of Dr. Vicent Pelechano at the Karolinska Institute (Stockholm, Sweden) has been crucial. Previously, transcriptomic analyses of the RNAseq data were performed. Notably, for both, *bud27Δ* mutant and TOR pathway inactivation we found groups of genes related to Gcn4 transcription factor, and to biological processes for translation, nuclear transport, RNA localization, RNA transport and export from the nucleus, and ribosome biogenesis, of, among others (Table B2, B3 and B4).

Our data suggest alternative polyadenylation caused by lack of Bud27 or TOR pathway inactivation (Figure B9). This alteration seems to be more relate to Sth1-dependent genes (Figure B17). On the contrary, no significant variations were observed Gcn4-dependent genes (Figure B17).

In human cells nucleosome positioning can alter the polyadenylation and the recruitment of polyadenylation machinery to nascent mRNA (Jordán-Pla et al., 2014; Luco et al., 2011; McCracken et al. ., 1997). In addition, the importance of polyadenylation on transcription termination mediated by RNA pol II has been demonstrated (Gromak et al., 2006; Plant et al., 2005). Notably, our preliminary data suggest the accumulation of RNA pol II around the TTS region (transcription termination site) in the *bud27Δ* mutant. On the

other hand, lack of Bud27 causes an increase in histone occupancy and a decrease in Sth1 occupancy towards the 3' region of the genes (Martínez-Fernández, in preparation). These data and those previously described by our group proposing a tripartite association between Bud27, Rpb5 and Sth1 (RSC component) (Mirón-García et al., 2014), leads us to suggest that lack of Bud27 could cause a defect in nucleosome positioning or in the chromatin dynamic, leading to the alterations in alternative polyadenylation and consequently in mRNA stability.

The parallelism between the effects observed by lack of Bud27 or TOR pathway inactivation, suggest an important role of Bud27 in TOR pathway. Blocking TOR in both *S. cerevisiae* and human cells, decrease the intracellular levels of Bud27 and URI. This could account for the effects shown in the *bud27Δ* mutant (Gstaiger et al., 2003) (Martínez-Fernández, in preparation).

INFLUENCE OF Rtr1 on the mRNA LIFE CYCLE

Rtr1, whose human orthologue is RPAP2, is a CTD phosphatase with a role in the transition from transcription initiation to elongation mediated by the RNA pol II, promoting the dephosphorylation of CTD-Ser5P in the 5' region of the genes prior to its phosphorylation in CTD-Ser2 (Buratowski, 2009). The lack of Rtr1 causes transcriptional defects, resulting in an accumulation of CTD-Ser5P in the coding region of the genes (Gibney et al., 2008, Mosley et al., 2013). The role of both Rtr1 and RPAP2 in the assembly and transport of the RNA pol II to the nucleus has been suggested (Forget et al., 2013, Gómez-Navarro and Estruch, 2015). A role for Rtr1 favoring the degradation of its own transcript has also been described (Hodko et al., 2016).

In this work we have demonstrated the role of Rtr1 in the mRNA life cycle by modulating negatively mRNA stability. In fact, the absence of Rtr1 causes a decrease in the mRNA degradation rate (Figure R1 and R3, Table R1). The mRNA accumulation observed in the *rtr1Δ* mutant does not correlate with the increase in mRNA stability. This suggests a homeostatic response, probably by decreasing transcription rate (Figure R2 and R4).

The genetic interaction between *RTR1* and *RPB4* and the functional interaction between both proteins have been described (Gibney et al., 2008). The cotranscriptional

imprinting of Rpb4 on mRNAs (Goler-Baron et al., 2008); Collier and Parker, 2005; Lotan et al., 2005), could favor the recruitment of the mRNA degradation machinery (Lotan et al., 2005). Similarly, the absence of Rpb4 causes greater mRNA stability (Garrido-Godino et al., 2016). These data suggest a coordinated role between Rtr1 and Rpb4 modulating mRNA stability. Similarly, the interaction between Rtr1 and Dhh1 (mRNA exonuclease), has been proposed modulating *RTR1* mRNA degradation (Hodko et al., 2016).

Taking these data we propose the existence a coordinated mechanism between Rtr1, Rpb4 and Dhh1 to modulate mRNA stability, probably through their association with mRNA. In this work, it has been shown that, in the absence of Rtr1, the levels of Rpb4 associated with mRNA decrease, with no Dhh1 alteration. In addition, the absence of Rpb4 led to a decrease in the level of Rtr1 and Dhh1 associated with mRNA, while the absence of Dhh1 causes a decrease in the level of Rtr1 and Rpb4 associated with mRNA. We propose a similar co-transcriptional mRNA imprinting for Rtr1 and Dhh1 than this observed for Rpb4 (Collier and Parker, 2005, Goler-Baron et al., 2008, Lotan et al., 2005). Our results have also shown a parallel behavior between Rtr1, Rpb4 and Dhh1 associated with chromatin and mRNA.

These data suggest that the interaction of these proteins with mRNA could occur in the context of chromatin. Given the role suggested for Rtr1 in the assembly and transport of RNA pol II to the nucleus (Forget et al., 2013; Gómez-Navarro and Estruch, 2015), data of our group showing that Rtr1 inactivation affects assembly of Rpb4 to the RNA pol II (Garrido-Godino, in preparation) and the role of Rpb4 in the mRNA stability, we suggest that the increase in mRNA stability observed in the absence of Rtr1 could occur, indirectly, by the aforementioned assembly defect. Consequently, the co-transcriptional Rpb4-mRNA imprinting would be altered, favoring the decrease in mRNA associated with Rpb4. This scenario could alter the recruitment of the mRNA degradation machinery, increasing the mRNA stability. Similarly, lack of Dhh1, that causes a decrease in Rtr1 levels, could lead to a similar assembly defects affecting mRNA stability. In addition, lack of Dhh1 also leads to a general increase in mRNA stability, by a decrease in mRNA degradation machinery activity. Anyway, we cannot rule out a direct role of Rtr1 in mRNA stability, perhaps through its association with Dhh1 and Rpb4.

Introducción

AATCGCAGT GATCGATT AGCTAGT GACGCTA AATCGCAGT GATCGATT AGCTAGT GACGCTA
ACCRACCTC GTGAGCACTTT CACGAGT GCTCARRCC CCRACCTC GTGAGCACTTT CACGAGT GCTCARRCC

1 MECANISMOS DE TRANSCRIPCIÓN EN EUCARIOTAS: RNA POLIMERASAS

1.1 Transcripción

La transcripción es un proceso altamente regulado mediante el cual se obtiene una molécula de RNA a partir de DNA. Las principales proteínas responsables de este proceso son las RNA polimerasas (RNA pols) en coordinación con una compleja maquinaria transcripcional compuesta por numerosos factores entre los que se encuentran factores de transcripción, reguladores transcripcionales y remodeladores de cromatina, entre otros.

Las RNA pols son enzimas heteromultiméricas dependientes de DNA, muy conservadas evolutivamente, presentes tanto en eucariotas, como en arqueas, bacterias y algunos virus (Werner and Grohmann, 2011; Werner et al., 2009). Sin embargo, mientras que en arqueas y bacterias existe un único tipo de RNA pol, en eucariotas se diferencian tres tipos de RNA pols diferenciadas fundamentalmente entre sí por la especificidad de los RNA que transcriben (Cramer et al., 2008). En plantas se ha descrito la existencia de otras dos RNA pols multiméricas: la RNA pol IV y V (Haag and Pikaard, 2011; Lahmy et al., 2010).

La RNA pol I sintetiza el RNA pre-ribosomal 35S. La actividad transcripcional de la RNA pol I supone el 60% de la transcripción nuclear (Warner, 1999), y el RNA ribosómico producido supone el 75% del RNA total (Warner, 1999; Werner et al., 2009). Este RNA madura dando lugar a los rRNA 28/25S (este último en levaduras), 18S y 5,8S (revisado en (Houseley and Tollervey, 2009)).

La RNA pol II es la que transcribe la mayor parte del genoma, aunque su contribución a la cantidad total de RNA presente en la célula es menor del 10% (Werner et al., 2009). Sintetiza los mRNA (RNA mensajeros) y otros transcritos no codificantes como los snoRNA (*small nucleolar RNA*), snRNA (*small nuclear RNA*), otros RNA no codificantes de mayor longitud o lncRNAs (*long non-coding RNAs*), piRNAs (*piwi-interacting RNAs*) y pequeños RNAs de interferencia (siRNAs) (revisado en (Kornienko et al., 2013)). Por último se ha descrito su papel en la transcripción de transcritos CUT (*cryptic unstable transcripts*), SUT (*stable unannotated transcripts*) y XUT (*Xrn1-sensitive unstable transcripts*) (Houseley and Tollervey, 2009; Van Dijk et al., 2011; Xu et al., 2009).

La RNA pol III transcribe el 15% del RNA total (Werner et al., 2009), produciendo el rRNA 5S, RNA transferentes (tRNA) y otros pequeños RNAs no codificantes, entre los que se encuentra el RNA U6 que participa en el proceso de *splicing*, donde se corta y ensambla el RNA para la eliminación de los intrones. Con la misma función encontramos en eucariotas superiores el RNA 7SK (Dieci et al., 2007). En muchos casos estos pequeños RNAs no codificantes son útiles como guía para la metilación de los rRNA, tal y como ocurre con SnR52 en levaduras (Dieci et al., 2013). Otro RNA que transcribe la RNA pol III en células de mamíferos es el RNA 7SL, un componente del complejo de ribonucleoproteína de partículas de reconocimiento de señal (SRP) (Dieci et al., 2013).

Las RNA pols IV y V en plantas (también denominadas RNA pols nucleares D y E) sintetizan los precursores de RNAs pequeños de interferencia (siRNA) que funcionan específicamente en el silenciamiento génico (Haag and Pikaard, 2011; Wierzbicki, 2012). También ha sido descrito que la RNA pol V sintetiza RNAs no codificantes largos relacionados con metilación del DNA, cuya función podría estar relacionada con el desarrollo y respuesta a cambios ambientales (Wierzbicki, 2012).

1.2 Organización y composición de las RNA pols

Las RNA pol I, II y III están constituidas por 14, 12 y 17 subunidades, respectivamente (Tabla I1). Las tres están formadas por un esqueleto conservado de 12 polipéptidos, 11 de los cuales tienen sus homólogos en la RNA pol de arqueas (Langer et al., 1995).

Las subunidades de las RNA pols se pueden dividir en varios grupos:

- El esqueleto base, cuya composición es de 5 polipéptidos de tipo $\beta\beta'\alpha 2\omega$, está implicado en la actividad catalítica. Su estructura es homóloga a la de la RNA pol de bacterias y arqueas.
- Seis polipéptidos propios de eucariotas y arqueas: Rpb5, Rpb10, Rpb12, así como Rpb4, Rpb7 y Rpb9 y sus respectivos homólogos en las RNA pol I (Rpa14, Rpa43, Rpa12, respectivamente) y RNA pol III (Rpc17, Rpc25 y Rpc11, respectivamente).

Existen 5 subunidades comunes a las tres RNA pols: Rpb5, Rpb6, Rpb8, Rpb10 y Rpb12, siendo Rbp5 la única no intercambiable entre levaduras y humanos (Cuevas-Bermudez, 2018; Zaros et al., 2007). Además, la subunidad Rpb8, considerada específica de eucariotas, presenta un ortólogo en arqueas, concretamente en Crenarqueas, denominada proteína G (Koonin et al., 2007).

Bacterias	Arqueas	Eucariotas				
		RNA pol I	RNA pol II	RNA pol III	RNA pol IV (plantas)	RNA pol V (plantas)
β	Rpo1 (RpoA)	RPA190	RPB1	RPC160	NRPD1	NRPE1
β	Rpo2 (RpoB)	RPBA135	RPB2	RPC128	NRPD/E2	NRPD/E2
α	Rpo3 (RpoD)	RPAC40	RPB3	RPAC40	RPB3 [1]	RPB3 [1]
α	Rpo11 (RpoL)	RPAC19	RPB11	RPAC19	RPB11	RPB11
ω	Rpo6 (RpoK)	RPB6	RPB6	RPB6	RPB6 [1]	RPB6
	Rpo5 (RpoH)	RPB5	RPB5	RPB5	RPB5 [3]	NRPE55
	Rpb8 (RpoG)*	RPB8	RPB8	RPB8	RPB8 [1]	RPB8 [1]
	Rpo10 (RpoN)	RPB10	RPB10	RPB10	RPB10	RPB10
	Rpo12 (RpoP)	RPB12	RPB12	RPB12	RPB12	RPB12
	Rpo4 (RpoF)	RPA14	RPB4	RPC17	NRPD/E4	NRPD/E4
	Rpo7(RpoE)	RPA43	RPB7	RPC25	NRPD7 [1]	NRPE7
		RPA12	RPB9	RPC11	NRPD9b	RPB9
	Rpo13*					
		RPA49		RPC53		
		RPA34.5		RPC37		
				RPC82		
				RPC34		
				RPC31		

Tabla I1: Composición de las RNA pols en bacterias, arqueas y eucariotas. La subunidad “Rpo13” y “RpoG”, no se han encontrado en la totalidad de las arqueas. Los números entre corchetes indican la frecuencia de dichas subunidades en la RNA pol IV y V. Las subunidades comunes a las tres RNA pols se muestran en un cuadrado. Existen diferentes nombres para subunidades comunes de levadura: Rpb5: ABC27; Rpb6: ABC23 o Rpo26; Rpb8: ABC14.5; Rpb10: ABC10 β ; Rpb12: ABC10 α . Tabla extraída de (Cuevas-Bermudez, 2018).

1.3 RNA polimerasa I

La RNA pol I está compuesta por 14 subunidades y tiene un peso molecular de 589 KDa (Fernández-Tornero, 2018; Fernández-Tornero et al., 2013; Russell and Zomerdijk, 2006). El núcleo está constituido por las dos subunidades mayores Rpa190 y Rpa135, constituyendo la hendidura o “*cleft*” que establece la conexión con el DNA. A su vez, está formada por dos módulos, la plataforma o “*shelf*” y grapa o “*clamp*” que se encuentran en el lado opuesto de la hendidura. La plataforma incluye las regiones del pie y la parte de Rpa190 que constituye la hendidura y las subunidades Rpb5 y Rpb6. La grapa comprende esencialmente dominios de Rpa190 con una contribución menor de Rpa135 (Fernández-Tornero, 2018). En contraste con la RNA Pol II, donde la grapa se balancea sobre la plataforma con un papel en regulación transcripcional (Cramer et al., 2001), en la RNA pol I la grapa y plataforma constituyen una unidad rígida (Neyer et al., 2016). El tallo o “*stalk*” de la RNA Pol I, formado por el heterodímero Rpa43/Rpa14, homólogas al heterodímero Rpb4/Rpb7 de la RNA pol II y Rpc17/Rpc25 de la RNA pol III (Siaut et al., 2003; Zaros and Thuriaux, 2005), está estrechamente unido a la plataforma y a la grapa; estos dos módulos y el tallo pueden ser considerados como una sola unidad que pivota respecto al núcleo de la enzima favoreciendo el cierre de la plataforma (Fernández-Tornero et al., 2013; Tafur et al., 2016). Además hay dos elementos estructurales adicionales que son únicos en la RNA Pol I que solo se ordenan en la configuración homodimérica inactiva: la cola C-terminal Rpa43 (residuos 251-326) incluyendo el elemento conector (residuos 262-326) que es esencial para la dimerización enzimática y el expansor en la subunidad Rpa190 (residuos 1337-1439) que incluye el asa que imita al DNA (residuos 1361-1399) bloqueando el sitio de unión de los ácidos nucleicos dentro de la hendidura (Fernández-Tornero, 2018).

La RNA pol I tiene además un heterodímero específico, Rpa49/Rpa34.5, relacionado con el factor de iniciación TFIIF de la RNA pol II y con el subcomplejo de la RNA pol III, Rpc37/Rpc53 (Fernández-Tornero et al., 2013). Además, Rpa49 presenta un dominio *C-terminal tandem winged hélix* (tWH), posiblemente relacionado con el factor de transcripción TFIIE de la RNA pol II (Fernández-Tornero et al., 2013).

La estructura de la RNA pol I, muestra diferencias destacables en la hendidura de unión del DNA (Figura I1), con respecto a las otras RNA pols (Figura I2 e I3), adoptando una conformación mucho más abierta, de 10 Å (Fernández-Tornero et al., 2013).

La RNA pol I está constituida por una fracción dimérica y otra monomérica. El complejo monomérico está implicado en la iniciación de la transcripción y los dímeros, que representan la mayor parte de la RNA pol I aislada, pueden disociarse reversiblemente en monómeros y solo son activos en la síntesis de RNA no específica (Milkereit et al., 1997). El factor de iniciación Rrn3, interacciona fuertemente con la RNA pol I (Milkereit and Tschochner, 1998; Peyroche et al., 2000). Los monómeros libre de la RNA pol I requieren del factor Rrn3 para poder ser reclutados en los promotores e iniciar la transcripción (Keener et al., 1998; Yamamoto et al., 1996). Estudios recientes mediante análisis de criomicroscopía electrónica (cryo-EM) han revelado que la diferencia entre las estructuras monoméricas de la RNA pol I libres y las unidos a Rrn3 a través del tallo (Engel et al., 2016; Torreira et al., 2017) difieren en que los monómeros libres parecen adoptar una estructura flexible y cuando están asociados a Rrn3 adoptan una disposición fija con la excepción de la cola C-terminal Rpa43 (Torreira et al., 2017).

Además, la transición de la disposición inactiva de la RNA pol I a activa requiere al menos dos eventos. En primer lugar, los dímeros de la enzima deben disociarse para producir monómeros. Y en segundo lugar, los monómeros de la RNA pol I necesitan unirse a Rrn3 para ser reclutado a los promotores. Rrn3 contacta con la enzima en ambas subunidades del tallo, Rpa43 y Rpa14, así como con Rpa190 y el heterodímero Rpac40 / Rpac19 (Engel et al., 2016; Torreira et al., 2017), cuya interacción se ve regulada por procesos de fosforilación y defosforilación de los monómeros de la RNA pol I y Rrn3, ocupando un área similar al mediador en la RNA pol II (Fernández-Tornero, 2018).

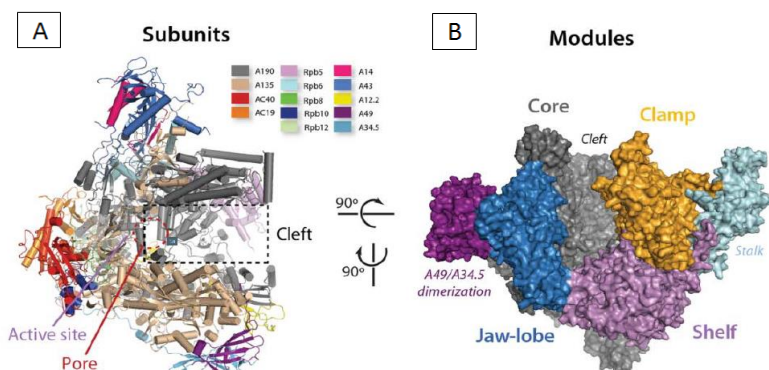


Figura 11: Disposición estructural de la RNA pol I. A) Disposición de las 14 subunidades que constituyen la RNA pol I. **B)** Se muestra los cuatro módulos definidos para la RNA pol II (Cramer et al., 2001), así como el tallo o “stalk” y la región de dimerización A49/A34.5. Imagen extraída de (Fernández-Tornero, 2018).

1.4 RNA polimerasa III

La RNA pol III, de las tres RNA pols de la mayoría de eucariotas, es la más grande y compleja. Está constituida por 17 subunidades con una masa molecular de unos 700 kDa (Figura I2). De las 10 subunidades que constituyen el núcleo de la enzima, Rpc160 y Rpc128 son las dos subunidades mayores, mostrando una gran homología con las subunidades de la RNA pol II, Rpb1 y Rpb2, y de la RNA pol I, Rpa190 y Rpa135, respectivamente, constituyendo la hendidura de unión al DNA que forma el sitio activo de la enzima. La subunidad Rpc11 es específica de la RNA pol III, aunque se ha descrito homología con la subunidad Rpb9 de la RNA pol II involucrada en la elongación de la transcripción y con el factor de elongación TFIIS (RNA pol II) que participa en la escisión del fragmento sobrante de RNA tras la parada y marcha atrás de la enzima (*backtracking*) (Awrey et al., 1997; Fernández-Tornero et al., 2011; Fernández-Tornero et al., 2007; Jasiak et al., 2006).

El subcomplejo Rpc17/Rpc25, que corresponde a las subunidades Rpb4 / Rpb7 de la RNA pol II y a las subunidades Rpa14/Rpa43 de la RNA pol I constituye un tallo que sobresale del núcleo de la polimerasa en el lado de Rpc160. Este subcomplejo es esencial para el inicio de transcripción, así como para la interacción con el RNA naciente (Dezélée et al., 1976; Fernández-Tornero et al., 2011; Jasiak et al., 2006; Siaut et al., 2003; Zaros and Thuriaux, 2005).

Presenta cinco subunidades específicas (Rpc31, Rpc34, Rpc37, Rpc53 y Rpc82) que se organizan en dos subcomplejos distintos. Un subcomplejo lo forma el heterodímero Rpc37/Rpc53, equivalente al heterodímero Rpa49/Rpa34.5 de la RNA pol I y relacionado con el factor de iniciación TFIIF (Archambault et al., 1997; Carter and Drouin, 2009; Fernández-Tornero et al., 2010; Kuhn et al., 2007), que interacciona con el DNA participando en todo el proceso transcripcional. El otro subcomplejo corresponde al heterodímero Rpc31/Rpc82/Rpc34, con cierta homología al factor de transcripción TFIIE e involucrado en la iniciación de la transcripción (Carter and Drouin, 2009; Fernández-Tornero et al., 2010; Werner et al., 2009). Las subunidades específicas Rpc82 y Rpc34 también podrían interaccionar con el DNA (Hoffmann et al., 2015). Recientemente se ha

descrito que la subunidad Rpc82 se extiende sobre la estructura de la grapa, permitiendo una conexión entre el módulo tallo y grapa (Hoffmann et al., 2016).

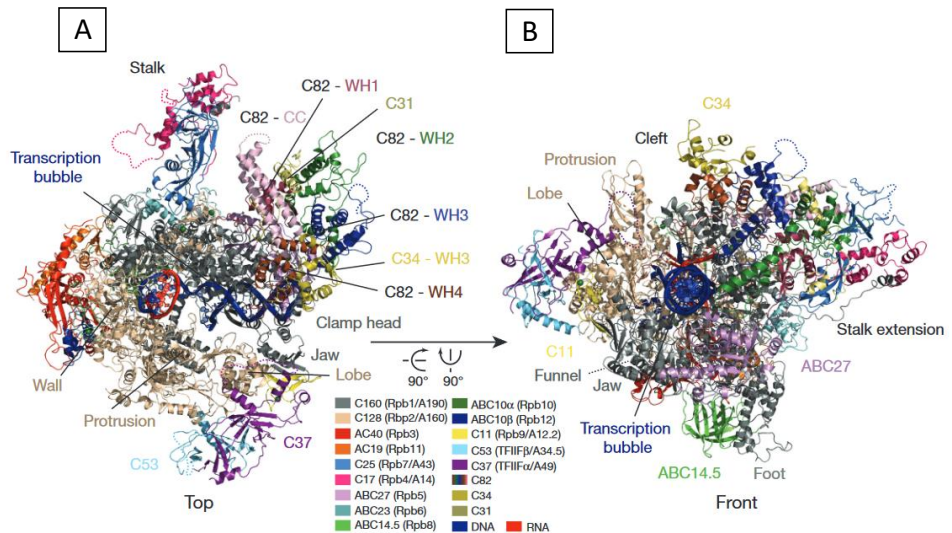


Figura 12: Estructura cristalográfica de la RNA pol III. Se muestra desde una perspectiva superior (A), y desde una perspectiva frontal (B). En discontinuo se muestran regiones no incluidas en el modelo. En azul, se muestra el DNA molde situado en el centro activo de la enzima. (Hoffmann et al., 2015).

1.5 RNA polimerasa II

La RNA pol II sintetiza todos los RNA mensajeros de la célula además de otros RNA no codificantes. Está constituida por 12 subunidades con una masa total de unos 514 kDa (Figura I3). La maquinaria de transcripción que engloba la RNA pol II es la más compleja, y a su vez, estudiada de las tres RNA pols y está constituida por numerosos factores generales de transcripción, co-reguladores, activadores y represores específicos (Hahn, 2004).

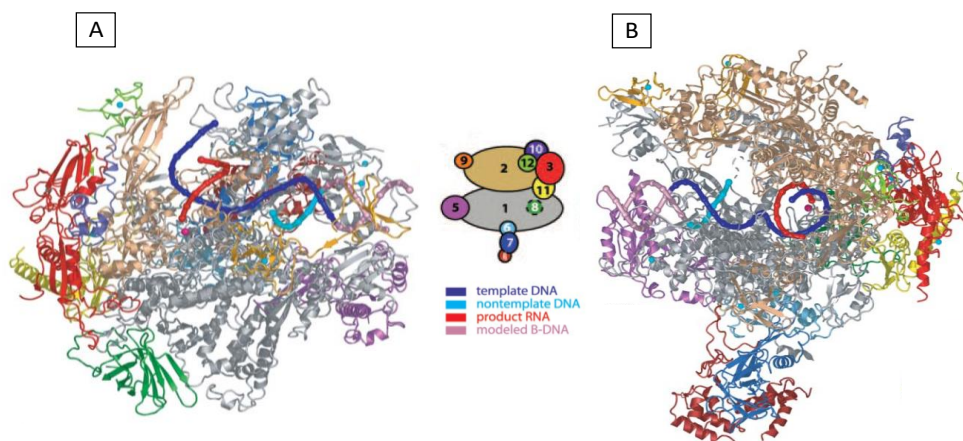


Figura I3: Estructura cristalográfica de la RNA pol II en elongación. Se observa una visión superior (A) y una visión frontal (B). La línea azul en el centro activo de la enzima corresponde al DNA molde y la línea roja, igualmente localizada, corresponde al RNA que se está sintetizando. El código de colores se muestra en el esquema de las subunidades situado entre las dos figuras (Cramer, 2004).

Del conjunto de las 12 subunidades que la constituyen, únicamente Rpb4 y Rpb9 son dispensables para la viabilidad celular (Woychik et al., 1990). Rpb4/7 constituye un heterodímero dissociable del conjunto (Armache et al., 2003; Bushnell et al., 2004; Cramer et al., 2000; Cramer et al., 2001). El núcleo de la enzima está conformado por cuatro módulos móviles: núcleo o “core”, plataforma, garra-lóbulo o *jaw lobe* y grapa, que lo constituyen las dos subunidades mayores, Rpb1 y Rpb2 (centro activo de la enzima) y además las subunidades, Rpb3, Rpb10, Rpb11 y Rpb12 implicadas en el ensamblaje del complejo (Cramer et al., 2001). El módulo garra-lóbulo o “*jaw-lobe*”, constituye la garra superior, formada por las regiones de Rbp1 y Rpb9 y el lóbulo de Rpb2. El módulo plataforma contiene la garra inferior (un dominio de Rbp5), el dominio de ensamblaje de Rbp5, Rpb6 y las regiones del pie (*foot*) y hendidura de Rpb1. Por último, el módulo grapa está formado por regiones de Rpb1 y regiones de Rpb2 (Cramer et al., 2001) (Tabla I2).

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

Tabla I2: Regiones conservadas de la RNA pol II. El * corresponde a los dominios de la RNA pol II definidos por Cramer y colaboradores (Cramer, 2004). El doble ** define los residuos de los dominios conservados descritos por (García-López et al., 2011). Los números indican las siguientes referencias donde se define cada factor transcripcional: 1 {(Kettenberger et al., 2003), 2 (Leuther et al., 1996), 3 (Kostrewa et al., 2009), 4 (Bushnell et al., 2004), 5 (Suh et al., 2010) y 6(García-López et al., 2011).

Las subunidades mayores Rpb1 y Rpb2 forman un canal que conduce hasta el centro activo, finalizando en una pared que bloquea el paso. El canal se ve atravesado por un poro por debajo del centro activo permitiendo la salida del RNA sintetizado. El módulo grapa, se encuentra en uno de los laterales del canal permitiendo una disposición abierta en la estructura del núcleo cuando aún no se han asociado al complejo el heterodímero Rpb4/7, lo que favorece la entrada del DNA para su transcripción (Cramer, 2004). Una vez dispuesto el DNA para transcripción, la asociación de dicho heterodímero cambia la conformación, cerrando el complejo y contribuyendo a la elongación de la transcripción y procesividad de la enzima (Allepuz-Fuster et al., 2014; Cramer et al., 2001; Garavís et al., 2017; Gnatt et al., 2001; Mirón-García et al., 2013). Además, hay datos que sugieren que el módulo grapa presenta una conformación cerrada ya en la iniciación de la transcripción (Cramer, 2004; Cramer et al., 2001). Recientemente se ha descrito que Rpb4/7 podría tener una relación funcional con Rpb5 y la asociación del factor de elongación Spt5/4 para el paso de la iniciación a la elongación de la transcripción (Martínez-Fernández et al., 2018).

En nuestro grupo de investigación se han descrito regiones o dominios conservados en la RNA pol II de todos los eucariotas, sin homología en las RNA pol I y III, ni tampoco en la RNA pol de arqueas, ni de bacterias (García-López et al., 2011). Estos dominios se encuentran en la superficie de dichas subunidades, previamente descritas (Cramer et al.,

2001; García-López et al., 2011), siendo zonas potenciales de interacción con factores transcripcionales. En este sentido, se han descrito interacciones de los dominios conservados de la pared y *dock* con TFIIB (Bushnell et al., 2004; Kostrewa et al., 2009). El dominio conservado de la garra interacciona con el factor de transcripción TFIIS (Kettenberger et al., 2003) y TFIIE (Leuther et al., 1996), que también interacciona con el dominio conservado del embudo (Kettenberger et al., 2003). Por último, se han descrito diversas interacciones con el dominio conservado del pie de la RNA pol II. Por un lado, una interacción física con el componente Ceg1 de la enzima de *capping* del mRNA (Suh et al., 2010) y con Mvp1 y Spo14, dos nuevos reguladores transcripcionales implicados en la iniciación y/o elongación temprana de la transcripción (García-López et al., 2011).

1.5.1 El dominio carboxilo-terminal de Rpb1 (CTD)

La subunidad mayor de la RNA pol II, Rpb1, contiene un dominio carboxilo terminal (CTD), no presente en la RNA pol I ni III. El CTD es un dominio largo y flexible, constituido en su mayor parte por un heptapéptido (Y₁S₂P₃T₄S₅P₆S₇) repetido, en tándem. El número de repeticiones varía dependiendo del organismo y está presente en animales, plantas, levaduras y un amplio número de protistas (Corden, 1990; Liu et al., 2008; Liu et al., 2010a).

En *S. cerevisiae* el dominio CTD tiene una longitud de 650 Å y su estructura presenta una conformación extendida, localizándose próximo al canal de salida del RNA recién sintetizado (Figura I4). El CTD sufre continuas modificaciones postraduccionales, claves para coordinar el proceso de transcripción, así como procesos cotranscripcionales tales como la adición de la caperuza 5' al mRNA, procesos de poliadenilación y *splicing*, sirviendo como plataforma para el reclutamiento de enzimas y proteínas implicadas en estos procesos (Allepuz-Fuster et al., 2014; Bentley, 2014; Egloff and Murphy, 2008; Hirose and Ohkuma, 2007; Meinhart et al., 2005; Muñoz et al., 2010; Phatnani and Greenleaf, 2006).

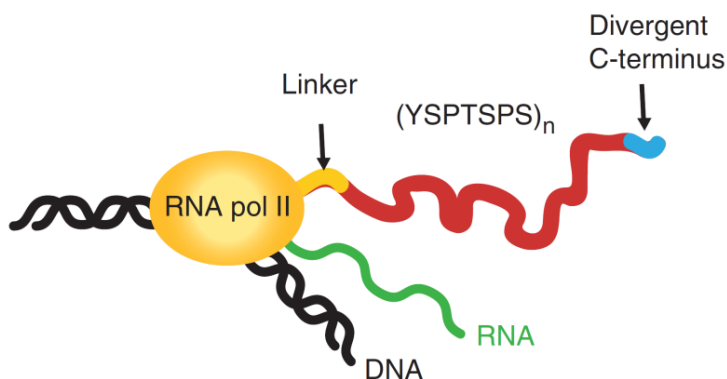


Figura I4: Representación esquemática del dominio carboxi-terminal (CTD), que forma parte de la subunidad Rpb1 de la RNA pol II. Imagen extraída de (Jasnovidova and Stefl, 2013).

Estas modificaciones postraduccionales del CTD incluyen fosforilación, ubiquitilación (Li et al., 2007), metilación (Sims et al., 2011), glicosilación (Comer and Hart, 2001; Kelly et al., 1993; Ranuncolo et al., 2012), acetilación e isomerización *cis-trans* de residuos de prolina (Lu et al., 2007). La fosforilación es el proceso más estudiado, mostrándose modificación en cinco de los siete residuos que constituye el heptapéptido (Y₁, S₂, T₄, S₅, y S₇) (Allepuz-Fuster et al., 2014; Aristizabal and Kobor, 2016; Calvo and García, 2012).

La fosforilación de las serinas 2, 5 y 7 están relacionadas con los procesos de iniciación, elongación y terminación de la transcripción, así como con el procesamiento de RNAs codificantes y no codificantes, entre otros (Calvo and García, 2012; Maniatis and Reed, 2002; Moore and Proudfoot, 2009). Los niveles de fosforilación del CTD-Ser5P son mayores en la región promotora durante el inicio de la transcripción, mientras que a medida que se avanza hacia la elongación, se desfosforila disminuyendo los niveles de CTD-Ser5P, tal y como se observa en la figura I5. También la fosforilación en Ser7 comienza en la iniciación temprana de la transcripción y se mantiene hasta la terminación. La fosforilación de CTD-Ser5 y CTD-Ser7, en la elongación temprana, es llevada a cabo por la quinasa Kin28/Cdk7, subunidad de TFIIF, y estimulada por el mediador, que interacciona con la misma (Boeing et al., 2010). Por su parte Srb10, subunidad del mediador, también participa en la fosforilación del CTD-Ser5 (Galbraith et al., 2010). La fosforilación del CTD-

INTRODUCCIÓN

Ser5 está ligada al reclutamiento de la maquinaria de *capping* al inicio de la transcripción (Cho et al., 1997; McCracken et al., 1997), así como a procesos de remodelación de cromatina y modificación de histonas (Heidemann et al., 2013). Las fosfatasa Ssu72 y Rtr1/RPAP2 son las encargadas de desfosforilar el CTD-Ser5 para favorecer el paso a la elongación de la transcripción. Rtr1 actúa en la fase temprana de la elongación, mientras que Ssu72 actúa en los residuos remanentes aún fosforilados en el resto de la elongación (Buratowski, 2009), así como en el procesamiento del extremo 3' de los mRNA nacientes, en el proceso de corte y poliadenilación (Dichtl et al., 2002; He et al., 2003; Krishnamurthy et al., 2004; Steinmetz and Brow, 2003; Xiang et al., 2010). La fosforilación del CTD-Ser2 en levaduras esta mediada mayoritariamente por la quinasa Ctk1 y estimulada por Bur1, fosforilando a Ctk1 (Liu et al., 2009; Qiu et al., 2009), que actúa favoreciendo la asociación de factores de poliadenilación y terminación de la transcripción (Ahn et al., 2004). Al final de la transcripción las fosforilaciones del CTD en Ser2, Ser5 y Ser7 están implicadas en el reciclaje de la RNA polimerasa II y reclutamiento de nuevo al promotor reiniciando el ciclo transcripcional (Zhang et al., 2012). Finalmente, una vez terminada la transcripción, los residuos del CTD-Ser2, CTD-Ser5 y CTD-Ser7 fosforilados son desfosforilados por las fosfatasa Fcp1/SCP1 y Ssu72 (Cho et al., 2001; Krishnamurthy et al., 2004; Svejstrup et al., 1997; Zhang et al., 2012).

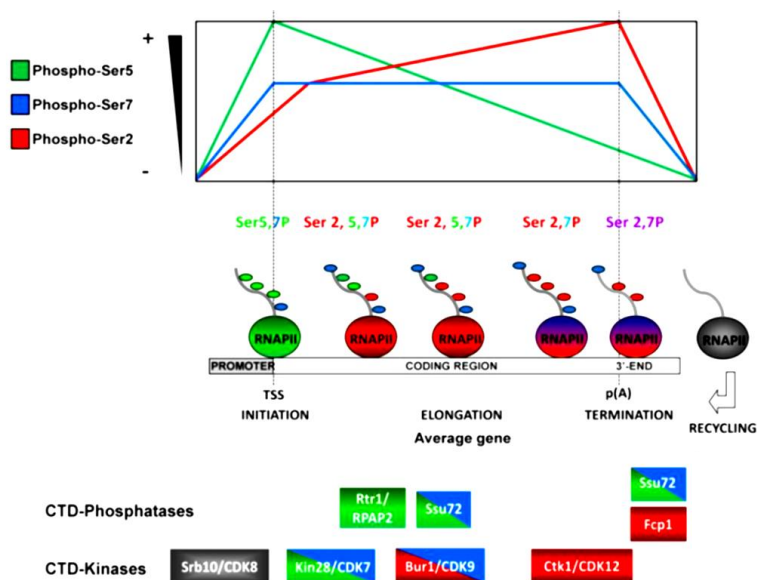


Figura I5: Perfil de fosforilación de las Serinas 2, 5 y 7 del CTD de la RNA pol II en *Saccharomyces cerevisiae*. Se muestran las quinasas y fosfatasa, cuya implicación en el proceso viene determinada por un código de colores. Imagen extraída de (Calvo and García, 2012).

1.5.2 Rtr1/RPAP2, fosfatasa del CTD

Rtr1, y su ortólogo RPAP2, han sido descritas como las fosfatasa del CTD con un papel fundamental en la transición de la iniciación a la elongación de la transcripción, promoviendo la desfosforilación de CTD-Ser5P en la región 5' de los genes, y a su vez, favoreciendo la fosforilación del CTD-Ser2. La ausencia de Rtr1 conlleva acumulación de CTD-Ser5P en la región codificante de los genes (Gibney et al., 2008; Mosley et al., 2013). Se ha descrito una interacción genética de *RTR1* con los genes *RPB4* y *RPB9* que codifican las subunidades Rpb4 y Rpb9 de la RNA pol II (Gibney et al., 2008), y una interacción física de la proteína RPAP2 con la subunidad Rpb6 en células humanas (Wani et al., 2014). Estudios por espectrometría de masas muestran la asociación de RPAP2 a la RNA pol II (Forget et al., 2013). La inactivación de RPAP2 provoca un incremento de los niveles de CTD-Ser7P *in vivo* afectando a la expresión de los snRNA (Egloff et al., 2007). Se ha propuesto un modelo por el cual el reclutamiento de RPAP2 al CTD de la RNA pol II en los genes de snRNA humanos, tanto *in vivo* como *in vitro*, está acoplado a la fosforilación de CTD-Ser7, que ocurre tras la fosforilación en CTD-Ser5. Esta asociación de RPAP2 recluta al complejo integrador y desfosforila los residuos de CTD-Ser7P (Egloff et al., 2012). También se ha implicado a Rtr1 en la desfosforilación del residuo Tyr1P del CTD, apoyando el papel de Rtr1 en promover la transición de la iniciación a la elongación de la transcripción (Hsu et al., 2014). El papel de Rtr1 como fosfatasa directa del CTD ha sido cuestionado (Xiang et al., 2012), considerándose la posibilidad de que realmente su papel sea el de favorecer la función de Ssu72, fosfatasa principal encargada de la transición CTD-Ser5P/CTD-Ser2P en el paso de la iniciación a la elongación de la transcripción (Rosado-Lugo and Hampsey, 2014). Sin embargo, se ha sugerido que, tanto la eliminación de Rtr1 (Mosley et al., 2009), como la falta de Ssu72 (Rosado-Lugo and Hampsey, 2014) ocasionan defectos en la defosforilación de la CTD-Ser5P en el extremo 5', funcionando de manera no redundante (Rosado-Lugo and Hampsey, 2014).

El análisis estructural de Rtr1 en *Kluyveromyces lactis* ha mostrado carencia de actividad catalítica y sugieren la falta de un centro activo definido (Figura I6) (Xiang et al., 2012). Sin embargo, estudios recientes en *S. cerevisiae* sí identifican un sitio activo atípico con actividad fosfatasa (Irani et al., 2016).

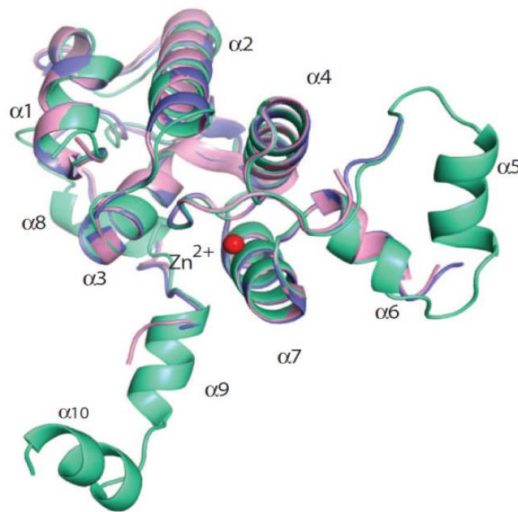


Figura I6: Estructura cristalográfica de Rtr1. Superposición de la estructura de *K. lactis* (violeta y magenta) y la estructura de Rtr1 de *S. cerevisiae* (verde) (Irani et al., 2016).

Recientemente se ha implicado a Rtr1 en la modulación de la estabilidad de su propio transcrito y del transcrito del gen *BMH2*, incrementándose su estabilidad en cepas carentes de Rtr1 (Hodko et al., 2016). Además se ha descrito una asociación física y funcional entre Rtr1 y la exonucleasa de RNA Dhh1, y la ausencia de ambas supone un incremento más acusado de la estabilidad de dichos transcritos. Este proceso podría implicar un papel común entre el complejo de exonucleasas Rtr1, Dhh1 y REX (Hodko et al., 2016; Smith-Kinnaman et al., 2014).

RPAP2 es necesario para el importe de la RNA pol II al núcleo, provocando su silenciamiento una acumulación de la enzima en el citoplasma (Forget et al., 2013). Por otro lado, en levaduras se ha demostrado también el importante papel de Rtr1 en el transporte de ciertas subunidades de la RNA pol II al núcleo (Rpb1, Rpb2, Rpb3 y Rpb11) (Gómez-Navarro and Estruch, 2015).

Estudios proteómicos muestran que Rtr1 interacciona con la RNA pol II hiperfosforilada carente del dímero Rpb4/7 (Mosley et al., 2013). El interactoma de Rtr1 confirma que Rpb4 y Rpb7 no copurifican significativamente con Rtr1 y que esta interacciona principalmente con el núcleo de 10 subunidades de la RNA pol II sin dímero Rpb4/7 (Smith-Kinnaman et al., 2014). De igual modo, estudios de la RNA pol II, a partir de 30

una purificación de Rtr1, detectan niveles más bajos de Rpb4/7 respecto al resto de la enzima (Mosley et al., 2013)

1.6 Ensamblaje y transporte al núcleo de las RNA polimerasas

La biogénesis de las RNA pols ha sido un tema clave de estudio en los últimos años. Sin embargo, para un completo entendimiento del proceso de ensamblaje de las RNA pols, se ha necesitado del conocimiento previo del ensamblaje de la RNA pol bacteriana (Figura I7). Este complejo empieza con la formación del dímero $\alpha\alpha$, que interactúa con la subunidad β . Finalmente se une la subunidad β' , posiblemente formando un complejo con la subunidad ω ; esta asociación no parece esencial y se le asigna la función de estabilizar a la subunidad β' (Minakhin et al., 2001). La subunidad β' y β constituyen el centro activo de la RNA pol bacteriana (Bushnell et al., 2002; Wild and Cramer, 2012; Zhang et al., 1999).

En base a los estudios de ensamblaje de la RNA pol bacteriana se sugiere que en el caso de la RNA pol II en eucariotas, el proceso comienza con la formación del subcomplejo Rpb3 (Rpb3, Rpb10, Rpb11 y Rpb12) correspondiente al dímero $\alpha\alpha$. Sucesivamente se ensambla el subcomplejo Rpb2 (Rpb2 y Rbp9), correspondiente a la subunidad β , y finalmente se asociaría el subcomplejo Rpb1 (Rpb1, Rpb5, Rpb6 y Rpb8), correspondiente a la subunidad β' . Posteriormente se unirá el dímero Rpb4/7 en regiones periféricas al complejo (Wild and Cramer, 2012) (Figura I7).

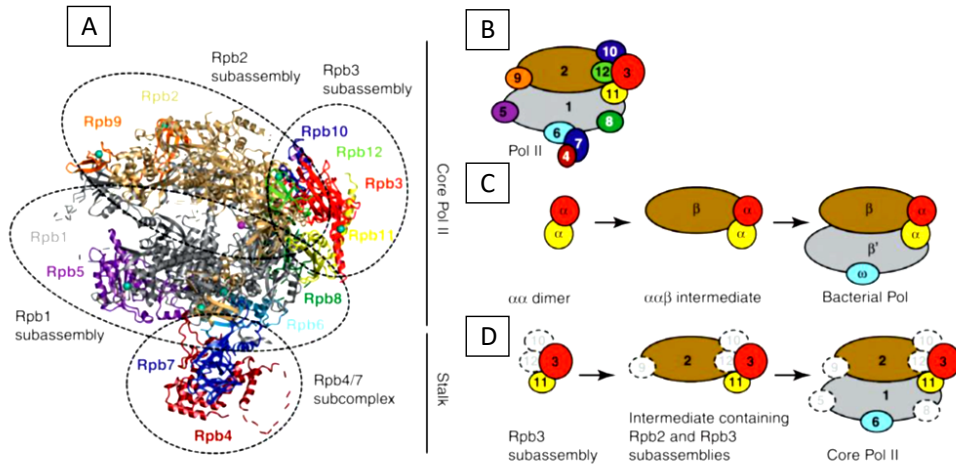


Figura 17: Esquema del ensamblaje secuencial de las subunidades de la RNA pol II en eucariotas. A) Estructura cristalográfica de la RNA pol II. Se muestran los subcomplejos de ensamblaje. **B)** Esquema de la organización la RNA pol II. **C)** Secuencia de ensamblaje de las subunidades de la RNA pol en bacterias. **D)** Modelo sugerido de la asociación secuencial de las subunidades de la RNA pol II en eucariotas. Imagen extraída de (Wild and Cramer, 2012).

Se ha propuesto, a partir de datos con células humanas, que el ensamblaje de la RNA pol II ocurre en el citoplasma previo a su transporte al núcleo (Boulon et al., 2010). Además, para que las subunidades mayores de la RNA pol II (Rpb1 o Rpb2) se importen al núcleo adecuadamente, cada una necesitan de la otra (Gómez-Navarro and Estruch, 2015). En humanos también se ha propuesto que el ensamblaje de la enzima RNA pol II se estabiliza por varios factores de ensamblaje (Rtp1, RPAP (1,2 y 4), GPN (2,3 y 1), R2TP, HSP90, complejo CCT y microtúbulos) (Boulon et al., 2010; Jeronimo et al., 2007). En *S. cerevisiae*, la RNA pol II ensamblada, posiblemente unida a algunos factores de ensamblaje, se une a Iwr1, que facilita su importe al núcleo por el complejo importina α/β a través del poro nuclear (NPC). La liberación de los factores de ensamblaje y transporte en el núcleo puede estar acoplada a la iniciación de la transcripción. La salida del núcleo de los factores de ensamblaje y transporte se puede producir por diferentes vías dependiendo de proteínas específicas: Crm1 o Xpo1, entre otras (Cloutier and Coulombe, 2010; Forget and Chartrand, 2011; Minaker et al., 2013; Mirón-García et al., 2013).

No existen muchos datos sobre el ensamblaje de las RNA pol I y III, aunque se ha demostrado que la proteína *prefoldin-like* Bud27 media este proceso para las tres enzimas en *S. cerevisiae*, de manera dependiente de Rpb5 y previo a su entrada al núcleo (Mirón-García et al., 2013). De igual manera, recientemente se ha descrito la participación de la proteína Bud27 en el ensamblaje de la de las subunidades mayores de la RNA pol III, Rpc160 y Rpc128 (Vernekar and Bhargava, 2015) y de Rbs1 en el ensamblaje de esta misma polimerasa y su translocación al núcleo (Cieśla et al., 2015).

2. LA TRANSCRIPCIÓN MEDIADA POR LA RNA POL II

El proceso transcripcional de la RNA pol II se puede desglosar en cuatro etapas: pre-iniciación, iniciación, elongación y terminación (Shandilya and Roberts, 2012).

2.1 Pre-iniciación e iniciación de la transcripción

La transcripción de los genes codificantes la realiza la RNA pol II. Para ello, en primer lugar, esta se asocia al promotor, aunque requiere de un conjunto de factores, denominados factores generales de transcripción (GTFs: del inglés “*General Transcription Factors*”) (Tabla I3). Al conjunto de este complejo se le denomina complejo de preiniciación o PIC (del inglés “*preinitiation complex*”).

El reconocimiento del promotor por parte de la RNA pol II y la correcta asociación de los factores GTFs se ven dificultados por el enrollamiento que presenta la cromatina. Para facilitar la formación del complejo PIC se requiere de una serie de remodeladores de cromatina que facilitan la accesibilidad a la misma. Los organismos eucariotas disponen de complejos remodeladores de cromatina tales como SWI/SNF, SAGA (por Spt-Ada-Gcn5-acetiltransferasa) y RSC (Angus-Hill et al., 2001; Gupta et al., 2016; Mirón-García et al., 2014; Soutourina et al., 2006; Sudarsanam and Winston, 2000).

En *S. cerevisiae* la formación del complejo PIC (Figura I8) es un proceso secuencial que comienza por el reclutamiento de la proteína de unión a TATA, TBP (TATA *binding protein*), en los promotores que contienen la secuencia TATA, a través del complejo SAGA (Sermwittayawong and Tan, 2006) y en los casos en los que los promotores no tienen secuencia TATA consenso, a través de TFIID (Basehoar et al., 2004). TBP favorece la asociación del conjunto de los factores GTFs. Este proceso también está regulado

INTRODUCCIÓN

negativamente por Mot1, que interacciona con TBP o lo redistribuye del promotor por mecanismos tanto dependientes como independientes de ATP (Auble et al., 1994; Darst et al., 2003; Gumbs et al., 2003; Pereira et al., 2001; Sprouse et al., 2006), y por NC2, cuya asociación con TBP es dependiente de DNA (Kamada et al., 2001; Peiro-Chova and Estruch, 2007; Schluesche et al., 2007).

Factores transcripcionales	Función
TFIIA	Constituido por los polipéptidos Toa1 y Toa2, en levaduras (Hampsey 1998). Estabiliza la unión de TBP al DNA (Weideman, Netter et al. 1997).
TFIIB	Monómero que determina el sitio de iniciación de la transcripción. El dominio C-terminal interacciona con TBP, y el extremo N-terminal se une al complejo RNA polimerasa II/TFIIF reclutándolo al complejo de preiniciación (Reese 2003).
TFIID	Compuesto por TBP y 14 factores asociados a TBP (TAFs). Se requiere para el reconocimiento de los promotores sin caja TATA (TATA- less), y para procesos transcripcionales con implicación de activadores.
TFIIE	Compuesto por Tfa1 y Tfa2 (Venters and Pugh 2009). Se asocia al PIC después de la RNA polimerasa II y recluta a TFIIH regulando su actividad helicasa y quinasa (Grünberg and Hahn 2013).
TFIIF	Compuesto por Tfg1, Tfg2 y Tfg3 (Hampsey 1998). Podría participar en la apertura de la grapa y colocar el DNA promotor sobre la hendidura de la RNA pol II (Grünberg and Hahn 2013).
TFIIH	Lo constituyen las quinasas Ccl1, Tfb3 y Kin28, entre otras proteínas, que fosforilan el CTD durante la transición de la iniciación a la elongación de la transcripción. TFIIH trabaja junto con TFIIE para modular la actividad de la RNA polimerasa II y facilitar la salida del promotor (Grünberg and Hahn 2013)(Venters and Pugh 2009). Tiene actividad helicasa y quinasa (Compe and Egly, 2012).

Tabla I3: Factores generales de transcripción (GTFs) implicados en la transcripción mediada por la RNA pol II en *S. cerevisiae*.

La asociación del conjunto de los factores GTFs comienza con TFIIA, que favorece la estabilización entre la interacción de TBP y el DNA e interacciona con TFIID (Kraemer et

al., 2001). Por su parte, la asociación de TFIIB constituye un complejo ternario muy estable junto con TBP y el DNA. Esto permite la asociación de la RNA pol II al núcleo del promotor acompañado de TFIIF, que estabiliza la formación del PIC (Shandilya and Roberts, 2012; Venters and Pugh, 2009).

Posteriormente, tanto el complejo mediador como los factores generales de transcripción TFIH y TFIE son reclutados al complejo PIC. La asociación de TFIE tiene lugar una vez localizado el complejo PIC en el promotor, favoreciendo el inicio de la transcripción. Por otro lado, TFIH es reclutado por TFIE promoviendo el cierre del complejo PIC, favoreciendo de igual modo la iniciación de la transcripción. La secuencialidad de la asociación de estos dos factores no queda muy clara, planteándose también otra alternativa en la que se asocian previamente antes de unirse al PIC (Shandilya and Roberts, 2012; Thomas and Chiang, 2006). El reclutamiento de TFIH por TFIE también supone una regulación de sus actividades quinasa y helicasa. La actividad helicasa supone un factor importante en la separación de la doble hebra de DNA, formándose un complejo promotor abierto con la RNA pol II (Wang et al., 1992). Además, el mediador es un gran complejo multiproteico que actúa como plataforma en el complejo PIC, conectando e integrando las señales de la maquinaria de transcripción y favoreciendo la iniciación de la transcripción desempeñada por la RNA pol II (Björklund and Gustafsson, 2005; Werner, 2008).

El centro catalítico de la RNA pol II se desliza sobre la cadena molde del DNA, hasta encontrar el sitio de iniciación de la transcripción (TSS). Cuando el transcrito nascente alcanza una longitud de 5 nucleótidos, se conecta con una de las regiones del factor TFIIB, constituyendo un complejo estable. Posteriormente, cuando el transcrito alcanza los 7 nucleótidos de longitud compite con TFIIB, desplazándolo y promoviendo la formación del complejo de elongación (escape del promotor) (Kostrewa et al., 2009; Liu et al., 2010b). Cuando se disocia del promotor, la RNA pol II se desensambla de algunos componentes del PIC (Figura 18), estableciendo una conexión muy estable con el RNA nascente. Una vez alcanzado el transcrito los 8-9 nucleótidos de longitud se establecen contactos fuera del canal de salida del RNA, provocando la separación RNA-DNA molde, y un cambio conformacional de la RNA pol II, que pasará a contener un híbrido DNA-RNA estable en su centro activo (Westover et al., 2004). El avance de la RNA pol II dejando atrás el promotor se ve favorecido por procesos de fosforilación en el CTD (revisado en (Calvo and García,

2012)). Para la reiniciación de la transcripción la mayoría de los componentes del PIC se quedan asociados al promotor, salvo TFIIB, TFIIF y la RNA pol II que necesitan ser nuevamente reclutados, incrementando la eficiencia de la transcripción (Sikorski and Buratowski, 2009; Thomas and Chiang, 2006).

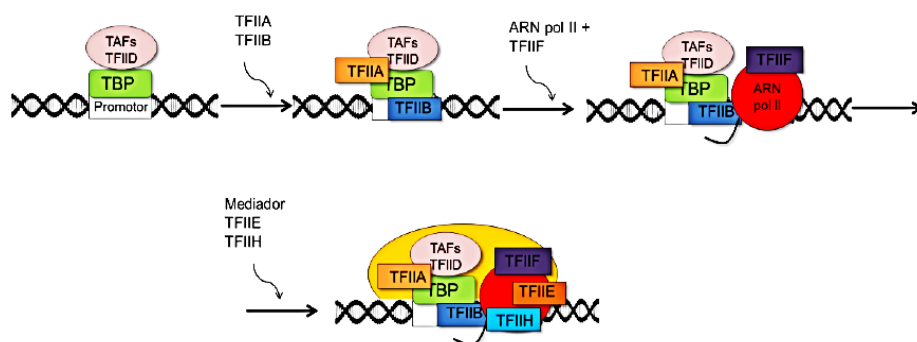


Figura I8: Modelo del ensamblaje secuencial del complejo de preiniciación (PIC). Imagen extraída de (Tesis Martínez-Fernández, 2016).

En esta primera etapa de la transcripción tiene lugar la fosforilación del CTD-Ser5 por Kin28 (subunidad de TFIIH), alterando la interacción estable entre el CTD y componentes del PIC, favoreciendo el escape del promotor de la RNA pol II y dando paso a la elongación de la transcripción (Calvo and García, 2012). Rtr1, fosfatasa del CTD, tiene un papel fundamental en la transición de la iniciación de la transcripción a la elongación promoviendo la defosforilación de CTD-Ser5P en la región 5' de los genes, y a su vez, favorecer la fosforilación del CTD-Ser2 (Gibney et al., 2008; Mosley et al., 2013). También se ha descrito que Spt5 interacciona con el coactivador transcripcional Sub1 y dicha interacción podría ayudar a la asociación de Spt5 a la RNA pol II durante la transición entre la iniciación a la elongación de la transcripción, promoviendo positivamente la elongación (García et al., 2012). De igual manera, la subunidad común Rpb5 influencia la correcta asociación de Spt5 a la RNA pol II para favorecer esta transición irreversible (Martínez-Fernández et al., 2018).

2.2 Elongación en la transcripción

La elongación de la transcripción comprende el periodo en el que la RNA pol II transcribe la región codificante del gen una vez iniciado el proceso. El inicio de la elongación es un proceso lento e ineficiente, puesto que la síntesis de muchos de los transcritos iniciados se ve abortada por las numerosas pausas y bloqueos que tienen lugar durante este proceso (Marshall and Price, 1992). Sin embargo, se considera que esta fase inicial supone un mecanismo que regula la transcripción controlando la calidad de los transcritos, mediado, en eucariotas superiores, por los factores de elongación NELF (“*Negative elongation factor*”) y DSIF, cuyo homólogo en levaduras es Spt4/5 (Hartzog and Fu, 2013; Shandilya and Roberts, 2012; Venters and Pugh, 2009). Cuando el transcrito alcanza unos 25 nucleótidos aproximadamente se considera constituido el complejo de elongación, liberándose la RNA pol II de los factores GTFs (Hahn, 2004).

En este paso, el factor de elongación Spt4/5 establece una mayor estabilidad entre el DNA y el RNA naciente (Figura I9) (Bourgeois et al., 2002; Hartzog and Fu, 2013; Martinez-Rucobo et al., 2011). Spt4/5 también podría estar regulando la elongación de la transcripción coordinando la remodelación de la cromatina y la modificación de histonas, facilitando el acceso de la RNA pol II al DNA diana (revisado en (Hartzog and Fu, 2013).

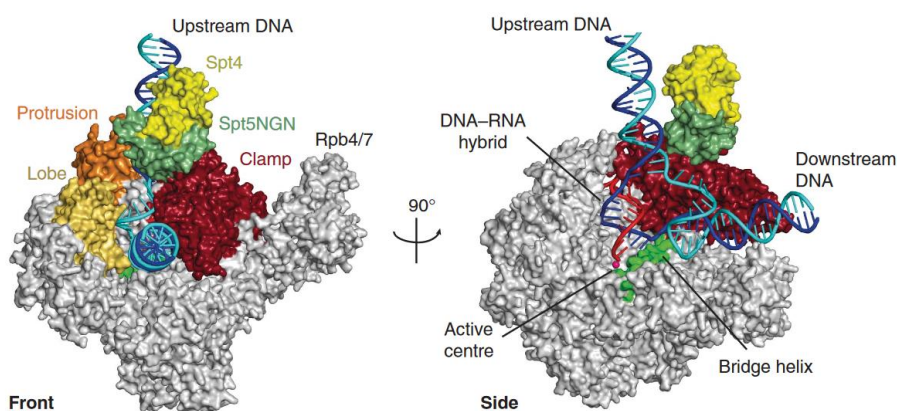


Figura I9: Modelo estructural de la disposición de la RNA pol II y el heterodímero Spt4/5, constituyendo el complejo elongante. Imagen extraída de (Martinez-Rucobo et al., 2011).

La asociación de Spt4/5 en el complejo transcripcional provoca la irreversibilidad de la elongación de la transcripción, porque refuerza estéricamente la disposición del ácido nucleico y previene la salida del RNA y la reasociación de las cadenas de DNA. Para evitar una asociación prematura, TFIIE compete con el dominio NGN de Spt5 por la región de unión a la grapa (*Martinez-Rucobo et al., 2011*). Como se ha comentado previamente, la subunidad Rpb5 modula la correcta asociación de Spt5 a la RNA pol II durante la elongación de la transcripción para favorecer el paso de la iniciación a la elongación temprana de la transcripción. Rpb5 es importante para la correcta organización estructural del dominio plataforma de la RNA pol II, favoreciendo el movimiento de la grapa y Rpb4/7 y a su vez, la correcta asociación de Spt5 al mismo, influyendo además en el correcto proceso de *backtracking* (Martínez-Fernández et al., 2018).

También en arqueas se ha demostrado que existe una competición entre el factor de iniciación TFE y el factor de elongación Spt4/5 por su asociación a la grapa de la enzima para modular el paso de la iniciación a la elongación (Grohmann et al., 2011).

En el proceso de la elongación se fosforila el CTD-Ser2, mientras que el CTD-Ser5 se va desfosforilando gradualmente. En la fosforilación del CTD-Ser2 está implicado el factor TEFb en humanos y las quinasas Ctk1 y Bur1 en levaduras (Keogh et al., 2003; Qiu et al., 2009) y en la defosforilación de CTD-Ser5P, las fosfatasas RPAP2 y Rtr1 en humanos y levaduras, respectivamente (Gibney et al., 2008; Mosley et al., 2009) y Ssu72 en levaduras (Bataille et al., 2012; Krishnamurthy et al., 2004; Zhang et al., 2012). Esta fosforilación en CTD-Ser2 proporciona una plataforma para el reclutamiento de aquellos complejos que se desplazan con la RNA pol II a través del gen (revisado en (Nechaev and Adelman, 2011)).

Como ya se ha mencionado, la elongación de la transcripción es un proceso interrumpido, puesto que la progresión de la RNA pol II sufre numerosas paradas de tiempo variable (Darzacq et al., 2007). Estas paradas transcripcionales, originadas por muchas causas como los obstáculos encontrados en el DNA (Gómez-Herreros et al., 2012), pueden conllevar a reanudar la transcripción o a mantener la RNA pol II parada de forma estable (Gu and Reines, 1995), lo que implica una completa represión de la expresión génica, pudiendo afectar seriamente a la replicación del DNA y conduciendo a la inestabilidad del genoma y, posiblemente, a la muerte celular (Daulny and Tansey, 2009). Para reanudar la

marcha de la RNA pol II existen determinados mecanismos, como es el denominado *backtracking* o marcha atrás, mediante el cual la RNA pol II retrocede sobre el mRNA, provocando la pérdida de contacto entre el extremo 3' del RNA nascente y el centro activo de la RNA pol II. Este extremo del transcrito será escindido, permitiendo recolocar el nuevo extremo 3' en el centro activo de la enzima (Gómez-Herreros et al., 2012).

En el proceso de *backtracking* el factor TFIIS estimula la escisión de la región 3' del transcrito nascente. TFIIS está compuesto por tres dominios estructurales, I, II y III, de los cuales los dominios II y III constituyen el fragmento mínimo con actividad transcripcional (Morin et al., 1996). TFIIS, codificado por el gen *DST1*, cuya delección es viable para el crecimiento celular (Nakanishi et al., 1992), tiene un papel muy importante en la transición entre la iniciación y la elongación de la transcripción (Gómez-Herreros et al., 2012; Guglielmi et al., 2007; Malagon et al., 2004; Mason and Struhl, 2005). La reanudación de la transcripción requiere de la escisión del extremo 3' del RNA nascente tras el *backtracking* puesto que el complejo entre DNA, RNA y RNA pol II es muy estable tras la parada, requiriendo de mecanismos adicionales para reanudar la transcripción (Gómez-Herreros et al., 2012). El mecanismo mediante el cual TFIIS escinde el RNA implica el correcto posicionamiento del dominio III de TFIIS en el centro activo de la RNA pol II (Cheung and Cramer, 2011). De esta forma se remodelan los motivos de la RNA pol II unidos al RNA tras el *backtracking* y una vez cortado el fragmento de RNA, el centro activo de la RNA pol II se recoloca en el extremo 3' del RNA.

Otro mecanismo alternativo que promueve la reanudación de la transcripción por parte de la RNA pol II tras la parada transcripcional, es el complejo Ccr4-Not, esencial y conservado en eucariotas (Denis and Chen, 2003) (Collart and Panasenko, 2012; Miller and Reese, 2012; Reese, 2013). Ccr4-Not actúa favoreciendo la reanudación de la RNA pol II, pero no la escisión del RNA como ocurre en caso de *backtracking* por TFIIS (Kruk et al., 2011). Ccr4-Not es un complejo multiproteico que actúa, además, como regulador en el ciclo de vida de los mRNA en los procesos de transcripción, *decapping*, deadenilación y ubiquitilación de los transcritos (Collart and Timmers, 2004; Denis and Chen, 2003; Laribee et al., 2007) con un papel principal en la actividad catalítica de la deadenilación del mRNA (Parker, 2012).

Si bien estos complejos Ccr4-Not y TFIIIS tiene funciones diferentes, existen estudios que demuestran que la eliminación simultanea del complejo Ccr4-Not y el factor TFIIIS es letal para la célula, sugiriendo un papel coordinado en los procesos de elongación (Miller and Reese, 2012).

