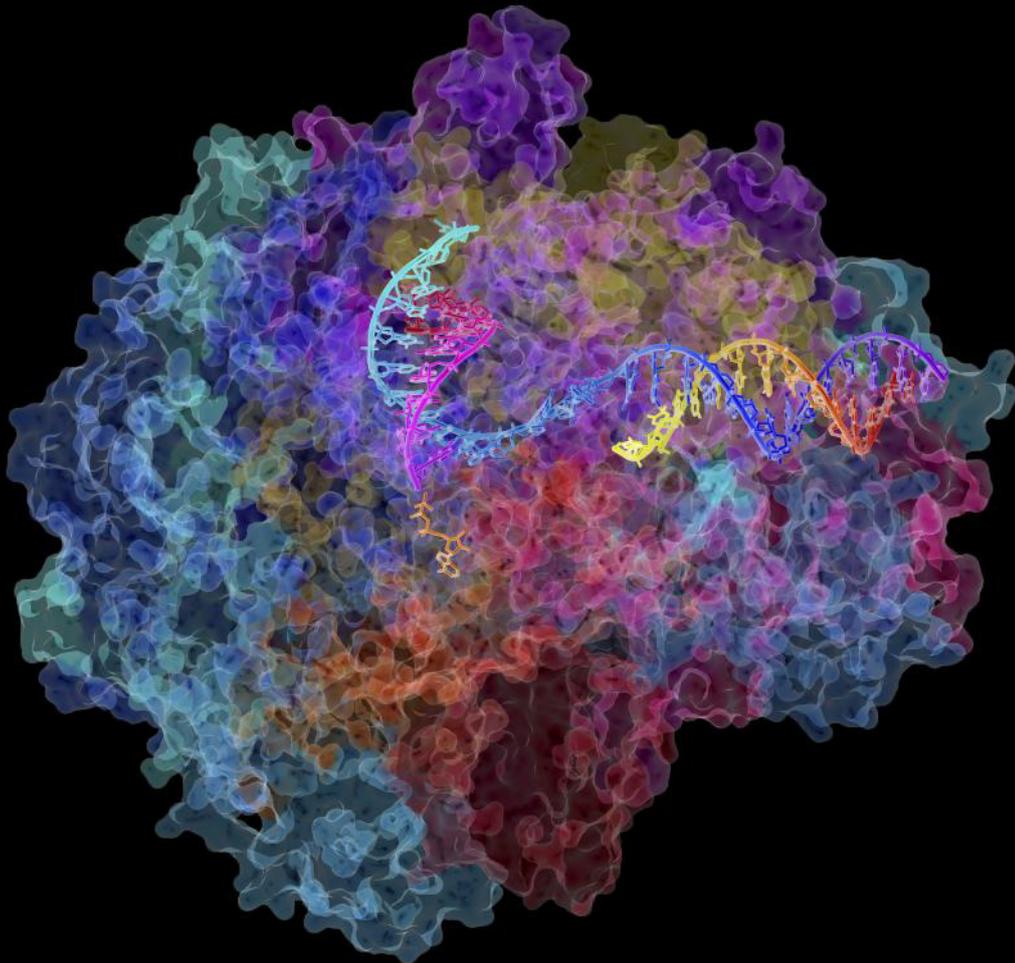


Caracterización funcional del coactivador transcripcional Sub1 en *Saccharomyces cerevisiae*.

Alejandro Collin
Salamanca, España 2018.



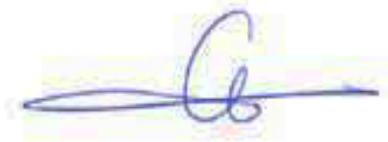
La **Dra. Olga Calvo**, científica titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

CERTIFICA:

Que el licenciado Alejandro Alberto Collin ha realizado el trabajo titulado “**Caracterización funcional del coativador transcripcional Sub1 en *S. cerevisiae***” bajo mi dirección, en el Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG), centro mixto de la Universidad de Salamanca y del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), para optar al grado de Doctor en Biología.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, expide el presente certificado.

Salamanca, 28 de Julio de 2018



Dra. Olga Calvo



INSTITUTO DE BIOLOGÍA
FUNCIONAL Y GENÓMICA



El **Dr. Francisco del Rey Iglesias**, Catedrático del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca,

CERTIFICA:

Que la memoria titulada “**Caracterización funcional del coactivador transcripcional Sub1 en Saccharomyces cerevisiae**” presentada por el licenciado Alejandro Alberto Collin para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. Olga Calvo, en el Instituto de Biología Funcional y Genómica, centro mixto de la Universidad de Salamanca y del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, expide el presente certificado.

Salamanca, 28 de Julio de 2018

Dr. Francisco Rey Iglesias

“Hacer una tesis significa divertirse y la tesis es como el cerdo, en ella todo tiene provecho.”

Umberto Eco.

AGRADECIMIENTOS

Cuando estaba finalizando las correcciones finales del archivo más o menos definitivo de esta tesis, pensé que la redacción de los agradecimientos sería un trámite rápido. Saben los que pasaron por esto que no es así, ahora yo también: la cuenta de los amigos, familiares, investigadores y conocidos que ayudaron, aun sin saberlo muchos de ellos, es tan larga, que seguramente, a continuación, cometeré algunos olvidos. A todos ellos, muchísimas gracias.

A mi familia, en especial a mi mamá, Gloria, y a la memoria de mi papa Santiago, les doy gracias porque, en busca de nuestra felicidad nos llenaron de intereses en la misma medida que nos dejaron elegir. A mis hermanos, a Mauricio, que nunca dejo de acompañarme y me permitió “repatriarme” en la Ciudad de Córdoba. A Gerardo y Marcela y a mis sobrinos, con los que siempre sentí que estuvieron pendientes y contentos con mi aventura fuera de Argentina.

A mi directora de tesis, Olga Calvo, de la cual no solo aprendí la fuerza de empuje con la que hay que avanzar en ciencia, sino también un estilo de abordar una demostración científica, quiero agradecerle las horas de trabajo que me ha dedicado, descontando tiempo de su vida familiar.

Siempre tengo presente a todos mis amigos de Córdoba (la Córdoba de Argentina), esos amigos de la secundaria que viven en Villa María, esos que son de toda la vida y para toda la vida. Gracias a los chicos del clásico “asado de los viernes”, al cual faltó muchas veces, con los que formamos un grupo tan divertido, horizontal y amigero como pocos. Gracias Nico Bertotto, Lucas Bellomo, Claudio Nuccio, Seba Villa, Ignacio Pippino, Jose Rivas, Diego Dubois, Leonardo Luque, Fernando Cardozo, Santi Suninno, Tito, Gaston Ronco...

A Franco Juárez, otro hermano, que estuvo desde mis incertidumbres iniciales sobre la elección de vivir en el extranjero, hasta el minuto anterior a poner un pie en el avión hacia España, gracias. A Diego Pietrani, por su apoyo sincero y por sentir como propio mis proyectos personales. A Diego Benavidez y Gerardo Pissoni., por sus ánimos iniciales, mediales y finales.

A los “chicos” de la Facultad, quiero agradecerles que siempre tuvieron el buen tino de darme esa patadita justa cuando los asuntos personales parecían no ir para ningún lado: A Diego Valdez, los “Nicolases” Cechini y Roldan, Alejandra Trenchi, los hermanos Peter y Chicho Clop, Carola Milozzi, Valentina Brailovsky y Paula Nieto.

Gracias a Leonardo, Pablo y Mauricio Coria, Gastón y Matías Traverssa, Friky Gentile, Nicolas Rizzo y Gaston Restovich, por esas interminables charlas nocturnas en

épocas de Universidad (y que continúan hasta hoy), sobre ciencia, medicina, “filosofía de almacén”, y otros temas poco académicos...acompañados con mates lavados, ceniceros colmados de colillas de cigarrillo y eventualmente algún vino (éramos estudiantes con escasos recursos en esas épocas). Podrían haber sido el embrión de cualquier tesis doctoral.

En la receta de como cocinar una tesis, les debo mis gracias a la gran dosis de alegría y luz cubana de Dunia Llanes Padrón, a los caldos levantamueertos de Sandra Cruz, al humor cómplice de los sagaces Isaac Céspedes y Víctor Ramos, y a la sensibilidad de Yoli Merlo Rendo y su inseparable te de menta poleo. Fueron el ingrediente principal de mi vida salmantina, que se mezcló en nuestra segunda casa que sentimos como propia, la última de Miguel de Unamuno y la actual de María Rosa Sánchez y Blanca Paniagua. Y dentro del grupo de los grandes amigos *made in España*, es gracias a la ayuda del excéntrico y generoso Willie Giraldo Rosa que pude poner un pie en Salamanca, en sí mismo, una clase interesantísima de loco boricua.

En estos últimos e intensos tiempos de compatibilizar las obligaciones laborales diarias, tesis y docencia, gracias por tu paciencia Celeste Bagües que recientemente estás surfeando conmigo esta montaña rusa emocional que significa escribir una tesis.