Uno de los procesamientos más versátiles en la vida de una molécula de mRNA es el *splicing* del pre-mRNA. La mayoría de los pre-mRNAs eucarióticos contienen intrones, que tienen que ser eliminados (*splicing*) (Ardehali and Lis, 2009), y exones, que deben ser ligados juntos, antes de que los mRNA puedan ser traducidos a proteínas. Será en estadios avanzados de la elongación transcripcional donde tenga lugar este proceso, reclutándose el *espliceosoma*, encargado de eliminar los intrones, inicialmente de manera co-transcripcional y terminando post-transcripcionalmente en el núcleo, como consecuencia de la mayor velocidad de síntesis de la RNA pol II respecto al procesamiento del espliceosoma (Beyer and Osheim, 1988). Aunque el *espliceosoma* realiza la catálisis de los intrones, adicionalmente se requieren factores de *splicing* para determinar los sitios de escisión, tales como la familia de proteínas SR (Lin and Fu, 2007). A su vez, el *splicing* está modulado por procesos de fosforilación del CTD (David and Manley, 2010; Hargreaves et al., 2009). Los pre-mRNAs pueden ser empalmados alternativamente, proporcionando un fuente principal de diversidad del transcriptoma y proteoma en las células (Pan et al., 2008). En humanos se ha descrito que el 75% de los genes sufren *splicing* alternativo (Black, 2000).

2.3 Terminación de la transcripción

Una vez completada la síntesis del mRNA, la RNA pol II se disocia de la cadena molde de DNA. Este proceso es controlado y regulado por dos rutas: una ruta dependiente de poli(A) y una ruta dependiente de Sen1.

La mayoría de los mRNA codificantes en eucariotas tienen una señal poli(A) altamente conservada 5'-AAUAAA-3', seguida de una secuencia rica en G/U cerca del extremo 3'. Cuando la RNA pol II alcanza la región correspondiente en el DNA, reduce considerablemente su procesividad provocando su pausa y favoreciendo la escisión del mRNA naciente, en la ruta dependiente de poli(A). La señal 5'-AAUAAA-3, a su vez es reconocida por el factor de corte y especificidad de poliadenilación (CPF), el factor de corte

IA (CF IA) y el factor de corte IB (CF IB), en levaduras. Finalmente, la proteína de unión a la poli(A) (Pab1) (Mandel et al., 2008; Tian and Graber, 2012) es la responsable de la escisión endonucleolítica que precede a la poliadenilación del transcrito que resulta aguas-arriba del extremo 3', mientras que el fragmento de aguas-abajo será degradado (Shandilya and Roberts, 2012). La maquinaria que procesa el extremo 3' del transcrito que va a poliadenilarse es altamente compleja, comprendiendo más de 20 polipéptidos en levaduras, alrededor de 14 proteínas en mamíferos y más de 80 proteínas en células humanas (Mandel et al., 2008; Millevoi and Vagner, 2009; Shi et al., 2009). Por otro lado, el complejo PAF1C humano, cuyo ortólogo fue identificado por primera vez en *S. cerevisiae*, Paf1, como un factor de elongación desempeñando un papel en la modificación de la cromatina asociada a la transcripción (Krogan et al., 2002; Mueller et al., 2004; Rozenblatt-Rosen et al., 2005; Simic et al., 2003; Squazzo et al., 2002) se ha demostrado que participa en la formación del extremo 3' del mRNA (Penheiter et al., 2005; Rosonina and Manley, 2005) al interactuar con CPSF (homólogo a CFP en levaduras) entre otros (Nordick et al., 2008).

Como se describe con más detalle en el apartado 3.2 (Poliadenilación del mRNA), la poliadenilación alternativa conlleva alteración de los sitios de corte y poliadenilación preestablecidos, actuando este proceso como un regulador de la expresión génica (revisado en (Turner et al., 2017)). Se ha sugerido que la poliadenilación alternativa puede ser ocasionada, entre otros procesos, por un defectuoso reajuste de los nucleosomas durante la transcripción o por daños en el DNA (Di Giammartino et al., 2011; Huang et al., 2013; Jensen et al., 2003; Luco et al., 2011; McCracken et al., 1997; Proudfoot et al., 2002; Turner et al., 2017).

La ruta de terminación **dependiente de Sen1 nuclear**, es una ruta alternativa para los RNAs no codificantes: snRNA, snoRNA, CUTs y SUTs (Berendzen, 2013; Shandilya and Roberts, 2012). El extremo 3' de estos transcritos, a diferencia del mRNA, se genera por corte endonucleolítico y/o exonucleolítico por el exosoma nuclear. Para el reconocimiento y transducción de la señal de terminación de la transcripción, se necesitan factores que incluyen proteínas de unión al RNA, tales como Ndr1, Nab3 y la helicasa de RNA y DNA Sen1 (Kim et al., 1999; Steinmetz and Brow, 1996; Steinmetz et al., 2001; Steinmetz et al., 2006). En esta vía, la helicasa Sen1 (proteína nuclear que interacciona con el CTD) (Ursic et al.,

2004) separa el híbrido RNA-DNA en el centro activo, facilitando la disociación de la RNA pol II (Steinmetz and Brow, 1996; Ursic et al., 2004). También se ha descrito la existencia del complejo TRAMP que activa al exosoma para la degradación de transcritos aberrantes tras la adición de la cola poli(A) (LaCava et al., 2005).

2.4 Remodelación de la cromatina en el proceso transcripcional

La cromatina en eucariotas corresponde a una organización compleja de DNA empaquetado con proteínas que juega un papel crucial en los procesos biológicos, como la replicación de DNA, la recombinación de DNA y el mantenimiento de los cromosomas o la expresión de genes, entre otros. La unidad fundamental de la cromatina es el nucleosoma, que comprende 147 pb de DNA genómico alrededor de un octámero compuesto por dos copias de cuatro histonas (H2A, H2B, H3 y H4), que componen fibras de ~10 nm (Kornberg, 1974; Luger et al., 1997; Van Hoide et al., 1974). Además de este octámero, otras variantes de histonas también contribuyen a la composición de la cromatina y su influencia en la regulación biológica, como Htz1 en levadura o H2A.Z en células de mamíferos (Boulard et al., 2007). El empaquetamiento final de estos complejos da forma a fibras de ~30nm. El plegamiento y remodelación de la cromatina tiene un fuerte impacto en la regulación de la expresión génica (Espada and Esteller, 2007; Misteli, 2001).

El promotor común de la RNA pol II se encuentra dispuesto en una región de la cromatina libre de nucleosomas (NFR, "*nucleosome-free region*") de 150 pb situada a unos 200 pb de la región codificante (Yuan et al., 2005). Flanqueando cada NFR se encuentran dos nucleosomas fuertemente posicionados (NPS, "*nucleosome-positioning sequences*"), ocurriendo con mayor probabilidad en los promotores que contienen caja TATA (Ioshikhes et al., 2006; Segal et al., 2006). El acceso al DNA situado en los nucleosomas se podría conseguir por movimientos corredizos de los nucleosomas (Inai et al., 2007; Lomvardas and Thanos, 2001) o un proceso de desalojo de histonas (*histone eviction*) (Adkins et al., 2004; Boeger et al., 2004) (Figura I10).

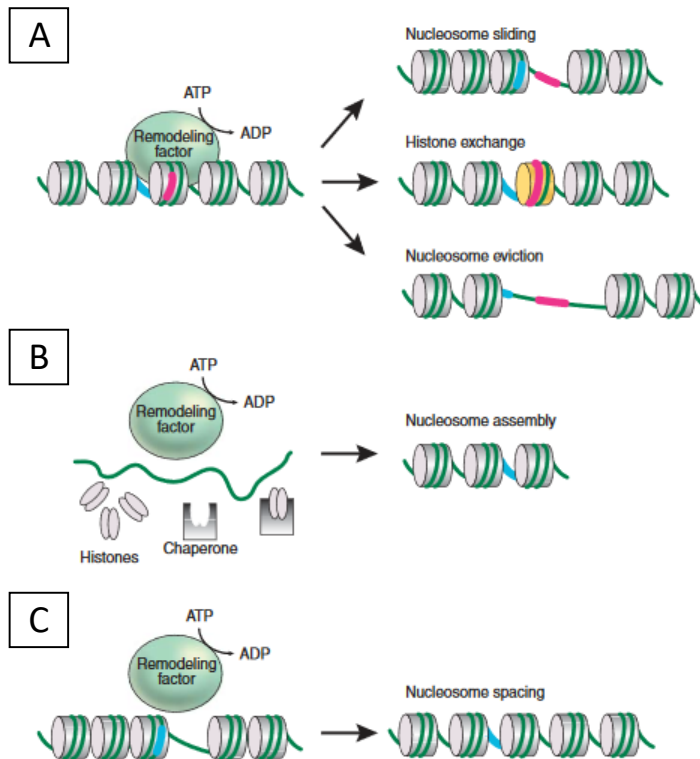


Figura I10: Representación esquemática de cómo los remodeladores de cromatina actúan en la reestructuración de los nucleosomas facilitando el proceso transcripcional. **A)** En rosa se muestra el DNA diana, y en azul, la región donde se asocian los remodeladores de cromatina permitiendo liberar la histona y quedando libre DNA enrollado. En la derecha se muestran las diferentes modificaciones posibles de los nucleosomas (de arriba abajo): corrimiento de nucleosomas o "*nucleosome sliding*", intercambio de histonas o "*nucleosome exchange*" y expulsión de nucleosomas o "*nucleosome eviction*" **B)** Muchos remodeladores de cromatina trabajan en cooperación con las chaperonas de histonas para posicionar el DNA alrededor de los nucleosomas. **C)** Los remodeladores de cromatina pueden equilibrar las distancias entre nucleosomas en un proceso de espaciado o *spacing*. Imagen extraída de (Becker and Workman, 2013).

Existen muchos factores y procesos que regulan la accesibilidad de las proteínas reguladoras de la transcripción a la cromatina, entre las que se encuentran modificaciones postraduccionales por acetilación, fosforilación, metilación, ubiquitilación y sumoliación sobre aminoácidos de las histonas sin dañar el DNA. Esto permite la modificación de la estructura de la cromatina, alterando la interacción DNA-histona resultando en una conformación abierta o cerrada de la cromatina y favoreciendo la procesividad de la de la

enzima (Petruk et al., 2012; Shogren-Knaak et al., 2006; Smolle and Workman, 2013; Williams et al., 2008).

Las chaperonas de histona pueden unirse específicamente a histonas aisladas, contribuyendo en la mayoría de los casos a su localización y/o función (Figura 110) (Luk et al., 2007; Obri et al., 2014; Tagami et al., 2004). Además se ha visto que cooperan con los remodeladores de cromatina actuando como aceptores de histona, pudiendo actuar como reguladores transcripcionales, activando y reprimiendo la transcripción (Kuryan et al., 2012; Lorch et al., 2006; Owen-Hughes and Workman, 1996; Swaminathan et al., 2005; Venkatesh and Workman, 2015). Además, las prefoldinas podrían ser un efector en los cambios estructurales de la cromatina favoreciendo su accesibilidad para la elongación de la transcripción (Millán-Zambrano et al., 2013).

Los remodeladores de cromatina emplean la energía obtenida mediante la hidrólisis de ATP para generar desplazamiento de nucleosomas a lo largo de la cromatina, intercambiar histonas, desalojar nucleosomas (*nucleosome eviction*), equilibrar las distancias entre nucleosomas (*spacing*) o trabajar en colaboración con las chaperonas de histona para el ensamblaje de histonas (Becker and Workman, 2013). Entre el conjunto de los remodeladores de cromatina encontramos en levadura el complejo Swi/Snf, Ino80 (también en humanos), las proteínas Isw1 e Isw2 (homólogos del complejo ISWI de *Drosophila*) y el complejo RSC, actuando como reguladores positivos de la transcripción (Angus-Hill et al., 2001; Spain et al., 2014; Sudarsanam and Winston, 2000; Wippo et al., 2011).

En nuestro grupo de investigación, nos interesamos por el complejo remodelador de la cromatina (RSC), constituido por 15 subunidades (Cairns et al., 1996), siendo Sth1 la subunidad mayor con actividad catalítica en una vía dependiente de ATP (Saha et al., 2005). RSC interacciona con las tres RNA pols a través de la subunidad Rsc4, posiblemente mediante asociación con la subunidad común a las tres RNA pols, Rpb5 (Soutourina et al., 2006). Además regula gran variedad de genes transcritos por la RNA pol II y III, implicados en metabolismo, respuesta a estrés, síntesis de la pared celular, funciones mitocondriales, y progresión del ciclo celular (Angus-Hill et al., 2001; Damelin et al., 2002; Spain et al., 2014; Sudarsanam and Winston, 2000). El complejo RSC se ha encontrado localizado en el

promotor y la región codificante, sugiriendo su papel en la regulación de la iniciación y la elongación de la transcripción (Badis et al., 2008; Carey et al., 2006; Parnell et al., 2008; Spain et al., 2014). También se ha descrito la interacción de Sht1 con Bud27 (prefoldin-like) y la influencia de Bud27 en la asociación de RSC a las RNA pols II y III (Mirón-García et al., 2014; Vernekar and Bhargava, 2015). Recientemente se ha descrito que la fosforilación del CTD-Ser2 y el estado de acetilación de las histonas contribuye a la asociación del complejo RSC en las regiones codificantes de los genes, influyendo en la ocupación de las histonas (Spain et al., 2014).

3. CICLO DE VIDA DEL mRNA

3.1 Formación de la caperuza 5' en el mRNA

La fosforilación del CTD-Ser5 de la RNA pol II (Buratowski, 2009; Hsin et al., 2011), estimula el reclutamiento de la maquinaria de *capping* comprendida por Cet1 (RNA trifosfatasa), Ceg1 (guanililtransferasas) y Abd1 (metiltransferasa) (Ghosh and Lima, 2010). Este proceso, secuencial, permite la adición de la caperuza (caperuza 7-metilguanosina (m7G)), en 5' del mRNA, estabilizada por el CTR ("*C-terminal region*") de Spt5 (Ghosh and Lima, 2010). La caperuza 5' protege al transcrito de la degradación y promueve la iniciación de la traducción (Schwer et al., 1998; Sonenberg and Hinnebusch, 2009). La caperuza completa se asocia con el complejo de unión al "cap" (CBC: *cap binding-complex*) que funciona en el corte y empalme del pre-mRNA (*splicing*) y en el exporte del mismo al citoplasma (Lewis and Izaurflde, 1997; Li et al., 2016; Schwer and Shuman, 1996).

Este proceso secuencial (Figura 111) comienza con la participación del heterodímero Cet1-Ceg1 mediante la unión de Ceg1 al CTD-Ser5P (Martinez-Rucobo et al., 2015), dando paso a la asociación del factor de elongación Spt5 e interaccionan con su dominio CTR. La rápida disociación de Cet1-Ceg1 permite la asociación de Abd1, que se recluta aproximadamente 110 pb aguas-abajo del sitio de inicio de la transcripción y puede permanecer con la RNA pol II elongante parcialmente fosforilada en CTD-Ser5. Abd1 y el CTD-Ser5P permiten el reclutamiento de las quinasas Ctk1 y Bur1, respectivamente, que fosforialan la Ser2 del CTD (Qiu et al., 2009). Abd1 cataliza la transferencia de un grupo metilo desde la S-adenosilmetionina al extremo GpppN de la caperuza 5'. Una vez metilada la caperuza, se une a CBC, que mantiene el reclutamiento de Ctk1 y Bur1 cuando los niveles

de Abd1 y CTD-Ser5P disminuyen en la región 3' del gen. El RNA naciente con la caperuza sin metilar es eliminado por la ruta de degradación dependiente de Rai1-Rat1 (Jiao et al., 2010).

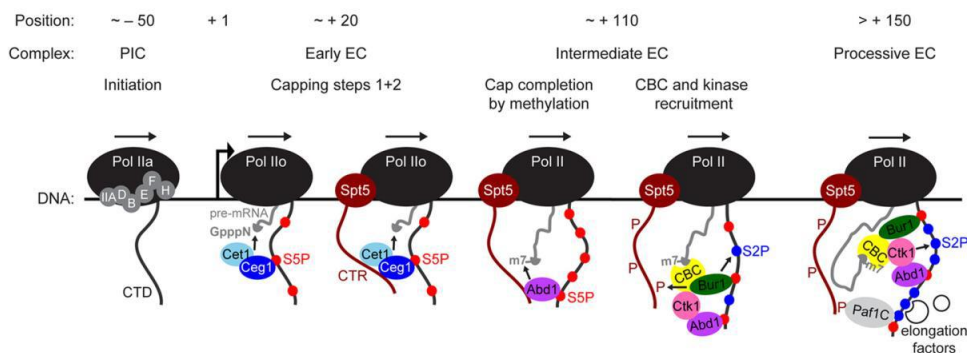


Figura I11: Modelo para la transición de iniciación-elongación de la RNA pol II. La RNA pol II y el CTD (negro) se muestra transcribiendo el DNA (línea negra horizontal) de izquierda a derecha para producir mRNA protegido (gris). PIC, complejo de preiniciación; EC, complejo de elongación; TFIIA/B/D/E/F/H, factores de iniciación; S5P / S2P, serina 5 y 2 del CTD fosforiladas; m7, N7 grupo metilo de la caperuza; Paf1C, complejo Paf1. Imagen extraída de (Lidschreiber et al., 2013).

3.2 Poliadenilación del mRNA

La mayoría de los mRNAs codificantes de proteínas en eucariotas, como se ha detallado en el apartado 2.3 (Terminación de la transcripción), sufren un proceso de poliadenilación en su extremo 3', tras sufrir un corte endonucleolítico previo (Colgan and Manley, 1997). Sin embargo, es común que exista más de un sitio de poliadenilación en la región 3', favoreciendo el proceso denominado "poliadenilación alternativa", desempeñando un importante papel en la regulación de la expresión génica (Turner et al., 2017). Se han descrito alteraciones en la poliadenilación alternativa asociadas a enfermedades en humanos (Turner et al., 2017). Estudios realizados en humanos y ratones muestran poliadenilación alternativa en el ~54% y 32% de los genes, respectivamente (Ozsolak et al., 2010; Tian et al., 2005). En *S. cerevisiae* se ha descrito que aproximadamente el 70% de los genes codifican isoformas alternativas (Pelechano et al., 2013).

Diferentes estudios consideran varios tipos de poliadenilación alternativa que se resume en dos principales:

- Sitios de poliadenilación alternativa ubicados en la región 3' no codificante (UTR), lo que da como resultado transcritos con región de 3' UTR de diferente longitud pero que codifican la misma proteína (Di Giammartino et al., 2011))(revisado en (Turner et al., 2017).
- Sitios de poliadenilación alternativos que se localizan en intrones/exones internos. Esto conlleva eventos de poliadenilación alternativa que producen diferentes isoformas de proteínas.

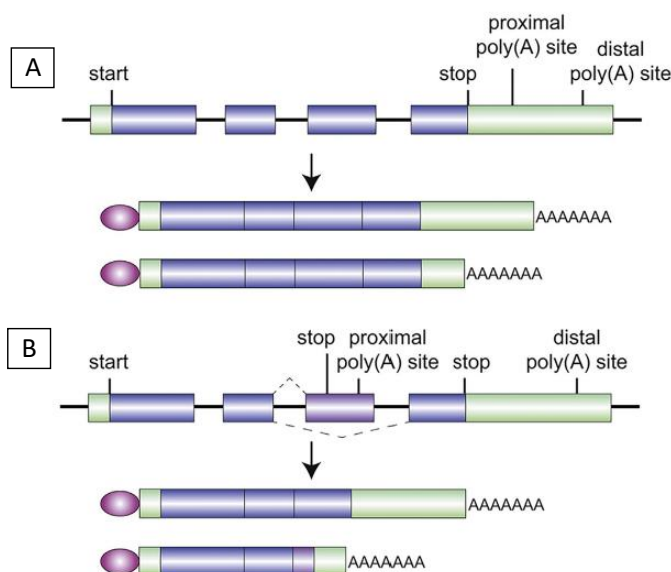


Figura I12: Tipos de poliadenilación alternativa. **A)** Sitios de poliadenilación alternativa ubicados en la región 3' no codificante (UTR). **B)** Sitios de poliadenilación alternativos localizados en intrones/exones internos. Imagen extraída de (Turner et al., 2017).

Se ha descrito que la poliadenilación alternativa puede estar ocasionada por daños en el DNA producidos por condiciones de estrés tales como UV o 4-nitroquinolina 1-óxido (4NQO) (Graber et al., 2013). Por otro lado, en células humanas el posicionamiento de los nucleosomas pueden afectar la utilización de los sitios de poliadenilación y el reclutamiento de la maquinaria de poliadenilación al mRNA naciente (Luco et al., 2011; McCracken et al., 1997).

La poliadenilación alternativa es una de las causas de la inestabilidad de los transcritos (Geisberg et al., 2014; Ji et al., 2011). De igual modo, se ha visto que los sitios de poliadenilación tienen un impacto en la terminación de la transcripción (Huang et al., 2013; Jensen et al., 2003; Proudfoot et al., 2002), al igual que defectos en exportación de mRNA, eficiencia de la traducción y *splicing* (Maniatis and Reed, 2002; Vinciguerra and Stutz, 2004; Zhang et al., 2010).

3.3 Exporte del mRNA

El transporte de los RNAs desde el núcleo al citoplasma, que tiene lugar a través de los complejos de poro nuclear, es un proceso regulado y, en la mayoría de los casos dependientes de receptores de transporte (Strambio-De-Castillia et al., 2010). Los tRNA, miRNA y snRNA, requieren receptores de transporte del tipo importina/karioferina- β mientras que el transporte de los mRNA necesita un receptor heterodimérico llamado Mex67-Mtr2 en *S. cerevisiae* (Köhler and Hurt, 2007; Stewart, 2010) y la correcta disposición del complejo Sac3p-Thp1p en el poro nuclear (Fischer et al., 2002). Entre los diferentes factores implicados en el transporte, el complejo TREX (*Transcription-export*) juega un papel central en el acoplamiento de la transcripción y el exporte (García-Oliver et al., 2012; Sträßer et al., 2002; Zenklusen et al., 2002).

3.4 Degradación del mRNA

La degradación del mRNA puede tener lugar tanto en el núcleo como en el citoplasma. En la mayoría de los casos cuando tiene lugar una degradación del mRNA en el núcleo viene ocasionada por defectos en su procesamiento. Esta degradación está mediada por el exosoma nuclear, compuesto por varias subunidades, incluyendo la exonucleasa 3'-5' conservada, Rrp6 (LaCava et al., 2005) y Rat1 (exonucleasa 5'-3') (Bousquet-Antonelli et al., 2000). De igual modo, como se ha mencionado en apartados anteriores, daños en el DNA (Graber et al., 2013), pueden afectar los sitios de poliadenilación que es una de las causas de la inestabilidad de los transcritos (Geisberg et al., 2014; Ji et al., 2011).

Tras el exporte del mRNA al citoplasma, este se traduce a proteína o puede ser almacenado en cuerpos de procesamiento (*p-bodies* o *processing bodies*, PBs) o en los

gránulos de estrés (SGs), procesos muy conservados en eucariotas en (Anderson and Kedersha, 2009).

Muchos de los constituyentes de los PBs son factores de degradación del mRNA, tales como Dhh1, Pat1, Scd6, Edc3, proteínas de la ruta NMD (*non-sense mediated mRNA decay*) y el complejo Lsm1-7, constituido también por Dcp1/Dcp2 y la exonucleasa Xrn1 (Balagopal and Parker, 2009; Sheth and Parker, 2003; Zheng et al., 2008). Esto sugiere que la degradación del mRNA puede ocurrir en los PBs, aunque también puede tener lugar fuera de ellos (Sheth and Parker, 2003).

En levaduras la degradación citoplasmática de los mRNA ocurre por un proceso de deadenilación en el que tiene lugar un acortamiento de las colas de poli(A) (Decker and Parker, 2012; Muhlrads and Parker, 2005). Los procesos de deadenilación en levadura (Figura 113A) están producidos por el complejo Pan2/Pan3 y el complejo Ccr4/Pop2/Not (Brown and Sachs, 1998; Tucker et al., 2002). Esta deadenilación de los transcritos induce una degradación por el extremo 3' del mRNA por parte del exosoma (Anderson and Kedersha, 2009). A su vez, los mRNA se degradan desde el extremo 5', eliminándose la caperuza 5' por el complejo *decapping* Dcp1/Dcp2 favorecido por Dhh1, permitiendo la acción de Xrn1 degradando el mRNA desde el extremo 5' (Dunckley and Parker, 1999; Hsu and Stevens, 1993; Muhlrads et al., 1994; Steiger et al., 2003; Van Dijk et al., 2011).

Pab1, proteína de unión a la cola de poli(A) del mRNA, tiene un papel como regulador negativo del *decapping* (Tharun, 2009) y participa en procesos de deadenilación promoviendo la acción de Pan2 (Boeck et al., 1998), aunque se ha descrito que inhibe la función de deadenilación de Ccr4 (Tucker et al., 2002), considerado el centro activo de deadenilación (Goldstrohm and Wickens, 2008).

Existe también otra alternativa independiente al proceso de deadenilación (Figura 113 B) que implica el reclutamiento de la maquinaria de *decapping* (Badis et al., 2004; Muhlrads and Parker, 2005), que en *S. cerevisiae* interacciona con la proteína Rps28B y el potenciador de decapping 3 (Edc3). Posteriormente Xrn1 actúa degradando el mRNA desde el extremo 5', favorecido por la eliminación de la caperuza 5' por parte del complejo Dcp1/Dcp2, estimulado a su vez por Dhh1 (Dunckley and Parker, 1999; Hsu and Stevens, 1993; Muhlrads et al., 1994; Steiger et al., 2003; Van Dijk et al., 2011).

Finalmente, la degradación del mRNA mediada por endonucleasa (Figura I13 C), se inicia con un corte interno del mRNA que puede ser producido por distintas endonucleasas como Pmr1, Ire1 o RNasa MRP. Este corte genera dos fragmentos con un extremo desprotegido que serán degradados por Xrn1 y el exosoma (Garneau et al., 2007) (Figura I13).

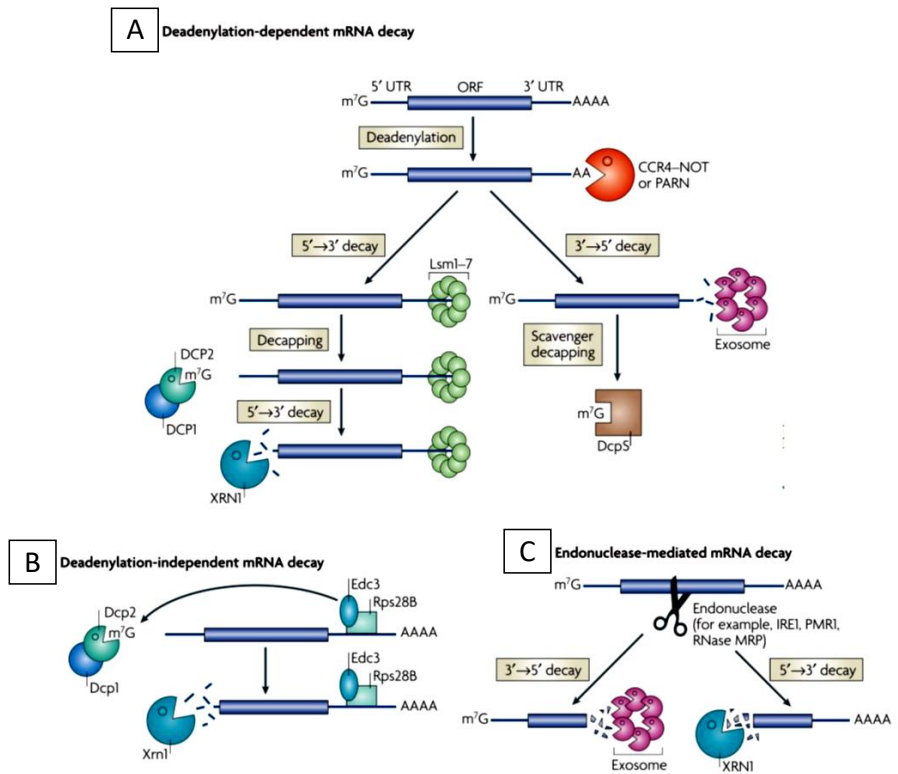


Figura I13: Modelo del proceso de degradación citoplasmático del mRNA. A) Ruta de degradación de mRNA dependiente de deadenilación. B) Ruta de degradación independiente de deadenilación. C) La degradación del mRNA mediada por endonucleasas. Imagen extraída de (Garneau et al., 2007).

3.5 Papel de Dhh1 ("DEAD box Helicase Homolog") en el ciclo de vida del mRNA

Uno de los factores ya mencionados que tras la deadenilación del mRNA participa en la eliminación de la caperuza 5' ("decapping") de los transcritos y favorece la degradación del mRNA es Dhh1 (Carroll et al., 2011; Fischer and Weis, 2002). Esta proteína es un miembro conservado de la familia de las helicasas *DEAD box* que parece tener un papel directo en el *decapping*. Su ausencia provoca una acumulación de mRNA con

caperuza en 5', además de una mayor estabilidad en los mismos (De Waard et al., 2006). Interacciona físicamente con otras proteínas implicadas en el proceso, tales como la enzima Dcp1, Lsm1 y Pat1/Mrt1, cuya función es la de favorecer el *decapping*. Se ha sugerido que actúa coordinando el proceso de degradación (Coller et al., 2001). Además se ha descrito la asociación de Dhh1 con la fosfatasa del CTD, Rtr1, y con las exonucleasas Rex2 y Rex3 (Hodko et al., 2016; Smith-Kinnaman et al., 2014).

3.6 Heterodímero Rpb4/7, y su papel en el ciclo de vida del mRNA

Rpb4, subunidad de la RNA pol II, constituye junto con Rpb7 un heterodímero disociable del resto de la RNA pol II, siendo Rpb4 no esencial para la viabilidad celular. El dímero Rpb4/7 además de estar implicado en la iniciación y elongación de la transcripción (Allepuz-Fuster et al., 2014; Chung et al., 2003; Edwards et al., 1991; Hirtreiter et al., 2009; Naji et al., 2007; Ouhammouch et al., 2004) participa en procesos post-transcripcionales tales como el transporte y degradación del mRNA (Garrido-Godino et al., 2016; Goler-Baron et al., 2008)(Farago et al., 2003). Rpb4 se asocia a los transcritos recién sintetizados en el núcleo por la RNA pol II durante la transcripción, acompañándolos en su exportación al citoplasma (Garrido-Godino et al., 2016; Goler-Baron et al., 2008; Harel-Sharvit et al., 2010). Rpb4 está también implicado en la traducción, demostrándose la interacción física y funcional entre Rpb4/7 con los componentes Nip1 y Hcr1 del factor traduccional eIF3, requerido para una eficiente iniciación de la traducción (Harel-Sharvit et al., 2010). La ausencia de Rpb4, o la mutación de Rpb7 (*rpb7-26*), provoca defectos en la disociación de los mRNA de los *p-bodies* (PBs) y el ensamblaje con los polisomas, apoyando el papel de Rpb4/7 en el inicio de la traducción (Harel-Sharvit et al., 2010). Además, defectos en el ensamblaje del heterodímero Rpb4/7 a la RNA pol II (en mutantes tales como *rpb6^{Q100R}* y *rpb1^{C67S,C70S}*) conllevan la formación de polisomas defectuosos (Harel-Sharvit et al., 2010).

El papel de Rpb4 en la degradación del mRNAs, se observó al deletar *RPB4*, lo que provoca una acumulación de los *p-bodies* (PBs), junto a factores de degradación del mRNA (Lotan et al., 2005). Se ha demostrado, además, la interacción física de Rpb4 con los factores de la maquinaria de degradación de mRNA Pat1/Lsm1-7. Pat1 se considera el primer factor de degradación del mRNA que se une al transcrito en el extremo 3', aún asociado con los factores de traducción y que recluta al complejo Lsm1-7 (Coller and Parker,

2005), con un papel importante en el *decapping*. Rpb4 interacciona genéticamente con el complejo Pat1/Lsm1-7 (Lotan et al., 2005). El déficit en la presencia del heterodímero Rpb4/7 en los mRNA, en el mutante *rpb6^{Q100R}* conlleva problemas en degradación de los transcritos (Goler-Baron et al., 2008; Shalem et al., 2011). Posteriormente, se ha descrito, por nuestro grupo, que la correcta asociación del dímero Rpb4/7 a la RNA pol II es necesaria en la modulación de la transcripción y degradación del mRNA, provocando su ausencia o su disociación de la RNA pol II un incremento de la estabilidad de la mayoría de los mRNA, por deficiencia en su asociación a los mismos (Garrido-Godino et al., 2016).

Según describimos en la figura I14, el dímero Rpb4/7 que forma parte de la RNA pol II, una vez sintetizado el mRNA nascente, se asocia a él, acompañándolo en su transporte al citoplasma. Una vez allí interacciona con el factor eIF3 favoreciendo la traducción. Rpb4/7 se asocia a los *p-bodies* favoreciendo la degradación del mRNA, por un acortamiento de las colas de poli(A), y facilitando el acceso de las exonucleasas. Finalmente, el Rpb4/7 puede ser reciclado, retornando al núcleo (Dahan and Choder, 2013; Forget and Chartrand, 2011; Selitrennik et al., 2006).

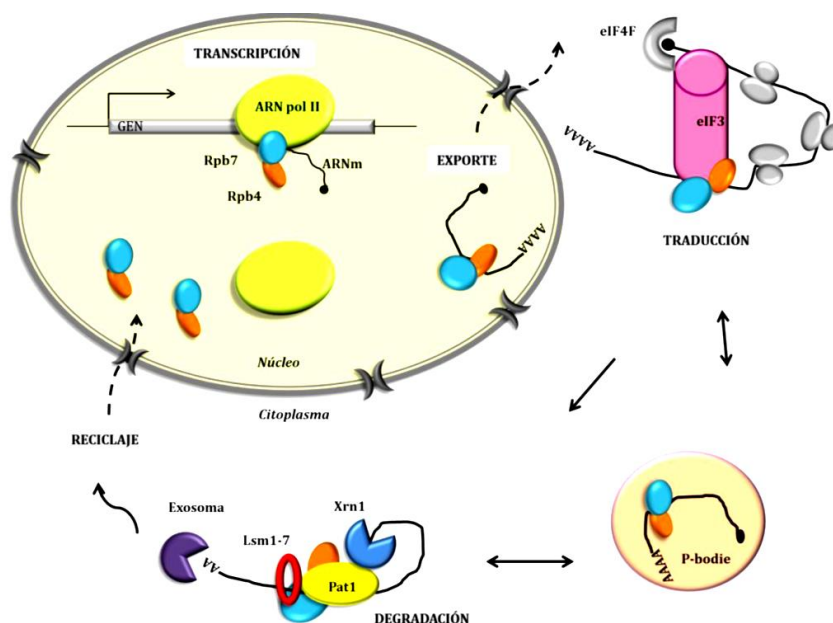


Figura I14: Esquema de la relación entre Rpb4/7 y los mRNA. Imagen extraída de (Tesis Garrido-Godino, 2014) adaptado de (Dahan and Choder, 2013; Forget et al., 2013).

4. La Prefoldina-like Bud27

Bud27 (prefoldina no convencional que interacciona con Rpb5), y su ortólogo en humanos URI, son miembros de la familia de las prefoldinas-like (PFD-like) que actúan como chaperonas en una vía independientes de ATP. Se ha descrito que esta proteína se une a la subunidad Rpb5 de las tres RNA pols y se considera que funciona como una proteína puente capaz de reclutar miembros adicionales de la familia prefoldina (PDF) tanto en humanos como en levadura,s formando parte del complejo R2TP/PFDL en humanos (Dorjsuren et al., 1998; Gstaiger et al., 2003; Mirón-García et al., 2013). Si bien en humanos URI forma parte del complejo prefoldina-like que implica diversas proteínas (Figura I15), en levaduras no está claro si este complejo existe como tal. De hecho, en *S. cerevisiae* Bud27 solo se encuentra asociada a Pfd6 (también conocidas como Gim1/Yke2). De igual forma, de las otras proteínas encontradas en humanos asociadas al complejo prefoldina-like, solo Rpb5 y Pfd2 se encuentran en levaduras (Delgermaa et al., 2004; Geissler et al., 1998; Gstaiger et al., 2003; Ito et al., 2001; Mirón-García et al., 2013; Siegers et al., 1999; Wang et al., 2012).

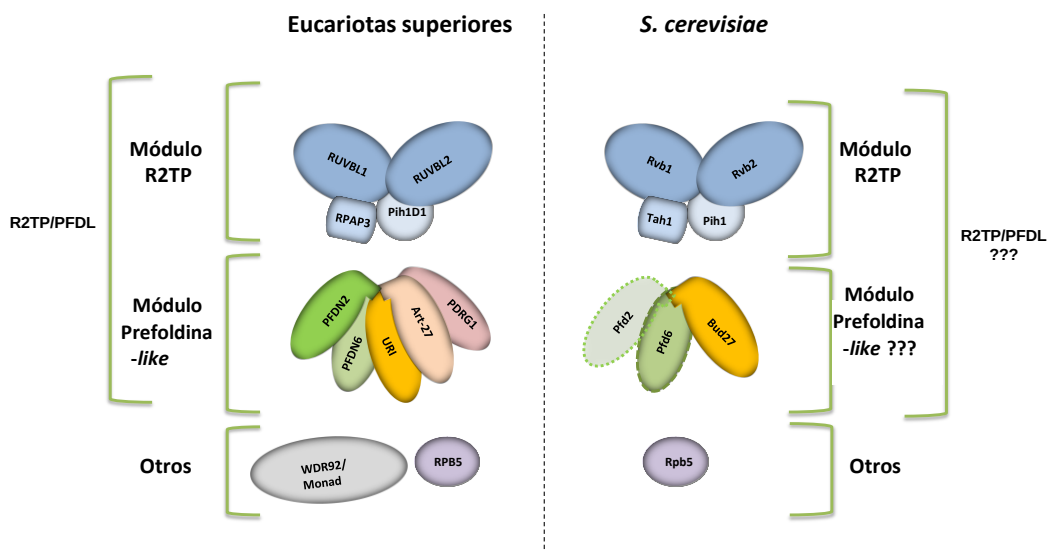


Figura I15: Esquema de los posibles complejos R2TP/PFDL. Bud27 en *S. cerevisiae* y su ortólogo URI en organismos eucariotas superiores, así como los diversos componentes de los complejos R2TP/PFDL. Las interrogaciones indican la posible no existencia de dichos complejos o módulos, de manera similar a los de eucariotas superiores.

4.1 Papel citoplasmático de Bud27/URI

4.1.1 Bud27 media la biogénesis de las tres RNA pols en *Saccharomyces cerevisiae*

Bud27 se ha descrito como la primera proteína implicada en la biogénesis de las tres RNA pols, en *S. cerevisiae*, en una vía dependiente de Rpb5 y necesaria para la correcta asociación de Rpb5 y Rpb6 en las tres enzimas (Mirón-García et al., 2013). Este proceso tiene lugar en el citoplasma, en un último paso de la biogénesis antes de su translocación al núcleo. La delección de *BUD27* provoca una acumulación de las tres RNA pols en el citoplasma. Además la localización nuclear de las enzimas no depende de la localización de Bud27. Esta acumulación citoplasmática también tiene lugar cuando se elimina el dominio de unión a Rpb5 en la proteína Bud27 (Mirón-García et al., 2013).

Bud27 parece estar implicada en la biogénesis de las RNA pols independientemente al resto del complejo prefoldinas (Figura I16). Aun así, Bud27 interacciona físicamente con Yke2 (Pfd6) e interacciona genéticamente con *GIM6* (que codifica Pdf1) (Deplazes et al., 2009). Las subunidades Pfd1, Pfd6 y Pfd2 (Gim4) son prescindibles para la localización nuclear de las tres RNA pols (Mirón-García et al., 2013).

De igual manera, se ha propuesto un papel para Bud27 en el ensamblaje de las subunidades mayores de la RNA pol III, Rpc160 y Rpc128, al resto de la enzima (Vernekar and Bhargava, 2015).

En *S. cerevisiae* la función de Bud27 en la biogénesis de la RNA pol II es independiente de Iwr1 (Mirón-García et al., 2013), un factor que interacciona con las subunidades Rpb1 y Rpb2 dirigiendo su importe al núcleo (Czeko et al., 2011; Wild and Cramer, 2012), aunque se han descrito interacciones genéticas entre *BUD27*, *IWR1* y *RPB5* (Costanzo et al., 2010; Esberg et al., 2011).

Por último, el silenciamiento de URI con siRNA en fibroblastos pulmonares humanos provoca la acumulación de Rpb1 en el citoplasma, lo que sugiere el papel de URI en la biogénesis de las RNA pols, al menos la de la RNA pol II (Mirón-García et al., 2013).

Todos estos datos en acuerdo con los datos previamente publicados en células de humanas que proponen un papel para URI en el ensamblaje de la RNA pol II (Boulon et al., 2010).

4.1.2 Bud27 en traducción

La traducción de proteínas es un proceso altamente regulado que coordina la síntesis de cadenas polipeptídicas llevada a cabo por los ribosomas y los factores de traducción, con el plegamiento cotraduccional de polipéptidos nacientes mediante complejos de chaperonas (Frydman, 2001). Los mecanismos de control de calidad postraduccional y traduccional actúan sobre las proteínas nacientes, incluido el plegamiento correcto de las cadenas por la acción de las prefoldinas y las chaperonas. Existe también un mecanismo que implica la fosforilación dependiente de Gcn2 del factor de traducción eIF2a, para inhibir la traducción de la mayoría de las proteínas y para activar la traducción de algunas proteínas reguladas por estrés, como los factores de transcripción de mamíferos ATF4 o Gcn4 en levadura (revisado en (Albanese et al., 2006; Gebauer and Hentze, 2004)).

La traducción de Gcn4 (activador transcripcional) está regulada negativamente por Bud27 y la ausencia de Bud27 provoca un incremento de la traducción de Gcn4 (Gstaiger et al., 2003). Defectos traduccionales provocan un crecimiento celular lento con fenotipo de termosensibilidad en *S. cerevisiae* (Cuesta et al., 1998), coincidiendo con el fenotipo presentado por el mutante *bud27Δ*, sensible también a inhibidores de la traducción tales como la cicloheximida, paramomicina e higromicina B (Deplazes et al., 2009). Bud27 tiene un papel en la iniciación de la traducción (Figura I16) promoviendo un eficiente reclutamiento del complejo ternario, TC (consistente en el iniciador metionil-tRNA, Met-tiMetRNA, el factor iniciador eIF2 y GTP) a la subunidad 40S. Este proceso ocurre a través de la interacción entre Bud27 y el factor de iniciación de la traducción eIF1A (Deplazes et al., 2009; Mockli et al., 2007) y la asociación entre Bud27 y los ribosomas (Deplazes et al., 2009). También se ha descrito la interacción entre Bud27 y las chaperonas Ssb1 y Sis1 (Mirón-García et al., 2013; Mockli et al., 2007), miembros de la familia Hsp70 y Hsp40. Estos datos sugieren la implicación de Bud27 en el plegamiento de proteínas de un modo indirecto (Deplazes et al., 2009).

4.2 Papel nuclear de URI/Bud27

La ausencia de Bud27 conduce a una disminución general en la ocupación de la RNA pol II y III en los genes, sugiriendo una disminución en los niveles de expresión génica en *S. cerevisiae* (Gstaiger et al., 2003; Mirón-García et al., 2014; Vernekar and Bhargava, 2015), que podría ser la consecuencia de un ensamblaje defectuoso en el citoplasma y, por tanto, de una importación defectuosa al núcleo (Mirón-García et al., 2013; Vernekar and Bhargava, 2015). Esta hipótesis podría extrapolarse para la RNA pol I.

Bud27 interactúa con formas fosforiladas de la RNA pol II (CTD-Ser5P y CTD-Ser2P), sugiriendo una implicación en la elongación de la transcripción (Mirón-García et al., 2014). De hecho, la falta de Bud27 afecta la elongación de la transcripción, como lo demuestra el *aumento* de fosforilación Ser5-CTDP y Ser2-CTDP, así como la sensibilidad a drogas que afectan al nivel intracelular de nucleótidos, ácido micofenólico y 6.azauracilo, (Mirón-García et al., 2014). Bud27 también interactúa *in vivo* con Sth1, subunidad del complejo remodelador de cromatina, RSC. La inactivación de Bud27 altera la asociación entre Sth1 y formas elongantes de la RNA pol II (Mirón-García et al., 2014). Se ha descrito un fenómeno similar con la RNA pol III en *S. cerevisiae*, lo que sugiere que Bud27 también podría actuar sobre RNA pol III durante la elongación de la transcripción (Vernekar and Bhargava, 2015). Estos datos son consistentes con las interacciones genéticas descritas entre BUD27 y RSC1, RSC8 y RSC4 (Collins et al., 2007; Mirón-García et al., 2014). En correlación con la interacción funcional entre Bud27 y Sth1, Rpb5, que se asocia directamente a Bud27 (igual en eucariotas superiores), también establece una conexión con Rsc4 (otra subunidad de RSC). Concretamente, la falta de la interacción Rpb5-Rsc4 afecta la estructura de la cromatina en la región promotora de algunos genes regulados por RSC, conllevando una alteración de la transcripción (Soutourina et al., 2006). Teniendo en cuenta todos los datos anteriores combinados, planteamos la hipótesis de que Bud27 podría promover la interacción de RSC con la RNA pol II y III a través de Rpb5, formando un complejo tripartito estable. Se podría requerir esta asociación entre Bud27/Rpb5/RSC para mantener la conformación adecuada de la cromatina en todos los genes y para modular el proceso de elongación de la transcripción de la RNA pol II y III. Debido a que Rpb5 es una subunidad común de las tres RNA pols nucleares, no podemos descartar que Bud27 también pueda

facilitar procesos similares con la RNA pol I (Mirón-García et al., 2014).

El papel de Bud27 en el núcleo no se limita a la transcripción. Se ha propuesto que Bud27 podría estar involucrado en procesos de reparación del DNA en *S. cerevisiae* y que células *bud27Δ* muestran una recombinación de cromátidas hermanas alteradas. La falta de Bud27 aumenta el nivel de Rad52, una proteína implicada en la reparación de roturas de doble cadena en el DNA durante el crecimiento vegetativo y la meiosis, así como en la recombinación homóloga (Muñoz-Galván et al., 2013). Por consiguiente, las células *bud27Δ* muestran una recombinación de cromátidas hermanas alterada. Es razonable sugerir que el deterioro de la conexión entre RSC y Bud27 podría tener un impacto en la estructura de la cromatina, afectando procesos como la reparación y recombinación del DNA (Figura I16).

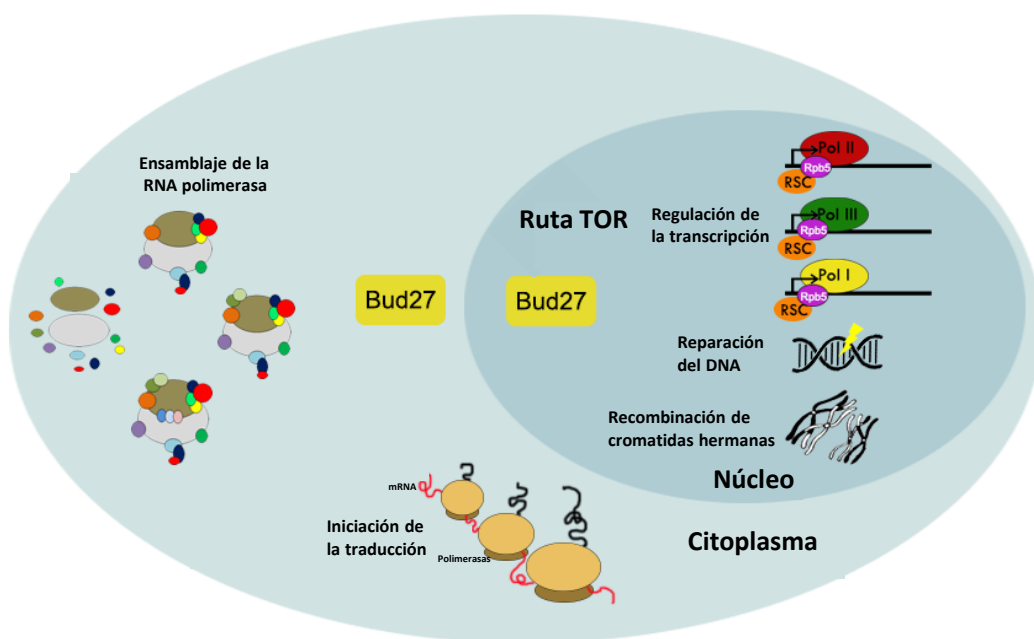


Figura I16: Representación esquemática de las diversas funciones de Bud27 en el núcleo y citoplasma en *S. cerevisiae*.

4.3 URI/Bud27, como factor implicado en la ruta TOR.

TOR ("*target of rapamycin*") es una ruta de transducción de señales conservada en todos los eucariotas, actuando como regulador en el crecimiento y metabolismo celular (revisado en (Loewith and Hall, 2011)). Existen dos complejos TOR descritos tanto para humanos como para levaduras: TOR complex 1 (TORC1 o mTORC1 en humanos) y TOR complex 2 (TORC2 o mTORC2 en humanos) (Loewith et al., 2002; Nandagopal and Roux, 2015; Reinke et al., 2004; Wedaman et al., 2003; Wullschleger et al., 2006). TORC1 compuesto por TOR1 y TOR2 es sensible a rapamicina, involucrado en la regulación de la síntesis de proteínas, transporte de nutrientes, progresión del ciclo celular y autofagia. TORC2, no es sensible a rapamicina y media la vía única de TOR2 encargada de polarizar el crecimiento celular y la actina que forma parte del citoesqueleto, entre otras funciones (Moir and Willis, 2013).

Tanto Bud27 como su ortólogo en humanos URI, parecen participar en la ruta TOR (Gstaiger et al., 2003). La inactivación de Bud27 altera la expresión de 39 genes, todos relacionados con el metabolismo de aminoácidos y de estos 29, solapan con los 331 alterados tanto en presencia de rapamicina como en condiciones de carencia de aminoácidos en células de *S. cerevisiae* (Gstaiger et al., 2003). En esta línea, la mayoría de los genes de la RNA pol II, alterados en las células *bud27Δ*, contienen un sitio de unión consenso para Gcn4, activador transcripcional de genes de aminoácidos biosintéticos bajo condiciones de carencia (Gstaiger et al., 2003; Natarajan et al., 2001). De acuerdo con esto, los análisis ChIP-Seq realizados por nuestro grupo han revelado un subconjunto de genes con ocupación de la RNA pol II alterada por la inactivación de Bud27, la mayoría de ellos putativamente regulados por GCN4 (datos no publicados). En particular, nuestros resultados también sugieren que la falta de Bud27 provoca defectos transcripcionales similares a los observados por inhibición de la vía TOR con rapamicina (datos no publicados). Es tentador especular que la disminución en la acumulación de Bud27 bajo tratamiento con rapamicina (Gstaiger et al., 2003) podría ser la causa de estos procesos comunes alterados por la inactivación de Bud27.

La vía TOR está involucrada en procesos relacionados con el crecimiento que implican la biogénesis de los ribosomas (Lee et al., 2012; Mayer and Grummt, 2006). La

síntesis de ribosomas requiere la transcripción coordinada de RNA pol I (rRNA), RNA Pol II (genes de proteínas ribosomales) y RNA Pol III (5S rRNA) (Albert et al., 2016). Debe existir comunicación entre las tres RNA pol para sintetizar los transcritos de rRNA y mRNA de proteínas ribosomales para la biogénesis de ribosomas y las tres maquinarias transcripcionales podrían estar reguladas mediante algún factor que las coordine, lo que puede apuntar a Bud27 a través de la subunidad común a las tres enzimas, Rpb5.

Objetivos/Aims

AATCGCAGT GATCGATT AGCTAGT GACGCTA AATCGCAGT GATCGATT AGCTAGT GACGCTA
ACCRACCTC GTGAGCACTT CACGAGT GCTCARCC CCRACCTC GTGAGCACTT CACGAGT GCTCARCC

OBJETIVOS

Bud27 (*prefolin-like*) y Rtr1 (fosfatasa del CTD de la RNA polimerasa II), son dos proteínas implicadas en el ensamblaje y/o transporte de las RNA polimerasas al núcleo, objetos de estudio de nuestro grupo de investigación. El papel de estas proteínas en diversas etapas del proceso de transcripción y su posible relación con los procesos de degradación de mRNA nos lleva a plantear el estudio de su influencia en el ciclo de vida de los mRNA. Los objetivos específicos son:

1. Desarrollar un método de purificación de fracciones cromatínicas enriquecidas que nos permita el análisis de las proteínas asociadas a la misma, necesaria para el desarrollo de este trabajo.
2. Analizar el papel de Bud27 en los procesos de estabilidad/degradación de los mRNA y profundizar en su conexión con la ruta TOR.
3. Analizar el papel de Rtr1 en los procesos de estabilidad/degradación de los mRNA.

AIMS

Bud27 (*prefoldin-like*) and Rtr1 (CTD phosphatase of the RNA polymerase II), are two proteins involved in the assembly and/or transport of RNA pol to the nucleus. The role of these proteins in several steps of transcription process leads us to consider the study of their influence on the mRNA life cycle. The specific objectives are:

1. To develop a method to purify chromatin enriched fractions that allow us the analysis of their associated proteins, necessary for this work.
2. To analyze the role of Bud27 in the mRNA stability/degradation processes and to establish its relationship with TOR pathway.
3. To analyze the role of Rtr1 in the mRNA stability/degradation processes.

Materiales y Métodos

AATCGCAGTGATCGATTAGCTAGTGACGCTAATCGCAGTGATCGATTAGCTAGTGACGCTA
ACCRACCTCGTGAGCACTTTCACGAGTGCTCARRCCCRACCTCGTGAGCACTTTCACGAGTGCTCARRCA

1 Medios de cultivo

1.1 Medios de cultivo para *Escherichia coli*

LB (Luria-Bertani): triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v) y NaCl 0,5% (p/v). Para la obtención de LB sólido se añadió además 1,5% (p/v) de agar.

Los antibióticos usados en el manejo de *E. coli* fueron ampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (25 µg/ml).

1.2 Medios de cultivo para *Saccharomyces cerevisiae*

- **Medio completo (YPD):** peptona 2% (p/v), glucosa 2% (p/v), extracto de levadura 1% (p/v). Para el medio sólido se añadió 2% (p/v) de agar.

- **Medio mínimo (SD: *synthetic dropout*):** base de nitrógeno para levadura (YNB) 0,17% (p/v), sulfato de amonio 0,5% (p/v), glucosa 2% (p/v). Para el medio sólido se añadió 2% (p/v) de agar. Este medio requiere de la adición de aminoácidos y vitaminas (Tabla M1) en base a la auxotrofías y prototrofías de las cepas.

- **Medio de esporulación (SPO):** acetato de potasio 1% (p/v), extracto de levadura 0,1% (p/v), glucosa 0,05% (p/v), agar 2% (p/v). Este medio debe ser suplementado con ¼ de los requerimientos habituales de aminoácidos.

1.3 Aminoácidos, vitaminas y antibióticos

1.3.1 Aminoácidos y vitaminas

Los aminoácidos y vitaminas utilizados para cultivos de *S. cerevisiae* se encuentran en la tabla M1.

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

Tabla M1: Aminoácidos y vitaminas

1.4 Drogas

▪ **Rapamicina:** Antibiótico producido como metabolito secundario por *Streptomyces hygroscopicus* (Loewith and Hall, 2011). El efecto de esta droga es inhibir la ruta de señalización TOR (del inglés “*Target Of Rapamycin*”) imitando una situación de carencia de nutrientes (Rohde et al., 2001). Esta droga se añade a medio rico YPD a una concentración variable dependiendo de los requisitos experimentales partiendo de una solución a 1M disuelta en DMSO.

▪ **Tiolutina:** Antibiótico que inhibe la actividad de la RNA polimerasa II tanto *in vivo* como *in vitro*, incrementando los niveles de genes de estrés, tales como *HSP82* (entre 5 y 10 veces), *SSA4* (más de 25 veces) y *HSP26* (más de 50 veces), en condiciones en las que la transcripción de los genes no implicados en respuesta a estrés está bloqueada (Adams and Gross, 1991). Esta droga disuelta en DMSO a una concentración de 1 mg/ml se usó con medio rico YPD a una concentración final de 5 mg/ml.

▪ **FOA:** ácido 5-fluoro-orótico (FOA) es una droga habitualmente utilizada como sistema de selección (Boeke et al., 1984). El gen *URA3* codifica la ortidina 5-fluoro-UMP fosfato descarboxilasa que convierte el ácido fluororótico en 5-fluoro-UMP, tóxico para las células. En este medio será inviable el crecimiento de cepas que contengan en el genoma el gen *URA3* o un plásmido con el mismo. Por ello, el FOA se ha utilizado como herramienta para provocar la eliminación de la célula de aquellos plásmidos no esenciales que contengan el gen *URA3*. Se añade directamente el producto en polvo a una concentración final de 0,5 mg/ml en SD suplementado con los requerimientos necesarios a cada situación experimental.

▪ **Cicloheximida:** es un inhibidor de la síntesis proteica en organismos eucariotas y es producida por la bacteria *Streptomyces griseus*. Actúa interfiriendo en la actividad peptidil transferasa del ribosoma 60S, bloqueando la elongación traduccional. Se usa a la concentración necesaria en medio mínimo SD con los requerimientos específicos, desde una solución a una concentración de 50 mg/ml disuelta en metanol.

2 Técnicas de manipulación en *Saccharomyces cerevisiae* y *Escherichia coli*

2.1 Técnicas de manipulación de *Saccharomyces cerevisiae*

2.1.1 Condiciones de cultivo

Las células se cultivaron a temperatura óptima o permisiva de 30°C. Las temperaturas restrictivas, dependiendo de la condición experimental, fueron de 33°C, 35°C y 37°C. Para todas las temperaturas, los cultivos líquidos se incubaron con una agitación de 180 rpm.

2.1.2 Transformaciones

2.1.2.1 Transformación rápida

Para la transformación rápida con plásmido en *S. cerevisiae*, se utilizó el protocolo previamente descrito (Chen et al., 1992), que parte de un pellet de células recogidas en fase exponencial ($D.O_{600} \sim 0,5-0,8$), crecidas en medio YPD o SD líquido a 30°C. Estas células se lavaron dos veces con H₂O miliQ y se centrifugaron a 2500 rpm durante 4 minutos. Dicho pellet se resuspendió en 150 µl de PEG₄₀₀₀ 40% (p/v), LiAc 0,2 M, DTT 0,05 M y 1-3 µg de DNA. Posteriormente se realizó un choque térmico a 45°C durante 45 minutos. Una vez finalizado, las células se recogieron mediante centrifugación a bajas revoluciones (2500 rpm), lavándolas con H₂O miliQ. Por último se resuspendieron en 200 µl de H₂O miliQ, sembrándose en placas adecuadas para cada experimento.

2.1.2.2 Transformación por el método Acetato de Litio/polietilenglicol

Método descrito previamente (Gietz et al., 1995) con modificaciones, en el cual, se partió de un pellet de células recogidas en fase exponencial ($D.O_{600} \sim 0,5-0,8$), crecidas en medio YPD o SD líquido a 30°C. Estas células se lavaron dos veces con H₂O miliQ y se centrifugaron a 2500 rpm durante 4 minutos. A continuación, se volvió a lavar el pellet de células con 0,1 volumen de TE/LiAc (TE [Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5]; LiAc [LiAc 0,1 M, pH 7,5]) respecto al volumen inicial de cultivo recogido. Las células se resuspendieron en 50 µl de TE/LiAc, incubándose a 30°C durante 1 hora en presencia de 300 µl de 40% (p/v) PEG₄₀₀₀/TE/LiAc, y añadiendo 50 µg de DNA de esperma de salmón desnaturalizado y 1 µg del DNA de interés. Posteriormente se realizó un choque térmico a 42°C durante 20

minutos. Tras el choque térmico, se realizaron 2 lavados con H₂O miliQ, a 2500 rpm durante 2 minutos, resuspendiendo finalmente las células en 400 µl de H₂O miliQ y sembrándolos en los diferentes medios y condiciones que requiera el experimento. En caso de que el medio incluya el antibiótico G-418 a una concentración final de 0,4 mg/ml, antes de sembrarse, las células fueron sometidas a un proceso de recuperación en 1 ml de YPD durante 2 horas a 30°C en el baño, para permitir la expresión del gen de resistencia.

2.1.3 Determinación de sexos en células haploides, construcción de cepas diploides, esporulación y selección de esporas.

2.1.3.1 Construcción de cepas diploides

Previamente a la construcción de cepas diploides, se comprobó el sexo de las cepas mediante una PCR de colonias (explicado en apartado de PCRs), usando los oligos *A1*, *alpha1* y *Mat_reverse* (Tabla suplementaria M4), seguida de la comprobación del tamaño diferencial entre *MATa* o *MATα* mediante electroforesis en un gel de agarosa. La construcción de cepas diploides se realizó cruzando cepas de sexo contrario (*MATa*, *MATα*); para ello se resuspendieron células de ambos sexos en 50 µl de H₂O miliQ y se depositaron 5 µl en una placa con medio rico sólido YPD y se incubaron durante 12 horas a 30°C. Para la selección posterior de las cepas diploides, se aislaron colonias de este cruce y se seleccionaron aquellas que contenían los marcadores de auxotrofia requeridos. Cuando esto no era posible, se seleccionaban las colonias mayores y se les comprobaba por PCR la presencia de marcadores para los dos sexos.

2.1.3.2 Esporulación

Para la obtención de cepas haploides a partir de cepas diploides se empleó el medio de esporulación (SPO), descrito en medios de cultivo; con ello se somete a las células a condiciones adversas de crecimiento con bajos niveles de fuente de carbono y nitrógeno, favoreciendo la división meiótica y dando lugar a cuatro células hijas envueltas en un asca única. Se incubaron las células a 30°C durante varios días hasta la observación al microscopio de la formación de ascas (tétradas) con esporas.

2.1.3.3 Selección de las células haploides tras la esporulación

Para la selección de las células haploides hay que digerir el asca que las envuelve utilizando Zimoliasa 20T (US Biological) a una concentración de 1 mg/ml, a 37°C durante 30 minutos. Esta solución se agitó suavemente para disgregar las esporas y se sembraron en medios selectivos para la obtención de las células haploides de interés.

Empleando el mismo método de PCR que utilizábamos en la determinación del sexo, comprobamos la haploidía de las células seleccionadas.

2.1.3.4 Construcción de cepas mediante la delección de genes y adición de etiquetas.

La delección de genes y adición de etiquetas se realizó por recombinación homóloga transformando las células de levadura con el producto de DNA de interés amplificado por PCR.

Para la generación de cepas conteniendo *rtr1::TAP*, se amplificó el fragmento *rtr1::TAP::HIS* desde una cepa que contiene este alelo, con los oligos *RTR1-501* y *RTR1-301*, y se procedió a la posterior transformación con las cepas requeridas.

Para la delección de *RTR1*, *rtr1Δ*, se amplificó el fragmento *rtr1::KanMX4* desde la cepa YFN161 con los oligos *RTR1-501* y *RTR1-301*, y este se utilizó para transformar las cepas correspondientes.

2.2 Manipulación de *Escherichia coli*

Las condiciones óptimas de cultivo de *E. coli* son 37°C de temperatura a una agitación de 180 rpm en el caso de cultivos en medio líquido. Para el cultivo de *E. coli* se usó el medio LB suplementado con ampicilina 100 µg/ml o kanamicina 25 µg/ml dependiendo de las necesidades experimentales.

La extracción de plásmido se realizó usando el kit comercial PureYield™ Plasmid Miniprep System (*Promega*), siguiendo el protocolo establecido.

Para la transformación de bacterias con plásmidos se emplearon células electrocompetentes XL1-blue. El protocolo de electroporación parte de 50 µl de células electrocompetentes ($\sim 2 \times 10^{10}$ células/ml) a las que se le añadió 1 µg de plásmido en una

cubeta de electroporación estéril (enfriada previamente en hielo) de 0,2 cm de anchura. Tras un pulso eléctrico de 4-5 milisegundos y un campo eléctrico de 12,5 kV/cm (Equipo MicropulserTM; Biorad), las células fueron resuspendidas en 1 ml de medio de recuperación SOC (atemperado previamente a 37°C) e incubadas a 37°C durante 1h. Las células fueron sembradas en placas de LB sólido suplementado con el antibiótico requerido.

Para la preparación de células electrocompetentes todo el procedimiento debe realizarse en frío. Se partió de 1L de cultivo de células de la cepa XL1-blue, crecidas en medio LB y recogidas en fase exponencial ($D.O_{600} \sim 0,5$) y centrifugando a 5.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente se lavó el pellet de células, dos veces con 1 volumen de H₂O miliQ estéril fría y una vez con 0.01 volúmenes de 10% (v/v) glicerol estéril frío respecto al volumen de cultivo recogido. Las células se resuspendieron en 1 ml de glicerol 10% (v/v) (lo que supone una concentración de 1000 veces). Posteriormente se prepararon alícuotas de 50 µl, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

3 Técnicas de Biología Molecular

3.1 Técnicas de Análisis y manipulación de ácidos nucleicos

3.1.1 Extracción de DNA genómico de *Saccharomyces cerevisiae*

Para la extracción de DNA genómico se partió de un pellet de células procedente de un cultivo de 10 ml (30°C en YPD líquido en fase exponencial $D.O_{600} \sim 0,6-0,8$), o a partir de una buena masa de células recogidas de una placa del medio que corresponda. Este pellet se resuspendió en 200 µl de tampón de extracción (SDS 1% (p/v), Triton X-100 2% (v/v), NaCl 100 mM) y se añadieron 300 µl de perlas de vidrio (425-600 µm, SIGMA) y 200 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), pH 8. La mezcla se agitó con vórtex a máxima potencia durante 4 minutos a 4°C. Tras la rotura se le añadieron 200 µl de tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8) y se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se precipitó con 1 ml de etanol absoluto frío (-20°C), tras mezclar por inversión. Se centrifugó de nuevo a 13.000 rpm, 5 minutos, a 4°C, y se resuspendió el pellet en 400 µl de tampón TE, incubándolo a 37°C hasta su disolución completa. Posteriormente se añadieron 10 µl de acetato sódico 4 M y 2,5 volúmenes (1 ml) de etanol absoluto frío (-20°C), se mezcló por inversión y se centrifugó a 13000 rpm durante 5

minutos a 4°C. Una vez precipitado el DNA, fue lavado con 1 ml de etanol al 70% (v/v), secado y resuspendido en 50 µl de H₂O miliQ estéril.

3.1.2 Extracción de RNA de *Saccharomyces cerevisiae*

Para la extracción de RNA se partió de 10 ml de cultivo recogido a una D.O₆₀₀~0,6 (fase exponencial) mediante centrifugación a 4000 rpm, 4°C durante 3 minutos (para una mayor extracción de RNA se puede emplear más volumen de cultivo). El pellet se lavó con 1 ml de H₂O miliQ y se resuspendió en 200 µl de LETs (LiCl 5M, EDTA 0,5M pH 8, SDS 10% (p/v) y Tris-HCl 1M pH 7,5), 100 µl fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (125:24:1) pH 4,7 y 100 µl de perlas de vidrio (425-600 µm, SIGMA), agitándose con vórtex durante 12 minutos a 4°C a máxima potencia. Posteriormente se centrifugó durante 5 minutos a 12000 rpm y 4°C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo al que se añadió un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (125:24:1) pH 4,7. Se mezcló suavemente con el vórtex para mezclar y se centrifugó en las mismas condiciones. Se recuperó el sobrenadante añadiéndole un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Se mezcló y se centrifugó 5 minutos a 12000 rpm a 4°C. El sobrenadante se precipitó con un volumen de LiCl 5M a -20°C durante 3 horas (u “*overnight*”). Se centrifugó durante 5 minutos a 12000 rpm a 4°C, se lavó el pellet con 70% (v/v) de etanol frío y se resuspendió en 300 µl de H₂O miliQ. Posteriormente el RNA se precipitó con 1/10 del volumen de acetato sódico 3M y dos volúmenes de etanol absoluto frío a -20°C durante 1 hora u “*overnight*” a -20°C. Tras la precipitación, se centrifugó durante 15 minutos a 14000 rpm y 4°C, se lavó el pellet con 70% (v/v) de etanol frío, se dejó secar a temperatura ambiente y finalmente se resuspendió en 50 µl de H₂O miliQ.

3.1.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para el análisis por PCR se emplearon tres DNA polimerasas diferentes dependiendo de los requerimientos experimentales.

- DNA polimerasa *BIOTOOLS* (BIOTOOLS B&M Labs, S.A.) utilizada para la comprobación de marcadores de cepas y fragmentos de DNA inferiores a 1Kb.
- *iProof High-Fidelity DNA Polymerase* (BioRad), se utilizó para amplificar fragmentos destinados a recombinación homóloga y clonación debido a su alta fidelidad.

- *iTaq™ DNA Polymerase (BioRad)*, enzima empleada de forma rutinaria para comprobación de fragmentos grandes.

Para PCRs de colonias de levadura, se resuspendió una colonia en 2,4 µl de NaOH 0,02N, se congeló en nitrógeno líquido y posteriormente se incubó a 100°C durante 10 minutos. Finalmente se le añadieron a la solución los respectivos reactivos de la PCR y se procedió a realizar la PCR.

3.1.4 Transcripción reversa o retrotranscripción (RT)

Para el análisis de RNA mediante PCR a tiempo real, es necesario sintetizar cDNA a partir de este. Se empleó el kit comercial *iScript™ cDNA synthesis kit (BioRad)*, siguiendo las especificaciones del fabricante. Se usó 1 µg de RNA y se utilizó un volumen final de reacción de 20 µl a los que se añadieron 80 µl de H₂O miliQ libre de DNasa y RNasa tras la retrotranscripción, para conseguir un volumen final de 100 µl. Para la PCR cuantitativa a tiempo real se empleó una dilución 1:100 de dicho cDNA.

3.1.5 PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)

Las reacciones de qPCR se realizaron utilizando los equipos *CFX96™* y *CFX384™ Real-time PCR detection systems (BioRad)*.

Para el análisis de cDNA procedente mRNA se empleó kit comercial *SsoFast™ EvaGreen® Supermix (BioRad)*. Para ello se emplearon 1:100 del cDNA preparado según se indica anteriormente, 10 pmoles de cada oligonucleótido y 2,5 µl de la mezcla de reacción en un volumen de reacción final de 5 µl.

Los resultados obtenidos fueron analizados con el software *CFX Manager™ 3.1 (Biorad)*.

3.1.6 Análisis mediante cuantificación y electroforesis de ácidos nucleicos

La electroforesis de los ácidos nucleicos se realizó en geles de agarosa, entre el 0,6-2,5% (p/v) dependiendo del tamaño de los mismos, preparados con tampón TAE 0,5X (Tris-acetato 20 mM, EDTA 1 mM, pH 8,5). A las muestras se les añadió tampón de carga (azul de bromofenol 0,25% (p/v), glicerol 30% (v/v)) a una concentración final de 1X. Se

visualizaron los ácidos nucleicos usando SYBR Green (*Invitrogen™*) o bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y luz ultravioleta.

Para la cuantificación tanto de RNA como DNA se utilizó el equipo NanoVue® Plus Spectrophotometer (GE Healthcare).

3.1.7 Análisis de la estabilidad de mRNAs

Para el análisis de la tasa de degradación de mRNA, se crecieron las células en 150 ml de SD líquido (con los requerimientos específicos) a 30°C en agitación (180 rpm). Cuando el cultivo alcanzó una D.O₆₀₀~0,5, se añadió tiolutina a una concentración final de 5 µg/ml, provocando una parada en la transcripción. Se recogieron alícuotas de 15 ml a los diferentes tiempos requeridos, recuperándose el pellet de células con una centrifugación de 2 minutos a 4000 rpm, y posteriormente congelándolo en N₂ líquido. A partir de estas muestras se realizaron extracciones de RNA (apartado 3.1.2), analizándose por RT-qPCR (apartado 3.1.3) y Dot-blot.

3.1.8 Dot-blot

Para el análisis de RNA mediante Dot-blot se midió la concentración utilizando el equipo NanoVue® Plus Spectrophotometer (GE Healthcare) y se diluyeron las muestras a la misma concentración final. Se depositaron gotitas del mismo tamaño (1 µl de volumen y 2 µg de RNA) de cada muestra sobre una membrana de nitrocelulosa previamente lavada 2 veces durante 5 minutos con tampón SSC 2X (SSC 20X: NaCl 3M, Citrato sódico 300mM pH 7). Puesto que la mayor parte del RNA es ribosómico, usamos la cuantificación de RNA total para normalizar la carga. Una vez la gotas habían empapado la membrana y no quedaba líquido, se incubó la membrana en una estufa a 65°C durante 5 minutos, seguido de “crosslinking” durante 2 minutos con luz UV a potencia de 400 mJ/cm² y una longitud de onda de 254 nm, en un UV crosslinker (Biolink Shortwave 254nm).

Posteriormente se procedió a hibridar el RNA con la sonda correspondiente. Para ello, la membrana se incubó en tampón de hibridación (NaPO₄ 0,5 M pH 7, EDTA 10 mM y SDS 7% (p/v)) previamente calentado a la temperatura de *melting* del oligodT (56º) durante 45-60 minutos. Posteriormente se añadieron 50 pmol de oligodT (oligodTCy3), incubándose a la misma temperatura de *melting* durante toda la noche. Tras la

incubación, se realizaron 6 lavados de 10 minutos, a temperatura ambiente, con tampón de lavado (NaPO_4 0.28 M pH 7,2, SDS 7% (p/v)), previamente calentado a la temperatura de hibridación (56°C).

La fluorescencia se analizó en el documentador de geles (Versadoc) de los Servicios centrales de apoyo a la investigación (SCAI) de la Universidad de Jaén, utilizando el programa Quantity One, optimizado para la detección de fluorescencia roja a una longitud de onda de 635 nm.

3.1.9 RNA-seq (secuenciación del RNA)

3.1.9.1 Extracción de RNA

Para la secuenciación de RNA de células de *S. cerevisiae* se partió de RNA extraído tal y como se explica en el apartado correspondiente, a partir de 50 ml de cultivo.

3.1.9.2 Secuenciación de mRNA y determinación de los sitios de poli(A). Método 3'T-fill

La secuenciación de mRNA y determinación de los sitios de poli(A) en todo el genoma se realizó utilizando el método 3'T-fill (Wilkening et al., 2013) (Figura M1) y en colaboración con en el laboratorio del Dr. Steinmetz en el European Molecular Biology Laboratory (EMBL) Heidelberg, Alemania.

En primer lugar, se generó la librería de cDNAs usando el kit QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit for Illumina en el "Gene Core del EMBL (Alemania). Una vez obtenida la librería, se cargó en la estación de cluster (cBot, Illumina), añadiendo el tampón T-fill (Wilkening et al., 2013). durante 5 minutos se incubó a 60°C, permitiendo que el cebador compuesto por timinas (dTTPs) se alinee al fragmento de poli(A) donde se rellena con dTTPs (Figura M1B). Posteriormente se pasa al secuenciador HiSeq 2000 (Illumina) (Figura M1C), secuenciándose los mRNAs desde el primer nucleótido inmediatamente posterior al poli(A). Los datos obtenidos, se procesaron durante mi estancia doctoral en el Karolinska Institutue, Estocolmo (Suecia), en colaboración con el Dr. Pelechano.

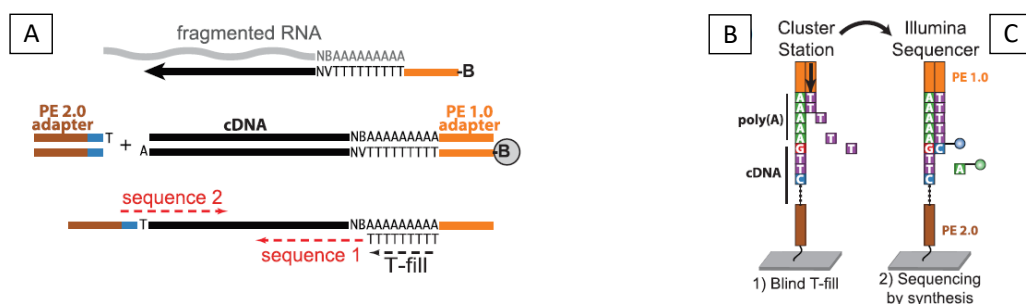


Figura M1: Esquema general del método 3'T-fill. A) Esquema del protocolo 3'T-fill. El RNA fragmentado se transcribe de forma inversa con un cebador oligo (dT) acoplado al adaptador PE 1.0 (naranja) y biotina (B). Después de la síntesis de la segunda cadena el adaptador PE 2.0 (marrón) se liga al fragmento unido. B) En la estación de clúster, la cola de poli(A) se rellena con nucleótidos dTTPs complementarios sin etiqueta. C) Posteriormente, la secuenciación comienza directamente al final de la 3'-UTR (primer nucleótido tras la cola poli(A)) (Wilkening et al., 2013).

En base a la metodología utilizada en el método 3'T-fill, el tipo de secuenciación empleado parte del extremo 3', a partir del nucleótido pegado a la cola de poli(A). Por tanto, en las secuencias nunca debe aparecer como primer nucleótido la timina. Esto se comprobó mediante el programa FastQC (Figura M2).

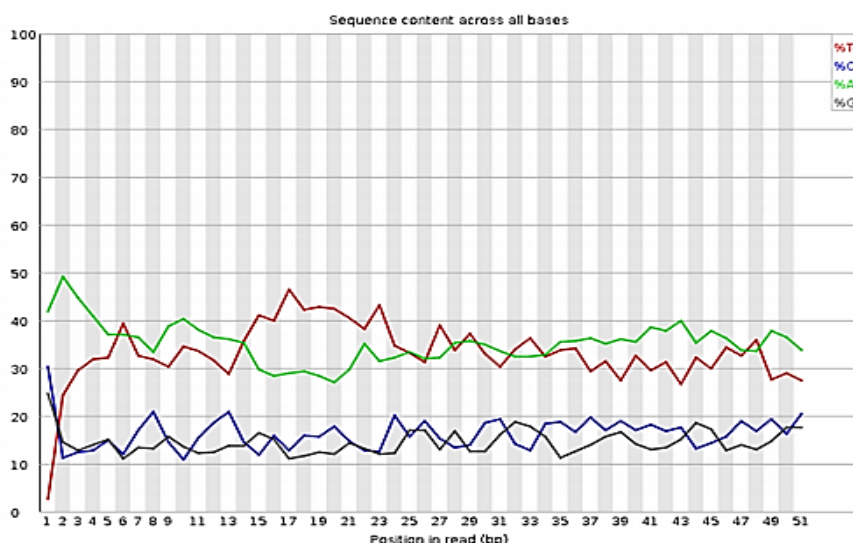


Figura M2: Representación mediante el programa FastQC, de la disposición de los diferentes nucleótidos en el conjunto de los transcritos. Como se observa como primer nucleótido de los transcritos no aparece Timina (en rojo) en la totalidad de los transcritos. Se usó la metodología 3'T-fill, mediante la cual se secuencia a partir del primer nucleótido después de la cola de poli(A).

3.1.9.3 Pre-procesamiento y alineamiento

La eliminación de los adaptadores (*barcode*) se realizó mediante el paquete *fastx_clipper*. El alineamiento se realizó con *hisat2*-2.0.5 utilizando el genoma de referencia de *S. cerevisiae* S288c *genome* (SGD R64).

3.1.9.4 Establecimiento de los sitios de poliadenilación

La identificación de los sitios de poliadenilación se estableció a partir de los sitios de poliadenilación preestablecidos (Xu et al., 2009), en torno al cual se analizó un rango de +/- 200 pb (variable dependiendo de los análisis), utilizando el programa Rstudio.

La poliadenilación de genes específicos se visualizó con el programa Integrative Genomics Viewer (IGV) (Robinson et al., 2011; Thorvaldsdóttir et al., 2013)

3.1.9.5 Análisis de la expresión diferencial

La determinación de los niveles de transcritos de cada uno de los genes se desarrolló en R/Bioconductor, a partir de una versión avanzada del paquete DESeq (Anders and Huber, 2010), DESeq2.

Para ello, en primer lugar se hizo un análisis de similitud de las réplicas y calidad de las muestras. Se usaron tres tipos de análisis con el mismo fin: PCA, *heatmap* y *heatpairs*. En este caso la utilización de los datos en logaritmo en base 2, tal cual se emplea para analizar los niveles de expresión, plantea el siguiente problema: los genes con bajo nivel de conteo tienden a dominar el resultado, debido al fuerte ruido de fondo (Poisson) inherente en los conteos de los valores pequeños. Para solucionar este problema, DESeq2 ofrece una transformación regularizada del logaritmo (rlog), donde los genes con altos niveles de conteos no difieren mucho del logaritmo en base 2 ordinario; sin embargo, para los genes con niveles de conteos bajos, los valores se reducen a los promedios de los genes en todas las muestras, permitiendo de este modo obtener un análisis representativo.

3.2 Técnicas de análisis proteicos

3.2.1 Extracción de proteínas

Se partió de un volumen de cultivo estándar de 100 ml, crecido a 30°C en agitación (180 rpm), en fase exponencial a $D.O_{600} \sim 0,6-0,8$ y las células se recogieron por centrifugación durante 5 minutos a 4000 rpm y 4°C. Posteriormente se lavaron con 1 ml de H₂O miliQ. El pellet de células se resuspendió en 300 μ l 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 200 μ l de bolitas de vidrio (425-600 μ m, SIGMA). Posteriormente, se agitó a máxima potencia durante 15 minutos a 4°C, incubando cada 5 minutos los tubos en hielo 1 minuto. Tras la rotura se centrifugó a 14000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante que se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Los extractos celulares pueden almacenarse finalmente a -80°C.

Para cuantificar la concentración de proteínas obtenidas, se empleó el método de Bradford (Bradford, 1976) que utiliza una recta patrón realizada con BSA (Albúmina de suero bovino).

3.2.2 Análisis de proteínas por western-blot

Para el análisis de las proteínas mediante western-blot se llevó a cabo una electroforesis de las muestras en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con la presencia de SDS (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). El porcentaje de acrilamida empleado tanto para geles continuos como discontinuos, va a depender del tamaño de la proteína de interés de cada experimento. El tampón de electroforesis empleado está compuesto por Tris-HCl 50 mM pH 8,3-8,6, glicina 0,38 M, SDS 0,1% (p/v), y se usó un voltaje constante entre 100-200V. Una vez terminada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF Immobilon-P (Millipore®), activadas previamente durante 15 segundos en metanol. La transferencia se realizó mediante electrotransferencia semiseca en Trans-Blot Semidry Transfer Cell (BioRad). Para ello, se colocaron sobre el ánodo, en el siguiente orden, 3 piezas de papel whatman® del mismo tamaño (de 1 cm mayor a cada lado de la membrana) empapadas en tampón ánodo I (Tris-HCl 0,3 M pH 10,4, metanol 10%

(v/v)), 2 piezas de papel whatman® empapadas en tampón ánodo II (Tris-HCl 25 mM pH 10,4, metanol 10% (v/v)), la membrana de PVDF, el gel de poliacrilamida y 3 piezas de papel whatman® empapadas en tampón cátodo (Tris-HCl 25 mM pH 9,4, metanol 10% (v/v), glicina 40 mM). Tras colocar el cátodo, se llevó a cabo la transferencia durante 45 minutos, aplicando una corriente de 2,5 mA/cm² (relativo al tamaño de las piezas papel usadas). La comprobación de la transferencia de las proteínas se realizó mediante incubación de la membrana con una solución de rojo Ponceau (Rojo Ponceau 0,5% (p/v), ácido acético glacial 1% (v/v)), durante 5 minutos en agitación a temperatura ambiente y lavado con H₂O destilada.

Las membranas se bloquearon con leche en polvo al 5% (p/v) en tampón PBST (Tween20 0,05% (p/v) diluido en PBS), durante 40 minutos a temperatura ambiente u *overnight* a 4°C. El anticuerpo primario (Tabla suplementaria M5) se diluyó en una solución de tampón PBST con 2% (p/v) de leche en polvo y se incubó situando la membrana en una pieza de parafilm M®, vertiendo en ella el anticuerpo de modo estático, durante 90 minutos a temperatura ambiente u *overnight* a 4°C. Posteriormente se lavó la membrana con PBST conteniendo 2% (p/v) de leche en polvo, 3 veces durante 10 minutos en agitación. El anticuerpo secundario (Tabla suplementaria M5) se diluyó en una solución de tampón PBST y se incubó del mismo modo que el anticuerpo primario pero durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente la membrana se lavó con PBST, 3 veces durante 10 minutos, a temperatura ambiente en agitación. Para la detección quimioluminiscente se empleó el kit comercial *ECL-prime kit (Amersham)* siguiendo las especificaciones del fabricante.

Deshibridación de las membranas

En algunos casos se requiere analizar diferentes proteínas con distintos anticuerpos. Para eliminar los anticuerpos previamente usados, las membranas se incubaron durante 30 minutos en solución de deshibridación (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 2% (p/v), β-mercaptoetanol 100 mM), a 50°C, en un horno de hibridación y se lavaron posteriormente tres veces durante 5 minutos, a temperatura ambiente en PBST. Tras esto pueden usarse siguiendo el procedimiento estándar descrito.

3.2.3 Precipitación con TCA

Para concentrar los extractos proteicos se añadió TCA a una concentración final del 10% (v/v) desde una concentración de TCA al 100% (v/v). La muestra se incubó en hielo durante 30 minutos u *overnight* a -20°C. Posteriormente se centrifugó la solución de proteínas durante 15 minutos a 4°C y 14000 rpm. El pellet obtenido se lavó con acetona fría dos veces durante 15 minutos a 4°C y 14000 rpm y se secó a 60°C durante algunos minutos. El pellet resultante se resuspendió en tampón de carga 1X y se hirvió durante 5 minutos para su posterior análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.

3.2.4 Aislamiento del mRNA y análisis de las proteínas asociadas, UV-crosslinking

Se crecieron 25 ml de células a 30°C, en medio SD líquido (con todos los requerimientos), hasta $D.O_{600} \sim 0,6-0,7$. El pellet recogido mediante una centrifugación de 2 minutos a 4000 rpm, se resuspendió en 30 ml de PBS 1X, NP40 0,005 % (v/v), que posteriormente se vertió a una placa de Petri (90 x 15mm), donde se fijaron las proteínas asociadas al mRNA en tres etapas de UV a 400 mJ/cm² con dos minutos en hielo entre cada etapa, a longitud de onda de 254 nm (total 1,200 mJ/cm²) en un UV crosslinker (Biolink Shortwave 254nm). Tras la fijación se procedió a la rotura celular, resuspendiendo las células en 500 µl de tampón de lisis (Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, EDTA 1 mM, protease inhibitor cocktail 1X (Complete; Roche)), mediante agitación en vórtex durante 4 minutos a 4°C y máxima potencia. Se centrifugó a 500 xg durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante se sometió al mismo procedimiento de centrifugación. Se descartó el pellet y el sobrenadante se pasó por una jeringa de 1 ml U-100 Insulina con tamaño de aguja (0,5 x 16 mm). Se centrifugó de nuevo a 500 xg, 5 minutos, a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Se guardó una alícuota como extracto celular y el resto se incubó con la resina oligo dT₍₂₅₎ Cellulose Beads (BioLabs) (200 µl/muestra) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó suavemente 20 segundos eliminando el sobrenadante. La resina se lavó 5 veces con tampón de lisis y otras 5 veces con tampón de lisis aumentando la concentración de NaCl a 1M. Posteriormente se lavó 1 vez con el tampón bajo en sales (Tris 10 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM). Finalmente la resina se hirvió en 30 µl de tampón de carga con tampón Laemli 1X. Tras esto

se descartó la resina y se recuperó el sobrenadante conteniendo las proteínas para proceder al análisis por western blot.

3.2.5 yChEFs (yeast *Chromatin Enriched Fractions*)

El protocolo del aislamiento de fracciones cromatínicas enriquecidas, yChEFs, con las proteínas asociadas, se desarrolla en detalle en el Capítulo I.

4 Determinación del tamaño y número celular mediante citometría de flujo

La determinación del tamaño relativo de las células de cada cepa y el número de células por unidad de volumen se realizó usando el citómetro de flujo (*Beckton Dickinson - BD LSRFORTESSA*) de los Servicios centrales de apoyo a la investigación (SCAI) de la Universidad de Jaén, utilizándose el láser 488 NM. El programa de análisis empleado fue Beckton Dickinson - BD FACSDIVA V6.2.

Tabla suplementaria M1: Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Estirpes	Genotipo	Referencias
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Euroscarf
BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	Euroscarf
Dhh1-HA	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 dhh1-HA-HIS3</i>	Cedida por el Dr. José Enrique Pérez
PAY515	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YDL160c(dhh1Δ)::KanMX4</i>	Euroscarf
RTR1:TAP	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rtr1::TAP::HIS3MX6</i>	Open Biosystem
Rtr1:TAP rpb4Δ	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rtr1::TAP::HIS3MX6 YJL140w(rpb4Δ)::kanMX4</i>	Cedida por la Dra. Olga Calvo
Y01285	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YJL140w(rpb4Δ)::kanMX4</i>	Euroscarf
YFN104	<i>MATα ura3-52 his3Δ200 leu2-3,112 trp1Δ63 rpb1-Δ187::HIS3 + pYEB220-rpb1-84 (2μm LEU2 RPB1)</i>	(Garrido-Godino et al., 2013)
YFN105	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 trp1-Δ63 YFL023W(bud27Δ)::kanMX4</i>	(Mirón-García et al., 2013)
YFN116	<i>MATα ura3-52 his3Δ200 leu2-3,112 trp1Δ63 rpb1-Δ187::HIS3 + pYEB220 (2μm LEU2 RPB1)</i>	(Garrido-Godino et al., 2013)
YFN117	<i>MATα ura3-52 his3Δ200 leu2-3,112 trp1Δ63 rpb1-Δ187::HIS3 + pYEB220-rpo21-4 (2μm LEU2 RPB1)</i>	(Garrido-Godino et al., 2013)
YFN161	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YER139c(rtr1Δ)::kanMX4</i>	Desde el diploide Y26137 (Euroscarf)

YFN382	<i>MATα ura3-52 his3Δ200 leu2-3,112 trp1Δ63 rpb1-Δ187::HIS3 + pYEB220 (2μm LEU2 RPB1) ceg1::13Myc::kanMX6</i>	Este trabajo
YFN383	<i>MATα ura3-52 his3Δ200 leu2-3,112 trp1Δ63 rpb1-Δ187::HIS3 + pYEB220-rpo21-4 (2μm LEU2 RPB1) ceg1::13Myc::kanMX6</i>	Este trabajo
YFN384	<i>MATα ura3-52 his3Δ200 leu2-3,112 trp1Δ63 rpb1-Δ187::HIS3 + pYEB220-84 (2mm LEU2 RPB1) ceg1::13Myc::kanMX6</i>	Este trabajo
YFN574	<i>MATα ura3-52 his3Δ200 leu2-3,112 trp1Δ63 rpb1-Δ187::HIS3 + pYEB220 (2mm LEU2 RPB1) abd1::13Myc::kanMX6</i>	Este trabajo
YFN575	<i>MATα ura3-52 his3Δ200 leu2-3,112 trp1Δ63 rpb1-Δ187::HIS3 + pYEB220-rpo21-4 (2μm LEU2 RPB1) abd1::13Myc::kanMX6</i>	Este trabajo
YFN576	<i>MATα ura3-52 his3Δ200 leu2-3,112 trp1Δ63 rpb1-Δ187::HIS3 + pYEB220-84 (2μm LEU2 RPB1) abd1::13Myc::KanMX6</i>	Este trabajo
YFN735	<i>Mata ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 YER139c(rtr1Δ)::KanMX4 dhh1Δ::KanMX4</i>	Este trabajo
YFN737	<i>Mata ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 YER139c(RTR1)::TAP::HIS3MX6 YGL173C(xrn1)::kanMX4</i>	Este trabajo
YFN738	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YDL160c(dhh1Δ)::KanMX4 rtr1::TAP::HIS3MX6</i>	Este trabajo
YFN739	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YER139c(rtr1Δ)::KanMX4 YDL160c(dhh1Δ)::KanMX4</i>	Este trabajo
YFN740	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 dhh1-HA-HIS3 RTR1::TAP::HIS3MX6</i>	Este trabajo
YFN741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 dhh1-HA-HIS3 YER139c(RTR1)::TAP::HIS3MX6 YJL140w(rpb4Δ)::kanMX4</i>	Este trabajo
YFN742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 dhh1-HA-HIS3</i>	Este trabajo
YFN1076	<i>Mata ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 YGL173C(xrn1)::kanMX4</i>	Euroscarf

Tabla suplementaria M2: Oligonucleótidos para PCR cuantitativa en tiempo real (*RT-qPCR*).

Oligos (<i>RT-qPCR</i>)	Secuencia	Región
18S-501	CATGGCCGTTCTTAGTTGGT	Región interna al gen
18S-301	ATTGCCTCAAACCTCCATCG	Región interna al gen
ACT1-501	GCCTTCTACGTTTCCATCCA	Región codificante central
ACT1-301	GGCCAAATCGATTCTCAAAA	Región codificante central
CPA2-501	TTTCTCCAGACCACCCAGTC	Región codificante 3'
CPA2-301	GCTTTTGCGACCTTATCAGC	Región codificante 3'
HHT1-501	TGCCTTTCCAAAGATTGGTC	Región codificante 3'
HHT1-301	TTGGATAGTGACACGCTTGG	Región codificante 3'
RPB6-501	TGTGCTTAATGCCCTTATTTG	Región codificante 5'
RPB6-301	AAAGCAGTCAGCAGCTTTTT	Región codificante 5'
PMA1-6 (forw)	ATATTGTTACTGTCGTCGGTGTCTGGAT	Región codificante 3'
PMA1-6 (rev)	ATTAGGTTTCCTTTTCGTGTTGAGTAGA	Región codificante 3'
DHH1-501	TACCTGTCCCATTCCCGATA	Región codificante 3'
DHH1-301	GTGGAGGATACGCCTGTTGT	Región codificante 3'
RTR1-503	CCTGAACAGGACAAACACGA	Región codificante 3'
RTR1-304	TTCTGTAGTCCCACTGTCAGGA	Región codificante 3'
RPB4-503	GGAGTTGGAGTCTATCGACGTT	Región codificante 3'
RPB4-302	CCAGTGCTTTTCAGAAGCTG	Región codificante 3'

Tabla suplementaria M3: Oligonucleótidos para delección de genes mediante recombinación homóloga.

Oligos (Recombinación homóloga)	Secuencia	Región
<i>RTR1-501</i>	TCCGATATTTTGTCCGAAATAGG	Anterior a <i>RTR1</i>
<i>RTR1-301</i>	GACTCAAAGTGAATTATAGCAAAG	Posterior a <i>RTR1</i>

Tabla suplementaria M4: Oligonucleótidos para análisis de marcadores

Oligos (análisis de marcadores)	Secuencia	Región
<i>A1</i>	TCATCAATATCACCCAAGC	Región codificante
<i>alpha1</i>	TACTTCGAAGCCTGCTTCA	Región codificante
<i>MAT_reverse</i>	GCTTGTACCAGAGGAAGCAAA	Aguas abajo del codón de STOP

Tabla suplementaria M5: Anticuerpos

Proteína	Anticuerpo primarios	Concentración	
Pgk1	(459250). 3-Fosfoglicerato quinasa (PGK) (Invitrogen)	1:7000 para western blot	Ratón (monoclonal)
Rpb3	(1Y26). Subunidad de la RNA polimerasa II (Abcam)	1:1000 para western blot	Ratón (monoclonal)
Rpb4	(2Y14). Subunidad de la RNA polimerasa II (Santa Cruz Biotechnology)	1:1000 para western blot	Ratón (monoclonal)
TAP	Anti-PAP (Sigma)	1:7000 para western blot	
Rpb1	(8WG16). Dominio C-terminal del CTD (RNA polimerasa II, subunidad Rpb1) (Santa Cruz Biotechnology)	1:1000 para western blot	Ratón (monoclonal)
HA	(12CA5). Roche. Reconoce la secuencia YPYDVPDYA del péptido HA	1:750 para western blot	Ratón (monoclonal)
Histona H3	(ab1791). Extremo C-terminal (100 aa) de la histona H3 humana(abcam)	1:7000 para western blot	Conejo (policlonal)
Pab1	Cedido por T.H. Jensen (Schmid et al., 2012)	1:1000 para western blot	Ratón
c-Myc	(9E10). Aminoácidos 408-439 del extremo C-terminal de la proteína c-Myc humana (Santa Cruz Biotechnology)	1:1000 para western blot	Ratón (monoclonal)
Rpb1 (CTD)	Dominio C-terminal del CTD (RNA polimerasa II, subunidad Rpb1) (Dr. Francisco Navarro)	1:2000 para western blot	Conejo (policlonal)
Rpb7	yN-19 (Santa Cruz Biotechnology)	1:1000 para western blot	Ratón (monoclonal)

MATERIALES Y MÉTODOS

CTD-Ser2P	Ser2 fosforilada del dominio C-terminal del CTD (RNA polimerasa II, subunidad Rpb1). Ab5095 (Abcam)	1:1000 para western blot	Ratón (monoclonal)
Ratón IgG(H+L)	Peroxidasa conjugada (BioRad)	1:10000 para western blot	Anticuerpo secundario
Conejo IgG	Peroxidasa conjugada (Sigma)	1:10000 para western blot	Anticuerpo secundario

Resultados

AATCGCAGT GATCGATT AGCTAGT GACGCTA AATCGCAGT GATCGATT AGCTAGT GACGCTA
ACCRACCTC GTGAGCACTT CACGAGT GCTCARCC CCRACCTC GTGAGCACTT CACGAGT GCTCARCC

Capítulo I

AATCGCAGT GATCGATT AGCTAGT GACGCTA AATCGCAGT GATCGATT AGCTAGT GACGCTA
ACCRACCTC GTGAGCACTT CACGAGT GCTCARCC ACCRACCTC GTGAGCACTT CACGAGT GCTCARCC

RESUMEN

Desarrollo de una Técnica para el análisis de fracciones de cromatina enriquecidas, yChEFs (*yeast Chromatin Enriched Fractions*)

En este trabajo se ha desarrollado una técnica de purificación de fracciones enriquecidas de cromatina en *S. cerevisiae*, llamada yChEFs (*yeast Chromatin Enriched Fractions*), que permite de un modo fácil, reproducible y escalable analizar las proteínas asociadas a la cromatina evitando la necesidad de realizar fraccionamiento celular empleando zimoliasa para obtener esferoplastos con el fin de aislar el núcleo, y además evitando procesos de solubilización o eliminación del DNA tales como la sonicación o tratamiento con DNasa.

El procedimiento seguido incluye diversas centrifugaciones a diferente velocidad para conseguir un pellet de cromatina enriquecido con las proteínas asociadas (Figura 1 del artículo). A lo largo de este procedimiento se obtienen distintas fracciones (sobrenadante 1-3: S1-S3; pellet 1-3: P1-P3), siendo la fracción final P3 la cromatina enriquecida. El conjunto de las fracciones del proceso fueron analizadas mediante western blot (Figura 2 del artículo) utilizando el anticuerpo anti histona H3 como control de cromatina y anti Pgk1 como control citoplasmático. Se corroboró, además, el proceso usando un anticuerpo frente a la subunidad mayor de la RNA pol II, Rpb1 y frente a la forma elongante fosforilada en CTD-Ser2.

Como muestran nuestros datos (Figura 3 del artículo) el método de yChEFs es más eficaz sin llevar a cabo crosslinking de proteínas a DNA (usando formaldehído o DSG, tanto de forma individual como conjunta).

Utilizando fracciones cromatínicas enriquecidas se ha establecido el proteoma asociado a cromatina por espectrometría de masas, identificándose una 750 proteínas. El análisis de las categorías funcionales de las proteínas asociadas a la cromatina revela relación con procesos biológicos de la cromatina (ensamblaje y desensamblaje, remodelación, organización y modificación de cromatina) y transcripción o procesamiento del RNA entre otros (Tabla 1 del artículo).

Para determinar la validez y eficacia del método yChEFs, se llevaron a cabo comparaciones de los datos proteómicos con los obtenidos en otros métodos previamente descritos (Carrillo et al., 2010; Lambert et al., 2010). Como se muestra mediante diagramas de Venn (Figura 5 del artículo), existe un gran solapamiento entre los datos obtenidos a partir de yChEFs y los de los otros métodos. De igual manera al comparar los otros dos métodos entre sí hay menos coincidencia, lo que apoya la eficacia y validez de nuestro método para aislar proteínas asociadas a cromatina.

Por otro lado, aprovechando esta técnica hemos establecido el proteoma dependiente de RNA, con un total de 554 proteínas identificadas. Para ello, se trataron las muestras con RNasa previamente al procedimiento y se analizaron mediante espectrometría de masas. Se identificaron 202 proteínas dependientes de RNA, mayoritariamente relacionadas con categorías funcionales de procesamiento de RNA, transcripción, metabolismo de ncRNA, nucleosomas y remodelación de cromatina (Tabla 2 del artículo). De estos análisis destacamos un grupo de proteínas involucradas en el procesamiento de mRNA como Dcp2, Xrn1, Dhh1 y Pbp1.

Por último el método yChEFs permite el análisis de proteínas de unión lábil (como el dímero Rbp4/7 de la RNA pol II) o transitoria (como las proteínas Ceg1 y Abd1) (Figura 8 del artículo).

A novel yeast chromatin-enriched fractions approach, yChEFs, for chromatin-associated and RNA-dependent chromatin-associated proteome analysis

Running title:

yChEFs approach for chromatin-associated proteins analysis

Abel Cuevas-Bermudez, Ana Isabel Garrido-Godino and Francisco Navarro*

Departamento de Biología Experimental, Facultad de Ciencias Experimentales,
Universidad de Jaén, Paraje de las Lagunillas, s/n, 23071, Jaén, Spain.

*: Corresponding author

Email: fngomez@ujaen.es

Tel: 00-34-953-212771

FAX: 00-34-953-211875

ABSTRACT

To identify chromatin-associated proteome in *Saccharomyces cerevisiae*, we developed a new approach named yChEFs (yeast Chromatin Enriched Fractions). yChEFs allows the easy, reproducible and scalable recovery of proteins associated with chromatin, and bypasses subcellular fractionation requirements and having to use zymolyase to obtain the spheroplast. This method allows proteins to be isolated from nonsonicated chromatin without resorting to prior crosslinking. By applying yChEFs and mass spectrometry, we detected about 750 chromatin-bound proteins, many of which can be detected by other previous approaches. We used this combined approach to identify the RNA-dependent chromatin-associated proteome. Notably, yChEFs identifies weak or transient chromatin-associated proteins.

Keywords: Chromatin function of biology, multifunctional proteins, yeast, Transcription, mass spectrometry, *Saccharomyces cerevisiae*, RNA

INTRODUCTION

Chromatin in eukaryotes corresponds to a complex organization of DNA packaged with proteins that plays crucial roles in biological processes, such as DNA replication, DNA recombination and chromosome maintenance or gene expression, among others. The fundamental unit of chromatin is the nucleosome, which comprises 147 bp of genomic DNA around a histone octamer composed of two copies of four core histones, H2A, H2B, H3 and H4, which make up ~ 10 nm fibers (1-3). In addition to this octamer, other histone variants also contribute to the composition of chromatin and its influence on biological regulation, such as Htz1 in yeast or H2A.Z in mammalian cells (4). The final packaging of these complexes shapes fibers of ~ 30 nm. Chromatin folding and unfolding are believed to have a strong impact on the regulation of biological processes (5, 6).

Chromatin interacts with other nuclear components, and this correlates with gene expression regulation. Thus identifying chromatin-associated proteins should help to improve our understanding of chromatin composition and gene regulation. Advances in proteomic technology and subsequent analyses have significantly facilitated the study of proteins and proteins complexes associated with chromatin. However given its large size and its charge, chromatin easily precipitates during cell extract preparation (7). DNA-protein macrocomplexes are usually insoluble and lost while preparing protein extracts done to obtain chromatin fractions (8). To maximize DNA-protein recovery, a cellular fractionation-based approach has been developed in several organisms, such as *Xenopus* (9, 10), *Caenorhabditis elegans* (11), human (12-14), rice (15) or budding yeast (16, 17). In most cases, these studies have been accompanied by proteomic analyses done by mass spectrometry, including quantitative mass spectrometry (7, 16). An alternative to cell fractionation is the

chromatin immunoprecipitation method (ChIP) that allows the characterization of DNA-associated proteins, and is a major tool to analyze the interactions between protein and genomic DNA regions (18). However, this method is not highly efficient for proteomic analyses because it uses formaldehyde for *in vivo* crosslinking, which modifies proteins and then alters subsequent purification steps (19). ChIP combined with mass spectrometry after SDS-separation has been used to identify proteins associated with enhancers in mouse embryonic stem cells (20). Affinity purification combined with mass spectrometry is one of the most powerful tools used to characterize protein-protein interactions, and this method has been applied largely to multiple model organisms (21).

Budding yeast cell fractionation, which includes the use of zymolyase to obtain the spheroplast before separating the cytoplasm and the nucleus, has also been employed mainly to obtain chromatin fractions (10, 16, 17). Based on ChIP, a method termed mChIP that enables the purification of protein complexes from chromatin has been developed in budding yeast (8, 21). This method's main characteristic is that affinity purification is performed after chromatin sonication and solubilization, which allows protein-DNA complexes to be purified with their associated proteins in sufficient quantities to be analyzed by mass spectrometry. A similar technique, in which proteins are crosslinked to DNA, has also been improved by combining it with the iTRAQ method to perform quantitative mass spectrometry (22). Another method that does not use cell fractionation in *S. cerevisiae* to obtain chromatin fractions to isolate nascent RNA has been recently developed, which does not use chromatin sonication and obtains chromatin fractions depleted of rRNA and tRNA (23).

In this work, we improved a new a method to obtain highly enriched chromatin fractions in *Saccharomyces cerevisiae* that bypasses the necessity to perform cell

fractionation to obtain the spheroplast and to achieve nucleus isolation. This method, named yChEFs (yeast Chromatin Enriched Fractions), allows proteins to be isolated from nonsonicated chromatin without resorting to prior crosslinking. yChEFs combined with mass spectrometry was successfully used to identify the chromatin-associated proteome and detected about 750 chromatin-bound proteins, many of which are detected by other previous approaches. We used this combined approach to identify the RNA-dependent chromatin proteome. Notably, yChEFs allows the identification of weak or transient chromatin-associated proteins.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strains, genetic manipulations and media

The *S. cerevisiae* strains used in this study are listed in Table I. Common media, growth conditions, transformation and genetic manipulations were performed according to established procedures (24).

Chromatin isolation

Chromatin isolation was based on a previously described procedure (23) with major modifications: 200 ml of exponentially grown yeast culture ($OD_{600} \sim 0.7-0.8$) were washed with water and resuspended in 200 μ l of Buffer 1 (20 mM HEPES [pH 8.0], 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 10 mM N-butyric acid, 0.8% Triton X-100, 0.25 M sucrose, 2.5 mM spermidine, 0.5mM spermine). This step and subsequent ones were performed at 4°C. Next 200 μ l of glass beads (425-600 μ m) were added and cells were lysed by vortexing for 4 minutes. Beads were spun down (5 min at 500g) and residual intact cells were removed from the supernatant by further centrifugation (5 min at 500g). This supernatant was transferred to a new tube and was centrifuged again at high speed (20 min at 20000g). Pellet 1 (P1) was resuspended in 200 μ l of Buffer 1, while supernatant 1 (S1) was discarded. P1 was centrifuged for 20 min at 20000g to obtain pellet 2 (P2), which was resuspended in 200 μ l of Buffer 2 (20 mM HEPES [pH 7.6], 450 mM NaCl, 7.5 mM $MgCl_2$, 20 mM EDTA, 10% glycerol, 1% NP-40, 2 M urea, 0.5 M sucrose, 1 mM DTT, 0.125 mM PMSF). Supernatant 2 (S2) was discarded and P2 was centrifuged at high speed (20 min at 20000g) to finally obtain pellet 3 (P3), which constituted the chromatin-enriched fraction, while supernatant 3 (S3) was discarded.

RNase (2mg/ml) was added to cells prior to S1-P1 separation whenever required, and was incubated for 1 h at 37°C. Subsequent steps were performed to obtain chromatin-enriched fractions.

P3 was finally resuspended in 20 µl of 1X Tris-Glycine SDS Sample Buffer and incubated for 5 min at 100°C, followed by spinning at 10000 rpm for 30 s. The 1-1:2 dilution of chromatin pellet was used for SDS-PAGE, followed by Western blotting with different antibodies: 9E10 anti-C-Myc (Santa Cruz Biotechnology), anti-Rpb1 (this work), anti-Rpb4 (Pol II RPB4 (2Y14), Santa Cruz Biotechnology), anti-Rpb7 (Rpb7 (yN-19), Santa Cruz Biotechnology), anti-CTD-Ser2 (anti-RNA polymerase II; ab5095, Abcam), anti-Histone H3 (ab1791; Abcam) or anti-phosphoglycerate kinase, Pgk1 (459250; Invitrogen).

For the mass spectrometry analysis, the chromatin-enriched fraction (P3) was resuspended in 20 µl of Tris-HCl 50 mM, pH 7.5. Then 5µl were used for SDS-PAGE and verification purposes.

Formaldehyde and DSG crosslinking

The cells from the 200 ml exponentially grown yeast culture ($OD_{600} \sim 0.7-0.8$) were subjected to crosslinking with formaldehyde as previously described (25) prior to chromatin fraction preparation.

Protein-DNA crosslinking was performed with disuccinimidyl glutarate (DSG) as follows: the cells from 200 ml of the exponentially grown yeast culture ($OD_{600} \sim 0.7-0.8$) were washed with water and resuspended in 10 ml crosslinking solution (2mM DSG, 0.25% DMSO in PBS 1X). Cells were incubated at room temperature for 15 minutes and then washed with PBS 1X. The pellet was frozen for the next chromatin fraction preparation.

For double DSG plus formaldehyde crosslinking, the pellet from the DSG treatment was resuspended in 40 ml PBS 1X with 1% formaldehyde for 15 minutes, followed by the addition of 125 mM glycine to block the effect of formaldehyde. Subsequently, cells were washed with PBS 1X and the pellet was recovered for the chromatin-enriched fraction preparation.

Given fixation, and in order to facilitate the analysis of the chromatin-associated proteins by Western blot, the chromatin-enriched fractions (P3) were sonicated for 20 minutes in a Bioruptor (® (UCD-200, Dianogene), with (30 "ON, 30" OFF) cycles in 300 µl lysis buffer (50 mM HEPES, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8, 1% Triton-X-100, 0,1% sodium deoxycholate, 1mM PMSF, 0.15% Benzamidine, protease inhibitor cocktail (Complete, Roche)). TCA (trichloroacetic acid) was subsequently added at a final 10% concentration and was incubated overnight at -20°C. Samples were then centrifuged for 15 minutes at 4°C and 14000 rpm. The obtained pellet was twice washed with cold acetone for 15 minutes at 4°C and 14000 rpm, and was dried at 60°C for a few minutes. The pellet was resuspended in 30 µl of water, and 5 µl were used for SDS-PAGE and were western blotted with the different antibodies.

Peptide digestion and desalting

Prior to peptide digestion, disulfide bonds were reduced with 50 mM DTT (37°C, 30 min) to obtain proper results. Peptide digestions were carried out by with the FASP Protein Digestion kit (Expedeon), as indicated by the manufacturer. Then peptide solutions were desalted in Pierce C18 reverse-phase spin columns (C18 reverse-phase resin; Thermo Scientific) according to the manufacturer's recommendations.

Mass spectrometry analysis

An LC MS/MS analysis was performed in a Thermo Scientific EASY-nLC 1000 nano-LC system with an integrated nanospray emitter coupled to a Thermo Q-Exactive Orbitrap mass spectrometer, which operated in the positive ionization mode and was equipped with an Easy-Spray nanospray ion source housing (Thermo Scientific, USA). The Nanoflow UHPLC was equipped with a PepMap100 C18 precolumn (75 μ m x 2 cm; 3 μ m particle size). The spectrometer was equipped with an EASY-Spray PepMap RSLC C18 column (75 μ m x 50 cm; 2 μ m particle size) and the column was maintained at 40°C. The injection volume (10 μ l) that contained the peptide mixture (~ 2 μ g) was loaded into a column, and was separated and eluted with a linear gradient of 8-90% buffer B (acetonitrile with 0.1% (v/v) formic acid) at a flow rate of 200 nL/min for 120 minutes.

MS/MS spectra were acquired with Xcalibur 3.0.63. Minimal peptide confidence “high” was stabilized (false discovery rate -FDR- set at 1%).

Peak lists were generated from the MS/MS .raw file using Thermo Proteome Discoverer 1.4 (version 1.4.0.288) to produce a .mgf file, and were analyzed by search algorithm Sequest HT and matched to the *S. cerevisiae* protein sequences in uniprot.org.

RESULTS

yChEFs for chromatin-associated protein analyses

Analyzing the proteins associated with chromatin in budding yeast is a difficult task as most methods require cell fractionation, spheroplast preparation and chromatin solubilization after mechanical or enzymatic digestion (10, 16, 17, 26). Other methods that do not use cell fractionation allow chromatin-enriched fractions preparation, but also require the mechanical or enzymatic digestion of chromatin (sonication or DNase treatment) and, in some cases, require the crosslinking of proteins to chromatin (8, 22). Furthermore, most of the protein preparations obtained by those methods contain large amounts of cytoplasmic proteins.

The challenging objective was to acquire a single, reproducible and scalable method to obtain highly enriched chromatin fractions in *S. cerevisiae* that allows the analysis of chromatin-associated proteins. Accordingly, we developed a method termed yChEFs (yeast Chromatin Enriched Fractions) to isolate highly enriched chromatin fractions in *S. cerevisiae*. To do so, we improved a previously described procedure to isolate nascent RNA in *S. cerevisiae* (23). We used the stringent washing of chromatin fractions by postulating that this could reduce cytoplasmic contamination, and we recovered chromatin in several steps by differential centrifugation (Fig. 1). We used a high EDTA concentration in buffer 2 to favor translating ribosomes dissociation and to then avoid contaminating mRNA purification (23).

To analyze the whole procedure, we performed Western blot experiments to identify different chromatin-associated proteins. As shown in Figure 2, histone H3, a marker of chromatin, was enriched in all the chromatin fractions (Pellets 1-3: P1, P2 and P3). Similarly, Rpb1, the largest subunit of RNA polymerase II, was also enriched

in the chromatin fractions, and was maximal in pellet 3 (P3). Since Rpb1 was not only associated with chromatin, but was also free in the cytoplasm, we analyzed Rpb1 phosphorylated at Ser2 of its CTD domain, a marker of elongating RNA pol II. As shown, the signal was maximal at pellet 3. Notably, chromatin was properly isolated as no cytoplasmic Pgk1 protein was detected in pellet 3 and considerably reduced during the chromatin purification procedure.

Taken together, we conclude that the final pellet 3 (P3) is a useful highly enriched chromatin fraction for protein analyses.

Protein-DNA crosslinking affects chromatin fraction preparation

To further improve our yChEFs method, and in an attempt to obtain more enriched chromatin fractions, we were interested in determining how protein-DNA crosslinking affected the amount of purified proteins. To do so, cells were subjected to *in vivo* crosslinking with the substrates used mainly in chromatin immunoprecipitation (ChIp) or mChIp methods, and in other analyses of chromatin-associated proteins: formaldehyde, DSG (disuccinimidyl glutarate), or the formaldehyde and DSG combination (18-20, 27). The yChEFs procedure was followed with the cells subjected to *in vivo* crosslinking with formaldehyde, and the enriched chromatin fractions that corresponded to pellet 3 (P3) were analyzed (see Fig. 3A) by SDS-PAGE. As shown in Figure 3A, *in vivo* crosslinking with formaldehyde substantially reduced the amount of isolated proteins when combined with the yChEFs procedure. We extended the analysis to *in vivo* crosslinking with DSG, or with double *in vivo* crosslinking with DSG plus formaldehyde, in two subsequent steps. In both cases after the yChEFs procedure, the enriched chromatin fractions from pellet 3 were sonicated for 20 minutes to facilitate protein solubilization, which was precipitated with TCA and

analyzed by SDS-PAGE. Similarly, *in vivo* DSG crosslinking reduced the amount of the isolated proteins (Fig. 3B), while double crosslinking with DSG plus formaldehyde proved mostly inefficient. Furthermore in an attempt to further explore the proteins associated with the chromatin fraction, we used mass spectrometry to analyze the chromatin-associated proteome after DSG treatment, and compared it to that obtained by our yChEFs method (see below). This demonstrates that crosslinking affected mainly the protein composition in the chromatin-enriched fractions (not shown).

We also compared the yChEFs method with the modified mChIp, which uses *in vivo* formaldehyde crosslinking (22), demonstrating that yChEFs was more efficient than the other assayed method to obtain highly enriched chromatin fractions, as revealed from analyzing the amount of cytoplasmic Pgk1 by Western blotting as a control (Fig. S1).

Chromatin-associated proteome analysis by mass spectrometry

The chromatin-enriched fractions obtained by yChEFs were used to define the chromatin-associated proteome from *S. cerevisiae*. In order to evaluate and compare data from several experiments, an equal amount of the digested peptides obtained after protein solubilization per sample was subjected to a mass spectrometry analysis. The results confirmed that the chromatin fractions were enriched in well-characterized chromatin proteins in yeast (21, 23) (Figure 4A). Similarly, their counterparts have been also identified as being associated with chromatin in other organisms (15).

The proteins that represent the chromatin-associated proteome from *S. cerevisiae* were selected with high peptide confidence (FDR 1%). In addition, and to be more stringent, only those proteins showing at least two unique peptides in each replicate were selected. By applying these filters, 826 different proteins were identified. Among

theme, 64 were identified as being mitochondrial with Proteome Discoverer (7.75%) and were, in turn, removed from the analysis. As a result, 762 proteins were selected as the chromatin-associated proteome from *S. cerevisiae* (Figure 4B; Supplementary List 1).

To help understand the distribution of the chromatin-associated proteins, GO annotations and protein-protein interaction networks were determined by STRING (28). Of the proteins that covered the chromatin-associated proteome, 17% were cytosolic (130 of 762). This falls in line with the fact that our yChEFs procedure recovers highly enriched chromatin fractions, but is not a full chromatin purification procedure (Figs. 4B and 6). However when analyzing with Proteome Discoverer, only 13.3% cytosolic proteins were identified (102 of 762; Supplementary List 2). Notably, most of these cytosolic proteins were also identified as being nuclear or interacting physically with nuclear proteins, as listed in SGD (<https://www.yeastgenome.org/>). One example is peptidyl proline isomerase Cpr1, which has been previously shown in an mChIP analysis to interact with many nuclear proteins, and to function in nutrient-sensing and cell cycle regulation (21). Furthermore, 16.3% of the proteins from the chromatin-associated proteome (124 of 762) were identified as being components of pre-ribosome complexes and, among them, 89 (11.7% of the 762 total proteins) also corresponded to cytosolic ribosome components.

A further analysis of the GO annotations (Table 1) showed many biological processes related with chromatin (chromatin assembly or disassembly, chromatin organization, chromatin remodeling, chromatin modification, etc.), chromosomes (chromosome organization, minichromosome maintenance, etc.), transcription (regulation of transcription, transcription from RNA pols, etc.) or RNA processing (rRNA processing, ncRNA processing, RNA maturation, etc.), among others.

Comparison between yChEFs and other chromatin isolation methods

To further test the validity of the yChEFs procedure, we compared our proteomic data from the mass spectrometry analysis with those from the chromatin fractions from *S. cerevisiae* obtained by two other previously published methods. First we analyzed the data from the chromatin fractions obtained after chromatin fractionation by using a high stringency washing buffer with EDTA to avoid contaminating mRNA from translating ribosomes (23). As shown in Figure 5 by Venn diagrams, 316 proteins overlapped both methods (41.5% of the 762 proteins identified by yChEFs and 71% of the 445 proteins identified by Carrillo *et al.* (23)). Notably, the other 129 proteins not shared with our yChEFs data corresponded mainly to the GO categories or to the components also identified by us (Ribosomes, RNA pols and rRNA processing).

Second we compared the data from yChEFs with the budding yeast chromatin-associated interactome. This proteome corresponds to a large-scale study of proteins association with 724 different preys performed by mChIP, an affinity purification method that allows the selective enrichment of chromatin-bound proteins along with their associated interactors (21). In this study 727 proteins were identified, of which 233 (about 30%) were shared with our data from yChEFs (Fig. 5). When comparing the data from the budding yeast chromatin-associated interactome with those obtained by Carrillo *et al.* (23), only 124 overlapped (17% and 28%, respectively). This indicates a greater coincidence between the yChEFs proteome and this chromatin-associated interactome than with the other well-established procedure. In any case, the low overlap percentage can be explained by the fact that the yeast chromatin-associated interactome is not a global chromatin proteome, but the sum of individual analyses for a large group of preys (21).

Different chromatin-bound proteins, which are difficult to purify by traditional methods, have been characterized by mChIP, and include: Minichromosome Maintenance (MCM) Helicase Mcm5 (8), Yta7, a protein shown to be associated to chromatin boundary regions between transcriptionally active and silent chromatin, and also with many promoter sequences (8), and the peptidyl proline isomerase Cpr1, previously shown to be cytoplasmic (21). By using the yChEFs procedure, these proteins and the majority of their interactors found by mChIP were also identified (Supplementary List 1).

Altogether, these data account for the validity of the yChEFs method to characterize the chromatin-associated proteome in *S. cerevisiae*.

RNA-dependent chromatin-associated proteome analysis by mass spectrometry

We were interested in applying the yChEFs method to determine the RNA-dependent chromatin-associated proteome. To do so, we incubated a whole cell extract with RNase for 1 h at 37°C and then proceeded with the yChEFs method. The chromatin-enriched fractions were subjected to mass spectrometry, as indicated above: two replicates per chromatin-enriched fraction, both with and without RNase incubation, and an equal amount of the digested peptides obtained after protein solubilization, were used. Only those proteins showing at least two unique peptides in each replicate, or those absent under one condition, but with at least two unique peptides in the two replicates of the other conditions, were selected: high peptide confidence (FDR 1%).

By applying these filters, 606 different proteins were identified, of which Proteome Discoverer identified 52 (8.5%) as being mitochondrial which were, in turn, removed from the analysis. As a result, 554 proteins were selected as the RNA-dependent

chromatin-associated proteome from *S. cerevisiae* (Supplementary List 3). According to the GO annotations and the protein-protein interaction networks analyzed by STRING (28), 8.3% of the proteins covering the RNA-dependent chromatin-associated proteome were cytosolic (46 of 554) (Fig. 6). Furthermore, 13% of the proteins from the chromatin-associated proteome (72 of 554) were identified as being components of the pre-ribosome complexes, of which 29 (5.2% of the 554 total proteins) corresponded to components of the cytosolic ribosomes.

To better define the RNA-dependent chromatin-associated proteome from *S. cerevisiae* in detail, for each sample we calculated the ratio between the unique peptides for each protein and the global amount of the histones' unique peptides. As expected, this global amount was similar in all cases when an equal amount of the digested peptides after protein solubilization was used. Subsequently, we calculated the mean of the two replicates per condition and calculated the standard yChEFs vs. RNase incubation ratio (Supplementary List 3). As a result, 202 proteins showed a ratio higher than 2-fold. Furthermore, the GO annotation analysis for these 202 proteins, whose association to the chromatin depends on RNA, is listed in Table 2 (upper panel), which shows the biological processes related mainly to RNA processing and RNA cleavage, Transcription, ncRNA metabolism, nucleosomes and chromatin modification. Figure 7 represents the interaction networks, determined by STRING (28), for nucleosome and chromatin remodeling-related proteins, for RNA processing and RNA cleavage, and also for ncRNA metabolism-related proteins. Conversely, the GO annotation analysis for the proteins with a ratio lower than 2-fold shows biological processes related mainly with translation and ribosome biogenesis (Table 2, lower panel, and Supplementary List 3).

Notably, four proteins involved in mRNA processing were identified among those whose association with chromatin depended on RNA: Dcp2, Xrn1, Dhh1 and Pbp1 (Figure 7, middle panel). Dcp2 is a member of the Dcp1p-Dcp2p decapping enzyme complex that removes the 5' cap structure from mRNAs prior to their degradation. This protein has been found in the nucleus and positively regulates transcription initiation (29-31). Dcp2 is necessary for the eukaryotic mRNA degradation pathway from 5' to 3' by the Xrn1 exonuclease, assisted by Dhh1 and other enzymes (29, 32, 33). Both Xrn1 and Dhh1 have been shown to shuttle between the cytoplasm and the nucleus, and to be associated with chromatin (32). Pbp1 (the Pab1-binding protein 1) is a glucose deprivation component that induces stress granules and interacts with Pab1 to regulate mRNA polyadenylation that also localize in the nucleus (34, 35).

yChEFs allows the efficient purification of weak or transient chromatin-associated proteins.

By considering all the above results, we hypothesized that the yChEFs procedure could be useful for purifying and analyzing weak or transient chromatin-associated proteins by Western blotting. To test this, we first used *S. cerevisiae* mutants previously shown to alter the correct assembly of RNA pol II, which leads to an Rpb4/Rpb7 unstable dimer that is partially dissociated from the rest of the enzyme (36, 37). The chromatin-enriched fractions from not only mutants *rpo21-4* and *rpb1-84*, but also from their isogenic parental strain (36), were subjected to Western blotting and were analyzed for different RNA pol II subunits (Rpb1, Rpb4 and Rpb7). As shown in Figure 8A, and as previously reported (36), both mutants contained a smaller amount of RNA pol II associated with chromatin (analyzed by using the antibodies against the largest subunit of the enzyme, Rpb1). Furthermore, the dissociation of the

unstable dimmer Rpb4/7 from the rest of the complex was corroborated with the antibodies against Rpb4 and Rpb7, which demonstrated the validity of yChEFs to detect weak chromatin-associated proteins.

Two components of the mRNA-capping machinery from *S. cerevisiae*, Ceg1 and Abd1 (38, 39), were selected to analyze transient chromatin-associated proteins. For this purpose, the same mutant and the wild-type strains indicated before, which contained functional Myc-tagged Abd1 or Myc-tagged Ceg1, were used. As shown in Figure 8 B and C, both proteins were detected, with differences between strains. In all cases, chromatin was properly isolated because no cytoplasmic Pgk1 protein was detected.

Taken together, these results confirm the validity of yChEFs to purify weak or transient chromatin-associated proteins.

DISCUSSION

Here we describe a novel proteomic procedure, yChEFs, to isolate highly enriched chromatin fractions from *S. cerevisiae*, and to then obtain the proteins that interact with chromatin. We used this method to successfully determine the chromatin-associated and RNA-dependent chromatin-associated proteomes from *S. cerevisiae*.

This procedure facilitates chromatin isolation since, unlike most previously used methods in yeast, it does not have to resort to cell fractionation, spheroplast isolation and nucleus purification to obtain chromatin. In addition, chromatin solubilization by DNA shearing steps after mechanical (sonication) or enzymatic (DNase treatment) digestion is demonstrated as not being necessary for proteomic or Western blot analyses when purifying chromatin by yChEFs, unlike most previously reported procedures (8, 10, 16, 17, 22, 26). Notably, *in vivo* crosslinking of proteins to DNA with formaldehyde, DSG or both compounds as other methods use (18-20, 27) (40), strongly affects protein recovery efficiency. Thus avoiding this step facilitates protein-associated chromatin purification.

Our newly developed approach efficiently purifies well-characterized chromatin proteins in yeast, with histones and histone variants among them (21, 23) whose counterparts have also been identified as being associated with chromatin in other organisms (15). About 8% of the proteins identified in our analysis were mitochondrial. This observation is a general feature in most chromatin-associated proteins purification procedures in different organisms (15, 23, 41), which is probably due to the fact that no specific steps to separate mitochondrial chromatin were used, or could be owing to the high concentration of the mitochondrial proteins that can be recovered as nonspecific contaminants. We also identified 10-15% cytosolic proteins, whose relationship with chromatin was unclear, which has also been observed by

others (8, 16, 21, 23, 41). Indeed most of these cytosolic proteins have also been identified in the *S. cerevisiae* Database (SGD) as being nuclear or as interacting physically with nuclear proteins, which is the case of peptidyl proline isomerase Cpr1, previously identified in mChIP (21). This agrees with yChEFs being a procedure that recovers highly enriched chromatin fractions, but does not correspond to a full chromatin purification procedure. The identified pre-ribosome complexes proteins (about 16%) could account for the nuclear pre-ribosome components associated with RNA maturation machinery (42). Most of these proteins are shared with pre-ribosome complexes despite being identified as components of cytosolic ribosomes.

The validity and efficiency of yChEFs were corroborated by comparing our proteomic data with those of other previously reported well-established procedures (8, 21, 23). In fact 71% of the proteins identified by Carrillo *et al.* (23) overlapped the yChEFs proteomic analysis, and most of the nonshared proteins corresponded to GO categories or components which our analysis also identified (ribosomes, RNA pols and rRNA processing), which suggests differences in mass spectrometry sensitivity. The yChEFs proteomic analysis also correlated with a large-scale mChIP study of proteins association with 724 different preys (21). Only 30% of the proteins from yChEFs overlapped the yeast chromatin-associated interactome identified by mChIP. However, we can state that this interactome is not a global chromatin proteome, but the sum of the individual analyses for a large group of preys (21). Furthermore, mChIP recovers a larger amount of contaminant cytosolic proteins than yChEFs (our data). Notably, a comparison of the data from the budding yeast chromatin-associated interactome (21) with the proteome defined by Carrillo *et al.* (23) shows a lesser coincidence than that observed with the yChEFs proteome. In addition, chromatin-bound proteins that are difficult to purify by traditional methods, but are characterized by mChIP, such as

Mcm5, Yta7, and Cpr1, and the majority of their interactors (8, 21) were also identified by the yChEFs procedure. Some proteins identified by mChIP as being able to interact with poorly characterized non-histone protein Lge1, such as TORC1 complex components (8), were also obtained by yChEFs. Altogether, these data suggest that yChEFs is an efficient method to characterize the chromatin-associated proteome in *S. cerevisiae*.

The use of the yChEFs procedure, combined with the analysis of the RNA-dependent chromatin-associated proteome, identified 202 proteins whose association to chromatin depended on RNA. The GO annotation analysis revealed biological processes related mainly to RNA processing and RNA cleavage, transcription, ncRNA metabolism, nucleosomes and chromatin modification. Of all the proteins from this proteome, 13% were identified as being components of pre-ribosome complexes. Four proteins involved in mRNA processing, also characterized as shuttling between the cytoplasm and the nucleus, were identified: Dcp2, Xrn1, Dhh1 and Pbp1. Dcp2 is a member of the Dcp1p-Dcp2p decapping enzyme complex that removes the 5' cap structure from mRNAs prior to their degradation (29-31). Dcp2 is necessary for the eukaryotic mRNA degradation pathway from 5' to 3' by the Xrn1 exonuclease, assisted by Dhh1 and other enzymes (29, 32, 33). Pbp1 (Pab1-binding protein 1) is a component of glucose deprivation that induces the stress granules that interact with Pab1 to regulate mRNA polyadenylation (34, 35).

In summary, we have developed a new method to obtain highly enriched chromatin fractions in *S. cerevisiae* which bypasses the necessity of not only performing cell fractionation, spheroplast isolation and nucleus purification to obtain chromatin, but also of chromatin solubilization by DNA shearing. This method, named yChEFs (yeast Chromatin Enriched Fractions), combined with mass spectrometry is useful for the

characterization of the chromatin-associated proteome and can be extended to any condition, such as identifying the RNA-dependent chromatin-associated proteome. Notably, yChEFs identifies weak or transient chromatin-associated proteins. The combination of this method with affinity purification procedures can be helpful to better identify nuclear protein interaction networks.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the “Centro de Instrumentación Científico-Técnico (CICT), Universidad de Jaén” for technical support in the mass spectrometry analysis.

This work has been supported by grants from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, MINECO, and FEDER funds (BFU2016-77728-C3-2-P to F.N.) and Junta de Andalucía (BIO258 and BIO271 to F. N.).

A.C-B. is a recipient of a FPI predoctoral contract from MINECO. A.I.G-G was a recipient of MEC and a postdoctoral fellowship from the University of Jaén.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Experimental protocol for chromatin-bound proteins by the yChEFs approach. Left lower panel: SDS-PAGE analysis. P1-P3: Pellet 1-3. S1-S3: Supernatant 1-3.

Figure 2: Protein analysis of the different fractions from the yChEFs procedure. Rpb1 and CTD-Ser2P for the global and elongating forms of RNA pol I, respectively, Histone H3 and Pgk1 were analyzed by Western blot. Note that chromatin was properly isolated as no cytoplasmic Pgk1 protein was detected. P1-P3: Pellet 1-3. S1-S3: Supernatant 1-3.

Figure 3: Protein analysis of the different fractions from the yChEFs procedure upon *in vivo* crosslinking with different compounds. Coomassie-stained SDS-PAGE showing fractions from the yChEFs approach, either with or without *in vivo* crosslinking with formaldehyde, DSG, or both. The proteins for the whole P3 pellet of each experiment were loaded.

Figure 4: Proteomic analysis of the chromatin-enriched fractions from *S. cerevisiae* by the yChEFs approach. A) Well-characterized chromatin proteins for different complexes, in yeast, detected by mass spectrometry. B) Global representation of the proteins detected by mass spectrometry analyses.

Figure 5: Venn diagrams representation of yChEFs compared with different proteomic analyses. The data correspond to the proteomic analysis from yChEFs

(Cuevas) compared with the proteomic data from the chromatin-bound proteins obtained by other approaches (21, 23).

Figure 6: Proteomic analysis of the chromatin-associated and RNA-dependent chromatin-associated proteomes determined by the yChEFs approach. Global representation of the proteins detected by mass spectrometry analyses.

Figure 7: Distinct protein networks for different GO categories from the RNA-dependent chromatin-associated proteome determined by yChEFs. Interaction networks, determined by STRING (28), for the GO categories that correspond to the nucleosome and chromatin remodeling-related proteins, as well as for RNA processing and RNA cleavage, and for ncRNA metabolism-related proteins. GO categories correspond to the RNA-dependent proteins identified by mass spectrometry in proteomic analysis from yChEFs procedure.

Figure 8: yChEFs efficiently purifies weak and transient chromatin-bound proteins. Different chromatin-bound proteins analyzed by Western blot in whole-cell and yChEFs samples (P3 pellets) of the indicated wild-type and mutant strains. Note that chromatin was properly isolated as no cytoplasmic Pgk1 protein was detected.

Figure S1: Protein analysis of the yChEFs and mChIP procedures. The yChEFs samples (P3 pellets) and the final pellet from the mChIP procedure (21) were analyzed by Western blot for Rpb1 (RNA pol II), Histone H3 (chromatin-bound protein control) and Pgk1 (cytoplasmic protein).

1. Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., and Richmond, T. J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251-260
2. Van Holde, K. E., Sahasrabudhe, C. G., and Shaw, B. R. (1974) A model for particulate structure in chromatin. *Nucleic Acids Res* 1, 1579-1586
3. Kornberg, R. D. (1974) Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 184, 868-871
4. Boulard, M., Bouvet, P., Kundu, T. K., and Dimitrov, S. (2007) Histone variant nucleosomes: structure, function and implication in disease. *Subcell Biochem* 41, 71-89
5. Misteli, T. (2001) Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression. *Science* 291, 843-847
6. Espada, J., and Esteller, M. (2007) Epigenetic control of nuclear architecture. *Cell Mol Life Sci* 64, 449-457
7. Lambert, J. P., Pawson, T., and Gingras, A. C. (2012) Mapping physical interactions within chromatin by proteomic approaches. *Proteomics* 12, 1609-1622
8. Lambert, J. P., Mitchell, L., Rudner, A., Baetz, K., and Figeys, D. (2009) A novel proteomics approach for the discovery of chromatin-associated protein networks. *Mol Cell Proteomics* 8, 870-882
9. Khoudoli, G. A., Gillespie, P. J., Stewart, G., Andersen, J. S., Swedlow, J. R., and Blow, J. J. (2008) Temporal profiling of the chromatin proteome reveals system-wide responses to replication inhibition. *Curr Biol* 18, 838-843
10. Liang, C., and Stillman, B. (1997) Persistent initiation of DNA replication and chromatin-bound MCM proteins during the cell cycle in cdc6 mutants. *Genes Dev* 11, 3375-3386
11. Chu, D. S., Liu, H., Nix, P., Wu, T. F., Ralston, E. J., Yates, J. R., 3rd, and Meyer, B. J. (2006) Sperm chromatin proteomics identifies evolutionarily conserved fertility factors. *Nature* 443, 101-105
12. Du, Y. C., Gu, S., Zhou, J., Wang, T., Cai, H., Macinnes, M. A., Bradbury, E. M., and Chen, X. (2006) The dynamic alterations of H2AX complex during DNA repair detected by a proteomic approach reveal the critical roles of Ca(2+)/calmodulin in the ionizing radiation-induced cell cycle arrest. *Mol Cell Proteomics* 5, 1033-1044
13. Foltz, D. R., Jansen, L. E., Black, B. E., Bailey, A. O., Yates, J. R., 3rd, and Cleveland, D. W. (2006) The human CENP-A centromeric nucleosome-associated complex. *Nat Cell Biol* 8, 458-469
14. Foltz, D. R., Jansen, L. E., Bailey, A. O., Yates, J. R., 3rd, Bassett, E. A., Wood, S., Black, B. E., and Cleveland, D. W. (2009) Centromere-specific assembly of CENP-a nucleosomes is mediated by HJURP. *Cell* 137, 472-484
15. Tan, F., Li, G., Chitteti, B. R., and Peng, Z. (2007) Proteome and phosphoproteome analysis of chromatin associated proteins in rice (*Oryza sativa*). *Proteomics* 7, 4511-4527
16. Kubota, T., Hiraga, S., Yamada, K., Lamond, A. I., and Donaldson, A. D. (2011) Quantitative proteomic analysis of chromatin reveals that Ctf18 acts in the DNA replication checkpoint. *Mol Cell Proteomics* 10, M110005561

17. Frei, C., and Gasser, S. M. (2000) The yeast Sgs1p helicase acts upstream of Rad53p in the DNA replication checkpoint and colocalizes with Rad53p in S-phase-specific foci. *Genes Dev* 14, 81-96
18. Aparicio, O., Geisberg, J. V., and Struhl, K. (2004) Chromatin immunoprecipitation for determining the association of proteins with specific genomic sequences in vivo. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 17, Unit 17 17
19. Metz, B., Kersten, G. F., Hoogerhout, P., Brugghe, H. F., Timmermans, H. A., de Jong, A., Meiring, H., ten Hove, J., Hennink, W. E., Crommelin, D. J., and Jiskoot, W. (2004) Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: reactions with model peptides. *J Biol Chem* 279, 6235-6243
20. Engelen, E., Brandsma, J. H., Moen, M. J., Signorile, L., Dekkers, D. H., Demmers, J., Kockx, C. E., Ozgur, Z., van, I. W. F., van den Berg, D. L., and Poot, R. A. (2015) Proteins that bind regulatory regions identified by histone modification chromatin immunoprecipitations and mass spectrometry. *Nat Commun* 6, 7155
21. Lambert, J. P., Fillingham, J., Siahbazi, M., Greenblatt, J., Baetz, K., and Figeys, D. (2010) Defining the budding yeast chromatin-associated interactome. *Mol Syst Biol* 6, 448
22. Hierlmeier, T., Merl, J., Sauert, M., Perez-Fernandez, J., Schultz, P., Bruckmann, A., Hamperl, S., Ohmayer, U., Rachel, R., Jacob, A., Hergert, K., Deutzmann, R., Griesenbeck, J., Hurt, E., Milkereit, P., Bassler, J., and Tschochner, H. (2013) Rrp5p, Noc1p and Noc2p form a protein module which is part of early large ribosomal subunit precursors in *S. cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 41, 1191-1210
23. Carrillo Oesterreich, F., Preibisch, S., and Neugebauer, K. M. (2010) Global analysis of nascent RNA reveals transcriptional pausing in terminal exons. *Mol Cell* 40, 571-581
24. Garcia-Lopez, M. C., Pelechano, V., Miron-Garcia, M. C., Garrido-Godino, A. I., Garcia, A., Calvo, O., Werner, M., Perez-Ortin, J. E., and Navarro, F. (2011) The conserved foot domain of RNA pol II associates with proteins involved in transcriptional initiation and/or early elongation. *Genetics* 189, 1235-1248
25. Martinez-Fernandez, V., Garrido-Godino, A. I., Miron-Garcia, M. C., Begley, V., Fernandez-Pevida, A., de la Cruz, J., Chavez, S., and Navarro, F. (2017) Rpb5 modulates the RNA polymerase II transition from initiation to elongation by influencing Spt5 association and backtracking. *Biochim Biophys Acta* 1861, 1-13
26. Miron-Garcia, M. C., Garrido-Godino, A. I., Martinez-Fernandez, V., Fernandez-Pevida, A., Cuevas-Bermudez, A., Martin-Exposito, M., Chavez, S., de la Cruz, J., and Navarro, F. (2014) The yeast prefoldin-like URI-orthologue Bud27 associates with the RSC nucleosome remodeler and modulates transcription. *Nucleic Acids Res* 42, 9666-9676
27. Freire-Picos, M. A., Landeira-Ameijeiras, V., and Mayan, M. D. (2013) Stalled RNAP-II molecules bound to non-coding rDNA spacers are required for normal nucleolus architecture. *Yeast* 30, 267-277
28. Szklarczyk, D., Morris, J. H., Cook, H., Kuhn, M., Wyder, S., Simonovic, M., Santos, A., Doncheva, N. T., Roth, A., Bork, P., Jensen, L. J., and von Mering, C. (2017) The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res* 45, D362-D368
29. Parker, R. (2012) RNA degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 191, 671-702
30. Yoon, J. H., Choi, E. J., and Parker, R. (2010) Dcp2 phosphorylation by Ste20 modulates stress granule assembly and mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 189, 813-827

31. Harigaya, Y., Jones, B. N., Muhlrads, D., Gross, J. D., and Parker, R. (2010) Identification and analysis of the interaction between Edc3 and Dcp2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 30, 1446-1456
32. Haimovich, G., Medina, D. A., Causse, S. Z., Garber, M., Millan-Zambrano, G., Barkai, O., Chavez, S., Perez-Ortin, J. E., Darzacq, X., and Choder, M. (2013) Gene expression is circular: factors for mRNA degradation also foster mRNA synthesis. *Cell* 153, 1000-1011
33. Sun, M., Schwalb, B., Pirkel, N., Maier, K. C., Schenk, A., Failmezger, H., Tresch, A., and Cramer, P. (2013) Global analysis of eukaryotic mRNA degradation reveals Xrn1-dependent buffering of transcript levels. *Mol Cell* 52, 52-62
34. Swisher, K. D., and Parker, R. (2010) Localization to, and effects of Pbp1, Pbp4, Lsm12, Dhh1, and Pab1 on stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 5, e10006
35. Duy, D. L., Suda, Y., and Irie, K. (2017) Cytoplasmic deadenylase Ccr4 is required for translational repression of LRG1 mRNA in the stationary phase. *PLoS One* 12, e0172476
36. Garrido-Godino, A. I., Garcia-Lopez, M. C., and Navarro, F. (2013) Correct Assembly of RNA Polymerase II Depends on the Foot Domain and Is Required for Multiple Steps of Transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 33, 3611-3626
37. Garrido-Godino, A. I., Garcia-Lopez, M. C., Garcia-Martinez, J., Pelechano, V., Medina, D. A., Perez-Ortin, J. E., and Navarro, F. (2016) Rpb1 foot mutations demonstrate a major role of Rpb4 in mRNA stability during stress situations in yeast. *Biochim Biophys Acta* 1859, 731-743
38. Gu, M., Rajashankar, K. R., and Lima, C. D. (2010) Structure of the *Saccharomyces cerevisiae* Cet1-Ceg1 mRNA capping apparatus. *Structure* 18, 216-227
39. Schroeder, S. C., Zorio, D. A., Schwer, B., Shuman, S., and Bentley, D. (2004) A function of yeast mRNA cap methyltransferase, Abd1, in transcription by RNA polymerase II. *Mol Cell* 13, 377-387
40. Wang, P., Byrum, S., Fowler, F. C., Pal, S., Tackett, A. J., and Tyler, J. K. (2017) Proteomic identification of histone post-translational modifications and proteins enriched at a DNA double-strand break. *Nucleic Acids Res* 45, 10923-10940
41. Kim, D. R., Gidvani, R. D., Ingalls, B. P., Duncker, B. P., and McConkey, B. J. (2011) Differential chromatin proteomics of the MMS-induced DNA damage response in yeast. *Proteome Sci* 9, 62
42. Kressler, D., Hurt, E., and Bassler, J. (2010) Driving ribosome assembly. *Biochim Biophys Acta* 1803, 673-683

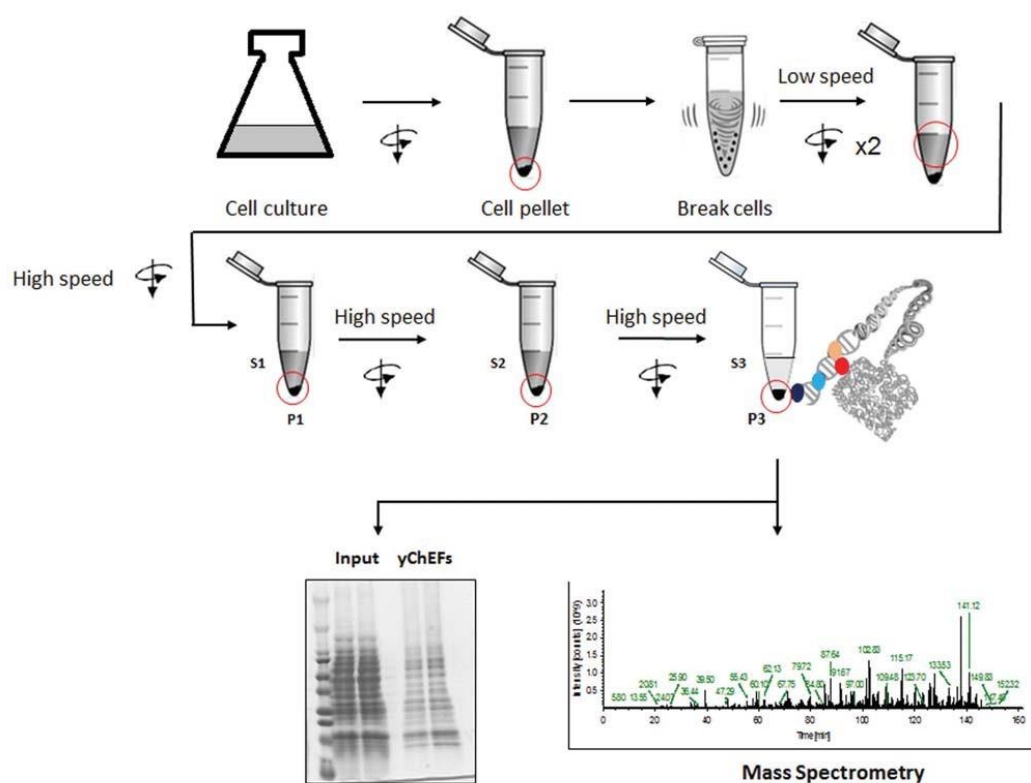


Figure 1

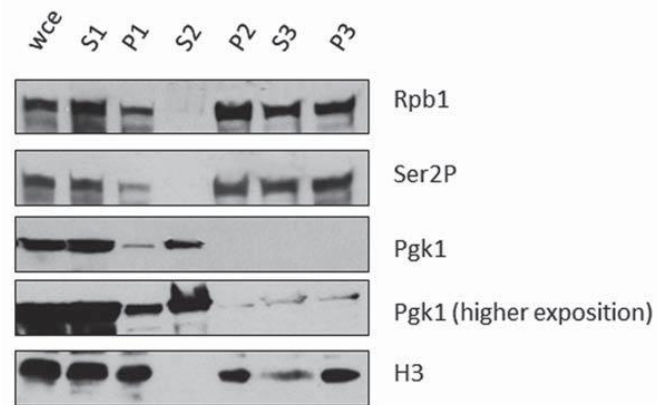
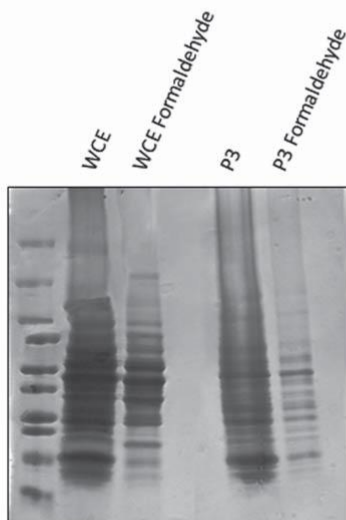


Figure 2

A



B

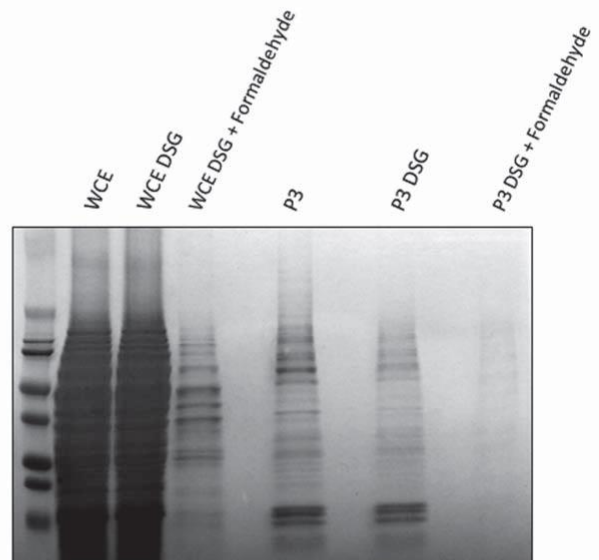


Figure 3

A

Complex	Detected proteins
Histones	Histone H1, Histone H2A, Histone H2B, Histone H3, Histone H4
RNA polymerases	Rpa190, Rpa135, Rpa49, Rpa43, Rpa34, Rpb1, Rpb2, Rpb4, Rpb9, Rpc160, Rpc128, Rpc82, Rpc53, Rpc40, Rpc37, Rpc34, Rpc19, Rpb5, Rpb6, Rpb8
DNA polymerases and Replication factors	Pol1, Pol2, Dpb2, Rfc1, Rfc2, Rfc3, Rfc4, Rfc5,
Chromatin Remodelers (RSC, SWI/SNF, ISWia, ISWib, ISW2, yINO80)	Sth1, Rsc3, Npl6, Rsc6, Rsc2, Arp7, Rsc8, Arp9, Rsc58, Rsc4, Sfh1, Rsc9, Rsc1, Rtt102, Rsc30, Swi3, Swr1, Isw1, Ioc2, Ioc3, Ioc4, Rvb1, Rvb2, Ies1, Ies3, Nhp10

Proteomic analysis of chromatin fractions, by mass spectrometry, in *Saccharomyces cerevisiae*.

B

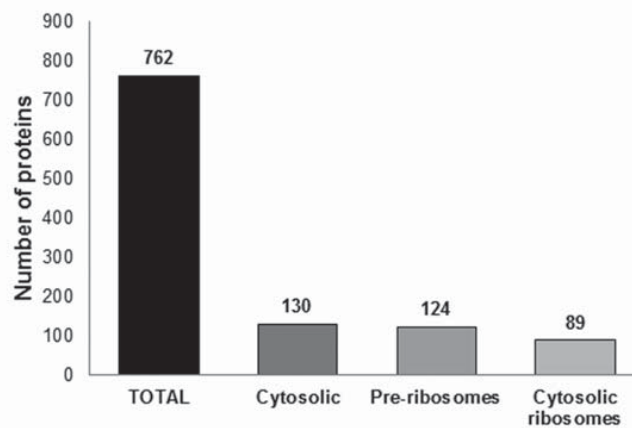


Figure 4

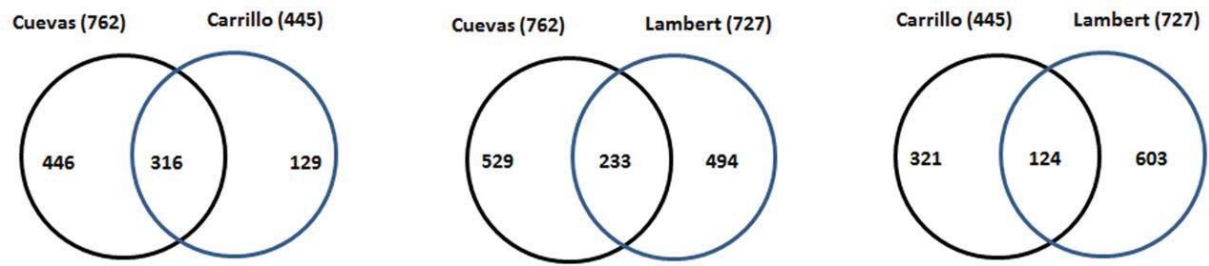


Figure 5

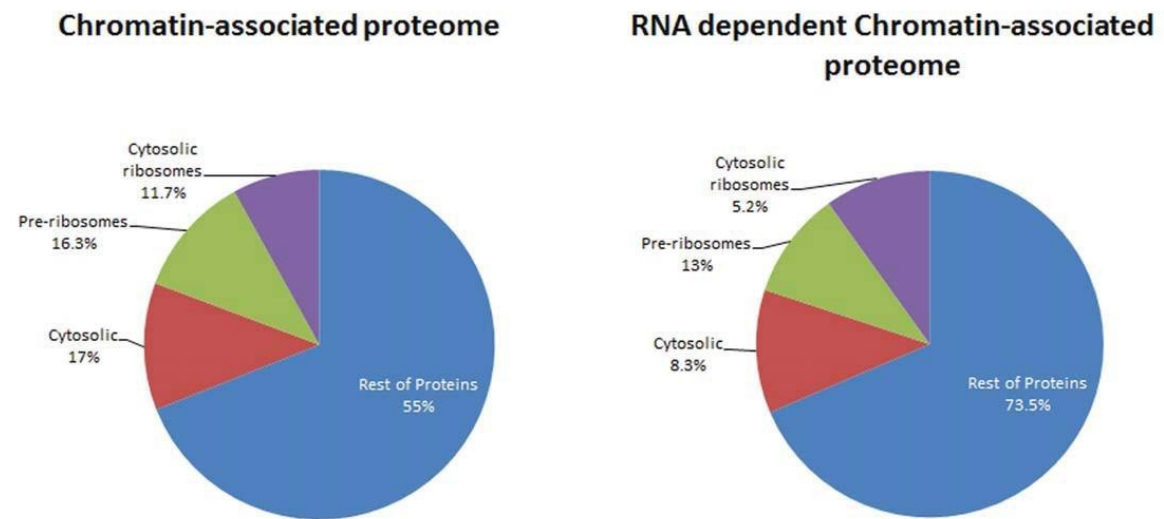


Figure 6

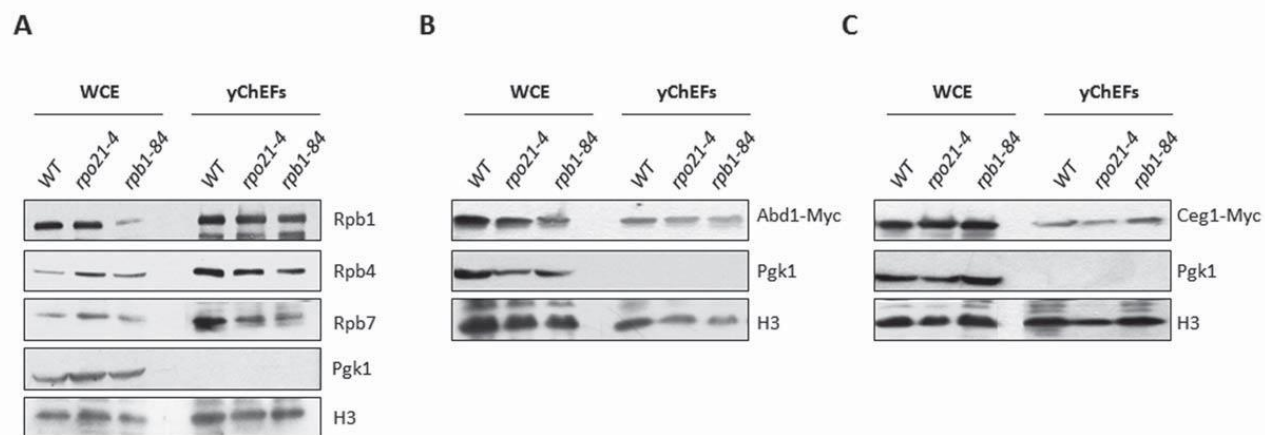
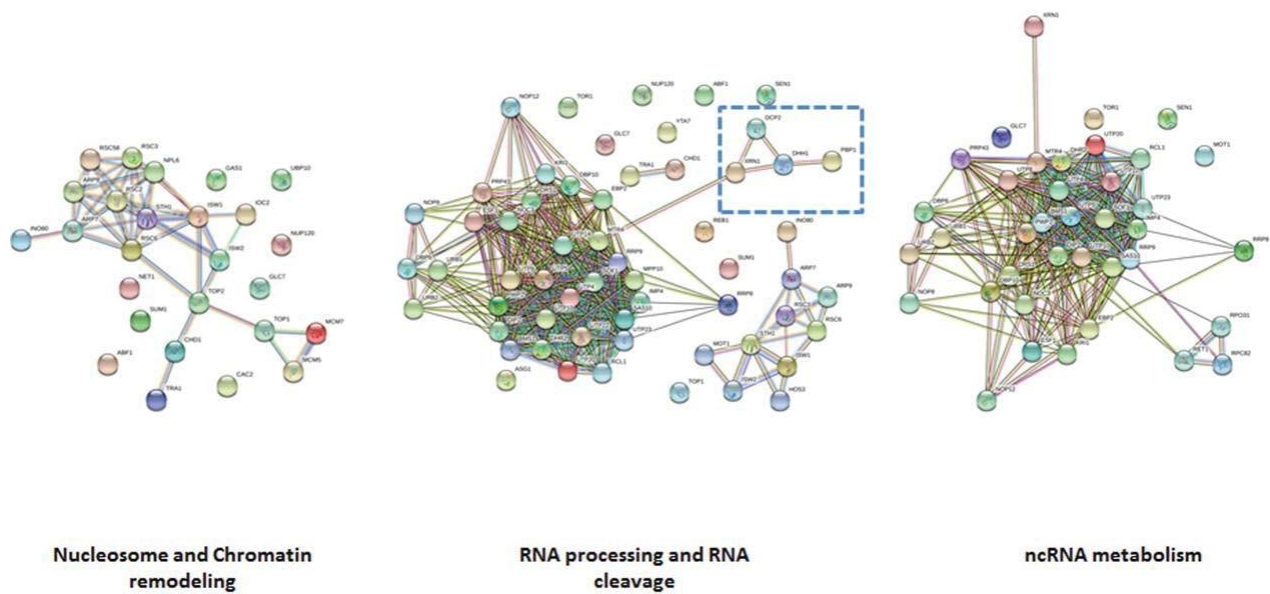


Table 1: Functional categories (Biological Process). Proteins identified by Mass spectrometry from *S. cerevisiae* Chromatin Enriched Fractions.

The analysis was performed using the STRING software (1).

Functional categories	p-Value	Functional categories	p-Value	Functional categories	p-Value
ribosome biogenesis	2.00E-83	ribonucleoprotein complex localization	3.61E-17	regulation of cellular protein metabolic process	1.46E-08
ribonucleoprotein complex biogenesis	4.45E-82	maturation of LSU-rRNA from tricistronic rRNA		negative regulation of metabolic process	1.93E-08
rRNA processing	1.12E-72	transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA)	9.75E-16	RNA biosynthetic process	1.99E-08
rRNA metabolic process	5.80E-70	ribonucleoprotein complex subunit organization	1.25E-15	DNA repair	2.27E-08
ncRNA metabolic process	4.19E-67	maturation of LSU-rRNA	1.44E-15	transcription, DNA-templated	2.95E-08
cellular component biogenesis	4.87E-62	chromatin organization	3.30E-15	negative regulation of nucleobase-containing	
ncRNA processing	1.84E-57	regulation of RNA metabolic process	3.71E-15	compound metabolic process	3.10E-08
ribosomal small subunit biogenesis	1.97E-49	regulation of nucleobase-containing compound		negative regulation of cellular macromolecule	
RNA metabolic process	1.29E-47	metabolic process	5.12E-15	biosynthetic process	6.72E-08
maturation of SSU-rRNA from tricistronic rRNA		chromosome organization	8.07E-15	negative regulation of cellular metabolic process	7.89E-08
transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA)	1.38E-41	rRNA-containing ribonucleoprotein complex export		chromatin assembly	8.14E-08
RNA processing	2.49E-41	from nucleus	1.02E-14	negative regulation of gene expression	8.77E-08
nucleic acid metabolic process	2.49E-41	RNA transport	1.45E-14	nitrogen compound transport	8.77E-08
cellular component organization or biogenesis	2.68E-41	macromolecular complex assembly	1.45E-14	mRNA transport	1.18E-07
maturation of SSU-rRNA	3.19E-40	RNA phosphodiester bond hydrolysis	2.78E-14	protein complex subunit organization	1.60E-07
nucleobase-containing compound metabolic process	3.28E-37	regulation of transcription, DNA-templated	3.28E-14	localization	1.71E-07
cytoplasmic translation	3.02E-36	ribonucleoprotein complex assembly	3.57E-14	negative regulation of cellular biosynthetic process	2.06E-07
cellular aromatic compound metabolic process	4.98E-36	cellular macromolecular complex assembly	3.69E-14	DNA packaging	2.38E-07
heterocycle metabolic process	1.44E-35	organelle assembly	3.69E-14	ribosomal large subunit assembly	2.66E-07
gene expression	4.30E-35	regulation of nucleic acid-templated transcription	5.84E-14	translation	3.15E-07
organic cyclic compound metabolic process	3.89E-33	chromatin remodeling	8.58E-14	negative regulation of macromolecule metabolic	
maturation of 5.8S rRNA from tricistronic rRNA		nucleobase-containing compound transport	1.09E-13	process	4.98E-07
transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA)	5.60E-30	regulation of cellular amide metabolic process	1.47E-13	translational elongation	6.98E-07
ribosomal large subunit biogenesis	3.93E-28	cellular component assembly	2.60E-13	protein-DNA complex assembly	7.27E-07
cellular nitrogen compound metabolic process	5.93E-27	regulation of translation	3.48E-13	transcription from RNA polymerase III promoter	8.94E-07
regulation of nitrogen compound metabolic process	5.24E-26	organic substance metabolic process	7.82E-13	establishment of organelle localization	9.30E-07
regulation of gene expression	2.66E-25	posttranscriptional regulation of gene expression	1.23E-12	negative regulation of biological process	1.10E-06
regulation of cellular metabolic process	5.53E-25	ribosome assembly	1.79E-12	organelle localization	1.37E-06
regulation of cellular macromolecule biosynthetic		nucleic acid phosphodiester bond hydrolysis	2.26E-12	rRNA export from nucleus	1.62E-06
process	1.36E-24	DNA-templated transcription, elongation	5.86E-12	nucleobase-containing compound biosynthetic	
regulation of macromolecule biosynthetic process	1.58E-24	primary metabolic process	8.72E-12	process	2.34E-06
regulation of macromolecule metabolic process	3.03E-24	nucleosome disassembly	3.34E-11	negative regulation of RNA metabolic process	3.52E-06
nitrogen compound metabolic process	3.31E-24	chromatin disassembly	3.34E-11	negative regulation of transcription, DNA-templated	4.74E-06
regulation of primary metabolic process	1.33E-23	ncRNA transcription	3.63E-11	negative regulation of cellular process	5.47E-06
regulation of cellular biosynthetic process	2.53E-23	macromolecule biosynthetic process	4.49E-11	DNA metabolic process	5.90E-06
regulation of metabolic process	2.08E-22	cellular macromolecule biosynthetic process	6.03E-11	organic substance biosynthetic process	6.30E-06
endonucleolytic cleavage in ITS1 to separate SSU-		cellular component organization	1.23E-10	regulation of translational fidelity	6.88E-06
rRNA from 5.8S rRNA and LSU-rRNA from tricistronic		RNA export from nucleus	1.28E-10	macromolecule localization	6.92E-06
rRNA transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA)	2.12E-22	cellular nitrogen compound biosynthetic process	1.81E-10	aromatic compound biosynthetic process	8.61E-06
endonucleolytic cleavage of tricistronic rRNA transcript		chromatin silencing	1.86E-10	amide biosynthetic process	1.01E-05
(SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA)	7.15E-22	organelle organization	1.86E-10	biosynthetic process	1.08E-05
macromolecular complex subunit organization	7.15E-22	metabolic process	2.08E-10	peptide metabolic process	1.36E-05
cleavage involved in rRNA processing	8.23E-22	cellular metabolic process	2.20E-10	cell cycle	1.62E-05
biological regulation	3.16E-20	transcription from RNA polymerase II promoter	2.59E-10	nucleosome mobilization	1.62E-05
rRNA 5'-end processing	6.00E-20	transcription elongation from RNA polymerase II		rRNA transcription from RNA polymerase III promoter	1.94E-05
RNA localization	6.83E-20	promoter	3.66E-10	establishment of localization in cell	1.94E-05
macromolecule metabolic process	1.12E-19	chromatin modification	7.47E-10	snRNA metabolic process	2.34E-05
regulation of cellular process	3.54E-19	regulation of gene expression, epigenetic	7.47E-10	heterocycle biosynthetic process	2.95E-05
endonucleolytic cleavage to generate mature 5'-end of		negative regulation of nitrogen compound metabolic		DNA strand elongation involved in DNA replication	3.00E-05
SSU-rRNA from (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA)	4.06E-19	process	7.78E-10	transcription from RNA polymerase I promoter	3.00E-05
nucleosome organization	5.91E-19	protein complex disassembly	1.55E-09	translational initiation	3.00E-05
nucleocytoplasmic transport	6.64E-19	ribosomal subunit export from nucleus	1.73E-09	nuclear-transcribed mRNA catabolic process	4.69E-05
cellular macromolecule metabolic process	1.32E-18	cellular response to DNA damage stimulus	2.82E-09	chromatin silencing at telomere	5.38E-05
chromatin assembly or disassembly	1.66E-18	macromolecular complex disassembly	3.02E-09	cellular biosynthetic process	5.49E-05
regulation of biological process	1.71E-18	cellular localization	3.16E-09	rRNA transcription	7.36E-05
endonucleolytic cleavage in 5'-ETS of tricistronic	2.66E-18	ATP-dependent chromatin remodeling	3.68E-09	intracellular transport	8.51E-05
rRNA transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA)		RNA phosphodiester bond hydrolysis, endonucleolytic	5.09E-09	nucleosome assembly	9.73E-05
protein-DNA complex subunit organization	1.78E-17	DNA conformation change	5.54E-09	cell cycle process	9.91E-05
ribonucleoprotein complex export from nucleus	2.29E-17	regulation of translational elongation	1.05E-08		

Table I: Yeast strains

Strains	Genotype	Origin
BY4741	<i>MATa his3A1 leu2A0 met15A0 ura3A0</i>	Euroscarf
YFN116	<i>MATa ura3-52 his3A200 leu2-3,112 trp1A63 rpb1-A187::HIS3 + pYEB220 (2μm LEU2 RPB1)</i>	(36)
YFN117	<i>MATa ura3-52 his3A200 leu2-3,112 trp1A63 rpb1-A187::HIS3 + pYEB220-rpo21-4 (2μm LEU2 RPB1)</i>	(36)
YFN104	<i>MATa ura3-52 his3A200 leu2-3,112 trp1A63 rpb1-A187::HIS3 + pYEB220-rpb1-84 (2μm LEU2 RPB1)</i>	(36)
YFN574	<i>MATa ura3-52 his3A200 leu2-3,112 trp1A63 rpb1-A187::HIS3 + pYEB220 (2mm LEU2 RPB1)</i> <i>abd1::13Myc::kanMX6</i>	This work
YFN575	<i>MATa ura3-52 his3A200 leu2-3,112 trp1A63 rpb1-A187::HIS3 + pYEB220-rpo21-4 (2μm LEU2 RPB1)</i> <i>abd1::13Myc::kanMX6</i>	This work
YFN576	<i>MATa ura3-52 his3A200 leu2-3,112 trp1A63 rpb1-A187::HIS3 + pYEB220-84 (2μm LEU2 RPB1)</i> <i>abd1::13Myc::KanMX6</i>	This work
YFN382	<i>MATa ura3-52 his3A200 leu2-3,112 trp1A63 rpb1-A187::HIS3 + pYEB220 (2μm LEU2 RPB1)</i> <i>ceg1::13Myc::kanMX6</i>	This work
YFN383	<i>MATa ura3-52 his3A200 leu2-3,112 trp1A63 rpb1-A187::HIS3 + pYEB220-rpo21-4 (2μm LEU2 RPB1)</i> <i>ceg1::13Myc::kanMX6</i>	This work
YFN384	<i>MATa ura3-52 his3A200 leu2-3,112 trp1A63 rpb1-A187::HIS3 + pYEB220-84 (2mm LEU2 RPB1)</i> <i>ceg1::13Myc::kanMX6</i>	This work

Table 2: Functional categories (Biological Process). Proteins identified by Mass spectrometry from *S. cerevisiae* Chromatin Enriched Fractions after RNase incubation. The analysis was performed using the STRING software (1).

Standard yChEFsIRNase incubation >2

Functional categories	p-Value	Functional categories	p-Value	Functional categories	p-Value
cellular component biogenesis	1.22E-17	nucleosome positioning	6.36E-08	endonucleolytic cleavage in ITS1 to separate SSU-rRNA from 5.8S rRNA and LSU-rRNA from trichostonic rRNA transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA)	2.55E-06
rRNA processing	3.82E-15	maturation of 5.8S rRNA from trichostonic rRNA transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA)	7.11E-08	cleavage involved in rRNA processing	5.27E-06
ribosome biogenesis	2.31E-14	regulation of primary metabolic process	8.01E-08	regulation of biological process	1.28E-05
ribonucleoprotein complex biogenesis	7.16E-14	regulation of nucleobase-containing compound metabolic process	1.07E-07	DNA conformation change	1.28E-05
ncRNA metabolic process	2.63E-12	regulation of macromolecule metabolic process	1.18E-07	regulation of cellular process	1.67E-05
gene expression	5.57E-12	endonucleolytic cleavage in 5'-ETS of trichostonic rRNA transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA)	1.19E-07	cellular macromolecule metabolic process	2.69E-05
RNA metabolic process	6.19E-12	regulation of transcription, DNA-templated	1.19E-07	chromatin silencing	2.71E-05
ribosomal small subunit biogenesis	5.11E-10	regulation of gene expression	1.26E-07	regulation of gene expression, epigenetic	2.94E-05
nucleic acid metabolic process	2.87E-09	endonucleolytic cleavage to generate mature 5'-end of SSU-rRNA from (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA)	1.60E-07	cellular component assembly	3.15E-05
maturation of SSU-rRNA from trichostonic rRNA transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA)	3.07E-09	nucleosome organization	3.26E-07	chromatin assembly	3.86E-05
RNA processing	3.07E-09	ATP-dependent chromatin remodeling	3.51E-07	transcription, DNA-templated	4.32E-05
cellular component organization or biogenesis	6.87E-09	cellular nitrogen compound metabolic process	3.76E-07	DNA-templated transcription, elongation	4.71E-05
regulation of macromolecule biosynthetic process	8.87E-09	nucleosome disassembly	3.82E-07	transcription from RNA polymerase II promoter	4.71E-05
regulation of cellular biosynthetic process	8.87E-09	chromatin disassembly	3.82E-07	DNA packaging	4.74E-05
chromatin assembly or disassembly	1.02E-08	endonucleolytic cleavage of trichostonic rRNA transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA)	7.96E-07	macromolecular complex assembly	6.04E-05
regulation of nitrogen compound metabolic process	1.77E-08	protein-DNA complex subunit organization	9.93E-07	RNA phosphodiester bond hydr	
regulation of cellular macromolecule biosynthetic process	2.40E-08	regulation of metabolic process	1.20E-06		
regulation of cellular metabolic process	4.38E-08				
biological regulation	4.38E-08				

Standard yChEFsIRNase incubation <0.5

Functional categories	p-Value	Functional categories	p-Value	Functional categories	p-Value
cytoplasmic translation	5.36E-55	maturation of SSU-rRNA from trichostonic rRNA transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA)	8.57E-07	cellular amide metabolic process	5.66E-06
ribosome biogenesis	8.13E-14	translational elongation	1.26E-06	regulation of translational elongation	6.77E-06
ribonucleoprotein complex biogenesis	4.31E-13	translation	1.92E-06	rRNA-containing ribonucleoprotein complex export from nucleus	1.15E-05
rRNA metabolic process	5.77E-09	ncRNA metabolic process	1.92E-06	ribonucleoprotein complex export from nucleus	1.39E-05
ribosomal small subunit biogenesis	5.80E-09	peptide metabolic process	2.30E-06	ribonucleoprotein complex localization	1.41E-05
rRNA processing	7.79E-09	regulation of translation	4.74E-06	RNA processing	1.70E-05
cellular component biogenesis	4.72E-08			regulation of translational initiation	2.55E-05

Capítulo II

AATCGCAGT GATCGATT AGCTAGT GACGCTA AATCGCAGT GATCGATT AGCTAGT GACGCTA
ACCRACCTC GTGAGCACTT CACGAGT GCTCARCC ACCRACCTC GTGAGCACTT CACGAGT GCTCARCC

Nuestro grupo de investigación a lo largo de los últimos años ha tratado de caracterizar funcionalmente la RNA polimerasa II y el papel que juegan proteínas asociadas a ella en diversos procesos como el ensamblaje, transcripción y ciclo de vida de los mRNA.

Este estudio se va a centrar en el papel de dos proteínas; Bud27, cuyo ortólogo en humanos es URI/RMP, miembro de la familia *prefoldin-like* de las chaperonas ATP-independientes y Rtr1, proteína ortóloga de la humana RPAP2, fosfatasa que afecta la expresión génica al modular el estado de fosforilación del dominio C-terminal, CTD, de la subunidad mayor de la RNA pol II.

Nuestro grupo de investigación ha descrito un papel para Bud27 en la biogénesis de los mRNA y el ensamblaje de la RNA pol II (Mirón-García et al., 2013; Mirón-García et al., 2014). Datos de nuestro grupo muestran su importancia en la maduración de transcritos, así como su interacción con proteínas de unión a RNAs y RBPs. En base a esto, nos planteamos el posible papel de Bud27 en el ciclo de vida de los mRNA.

Dado el papel de Rtr1 en el paso de la iniciación a la elongación en la transcripción, etapa en la que el grupo centra parte de su trabajo, datos de nuestro grupo y de otros que sugieren un papel en el ensamblaje de la RNA pol II, y apoyado por datos recientes que indican que modula la estabilidad de su propio transcrito (Hodko et al., 2016), nos planteamos estudiar el papel de Rtr1 en el ciclo de vida de los mRNA.

CAPÍTULO II: INFLUENCIA DE Bud27 EN EL CICLO DE VIDA DE los mRNA

Antecedentes

Bud27, cuyo ortólogo en humanos es URI/RMP, es un miembro de la familia *prefoldin-like* de las chaperonas ATP-independientes. Nuestro grupo de investigación ha descrito que media el ensamblaje de las tres RNA pols de manera dependiente de Rpb5, subunidad común a las tres RNA polimerasas (Mirón-García et al., 2013) y otros han descrito su papel en el ensamblaje de la RNA pol III (Vernekar and Bhargava, 2015). Del mismo modo, Bud27 contribuye a la biogénesis de los mRNA e influencia la elongación de la transcripción de la RNA pol II mediante su asociación con Sth1, componente principal del complejo remodelador de cromatina RSC, (Mirón-García et al., 2014). La asociación entre Bud27 y RSC se extiende a la RNA pol III (Vernekar and Bhargava, 2015). De igual manera, la falta de Bud27 y de URI afecta la transcripción de distintos genes (Gstaiger et al., 2003; Mirón-García et al., 2014). Además, Bud27 también modula la asociación de la RNA polimerasa II a los genes (datos de nuestro grupo).

Bud27 y URI participan en la ruta TOR (“target of rapamycin”), ruta de señales que regula la disponibilidad de nutrientes en eucariotas (Gstaiger et al., 2003). Datos de nuestro grupo muestran que en el mutante *bud27Δ* hay 177 genes con una mayor ocupación de la RNA polimerasa II respecto al silvestre, de los cuales el 75% son putativamente dependientes de Gcn4 (factor de transcripción activador de la biosíntesis de los aminoácidos). A su vez, Gcn4 está regulada por la ruta TOR, controlando la traducción de los mRNA dependientes de Gcn4 (Valenzuela et al., 2001). Por otro lado, se sabe que el bloqueo de la ruta TOR conlleva la alteración de los transcritos, acortando las colas de poli(A) provocando una aceleración en la degradación de los mRNA (Albig and Decker, 2001).

Estudios de nuestro grupo muestran que Bud27 está implicada en procesos de maduración de transcritos, concretamente en la síntesis y/o maduración de los tRNA, posiblemente regulando específicamente la maquinaria transcripcional de la RNA polimerasa III, así como en la maduración de rRNAs y mRNAs.

Asimismo, en nuestro grupo hemos identificado mediante un escrutinio de supresión génica, por sobreexpresión, genes que suprimen el defecto de termosensibilidad

en una cepa *bud27Δ*. De entre ellos, resulta interesante el gen *PAB1* que codifica la proteína Pab1 (proteína de unión al mRNA), involucrada en procesos de deadenilación (revisado en (Parker, 2012)) y tamaño de la cola de poli(A) de los mRNA (Aasland et al., 1996).

Por tanto, puesto que Bud27 es un importante foco de estudio en nuestro grupo, y basándonos en los antecedentes previamente mostrados, nos planteamos el estudio del papel que puede tener Bud27 en el ciclo de vida de los mRNA. De igual manera consideramos interesante analizar el bloqueo de la ruta TOR por rapamicina para intentar elucidar el posible papel que Bud27 puede estar realizando en este proceso en cuanto a la estabilidad de los mRNA.

ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LOS mRNA EN AUSENCIA DE Bud27

Basándonos en los antecedentes indicados, nos planteamos el estudio de la estabilidad de los transcritos en carencia de Bud27.

Estudio de la estabilidad de los mRNA en genes individuales en ausencia de Bud27

Para determinar el efecto que tiene la delección de *BUD27* en la estabilidad global de los mRNA se usó la cepa mutante *bud27Δ* y su cepa isogénica silvestre. Para ello, se crecieron las cepas en medio SD líquido a 30°C. Cuando los cultivos alcanzaron una $D.O_{600} \sim 0,5$, se añadió tiolutina para inhibir la transcripción de nuevas moléculas de mRNA, y se recogieron alícuotas a distintos intervalos de tiempo entre 0 y 60 minutos, permitiéndonos de esta forma tener un seguimiento de la estabilidad de los mRNA a lo largo del tiempo. Tras la extracción de RNA de cada punto se analizó mediante RT-qPCR la estabilidad de cuatro genes individuales: *CPA2*, *HHT1*, *ACT1* y *RPB6*, normalizando su expresión a la del rRNA 18S transcrito por la RNA polimerasa I (Figura B1).

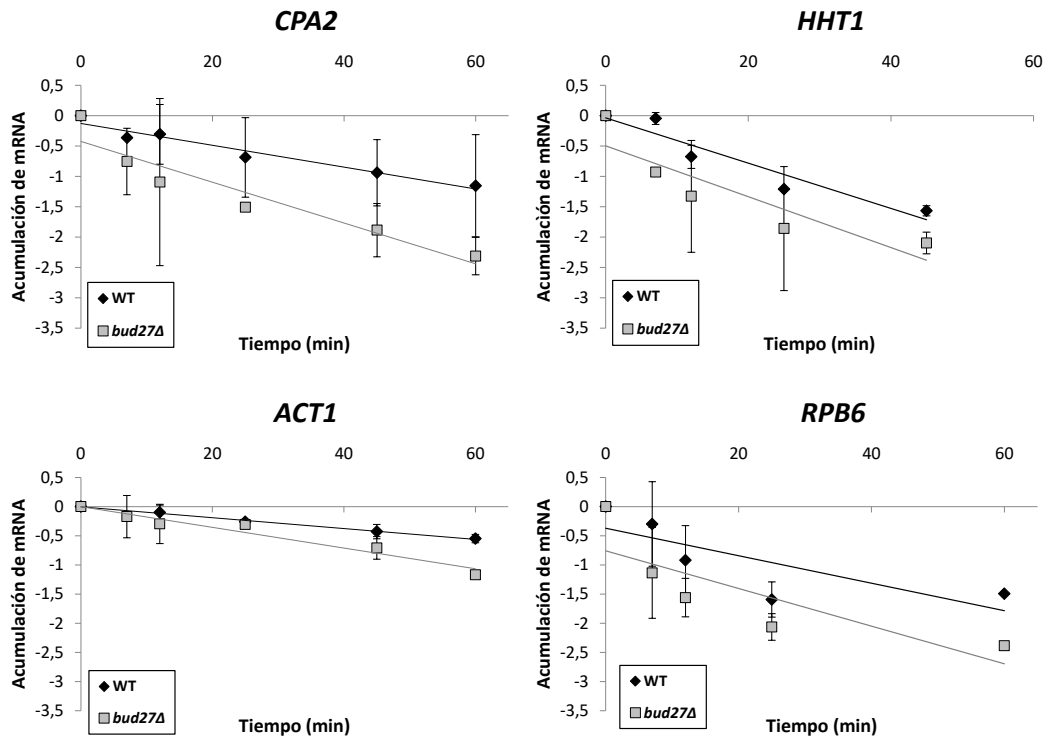


Figura B1: Representación de la estabilidad de los mRNA de los genes *CPA2*, *HHT1*, *ACT1* y *RPB6*. El análisis se realizó mediante RT-qPCR y se normalizó a los niveles del rRNA *18S*. La caída se representa en escala logarítmica (logaritmo neperiano). La línea de tendencia es indicativa de la velocidad de degradación del mRNA.

Como se observa en la figura B1, de forma generalizada en los cuatro genes analizados, el mutante *bud27Δ* muestra una aceleración de la velocidad de degradación de los mRNA si lo comparamos con su cepa isogénica silvestre, provocando una disminución de la vida media de los transcritos, como se muestra en la tabla B1. Estos datos sugieren un papel positivo de Bud27 en la estabilidad de los mRNA.

	WT	<i>bud27Δ</i>
<i>CPA2</i>	1	0,49
<i>HHT1</i>	1	0,88
<i>ACT1</i>	1	0,52
<i>RPB6</i>	1	0,72

Tabla B1: Vidas medias de los mRNA para los genes indicados. Los datos son analizados a partir de los datos de RT-qPCR de la Figura B1, en el mutante *bud27Δ* frente al silvestre, normalizando el silvestre a 1.

RESULTADOS

Análisis de los niveles de acumulación de mRNA de los genes *CPA2*, *HHT1*, *ACT1* y *RPB6*, en ausencia de Bud27

Una vez analizado el efecto de la ausencia de Bud27 en la estabilidad de los mRNA, nos planteamos analizar los niveles de acumulación de mRNA de los genes utilizados en la figura B1, para determinar si el mutante *bud27Δ* altera dicha acumulación (Figura B2). Para ello, se utilizaron los valores de acumulación de mRNA obtenidos a tiempo 0 (0 minutos) procedentes del análisis de RT-qPCR (Figura B1), antes del tratamiento con tiolutina. Los valores de acumulación de mRNA inicial se relativizaron al control interno 18S (Figura B2).

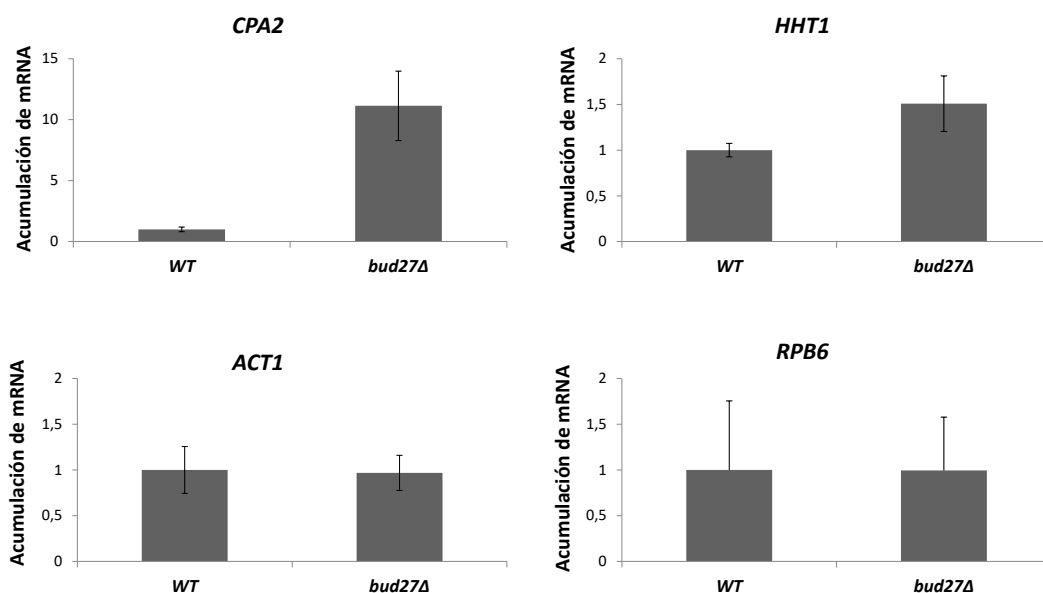


Figura B2: Análisis de la acumulación de mRNA para los genes *CPA2*, *HHT1*, *ACT1* y *RPB6*. Valores de acumulación inicial de mRNA de cada gen (Figura B1), antes del tratamiento con tiolutina, relativizados al control interno rRNA 18S, tanto para el mutante *bud27Δ* como para su cepa isogénica silvestre.

Como se observa en la Figura B2 los niveles de acumulación de mRNA no muestran variaciones significativas entre el mutante *bud27Δ* y la cepa isogénica silvestre para los genes analizados, excepto para el gen *CPA2*. Curiosamente el gen *CPA2* muestra niveles de ocupación de RNA pol II en carencia de Bud27 más elevados que en una cepa silvestre (datos de nuestro grupo), lo que podría explicar este aumento de acumulación de mRNA. Con la excepción de este gen, podemos sugerir que puesto que observamos una menor

estabilidad de los transcritos de varios de estos genes en el mutante *bud27Δ*, sin variación en la acumulación de mRNA respecto al silvestre, posiblemente se esté dando una respuesta homeostática en dicho mutante para compensar la cantidad de mRNA global en la célula.

Por otra parte, los análisis realizados mediante citometría de flujo (Materiales y Métodos) no mostraron diferencias significativas en el tamaño celular (WT=1; *bud27Δ*=1,15 +/- 0,02) y número de células por unidad de volumen a igual DO₆₀₀. Sí existe, no obstante un diferencia importante en la tasa de crecimiento, GR (WT= 90 min; *bud27Δ*= 135min).

Estudio de la estabilidad global de mRNA

Una vez determinada la disminución de estabilidad de los mRNA de los genes analizados, nos planteamos el análisis de la estabilidad global de mRNA mediante Dot-blot. A pesar de que es una técnica rutinaria en mucho laboratorios, en nuestro grupo no se había desarrollado esta técnica, al menos utilizando la sonda fluorescente oligodT (oligodTCy3) que reconoce las colas de poli(A) de los mRNA. Por ello, en primer lugar se llevó a cabo la puesta a punto del método, a partir de muestras de RNA total recogidas a tiempo 0 (0 minutos), de dos réplicas del mutante *bud27Δ* y sus correspondientes réplicas del silvestre. Como se muestra en la figura B3B podemos observar las diferencias respectivas esperadas, en la cuantificación de mRNA total, en relación al RNA total cargado. Los datos corroboran la sensibilidad y eficacia de esta técnica en la detección de los niveles de mRNA.

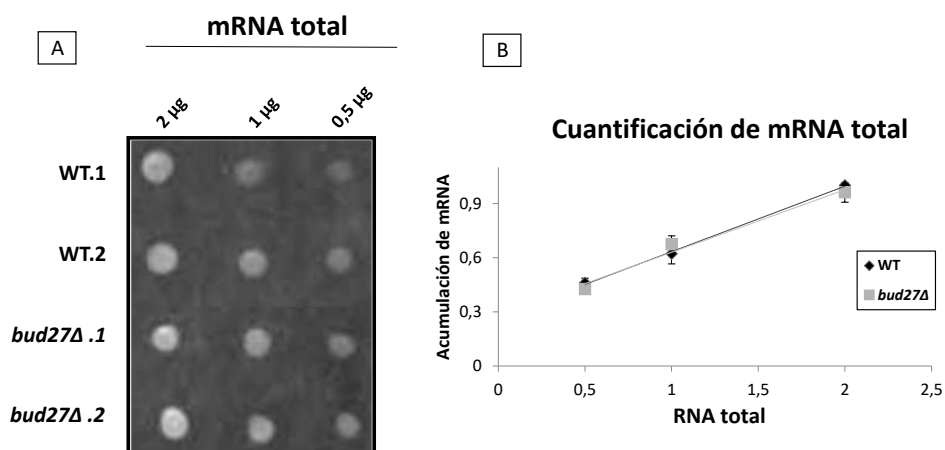


Figura B3: Puesta a punto del análisis de mRNA total mediante Dot-blot con la sonda fluorescente oligodT (oligodTCy3). **A)** Dot-blot, analizando por duplicado mutantes *bud27 Δ* y su respectivo silvestre. Se cargaron 2 μ g, 1 μ g y 0,5 μ g de RNA total. **B)** Cuantificación de los niveles de mRNA en las diferentes muestras.

Una vez puesta a punto la técnica, continuando con el propósito de analizar la estabilidad del mRNA total en el mutante *bud27 Δ* respecto al silvestre, utilizando las diferentes muestras recogidas a los distintos tiempos entre 0-60 minutos previo al tratamiento con tiolutina en el apartado anterior, se analizó la cantidad de mRNA total mediante Dot-blot, cargando cantidades iguales de RNA total para cada muestra (Figura B4).

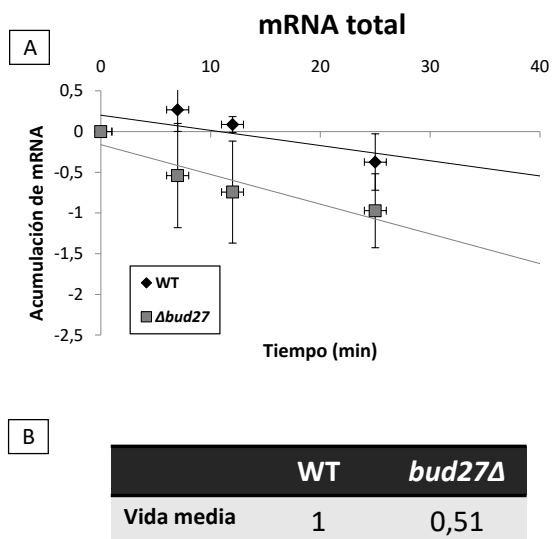


Figura B4: Análisis de la estabilidad de mRNA total mediante Dot-blot, en la cepa *bud27 Δ* y su cepa isogénica silvestre, previo al tratamiento con tiolutina para provocar la parada transcripcional. **A)** Cuantificación de la señal de fluorescencia con la sonda oligodT (oligodTCy3) para cada tiempo analizado. **B)** Cálculo de la vida media de los transcritos del apartado A) relativizando frente al nivel en la cepa silvestre

Como se observa en la figura B4A, la estabilidad global de los mRNA en una cepa *bud27Δ*, es menor que la de la cepa isogénica silvestre. Tal y como se observa en el análisis de las vidas medias, el mutante *bud27Δ* muestran una disminución del doble en la vida media de los mRNA en relación a la cepa silvestre (Figura B4B).

Por otro lado, se determinaron los niveles de acumulación de mRNA global, a partir de los valores obtenidos a tiempo 0 (0 minutos) en el Dot-blot, antes del tratamiento con tiolutina. Los valores de acumulación de mRNA inicial se relativizaron a la cantidad total de RNA utilizada (μg de RNA) (Figura B5).

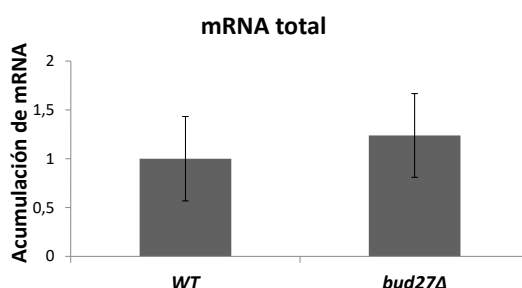


Figura B5: Análisis de la acumulación global de mRNA. Valores de acumulación global de mRNA (Figura B4A), previo al tratamiento con tiolutina, relativizados a la cantidad total de RNA usado en cada experimento (μg de RNA), tanto para el mutante *bud27Δ* como para su cepa isogénica silvestre.

Como se observa en la figura B5 los niveles de acumulación de mRNA global entre el mutante *bud27Δ* y la cepa isogénica silvestre no muestran diferencias significativas. El hecho de que haya una caída importante de la vida media de los mRNA sin cambios importantes en la acumulación de los mismos sugiere un comportamiento homeostático para mantener los niveles de mRNA similares a los de la cepa silvestre. Eso sugiere un aumento de la actividad transcripcional.

PAPEL DE Bud27 EN LOS PROCESOS DE POLIADENILACIÓN ALTERNATIVA de los mRNA

Una vez demostrado el papel de Bud27 en la estabilidad del mRNA, tratamos de determinar el mecanismo a través del cual Bud27 modula este proceso. Se ha descrito que tanto Bud27 como su ortólogo en humanos, URI, participan en la ruta TOR (Gstaiger et al.,

2003), y que el bloqueo de la ruta TOR tras el tratamiento por rapamicina produce la desestabilización de los transcritos debido a un acortamiento en las colas de poli(A) en *S. cerevisiae* (Albig y Decker, 2001). Además, en un escrutinio de supresión génica llevado a cabo en nuestro grupo, se ha identificado supresión del fenotipo de termosensibilidad en una cepa con *BUD27* delecionado por sobreexpresión de *PAB1*, gen que codifica la proteína Pab1 de unión a la colas de poli(A) e involucrada en el control del tamaño de las mismas y en procesos de deadenilación de los transcritos, modulando la actividad de complejos tales como Ccr4/Pop2/Not y Pan2/Pan3, implicados directamente en el acortamiento de las colas de poli(A) (revisado en (Parker, 2012)). Puesto que se ha descrito previamente que uno de los motivos que provoca inestabilidad en los transcritos es la alteración en las colas de poli(A) por procesos de “poliadenilación alternativa” (Geisberg et al., 2014), planteamos la hipótesis de que la inestabilidad de los transcritos en carencia de Bud27 pueda ser debida a este proceso de poliadenilación alternativa. Asimismo se ha demostrado, que la alteración de los sitios de poliadenilación puede estar ocasionada por daños en el DNA sufrido por diferentes condiciones de estrés tales como UV o 4-nitroquinolina 1-óxido (4NQO) (Graber et al., 2013), y existen estudios que involucran a Bud27 como factor de reparación del DNA dañado en situaciones de estrés (Muñoz-Galván et al., 2013).

Por tanto, nos planteamos realizar un estudio de poliadenilación alternativa en cepas con *BUD27* delecionado así como en su cepa isogénica silvestre tratada con rapamicina para bloquear la ruta TOR.

Análisis transcriptómico del mutante *bud27Δ* y su comparación con el bloqueo de la ruta TOR por rapamicina.

Con objeto de analizar el perfil de poliadenilación en cepas carentes de *BUD27* así como en cepas silvestres tratadas “overnight” con rapamicina para bloquear la ruta TOR, se procedió a realizar un análisis global de mRNA mediante RNA-Seq. La secuenciación se llevó a cabo en dirección 3’-5’, desde el primer nucleótido siguiente a la cola de poli(A), siguiendo el método descrito previamente (Wilkening et al., 2013) (Ver Materiales y Métodos). El estudio de expresión génica así como el análisis de los sitios de poliadenilación derivado de estos datos se realizó en colaboración con el Dr. Vicent Pelechano (Karolinska Institute, Estocolmo, Suecia).

A partir de los datos obtenidos mediante RNA-Seq se realizaron en primer lugar estudios transcryptómicos tanto en el mutante *bud27Δ* frente a la cepa isogénica silvestre, como en el propio silvestre tratado con rapamicina frente a condiciones de no tratamiento. Para este estudio se usaron técnicas bioinformáticas aprendidas durante mi estancia en el laboratorio del Dr. Vicent Pelechano (Karolinska Institute, Estocolmo, Suecia). El análisis de los niveles de expresión génica se realizó con el programa Rstudio, utilizando el paquete Deseq2, y se desarrolló un primer análisis de calidad y similitud entre réplicas para las distintas muestras. Para ello, en la figura B6A se muestra este análisis empleando un mapa de calor (*heatmap*), cuya escala de colores representa la semejanza entre muestras, siendo los tonos más oscuros indicativo de una mayor similitud entre las mismas. Otro tipo de estudio que se desarrolló fue un análisis “*heatpairs*” (Figura B6B), donde igualmente se comparan todas las réplicas de cada muestra entre sí, pero en este caso la similitud entre las muestras viene indicada por un valor numérico, siendo 1 el valor de mayor similitud; se representan además unas gráficas de dispersión donde la desviación de puntos con respecto a la línea de tendencia indica variabilidad entre las muestras. Por último, como control de calidad representamos una gráfica del tipo PCA (Análisis de los componentes principales) (Figura B6C) donde las réplicas de la misma muestra están representadas con un punto del mismo color. La proximidad de los puntos es indicativa de mayor similitud entre ellas.

A diferencia de los posteriores análisis de nivel de expresión génica, en los cuales se utilizan los datos normalizados mediante logaritmo en base 2, “*log2foldchange*”, (Figura B7), en el análisis de las gráficas indicativas de calidad y similitud de réplicas (“*heatmaps*”, “*heatpairs*” y “*PCA*”,) (Figura B6), el empleo de los datos logarítmicos en base 2 plantea un problema. Los genes con bajo nivel de conteo tienden a dominar el resultado, debido al fuerte ruido de fondo (Poisson) inherente en los conteos de los valores pequeños. Para solucionar este problema, Deseq2 ofrece una transformación regularizada del logaritmo (*rlog*), donde los genes con altos niveles de conteos no difieren mucho del logaritmo en base 2 ordinario. Sin embargo, para los genes con niveles de conteos bajos, los valores se reducen a los promedios de los genes en todas las muestras, permitiendo de este modo, obtener un análisis representativo.

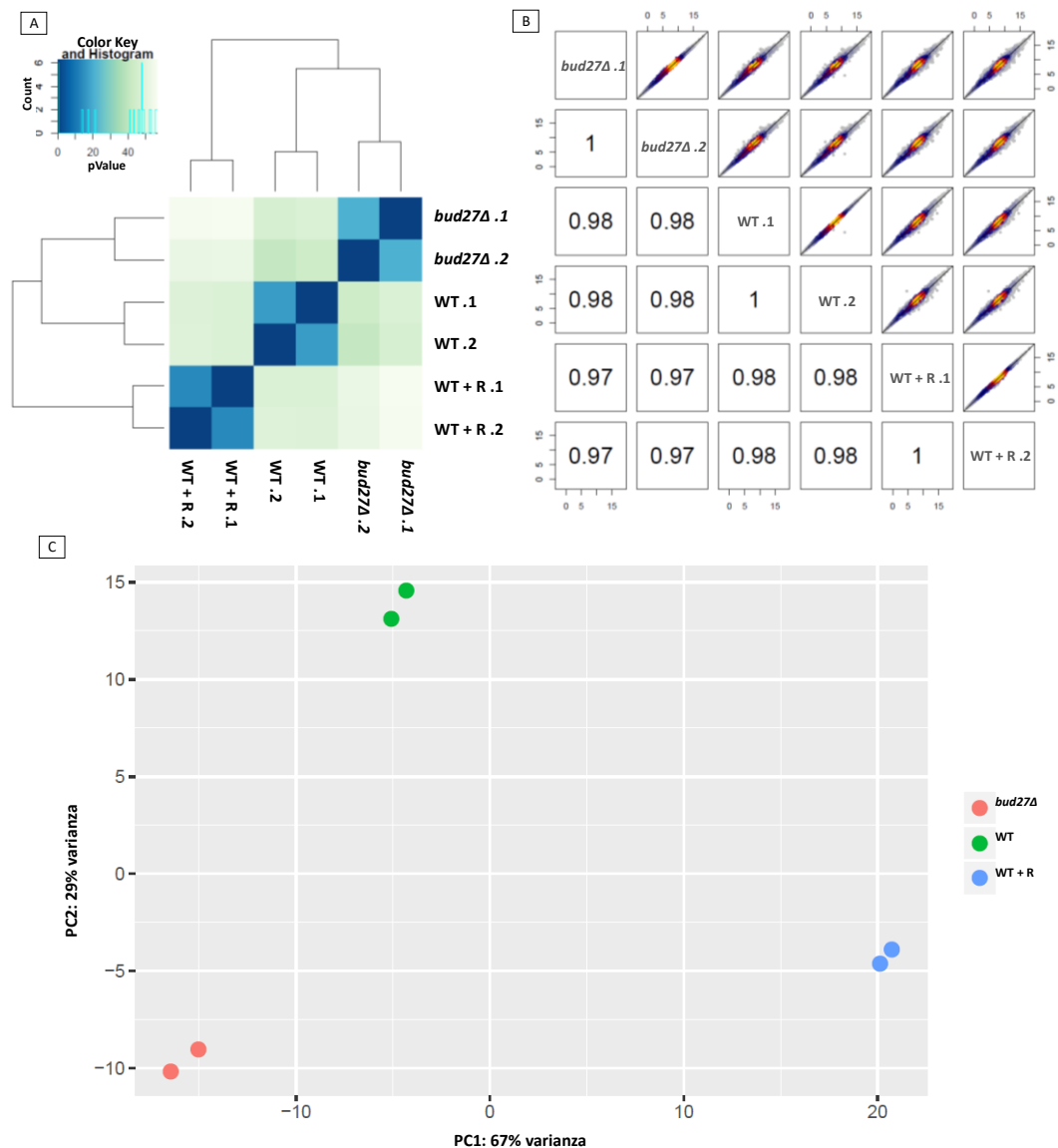


Figura B6: Análisis de calidad y variabilidad entre las muestras de RNAseq para el mutante *bud27Δ* y la cepa isogénica silvestre tratada con rapamicina (WT + R), así como el mismo silvestre sin tratamiento específico (WT). **A)** Análisis *Heatmap*. Mapa de calor que establece una mayor similitud entre muestras; a mayor intensidad del color mayor similitud. **B)** Análisis *Heatpairs*. En esta gráfica la similitud entre las muestras viene indicada por un valor numérico, siendo 1 el valor de mayor similitud, y unas gráficas de dispersión donde la desviación de puntos con respecto a la línea de tendencia indica variabilidad entre las muestras. **C)** Análisis PCA. La proximidad de los puntos de las réplicas de las mismas muestras confirma su calidad en cuanto a similitud y la distancia con las otras muestras indica mayor variabilidad.

Evaluando los diferentes análisis de calidad representados en la figura B6 concluimos que las muestras con las que estamos trabajando son fiables por la similitud existente entre réplicas (Figura B6). Además, podemos observar las diferencias existentes entre el mutante *bud27Δ* y el bloqueo de la ruta TOR por rapamicina en una cepa silvestre, ambas frente a la misma cepa silvestre sin tratamiento específico, lo que sugiere una expresión génica diferencial.

Una vez valorado la calidad de las muestras, se procedió al análisis de los niveles de acumulación de mRNA para cada gen entre la mutación *bud27Δ* y el bloqueo de la ruta TOR por rapamicina en una cepa silvestre en ambos casos frente la misma cepa silvestre sin tratamiento específico (Figura B7). Para el análisis de acumulación de mRNA sí se emplean datos con logaritmo en base 2. En la representación gráfica de la figura B7 cada punto simboliza un gen. El eje X corresponde a la acumulación media de mRNA para cada gen, mientras que el eje Y muestra las diferencias entre las condiciones estudiadas. Los puntos en rojo representan aquellos genes con diferencias significativas ($p\text{Value} < 0.01$).

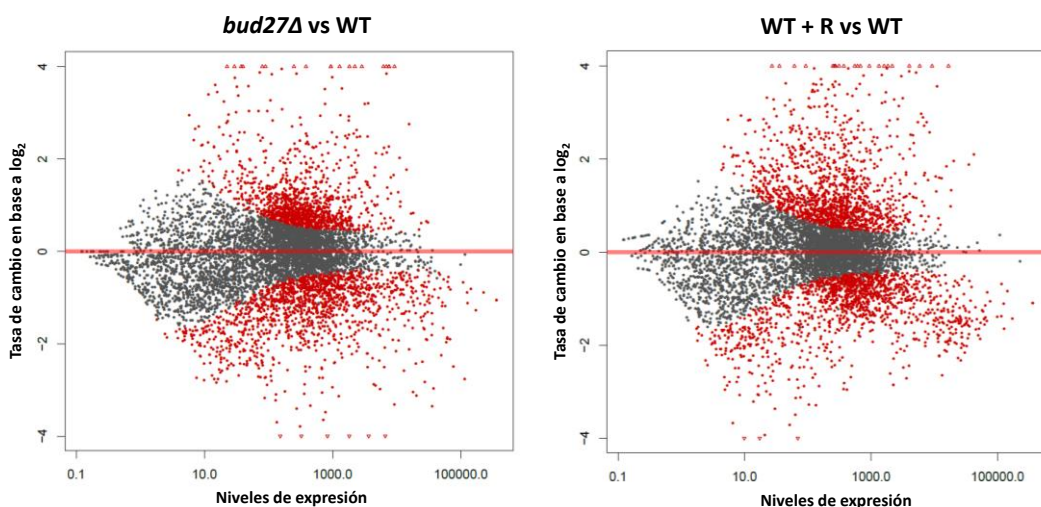


Figura B7: Análisis del nivel de acumulación de mRNA diferencial de cada gen (niveles de expresión) en el mutante *bud27Δ* y en un silvestre tratado con rapamicina para bloquear la ruta TOR (WT + R), frente al silvestre (WT). En la figura aparecen con puntos rojos aquellos genes que muestran diferencias significativas, ($p < 0.01$), frente al silvestre.

Como se muestra en la figura B7, la ausencia de Bud27 en la célula y el tratamiento con rapamicina en un silvestre para bloquear la ruta TOR (Figura B7) tiene un efecto

RESULTADOS

importante en la acumulación de mRNA (expresión génica). En ambas condiciones, la nube de puntos rojos sugiere que la expresión génica de un importante número de genes se ve afectada respecto al silvestre.

Para determinar el número de genes que estaban afectados con una mayor o menor acumulación de mRNA en el mutación *bud27Δ* y el bloqueo de la ruta TOR por rapamicina en una cepa silvestre, ambos frente a la misma cepa silvestre sin tratamiento específico, se realizaron diagramas de Venn. De igual modo, se representan mediante diagramas de Venn los genes comunes a las dos situaciones. En todos los casos, se trata de diferencias en la acumulación de mRNA, mayor o menor de 2 veces para las 2 condiciones analizadas (Figura B8).

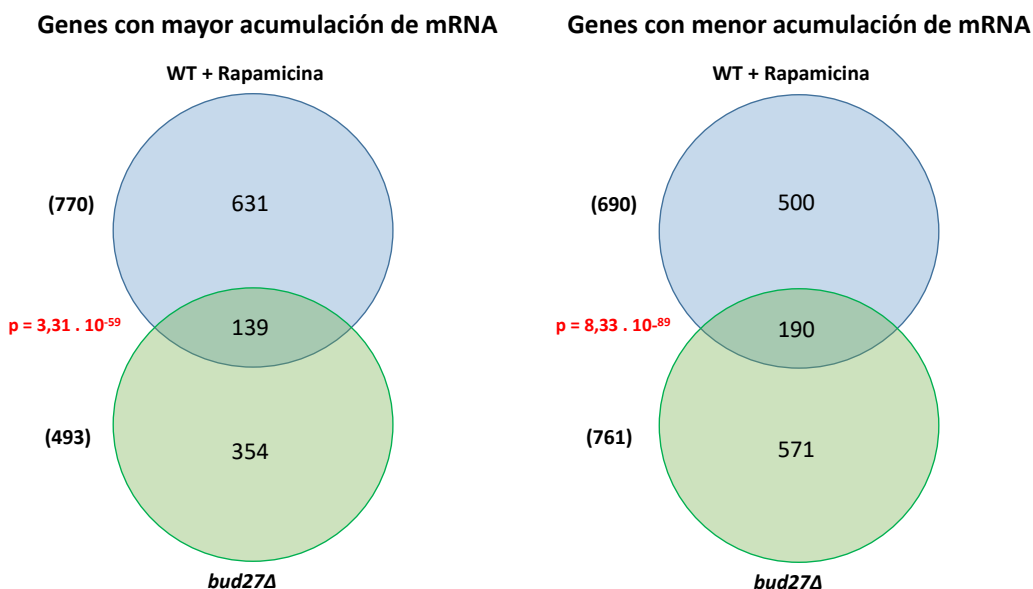


Figura B8: Representación mediante Diagramas de Venn de genes con acumulación de mRNA mayor y menor de 2 veces en el mutante *bud27Δ* y el bloqueo de la ruta TOR por rapamicina en una cepa silvestre frente la misma cepa silvestre sin tratamiento específico.

Como se observa en la figura B8, tanto en el mutante *bud27Δ* como en la cepa silvestre tratada con rapamicina para bloquear la ruta TOR, existe un importante número de genes alterados en cuanto a la acumulación de mRNA, con respecto a la cepa silvestre. Además, un alto número de estos genes son comunes a ambas condiciones (Entre 25-28%

en carencia de Bud27 y entre 18-27% en bloqueo de ruta TOR, para los genes de mayor o menor acumulación, respectivamente). Ante la hipótesis de que el bloqueo de la ruta TOR, que altera la estabilidad de los mRNA acelerando su degradación (Albig and Decker, 2001) y el aumento de inestabilidad de los mRNA en una *bud27Δ* (Figura B1) puedan ser respuestas comunes, analizamos las categorías funcionales a las que pertenecían estos genes alterados. Para ello se hizo un análisis con las herramientas de la plataforma STRING (*Functional protein association networks* (Szklarczyk et al., 2016), de los procesos biológicos, excluyendo categorías con valores de p-Value menores de 10^{-5} . En la tabla B2 se analizan todos los genes con mayor y menor acumulación de mRNA en un mutante *bud27Δ* frente al silvestre, en la tabla B3 se analizan todos los genes con mayor y menor acumulación de mRNA en un silvestre bloqueando la ruta TOR con rapamicina frente al silvestre sin tratamiento específico y en la tabla B4, se analizan los genes con mayor y menor acumulación de mRNA comunes a ambas condiciones.

Genes con mayor acumulación de mRNA en el mutante *bud27Δ*

Procesos biológicos

	p-Value
proceso biosintético de aminoácidos celulares	$3.36 \cdot 10^{-12}$
proceso biosintético de alfa-aminoácido	$1.11 \cdot 10^{-11}$
proceso biosintético de pequeñas moléculas	$1.92 \cdot 10^{-10}$
proceso metabólico alfa aminoácido	$3.87 \cdot 10^{-10}$
proceso metabólico de aminoácidos celulares	$1.11 \cdot 10^{-09}$
proceso metabólico de aminoácidos de la familia del aspartato	$2.12 \cdot 10^{-09}$
proceso biosintético de ácido carboxílico	$3.61 \cdot 10^{-09}$
proceso biosintético de aminoácidos de la familia del aspartato	$5.06 \cdot 10^{-08}$
proceso metabólico de pequeña molécula	$6.62 \cdot 10^{-08}$
proceso biosintético de lisina	$7.24 \cdot 10^{-08}$
proceso metabólico oxoácido	$4.99 \cdot 10^{-06}$
proceso biosintético de lisina a través del ácido α -aminoadípico	$6.77 \cdot 10^{-06}$
proceso metabólico de ácido carboxílico	$2.12 \cdot 10^{-05}$

Genes con menor acumulación de mRNA en el mutante *bud27Δ*

Procesos biológicos

Categoría no encontrada

Tabla B2: Análisis de las categorías funcionales de los genes con mayor o menor acumulación de mRNA en el mutante *bud27Δ* frente al silvestre, a partir de los datos procedentes del RNA-Seq (Figura B7). Se usó el programa STRING (<https://string-db.org/>) (Szklarczyk et al., 2016).

Genes con mayor acumulación de mRNA en un silvestre

tratado con rapamicina para bloquear la ruta TOR

Procesos biológicos

	p-Value
proceso metabólico de pequeña molécula	$5.44 \cdot 10^{-07}$
proceso metabólico del glutamato	$8.07 \cdot 10^{-05}$
proceso metabólico de ácido carboxílico	$8.07 \cdot 10^{-05}$
proceso metabólico del ácido monocarboxílico	$8.07 \cdot 10^{-05}$

Genes con menor acumulación de mRNA en un silvestre

tratado con rapamicina para bloquear la ruta TOR

Procesos biológicos

	p-value
traducción citoplásmica	$4.46 \cdot 10^{-12}$
biogénesis ribosómica	$1.31 \cdot 10^{-77}$
biogénesis del complejo ribonucleoproteico	$1.79 \cdot 10^{-68}$
procesamiento de rRNA	$7.24 \cdot 10^{-52}$
proceso metabólico del ncRNA	$7.07 \cdot 10^{-51}$
proceso metabólico del rRNA	$4.11 \cdot 10^{-49}$
procesamiento de ncRNA	$7.19 \cdot 10^{-49}$
biogénesis de la subunidad pequeña ribosomal	$2.53 \cdot 10^{-40}$
maduración de SSU-rRNA a partir del transcrito tricistronico de rRNA (SSU-rRNA,	$2.48 \cdot 10^{-35}$
maduración de SSU-rRNA	$5.06 \cdot 10^{-34}$
biogénesis de la subunidad ribosomal grande	$2.23 \cdot 10^{-30}$
Procesamiento de RNA	$3.44 \cdot 10^{-28}$
biogénesis del componente celular	$3.12 \cdot 10^{-26}$
montaje de ribosomas	$1.56 \cdot 10^{-22}$
maduración de 5.8S rRNA del transcrito de rRNA tricistronico (SSU-rRNA, 5.8S rRNA,	$5.51 \cdot 10^{-15}$
escisión endonucleolítica del transcrito del rRNA tricistronico (SSU-rRNA, 5.8S rRNA,	$7.48 \cdot 10^{-14}$
exportación de complejo ribonucleoproteico que contiene rRNA desde el núcleo	$1.05 \cdot 10^{-13}$
escisión endonucleolítica en ITS1 para separar SSU-rRNA de 5.8S rRNA y LSU-rRNA	$3.69 \cdot 10^{-13}$
ensamblaje complejo ribonucleoproteico	$5.84 \cdot 10^{-13}$
elongación traduccional	$2.87 \cdot 10^{-12}$
conjunto de subunidad grande ribosomal	$6.31 \cdot 10^{-12}$
exportación de rRNA desde el núcleo	$9.13 \cdot 10^{-12}$
exportación de complejo de ribonucleoproteína del núcleo	$1.61 \cdot 10^{-11}$
localización del complejo de ribonucleoproteína	$2.04 \cdot 10^{-11}$
escisión implicada en el procesamiento de rRNA	$2.08 \cdot 10^{-11}$
transporte nucleocitoplasmático	$2.99 \cdot 10^{-10}$
procesamiento de rRNA 5-end	$3.36 \cdot 10^{-10}$
maduración de LSU-rRNA	$8.49 \cdot 10^{-10}$
transcripción ncRNA	$3.54 \cdot 10^{-06}$
regulación de la traducción	$4.31 \cdot 10^{-06}$
traducción	$4.93 \cdot 10^{-06}$
exportación de RNA desde el núcleo	$6.53 \cdot 10^{-06}$
proceso metabólico de ácido nucleico	$8.92 \cdot 10^{-06}$
regulación de la elongación traduccional	$1.32 \cdot 10^{-05}$
localización de RNA	$4.71 \cdot 10^{-05}$
transporte de RNA	$5.37 \cdot 10^{-05}$

Tabla B3: Análisis de las categorías funcionales de los genes con acumulación de mRNA 2 veces mayor o menor, en una cepa silvestre tratada con rapamicina para bloquear la ruta TOR frente al silvestre sin tratamiento específico, a partir de los datos precedentes del RNA-Seq (Figura B7). Se usó el programa STRING (<https://string-db.org/>) (Szkarczyk et al., 2016).

Genes comunes entre el mutante *bud27Δ* y cepas con la ruta TOR bloqueada por rapamicina, con mayor acumulación de mRNA

Procesos biológicas	p-Value
vías metabólicas	$6.38 \cdot 10^{-08}$
biosíntesis de metabolitos secundarios	$1.04 \cdot 10^{-06}$
biosíntesis de aminoácidos	$1.04 \cdot 10^{-06}$
metabolismo de arginina y prolina	$2.21 \cdot 10^{-05}$

Genes comunes entre el mutante *bud27Δ* y cepas con la ruta TOR bloqueada por rapamicina con menor acumulación de mRNA

Procesos biológicas	p-Value
traducción citoplásmica	$9.21 \cdot 10^{-17}$
biogénesis ribosómica	$2.09 \cdot 10^{-10}$
biogénesis del complejo ribonucleoproteico	$9.83 \cdot 10^{-10}$
procesamiento de rRNA	$9.93 \cdot 10^{-07}$
proceso metabólico del ncRNA	$3.38 \cdot 10^{-06}$
elongación traduccional	$4.51 \cdot 10^{-06}$
procesamiento de ncRNA	$4.51 \cdot 10^{-06}$
proceso metabólico del rRNA	$8.78 \cdot 10^{-06}$
biogénesis de la subunidad pequeña ribosomal	$1.55 \cdot 10^{-05}$

Tabla B4: Análisis de las categorías funcionales de los genes comunes con acumulación de mRNA 2 veces mayor o menor entre el mutante *bud27Δ* frente a su cepa silvestre y una cepa silvestre tratada con rapamicina para bloquear la ruta TOR, frente al silvestre sin tratamiento específico, a partir de los datos procedentes del RNA-Seq (Figura B7). Se usó el programa STRING (<https://string-db.org/>) (Szklarczyk et al., 2016).

Analizando las tablas B2, B3 y B4 en conjunto podemos observar que aquellos genes con mayor acumulación de mRNA en el mutante *bud27Δ* y en una cepa silvestre tratada con rapamicina para bloquear la ruta TOR, e incluso en los comunes entre las dos condiciones, observamos categorías funcionales relacionadas mayoritariamente con procesos biosintéticos. Cuando se analizan aquellos genes con menor acumulación de mRNA, solo para la cepa silvestre tratada con rapamicina para bloquear la ruta TOR observamos una relación directa con genes implicados en procesamiento del RNA, maduración de rRNA, transporte de RNA y localización de RNA, traducción y biogénesis ribosomal (Tabla B3). Sin embargo, cuando analizamos los genes con menor acumulación de mRNA comunes al mutante *bud27Δ* y una cepa silvestre tratada con rapamicina para bloquear la ruta TOR, frente a sus silvestres (Tabla B4), sí observamos categorías funcionales implicadas en diversos procesos del RNA, de síntesis de ribosomas y de traducción, información que se veía enmascarada, probablemente, en el análisis de los

genes con menor acumulación de mRNA en el mutante *bud27Δ* (Tabla B2), por el importante número de genes implicados en otros procesos celulares.

De manera interesante se observa que entre el 70%-80% de los genes con mayor acumulación de mRNA tanto en el mutante *bud27Δ* como en el silvestre tratado con rapamicina para bloquear la ruta TOR, son dependientes de Gcn4. Esto está en correlación con lo descrito en condiciones de bloqueo de ruta TOR y de carencia de Bud27 y URI (Gstaiger et al, 2003).

Por otro lado, los genes con menor acumulación de mRNA parecen indicar una respuesta a estrés (Gasch et al., 2000) y estarían, además, en concordancia con los defectos en traducción, maduración de rRNA, tRNA y mRNA, así como con los defectos en biogénesis de ribosomas observados en carencia de Bud27 (Deplazes et al; Martínez-Fernández, en preparación). La disminución de la acumulación de mRNA puede estar relacionada con la disminución de la estabilidad de los mRNA, tanto en el mutante *bud27Δ* (Figura B4), como en el silvestre tratado con rapamicina bloqueando la ruta TOR (Albig and Decker, 2001), lo que conllevaría, en cualquier caso, una posible respuesta de estrés.

Estudio de la poliadenilación alternativa

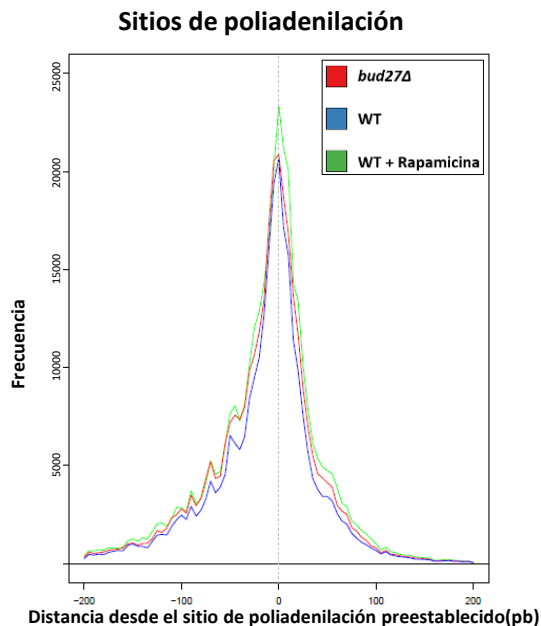
Profundizando en la hipótesis inicial en la que se planteaba que la inestabilidad de los mRNA en el mutante *bud27Δ* podía ser debida a una alteración de la poliadenilación de los mRNA, se analizaron los sitios de poliadenilación de los mismos en un silvestre y una cepa *bud27Δ*. En paralelo se realizó el análisis del silvestre tras el tratamiento con rapamicina para bloquear la ruta TOR, ya que se ha descrito la alteración del tamaño de las colas de poli(A) en estas condiciones (Albig and Decker, 2001), aunque nada referente a alteración de los sitios de poliadenilación.

A partir de los datos de RNA-Seq anteriores normalizados a lecturas por millón, provenientes de una secuenciación en dirección 3'-5' desde el primer nucleótido tras la cola de poli(A), se analizaron los sitios de poliadenilación alternativa. El estudio requiere de los datos de los sitios de poliadenilación preestablecidos, cedidos por el Dr. Vicent Pelechano. A partir de esos datos, mediante el programa Rstudio se analizó, de manera global, la poliadenilación existente en un rango estimado de +/- 200 pares de bases aguas-arriba y

aguas-abajo de los sitios preestablecidos de poliadenilación, correspondientes al valor 0 en el eje X de la figura B9A. En el eje Y se representa la suma de todos los transcritos que se poliadenilan en cada punto, siendo en esos puntos donde se puede observar las diferencias de poliadenilación entre las diferentes condiciones. Como se observa en la Figura B9A, tanto en el mutante *bud27Δ* como en un silvestre tratado con rapamicina para bloquear la ruta TOR se aprecian variaciones significativas que indican diferencias de poliadenilación en ambas direcciones (aguas-arriba y aguas-abajo) desde el sitio preestablecido de poliadenilación (punto 0) con respecto a su cepa isogénica silvestre.

Para corroborar estos datos, se utilizó un análisis de frecuencia acumulada que solo nos permite observar diferencias entre las distintas condiciones, sin mostrarnos en este caso valores reales de poliadenilación. Este método consiste en representar una gráfica de puntos donde cada punto es el sumatorio de todos los valores anteriores partiendo desde el sitio preestablecido de poliadenilación (punto 0), analizando independientemente aguas-arriba y aguas-abajo de ese punto. Como se observa en la Figura B9B, corroboramos las diferencias claras de poliadenilación globales en ambas direcciones, tanto en un mutante *bud27Δ* como tras el bloqueo de la ruta TOR por rapamicina en una cepa silvestre.

A



B

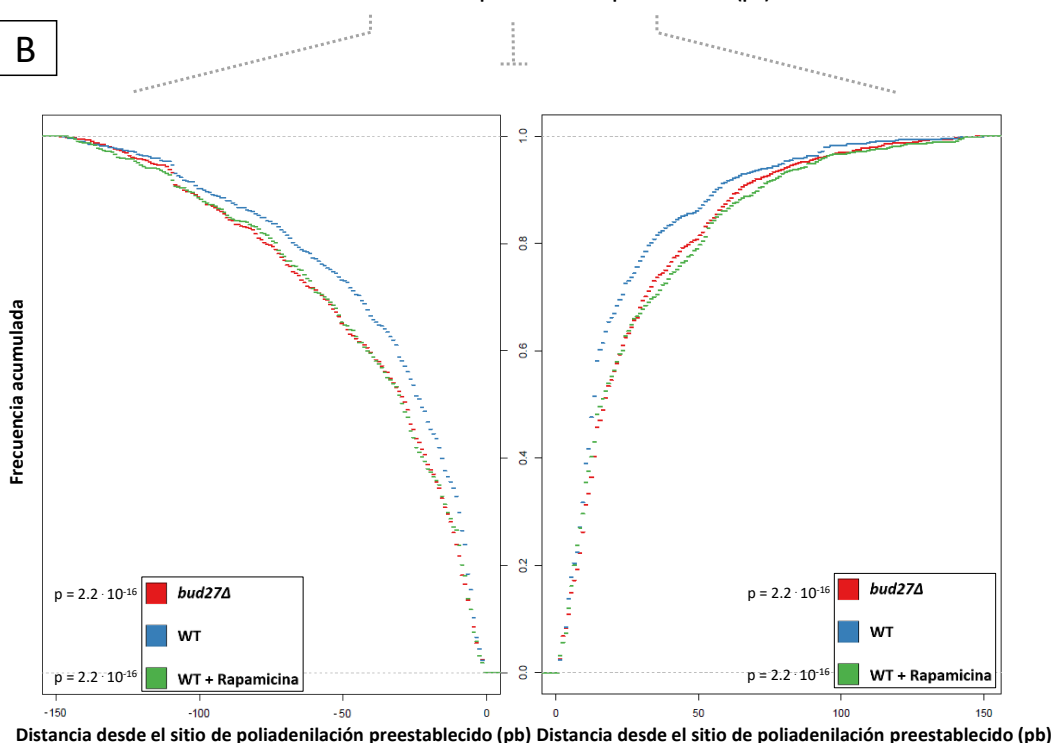


Figura B9: Análisis de sitios de poliadenilación alternativa en un mutante *bud27Δ* y tras el bloqueo de la tura TOR con rapamicina en una cepa silvestre (WT + Rapamicina) frente a la cepa silvestre sin tratamiento (WT). A) Frecuencia global acumulada de poliadenilación. Se analizan aproximadamente 200 pb aguas arriba y aguas abajo de los distintos sitios de poliadenilación preestablecidos (punto 0). **B) Frecuencia acumulada de sitios de poliadenilación.** Se analizan aproximadamente 150 pb aguas arriba y aguas abajo de los distintos sitios de poliadenilación preestablecidos (punto 0), por separado.

En la figura B10 se muestra un ejemplo del perfil de los sitios de poliadenilación para genes aleatorios en el mutante *bud27Δ* (Figura B10A), y una cepa silvestre tratada con rapamicina para bloquear la ruta TOR (Figura B10B), respecto a su silvestre, analizado con el programa IGV (*Integrative Genomics Viewer*).

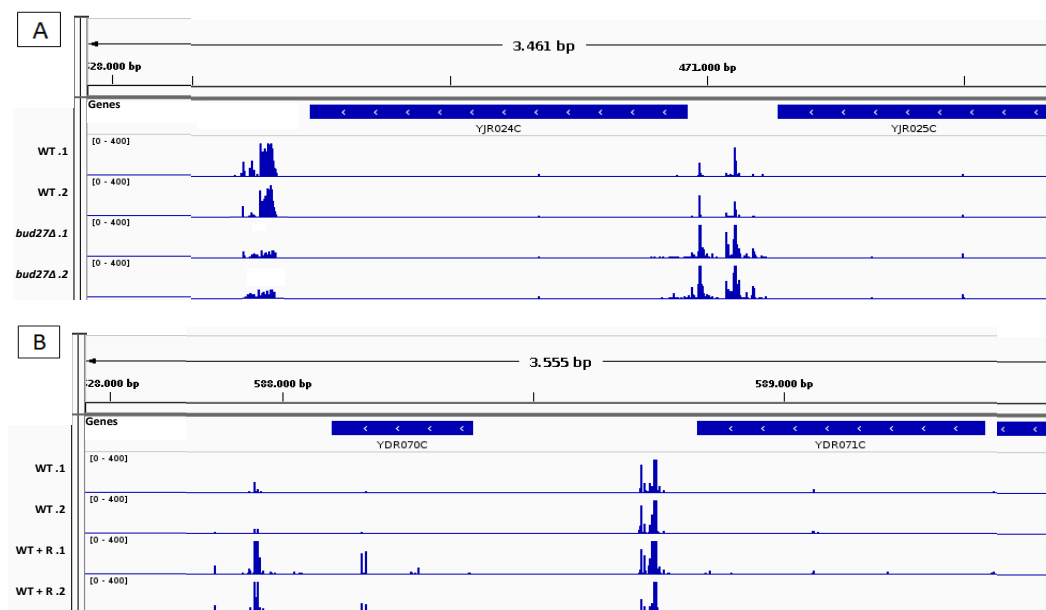


Figura B10: Ejemplo del perfil de los sitios de poliadenilación en el mutante *bud27Δ* y en una cepa silvestre tras el bloqueo de la ruta TOR con rapamicina respecto al silvestre, a partir de análisis de RNA-Seq. Análisis e imagen extraída con el visor IGV 2.2.72 (Robinson et al., 2011). Cada pico distribuido en el eje X representa el sitio de poliadenilación de cada transcrito. El eje Y, representa el número de mRNA que se poliadenilan en ese sitio.

Análisis de los sitios preferentes de poliadenilación

Una vez mostradas las alteraciones en la poliadenilación alternativa que tienen lugar en los mRNA en un mutante *bud27Δ* y en una cepa silvestre tras el bloqueo de la ruta TOR con rapamicina, el siguiente paso fue determinar los niveles diferenciales de poliadenilación aguas-arriba y aguas-abajo, para el global de los mRNA en ambas condiciones frente al silvestre. Para ello, en primer lugar se hizo un análisis individual de cada condición (mutante *bud27Δ*, bloqueo de la ruta TOR en una cepa silvestre tratada con rapamicina y cepa silvestre sin tratamiento específico) con el fin de establecer un ratio,

para cada mRNA, entre el total de los sitios de poliadenilación que presenta aguas-abajo frente al total de los que presenta aguas-arriba en torno al sitio preferente de poliadenilación. La representación es para el total de los mRNA (Figura B11).

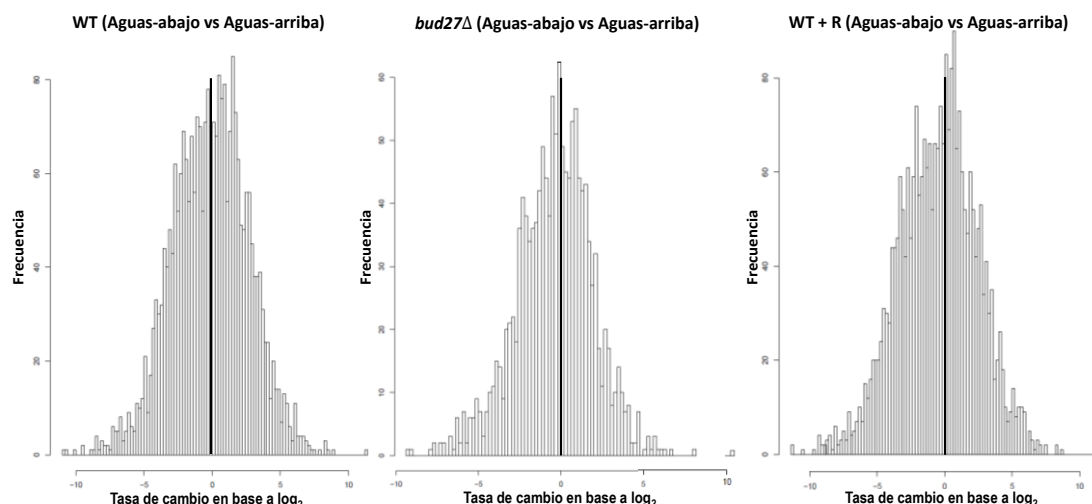


Figura B11: Análisis de los ratios entre los niveles de poliadenilación aguas-abajo vs aguas-arriba respecto al sitio de poliadenilación preestablecido para la cepa silvestre (WT), el mutante *bud27Δ* y un silvestre bloqueando la ruta TOR con rapamicina (WT + R). Se analiza el ratio entre el total de los sitios de poliadenilación aguas-abajo del sitio de poliadenilación preestablecido para cada mRNA, frente al total aguas-arriba. La gráfica representa el total de los mRNA. Se representa en el eje X el logaritmo en base 2 de los ratios calculados, y en el eje Y la frecuencia correspondiente al número de mRNA que corresponden a cada valor del ratio.

Como observamos en el análisis de la figura B11 los sitios de poliadenilación están repartidos prácticamente de un modo similar aguas-arriba y aguas-abajo, para todas las condiciones. Sin embargo se aprecia una ligera tendencia, tanto en el mutante *bud27Δ* como en el silvestre tratado con rapamicina, a la acumulación de sitios de poliadenilación aguas-arriba del sitio de poliadenilación preestablecido (aumento en la frecuencia de valores negativos). Esto se corrobora, cuando relativizamos los valores obtenidos en la figura B11 para el mutante *bud27Δ* y el silvestre tratado con rapamicina frente al silvestre sin tratamiento específico (Figura B12).

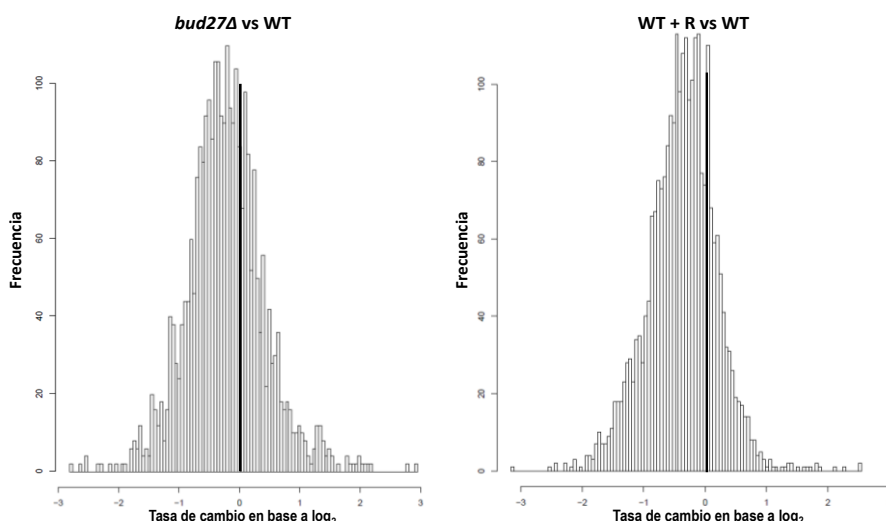


Figura B12: Análisis de la preferencia de los sitios de poliadenilación, aguas-arriba o aguas-abajo del sitio de poliadenilación preestablecido, en el mutante *bud27Δ* frente al silvestre (WT), y tras bloqueo de la tura TOR con rapamicina en la cepa silvestre (WT + R) frente al silvestre (WT). Las representaciones se corresponden con los datos de los ratios obtenidos en la figura B11 representando en el eje X, los valores, en logaritmo en base 2, de los ratios calculados de cada condición frente al silvestre, en torno al sitio de poliadenilación preestablecido (punto 0), aguas-arriba y aguas-abajo. En el eje Y se representa la frecuencia correspondiente al número de mRNA que corresponden a cada valor del ratio.

La figura B12 corrobora la mayor tendencia a la poliadenilación aguas-arriba del punto de poliadenilación preestablecido, con respecto al silvestre, tanto para *bud27Δ* como para el silvestre tratado con rapamicina.

Análisis de sitios de poliadenilación alternativa en grupos de genes dependientes de Sth1 y dependientes de Gcn4

Para profundizar en el estudio de la poliadenilación alternativa ocasionada por la ausencia de Bud27 y por el bloque de la ruta TOR, nos planteamos determinar si este comportamiento tiene lugar de un modo generalizado en el global de los genes, o por el contrario, es dependiente de grupos específicos de genes.

Para ello, se analizó en un primer lugar la alteración de los sitios de poliadenilación en los grupos de genes cuya acumulación de mRNA está aumentada o disminuida, tanto el mutante *bud27Δ* (Figura B13) como en el silvestre tras bloqueo de la ruta TOR (Figura B14) frente al silvestre sin tratamiento específico. También se realizó el análisis para el conjunto

de mRNA de aquellos genes comunes de los seleccionados anteriormente (ver figura B8) (Figura B15). Estos estudios se realizaron mediante análisis de frecuencia acumulada, que como se comentó previamente, consiste en representar gráficamente en cada posición de poliadenilación, el sumatorio de todos los transcritos encontrados en los puntos anteriores al mismo, partiendo desde el sitio de poliadenilación preestablecido (punto 0). Este tipo de representación nos permite ver con mayor claridad si existen diferencias significativas en el conjunto de sitios de poliadenilación, sin especificar si existe mayor o menor poliadenilación en cada sitio.

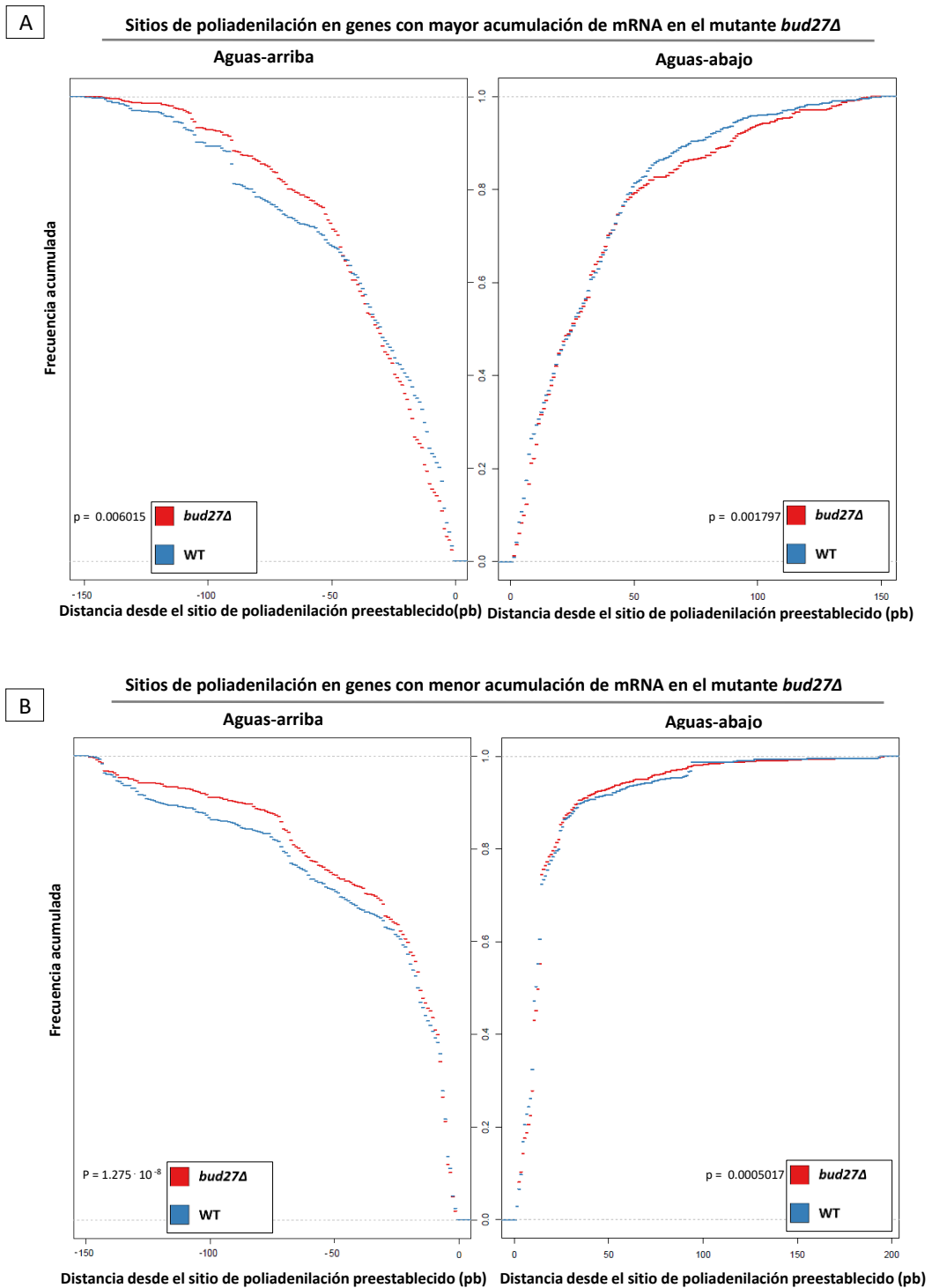


Figura B13: Estudio de las diferencias en los sitios de poliadenilación en el mutante *bud27Δ* respecto al silvestre (WT). Estudio mediante análisis de frecuencias acumuladas, en los genes con mayor (A) y menor (B) acumulación de mRNA en el mutante *bud27Δ* frente al silvestre (WT).

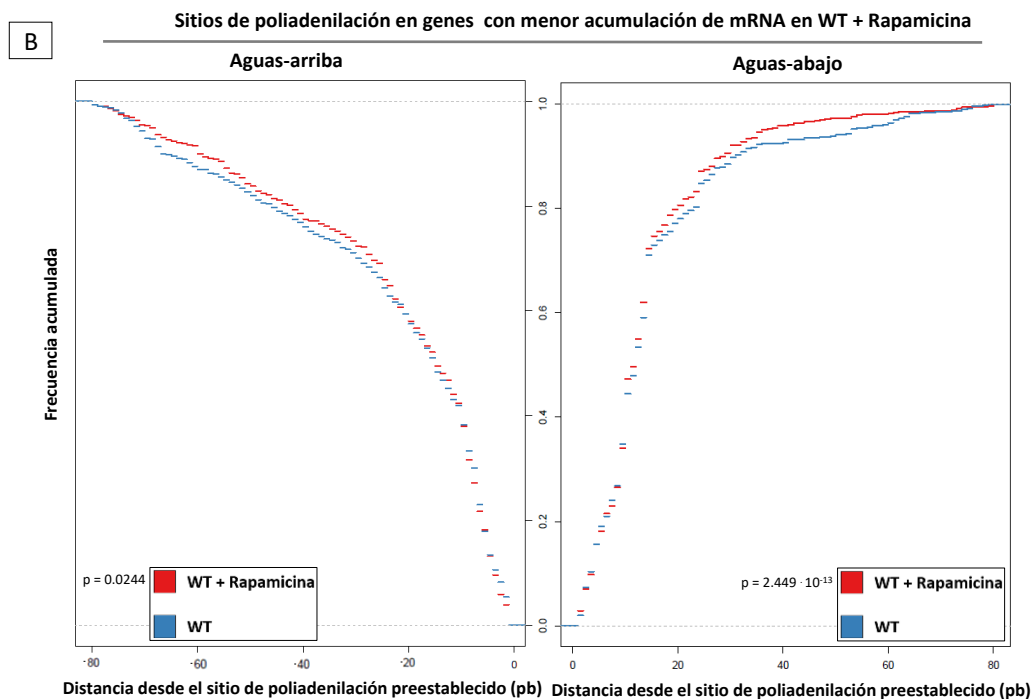
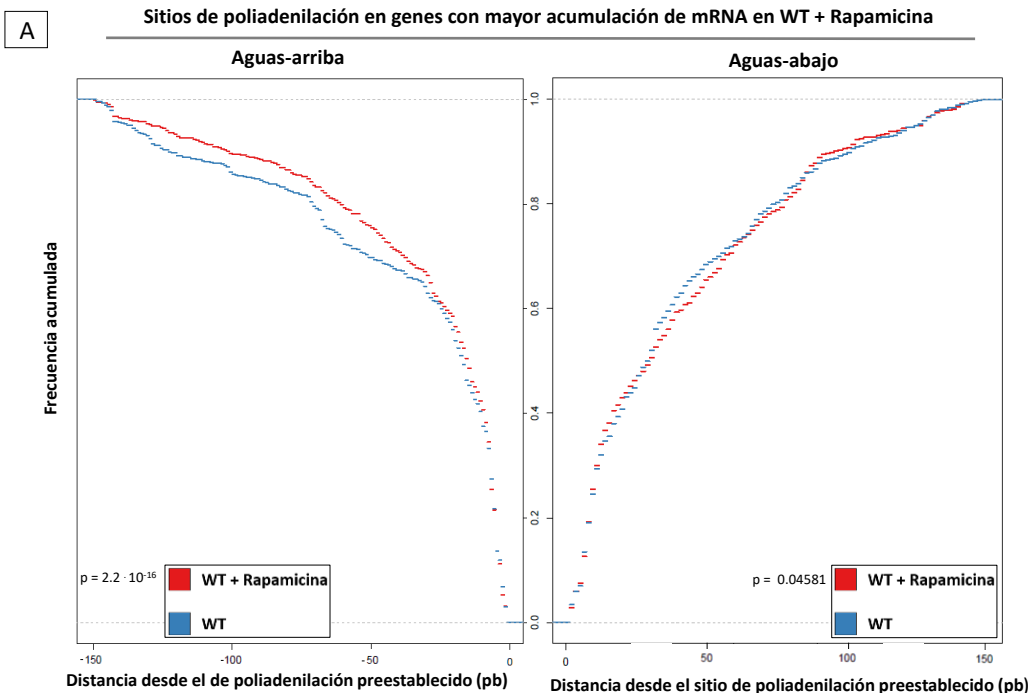


Figura B14: Estudio de las diferencias en los sitios de poliadenilación en el silvestre tratado con rapamicina (WT + rapamicina), respecto al silvestre (WT). Estudio mediante análisis de frecuencias acumuladas, en los genes con mayor (A) y menor (B) acumulación de mRNA en el silvestre tratado con rapamicina (WT + rapamicina), frente al silvestre (WT).

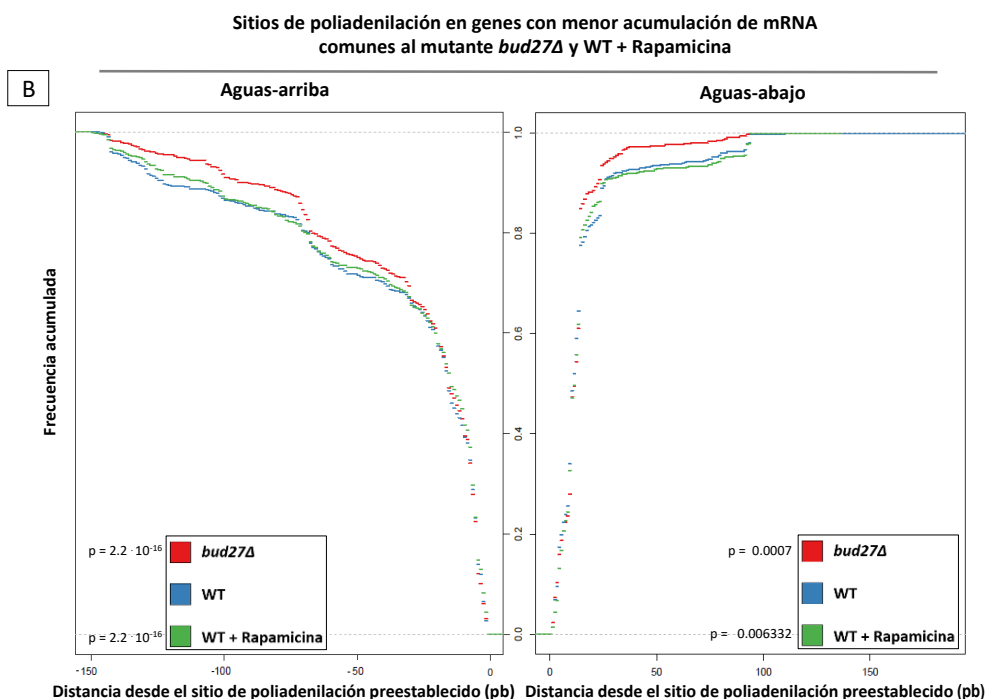
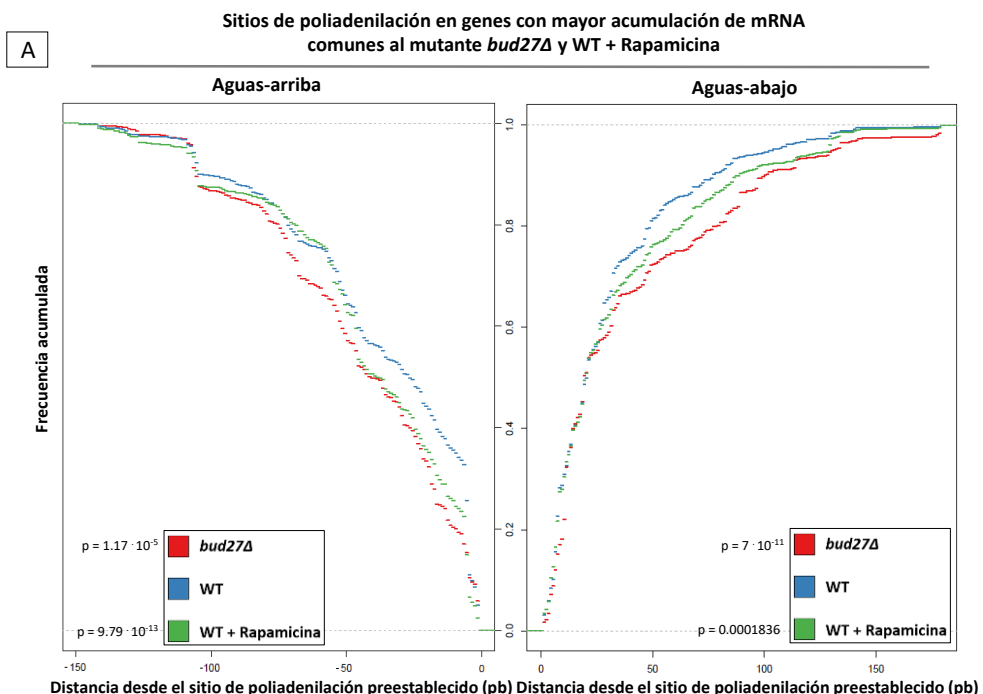


Figura B15: Estudio de las diferencias en los sitios de poliadenilación en el mutante *bud27Δ* y el silvestre tratado con rapamicina (WT + rapamicina), respecto al silvestre (WT). Estudio mediante análisis de frecuencias acumuladas, en los genes con mayor (A) y menor (B) acumulación de mRNA, comunes entre el mutante *bud27Δ* y el silvestre tratado con rapamicina (WT + rapamicina), frente al silvestre (WT).

Analizando las figuras B13, B14 y B15, de modo general, podemos concluir que el análisis de estos subgrupos responde al comportamiento general observado en el análisis global de los genes (Figura B9B), sin mostrarnos una tendencia diferencialmente significativa en el conjunto de los genes analizados. Sí parece, por el contrario, que existe una tendencia mayor de cambios en el mutante *bud27Δ*.

Datos previos describen la asociación de Bud27 a Sth1 (subunidad del complejo remodelador de la cromatina RSC) y la relación funcional entre estas proteínas y la RNA pol II (Mirón-García et al., 2014). Por otro lado, datos de nuestro grupo muestran que en un mutante *bud27Δ* el 75% de los genes con mayor ocupación de RNA pol II respecto a un silvestre son dependientes de Gcn4. Además, a partir de los datos de expresión diferencial obtenidos en la figura B7, se obtiene que entre el 70%-80% de los genes con mayor acumulación de mRNA tanto en el mutante *bud27Δ* como en el silvestre tratado con rapamicina bloqueando la ruta TOR, son dependientes de Gcn4. En base a estos datos, nos planteamos estudiar, los sitios de poliadenilación alternativos en la totalidad de los genes dependientes de Gcn4 (Figura B16) así como en el total genes dependientes de Sth1 (Figura B17A), analizando también por separado los genes dependientes de Sth1 positiva y negativamente (Figura B17B y C).

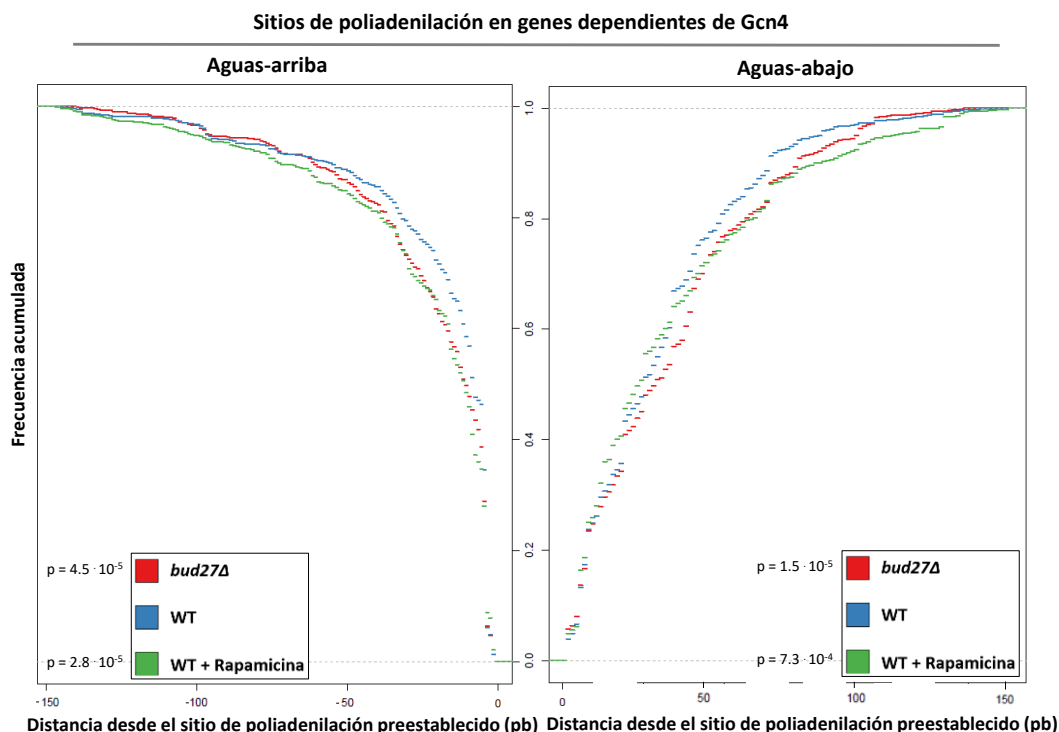
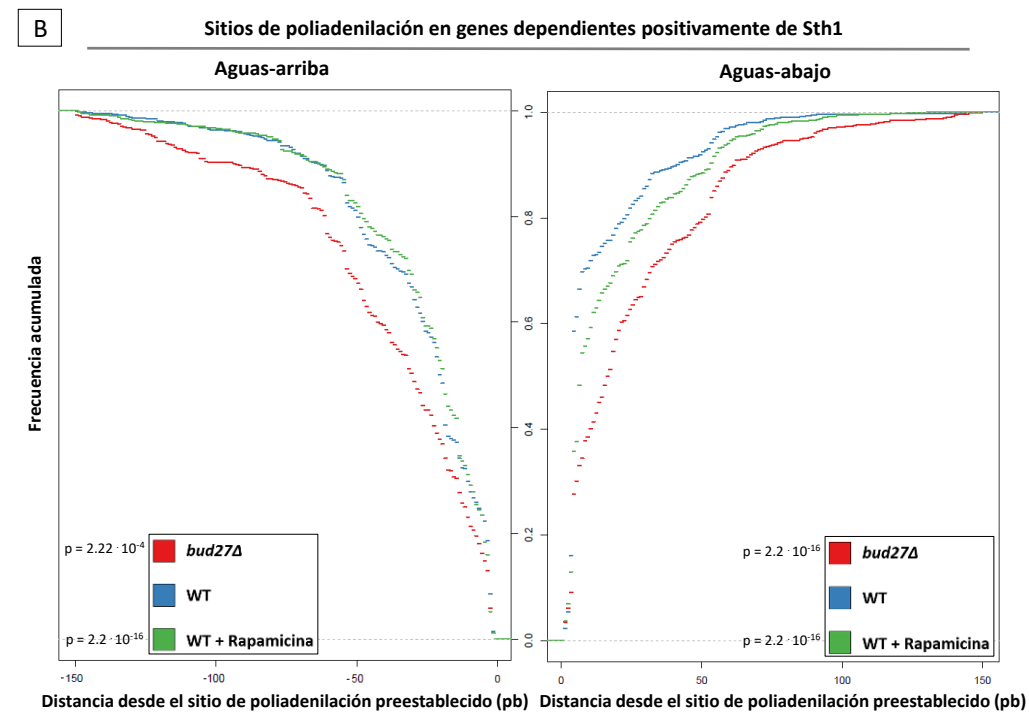
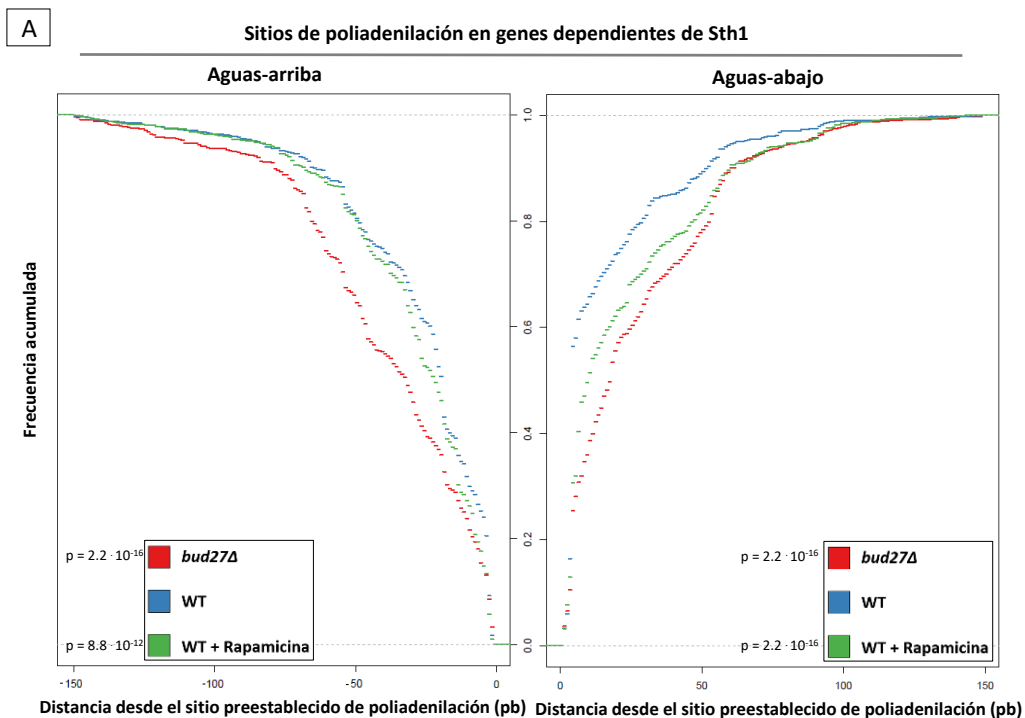


Figura B16: Estudio de las diferencias en los sitios de poliadenilación en el mutante *bud27Δ* y el silvestre tratado con rapamicina (WT + rapamicina), respecto al silvestre (WT). Estudio mediante análisis de frecuencias acumuladas, en todos los genes dependientes de Gcn4.

Como podemos observar en la figura B16, para el mutante *bud27Δ* y el silvestre tratado con rapamicina frente al silvestre, los genes dependientes de Gcn4 (analizados con las herramientas de la plataforma YEASTRACT, <http://www.yeasttract.com/index.php>), tanto aguas-arriba como aguas-abajo de los sitios de poliadenilación preestablecidos, presentan un patrón muy similar al análisis global (Figura B9B). Esto puede ser consecuencia de que estos genes suponen un 50% del total de los genes de *S. cerevisiae*.

Posteriormente, como se mencionaba con anterioridad, se analizaron el total genes dependientes de Sth1 (Figura B17A), analizando también por separado los genes dependientes de Sth1, tanto positiva como negativamente (Figura B17B y C).



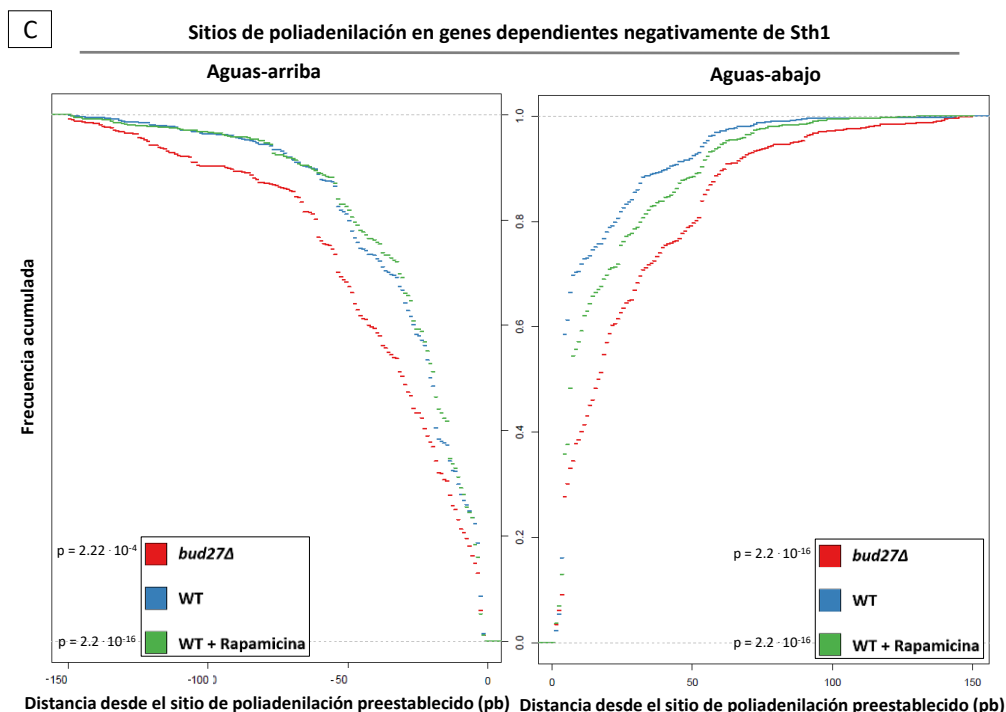


Figura B17: Estudio de las diferencias, en los sitios de poliadenilación en el mutante *bud27Δ* y el silvestre tratado con rapamicina (WT + rapamicina), respecto al silvestre (WT). Análisis de frecuencias acumuladas, en los genes dependientes de Sth1 de manera global (A), e individualmente los genes dependientes de Sth1, tanto positiva (B) como negativamente (C).

El dato más destacado en el análisis de la poliadenilación alternativa que hemos realizado viene, quizá del estudio de los genes dependientes de Sth1 (datos cedidos por el Dr. Ch. Govind) (Figura B17). Como se muestra, tanto el mutante *bud27Δ* como el tratamiento con rapamicina para bloquear la ruta TOR, con respecto a la cepa silvestre, presentan diferencias de poliadenilación importantes en los genes dependientes de Sth1 de manera global (Figura B17A), ocurriendo de igual modo en los análisis de los genes dependientes de Sth1 tanto positivamente (Figura B17B) como negativamente (figura B17C). Estos cambios presentan una significación mayor (menor p-value), incluso, en el mutante *bud27Δ*. En este caso, nuestros datos refuerzan la importancia de la asociación Bud27-Sth1 (Mirón-García et al., 2014). Debido a la importante poliadenilación alternativa que tiene lugar en los genes dependientes de Sth1, sería muy interesante profundizar en la relación funcional entre Bud27 y Sth1 a este nivel. Además, en cuanto al silvestre tratado con rapamicina respecto al silvestre sin tratamiento específico, en los tres grupos de genes

RESULTADOS

de la figura B17 se observa una variación significativa de los sitios de poliadenilación alternativa, aunque no tan destacada como la que se observa en el mutante *bud27Δ*.

El conjunto de estos datos sugieren una posible relación entre la poliadenilación alternativa y la correcta conformación de la cromatina, probablemente a través del posicionamiento de los nucleosomas.

Estudio preliminar de la posible influencia de Pab1 en los efectos provocados por la falta de Bud27 sobre los mRNA

Como se ha mencionado en antecedentes en un escrutinio de supresión génica hemos identificado el gen *PAB1* como un supresor multicopia del fenotipo de termosensibilidad del mutante *bud27Δ* (Figura B18).

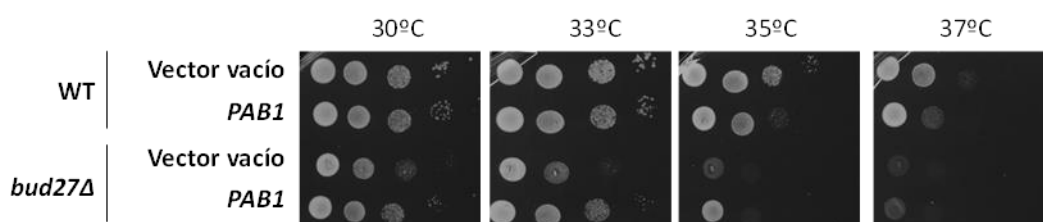


Figura B18: Crecimiento del mutante *bud27Δ* y el silvestre (WT), con y sin sobreexpresión de *PAB1*. Análisis en medio mínimo SD-URA a diferentes temperaturas.

Pab1 (proteína de unión a la cola de poli(A)) juega un papel importante en el establecimiento del tamaño de las colas de poli(A) y está implicada en los procesos de deadenilación del mRNA, modulando la actividad de complejos tales como Ccr4/Pop2/Not y Pan2/Pan3, implicados directamente en el acortamiento de las colas de poli(A) (revisado (Parker, 2012)).

Basándonos en estos datos, en primer lugar, nos planteamos la hipótesis de que la poliadenilación alternativa observada en el mutante *bud27Δ*, pueda estar mediada por Pab1. Para estudiar esta hipótesis, analizamos si la falta de Bud27 conllevaba menor asociación de Pab1 a los mRNA. Para ello realizamos experimentos de UV-crosslinking, (Materiales y Métodos), para fijar las proteínas asociadas a los mRNA de forma estable

("crosslinking") mediante el uso de luz UV a 254 nm. El análisis de Pab1 asociado a los mRNA, por western-blot, se muestra en la Figura B19.

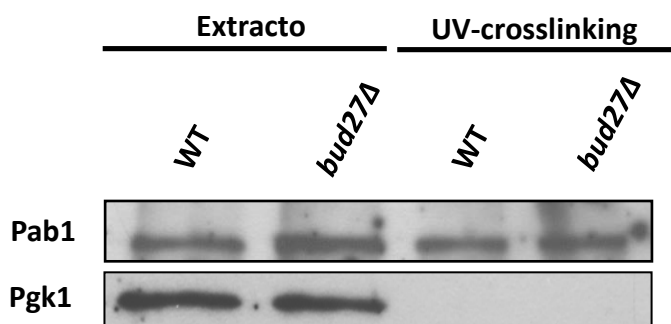


Figura B19: Detección por western-blot de los niveles de Pab1 asociadas a los mRNA. Experimentos realizados mediante el método UV-crosslinking, con el respectivo control de contaminante citoplasmático (Pgk1), en el mutante *bud27Δ* respecto a su silvestre (WT).

Como se observa en la figura B19, los niveles de Pab1 asociados a los mRNA en el mutante *bud27Δ* respecto al silvestre, no muestran diferencias significativas. Igualmente analizamos si la sobreexpresión de *PAB1* corregía el fenotipo de sensibilidad de mutante *bud27Δ* a la droga cicloheximida (inhibidor de la traducción bloqueando la elongación de la traducción), demostrado por nosotros y por otros (Deplazes et al., 2009). Como se observa en la figura B20, la sobreexpresión de *PAB1* corrige dicha sensibilidad en el mutante *bud27Δ*. Estos resultados sugieren que Pab1 podría tener un efecto positivo en la corrección, por lo menos parcial, del defecto traduccional del mutante carente de Bud27 (Deplazes et al., 2009) y podría sugerir que media en el defecto de estabilidad de mRNA observada y quizá en la diferencia de sitios de poliadenilación.

RESULTADOS

Por el momento, nuestros resultados no demuestran si la disminución de la estabilidad de mRNA en carencia de Bud27 y los cambios en poliadenilación alternativa van asociados. De igual manera, tampoco podemos concluir si el acortamiento de las colas de polyA observadas tras bloqueo de la vía TOR (Albig and Decker, 2001) está relacionado con la poliadenilación alternativa, ni si la carencia de Bud27 provoca un acortamiento de estas colas. En cualquier caso, los datos de análisis globales de poliadenilación mostrando una mayor tendencia a la presencia de sitios de poliadenilación aguas-arriba de los sitios preestablecidos sugieren esta posibilidad.

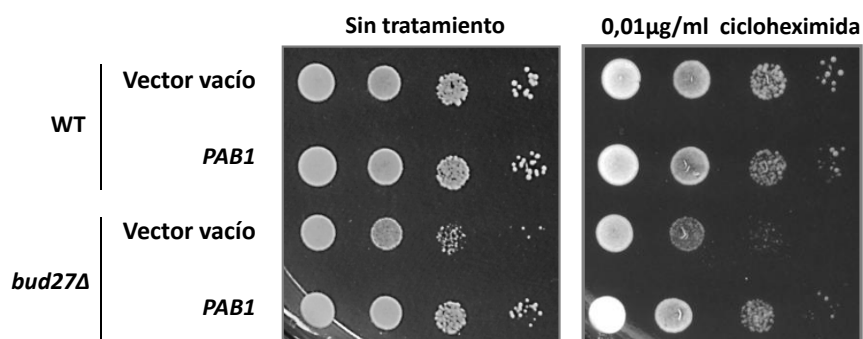


Figura B20: Crecimiento del mutante *bud27Δ* y el silvestre (WT), con y sin sobreexpresión de *PAB1*. Análisis en medio mínimo SD-URA con una concentración del 0,01 µg/ml de cicloheximida (inhibidor de la traducción bloqueando la elongación de la traducción) y sin tratamiento específico.

Capítulo III

AATCGCAGTGATCGATTAGCTAGTGACGCTAATCGCAGTGATCGATTAGCTAGTGACGCTA
ACCRACCTGGAGCACTTTCACGAGTGCTCARCCACCRACCTGGAGCACTTTCACGAGTGCTCARCC

CAPÍTULO III: INFLUENCIA DE LA FOSFATASA DEL CTD, Rtr1, EN EL CICLO DE VIDA DEL mRNA

Antecedentes

Rtr1, proteína ortóloga de la humana RPAP2, es una fosfatasa del CTD con un papel en la transición de la iniciación a la elongación de la transcripción, promoviendo la defosforilación del CTD-Ser5P en la región 5' de los genes, previo a su fosforilación en el CTD-Ser2 (Buratowski, 2009). La falta de Rtr1 provoca defectos transcripcionales, resultando en una acumulación de CTD-Ser5P en la región codificante de los genes (Gibney et al., 2008; Mosley et al., 2013). Se ha sugerido el papel de RPAP2 en humanos, en el ensamblaje de la RNA pol II (Boulon et al., 2010; Cloutier and Coulombe, 2010; Corden, 2011) y el papel, tanto de Rtr1 como de RPAP2, en el importe de la RNA pol II desde el citoplasma al núcleo (Forget et al., 2013; Gómez-Navarro and Estruch, 2015). Datos de nuestro grupo muestran también el papel de Rtr1 en el ensamblaje de la RNA pol II (Garrido-Godino, en preparación).

Un estudio proteómico ha demostrado la interacción entre Rtr1 y la RNA pol II hiperfosforilada que carece del dímero Rpb4/7 (Mosley et al., 2013). El interactoma de Rtr1 muestra que esta interacciona principalmente con el núcleo de 10 subunidades de la RNA pol II sin Rpb4/7 (Smith-Kinnaman et al., 2014). Por otro lado, se ha descrito una interacción genética negativa entre *RTR1* y *RPB4* (Gibney et al., 2008). En nuestro grupo de investigación se ha descrito el papel de Rpb4 en la estabilidad de los mRNA, demostrando que en situaciones de estrés la falta de Rpb4 produce una mayor estabilidad de los mismos (Garrido-Godino et al., 2016). De igual manera, se ha propuesto un papel para Rpb4 en la degradación de los mRNA, a través de su interacción física descrita con los factores de la maquinaria de degradación de mRNA Pat1/Lsm1-7 (Coller and Parker, 2005; Lotan et al., 2005).

Recientemente se ha propuesto el papel de Rtr1 en la regulación de la estabilidad de su propio transcrito (Hodko et al., 2016). Este proceso implica la interacción física de Rtr1 con Dhh1 (proteína involucrada en la estabilidad de los transcritos estimulando la eliminación de la caperuza 5' de los mRNA) (Hodko et al., 2016; Smith-Kinnaman et al., 2014). Además, la ausencia de ambas proteínas en la célula conlleva un aumento de la estabilidad del

transcrito de *RTR1* (Hodko et al., 2016). Estos datos en conjunto plantean la posibilidad de que Rtr1 tenga influencia en el ciclo de vida de los mRNA y sugieren una posible coordinación con Rpb4. Considerando el papel de Dhh1 junto con Rtr1 en la regulación de su propio transcrito, proponemos también, que Dhh1 esté involucrada en la posible coordinación entre Rtr1 y Rpb4 para la estabilidad de los mRNA.

PAPEL DE Rtr1 EN EL CICLO DE VIDA DE LOS mRNA: ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LOS mRNA

Considerando la interacción de Rtr1 con proteínas involucradas en el ciclo de vida de los mRNA, como Rpb4 y Dhh1, que tienen un papel en la estabilidad global de los mismos y apoyándonos en recientes datos publicados donde se describe la regulación por parte de Rtr1 en la estabilidad de su propio mRNA, en combinación con Dhh1 y las exonucleasas REX (Hodko et al., 2016), nos planteamos el estudio de la estabilidad de los transcritos en un mutante carente de Rtr1 (*rtr1Δ*).

Estudio de la estabilidad de los mRNA en genes individuales en ausencia de Rtr1

Para determinar el efecto que tiene la delección de *RTR1* en la estabilidad global de los mRNA, se usaron las cepas mutante *rtr1Δ* (YFN161) y su cepa isogénica silvestre (BY4741). Las condiciones de crecimiento fueron las mismas empleadas en el capítulo II, según las cuales se crecieron las cepas en medio SD líquido a 30°C. Cuando los cultivos alcanzaron una $D.O_{600} \sim 0,5$, se añadió tiolutina para inhibir la transcripción de nuevas moléculas de mRNA, y se recogieron alícuotas a distintos intervalos de tiempo entre 0 y 90 minutos, permitiéndonos de esta forma tener un seguimiento de la estabilidad de los mRNA a lo largo del tiempo. Tras la extracción de RNA de cada punto se analizó mediante RT-qPCR la estabilidad de los transcritos de tres genes individuales: *ACT1*, *PMA1* y *HHT1*, normalizando su acumulación a la del rRNA 18S transcrito por la RNA pol I (Figura R1).

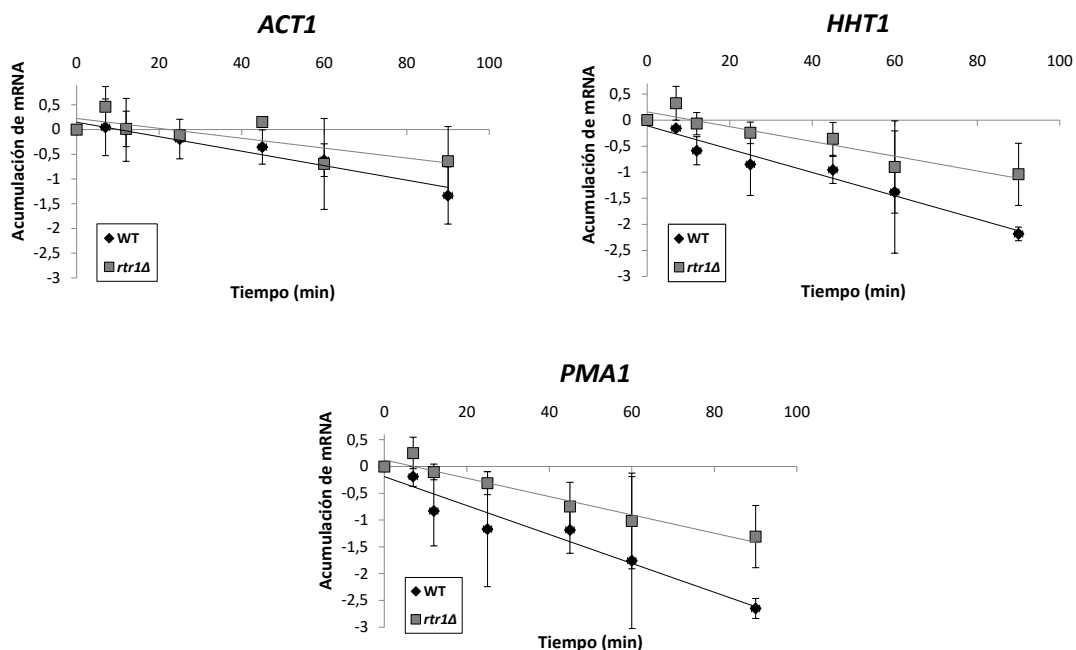


Figura R1: Representación de la estabilidad de mRNA de los genes *ACT1*, *HHT1* y *PMA1*, analizado mediante RT-qPCR y normalizado a los niveles del rRNA 18S. La caída se representa en escala logarítmica (logaritmo neperiano). La línea de tendencia es indicativa de la velocidad de degradación del mRNA.

Como se observa en la figura R1, de forma generalizada en los tres genes analizados, el mutante *rtr1Δ* muestra una disminución de la velocidad de degradación de los mRNA si lo comparamos con su cepa isogénica silvestre. Esto provoca un aumento de la vida media de los transcritos (Tabla R1). Estos datos sugieren un papel de Rtr1 en la estabilidad de los mRNA.

	WT	<i>rtr1Δ</i>
<i>HHT1</i>	1	1,57
<i>PMA1</i>	1	1,58
<i>ACT1</i>	1	1,47

Tabla R1: Vidas medias de mRNA para los genes indicados. Los datos son calculados a partir de los datos de RT-qPCR de la Figura R1, normalizando el silvestre a 1.

Análisis del nivel de acumulación de mRNA en los genes *HHT1*, *PMA1* y *ACT1*, en ausencia de Rtr1

Al igual que se hizo en el Capítulo II, una vez analizado el efecto de la ausencia de Rtr1 en la estabilidad de los mRNA, nos planteamos analizar los niveles de acumulación de mRNA de los genes utilizados en la figura R1, para determinar si el mutante *rtr1Δ* altera dicha acumulación (Figura R2). Para ello, se utilizaron los valores de acumulación de estos mRNA obtenidos a tiempo 0 (0 minutos; antes del tratamiento con tiolutina) procedentes del análisis de RT-qPCR (Figura R1), relativizados al control interno rRNA 18S (Figura B2).

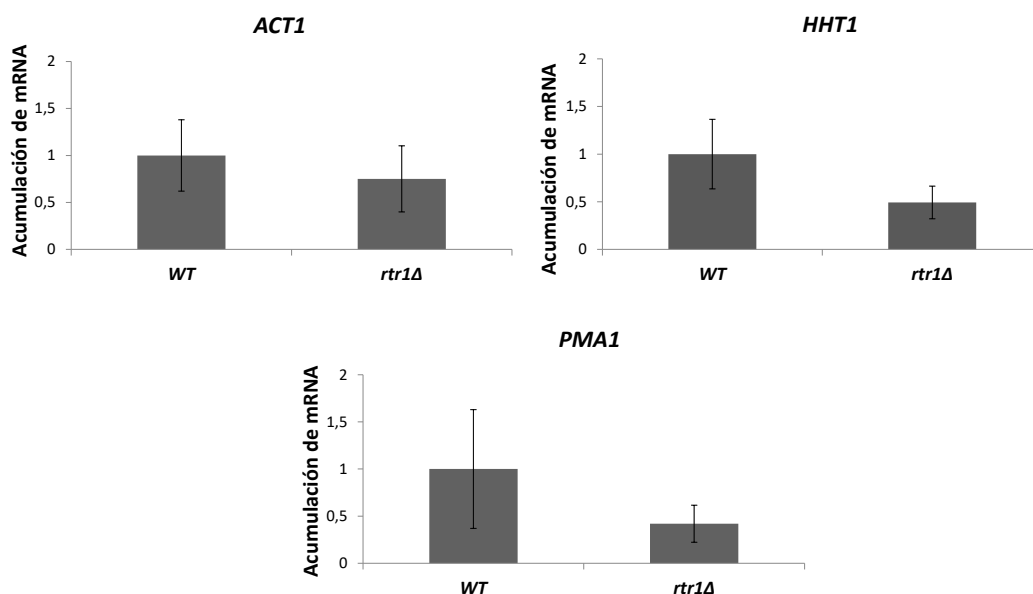


Figura R2: Análisis de la acumulación inicial de mRNA para los genes *PMA1*, *HHT1* y *ACT1*. Valores de acumulación inicial de mRNA de cada gen (Figura R1), previo al tratamiento con tiolutina, relativizados al control interno rRNA 18S, tanto para el mutante *rtr1Δ* como para su cepa isogénica silvestre.

Como se observa en la figura R2, los niveles de acumulación del mRNA para los genes analizados, son inferiores en el mutante *rtr1Δ* que en la cepa isogénica silvestre.

Por otra parte, los análisis realizados mediante citometría de flujo (Materiales y Métodos) no mostraron diferencias significativas en el tamaño celular ($WT=1$; $rtr1Δ= 1,14 \pm 0,01$) ni en el número de células por unidad de volumen, a igual DO_{600} , entre el mutante

rtr1Δ y su cepa isogénica silvestre. De igual manera, tampoco hay importantes diferencias en la tasa de crecimiento, GR (WT= 90 min; *rtr1Δ* = 105 min).

De igual modo que se hizo en el Capítulo II, analizamos los mRNA de manera global para corroborar si la mayor estabilidad de estos (Figura R1) en el mutante *rtr1Δ*, era extrapolable al total de los mRNA.

Estudio de la estabilidad global de mRNA en ausencia de Rtr1

Una vez determinado el aumento de estabilidad de los mRNA de los genes analizados se estudió la estabilidad global de los mRNA de la misma manera que se hizo en el Capítulo II. A partir de las diferentes muestras recogidas a los distintos tiempos entre 0-60 minutos antes el tratamiento con tiolutina se analizó la cantidad total de mRNA mediante Dot-blot, cargando cantidades iguales de RNA total para cada muestra. La detección de los mRNA se realizó mediante la sonda fluorescente oligodT (oligodTCy3) que reconoce las colas de poli(A) de los mRNA (Figura R3).

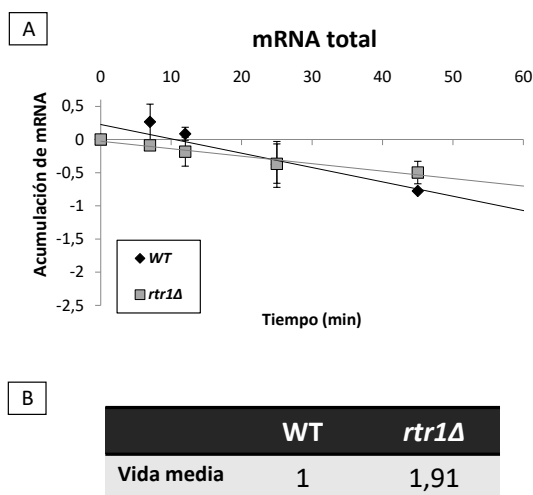


Figura R3: Análisis de la estabilidad de mRNA total mediante Dot-blot, en la cepa *rtr1Δ* y su cepa isogénica silvestre, antes del tratamiento con tiolutina para provocar la parada transcripcional. **A)** Cuantificación de la señal de fluorescencia con la sonda oligodT (oligodTCy3) para cada tiempo analizado. **B)** Cálculo de la vida media de los transcritos del apartado A) relativizando a la cepa silvestre.

RESULTADOS

Como se observa en la figura R3A, la estabilidad global de los mRNA en una cepa *rtr1Δ* es mayor que en la cepa isogénica silvestre y el análisis de la vida media, muestran un aumento de casi el doble en el mutante *rtr1Δ* en relación a la cepa silvestre (Figura R3B).

Por otro lado, se determinaron los niveles de acumulación de mRNA global, a partir de los valores obtenidos a tiempo 0 (0 minutos) en el Dot-blot, antes del tratamiento con tiolutina, relativizados a la cantidad total de RNA usado en cada experimento (μg de RNA cargado) (Figura R4).

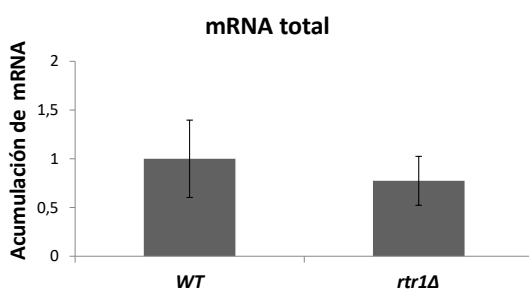


Figura R4: Análisis de la acumulación global de mRNA. Valores de acumulación global de mRNA (a partir de la Figura R3A), antes del tratamiento con tiolutina, relativizados a la cantidad total de RNA usado en cada experimento (μg de RNA), tanto para el mutante *rtr1Δ* como para su cepa isogénica silvestre.

Como se observa en la figura R4 no existen diferencias importantes en el nivel de acumulación global de mRNA, entre el mutante *rtr1Δ* y la cepa isogénica silvestre, si bien parece haber una ligera disminución. Tampoco se observan diferencias significativas cuando se relativizan los datos por célula y tamaño (no mostrado). El hecho de que aún existiendo aumento de estabilidad observemos estos resultados, sugieren una respuesta homeostática en dicho mutante para compensar la cantidad de mRNA, probablemente por una reducción en los niveles de transcripción en el mutante *rtr1Δ*.

Datos previos de nuestro grupo han demostrado que la correcta asociación del heterodímero Rpb4/7 con la RNA pol II es necesaria para modular la degradación de los mRNA y la transcripción bajo condiciones óptimas de crecimiento (Garrido-Godino et al., 2016). En ese mismo estudio, se describe que la falta de Rpb4 provoca un incremento global en la estabilidad de los mRNA en condiciones óptimas de crecimiento, y se ha mostrado su asociación directa a algunos de ellos (Garrido-Godino et al., 2016; Goler-Baron et al., 2008).

Además, datos previos sugieren un posible papel de Rpb4 en el reclutamiento de los factores responsables de la degradación de los mRNA a los mismos (Lotan et al., 2005). Estos datos, junto al aumento en la estabilidad de los mRNA provocada por la ausencia de Rtr1, y en base a datos previos que muestran una interacción genética y funcional entre Rtr1 y Rpb4 (Gibney et al., 2008; Mosley et al., 2013; Smith-Kinnaman et al., 2014) nos planteamos analizar si el papel de Rtr1 en la estabilidad de los mRNA podría estar relacionado con Rpb4.

Por otra parte, basado en los datos que proponen el efecto de Rtr1 sobre la estabilidad de su propio transcrito, en la asociación física entre Rtr1 y Dhh1 (Hodko et al., 2016; Smith-Kinnaman et al., 2014), así como en el papel que tiene Dhh1 en la estabilidad global de los mRNA (su ausencia provoca un aumento de la estabilidad) (Coller et al., 2001), nos propusimos estudiar la asociación funcional entre Rpb4, Rtr1 y Dhh1 en el ciclo de vida de los mRNA.

Estudio de la asociación de Rtr1 a los mRNA

Se ha demostrado la asociación de Rtr1 a su propio mRNA y su efecto sobre la estabilidad del mismo (Hodko et al., 2016). Por ello, nos planteamos determinar la posible interacción física de Rtr1 con los mRNA de manera global. En paralelo, y como control, analizamos la asociación de la exonucleasa Dhh1 a los mRNA.

Para ello, se utilizaron cepas conteniendo versiones etiquetadas de Rtr1-TAP y Dhh1-HA para el posterior estudio por western-blot. Desde células crecidas en condiciones óptimas a 30°C, en medio SD líquido hasta alcanzar una $D_{600} \sim 0.5$, se purificaron los mRNA mediante el método UV-crosslinking (Materiales y Métodos), tras fijar las proteínas asociadas al mRNA de forma estable (*crosslinking*) usando luz UV a 254 nm, y se analizó posteriormente la asociación de Rtr1 y Dhh1 a los mismos (Figura R5).

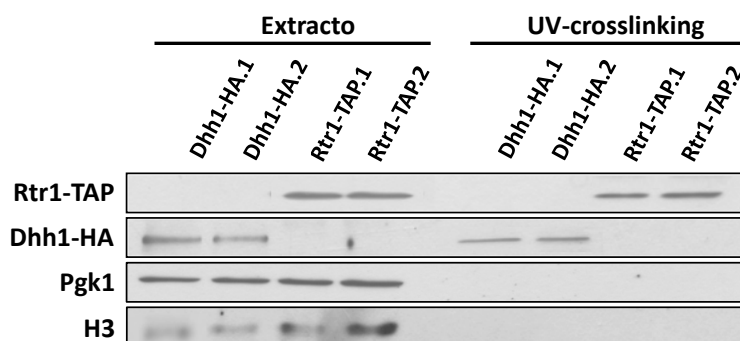


Figura R5: Detección por western-blot de proteínas asociadas a los mRNA purificados por el método UV-crosslinking. Se analizaron las proteínas de interés Rtr1 y Dhh1, mediante la detección de las etiquetas TAP y HA respectivamente, y los respectivos controles citoplasmático (Pgk1) y cromatínico (Histona H3).

Como se observa en la figura R5, el análisis de proteínas asociadas a los mRNA muestra que Rtr1 se asocia físicamente a los mismos. De la misma manera se observa la asociación de la exonucleasa Dhh1. Además, podemos ver que la purificación de mRNA está libre de contaminantes citoplasmático (Pgk1) y cromatínico (Histona H3). Estos resultados sugieren que Rtr1 podría asociarse a los mRNA de manera global, o por lo menos a una gran cantidad de ellos. Sin embargo, teniendo en cuenta los datos previos que muestran una asociación física entre Rtr1 y Dhh1 (Hodko et al., 2016; Smith-Kinnaman et al., 2014), es interesante analizar si la asociación de Rtr1 a los mRNA ocurre de un modo directo o indirectamente a través de Dhh1.

Análisis de una posible coordinación entre Rtr1, Rpb4 y Dhh1

Estos datos y otros previos muestran una mayor estabilidad de los mRNA en ausencia de Rtr1 (Hodko et al., 2016), de Dhh1 (Coller et al., 2001) y de Rpb4 (Garrido-Godino et al., 2016). Además, la interacción genética entre *RPB4* y *RTR1* (Gibney et al., 2008), la asociación entre Dhh1 y Rtr1 (Hodko et al., 2016; Smith-Kinnaman et al., 2014), así como la asociación demostrada por nosotros y otros entre Rtr1, Dhh1 y Rpb4 y los mRNA (Garrido-Godino et al., 2016; Goler-Baron et al., 2008; Hodko et al., 2016), refuerzan nuestra hipótesis de un posible papel de Rtr1 en la estabilidad de los mRNA en un mecanismo coordinado con Rpb4 y/o Dhh1.

Para esclarecer el posible papel coordinado entre Rtr1, Rpb4 y Dhh1 estudiamos la asociación de estas proteínas al mRNA en cepas carentes de cada una de ellas. Para ello, se generaron cepas mutantes *rtr1Δ*, *rpb4Δ* y *dhh1Δ* y sus cepas isogénicas silvestres con versiones etiquetadas de Rtr1-TAP y Dhh1-HA.

Para determinar posibles defectos fenotípicos de termosensibilidad en el crecimiento a causa de las etiquetas utilizadas, se sembraron diluciones seriadas de las distintas cepas en medio rico YPD a diferentes temperaturas (Figura R6).

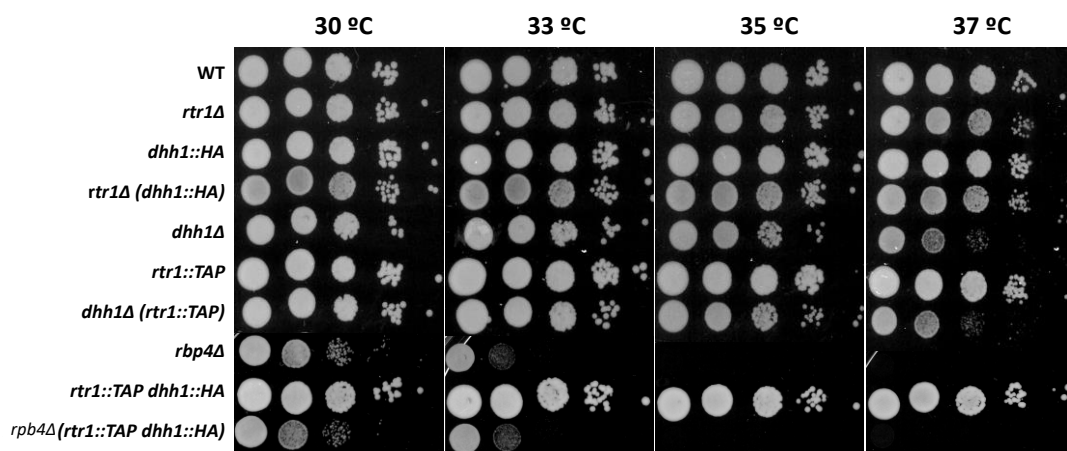


Figura R6: Crecimiento de cepas mutantes y silvestre, a distintas temperaturas en medio rico YPD.

Como se observa en la figura R6 las versiones etiquetadas de Rtr1-TAP y Dhh1-HA no provocan defectos de crecimiento significativos ni en la cepa silvestre ni en los mutantes (*rtr1Δ*, *dhh1Δ* y *rpb4Δ*). Por tanto, a priori, podemos descartar cualquier alteración inespecífica en nuestros estudios como consecuencia de las etiquetas de las proteínas.

Una vez generados los mutantes necesarios, y comprobado su crecimiento (Figura R6) se analizó el posible efecto de la ausencia de Rtr1, Rpb4 y Dhh1 en los niveles de asociación de las mismas a los mRNA.

RESULTADOS

Para profundizar en la hipótesis de un posible papel de Rtr1 en la estabilidad de los mRNA en un mecanismo coordinado con Rpb4 y/o Dhh1, nos planteamos determinar el efecto que tiene la ausencia de Rtr1 en la asociación de Rpb4 y Dhh1 a los mRNA. Para ello, se utilizó la técnica descrita hasta ahora (UV-crosslinking), para determinar los niveles de Rpb4 y Dhh1 asociados al mRNA en un mutante *rtr1Δ* frente a su silvestre (Figura R7).

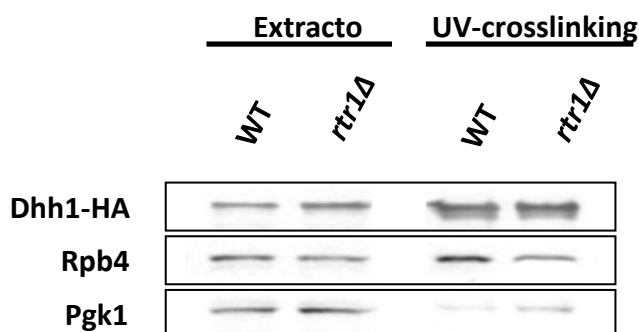


Figura R7: Detección por western-blot de proteínas asociadas a los mRNA purificados por el método UV-crosslinking en un mutante *rtr1Δ*. Se analizaron las proteínas de interés Rpb4 y Dhh1, y el respectivo control citoplasmático (Pgk1).

Como se observa en la figura R7, la purificación de mRNA está prácticamente libre de contaminante citoplasmático (Pgk1) y completamente libre de cromatina (Histona H3) (no mostrado). El análisis de proteínas asociadas a los mRNA muestra que los niveles de Dhh1 en el mutante *rtr1Δ* son similares a los del silvestre, tal y como ocurre en los extractos. Sin embargo, los niveles de Rpb4 asociado al mRNA son inferiores en un mutante *rtr1Δ* respecto al silvestre, a pesar de que la cantidad de Rpb4 en extractos proteicos totales es similar en ambas cepas. Esto refuerza la idea del papel coordinado entre Rtr1 y Rpb4, y sugiere una posible colaboración entre ambos, en su asociación al mRNA.

Una vez determinado el efecto de la ausencia de Rtr1 en la asociación de Rpb4 al mRNA, nos planteamos analizar el efecto que provoca la mutación *rpb4Δ* en la asociación de Rtr1 y Dhh1 a los mRNA. Para ello, del mismo modo que anteriormente, se analizaron

los niveles de Rtr1 y Dhh1 asociados a los mRNA en un mutante *rpb4Δ* frente al silvestre (Figura R8).

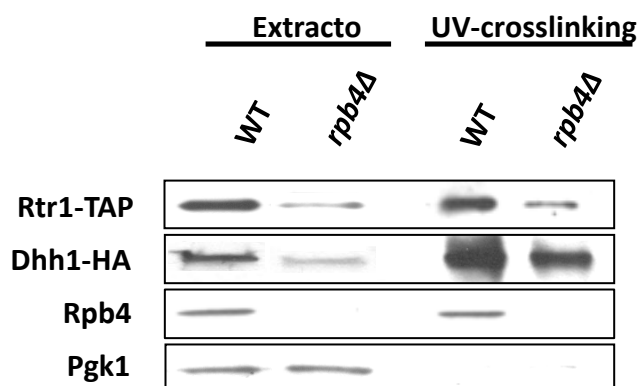


Figura R8: Detección por western-blot de proteínas asociadas a los mRNA purificados por el método UV-crosslinking en un mutante *rpb4Δ*. Se analizaron las proteínas de interés Rtr1, Dhh1 y Rpb4 y el respectivo control citoplasmático (Pgk1).

Como se observa en la figura R8, una vez corroborado que la purificación de mRNA está libre de contaminante citoplasmático (Pgk1) y cromatínico (Histona H3) (no mostrado), demostramos que los niveles de Rtr1 y Dhh1 asociados al mRNA en ausencia de Rbp4 son menores que en el silvestre. Sin embargo, no solo se ve afectado los niveles de asociación al mRNA, sino que ya en extractos los niveles totales de Dhh1 y Rtr1 son inferiores en el mutante *rpb4Δ*.

Para completar el análisis y poder esclarecer el posible papel coordinado de Rtr1 con Rpb4 y Dhh1 en la estabilidad del mRNA, se analizaron los niveles de Rtr1 y Rpb4 asociados al mRNA en ausencia de Dhh1, siguiendo el mismo procedimiento llevado a cabo hasta ahora (UV-crosslinking) (Figura R9).

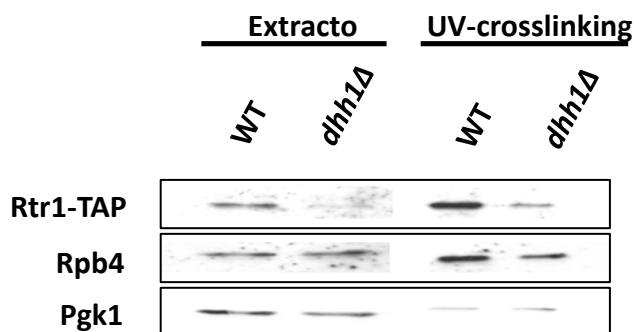


Figura R9: Detección por western-blot de proteínas asociadas a los mRNA purificados por el método UV-crosslinking en un mutante *dhh1Δ*. Se analizaron las proteínas de interés Rtr1 y Rpb4, y el respectivo control citoplasmático (Pgk1).

Como se observa en la figura R9, los niveles de Rtr1 y Rpb4 asociados al mRNA en ausencia de Dhh1 son menores en el mutante *dhh1Δ* que en la cepa silvestre. Por otro lado, los niveles de Rpb4 en extracto son similares en ambas cepas, mientras que los niveles de Rtr1 son menores en el mutante.

Estos datos, en conjunto, sugieren el posible papel coordinado de Rtr1 con Rpb4 y Dhh1 en el ciclo de vida del mRNA regulando su estabilidad, posiblemente favoreciendo su asociación al mRNA.

Una vez determinado el efecto, en ausencia de Rtr1, Rpb4 y Dhh1, en los niveles de asociación de las mismas a los mRNA, y conociendo que las tres proteínas están asociadas a la cromatina (Haimovich et al., 2013; Mosley et al., 2009), nos planteamos determinar si estos defectos de asociación a los mRNA, podrían tener lugar cotranscripcionalmente. Por ello, nos planteamos analizar los niveles de Rtr1, Rpb4 y Dhh1 asociados a la cromatina en ausencia de cada una de ellas. Para ello se utilizó la metodología desarrollada en el Capítulo I (yChEFs) que nos permite aislar fracciones de cromatina enriquecida con las proteínas asociadas a ella, libres de contaminantes citoplasmáticos.

En primer lugar se analizó cómo afecta la ausencia de Rtr1 en los niveles de Rpb4 y Dhh1 asociados a la cromatina.

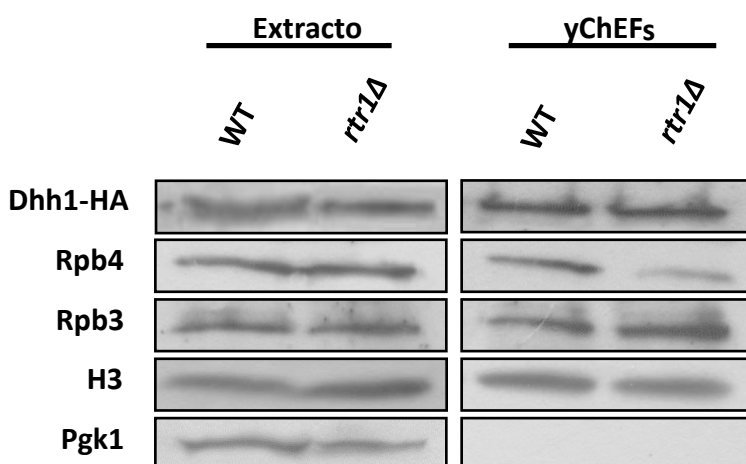


Figura R10: Detección por western-blot de proteínas asociadas a la cromatina a partir del método de purificación de fracciones cromatínicas enriquecidas (yChEFs) en un mutante *rtr1Δ*. Se analizaron las proteínas de interés Rpb4 y Dhh1, y los respectivos controles de contaminación citoplasmática (Pgk1) y control de carga a cromatina constante (Histona H3). Rpb3 se utiliza como control de la RNA pol II.

Como se observa en la figura R10, el aislamiento de la fracción cromatínica está libre de contaminante citoplasmático (Pgk1). Además los niveles de H3 en el mutante *rtr1Δ* respecto al silvestre son similares, de la misma manera que ocurre con la proteína Rpb3 como marcador de la RNA pol II. No observamos diferencias a nivel de asociación de Dhh1 y sí de asociación de Rpb4 a la cromatina, lo que no se observa en extractos. El hecho de que Rpb3 no varía en cromatina respecto al silvestre, indica que hay polimerasa unida a la cromatina sin dímero Rpb4/7 en ausencia de Rtr1. Estos resultados son similares a los observados en los experimentos de asociación de proteínas a mRNA. La menor asociación de Rpb4 a mRNAs se produciría cotranscripcionalmente dado que Rpb4 acompaña a los transcritos desde que se sintetiza hasta que se exportan al citoplasma (Dahan and Choder, 2013; Forget and Chartrand, 2011; Goler-Baron et al., 2008).

RESULTADOS

El análisis de asociación de Rtr1 y Dhh1 a la cromatina en ausencia de Rpb4 (Figura R11; controles H3, Pgk1 correctos), mostró que la ausencia de Rpb4 provoca disminución general de las proteínas Dhh1 y Rtr1 en las células y como consecuencia, menor unión de las mismas a la cromatina. De nuevo estos resultados son similares a los obtenidos en estudios de asociación de Dhh1 y Rtr1 a los mRNA en ausencia de Rpb4. A diferencia de lo descrito anteriormente, también la cantidad de Rpb3 disminuye de manera global y, como consecuencia, su asociación a la cromatina.

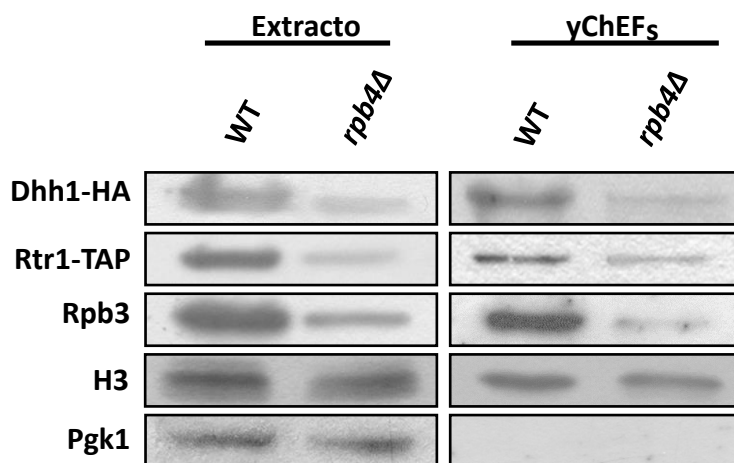


Figura R11: Detección por western-blot de proteínas asociadas a la cromatina a partir del método de purificación de fracciones cromatínicas enriquecidas (yChEFs) en un mutante *rpb4Δ*. Se analizaron las proteínas de interés Rtr1 y Dhh1, y los respectivos controles de contaminación citoplasmática (Pgk1) y control de carga a cromatina constante (Histona H3). Rpb3 se utiliza como control de la RNA pol II.

Estos datos sugieren que la menor asociación de Rtr1 y Dhh1 a los mRNA en ausencia de Rpb4 son consecuencia de la menor cantidad global de estas proteínas en las células.

Por último, analizamos el efecto de la ausencia de Dhh1, en los niveles de asociación de Rtr1 y Rpb4 a la cromatina (Figura R12), con la misma metodología seguida en los dos análisis anteriores.

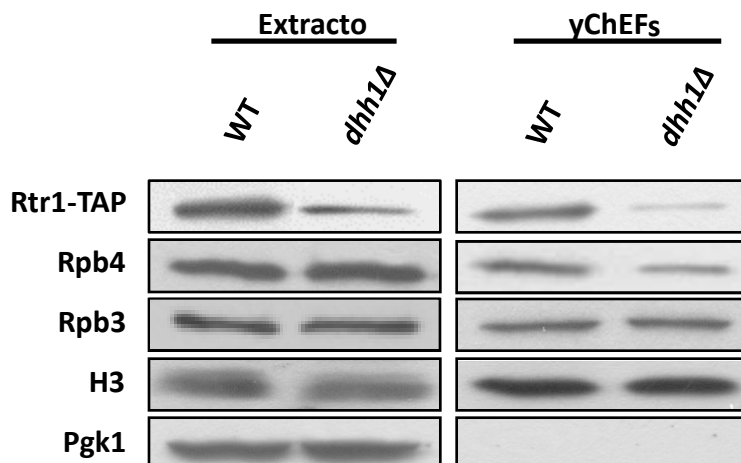


Figura R12: Detección por western-blot de proteínas asociadas a la cromatina a partir del método de purificación de fracciones cromatinicas enriquecidas (yChEFs) en un mutante *dhh1Δ*. Se analizaron las proteínas de interés Rtr1 y Rpb4, y los respectivos controles de contaminante citoplasmático (Pgk1) y control de carga a cromatina constante (Histona H3). Rpb3 se utiliza como control de la RNA pol II.

Como se observa en la figura 12, los controles (Pgk1 e Histona H3) son correctos. La asociación de Rtr1 y Rpb4 a la cromatina se ve disminuida a pesar de que solamente Rtr1 disminuye a nivel global en las células mutantes. En este caso no hay alteración en los niveles de Rpb3, lo que sugiere que hay polimerasa sin Rpb4/7 asociada a la cromatina. De nuevo los resultados son similares a los obtenidos en los experimentos de asociación de estas proteínas a los mRNA.

Para clarificar las diferencias observadas en los extractos para algunas de las proteínas estudiadas, analizamos los niveles de acumulación de mRNA de los genes *RTR1*, *DHH1* y *RPB4* (Figura R13) a partir de RNA total de las mismas cepas analizadas en la figura R7, R8 y R9.

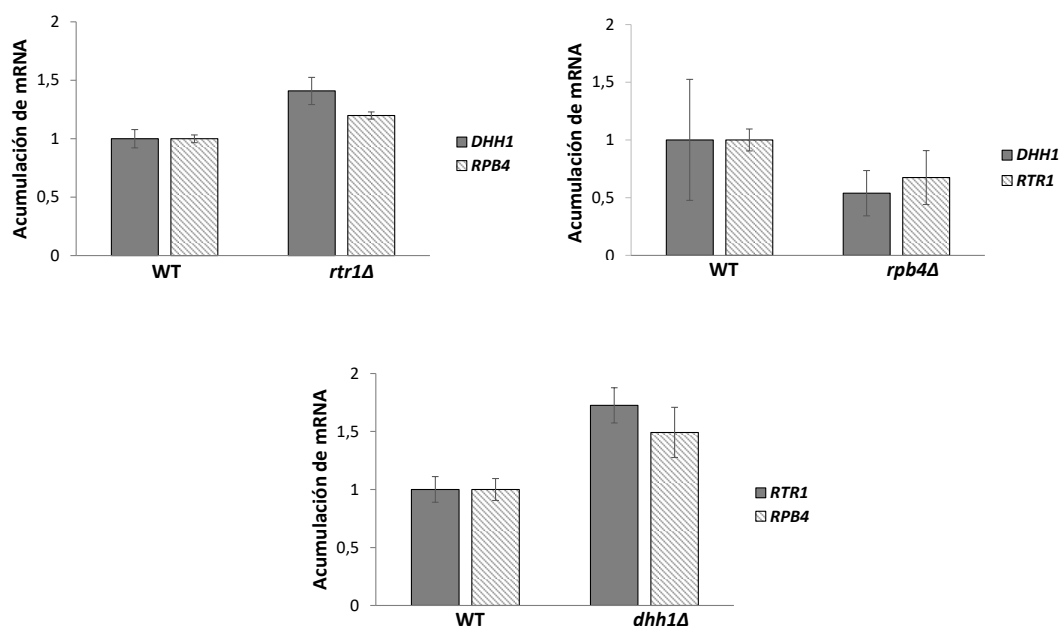


Figura R13: Representación de los niveles de acumulación de mRNA para *RTR1*, *RPB4* y *DHH1* en los mutantes *rtr1Δ*, *dhh1Δ* y *rpb4Δ*. Análisis mediante RT-qPCR, normalizado a los niveles de rRNA 18S.

Como se observa en la figura R13, de manera general los niveles de acumulación de mRNA coinciden con los de proteínas cuando se comparan las cepas mutantes y sus cepas isogénicas silvestres, con la excepción de *RTR1* en carencia de Dhh1, ya que aunque no hay diferencias significativas de acumulación de RNA, sí hay caída en la cantidad de proteína en las células. Esta diferencia podría ser resultado de algún mecanismo postraducciona.

Los resultados obtenidos en los análisis de UV-crosslinking (asociación de proteínas a los mRNA), los análisis de γ ChEFs (asociación de proteínas a la cromatina), así como en los análisis de acumulación de mRNA (RT-qPCR) y de proteína global en extractos se presenta en la tabla R2, donde se esquematiza el efecto que tendría la ausencia de cada una de las proteínas Rtr1, Rpb4 y Dhh1, sobre las dos proteínas restantes o sobre la expresión de los genes correspondientes.

	<i>rtr1Δ</i>				<i>rpb4Δ</i>				<i>dhh1Δ</i>			
	RT-qPCR	Extractos	γChEFs	UV-crosslinking	RT-qPCR	Extractos	γChEFs	UV-crosslinking	RT-qPCR	Extractos	γChEFs	UV-crosslinking
Rtr1					↓	↓	↓	↓		↓	↓	↓
Rpb4			↓	↓							↓	↓
Dhh1					↓	↓	↓	↓				

Tabla R2: Esquema del efecto provocado por la ausencia de cada una de las proteínas Rtr1, Rpb4 y Dhh1, sobre las dos restantes. Se muestran los análisis de acumulación de mRNA (RT-qPCR), niveles de proteínas en extractos, UV-crosslinking (asociación de proteínas a los mRNA) y análisis de γChEFs (asociación de proteínas a la cromatina).

Estos datos en conjunto, nos muestran que en ausencia de Rtr1 los niveles de Rpb4 asociados a los mRNA disminuyen. La ausencia de Rpb4 provoca una disminución global de proteínas Rtr1 y Dhh1 que conlleva menor asociación a los mRNA. A su vez, la ausencia de Dhh1 conlleva niveles inferiores de Rtr1 y Rpb4 asociados a los mRNA, y disminución en los niveles globales de proteína Rtr1 en las células. Este patrón de asociación a mRNA coincide con los niveles de asociación de las proteínas a la cromatina, en las mismas condiciones estudiadas. Estos datos sugieren una posible unión cotranscripcional de las mismas a los mRNA. Datos previos involucran a Rtr1 en el ensamblaje y transporte de la RNA pol II al núcleo (Forget et al., 2013; Gómez-Navarro and Estruch, 2015). Los datos de nuestro grupo muestran defectos en el ensamblaje de Rpb4 a la RNA pol II en un mutante *rtr1Δ* (Garrido-Godino, en preparación). Rpb4 interacciona con factores de degradación del mRNA Pat1/Lsm-1 (Lotan et al., 2005), acompañando al mRNA desde su síntesis hasta su degradación (Dahan and Choder, 2013; Forget and Chartrand, 2011; Selitrennik et al., 2006). Además, se ha descrito una interacción física entre Dhh1 y Rtr1 (Hodko et al., 2016; Smith-Kinnaman et al., 2014). En base a todos estos datos sugerimos que posiblemente la ausencia directa de Rtr1 o los bajos niveles de Rtr1 causados por la falta de Dhh1, podrían estar relacionados con la disminución en los niveles de Rpb4 asociados a los mRNA, probablemente por los defectos de ensamblaje de la RNA pol II al no asociarse

RESULTADOS

correctamente Rpb4 a la misma. Esto podría provocar un deficiente reclutamiento de la maquinaria de degradación de los mRNA por parte de Rpb4 aumentando la estabilidad de los mismos. En cualquier caso, no descartamos el posible papel directo de Rtr1, dada su asociación al mRNA.

Como se ha descrito previamente existe una interacción genética negativa entre *RTR1* y *RPB4* (Gibney et al., 2008). De manera interesante también observamos una interacción genética positiva entre *RTR1* y *DHH1* (Figura R14). Sin embargo, no se observa interacción genética con el gen *XRN1* que codifica la exonucleasa Xrn1, exonucleasa que favorece la degradación del mRNA 5'-3', lo que está en acuerdo con los datos previamente publicados que indican que Xrn1 no tiene efecto sobre el mecanismo de estabilidad del mRNA en el que interviene Rtr1 (Hodko et al., 2016). Esto sugiere que la relación entre Dhh1 y Rtr1 puede ser independiente de parte o del resto de la maquinaria de degradación de mRNA, ya que también se ha propuesto una influencia de las exonucleasas REX (Hodko et al., 2016).

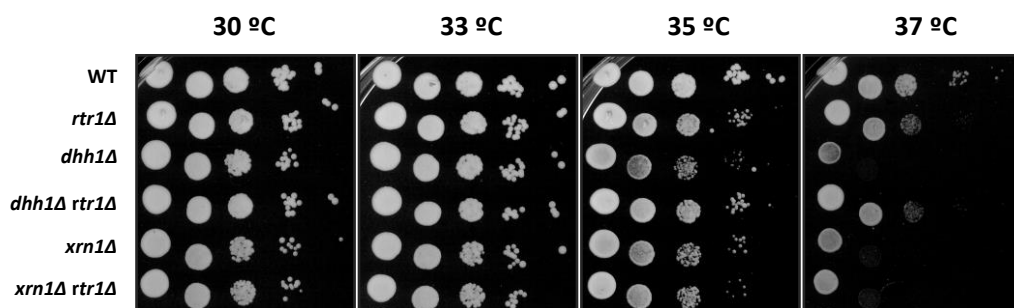


Figura R14: Crecimiento de cepas mutantes y silvestre, a distintas temperaturas en medio rico YPD.

Discusión

AATCGCAGTGATCGATTAGCTAGTGACGCTAATCGCAGTGATCGATTAGCTAGTGACGCTA
ACCRACCTGGAGCACTTACGAGTGCTCARRCCCRACCTGGAGCACTTACGAGTGCTCARRCA

CAPÍTULO I: Desarrollo de una Técnica para el análisis de fracciones de cromatina enriquecidas, yChEFs (*yeast Chromatin Enriched Fractions*)

En este trabajo se ha desarrollado una técnica de aislamiento de fracciones cromatínicas enriquecidas, en *S. cerevisiae*, yChEFs. Esta técnica y el uso de la espectrometría de masas nos han permitido analizar el proteoma asociado a cromatina y determinar el proteoma asociado a cromatina dependiente de RNA.

Este método es muy sencillo y reproducible puesto que evita la necesidad de obtener fracciones celulares, aislamiento de esferoplastos y purificación de núcleos para conseguir la purificación de la cromatina. Además no tiene la necesidad de fragmentar, solubilizar y/o eliminar el DNA, ya sea mediante sonicación o tratamientos con DNasa, para el análisis por Western blot o por espectrometría de masas, a diferencia de otras metodologías (Frei and Gasser, 2000; Hierlmeier et al., 2012; Kubota et al., 2011; Lambert et al., 2009; Lambert et al., 2010; Liang and Stillman, 1997; Luger et al., 1997; Mirón-García et al., 2014). Por otro lado, se ha demostrado que la fijación de las proteínas al DNA mediante formaldehído, DSG o una combinación de ambas afecta a la eficiencia del proceso (Aparicio et al., 2005; Engelen et al., 2015; Freire-Picos et al., 2013; Metz et al., 2004), lo que nos permite obviar este paso y facilitar aún más el desarrollo de la técnica.

Los análisis proteómicos, siguiendo esta metodología, muestran proteínas asociadas comúnmente a la cromatina en *S. cerevisiae*, cuyos homólogos han sido identificados en la cromatina en otros organismos, incluyendo las histonas y variantes de histonas (Boulard et al., 2007). Alrededor del 8% de las proteínas identificadas en nuestro análisis fueron mitocondriales, característica general en la mayoría de los procedimientos de purificación de proteínas asociadas a la cromatina en diferentes organismos (Chu et al., 2006; Du et al., 2006; Foltz et al., 2009; Foltz et al., 2006; Frei and Gasser, 2000; Khoudoli et al., 2008; Kubota et al., 2011; Liang and Stillman, 1997; Tan et al., 2007), probablemente debido al hecho de que no se emplea un paso específico para la eliminación de la cromatina mitocondrial, pudiendo también deberse a la alta concentración de proteínas mitocondriales existentes en la célula, que podrían recuperarse como contaminante inespecífico.

Por otro lado también se identificaron entre un 10-15% de proteínas citosólicas, en principio sin relación con la cromatina, algo también observado por otros (Kim et al., 2011; Kubota et al., 2011; Lambert et al., 2009; Lambert et al., 2010; Oesterreich et al., 2010). Sin embargo es posible que estas proteínas se asocien a la cromatina en algún momento; de hecho, muchas de estas proteínas se describen en *S. cerevisiae* Database (SGD) como nucleares o interaccionando físicamente con proteínas nucleares, como es el caso, por ejemplo, de la peptidil prolina isomerasa Cpr1, identificada previamente por otra metodología, mChIP (Lambert et al., 2010). De igual manera, las proteínas de complejos pre-ribosomales identificadas podrían formar parte de complejos pre-ribosomales nucleares asociados con la maquinaria de maduración de RNA (Kressler et al., 2010). Muchas de estas proteínas están presentes en complejos pre-ribosomales a pesar de haber sido descritas como componente de los ribosomas citosólicos (Kressler et al., 2010). yChEFs es un método mediante el cual se purifican de manera muy eficiente fracciones enriquecidas de cromatina, aunque no se trata de un procedimiento de purificación completo de la cromatina.

Para corroborar la validez y eficiencia del método yChEFs, este se comparó con otros métodos previamente descritos. Cuando se compara con el método previamente descrito por Carrillo y colaboradores (Carrillo et al., 2010) se determinó que el 71% de las proteínas detectadas en yChEFs coincidían con las identificadas en sus estudios (Carrillo et al., 2010). El resto de proteínas identificadas por yChEFs correspondían con categorías funcionales también presentes en los estudios indicados, tales como ribosomas, RNA pols y procesamiento de rRNA; probablemente estas diferencias se deban a diferencias en la sensibilidad de la espectrometría de masas. Por otro lado, en la comparación con la técnica de mChIP (Lambert et al., 2010), solo el 30% de las proteínas aisladas en yChEFs coinciden con las obtenidas por esta metodología, si bien este método es algo diferente pues estudia el interactoma a partir de un conjunto amplio de proteínas seleccionadas. Además, cuando se compara el interactoma obtenido mediante mChIP (Lambert et al., 2010), con el proteoma definido por Carrillo y colaboradores (Carrillo et al., 2010), se obtiene una menor coincidencia que la observada con el proteoma obtenido mediante yChEFs. Algunas proteínas difíciles de purificar por métodos tradicionales, pero que si se caracterizaron por mChIP como Mcm5, Yta7 y Cpr1 (Lambert et al., 2009; Lambert et al., 2010) también se

identificaron mediante el procedimiento yChEFs. De igual modo, algunas proteínas poco caracterizadas como Leg1 (glicoproteína), al igual que componentes del complejo TORC1, previamente purificadas en otros procedimientos de análisis de proteomas cromatínicos (Lambert et al., 2009), se obtuvieron mediante yChEFs, confirmando la eficiencia de esta metodología en *S. cerevisiae*.

El método yChEFs combinado con espectrometría de masas fue usado para el análisis del proteoma asociado a la cromatina de manera dependiente de RNA, identificándose 202 proteínas con asociación diferencial con respecto al proteoma sin tratamiento. El análisis de categorías funcionales, GO, reveló procesos biológicos relacionados principalmente con el procesamiento y escisión del RNA, la transcripción, el metabolismo de ncRNA, los nucleosomas y la modificación de la cromatina. De todas las proteínas identificadas en este proteoma, el 13% correspondieron con componentes de complejos pre-ribosomales. De forma interesante, cuatro proteínas involucradas en el procesamiento del mRNA se han identificado en este proteoma. Se trata de proteínas que se translocan entre el citoplasma y el núcleo: Dcp2, Xrn1, Dhh1 y Pbp1. Dcp2 es un miembro del complejo enzimático de *decapping* Dcp1p-Dcp2p que elimina la caperuza 5' de los mRNA antes de su degradación (Harigaya et al., 2010; Parker, 2012; Yoon et al., 2010). Dcp2 es necesario para la vía de degradación del mRNA eucariótico de 5' a 3' por la exonucleasa Xrn1, asistida por Dhh1 y otras enzimas (Engelen et al., 2015; Haimovich et al., 2013; Sun et al., 2013). Pbp1 (*Pab1 binding protein 1*) es un componente que induce la formación de gránulos de estrés y se une a Pab1 para regular la poliadenilación de los mRNA (Duy et al., 2017; Swisher and Parker, 2010). De igual forma, identificamos diferentes subunidades de las tres RNA pols asociadas a la cromatina de manera dependiente de RNA, lo que sugiere que estas enzimas permanecen asociadas a la cromatina, de manera más estable, en algún momento del proceso transcripcional, gracias a la presencia de RNA. Este puede ser el caso en el proceso de terminación de la RNA pol II (Shandilya and Roberts, 2012), maduración de los rRNAs (Ferreira-Cerca et al., 2005; Robledo et al., 2008), splicing de mRNAs (Ardehali and Lis, 2009), etc. Estos datos sugieren que un amplio número de proteínas y/o complejos, mayoritariamente relacionados con la transcripción y el procesamiento de RNAs, se asocian a la cromatina de manera dependiente de RNAs y su asociación se desestabiliza en ausencia de los mismos.

En resumen, en este trabajo se ha desarrollado una técnica de purificación de fracciones enriquecidas de cromatina en *S. cerevisiae* denominada yChEFs (yeast Chromatin Enriched Fractions), que permite de un modo fácil, reproducible y escalable identificar y analizar las proteínas asociadas a la misma, combinándose sin problemas con espectrometría de masas. Este método evita la necesidad de realizar fraccionamiento celular y/o solubilización del DNA mediante sonicación o tratamiento con DNasa. Esta técnica nos ha permitido identificar el proteoma asociado a la cromatina, así como el asociado a la misma dependiente de RNA.

CAPÍTULO II: INFLUENCIA DE Bud27 EN EL CICLO DE VIDA DEL mRNA

Bud27, ortólogo de URI/RMP en humanos, es un miembro del complejo prefoldinas (PDF) que actúan como chaperonas en una vía independiente de ATP (Andrews, 2010; Cloutier and Coulombe, 2010; Millán-Zambrano and Chávez, 2014). Bud27 media el ensamblaje de las tres RNA pols en una vía dependiente de Rpb5 (Mirón-García et al., 2013). Además, se ha descrito su importancia en la elongación de la transcripción de la RNA pol II favoreciendo la asociación de Sth1, componente principal del complejo remodelador de cromatina RSC, a la RNA pol II y a la cromatina (Mirón-García et al., 2014). Recientemente se ha demostrado también la asociación entre Bud27, Sth1 y la RNA pol III en *S. cerevisiae* (Vernekar and Bhargava, 2015). Estos datos hacen suponer que, de manera similar, este proceso debe ocurrir también a nivel de la RNA pol I. Por otro lado, en estudios previos se ha determinado que la falta de Bud27 altera la expresión de 39 genes, mayoritariamente relacionados con la regulación del metabolismo de aminoácidos (Gstaiger et al., 2003), aunque los datos de nuestro grupo, de ocupación de la RNA pol II, por ChIP, en un mutante carente de Bud27, hacen suponer que deben existir más cambios en los niveles globales de mRNA. Esto está apoyado por los datos transcriptómicos presentados en este trabajo. Además, estudios de nuestro grupo implican a Bud27 en procesos de maduración del global de transcritos: tRNA, rRNAs y mRNAs.

La ausencia de Bud27 acelera la velocidad de degradación de los mRNA respecto al silvestre, disminuyendo su estabilidad, con una reducción de la vida media de prácticamente la mitad. De manera sorprendente, cuando analizamos los niveles globales de acumulación de mRNA para genes concretos o para el total (analizando poli(A)), relativizados a controles internos o a tamaño celular, los datos no muestran la caída que se correspondería con la disminución de la vida media en el mutante *bud27Δ*. En el caso concreto del gen *CPA2*, observamos, incluso, unos niveles de acumulación de mRNA muy altos respecto al silvestre, lo que parece estar en concordancia con los altos niveles de ocupación de RNA pol II, mediante ChIP, que muestra este gen y que sugieren una mayor tasa de transcripción (Martínez-Fernández, en preparación). Sin embargo, el comportamiento del resto de los genes no se corresponde con los valores esperados según la inestabilidad de los mRNA. Estos datos sugieren un comportamiento homeostático para compensar la cantidad global de mRNA y sugieren que debe existir un aumento de la tasa

de transcripción, a pesar de que para algunos genes se ha observado disminución de la ocupación de RNA pol II (Mirón-García et al., 2014).

Como se ha mencionado en apartados anteriores, se ha relacionado tanto a Bud27 como a su ortólogo URI con la ruta TOR (Gstaiger et al., 2003). En nuestro grupo se ha demostrado que el 75% de los genes que presentan mayor ocupación de la RNA pol II en el mutante *bud27Δ* respecto al silvestre son dependientes de Gcn4, factor de transcripción regulado por TOR (Valenzuela et al., 2001). En concordancia, los resultados presentados en este trabajo muestran que una gran proporción de genes con mayor acumulación de mRNA en el mutante *bud27Δ* respecto al silvestre son dependientes de Gcn4. De igual manera, el 70% de los genes con mayor acumulación de mRNA por bloqueo de la ruta TOR son también dependientes de Gcn4. En conjunto, estos datos apoyan un papel trascendental de Bud27 en la ruta TOR. De hecho, el efecto que tiene el bloqueo de la ruta TOR en la estabilidad de los mRNA mimetiza el efecto del mutante *bud27Δ*, acelerando la degradación de los mismos (Albig and Decker, 2001). Nuestros datos transcriptómicos muestran igualmente un gran solapamiento entre los genes alterados por carencia de Bud27 y por bloqueo de la vía TOR con rapamicina, siendo el 70-80% de los genes con mayor acumulación comunes a ambos procesos, dependientes de Gcn4.

Se ha descrito que el bloqueo de la ruta TOR provoca inestabilidad en los transcritos debido a un acortamiento en las colas de poli(A) (Albig and Decker, 2001). Además, uno de los motivos que provoca inestabilidad en los transcritos es la existencia de “poliadenilación alternativa” (Geisberg et al., 2014). Datos de nuestro grupo demuestran que *PAB1* es un supresor del fenotipo de termosensibilidad del mutante *bud27Δ*; Pab1 es una proteína de unión al mRNA implicada en procesos de deadenilación (revisado en (Parker, 2012)) y tamaño de las colas de poli(A) de los mRNA (Aasland et al., 1996). Esto podría sugerir que la disminución en la estabilidad de los mRNA en un mutante *bud27Δ* y en condiciones de bloqueo de la ruta TOR mediante rapamicina (que conlleva acortamiento de las colas de poli(A)), podría estar relacionada con una alteración del reconocimiento de los sitios de poliadenilación. Efectivamente, como sugieren nuestros datos de RNA-seq, tanto la falta de Bud27 en el mutante *bud27Δ*, como el bloqueo de la ruta TOR en una cepa silvestre, conllevan alteración significativa en el reconocimiento y uso de los sitios de poliadenilación, con un aumento de sitios de poliadenilación, que parece mayor para la

mayoría de los genes, aguas-arriba respecto al sitio de poliadenilación preestablecido, en relación al silvestre.

No podemos descartar que el acortamiento de las colas de poli(A) que ocurre por bloqueo de la ruta TOR mediante rapamicina (Albig and Decker, 2001), pueda estar relacionado con la alteración en el reconocimiento y uso de los sitios de polidadenilación. Es interesante proponer que pueda estar ocurriendo, de igual modo, un acortamiento de las colas de poli(A) en el mutante *bud27Δ*.

El grupo de genes dependientes de Sth1 (datos cedidos por el Dr. Ch. Govind, (Spain et al., 2014)), muestra una importante alteración en el uso de sitios de poliadenilación. Esto es cierto tanto para el global de los genes dependientes de Sth1, como para aquellos regulados tanto positiva como negativamente. Esta alteración ocurre tanto en el mutante *bud27Δ*, como en el bloqueo de la ruta TOR por rapamicina, si bien es mayor en carencia de Bud27. De nuevo, los datos muestran una correlación entre Bud27 y Sth1, en línea con la asociación previamente descrita (Mirón-García et al., 2014; Vernekar and Bhargava, 2015).

Por el contrario, no existen cambios significativos en los perfiles de poliadenilación, a escala global, para los genes dependientes de Gcn4. En este caso se observa una variación en la alteración de uso de los sitios de poliadenilación similar a la mostrada para el global de los genes; el grupo de genes dependientes de Gcn4 supone el 50% del total de los genes de *S. cerevisiae* (<http://www.yeasttract.com/index.php>) (Monteiro et al., 2007).

Se ha descrito que daños en el DNA sufrido por diferentes condiciones de estrés tales como UV o 4-nitroquinolina 1-óxido (4NQO) ocasionan poliadenilación alternativa (Graber et al., 2013). Datos previos sugieren que Bud27 es necesario para el correcto funcionamiento de la ruta de reparación del DNA, SCR (*sister chromatin recombinant*) y la ausencia de Bud27 provoca una mayor acumulación de DSBs (*double-strand breaks*) (Muñoz-Galván et al., 2013). En concordancia, podría suponerse que los defectos en poliadenilación alternativa observados en carencia de Bud27 pueden tener también relación con el aumento de daños en el DNA.

El análisis transcriptómico en carencia de Bud27, así como en bloqueo de la ruta TOR en una cepa silvestre, muestra alteraciones importantes en el número de genes, con un considerable solapamiento cuando se comparan ambas situaciones. Estos datos refuerzan el papel de Bud27, y también de su ortólogo humano URI, en la vía TOR (Gstaiger et al., 2003). Datos recientes de nuestro grupo sobre el papel de Bud27 en la actividad de la RNA pol III y la biogénesis de los ribosomas refuerzan este papel (Martínez-Fernández en preparación). Es importante indicar que en estudios previos de expresión en un mutante *bud27Δ* frente a un silvestre, solo se observaron 39 genes alterados (incluyendo algunos tRNA y rRNA) (Gstaiger et al., 2003), a diferencia de la gran variación observada en nuestros estudios. La diferencia en las técnicas usadas, microarray de affymetrix en el caso de esos otros estudios (Gstaiger et al., 2003), frente a RNAseq a partir de RNA con poli(A) en nuestro trabajo, podrían explicar, en parte, estas importantes variaciones. El análisis de categorías funcionales para los genes con mayor acumulación de mRNA en carencia de Bud27 o en bloqueo de ruta TOR, muestra mayoritariamente procesos biosintéticos. Los genes con mayor acumulación de mRNA podrían estar relacionados con la activación de Gcn4, ya descrita en condiciones de bloqueo de ruta TOR y de carencia de Bud27 y URI (Almeida et al., 2009; Kimball, 2001)(Gstaiger et al, 2003). En el caso de los genes con menor acumulación de mRNA en las condiciones de estudio, solo observamos categorías funcionales significativas en el caso de bloqueo de ruta TOR por rapamicina, o bien en los genes comunes a esta situación y carencia de Bud27. Estas están relacionadas con procesos biológicos implicados en traducción, transporte nuclear, localización del RNA, transporte de RNA y su exportación desde el núcleo y transporte, exportación de rRNA desde el núcleo y biogénesis de ribosomas, entre otros. El hecho de que no identifiquemos categorías funcionales significativas en el total de los 761 genes alterados con menor acumulación en el mutante *bud27Δ*, podría deberse a los filtros utilizados en el análisis para considerar las variaciones significativas (mínimo 2 veces). Efectivamente, la reducción de los niveles de acumulación de mRNA a 1,5 veces con respecto al silvestre, permitió identificar, en el mutante *bud27Δ*, categorías funcionales relacionadas con procesos biológicos de traducción, transporte nuclear, localización del RNA, transporte de RNA y su exportación desde el núcleo y transporte y exportación de rRNA desde el núcleo.

Además, los procesos biológicos identificados para aquellos genes con menor acumulación del mRNA sugieren una respuesta a estrés general (Gasch et al., 2000). En cualquier caso, esta disminución puede estar relacionada con la disminución de la estabilidad de los mRNA, tanto en el mutante *bud27Δ* como en el silvestre tratado con rapamicina para bloquear la ruta TOR (Albig and Decker, 2001), lo que conllevaría, en cualquier caso, una respuesta de estrés (Gasch et al., 2000).

Por otro lado, las categorías funcionales identificadas para genes con menor acumulación de mRNA sugieren una relación con los defectos de traducción previamente descritos en células carentes de Bud27 (Deplazes et al., 2009), así como con datos de nuestro grupo que muestran defectos en biogénesis de ribosomas. De igual forma, se han descrito defectos en la biogénesis de ribosomas en bloqueo de la ruta TOR (Honma et al., 2006; Lee et al., 2012; Mayer and Grummt, 2006; Powers and Walter, 1999).

Datos de nuestro grupo muestran una menor presencia de Sth1 en la región 3' de los genes en un mutante *bud27Δ* (Martínez-Fernández, en preparación), en correlación con la asociación descrita entre Bud27 y RSC (Mirón-García et al., 2014; Vernekar and Bhargava, 2015). Resultados similares los hemos observado en bloqueo de la ruta TOR en una cepa silvestre. El extremo C-terminal de Rsc4 (subunidad de RSC), interacciona físicamente con Rpb5 (subunidad común a las 3 RNA pols de eucariotas) y una mutación que altera este dominio de Rsc4 provoca defectos en la transcripción de los genes (Soutourina et al., 2006). Rpb5 interacciona con Bud27, así como con su ortólogo humano URI (Gstaiger et al., 2003; Mirón-García et al., 2013; Mita et al., 2011; Mita et al., 2013; Wenxiang et al., 2003). La posibilidad de una interacción tripartita entre Bud27, Rpb5 y RSC, mediante la cual Bud27 podría modular la asociación del remodelador de cromatina RSC a las RNA pols a través de Rpb5, para regular, al menos, la elongación de la transcripción, ha sido sugerida (Mirón-García et al., 2014; Vernekar and Bhargava, 2015). La falta de Bud27 podría, por tanto, estar alterando la disposición de los nucleosomas, como se ha observado en un mutante carente de Rsc4 (Mirón-García et al., 2014; Soutourina et al., 2006). El hecho de que datos de ChIP de nuestro grupo muestren altos niveles de ocupación de histona H3 en el mutante *bud27Δ*, así como en bloqueo de la ruta TOR en una cepa silvestre (Martínez-Fernández, en preparación), podría apoyar esta hipótesis.

Por otro lado, en células humanas se ha descrito que el posicionamiento de los nucleosomas, además de afectar a la elongación de la transcripción, puede alterar la poliadenilación de genes de la RNA pol II y el reclutamiento de la maquinaria de poliadenilación al mRNA naciente (Jordán-Pla et al., 2014; Luco et al., 2011; McCracken et al., 1997). Se ha demostrado que los sitios de poliadenilación juegan un papel muy importante en la eficiencia de la terminación desencadenada después del reconocimiento de la señal de poliadenilación por la RNA pol II en células de mamíferos (Gromak et al., 2006; Plant et al., 2005). La disposición de los nucleosomas aguas-arriba de los sitios de poliadenilación marca el comienzo de la terminación de la transcripción, en células humanas (Huang et al., 2013). De igual modo, la RNA pol II se encuentra pausada en la región de los sitios de poliadenilación, para asegurar el procesamiento efectivo de la terminación en el extremo 3' (Huang et al., 2013).

De manera interesante, estudios preliminares en el mutante *bud27Δ* sugieren una mayor acumulación de la RNA pol II en la región TTS (sitio de terminación de la transcripción), más acentuada en los genes dependientes de Sth1, lo que podría indicar defectos en terminación de la transcripción en carencia de Bud27, probablemente asociados a alteraciones en la función de RSC y quizá en el posicionamiento adecuado de los nucleosomas. Nuestros datos sugieren una mayor tendencia a la poliadenilación aguas-arriba del sitio de poliadenilación preestablecido, tanto en el mutante *bud27Δ* como en bloqueo la ruta TOR en una cepa silvestre tratada con rapamicina. Podemos sugerir que un defectuoso posicionamiento de los nucleosomas, en el que podrían estar implicado los bajos niveles de Sth1 en la zona 3' de los genes, podría estar asociado a las alteraciones en la poliadenilación, en concordancia con lo propuesto en humanos que correlaciona defectos en el posicionamiento de nucleosomas con poliadenilación alternativa (Huang et al., 2013).

El paralelismo entre los datos presentados en carencia de Bud27 y en bloqueo de la ruta TOR sugiere que Bud27 tendría un papel importante en dicha ruta, en regular los procesos descritos. De hecho, el bloqueo de esta ruta tanto en la levadura *S. cerevisiae* como en células humanas, conlleva una disminución en los niveles intracelulares de proteína Bud27 y URI. Esto podría estar relacionado con los efectos observados en un mutante *bud27Δ* (Gstaiger et al., 2003); Martínez-Fernández, en preparación).

Teniendo en cuenta los datos descritos hasta el momento proponemos el modelo presentado en la figura D1, mediante el cual Bud27 interaccionaría con el complejo RSC a través de Rpb5 modulando el posicionamiento adecuado de los nucleosomas y/o la correcta disposición de la cromatina, permitiendo una eficiente transcripción. La falta de Bud27 generaría una alteración de la disposición de los nucleosomas, provocando defectos en la terminación de la transcripción y una alteración en los sitios de poliadenilación. Esto conllevaría la obtención de mRNA con sitios de poliadenilación alterados, pudiendo ser una de las causas del aumento de inestabilidad de los mRNA. En concordancia, se ha descrito que la poliadenilación alternativa constituye una de las causas de inestabilidad de los mRNA (Geisberg et al., 2014). No podemos descartar que se produzca un acortamiento en las colas de poli(A) de los mRNA que conlleve inestabilidad de los mRNA, como ha sido previamente descrito en condiciones de bloqueo de la ruta TOR (Albig and Decker, 2001), sin que este proceso deba estar directamente relacionado con el posicionamiento de los nucleosomas y la poliadenilación alternativa.

Por otro lado, de forma paralela y no excluyente, y tal y como ya se ha mencionado a lo largo de este trabajo, en un escrutinio de supresión del fenotipo de termosensibilidad del mutante *bud27Δ* se identificó el gen codificante de la proteína Pab1 como supresor de dicho fenotipo. Pab1 es una proteína de unión al mRNA involucrada en establecer el correcto tamaño de la cola de poli(A) (Aasland et al., 1996) e involucrada en procesos de deadenilación (Parker, 2012). Basándonos en estos datos planteamos que Pab1 podría estar implicada en la poliadenilación alternativa que parece estar ocurriendo en el mutante *bud27Δ* y tener un papel en la degradación de los mRNA. Sin embargo, el hecho de que los niveles de Pab1 asociado a mRNA no varíen por carencia de Bud27 no parece apoyar tal hipótesis. La proteína Pab1 podría regular negativamente la actividad deadenilasa de Ccr4, ya que datos obtenidos *in vitro* en *S. cerevisiae* muestran una reducción de dicha actividad cuando se añade Pab1, disminuyendo la velocidad de degradación de los mRNA (Tucker et al., 2002). Se ha sugerido que Ccr4 constituye el centro catalítico de deadenilación de las exonucleasas que forman el complejo Ccr4/Pop2/Not (Goldstrohm and Wickens, 2008; Thore et al., 2003), mediante el que se acorta la cola de poli(A) permitiendo la degradación del mRNA (Decker and Parker, 1993; Muhlrud and Parker, 1992). Por ello, pese a que los datos presentados son preliminares y es requerido un estudio más profundo, no

descartamos la posibilidad de que la actividad de Pab1 se vea afectada por la ausencia de Bud27 provocando un aumento en la tasa de degradación de los transcritos. Sin embargo, tampoco podemos descartar que la corrección del fenotipo de termosensibilidad se trate de un efecto indirecto, debido a una compensación de la estabilidad de los mRNA provocada por un exceso de Pab1 en la célula al sobreexpresar el gen *PAB1*.

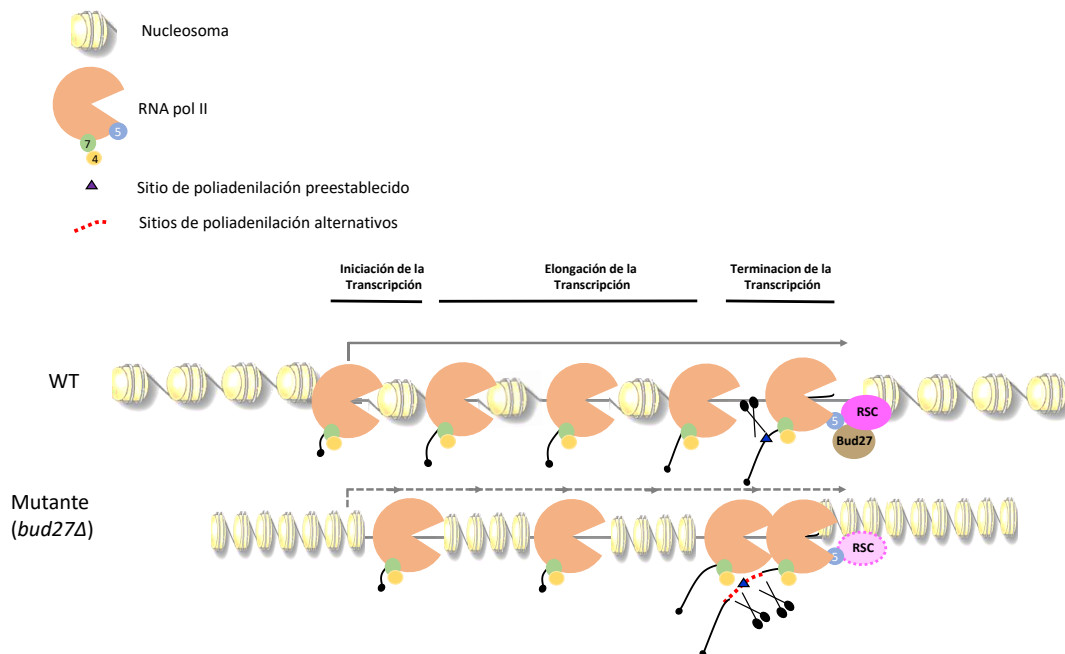


Figura D1: Modelo propuesto para la asociación tripartita entre Bud27, Rpb5 y RSC en la transcripción y poliadenilación. En un silvestre (WT), Bud27 asociado a Rpb5 favorece la función de RSC, lo que conlleva un correcto posicionamiento de los nucleosomas permitiendo una eficiente transcripción. La falta de Bud27 (mutante *bud27Δ*), generaría una errónea asociación de RSC a Rpb5, provocando una alternación en el posicionamiento de los nucleosomas, alterando la elongación de la transcripción y la terminación y provocando, probablemente, la alteración del reconocimiento y uso de sitios de poliadenilación alternativos.

CAPÍTULO III: INFLUENCIA DE LA FOSFATASA DEL CTD, Rtr1, EN EL CICLO DE VIDA DEL mRNA

Rtr1 en *S. cerevisiae*, cuyo ortólogo humano es RPAP2, es una fosfatasa del CTD que favorece el paso de la iniciación a la elongación de la transcripción mediante la desfosforilación del CTD-Ser5P en la región 5' de los genes, seguido de una fosforilación en el CTD-Ser2. Su ausencia provoca defectos transcripcionales, produciéndose una acumulación aberrante de fosforilación en el CTD-Ser5P en la región codificante de los genes (Gibney et al., 2008; Mosley et al., 2013). Se ha cuestionado el papel de Rtr1 como fosfatasa directa del CTD, considerando la posibilidad de que realmente su papel sea el de apoyar la labor de Ssu72, fosfatasa principal encargada de la transición CTD-Ser5P a CTD-Ser2P en el paso de la iniciación a la elongación de la transcripción (Rosado-Lugo and Hampsey, 2014). Se ha sugerido el papel tanto de Rtr1 como de RPAP2 en el ensamblaje y transporte de la RNA pol II al núcleo (Forget et al., 2013; Gómez-Navarro and Estruch, 2015).

Se descrito el papel de Rtr1 favoreciendo la degradación de su propio transcrito, (Hodko et al., 2016) en combinación con Dhh1, un miembro conservado de la familia de las helicasas *DEAD box* que parece tener un papel directo en el *decapping* (De Waard et al., 2006), estimulando la enzima de Dcp1 (Fischer and Weis, 2002), favoreciendo a su vez, el reclutamiento de las exonucleasas REX (Hodko et al., 2016).

El aumento de estabilidad global de mRNA observada en un mutante *rtr1Δ* concuerda con el hecho de que la delección de la región 3' UTR del mRNA de *RTR1*, donde se une la proteína Rtr1, provoca un aumento de la estabilidad del transcrito (Hodko et al., 2016). Además hemos demostrado que Rtr1 se asocia físicamente a los mRNA, más allá de la asociación a su propio transcrito, lo que podría sugerir una impronta más general sobre los mRNA (Hodko et al., 2016).

La acumulación de mRNA observada en el mutante *rtr1Δ*, similar a la de un silvestre, no se correlaciona con el aumento de estabilidad de los mRNA. Este hecho sugiere un comportamiento homeostático de la célula, probablemente por una reducción en los niveles de transcripción, lo cual estaría en correlación con datos que muestran una menor

ocupación de RNA pol II en los genes en ausencia de Rtr1 (Egloff et al., 2012; Kim et al., 2009; Mosley et al., 2009)).

Se ha descrito una interacción genética entre *RTR1* y *RPB4* y una interacción funcional entre ambas proteínas (Gibney et al., 2008; Mosley et al., 2013). Rpb4 tiene un importante papel en el ciclo de vida de los mRNA, modulando, entre otros procesos, de manera negativa, la estabilidad de los mismos (Garrido-Godino et al., 2016). Este proceso sería consecuencia de la impronta cotranscripcional de Rpb4 sobre los mRNA (Garrido-Godino et al., 2016; Goler-Baron et al., 2008); Collier and Parker, 2005; Lotan et al., 2005). Este hecho podría estar relacionado con datos que sugieren que Rpb4 actúa favoreciendo el reclutamiento de la maquinaria de degradación del RNA mensajero, a través de su interacción física con los factores Pat1/Lsm1-7 (Collier and Parker, 2005; Lotan et al., 2005). Las interacciones genética y funcional descritas entre Rtr1 y Rpb4 sugieren un papel coordinado entre Rtr1 y Rpb4 para modular la estabilidad de los transcritos, probablemente a través de su asociación a los mRNA.

La ausencia de Rtr1 provoca disminución de los niveles de Rpb4 asociado a los mRNA, lo que concuerda con un incremento en la estabilidad de los transcritos (Garrido-Godino 2016). Estos datos sugieren un papel mayoritario para Rpb4 en el proceso de estabilización global de mRNA en carencia de Rtr1, sin descartar un papel directo de la propia proteína Rtr1. La falta de Rtr1 conlleva defectos en el ensamblaje de la RNA pol II, alterando los niveles de Rpb4 (quizá del dímero Rpb4/7) asociado a la enzima (Garrido-Godino, en preparación), de manera que se asocian a la cromatina RNA pol II completa y RNA pol II sin Rpb4. Es probable que este defecto sea, por lo menos en parte, la causa de la existencia de una menor población de mRNA con Rpb4 asociado y en consecuencia, más estables, tal y como se ha demostrado previamente (Garrido-Godino et al., 2016). En concordancia con estos defectos en ensamblaje, RPAP2 y Rtr1 participan en el ensamblaje y/o importe de la RNA pol II al núcleo (Forget et al., 2013; Gómez-Navarro and Estruch, 2015). Por el contrario, y a pesar de los datos que describen la asociación Rtr1-Dhh1 para regular la estabilidad de su propio transcrito (Hodko et al., 2016), la asociación de Dhh1 a los mRNA no está alterada en ausencia de Rtr1.

También en ausencia de Dhh1 se produce una disminución de los niveles generales de Rtr1 en las células, sin alteración en la acumulación de su mRNA, sugiriendo algún mecanismo postraducciona l de regulación. Además también en ausencia de Dhh1 observamos dos poblaciones de RNA pol II asociadas a la cromatina, completa y sin Rpb4. Pudiera ser que la disminución en los niveles de Rtr1 estuviesen alterando el correcto ensamblaje de la RNA pol II, provocando defectos en la asociación de Rpb4 a la enzima. Esto conllevaría una alteración en los niveles de mRNA asociados a Rpb4 y un aumento de la estabilidad de los mismos (Garrido-Godino et al., 2016; Goler-Baron et al., 2008); Collier and Parker, 2005; Lotan et al., 2005). En cualquier caso, la falta de Dhh1 tendría también un efecto directo en la estabilidad de los mRNA al estar alterada su función en degradación (Collier et al., 2001) y serían este y el posible defecto de ensamblaje producido por la reducción de Rtr1, los causantes del aumento estabilidad global de mRNA.

Por el contrario, en ausencia de Rpb4 se reduce la acumulación de mRNA de los genes *RTR1* y *DHH1*, así como los niveles globales de estas proteínas y de la propia RNA pol II asociada a la cromatina . Curiosamente observamos que en el mutante *rpb4Δ* los niveles de Rpb3 y Rpb1 (indicadores de los niveles de RNA pol II) son inferiores al silvestre, en contraposición con estudios previos que mostraban valores similares de RNA pol II entre el mutante *rpb4Δ* y el silvestre (Allepuz-Fuster et al., 2014). Este hecho puede deberse, probablemente, al etiquetado de las cepas.

Es probable que, al igual que Rpb4 acompaña al mRNA desde su síntesis, a lo largo de su ciclo de vida, hasta su degradación (Garrido-Godino et al., 2016; Goler-Baron et al., 2008; Harel-Sharvit et al., 2010), Rtr1, y Dhh1 también puedan unirse a los mRNA cotranscripcionalmente. Esto concordaría con el hecho de que los niveles de asociación de Rtr1, Dhh1 y Rpb4 a los mRNA que observamos en las distintas cepas son siempre similares a los observados en cromatina.

En base a todos estos datos planteamos el siguiente modelo (Figura D2). Rtr1, además de su función descrita en desfosforilación del CTD-Ser5P (Buratowski, 2009), participa en el ensamblaje de la RNA pol II (Forget et al., 2013; Gómez-Navarro and Estruch, 2015; Garrido-Godino, en preparación). La falta de Rtr1 o la disminución en sus niveles como consecuencia de la ausencia de Dhh1, provocan una deficiencia en el ensamblaje de

la RNA pol II, lo que conlleva que exista un incremento en la población de RNA pol II carente de Rpb4 (probablemente del dímero Rpb4/7) asociada a la cromatina. Como consecuencia de este déficit, el paso contrascriptcional de Rpb4 a los mRNA se vería alterado, favoreciéndose el aumento de población de mRNA sin Rpb4 asociado, desfavoreciendo de esta forma el reclutamiento de la maquinaria de degradación de los mRNA y por tanto, aumentando la estabilidad de los mismos. De igual modo, estudios de polimerasa total en las formas fosforiladas del CTD purificando Rtr1 detectan niveles de Rpb4/7 menores respecto a RNA pol II (Mosley et al., 2013), lo que apoya este papel en ensamblaje. En el caso de ausencia de Dhh1, sin embargo, el aumento en la estabilidad de los mRNA comprendería al defecto de ensamblaje provocado por la disminución en los niveles de Rtr1 y, de manera más general, al efecto de la falta de esta proteína sobre el proceso de degradación de los mRNA, favoreciendo la eliminación de la caperuza 5' ("*decapping*") (Carroll et al., 2011; Fischer and Weis, 2002). No podemos descartar un efecto directo de Rtr1 sobre los mRNA, en correlación con su unión a los mismos y su papel en la regulación de la degradación de su propio mRNA (Hodko et al., 2016). Es posible que este efecto ocurra a través de la interacción con Rpb4 y/o Dhh1, entre otras proteínas. En cualquier caso, no sería un efecto general de participación o asociación de toda la maquinaria de degradación de mRNA, pues como demuestra nuestro trabajo y datos previos, al menos Xrn1 no parece tener un efecto sobre el mecanismo de estabilidad de mRNA en el que interviene Rtr1 (Hodko et al., 2016).

No podemos descartar que la asociación de Rpb4 al mRNA nascente proceda de Rpb4 libre que no se asocie cotranscriptcionalmente desde la propia RNA pol II. De igual modo, tampoco podemos descartar una asociación directa de Rtr1 y/o Dhh1 libres sin asociación a la enzima.

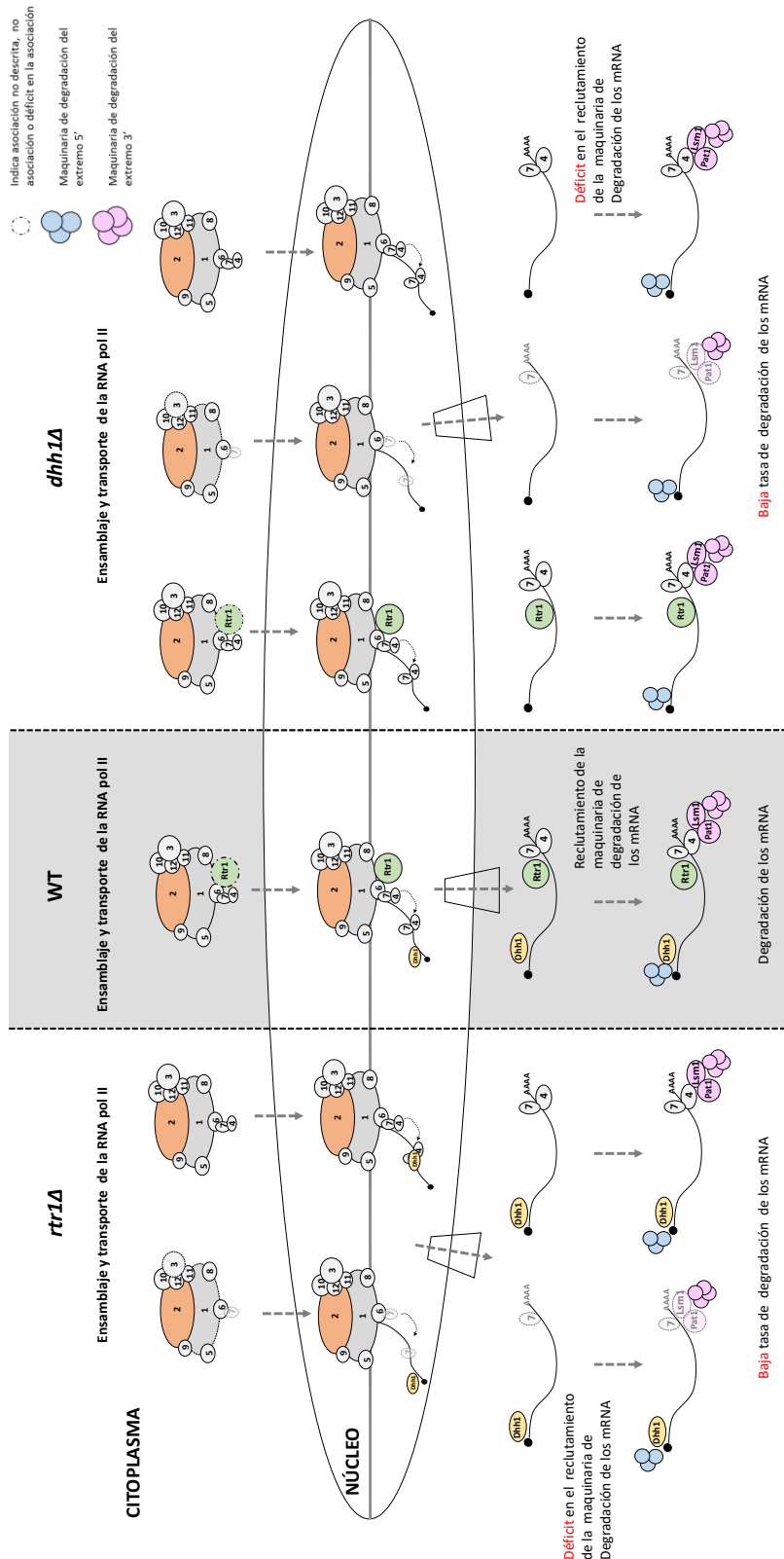


Figura D2: Rtr1 está implicado en el ensamblaje y transporte de la RNA pol II al núcleo (Forget et al., 2013; Gómez-Navarro and Estruch, 2015), posiblemente favoreciendo la correcta asociación del dímero Rpb4/7 al resto de la RNA pol II en el núcleo. Rtr1 se asocia a la RNA pol II en el núcleo para la desfosforilación del CTD-Ser5P, aunque podría unirse en el citoplasma para el proceso de ensamblaje y permanecer unida a la enzima. Rpb4 se une al mRNA naciente cotranscripcionalmente, acompañándolo en su ciclo de vida, favoreciendo el reclutamiento de la maquinaria de degradación y su posterior degradación (Garrido-Godino et al., 2016; Goler-Baron et al., 2008; Harel-Sharvit et al., 2010). Los bajos niveles de Rtr1 tanto para el mutante *rtr1Δ*, como por un efecto indirecto causado por la falta de Dhh1 (mutante *dhh1Δ*), provocan un déficit en el ensamblaje de la RNA pol II reduciendo los niveles de Rpb4 (probablemente del dímero Rpb4/7) asociados a la enzima unida a cromatina, disminuyendo por tanto, los niveles de Rpb4 (probablemente del dímero Rpb4/7) que acompañan al mRNA cotranscripcionalmente. Esto provocaría un déficit en el reclutamiento de la maquinaria de degradación y como consecuencia de ello, una disminución en la tasa de degradación de los mRNA.

Conclusiones/Conclusions

AATCGCAGT GATCGATT AGCTAGT GACGCTA AATCGCAGT GATCGATT AGCTAGT GACGCTA
ACCRACTC GTGAGCACTT CACGAGT GCTCARCC CCRACTC GTGAGCACTT CACGAGT GCTCARCC

CONCLUSIONES

CONCLUSIÓN PRIMERA

Se ha desarrollado una técnica fácil, reproducible y escalable, que permite la purificación de fracciones enriquecidas de cromatina con sus proteínas asociadas en *Saccharomyces cerevisiae*, denominada yChEFs (*y*east *C*hromatin *E*nriched *F*ractions). Este método es útil, también, para el análisis de proteínas unidas de manera lábil o transitoria. El procedimiento ha sido utilizado con éxito, combinado con espectrometría de masas, para analizar el proteoma asociado a la cromatina y el proteoma asociado a la cromatina dependiente de RNA.

CONCLUSIÓN SEGUNDA

La prefoldina-like Bud27 influencia la estabilidad de los mRNA en *Saccharomyces cerevisiae*. La falta de Bud27 conlleva una disminución global en la estabilidad de los mRNA y probablemente alteración en la selección de los sitios de poliadenilación, lo que determinaría una poliadenilación alternativa diferente. Es posible que esta alteración esté relacionada con la inestabilidad de los mRNA observada en carencia de Bud27. La relación funcional entre Bud27 y el remodelador de cromatina RSC nos lleva a proponer un modelo en el cual la falta de Bud27 podría provocar una alteración de la disposición de los nucleosomas o de la dinámica de la cromatina, provocando defectos en la terminación de la transcripción y una alteración en la selección de los sitios de poliadenilación, siendo esto, probablemente responsable de la inestabilidad de los mRNA. Bud27 participa en la ruta TOR, cuyo bloqueo parece conllevar resultados similares en poliadenilación. El hecho de que además el bloqueo de la ruta TOR provoque acortamiento de las colas de poli(A) de los mRNA, nos hace sugerir que el acortamiento de estas colas de poli(A) y la alteración en la poliadenilación alternativa podrían estar directamente relacionados.

CONCLUSIÓN TERCERA

La fosfatasa del CTD Rtr1 desempeña un papel en el ciclo de vida del mRNA modulando negativamente la estabilidad de los mismos. Consecuentemente, la falta de Rtr1 provoca un aumento de la vida media de los mRNA. El defecto en ensamblaje de la proteína Rpb4 (probablemente del dímero Rpb4/7) a la RNA pol II y de su asociación

CONCLUSIONES

cotranscripcional a los mRNA, podrían ser la causa del aumento de la estabilidad de los mismos observado en carencia de Rtr1, dado el papel de Rpb4 en este proceso. Nuestros datos y los descritos previamente sugieren una relación funcional entre Rtr1 y la exonucleasa Dhh1 que mediaría la degradación de los mRNA. No podemos descartar que el aumento en las vidas medias de los mRNA observado en carencia de Dhh1, no sea, en parte, indirecto, como consecuencia de los defectos en ensamblaje mencionados. Esta relación funcional podría extenderse a la proteína Rpb4. Por último no podemos descartar una acción directa de Rtr1 en la estabilidad de los mRNA, probablemente través de su asociación con Rpb4, Dhh1 y el mRNA.

CONCLUSIONS

FIRST CONCLUSION

We have developed an easy, reproducible and scalable technique to purify chromatin enriched fractions with their associated proteins in *Saccharomyces cerevisiae*, named yChEFs (yeast Chromatin Enriched Fractions). This method is useful for the analysis of labile or transiently bound proteins. The procedure has been successfully used, combined with mass spectrometry, to analyze the chromatin-associated proteome and the RNA-dependent chromatin-associated proteome.

SECOND CONCLUSION

The prefoldin-like Bud27 influences the mRNA stability in *Saccharomyces cerevisiae*. The lack of Bud27 leads to an overall decrease in mRNA stability and probably, to the alteration in the polyadenylation sites recognition, which could determine a different alternative polyadenylation. It is possible that this alteration is related to the mRNA instability under lack of Bud27. The functional relationship between Bud27 and the chromatin remodeler RSC leads us to propose a model in which lack of Bud27 could cause the alteration in nucleosomes organization and in transcription termination, altering the polyadenylation sites selection. Consequently, that could account for mRNA instability. Bud27 participates in TOR pathway, whose arrest seems to provoke similar polyadenylation alteration. Taking that TOR arrest leads to poly(A) tails shortening we can speculate that this process and the alternative polyadenylation alteration could be directly related.

THIRD CONCLUSION

The CTD phosphatase Rtr1 plays a role in the mRNA life cycle, modulating negatively their stability. Consequently, lack of Rtr1 causes an increase in the mRNA half-life. The defect in the assembly of Rpb4 (probably of the dimer Rpb4/7) to the RNA pol II and its co-transcriptional association with the mRNA, could be responsible of increase in mRNA stability under Rtr1 inactivation, given the role of Rpb4 in this process. Our data and those previously described suggest a functional relationship between Rtr1 and the Dhh1 exonuclease in mRNA degradation. We cannot rule out that a part of mRNA half-life defects observed under lack of Dhh1 could be indirect, as a consequence of the aforementioned

CONCLUSIONS

assembly defects. This functional relationship could be extended to Rpb4 protein. Finally we cannot rule out a direct participation of Rtr1 on mRNA stability, probably through its association with Rpb4, Dhh1 and the mRNA.

Bibliografía

AATCGCAGTGATCGATTAGCTAGTGACGCTAATCGCAGTGATCGATTAGCTAGTGACGCTA
ACCRACCTCGTGAGCACTTTCACGAGTGCTCARRCCCRACCTCGTGAGCACTTTCACGAGTGCTCARRCA

BIBLIOGRAFÍA

- Aasland, R., Stewart, A.F., and Gibson, T. (1996). The SANT domain: a putative DNA-binding domain in the SWI-SNF and ADA complexes, the transcriptional corepressor N-CoR and TFIIIB. *Trends in biochemical sciences* 21, 87-88.
- Adams, C.C., and Gross, D.S. (1991). The yeast heat shock response is induced by conversion of cells to spheroplasts and by potent transcriptional inhibitors. *Journal of bacteriology* 173, 7429-7435.
- Adkins, M.W., Howar, S.R., and Tyler, J.K. (2004). Chromatin disassembly mediated by the histone chaperone Asf1 is essential for transcriptional activation of the yeast PHO5 and PHO8 genes. *Molecular cell* 14, 657-666.
- Ahn, S.H., Kim, M., and Buratowski, S. (2004). Phosphorylation of serine 2 within the RNA polymerase II C-terminal domain couples transcription and 3' end processing. *Molecular cell* 13, 67-76.
- Albanese, V., Yam, A.Y.-W., Baughman, J., Parnot, C., and Frydman, J. (2006). Systems analyses reveal two chaperone networks with distinct functions in eukaryotic cells. *Cell* 124, 75-88.
- Albert, B., Knight, B., Merwin, J., Martin, V., Ottoz, D., Gloor, Y., Bruzzone, M.J., Rudner, A., and Shore, D. (2016). A molecular titration system coordinates ribosomal protein gene transcription with ribosomal RNA synthesis. *Molecular cell* 64, 720-733.
- Albig, A.R., and Decker, C.J. (2001). The target of rapamycin signaling pathway regulates mRNA turnover in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell* 12, 3428-3438.
- Almeida, B., Ohlmeier, S., Almeida, A.J., Madeo, F., Leão, C., Rodrigues, F., and Ludovico, P. (2009). Yeast protein expression profile during acetic acid-induced apoptosis indicates causal involvement of the TOR pathway. *Proteomics* 9, 720-732.
- Allepuz-Fuster, P., Martínez-Fernández, V., Garrido-Godino, A.I., Alonso-Aguado, S., Hanes, S.D., Navarro, F., and Calvo, O. (2014). Rpb4/7 facilitates RNA polymerase II CTD dephosphorylation. *Nucleic acids research* 42, 13674-13688.

- Anders, S., and Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome biology* **11**, R106.
- Anderson, P., and Kedersha, N. (2009). RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. *Nature reviews Molecular cell biology* **10**, 430-436.
- Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data.
- Angus-Hill, M.L., Schlichter, A., Roberts, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Cairns, B.R. (2001). A Rsc3/Rsc30 zinc cluster dimer reveals novel roles for the chromatin remodeler RSC in gene expression and cell cycle control. *Molecular cell* **7**, 741-751.
- Aparicio, O., Geisberg, J.V., Sekinger, E., Yang, A., Moqtaderi, Z., and Struhl, K. (2005). Chromatin immunoprecipitation for determining the association of proteins with specific genomic sequences in vivo. *Current protocols in molecular biology*, 21.23. 21-21.23. 33.
- Archambault, J., Chambers, R.S., Kobor, M.S., Ho, Y., Cartier, M., Bolotin, D., Andrews, B., Kane, C.M., and Greenblatt, J. (1997). An essential component of a C-terminal domain phosphatase that interacts with transcription factor IIF in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 14300-14305.
- Ardehali, M.B., and Lis, J.T. (2009). Tracking rates of transcription and splicing in vivo. *Nature Structural and Molecular Biology* **16**, 1123.
- Aristizabal, M.J., and Kobor, M.S. (2016). A single flexible RNAPII-CTD integrates many different transcriptional programs. *Transcription* **7**, 50-56.
- Armache, K.-J., Kettenberger, H., and Cramer, P. (2003). Architecture of initiation-competent 12-subunit RNA polymerase II. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 6964-6968.
- Auble, D.T., Hansen, K.E., Mueller, C., Lane, W.S., Thorner, J., and Hahn, S. (1994). Mot1, a global repressor of RNA polymerase II transcription, inhibits TBP binding to DNA by an ATP-dependent mechanism. *Genes & development* **8**, 1920-1934.
- Awrey, D.E., Weilbaecher, R.G., Hemming, S.A., Orlicky, S.M., Kane, C.M., and Edwards, A.M. (1997). Transcription Elongation through DNA Arrest Sites A MULTISTEP PROCESS INVOLVING BOTH RNA POLYMERASE II SUBUNIT RPB9 AND TFIIS. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 14747-14754.

- Badis, G., Chan, E.T., van Bakel, H., Pena-Castillo, L., Tillo, D., Tsui, K., Carlson, C.D., Gossett, A.J., Hasinoff, M.J., and Warren, C.L. (2008). A library of yeast transcription factor motifs reveals a widespread function for Rsc3 in targeting nucleosome exclusion at promoters. *Molecular cell* 32, 878-887.
- Badis, G., Saveanu, C., Fromont-Racine, M., and Jacquier, A. (2004). Targeted mRNA degradation by deadenylation-independent decapping. *Molecular cell* 15, 5-15.
- Balogopal, V., and Parker, R. (2009). Polysomes, P bodies and stress granules: states and fates of eukaryotic mRNAs. *Current opinion in cell biology* 21, 403-408.
- Basehoar, A.D., Zanton, S.J., and Pugh, B.F. (2004). Identification and distinct regulation of yeast TATA box-containing genes. *Cell* 116, 699-709.
- Bataille, A.R., Jeronimo, C., Jacques, P.-É., Laramée, L., Fortin, M.-È., Forest, A., Bergeron, M., Hanes, S.D., and Robert, F. (2012). A universal RNA polymerase II CTD cycle is orchestrated by complex interplays between kinase, phosphatase, and isomerase enzymes along genes. *Molecular cell* 45, 158-170.
- Becker, P.B., and Workman, J.L. (2013). Nucleosome remodeling and epigenetics. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5, a017905.
- Bentley, D.L. (2014). Coupling mRNA processing with transcription in time and space. *Nature Reviews Genetics* 15, 163-175.
- Berendzen, K.W. (2013). A GENERAL INTRODUCTION TO EUKARYOTIC TRANSCRIPTION AND ITS MOLECULAR COMPONENTS. *The Analysis of Regulatory DNA: Current Developments, Knowledge and Applications Uncovering Gene Regulation*, 3.
- Beyer, A.L., and Osheim, Y.N. (1988). Splice site selection, rate of splicing, and alternative splicing on nascent transcripts. *Genes & development* 2, 754-765.
- Björklund, S., and Gustafsson, C.M. (2005). The yeast Mediator complex and its regulation. *Trends in biochemical sciences* 30, 240-244.
- Black, D.L. (2000). Protein diversity from alternative splicing. *Cell* 103, 367-370.
- Boeck, R., Lapeyre, B., Brown, C.E., and Sachs, A.B. (1998). Capped mRNA degradation intermediates accumulate in the yeast *spb8-2* mutant. *Molecular and Cellular Biology* 18, 5062-5072.

- Boeger, H., Griesenbeck, J., Strattan, J.S., and Kornberg, R.D. (2004). Removal of promoter nucleosomes by disassembly rather than sliding in vivo. *Molecular cell* 14, 667-673.
- Boeing, S., Rigault, C., Heidemann, M., Eick, D., and Meisterernst, M. (2010). RNA polymerase II C-terminal heptarepeat domain Ser-7 phosphorylation is established in a mediator-dependent fashion. *Journal of biological chemistry* 285, 188-196.
- Boeke, J.D., La Croute, F., and Fink, G.R. (1984). A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Molecular and General Genetics MGG* 197, 345-346.
- Boulard, M., Bouvet, P., Kundu, T.K., and Dimitrov, S. (2007). Histone variant nucleosomes. *Chromatin and Disease* 41, 71.
- Boulon, S., Pradet-Balade, B., Verheggen, C., Molle, D., Boireau, S., Georgieva, M., Azzag, K., Robert, M.-C., Ahmad, Y., and Neel, H. (2010). HSP90 and its R2TP/Prefoldin-like cochaperone are involved in the cytoplasmic assembly of RNA polymerase II. *Molecular cell* 39, 912-924.
- Bourgeois, C.F., Kim, Y.K., Churcher, M.J., West, M.J., and Karn, J. (2002). Spt5 cooperates with human immunodeficiency virus type 1 Tat by preventing premature RNA release at terminator sequences. *Molecular and cellular biology* 22, 1079-1093.
- Bousquet-Antonelli, C., Presutti, C., and Tollervey, D. (2000). Identification of a regulated pathway for nuclear pre-mRNA turnover. *Cell* 102, 765-775.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.
- Brown, C.E., and Sachs, A.B. (1998). Poly (A) tail length control in *Saccharomyces cerevisiae* occurs by message-specific deadenylation. *Molecular and Cellular Biology* 18, 6548-6559.
- Buratowski, S. (2009). Progression through the RNA polymerase II CTD cycle. *Molecular cell* 36, 541-546.
- Bushnell, D.A., Cramer, P., and Kornberg, R.D. (2002). Structural basis of transcription: α -Amanitin-RNA polymerase II cocrystal at 2.8 Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 1218-1222.

- Bushnell, D.A., Westover, K.D., Davis, R.E., and Kornberg, R.D. (2004). Structural basis of transcription: an RNA polymerase II-TFIIB cocystal at 4.5 Angstroms. *Science* 303, 983-988.
- Cairns, B.R., Lorch, Y., Li, Y., Zhang, M., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Du, J., Laurent, B., and Kornberg, R.D. (1996). RSC, an essential, abundant chromatin-remodeling complex. *Cell* 87, 1249-1260.
- Calvo, O., and García, A. (2012). RNA polymerase II phosphorylation and gene expression regulation. In *Protein Phosphorylation in Human Health* (InTech).
- Carey, M., Li, B., and Workman, J.L. (2006). RSC exploits histone acetylation to abrogate the nucleosomal block to RNA polymerase II elongation. *Molecular cell* 24, 481-487.
- Carroll, J.S., Munchel, S.E., and Weis, K. (2011). The DExD/H box ATPase Dhh1 functions in translational repression, mRNA decay, and processing body dynamics. *The Journal of cell biology* 194, 527-537.
- Carter, R., and Drouin, G. (2009). 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. *Molecular biology and evolution* 27, 1035-1043.
- Cieśla, M., Makala, E., Płonka, M., Bazan, R., Gewartowski, K., Dziembowski, A., and Boguta, M. (2015). Rbs1, a new protein implicated in RNA polymerase III biogenesis in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 35, 1169-1181.
- Cloutier, P., and Coulombe, B. (2010). New insights into the biogenesis of nuclear RNA polymerases? This paper is one of a selection of papers published in this special issue entitled "Canadian Society of Biochemistry, Molecular & Cellular Biology 52nd Annual Meeting—Protein Folding: Principles and Diseases" and has undergone the Journal's usual peer review process. *Biochemistry and Cell Biology* 88, 211-221.
- Colgan, D.F., and Manley, J.L. (1997). Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes & development* 11, 2755-2766.
- Collart, M., and Timmers, H. (2004). The eukaryotic Ccr4-not complex: a regulatory platform integrating mRNA metabolism with cellular signaling pathways? *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 77, 289-322.
- Collart, M.A., and Panasenko, O.O. (2012). The Ccr4-not complex. *Gene* 492, 42-53.

- Coller, J., and Parker, R. (2005). General translational repression by activators of mRNA decapping. *Cell* 122, 875-886.
- Coller, J.M., Tucker, M., Sheth, U., Valencia-Sanchez, M.A., and Parker, R. (2001). The DEAD box helicase, Dhh1p, functions in mRNA decapping and interacts with both the decapping and deadenylase complexes. *Rna* 7, 1717-1727.
- Collins, S.R., Miller, K.M., Maas, N.L., Roguev, A., Fillingham, J., Chu, C.S., Schuldiner, M., Gebbia, M., Recht, J., and Shales, M. (2007). Functional dissection of protein complexes involved in yeast chromosome biology using a genetic interaction map. *Nature* 446, 806-810.
- Comer, F.I., and Hart, G.W. (2001). Reciprocity between O-GlcNAc and O-phosphate on the carboxyl terminal domain of RNA polymerase II. *Biochemistry* 40, 7845-7852.
- Corden, J. (2011). Going nuclear: transcribers in transit. *Molecular cell* 42, 143-145.
- Corden, J.L. (1990). Tails of RNA polymerase II. *Trends in biochemical sciences* 15, 383-387.
- Costanzo, M., Baryshnikova, A., Bellay, J., Kim, Y., Spear, E.D., Sevier, C.S., Ding, H., Koh, J.L., Toufighi, K., and Mostafavi, S. (2010). The genetic landscape of a cell. *science* 327, 425-431.
- Cramer, P. (2004). RNA polymerase II structure: from core to functional complexes. *Current opinion in genetics & development* 14, 218-226.
- Cramer, P., Armache, K.-J., Baumli, S., Benkert, S., Brueckner, F., Buchen, C., Damsma, G., Dengl, S., Geiger, S., and Jasiak, A. (2008). Structure of eukaryotic RNA polymerases. *Annu. Rev. Biophys.* 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., and Kornberg, R.D. (2000). Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science* 288, 640-649.
- Cramer, P., Bushnell, D.A., and Kornberg, R.D. (2001). Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 Ångstrom resolution. *Science* 292, 1863-1876.
- Cuesta, R., Hinnebusch, A.G., and Tamame, M. (1998). Identification of GCD14 and GCD15, novel genes required for translational repression of GCN4 mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 148, 1007-1020.

- Cuevas-Bermudez, A., Martínez-Fernández, V., Garrido-Godino, A.I., and Navarro, F. (2018). Subunits Common to RNA polymerases. The yeast Role in Medical Applications.
- Czeko, E., Seizl, M., Augsberger, C., Mielke, T., and Cramer, P. (2011). Iwr1 directs RNA polymerase II nuclear import. *Molecular cell* 42, 261-266.
- Chen, D.-C., Yang, B.-C., and Kuo, T.-T. (1992). One-step transformation of yeast in stationary phase. *Current genetics* 21, 83-84.
- Cheung, A.C., and Cramer, P. (2011). Structural basis of RNA polymerase II backtracking, arrest and reactivation. *Nature* 471, 249-253.
- Cho, E.-J., Kobor, M.S., Kim, M., Greenblatt, J., and Buratowski, S. (2001). Opposing effects of Ctk1 kinase and Fcp1 phosphatase at Ser 2 of the RNA polymerase II C-terminal domain. *Genes & development* 15, 3319-3329.
- Cho, E.-J., Takagi, T., Moore, C.R., and Buratowski, S. (1997). mRNA capping enzyme is recruited to the transcription complex by phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes & development* 11, 3319-3326.
- Chu, D.S., Liu, H., Nix, P., Wu, T.F., Ralston, E.J., Yates III, J.R., and Meyer, B.J. (2006). Sperm chromatin proteomics identifies evolutionarily conserved fertility factors. *Nature* 443, 101.
- Chung, W.-H., Craighead, J.L., Chang, W.-H., Ezeokonkwo, C., Bareket-Samish, A., Kornberg, R.D., and Asturias, F.J. (2003). RNA polymerase II/TFIIF structure and conserved organization of the initiation complex. *Molecular cell* 12, 1003-1013.
- Dahan, N., and Choder, M. (2013). The eukaryotic transcriptional machinery regulates mRNA translation and decay in the cytoplasm. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* 1829, 169-173.
- Damelin, M., Simon, I., Moy, T.I., Wilson, B., Komili, S., Tempst, P., Roth, F.P., Young, R.A., Cairns, B.R., and Silver, P.A. (2002). The genome-wide localization of Rsc9, a component of the RSC chromatin-remodeling complex, changes in response to stress. *Molecular cell* 9, 563-573.

- Darst, R.P., Dasgupta, A., Zhu, C., Hsu, J.-Y., Vroom, A., Muldrow, T., and Auble, D.T. (2003). Mot1 regulates the DNA binding activity of free TATA-binding protein in an ATP-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry* 278, 13216-13226.
- Darzacq, X., Shav-Tal, Y., De Turris, V., Brody, Y., Shenoy, S.M., Phair, R.D., and Singer, R.H. (2007). In vivo dynamics of RNA polymerase II transcription. *Nature structural & molecular biology* 14, 796-806.
- Daulny, A., and Tansey, W.P. (2009). Damage control: DNA repair, transcription, and the ubiquitin–proteasome system. *DNA repair* 8, 444-448.
- David, C.J., and Manley, J.L. (2010). Alternative pre-mRNA splicing regulation in cancer: pathways and programs unhinged. *Genes & development* 24, 2343-2364.
- De Waard, A., Breure, L., Kircz, J.G., and Van Oostendorp, H. (2006). Modeling rhetoric in scientific publications. In *International Conference on Multidisciplinary Information Sciences and Technologies, InSciT2006*.
- Decker, C.J., and Parker, R. (1993). A turnover pathway for both stable and unstable mRNAs in yeast: evidence for a requirement for deadenylation. *Genes & development* 7, 1632-1643.
- Decker, C.J., and Parker, R. (2012). P-bodies and stress granules: possible roles in the control of translation and mRNA degradation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4, a012286.
- Delgermaa, L., Hayashi, N., Dorjsuren, D., Nomura, T., Thuy, L.T.-T., and Murakami, S. (2004). Subcellular localization of RPB5-mediating protein and its putative functional partner. *Molecular and cellular biology* 24, 8556-8566.
- Denis, C.L., and Chen, J. (2003). The CCR4–NOT complex plays diverse roles in mRNA metabolism. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 73, 221-250.
- Deplazes, A., Möckli, N., Luke, B., Auerbach, D., and Peter, M. (2009). Yeast Uri1p promotes translation initiation and may provide a link to cotranslational quality control. *The EMBO journal* 28, 1429-1441.
- Dezélée, S., Wyers, F., Sentenac, A., and Fromageot, P. (1976). Two forms of RNA polymerase B in yeast. *The FEBS Journal* 65, 543-552.

- Di Giammartino, D.C., Nishida, K., and Manley, J.L. (2011). Mechanisms and consequences of alternative polyadenylation. *Molecular cell* **43**, 853-866.
- Dichtl, B., Blank, D., Ohnacker, M., Friedlein, A., Roeder, D., Langen, H., and Keller, W. (2002). A role for SSU72 in balancing RNA polymerase II transcription elongation and termination. *Molecular cell* **10**, 1139-1150.
- Dieci, G., Conti, A., Pagano, A., and Carnevali, D. (2013). Identification of RNA polymerase III-transcribed genes in eukaryotic genomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* **1829**, 296-305.
- Dieci, G., Fiorino, G., Castelnovo, M., Teichmann, M., and Pagano, A. (2007). The expanding RNA polymerase III transcriptome. *TRENDS in Genetics* **23**, 614-622.
- Dorjsuren, D., Lin, Y., Wei, W., Yamashita, T., Nomura, T., Hayashi, N., and Murakami, S. (1998). RMP, a novel RNA polymerase II subunit 5-interacting protein, counteracts transactivation by hepatitis B virus X protein. *Molecular and cellular biology* **18**, 7546-7555.
- Du, Y.-C., Gu, S., Zhou, J., Wang, T., Cai, H., MacInnes, M.A., Bradbury, E.M., and Chen, X. (2006). The dynamic alterations of H2AX complex during DNA repair detected by a proteomic approach reveal the critical roles of Ca²⁺/calmodulin in the ionizing radiation-induced cell cycle arrest. *Molecular & Cellular Proteomics* **5**, 1033-1044.
- Dunkley, T., and Parker, R. (1999). The DCP2 protein is required for mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae* and contains a functional MutT motif. *The EMBO Journal* **18**, 5411-5422.
- Duy, D.L., Suda, Y., and Irie, K. (2017). Cytoplasmic deadenylase Ccr4 is required for translational repression of LRG1 mRNA in the stationary phase. *PloS one* **12**, e0172476.
- Edwards, A.M., Kane, C., Young, R., and Kornberg, R.D. (1991). Two dissociable subunits of yeast RNA polymerase II stimulate the initiation of transcription at a promoter in vitro. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 71-75.
- Egloff, S., and Murphy, S. (2008). Role of the C-terminal domain of RNA polymerase II in expression of small nuclear RNA genes. (Portland Press Limited).

- Egloff, S., O'reilly, D., Chapman, R.D., Taylor, A., Tanzhaus, K., Pitts, L., Eick, D., and Murphy, S. (2007). Serine-7 of the RNA polymerase II CTD is specifically required for snRNA gene expression. *Science* 318, 1777-1779.
- Egloff, S., Zaborowska, J., Laitem, C., Kiss, T., and Murphy, S. (2012). Ser7 phosphorylation of the CTD recruits the RPAP2 Ser5 phosphatase to snRNA genes. *Molecular cell* 45, 111-122.
- Engel, C., Plitzko, J., and Cramer, P. (2016). RNA polymerase I–Rrn3 complex at 4.8 Å resolution. *Nature communications* 7, 12129.
- Engelen, E., Brandsma, J.H., Moen, M.J., Signorile, L., Dekkers, D.H., Demmers, J., Kockx, C.E., Ozgür, Z., Van Ijcken, W.F., and Van Den Berg, D.L. (2015). Proteins that bind regulatory regions identified by histone modification chromatin immunoprecipitations and mass spectrometry. *Nature communications* 6, 7155.
- Esberg, A., Moqtaderi, Z., Fan, X., Lu, J., Struhl, K., and Byström, A. (2011). Iwr1 protein is important for preinitiation complex formation by all three nuclear RNA polymerases in *Saccharomyces cerevisiae*. *PloS one* 6, e20829.
- Espada, J., and Esteller, M. (2007). Epigenetic control of nuclear architecture. *Cellular and molecular life sciences* 64, 449.
- Fernández-Tornero, C. (2018). RNA polymerase I activation and hibernation: unique mechanisms for unique genes. *Transcription*, 1-7.
- Fernández-Tornero, C., Böttcher, B., Rashid, U.J., and Müller, C.W. (2011). Analyzing RNA polymerase III by electron cryomicroscopy. *RNA biology* 8, 760-765.
- Fernández-Tornero, C., Böttcher, B., Riva, M., Carles, C., Steuerwald, U., Ruigrok, R.W., Sentenac, A., Müller, C.W., and Schoehn, G. (2007). Insights into transcription initiation and termination from the electron microscopy structure of yeast RNA polymerase III. *Molecular cell* 25, 813-823.
- Fernández-Tornero, C., Moreno-Morcillo, M., Rashid, U.J., Taylor, N.M., Ruiz, F.M., Gruene, T., Legrand, P., Steuerwald, U., and Müller, C.W. (2013). Crystal structure of the 14-subunit RNA polymerase I. *Nature* 502, 644-649.

- Fernández-Tornero, C., Böttcher, B., Rashid, U.J., Steuerwald, U., Flörchinger, B., Devos, D.P., Lindner, D., and Müller, C.W. (2010). Conformational flexibility of RNA polymerase III during transcriptional elongation. *The EMBO journal* 29, 3762-3772.
- Ferreira-Cerca, S., Pöll, G., Gleizes, P.-E., Tschochner, H., and Milkereit, P. (2005). Roles of eukaryotic ribosomal proteins in maturation and transport of pre-18S rRNA and ribosome function. *Molecular cell* 20, 263-275.
- Fischer, N., and Weis, K. (2002). The DEAD box protein Dhh1 stimulates the decapping enzyme Dcp1. *The EMBO Journal* 21, 2788-2797.
- Fischer, T., Sträßer, K., Rácz, A., Rodriguez-Navarro, S., Oppizzi, M., Ihrig, P., Lechner, J., and Hurt, E. (2002). The mRNA export machinery requires the novel Sac3p-Thp1p complex to dock at the nucleoplasmic entrance of the nuclear pores. *The EMBO journal* 21, 5843-5852.
- Foltz, D.R., Jansen, L.E., Bailey, A.O., Yates III, J.R., Bassett, E.A., Wood, S., Black, B.E., and Cleveland, D.W. (2009). Centromere-specific assembly of CENP-a nucleosomes is mediated by HJURP. *Cell* 137, 472-484.
- Foltz, D.R., Jansen, L.E., Black, B.E., Bailey, A.O., Yates III, J.R., and Cleveland, D.W. (2006). The human CENP-A centromeric nucleosome-associated complex. *Nature cell biology* 8, 458.
- Forget, A., and Chartrand, P. (2011). Cotranscriptional assembly of mRNP complexes that determine the cytoplasmic fate of mRNA. *Transcription* 2, 86-90.
- Forget, D., Lacombe, A.-A., Cloutier, P., Lavallée-Adam, M., Blanchette, M., and Coulombe, B. (2013). Nuclear import of RNA polymerase II is coupled with nucleocytoplasmic shuttling of the RNA polymerase II-associated protein 2. *Nucleic acids research* 41, 6881-6891.
- Frei, C., and Gasser, S.M. (2000). The yeast Sgs1p helicase acts upstream of Rad53p in the DNA replication checkpoint and colocalizes with Rad53p in S-phase-specific foci. *Genes & development* 14, 81-96.
- Freire-Picos, M., Landeira-Ameijeiras, V., and Mayán, M.D. (2013). Stalled RNAP-II molecules bound to non-coding rDNA spacers are required for normal nucleolus architecture. *Yeast* 30, 267-277.

- Frydman, J. (2001). Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annual review of biochemistry* 70, 603-647.
- Galbraith, M.D., Donner, A.J., and Espinosa, J.M. (2010). CDK8: a positive regulator of transcription. *Transcription* 1, 4-12.
- Garavís, M., González-Polo, N., Allepuz-Fuster, P., Louro, J.A., Fernández-Tornero, C., and Calvo, O. (2017). Sub1 contacts the RNA polymerase II stalk to modulate mRNA synthesis. *Nucleic acids research* 45, 2458-2471.
- García-López, M.C., Pelechano, V., Mirón-García, M.C., Garrido-Godino, A.I., García, A., Calvo, O., Werner, M., Pérez-Ortín, J.E., and Navarro, F. (2011). The conserved foot domain of RNA pol II associates with proteins involved in transcriptional initiation and/or early elongation. *Genetics* 189, 1235-1248.
- García-Oliver, E., García-Molinero, V., and Rodríguez-Navarro, S. (2012). mRNA export and gene expression: The SAGA–TREX-2 connection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* 1819, 555-565.
- García, A., Collin, A., and Calvo, O. (2012). Sub1 associates with Spt5 and influences RNA polymerase II transcription elongation rate. *Molecular biology of the cell* 23, 4297-4312.
- Garneau, N.L., Wilusz, J., and Wilusz, C.J. (2007). The highways and byways of mRNA decay. *Nature reviews Molecular cell biology* 8, 113-126.
- Garrido-Godino, A., García-López, M., García-Martínez, J., Pelechano, V., Medina, D., Pérez-Ortín, J., and Navarro, F. (2016). Rpb1 foot mutations demonstrate a major role of Rpb4 in mRNA stability during stress situations in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* 1859, 731-743.
- Garrido-Godino, A., Garcia-Lopez, M., and Navarro, F. (2013). Correct assembly of RNA polymerase II depends on the foot domain and is required for multiple steps of transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 33, 3611-3626.
- Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D., and Brown, P.O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular biology of the cell* 11, 4241-4257.

- Geisberg, J.V., Moqtaderi, Z., Fan, X., Oszolak, F., and Struhl, K. (2014). Global analysis of mRNA isoform half-lives reveals stabilizing and destabilizing elements in yeast. *Cell* 156, 812-824.
- Geissler, S., Siegers, K., and Schiebel, E. (1998). A novel protein complex promoting formation of functional α - and γ -tubulin. *The EMBO Journal* 17, 952-966.
- Ghosh, A., and Lima, C.D. (2010). Enzymology of RNA cap synthesis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 1, 152-172.
- Gibney, P.A., Fries, T., Bailer, S.M., and Morano, K.A. (2008). Rtr1 is the *Saccharomyces cerevisiae* homolog of a novel family of RNA polymerase II-binding proteins. *Eukaryotic cell* 7, 938-948.
- Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R., and Woods, R.A. (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/ss-DNA/PEG procedure. *Yeast* 11, 355-360.
- Gnatt, A.L., Cramer, P., Fu, J., Bushnell, D.A., and Kornberg, R.D. (2001). Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution. *Science* 292, 1876-1882.
- Goldstrohm, A.C., and Wickens, M. (2008). Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. *Nature reviews Molecular cell biology* 9, 337-344.
- Goler-Baron, V., Selitrennik, M., Barkai, O., Haimovich, G., Lotan, R., and Choder, M. (2008). Transcription in the nucleus and mRNA decay in the cytoplasm are coupled processes. *Genes & development* 22, 2022-2027.
- Gómez-Herreros, F., de Miguel-Jiménez, L., Millán-Zambrano, G., Peñate, X., Delgado-Ramos, L., Muñoz-Centeno, M.C., and Chávez, S. (2012). One step back before moving forward: regulation of transcription elongation by arrest and backtracking. *FEBS letters* 586, 2820-2825.
- Gómez-Navarro, N., and Estruch, F. (2015). Different pathways for the nuclear import of yeast RNA polymerase II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* 1849, 1354-1362.

- Graber, J.H., Nazeer, F.I., Yeh, P.-c., Kuehner, J.N., Borikar, S., Hoskinson, D., and Moore, C.L. (2013). DNA damage induces targeted, genome-wide variation of poly (A) sites in budding yeast. *Genome research* 23, 1690-1703.
- Grohmann, D., Nagy, J., Chakraborty, A., Klose, D., Fielden, D., Ebright, R.H., Michaelis, J., and Werner, F. (2011). The initiation factor TFE and the elongation factor Spt4/5 compete for the RNAP clamp during transcription initiation and elongation. *Molecular cell* 43, 263-274.
- Gromak, N., West, S., and Proudfoot, N.J. (2006). Pause sites promote transcriptional termination of mammalian RNA polymerase II. *Molecular and cellular biology* 26, 3986-3996.
- Gstaiger, M., Luke, B., Hess, D., Oakeley, E.J., Wirbelauer, C., Blondel, M., Vigneron, M., Peter, M., and Krek, W. (2003). Control of nutrient-sensitive transcription programs by the unconventional prefoldin URI. *Science* 302, 1208-1212.
- Gu, W., and Reines, D. (1995). Identification of a decay in transcription potential that results in elongation factor dependence of RNA polymerase II. *Journal of Biological Chemistry* 270, 11238-11244.
- Guglielmi, B., Soutourina, J., Esnault, C., and Werner, M. (2007). TFIIS elongation factor and Mediator act in conjunction during transcription initiation in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 16062-16067.
- Gumbs, O.H., Campbell, A.M., and Weil, P.A. (2003). High-affinity DNA binding by a Mot1p–TBP complex: implications for TAF-independent transcription. *The EMBO journal* 22, 3131-3141.
- Gupta, K., Sari-Ak, D., Haffke, M., Trowitzsch, S., and Berger, I. (2016). Zooming in on transcription preinitiation. *Journal of molecular biology* 428, 2581-2591.
- Haag, J.R., and Pikaard, C.S. (2011). Multisubunit RNA polymerases IV and V: purveyors of non-coding RNA for plant gene silencing. *Nature reviews Molecular cell biology* 12, 483-492.
- Hahn, S. (2004). Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nature structural & molecular biology* 11, 394.

- Haimovich, G., Medina, D.A., Causse, S.Z., Garber, M., Millán-Zambrano, G., Barkai, O., Chávez, S., Pérez-Ortín, J.E., Darzacq, X., and Choder, M. (2013). Gene expression is circular: factors for mRNA degradation also foster mRNA synthesis. *Cell* **153**, 1000-1011.
- Harel-Sharvit, L., Eldad, N., Haimovich, G., Barkai, O., Duek, L., and Choder, M. (2010). RNA polymerase II subunits link transcription and mRNA decay to translation. *Cell* **143**, 552-563.
- Hargreaves, D.C., Horng, T., and Medzhitov, R. (2009). Control of inducible gene expression by signal-dependent transcriptional elongation. *Cell* **138**, 129-145.
- Harigaya, Y., Jones, B.N., Muhlrads, D., Gross, J.D., and Parker, R. (2010). Identification and analysis of the interaction between Edc3 and Dcp2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **30**, 1446-1456.
- Hartzog, G.A., and Fu, J. (2013). The Spt4–Spt5 complex: a multi-faceted regulator of transcription elongation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* **1829**, 105-115.
- He, X., Khan, A.U., Cheng, H., Pappas, D.L., Hampsey, M., and Moore, C.L. (2003). Functional interactions between the transcription and mRNA 3' end processing machineries mediated by Ssu72 and Sub1. *Genes & development* **17**, 1030-1042.
- Heidemann, M., Hintermair, C., Voß, K., and Eick, D. (2013). Dynamic phosphorylation patterns of RNA polymerase II CTD during transcription. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* **1829**, 55-62.
- Hierlmeier, T., Merl, J., Sauert, M., Perez-Fernandez, J., Schultz, P., Bruckmann, A., Hamperl, S., Ohmayer, U., Rachel, R., and Jacob, A. (2012). Rrp5p, Noc1p and Noc2p form a protein module which is part of early large ribosomal subunit precursors in *S. cerevisiae*. *Nucleic acids research* **41**, 1191-1210.
- Hirose, Y., and Ohkuma, Y. (2007). Phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II plays central roles in the integrated events of eucaryotic gene expression. *The Journal of Biochemistry* **141**, 601-608.

- Hirtreiter, A., Grohmann, D., and Werner, F. (2009). Molecular mechanisms of RNA polymerase—the F/E (RPB4/7) complex is required for high processivity in vitro. *Nucleic acids research* 38, 585-596.
- Hodko, D., Ward, T., and Chanfreau, G. (2016). The Rtr1p CTD phosphatase autoregulates its mRNA through a degradation pathway involving the REX exonucleases. *RNA* 22, 559-570.
- Hoffmann, N.A., Jakobi, A.J., Moreno-Morcillo, M., Glatt, S., Kosinski, J., Hagen, W.J., Sachse, C., and Müller, C.W. (2015). Molecular structures of unbound and transcribing RNA polymerase III. *Nature* 528, 231-236.
- Hoffmann, N.A., Jakobi, A.J., Vorländer, M.K., Sachse, C., and Müller, C.W. (2016). Transcribing RNA polymerase III observed by electron cryomicroscopy. *The FEBS journal* 283, 2811-2819.
- Honma, Y., Kitamura, A., Shioda, R., Maruyama, H., Ozaki, K., Oda, Y., Mini, T., Jenö, P., Maki, Y., and Yonezawa, K. (2006). TOR regulates late steps of ribosome maturation in the nucleoplasm via Nog1 in response to nutrients. *The EMBO journal* 25, 3832-3842.
- Houseley, J., and Tollervey, D. (2009). The many pathways of RNA degradation. *Cell* 136, 763-776.
- Hsin, J.-P., Sheth, A., and Manley, J.L. (2011). RNAP II CTD phosphorylated on threonine-4 is required for histone mRNA 3' end processing. *Science* 334, 683-686.
- Hsu, C.L., and Stevens, A. (1993). Yeast cells lacking 5'→3' exoribonuclease 1 contain mRNA species that are poly (A) deficient and partially lack the 5' cap structure. *Molecular and cellular biology* 13, 4826-4835.
- Hsu, P.L., Yang, F., Smith-Kinnaman, W., Yang, W., Song, J.-E., Mosley, A.L., and Varani, G. (2014). Rtr1 is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates Tyr1 and Ser5 on the RNA polymerase II CTD. *Journal of molecular biology* 426, 2970-2981.
- Huang, H., Chen, J., Liu, H., and Sun, X. (2013). The nucleosome regulates the usage of polyadenylation sites in the human genome. *BMC genomics* 14, 912.

- Inai, T., Yukawa, M., and Tsuchiya, E. (2007). Interplay between chromatin and trans-acting factors on the IME2 promoter upon induction of the gene at the onset of meiosis. *Molecular and cellular biology* 27, 1254-1263.
- Ioshikhes, I.P., Albert, I., Zanton, S.J., and Pugh, B.F. (2006). Nucleosome positions predicted through comparative genomics. *Nature genetics* 38, 1210-1215.
- Irani, S., Yogesha, S., Mayfield, J., Zhang, M., Zhang, Y., Matthews, W.L., Nie, G., Prescott, N.A., and Zhang, Y.J. (2016). Structure of *Saccharomyces cerevisiae* Rtr1 reveals an active site for an atypical phosphatase. *Science signaling* 9, ra24-ra24.
- Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M., and Sakaki, Y. (2001). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 4569-4574.
- Jasiak, A.J., Armache, K.-J., Martens, B., Jansen, R.-P., and Cramer, P. (2006). Structural biology of RNA polymerase III: subcomplex C17/25 X-ray structure and 11 subunit enzyme model. *Molecular cell* 23, 71-81.
- Jasnovidova, O., and Stefl, R. (2013). The CTD code of RNA polymerase II: a structural view. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 4, 1-16.
- Jensen, T.H., Dower, K., Libri, D., and Rosbash, M. (2003). Early formation of mRNP: license for export or quality control? *Molecular cell* 11, 1129-1138.
- Jeronimo, C., Forget, D., Bouchard, A., Li, Q., Chua, G., Poitras, C., Thérien, C., Bergeron, D., Bourassa, S., and Greenblatt, J. (2007). Systematic analysis of the protein interaction network for the human transcription machinery reveals the identity of the 7SK capping enzyme. *Molecular cell* 27, 262-274.
- Ji, Z., Luo, W., Li, W., Hoque, M., Pan, Z., Zhao, Y., and Tian, B. (2011). Transcriptional activity regulates alternative cleavage and polyadenylation. *Molecular systems biology* 7, 534.
- Jiao, X., Xiang, S., Oh, C., Martin, C.E., Tong, L., and Kiledjian, M. (2010). Identification of a quality-control mechanism for mRNA 5 [prime]-end capping. *Nature* 467, 608-611.
- Jordán-Pla, A., Gupta, I., de Miguel-Jiménez, L., Steinmetz, L.M., Chávez, S., Pelechano, V., and Pérez-Ortín, J.E. (2014). Chromatin-dependent regulation of RNA polymerases

- II and III activity throughout the transcription cycle. *Nucleic acids research* 43, 787-802.
- Kamada, K., Shu, F., Chen, H., Malik, S., Stelzer, G., Roeder, R.G., Meisterernst, M., and Burley, S.K. (2001). Crystal structure of negative cofactor 2 recognizing the TBP-DNA transcription complex. *Cell* 106, 71-81.
- Keener, J., Josaitis, C.A., Dodd, J.A., and Nomura, M. (1998). Reconstitution of Yeast RNA Polymerase I Transcription in Vitro from Purified Components TATA-BINDING PROTEIN IS NOT REQUIRED FOR BASAL TRANSCRIPTION. *Journal of Biological Chemistry* 273, 33795-33802.
- Kelly, W.G., Dahmus, M.E., and Hart, G.W. (1993). RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc. *Journal of Biological Chemistry* 268, 10416-10424.
- Keogh, M.-C., Podolny, V., and Buratowski, S. (2003). Bur1 kinase is required for efficient transcription elongation by RNA polymerase II. *Molecular and cellular biology* 23, 7005-7018.
- Kettenberger, H., Armache, K.-J., and Cramer, P. (2003). Architecture of the RNA polymerase II-TFIIS complex and implications for mRNA cleavage. *Cell* 114, 347-357.
- Khoudoli, G.A., Gillespie, P.J., Stewart, G., Andersen, J.S., Swedlow, J.R., and Blow, J.J. (2008). Temporal profiling of the chromatin proteome reveals system-wide responses to replication inhibition. *Current Biology* 18, 838-843.
- Kim, D.R., Gidvani, R.D., Ingalls, B.P., Duncker, B.P., and McConkey, B.J. (2011). Differential chromatin proteomics of the MMS-induced DNA damage response in yeast. *Proteome science* 9, 62.
- Kim, H.-D., Choe, J., and Seo, Y.-S. (1999). The *sen1+* gene of *Schizosaccharomyces pombe*, a homologue of budding yeast *SEN1*, encodes an RNA and DNA helicase. *Biochemistry* 38, 14697-14710.
- Kim, M., Suh, H., Cho, E.-J., and Buratowski, S. (2009). Phosphorylation of the yeast Rpb1 C-terminal domain at serines 2, 5, and 7. *Journal of Biological Chemistry* 284, 26421-26426.

- Kimball, S.R. (2001). Regulation of translation initiation by amino acids in eukaryotic cells. In *Signaling Pathways for Translation* (Springer), pp. 155-184.
- Köhler, A., and Hurt, E. (2007). Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nature reviews Molecular cell biology* 8, 761-773.
- Koonin, E.V., Makarova, K.S., and Elkins, J.G. (2007). Orthologs of the small RPB8 subunit of the eukaryotic RNA polymerases are conserved in hyperthermophilic Crenarchaeota and "Korarchaeota". *Biology direct* 2, 38.
- Kornberg, R.D. (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 184, 868-871.
- Kornienko, A.E., Guenzl, P.M., Barlow, D.P., and Pauler, F.M. (2013). Gene regulation by the act of long non-coding RNA transcription. *BMC biology* 11, 59.
- Kostrewa, D., Zeller, M.E., Armache, K.-J., Seizl, M., Leike, K., Thomm, M., and Cramer, P. (2009). RNA polymerase II-TFIIB structure and mechanism of transcription initiation. *Nature* 462, 323-330.
- Kraemer, S.M., Ranallo, R.T., Ogg, R.C., and Stargell, L.A. (2001). TFIIA interacts with TFIID via association with TATA-binding protein and TAF40. *Molecular and cellular biology* 21, 1737-1746.
- Kressler, D., Hurt, E., and Baßler, J. (2010). Driving ribosome assembly. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1803, 673-683.
- Krishnamurthy, S., He, X., Reyes-Reyes, M., Moore, C., and Hampsey, M. (2004). Ssu72 is an RNA polymerase II CTD phosphatase. *Molecular cell* 14, 387-394.
- Krogan, N.J., Kim, M., Ahn, S.H., Zhong, G., Kobor, M.S., Cagney, G., Emili, A., Shilatifard, A., Buratowski, S., and Greenblatt, J.F. (2002). RNA polymerase II elongation factors of *Saccharomyces cerevisiae*: a targeted proteomics approach. *Molecular and cellular biology* 22, 6979-6992.
- Kubota, T., Hiraga, S.-i., Yamada, K., Lamond, A.I., and Donaldson, A.D. (2011). Quantitative proteomic analysis of chromatin reveals that Ctf18 acts in the DNA replication checkpoint. *Molecular & Cellular Proteomics* 10, M110. 005561.

- Kuhn, C.-D., Geiger, S.R., Baumli, S., Gartmann, M., Gerber, J., Jennebach, S., Mielke, T., Tschochner, H., Beckmann, R., and Cramer, P. (2007). Functional architecture of RNA polymerase I. *Cell* **131**, 1260-1272.
- Kuryan, B.G., Kim, J., Tran, N.N.H., Lombardo, S.R., Venkatesh, S., Workman, J.L., and Carey, M. (2012). Histone density is maintained during transcription mediated by the chromatin remodeler RSC and histone chaperone NAP1 in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 1931-1936.
- LaCava, J., Houseley, J., Saveanu, C., Petfalski, E., Thompson, E., Jacquier, A., and Tollervey, D. (2005). RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. *Cell* **121**, 713-724.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature* **227**, 680-685.
- Lahmy, S., Bies-Etheve, N., and Lagrange, T. (2010). Plant-specific multisubunit RNA polymerase in gene silencing. *Epigenetics* **5**, 4-8.
- Lambert, J.-P., Mitchell, L., Rudner, A., Baetz, K., and Figeys, D. (2009). A novel proteomics approach for the discovery of chromatin-associated protein networks. *Molecular & Cellular Proteomics* **8**, 870-882.
- Lambert, J.P., Fillingham, J., Siahbazi, M., Greenblatt, J., Baetz, K., and Figeys, D. (2010). Defining the budding yeast chromatin-associated interactome. *Molecular systems biology* **6**, 448.
- Langer, D., Hain, J., Thuriaux, P., and Zillig, W. (1995). Transcription in archaea: similarity to that in eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**, 5768-5772.
- Laribee, R.N., Shibata, Y., Mersman, D.P., Collins, S.R., Kemmeren, P., Roguev, A., Weissman, J.S., Briggs, S.D., Krogan, N.J., and Strahl, B.D. (2007). CCR4/NOT complex associates with the proteasome and regulates histone methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 5836-5841.
- Lee, J., Moir, R.D., McIntosh, K.B., and Willis, I.M. (2012). TOR signaling regulates ribosome and tRNA synthesis via LAMMER/Clk and GSK-3 family kinases. *Molecular cell* **45**, 836-843.

- Leuther, K.K., Bushnell, D.A., and Kornberg, R.D. (1996). Two-dimensional crystallography of TFIIB–and IIE–RNA polymerase II complexes: implications for start site selection and initiation complex formation. *Cell* 85, 773-779.
- Lewis, J.D., and Izaurfde, E. (1997). The role of the cap structure in RNA processing and nuclear export. *The FEBS Journal* 247, 461-469.
- Li, B., Carey, M., and Workman, J.L. (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell* 128, 707-719.
- Li, T., De Clercq, N., Medina, D.A., Garre, E., Sunnerhagen, P., Perez-Ortin, J.E., and Alepuz, P. (2016). The mRNA cap-binding protein Cbc1 is required for high and timely expression of genes by promoting the accumulation of gene-specific activators at promoters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* 1859, 405-419.
- Liang, C., and Stillman, B. (1997). Persistent initiation of DNA replication and chromatin-bound MCM proteins during the cell cycle in *cdc6* mutants. *Genes & development* 11, 3375-3386.
- Lidschreiber, M., Leike, K., and Cramer, P. (2013). Cap completion and C-terminal repeat domain kinase recruitment underlie the initiation-elongation transition of RNA polymerase II. *Molecular and cellular biology* 33, 3805-3816.
- Lin, S., and Fu, X.-D. (2007). SR proteins and related factors in alternative splicing. *Advances in experimental medicine and biology* 623, 107-122.
- Liu, P., Greenleaf, A.L., and Stiller, J.W. (2008). The essential sequence elements required for RNAP II carboxyl-terminal domain function in yeast and their evolutionary conservation. *Molecular biology and evolution* 25, 719-727.
- Liu, P., Kenney, J.M., Stiller, J.W., and Greenleaf, A.L. (2010a). Genetic organization, length conservation, and evolution of RNA polymerase II carboxyl-terminal domain. *Molecular biology and evolution* 27, 2628-2641.
- Liu, X., Bushnell, D.A., Wang, D., Calero, G., and Kornberg, R.D. (2010b). Structure of an RNA polymerase II–TFIIB complex and the transcription initiation mechanism. *Science* 327, 206-209.

- Liu, Y., Warfield, L., Zhang, C., Luo, J., Allen, J., Lang, W.H., Ranish, J., Shokat, K.M., and Hahn, S. (2009). Phosphorylation of the transcription elongation factor Spt5 by yeast Bur1 kinase stimulates recruitment of the PAF complex. *Molecular and cellular biology* 29, 4852-4863.
- Loewith, R., and Hall, M.N. (2011). Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. *Genetics* 189, 1177-1201.
- Loewith, R., Jacinto, E., Wullschlegel, S., Lorberg, A., Crespo, J.L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P., and Hall, M.N. (2002). Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Molecular cell* 10, 457-468.
- Lomvardas, S., and Thanos, D. (2001). Nucleosome sliding via TBP DNA binding in vivo. *Cell* 106, 685-696.
- Lorch, Y., Maier-Davis, B., and Kornberg, R.D. (2006). Chromatin remodeling by nucleosome disassembly in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 3090-3093.
- Lotan, R., Bar-On, V.G., Harel-Sharvit, L., Duek, L., Melamed, D., and Choder, M. (2005). The RNA polymerase II subunit Rpb4p mediates decay of a specific class of mRNAs. *Genes & development* 19, 3004-3016.
- Lu, K.P., Finn, G., Lee, T.H., and Nicholson, L.K. (2007). Prolyl cis-trans isomerization as a molecular timer. *Nature chemical biology* 3, 619-629.
- Luco, R.F., Allo, M., Schor, I.E., Kornblihtt, A.R., and Misteli, T. (2011). Epigenetics in alternative pre-mRNA splicing. *Cell* 144, 16-26.
- Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251-260.
- Luk, E., Vu, N.-D., Patteson, K., Mizuguchi, G., Wu, W.-H., Ranjan, A., Backus, J., Sen, S., Lewis, M., and Bai, Y. (2007). Chz1, a nuclear chaperone for histone H2AZ. *Molecular cell* 25, 357-368.
- Malagon, F., Tong, A.H., Shafer, B.K., and Strathern, J.N. (2004). Genetic interactions of DST1 in *Saccharomyces cerevisiae* suggest a role of TFIIS in the initiation-elongation transition. *Genetics* 166, 1215-1227.

- Mandel, C.R., Bai, Y., and Tong, L. (2008). Protein factors in pre-mRNA 3'-end processing. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65, 1099-1122.
- Maniatis, T., and Reed, R. (2002). An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* 416, 499-506.
- Marshall, N.F., and Price, D.H. (1992). Control of formation of two distinct classes of RNA polymerase II elongation complexes. *Molecular and cellular biology* 12, 2078-2090.
- Martínez-Fernández, V., Garrido-Godino, A.I., Mirón-García, M.C., Begley, V., Fernández-Pévida, A., de la Cruz, J., Chávez, S., and Navarro, F. (2018). 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* 1861, 1-13.
- Martínez-Fernández, V., Garrido-Godino, A.I., Cuevas-Bermudez, A., and Navarro, F. (2017). The yeast prefoldin Bud27. *Springer Nature*.
- Martinez-Rucobo, F.W., Kohler, R., van de Waterbeemd, M., Heck, A.J., Hemann, M., Herzog, F., Stark, H., and Cramer, P. (2015). Molecular basis of transcription-coupled pre-mRNA capping. *Molecular cell* 58, 1079-1089.
- Martinez-Rucobo, F.W., Sainsbury, S., Cheung, A.C., and Cramer, P. (2011). Architecture of the RNA polymerase-Spt4/5 complex and basis of universal transcription processivity. *The EMBO journal* 30, 1302-1310.
- Mason, P.B., and Struhl, K. (2005). Distinction and relationship between elongation rate and processivity of RNA polymerase II in vivo. *Molecular cell* 17, 831-840.
- Mayer, C., and Grummt, I. (2006). Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases. *Oncogene* 25, 6384.
- McCracken, S., Fong, N., Yankulov, K., Ballantyne, S., Pan, G., Greenblatt, J., Patterson, S.D., Wickens, M., and Bentley, D.L. (1997). The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature* 385, 357.
- Meinhart, A., Kamenski, T., Hoepfner, S., Baumli, S., and Cramer, P. (2005). A structural perspective of CTD function. *Genes & development* 19, 1401-1415.
- Metz, B., Kersten, G.F., Hoogerhout, P., Brugghe, H.F., Timmermans, H.A., De Jong, A., Meiring, H., ten Hove, J., Hennink, W.E., and Crommelin, D.J. (2004). Identification

- of formaldehyde-induced modifications in proteins reactions with model peptides. *Journal of Biological Chemistry* 279, 6235-6243.
- Milkereit, P., Schultz, P., and Tschochner, H. (1997). Resolution of RNA Polymerase I into Dimers and Monomers and Their Function in Transcription. *Biological chemistry* 378, 1433-1444.
- Milkereit, P., and Tschochner, H. (1998). A specialized form of RNA polymerase I, essential for initiation and growth-dependent regulation of rRNA synthesis, is disrupted during transcription. *The EMBO journal* 17, 3692-3703.
- Millán-Zambrano, G., and Chávez, S. (2014). Nuclear functions of prefoldin. *Open biology* 4, 140085.
- Millán-Zambrano, G., Rodríguez-Gil, A., Peñate, X., de Miguel-Jiménez, L., Morillo-Huesca, M., Krogan, N., and Chávez, S. (2013). The prefoldin complex regulates chromatin dynamics during transcription elongation. *PLoS Genet* 9, e1003776.
- Miller, J.E., and Reese, J.C. (2012). Ccr4-Not complex: the control freak of eukaryotic cells. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 47, 315-333.
- Millevoi, S., and Vagner, S. (2009). Molecular mechanisms of eukaryotic pre-mRNA 3' end processing regulation. *Nucleic acids research* 38, 2757-2774.
- Minaker, S.W., Filiatrault, M.C., Ben-Aroya, S., Hieter, P., and Stirling, P.C. (2013). Biogenesis of RNA polymerases II and III requires the conserved GPN small GTPases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 193, 853-864.
- Minakhin, L., Bhagat, S., Brunning, A., Campbell, E.A., Darst, S.A., Ebright, R.H., and Severinov, K. (2001). Bacterial RNA polymerase subunit ω and eukaryotic RNA polymerase subunit RPB6 are sequence, structural, and functional homologs and promote RNA polymerase assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 892-897.
- Mirón-García, M.C., Garrido-Godino, A.I., García-Molinero, V., Hernández-Torres, F., Rodríguez-Navarro, S., and Navarro, F. (2013). The prefoldin bud27 mediates the assembly of the eukaryotic RNA polymerases in an rpb5-dependent manner. *PLoS Genet* 9, e1003297.

- 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., and Navarro, F. (2014). The yeast prefoldin-like URI-orthologue Bud27 associates with the RSC nucleosome remodeler and modulates transcription. *Nucleic acids research*, gku685.
- Misteli, T. (2001). Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression. *Science* 291, 843-847.
- Mita, P., Savas, J.N., Djouder, N., Yates, J.R., Ha, S., Ruoff, R., Schafler, E.D., Nwachukwu, J.C., Tanese, N., and Cowan, N.J. (2011). Regulation of androgen receptor-mediated transcription by RPB5 binding protein URI/RMP. *Molecular and cellular biology* 31, 3639-3652.
- Mita, P., Savas, J.N., Ha, S., Djouder, N., Yates III, J.R., and Logan, S.K. (2013). Analysis of URI nuclear interaction with RPB5 and components of the R2TP/prefoldin-like complex. *PLoS One* 8, e63879.
- Mockli, N., Deplazes, A., Hassa, P.O., Zhang, Z., Peter, M., Hottiger, M.O., Stagljar, I., and Auerbach, D. (2007). Yeast split-ubiquitin-based cytosolic screening system to detect interactions between transcriptionally active proteins. *Biotechniques* 42, 725.
- Moir, R.D., and Willis, I.M. (2013). Regulation of pol III transcription by nutrient and stress signaling pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* 1829, 361-375.
- Monteiro, P.T., Mendes, N.D., Teixeira, M.C., d'Orey, S., Tenreiro, S., Mira, N.P., Pais, H., Francisco, A.P., Carvalho, A.M., and Lourenco, A.B. (2007). YEASTRACT-DISCOVERER: new tools to improve the analysis of transcriptional regulatory associations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic acids research* 36, D132-D136.
- Moore, M.J., and Proudfoot, N.J. (2009). Pre-mRNA processing reaches back tottranscription and ahead to translation. *Cell* 136, 688-700.
- Morin, P.E., Awrey, D.E., Edwards, A.M., and Arrowsmith, C.H. (1996). Elongation factor TFIIS contains three structural domains: solution structure of domain II. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 10604-10608.

- Mosley, A.L., Hunter, G.O., Sardi, M.E., Smolle, M., Workman, J.L., Florens, L., and Washburn, M.P. (2013). Quantitative proteomics demonstrates that the RNA polymerase II subunits Rpb4 and Rpb7 dissociate during transcriptional elongation. *Molecular & Cellular Proteomics* 12, 1530-1538.
- Mosley, A.L., Pattenden, S.G., Carey, M., Venkatesh, S., Gilmore, J.M., Florens, L., Workman, J.L., and Washburn, M.P. (2009). Rtr1 is a CTD phosphatase that regulates RNA polymerase II during the transition from serine 5 to serine 2 phosphorylation. *Molecular cell* 34, 168-178.
- Mueller, C.L., Porter, S.E., Hoffman, M.G., and Jaehning, J.A. (2004). The Paf1 complex has functions independent of actively transcribing RNA polymerase II. *Molecular cell* 14, 447-456.
- Muhlrad, D., Decker, C.J., and Parker, R. (1994). Deadenylation of the unstable mRNA encoded by the yeast MFA2 gene leads to decapping followed by 5'--> 3'digestion of the transcript. *Genes & development* 8, 855-866.
- Muhlrad, D., and Parker, R. (1992). Mutations affecting stability and deadenylation of the yeast MFA2 transcript. *Genes & Development* 6, 2100-2111.
- Muhlrad, D., and Parker, R. (2005). The yeast EDC1 mRNA undergoes deadenylation-independent decapping stimulated by Not2p, Not4p, and Not5p. *The EMBO journal* 24, 1033-1045.
- Muñoz-Galván, S., Jimeno, S., Rothstein, R., and Aguilera, A. (2013). Histone H3K56 acetylation, Rad52, and non-DNA repair factors control double-strand break repair choice with the sister chromatid. *PLoS genetics* 9, e1003237.
- Muñoz, M.J., de la Mata, M., and Kornblihtt, A.R. (2010). The carboxy terminal domain of RNA polymerase II and alternative splicing. *Trends in biochemical sciences* 35, 497-504.
- Naji, S., Grünberg, S., and Thomm, M. (2007). The RPB7 orthologue E' is required for transcriptional activity of a reconstituted archaeal core enzyme at low temperatures and stimulates open complex formation. *Journal of Biological Chemistry* 282, 11047-11057.

- Nakanishi, T., Nakano, A., Nomura, K., Sekimizu, K., and Natori, S. (1992). Purification, gene cloning, and gene disruption of the transcription elongation factor S-II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 267, 13200-13204.
- Nandagopal, N., and Roux, P.P. (2015). Regulation of global and specific mRNA translation by the mTOR signaling pathway. *Translation* 3, e983402.
- Natarajan, K., Meyer, M.R., Jackson, B.M., Slade, D., Roberts, C., Hinnebusch, A.G., and Marton, M.J. (2001). Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Molecular and cellular biology* 21, 4347-4368.
- Nechaev, S., and Adelman, K. (2011). Pol II waiting in the starting gates: Regulating the transition from transcription initiation into productive elongation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* 1809, 34-45.
- Neyer, S., Kunz, M., Geiss, C., Hantsche, M., Hodiřnau, V.-V., Seybert, A., Engel, C., Scheffer, M.P., Cramer, P., and Frangakis, A.S. (2016). Structure of RNA polymerase I transcribing ribosomal DNA genes. *Nature* 540, 607.
- Nordick, K., Hoffman, M.G., Betz, J.L., and Jaehning, J.A. (2008). Direct interactions between the Paf1 complex and a cleavage and polyadenylation factor are revealed by dissociation of Paf1 from RNA polymerase II. *Eukaryotic cell* 7, 1158-1167.
- Obri, A., Ouarrhni, K., Papin, C., Diebold, M.-L., Padmanabhan, K., Marek, M., Stoll, I., Roy, L., Reilly, P.T., and Mak, T.W. (2014). ANP32E is a histone chaperone that removes H2A. Z from chromatin. *Nature* 505, 648-653.
- Oesterreich, F.C., Preibisch, S., and Neugebauer, K.M. (2010). Global analysis of nascent RNA reveals transcriptional pausing in terminal exons. *Molecular cell* 40, 571-581.
- Ouhammouch, M., Werner, F., Weinzierl, R.O., and Geiduschek, E.P. (2004). A fully recombinant system for activator-dependent archaeal transcription. *Journal of Biological Chemistry* 279, 51719-51721.
- Owen-Hughes, T., and Workman, J.L. (1996). Remodeling the chromatin structure of a nucleosome array by transcription factor-targeted trans-displacement of histones. *The EMBO journal* 15, 4702.

- Ozsolak, F., Kapranov, P., Foissac, S., Kim, S.W., Fishilevich, E., Monaghan, A.P., John, B., and Milos, P.M. (2010). Comprehensive polyadenylation site maps in yeast and human reveal pervasive alternative polyadenylation. *Cell* **143**, 1018-1029.
- Pan, Q., Shai, O., Lee, L.J., Frey, B.J., and Blencowe, B.J. (2008). Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nature genetics* **40**, 1413.
- Parker, R. (2012). RNA degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **191**, 671-702.
- Parnell, T.J., Huff, J.T., and Cairns, B.R. (2008). RSC regulates nucleosome positioning at Pol II genes and density at Pol III genes. *The EMBO journal* **27**, 100-110.
- Peiro-Chova, L., and Estruch, F. (2007). Specific defects in different transcription complexes compensate for the requirement of the negative cofactor 2 repressor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **176**, 125-138.
- Pelechano, V., Wei, W., and Steinmetz, L.M. (2013). Extensive transcriptional heterogeneity revealed by isoform profiling. *Nature* **497**, 127.
- Penheiter, K.L., Washburn, T.M., Porter, S.E., Hoffman, M.G., and Jaehning, J.A. (2005). A posttranscriptional role for the yeast Paf1-RNA polymerase II complex is revealed by identification of primary targets. *Molecular cell* **20**, 213-223.
- Pereira, L.A., Van Der Knaap, J.A., van den Boom, V., van den Heuvel, F.A., and Timmers, H.M. (2001). TAFII170 interacts with the concave surface of TATA-binding protein to inhibit its DNA binding activity. *Molecular and cellular biology* **21**, 7523-7534.
- Petruk, S., Sedkov, Y., Johnston, D.M., Hodgson, J.W., Black, K.L., Kovermann, S.K., Beck, S., Canaani, E., Brock, H.W., and Mazo, A. (2012). TrxG and PcG proteins but not methylated histones remain associated with DNA through replication. *Cell* **150**, 922-933.
- Peyroche, G., Milkereit, P., Bischler, N., Tschochner, H., Schultz, P., Sentenac, A., Carles, C., and Riva, M. (2000). The recruitment of RNA polymerase I on rDNA is mediated by the interaction of the A43 subunit with Rrn3. *The EMBO journal* **19**, 5473-5482.
- Phatnani, H.P., and Greenleaf, A.L. (2006). Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. *Genes & development* **20**, 2922-2936.

- Plant, K.E., Dye, M.J., Lafaille, C., and Proudfoot, N.J. (2005). Strong polyadenylation and weak pausing combine to cause efficient termination of transcription in the human *Gy-globin* gene. *Molecular and cellular biology* 25, 3276-3285.
- Powers, T., and Walter, P. (1999). Regulation of ribosome biogenesis by the rapamycin-sensitive TOR-signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell* 10, 987-1000.
- Proudfoot, N.J., Furger, A., and Dye, M.J. (2002). Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* 108, 501-512.
- Qiu, H., Hu, C., and Hinnebusch, A.G. (2009). Phosphorylation of the Pol II CTD by KIN28 enhances BUR1/BUR2 recruitment and Ser2 CTD phosphorylation near promoters. *Molecular cell* 33, 752-762.
- Ranuncolo, S.M., Ghosh, S., Hanover, J.A., Hart, G.W., and Lewis, B.A. (2012). Evidence of the involvement of O-GlcNAc-modified human RNA polymerase II CTD in transcription in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 287, 23549-23561.
- Reese, J.C. (2013). The control of elongation by the yeast Ccr4–Not complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* 1829, 127-133.
- Reinke, A., Anderson, S., McCaffery, J.M., Yates, J., Aronova, S., Chu, S., Fairclough, S., Iverson, C., Wedaman, K.P., and Powers, T. (2004). TOR complex 1 includes a novel component, Tco89p (YPL180w), and cooperates with Ssd1p to maintain cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 279, 14752-14762.
- Robinson, J.T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E.S., Getz, G., and Mesirov, J.P. (2011). Integrative genomics viewer. *Nature biotechnology* 29, 24-26.
- Robledo, S., Idol, R.A., Crimmins, D.L., Ladenson, J.H., Mason, P.J., and Bessler, M. (2008). The role of human ribosomal proteins in the maturation of rRNA and ribosome production. *Rna* 14, 1918-1929.
- Rohde, J., Heitman, J., and Cardenas, M.E. (2001). The TOR kinases link nutrient sensing to cell growth. *Journal of Biological Chemistry* 276, 9583-9586.

- Rosado-Lugo, J.D., and Hampsey, M. (2014). The Ssu72 phosphatase mediates the RNA polymerase II initiation-elongation transition. *Journal of Biological Chemistry* 289, 33916-33926.
- Rosonina, E., and Manley, J.L. (2005). From transcription to mRNA: PAF provides a new path. *Molecular cell* 20, 167-168.
- Rozenblatt-Rosen, O., Hughes, C.M., Nannepaga, S.J., Shanmugam, K.S., Copeland, T.D., Guszczynski, T., Resau, J.H., and Meyerson, M. (2005). The parafibromin tumor suppressor protein is part of a human Paf1 complex. *Molecular and cellular biology* 25, 612-620.
- Russell, J., and Zomerdijs, J.C. (2006). The RNA polymerase I transcription machinery. In *Biochemical Society Symposia* (Portland Press Limited), pp. 203-216.
- Saha, A., Wittmeyer, J., and Cairns, B.R. (2005). Chromatin remodeling through directional DNA translocation from an internal nucleosomal site. *Nature structural & molecular biology* 12, 747-755.
- Schluesche, P., Stelzer, G., Piaia, E., Lamb, D.C., and Meisterernst, M. (2007). NC2 mobilizes TBP on core promoter TATA boxes. *Nature structural & molecular biology* 14, 1196-1201.
- Schmid, M., Poulsen, M.B., Olszewski, P., Pelechano, V., Saguez, C., Gupta, I., Steinmetz, L.M., Moore, C., and Jensen, T.H. (2012). Rrp6p controls mRNA poly (A) tail length and its decoration with poly (A) binding proteins. *Molecular cell* 47, 267-280.
- Schwer, B., Mao, X., and Shuman, S. (1998). Accelerated mRNA decay in conditional mutants of yeast mRNA capping enzyme. *Nucleic acids research* 26, 2050-2057.
- Schwer, B., and Shuman, S. (1996). Conditional inactivation of mRNA capping enzyme affects yeast pre-mRNA splicing in vivo. *Rna* 2, 574.
- Segal, E., Fondufe-Mittendorf, Y., Chen, L., Thåström, A., Field, Y., Moore, I.K., Wang, J.-P.Z., and Widom, J. (2006). A genomic code for nucleosome positioning. *Nature* 442, 772-778.
- Selitrennik, M., Duek, L., Lotan, R., and Choder, M. (2006). Nucleocytoplasmic shuttling of the Rpb4p and Rpb7p subunits of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase II by two pathways. *Eukaryotic cell* 5, 2092-2103.

- Sermwittayawong, D., and Tan, S. (2006). SAGA binds TBP via its Spt8 subunit in competition with DNA: implications for TBP recruitment. *The EMBO journal* 25, 3791-3800.
- Shalem, O., Groisman, B., Choder, M., Dahan, O., and Pilpel, Y. (2011). Transcriptome kinetics is governed by a genome-wide coupling of mRNA production and degradation: a role for RNA Pol II. *PLoS Genet* 7, e1002273.
- Shandilya, J., and Roberts, S.G. (2012). The transcription cycle in eukaryotes: from productive initiation to RNA polymerase II recycling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* 1819, 391-400.
- Sheth, U., and Parker, R. (2003). Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* 300, 805-808.
- Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J.-M., Pazin, M.J., Davie, J.R., and Peterson, C.L. (2006). Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* 311, 844-847.
- Siaut, M., Zaros, C., Levivier, E., Ferri, M.-L., Werner, M., Callebaut, I., Thuriaux, P., Sentenac, A., and Conesa, C. (2003). An Rpb4/Rpb7-like complex in yeast RNA polymerase III contains the orthologue of mammalian CGRP-RCP. *Molecular and cellular biology* 23, 195-205.
- Siegers, K., Waldmann, T., Leroux, M.R., Grein, K., Shevchenko, A., Schiebel, E., and Hartl, F.U. (1999). Compartmentation of protein folding in vivo: sequestration of non-native polypeptide by the chaperonin-GimC system. *The EMBO journal* 18, 75-84.
- Sikorski, T.W., and Buratowski, S. (2009). The basal initiation machinery: beyond the general transcription factors. *Current opinion in cell biology* 21, 344-351.
- Simic, R., Lindstrom, D.L., Tran, H.G., Roinick, K.L., Costa, P.J., Johnson, A.D., Hartzog, G.A., and Arndt, K.M. (2003). Chromatin remodeling protein Chd1 interacts with transcription elongation factors and localizes to transcribed genes. *The EMBO journal* 22, 1846-1856.
- Sims, R.J., Rojas, L.A., Beck, D., Bonasio, R., Schüller, R., Drury, W.J., Eick, D., and Reinberg, D. (2011). The C-terminal domain of RNA polymerase II is modified by site-specific methylation. *Science* 332, 99-103.

- Smith-Kinnaman, W.R., Berna, M.J., Hunter, G.O., True, J.D., Hsu, P., Cabello, G.I., Fox, M.J., Varani, G., and Mosley, A.L. (2014). The interactome of the atypical phosphatase Rtr1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular bioSystems* 10, 1730-1741.
- Smolle, M., and Workman, J.L. (2013). Transcription-associated histone modifications and cryptic transcription. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* 1829, 84-97.
- Sonenberg, N., and Hinnebusch, A.G. (2009). Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136, 731-745.
- Soutourina, J., Bordas-Le Floch, V., Gendrel, G., Flores, A., Ducrot, C., Dumay-Odelot, H., Soularue, P., Navarro, F., Cairns, B.R., and Lefebvre, O. (2006). Rsc4 connects the chromatin remodeler RSC to RNA polymerases. *Molecular and Cellular Biology* 26, 4920-4933.
- Spain, M.M., Ansari, S.A., Pathak, R., Palumbo, M.J., Morse, R.H., and Govind, C.K. (2014). The RSC complex localizes to coding sequences to regulate Pol II and histone occupancy. *Molecular cell* 56, 653-666.
- Sprouse, R.O., Brenowitz, M., and Auble, D.T. (2006). Snf2/Swi2-related ATPase Mot1 drives displacement of TATA-binding protein by gripping DNA. *The EMBO journal* 25, 1492-1504.
- Squazzo, S.L., Costa, P.J., Lindstrom, D.L., Kumer, K.E., Simic, R., Jennings, J.L., Link, A.J., Arndt, K.M., and Hartzog, G.A. (2002). The Paf1 complex physically and functionally associates with transcription elongation factors in vivo. *The EMBO journal* 21, 1764-1774.
- Steiger, M., Carr-Schmid, A., Schwartz, D.C., Kiledjian, M., and Parker, R. (2003). Analysis of recombinant yeast decapping enzyme. *Rna* 9, 231-238.
- Steinmetz, E.J., and Brow, D.A. (1996). Repression of gene expression by an exogenous sequence element acting in concert with a heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-like protein, Nrd1, and the putative helicase Sen1. *Molecular and cellular biology* 16, 6993-7003.

- Steinmetz, E.J., and Brow, D.A. (2003). Ssu72 protein mediates both poly (A)-coupled and poly (A)-independent termination of RNA polymerase II transcription. *Molecular and cellular biology* 23, 6339-6349.
- Steinmetz, E.J., Conrad, N.K., Brow, D.A., and Corden, J.L. (2001). RNA-binding protein Nrd1 directs poly (A)-independent 3'-end formation of RNA polymerase II transcripts. *Nature* 413, 327-331.
- Steinmetz, E.J., Warren, C.L., Kuehner, J.N., Panbehi, B., Ansari, A.Z., and Brow, D.A. (2006). Genome-wide distribution of yeast RNA polymerase II and its control by Sen1 helicase. *Molecular cell* 24, 735-746.
- Stewart, M. (2010). Nuclear export of mRNA. *Trends in biochemical sciences* 35, 609-617.
- Strambio-De-Castillia, C., Niepel, M., and Rout, M.P. (2010). The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. *Nature reviews Molecular cell biology* 11, 490-501.
- Sträßer, K., Masuda, S., Mason, P., Pfannstiel, J., Oppizzi, M., Rodriguez-Navarro, S., Rondón, A.G., Aguilera, A., Struhl, K., and Reed, R. (2002). TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature* 417, 304-308.
- Sudarsanam, P., and Winston, F. (2000). The Swi/Snf family: nucleosome-remodeling complexes and transcriptional control. *TRENDS in Genetics* 16, 345-351.
- Suh, M.-H., Meyer, P.A., Gu, M., Ye, P., Zhang, M., Kaplan, C.D., Lima, C.D., and Fu, J. (2010). A dual interface determines the recognition of RNA polymerase II by RNA capping enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 285, 34027-34038.
- Sun, M., Schwalb, B., Pirkel, N., Maier, K.C., Schenk, A., Failmezger, H., Tresch, A., and Cramer, P. (2013). Global analysis of eukaryotic mRNA degradation reveals Xrn1-dependent buffering of transcript levels. *Molecular cell* 52, 52-62.
- Svejstrup, J.Q., Li, Y., Fellows, J., Gnatt, A., Bjorklund, S., and Kornberg, R.D. (1997). Evidence for a mediator cycle at the initiation of transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 6075-6078.
- Swaminathan, V., Kishore, A.H., Febitha, K., and Kundu, T.K. (2005). Human histone chaperone nucleophosmin enhances acetylation-dependent chromatin transcription. *Molecular and Cellular Biology* 25, 7534-7545.

- Swisher, K.D., and Parker, R. (2010). Localization to, and effects of Pbp1, Pbp4, Lsm12, Dhh1, and Pab1 on stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS one* 5, e10006.
- Szklarczyk, D., Morris, J.H., Cook, H., Kuhn, M., Wyder, S., Simonovic, M., Santos, A., Doncheva, N.T., Roth, A., and Bork, P. (2016). The STRING database in 2017: quality-controlled protein–protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic acids research*, gkw937.
- Tafur, L., Sadian, Y., Hoffmann, N.A., Jakobi, A.J., Wetzel, R., Hagen, W.J., Sachse, C., and Müller, C.W. (2016). Molecular structures of transcribing RNA polymerase I. *Molecular cell* 64, 1135-1143.
- Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G., and Nakatani, Y. (2004). Histone H3. 1 and H3. 3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* 116, 51-61.
- Tan, F., Li, G., Chitteti, B.R., and Peng, Z. (2007). Proteome and phosphoproteome analysis of chromatin associated proteins in rice (*Oryza sativa*). *Proteomics* 7, 4511-4527.
- Tharun, S. (2009). Lsm1-7-Pat1 complex: A link between 3' and 5'-ends in mRNA decay? *RNA biology* 6, 228-232.
- Thomas, M.C., and Chiang, C.-M. (2006). The general transcription machinery and general cofactors. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 41, 105-178.
- Thore, S., Mauxion, F., Seraphin, B., and Suck, D. (2003). X-ray structure and activity of the yeast Pop2 protein: a nuclease subunit of the mRNA deadenylase complex. *EMBO reports* 4, 1150-1155.
- Thorvaldsdóttir, H., Robinson, J.T., and Mesirov, J.P. (2013). Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in bioinformatics* 14, 178-192.
- Tian, B., and Graber, J.H. (2012). Signals for pre-mRNA cleavage and polyadenylation. *Wiley interdisciplinary reviews: RNA* 3, 385-396.
- Tian, B., Hu, J., Zhang, H., and Lutz, C.S. (2005). A large-scale analysis of mRNA polyadenylation of human and mouse genes. *Nucleic acids research* 33, 201-212.

- Torreira, E., Louro, J.A., Pazos, I., Gonzalez-Polo, N., Gil-Carton, D., Duran, A.G., Tosi, S., Gallego, O., Calvo, O., and Fernández-Tornero, C. (2017). The dynamic assembly of distinct RNA polymerase I complexes modulates rDNA transcription. *Elife* 6.
- Tucker, M., Staples, R.R., Valencia-Sanchez, M.A., Muhlrads, D., and Parker, R. (2002). Ccr4p is the catalytic subunit of a Ccr4p/Pop2p/Notp mRNA deadenylase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal* 21, 1427-1436.
- Turner, R.E., Pattison, A.D., and Beilharz, T.H. (2017). Alternative polyadenylation in the regulation and dysregulation of gene expression. In *Seminars in cell & developmental biology*.
- Ursic, D., Chinchilla, K., Finkel, J.S., and Culbertson, M.R. (2004). Multiple protein/protein and protein/RNA interactions suggest roles for yeast DNA/RNA helicase Sen1p in transcription, transcription-coupled DNA repair and RNA processing. *Nucleic acids research* 32, 2441-2452.
- Valenzuela, L., Aranda, C., and González, A. (2001). TOR modulates GCN4-dependent expression of genes turned on by nitrogen limitation. *Journal of bacteriology* 183, 2331-2334.
- Van Dijk, E., Chen, C., d'Aubenton-Carafa, Y., Gourvennec, S., Kwapisz, M., Roche, V., Bertrand, C., Silvain, M., Legoix-Né, P., and Loeillet, S. (2011). XUTs are a class of Xrn1-sensitive antisense regulatory non-coding RNA in yeast. *Nature* 475, 114-117.
- Van Hoide, K., Sahasrabudhe, C.G., and Shaw, B.R. (1974). A model for particulate structure in chromatin. *Nucleic Acids Research* 1, 1579-1586.
- Venkatesh, S., and Workman, J.L. (2015). Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. *Nature reviews Molecular cell biology* 16, 178-189.
- Venters, B.J., and Pugh, B.F. (2009). How eukaryotic genes are transcribed. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 44, 117-141.
- Vernekar, D.V., and Bhargava, P. (2015). 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* 1849, 1340-1353.
- Vinciguerra, P., and Stutz, F. (2004). mRNA export: an assembly line from genes to nuclear pores. *Current opinion in cell biology* 16, 285-292.

- Wang, W., Carey, M., and Gralla, J.D. (1992). Polymerase II promoter activation: closed complex formation and ATP-driven start site opening. *Science* 255, 450-453.
- Wang, Y., Zhang, X., Zhang, H., Lu, Y., Huang, H., Dong, X., Chen, J., Dong, J., Yang, X., and Hang, H. (2012). Coiled-coil networking shapes cell molecular machinery. *Molecular biology of the cell* 23, 3911-3922.
- Wani, S., Hirose, Y., and Ohkuma, Y. (2014). Human RNA polymerase II-associated protein 2 (RPAP2) interacts directly with the RNA polymerase II subunit Rpb6 and participates in pre-mRNA 3'-end formation. *Drug discoveries & therapeutics* 8, 255-261.
- Warner, J.R. (1999). The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends in biochemical sciences* 24, 437-440.
- Wedaman, K.P., Reinke, A., Anderson, S., Yates, J., McCaffery, J.M., and Powers, T. (2003). Tor kinases are in distinct membrane-associated protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell* 14, 1204-1220.
- Wenxiang, W., Gu, J.X., Zhu, C.Q., Sun, F.Y., Dorjsuren, D., Yong, L., and Murakami, S. (2003). Interaction with general transcription factor IIF (TFIIF) is required for the suppression of activated transcription by RPB5-mediating protein (RMP). *Cell research* 13, 111.
- Werner, F. (2008). Structural evolution of multisubunit RNA polymerases. *Trends in microbiology* 16, 247-250.
- Werner, F., and Grohmann, D. (2011). Evolution of multisubunit RNA polymerases in the three domains of life. *Nature Reviews Microbiology* 9, 85-98.
- Werner, M., Thuriaux, P., and Soutourina, J. (2009). Structure–function analysis of RNA polymerases I and III. *Current opinion in structural biology* 19, 740-745.
- Westover, K.D., Bushnell, D.A., and Kornberg, R.D. (2004). Structural basis of transcription: separation of RNA from DNA by RNA polymerase II. *Science* 303, 1014-1016.
- Wierzbicki, A.T. (2012). The role of long non-coding RNA in transcriptional gene silencing. *Current opinion in plant biology* 15, 517-522.
- Wild, T., and Cramer, P. (2012). Biogenesis of multisubunit RNA polymerases. *Trends in biochemical sciences* 37, 99-105.

- Wilkening, S., Pelechano, V., Järvelin, A.I., Tekkedil, M.M., Anders, S., Benes, V., and Steinmetz, L.M. (2013). An efficient method for genome-wide polyadenylation site mapping and RNA quantification. *Nucleic acids research* 41, e65-e65.
- Williams, S.K., Truong, D., and Tyler, J.K. (2008). Acetylation in the globular core of histone H3 on lysine-56 promotes chromatin disassembly during transcriptional activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 9000-9005.
- Wippo, C.J., Israel, L., Watanabe, S., Hochheimer, A., Peterson, C.L., and Korber, P. (2011). The RSC chromatin remodelling enzyme has a unique role in directing the accurate positioning of nucleosomes. *The EMBO journal* 30, 1277-1288.
- Woychik, N., Liao, S., Kolodziej, P., and Young, R. (1990). Subunits shared by eukaryotic nuclear RNA polymerases. *Genes & development* 4, 313-323.
- Wullschleger, S., Loewith, R., and Hall, M.N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124, 471-484.
- Xiang, K., Manley, J.L., and Tong, L. (2012). The yeast regulator of transcription protein Rtr1 lacks an active site and phosphatase activity. *Nature communications* 3, 946.
- Xiang, K., Nagaike, T., Xiang, S., Kilic, T., Beh, M.M., Manley, J.L., and Tong, L. (2010). Crystal structure of the human symplekin-Ssu72-CTD phosphopeptide complex. *Nature* 467, 729-733.
- Xu, Z., Wei, W., Gagneur, J., Perocchi, F., Clauder-Münster, S., Camblong, J., Guffanti, E., Stutz, F., Huber, W., and Steinmetz, L.M. (2009). Bidirectional promoters generate pervasive transcription in yeast. *Nature* 457, 1033-1037.
- Yamamoto, R.T., Nogi, Y., Dodd, J., and Nomura, M. (1996). *RRN3* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an essential RNA polymerase I transcription factor which interacts with the polymerase independently of DNA template. *The EMBO journal* 15, 3964-3973.
- Yoon, J.-H., Choi, E.-J., and Parker, R. (2010). Dcp2 phosphorylation by Ste20 modulates stress granule assembly and mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology* 189, 813-827.

- Yuan, G.-C., Liu, Y.-J., Dion, M.F., Slack, M.D., Wu, L.F., Altschuler, S.J., and Rando, O.J. (2005). Genome-scale identification of nucleosome positions in *S. cerevisiae*. *Science* 309, 626-630.
- Zaros, C., and Thuriaux, P. (2005). Rpc25, a conserved RNA polymerase III subunit, is critical for transcription initiation. *Molecular microbiology* 55, 104-114.
- Zaros, L.G., Bricarello, P.A., Amarante, A.F.T., and Coutinho, L.L. (2007). Quantification of bovine cytokine gene expression using real-time RT-PCR methodology. *Genetics and Molecular Biology* 30, 575-579.
- Zenklusen, D., Vinciguerra, P., Wyss, J.-C., and Stutz, F. (2002). Stable mRNP formation and export require cotranscriptional recruitment of the mRNA export factors Yra1p and Sub2p by Hpr1p. *Molecular and cellular biology* 22, 8241-8253.
- Zhang, D.W., Mosley, A.L., Ramisetty, S.R., Rodríguez-Molina, J.B., Washburn, M.P., and Ansari, A.Z. (2012). Ssu72 phosphatase-dependent erasure of phospho-Ser7 marks on the RNA polymerase II C-terminal domain is essential for viability and transcription termination. *Journal of Biological Chemistry* 287, 8541-8551.
- Zhang, G., Campbell, E.A., Minakhin, L., Richter, C., Severinov, K., and Darst, S.A. (1999). Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell* 98, 811-824.
- Zhang, X., Virtanen, A., and Kleiman, F.E. (2010). To polyadenylate or to deadenylate: that is the question. *Cell Cycle* 9, 4437-4449.
- Zheng, D., Ezzeddine, N., Chen, C.-Y.A., Zhu, W., He, X., and Shyu, A.-B. (2008). Deadenylation is prerequisite for P-body formation and mRNA decay in mammalian cells. *J Cell Biol* 182, 89-101.

Anexos

AATCGCAGT GATCGATT AGCTAGT GACGCTA AATCGCAGT GATCGATT AGCTAGT GACGCTA
ACCRACCTC GTGAGCACTT CACGAGT GCTCARCC CCRACCTC GTGAGCACTT CACGAGT GCTCARCC

CURRÍCULUM VITAE**DATOS PERSONALES:**

Apellidos y nombre: Cuevas Bermúdez, Abel

DNI: 47818462-J

Dirección: C/ Río nº 12 C.P:23280 Beas de Segura (Jaén)

Fecha de nacimiento: 17 de Septiembre de 1991

Correo electrónico: acuevas@ujaen.es

FORMACIÓN ACADÉMICA:

Doctorado en Biología Molecular y Celular R.D: 99/2011.

Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Jaén
Actualidad

Máster en Biotecnología y Biomedicina-

Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Jaén
Septiembre de 2012

Graduado en Biología

Universidad de Jaén
Julio de 2013

OTRAS ACTIVIDADES DE CARÁCTER CIENTÍFICO O PROFESIONAL

Posición: Beneficiario de becas para estancias breves doctorales en el extranjero, ligado a la beca FPI (MINECO)

Institución. Grupo del Dr. Vicent Pelechano. En el Karolinska Institute, Departamento de Microbiología, Tumor y Biología celular. (Solna, Estocolmo (Suecia)).

Fecha: Desde el 17 de Mayo de 2017 hasta el 16 de Agosto de 2017.

PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN FINANCIADOS

Proyecto: B

Organismo financiador: Grupo

Código según financiadora:

Fecha:

PUBLICACIONES**Artículos**

Título: The yeast prefoldin-like URI-orthologue Bud27 associates with the RSC nucleosome remodeler and modulates transcription

Autores: Mirón-García, M.C., Garrido-Godino, A.I., Martínez-Fernández, V., Fernández-Pevida, A., Cuevas-Bermudez, A., Chávez, S., De la Cruz, J., and Navarro, F.

Año de publicación: 2014

Revista: Nucleic Acids Research 42(15):9666-76.

Capítulos de libro

Título: Cytoplasmic and Nuclear Functions for the Prefoldin-like URI/Bud27

Autores: Martínez-Fernández, V., Garrido-Godino, A.I., Cuevas-Bermudez, A., and Navarro, F.

Año de publicación: 2015

Libro: New research On Molecular Chaperones

Título: The yeast prefoldin Bud27

Autores: Martínez-Fernández, V., Garrido-Godino, A.I., Cuevas-Bermudez, A., and Navarro, F.

Año de publicación: 2017

Libro: Springer Nature

Título: Subunits Common to RNA polymerases

Autores: Cuevas-Bermudez, A., Martínez-Fernández, V., Garrido-Godino, A.I., and Navarro, F.

Año de publicación: 2018

Libro: The yeast Role in Medical Applications

COMUNICACIONES A CONGRESOS

Título: Estudiando el mecanismo de *backtracking* de la RNA pol II de *Saccharomyces cerevisiae* mediante la generación de mutantes por mutagénesis dirigida.

Autores: Cuevas-Bermudez, A., Garrido-Godino, A.I., Martínez-Fernández, V., Oya, R. y Navarro, F.

Congreso: SEG (Sociedad española de genética) congreso sociedad española de genética 2015

Lugar: Córdoba, Spain

Fecha: 2015

Título: Incorrect assembly of the RNA pol II affects transcriptional activity and mRNA stability

Autores: Garrido-Godino, A.I., Martínez-Fernández, V., Mirón-García, MC., Cuevas-Bermudez, A., Martínez-García, J., Pelechano, v., Pérez-Ortín, J.E., and Navarro, F.

Congreso: Gene expression as a circular process: cross-talk between trascription and mRNA degradation in eukaryotes

Lugar: Baeza, Jaén, Spain

Fecha: 2014

Título: The yeast prefoldin-like URI-orthologue Bud27 associates with the RSC nucleosome remodeler and modulates transcription

Autores: Mirón-García, M.C., Garrido-Godino, A.I., Martínez-Fernández, V., Fernández-Pevida, A., Cuevas-Bermudez, A., Chávez, S., De la Cruz, J., and Navarro, F.

Congreso: EMBO conference: “Gene transcription in yeast: From regulatory networks to mechanisms”

Lugar: Sant Feliu de Guixols, Cataluña, Spain

Fecha: Desde el 14 de junio de 2014 hasta el 19 de junio de 2014

Título: Incorrect assembly of the RNA pol II affects transcriptional activity and mRNA stability

Autores: Garrido-Godino, A.I., Martínez-Fernández, V., Cuevas-Bermudez, A., Martín-Exposito, M., Oya, R., Martínez-García, J., Pelechano, v., Pérez-Ortín, J.E., and Navarro, F.

Congreso: EMBO conference: “Gene transcription in yeast: From regulatory networks to mechanisms”

Lugar: Sant Feliu de Guixols, Cataluña, Spain

Fecha: Desde el 4 de noviembre de 2016 hasta el 6 de noviembre de 2016

Título: Incorrect assembly of the RNA pol II affects transcriptional activity and mRNA stability

Autores: Garrido-Godino, A.I., Martínez-Fernández, V., Cuevas-Bermudez, A., Martín-Exposito, M., Oya, R., Martínez-García, J., Pelechano, v., Pérez-Ortín, J.E., and Navarro, F.

Congreso: EMBO conference: “Gene transcription in yeast: From regulatory networks to mechanisms”

Lugar: Sant Feliu de Guixols, Cataluña, Spain

Fecha: Desde el 14 de junio de 2014 hasta el 19 de junio de 2014

The yeast prefoldin-like URI-orthologue Bud27 associates with the RSC nucleosome remodeler and modulates transcription

María Carmen Mirón-García¹, Ana Isabel Garrido-Godino¹, Verónica Martínez-Fernández¹, Antonio Fernández-Pevida^{2,3}, Abel Cuevas-Bermúdez¹, Manuel Martín-Expósito¹, Sebastián Chávez^{2,3}, Jesús de la Cruz^{2,3} and Francisco Navarro^{1,*}

¹Departamento de Biología Experimental, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén, Paraje de las Lagunillas, s/n, 23071, Jaén, Spain, ²Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, E-41013 Sevilla, Spain and ³Departamento de Genética, Universidad de Sevilla, E-41012 Sevilla, Spain

Received December 19, 2013; Revised July 10, 2014; Accepted July 14, 2014

ABSTRACT

Bud27, the yeast orthologue of human URI/RMP, is a member of the prefoldin-like family of ATP-independent molecular chaperones. It has recently been shown to mediate the assembly of the three RNA polymerases in an Rpb5-dependent manner. In this work, we present evidence of Bud27 modulating RNA pol II transcription elongation. We show that Bud27 associates with RNA pol II phosphorylated forms (CTD-Ser5P and CTD-Ser2P), and that its absence affects RNA pol II occupancy of transcribed genes. We also reveal that Bud27 associates *in vivo* with the Sth1 component of the chromatin remodeling complex RSC and mediates its association with RNA pol II. Our data suggest that Bud27, in addition of contributing to Rpb5 folding within the RNA polymerases, also participates in the correct assembly of other chromatin-associated protein complexes, such as RSC, thereby modulating their activity.

INTRODUCTION

The unconventional prefoldin Rpb5 interactor (URI/RMP), and its orthologue in yeast, Bud27, are members of the prefoldin (PFD) family of adenosine triphosphate (ATP)-independent molecular chaperones (1–4). URI was originally identified as a protein binding the Rpb5 subunit of all three nuclear RNA polymerases (RNA pol) (5) and is considered to function as a scaffold protein able to assemble additional members of the PFD family in both human and yeast (2,3,6). Notably, we and others have demonstrated that Bud27 also binds Rpb5 in the three RNA polymerases (3,7). Furthermore, URI has been

linked to essential cellular processes, such as translation initiation (8), genome stability and DNA damage response, and it is required for viability in *Drosophila*, *Caenorhabditis* and human cells (2,9,10).

Both URI and Bud27 have been reported to be involved in transcription. Human URI has been described as a negative regulator of androgen receptor (AR)-mediated transcription, able to modulate AR recruitment to target genes (10). In fact, a role for human URI as a transcriptional co-repressor has been proposed, through its interaction with the general transcription factor TFIIF, which also binds Rpb5, and with the hepatitis virus X protein (HBx) (5,11,12).

URI associates with Rvb1 and Rvb2, conserved essential AAA+ ATP-dependent DNA helicases that are present in the chromatin remodeling/modifying complexes Ino80, Swr-C, BAF and Tip60 (7,13,14). Furthermore, human URI associates with the PAF1 complex, which promotes RNA pol II (CTD) phosphorylation and histone modification during transcription elongation (15).

Despite all these evidences for a role of URI in transcription in different organisms, the precise role of Bud27 in transcription has not yet been deciphered in *Saccharomyces cerevisiae*. We have previously demonstrated that Bud27 shuttles between the cytoplasm and nucleus in an Xpo1-independent manner (3). Most importantly, Bud27 associates with the RNA polymerases in the cytoplasm, mediating its cytoplasmic assembly in an Rpb5-dependent manner (3).

In this work, we present evidence that Bud27 contributes to mRNA biogenesis and RNA pol II transcription elongation. We show that the lack of Bud27 affects RNA pol II occupancy within genes. Moreover, we demonstrate that Bud27 associates with RNA pol II phosphorylated forms (CTD-Ser5P and CTD-Ser2P), and modulates transcrip-

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +34 953 212771; Fax: +34 953 211875; Email: fngomez@ujaen.es

© The Author(s) 2014. Published by Oxford University Press on behalf of Nucleic Acids Research. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

In: New Research on Molecular Chaperones
Editor: Jaime Wyatt

ISBN: 978-1-63483-543-5
© 2015 Nova Science Publishers, Inc.

Chapter 3

CYTOPLASMIC AND NUCLEAR FUNCTIONS FOR THE PREFOLDIN-LIKE URI/BUD27

***Verónica Martínez-Fernández,
Ana Isabel Garrido-Godino, Abel Cuevas-Bermúdez
and Francisco Navarro****

Departamento de Biología Experimental, Facultad de Ciencias
Experimentales, Universidad de Jaén, Paraje de las Lagunillas, Jaén, Spain

ABSTRACT

The unconventional prefoldin Rpb5 interactor (URI/RMP), and its ortholog in yeast, Bud27, are members of the prefoldin (PFD) family of ATP-independent molecular chaperones. URI was originally identified as a protein binding the Rpb5 subunit of all three nuclear RNA polymerases (RNA pol) and is considered to function as a scaffold protein able to assemble additional members of the PFD family in both human and yeast.

URI and Bud27 have been linked to essential cellular processes both in the nucleus and the cytoplasm, such as RNA polymerases assembly, translation initiation, genome stability, DNA damage response, and viability. Furthermore, URI has been shown to be involved in several types of cancer processes and to regulate the TOR pathway, not only in humans, but also in yeast.

* Corresponding author: Francisco Navarro. E-mail: fngomez@ujaen.es. Tel: 00-34-953-212771.
Fax: 00-34-953-211875.

Subunits Common to RNA Polymerases

Cuevas-Bermúdez Abel,
Martínez-Fernández Verónica,
Garrido-Godino Ana I. and Navarro Francisco

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.70936>

Abstract

RNA polymerases are heteromultimeric complexes responsible of RNA synthesis. In yeast, as in the other eukaryotes, these complexes contain five common subunits (Rpb5, Rpb6, Rpb8, Rpb10 and Rpb12) that must have similar functions in the three RNA polymerases. However, some of these proteins have been shown to also have specific roles. In the last few decades, substantial progress has been made to understand the role of these common subunits in transcription, but their participation in the activity of each enzyme remains unclear. This review gives a comprehensive overview of current knowledge on the five common subunits of eukaryotic RNA pol, placing attention not only on their common roles in the activity of the RNA pols but also on describing specific roles for some of the complexes.

Keywords: RNA polymerases, transcription, protein complexes, common subunits, RNA

1. Introduction

Transcription is carried out by the RNA polymerases (RNA pol). While archaea and bacteria contain only one RNA pol, most eukarya contain three different enzymes responsible for the specific synthesis of different types of RNAs [1]. RNA pol I synthesises the precursor of the three largest rRNAs, whereas RNA pol III synthesises mostly tRNAs and 5S rRNA, together with several short non-translated RNAs. Meanwhile, RNA pol II produces all mRNAs and many non-coding RNAs [1, 2]. Moreover, in plants, two additional polymerases, IV and V (or nuclear RNA polymerases D and E), reportedly synthesise small interfering RNAs (siRNAs), regulating methylation and participating in gene silencing, as well as long non-coding RNAs involved in development and response to environmental changes [3–5].

INTECH
open science | open minds

© 2018 The Author(s). Licensee InTech. This chapter is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. 