Muchas páginas de este trabajo, no se podrían haber redactado sin el cálido ambiente de estudio y contención que supo fabricar Micaela Marfil, valoro mucho tu empujón, como el de Patricia Gazzera y Gisela San Martín que supieron entender la importancia personal que tiene esto. A Cristina Castellanos, que me dio el punto de vista alternativo y la charla distendida cuando el trabajo no salía como esperábamos.

A mi amiga, compañera de trabajo y de experimentos Romina Kohan, que no solo revisó y sugirió modificaciones para este manuscrito, sino que me contagio con su espíritu de aventura y calidez humana. Gracias por tu preocupación genuina y tu ayuda.

Finalmente, quiero dar gracias a los amigos que hice dentro del IBFG. En el transcurso del trabajo diario formamos un grupo divertido y solidario, entre los que se encuentran la hospitalaria toledana Esther Cabañas y Sara Gonzales. Pero especialmente a mi amiga y compañera *gintonics* Alicia García, que entre Sabinas y preinóculos supimos construir una gran amistad que yo y mi familia valoramos mucho.

Mis sinceras y reales gracias a todos.

INDICE

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. El ciclo de transcripción de la RNAPII | 3 |
| 1.1.1. Preiniciación de la transcripción | 3 |
| 1.1.2. Iniciación de la transcripción: activación del PIC y escape del Promotor..... | 6 |
| 1.1.3. Elongación: la extensión activa del transcrito | 8 |
| 1.1.3.1. La transcripción a través de la cromatina | 9 |
| 1.1.3.2. Los factores de la elongación de la transcripción | 10 |
| 1.1.4. Terminación de la transcripción | 12 |
| 1.1.5. Transcripción y procesamiento del RNA | 13 |
| 1.2. La regulación de la RNAPII por fosforilación | 15 |
| 1.2.1. La fosforilación del CTD de la subunidad mayor de la RNAPII, Rpb1..... | 16 |
| 1.2.2. Enzimas modificadoras de los niveles de fosforilación de la RNAPII..... | 18 |
| 1.3. Los coactivadores transcripcionales Sub1/PC4 | 20 |
| 1.3.1. Semejanzas y diferencias estructurales entre Sub1 y PC4 | 20 |
| 1.3.2. Características funcionales de PC4 | 22 |
| 1.3.3. Características funcionales de Sub1 | 23 |
| 1.3.4. Sub1 y la respuesta a estrés | 28 |
| 1.3.5. Sub1/PC4 y el mantenimiento de la estabilidad genómica | 30 |
| 2. OBJETIVOS | 33 |
| 3. RESULTADOS | 34 |
| CAPÍTULO 1. Caracterización Funcional del Dominio de Unión a DNA y de la Región Carboxilo-terminal de Sub1 | 35 |
| 3.1. Un acercamiento a la naturaleza modular de Sub1 | 36 |
| 3.1.1. Análisis de homología para la generación de mutantes | 36 |
| 3.1.2. Generación de mutantes en el dominio de unión a DNA y de un mutante que carece de la región carboxi-terminal (CT) de Sub1 | 39 |
| 3.2. Papel de los dominios de unión a DNA y de la región CT de Sub1 en la elongación | 45 |
| 3.2.1. La región carboxi-terminal de Sub1 es importante para su función como factor de elongación | 45 |
| 3.2.2. El dominio de unión a DNA de Sub1 es importante para la regulación transcripcional del gen <i>IMD2</i> | 48 |
| 3.2.3. La región C-terminal de Sub1 modula la elongación del transcrito <i>IMD2</i> | 53 |
| 3.2.3.1. La delección de la región carboxi-terminal de Sub1 influye negativamente en la asociación de Sub1 a la cromatina durante la elongación | 53 |
| 3.2.3.2. La región CT de Sub1 influye en la asociación de Rpb1 a la cromatina durante la elongación de la transcripción | 56 |
| 3.2.4. El CT de Sub1 influye en la tasa de elongación de la RNAPII ... | 57 |
| 3.2.5. El dominio de unión a DNA de Sub1 no influye en la elongación | 62 |
| 3.3. Caracterización de la región CT de Sub1 | 65 |
| 3.4. Sub1 dimeriza <i>in vivo</i> | 71 |

| | |
|--|-----|
| CAPÍTULO 2. Indicios sobre la Participación de Sub1 en la Respuesta al Estrés Severo | 73 |
| 3.5. Sub1 es necesario para la supervivencia al estrés oxidativo | 76 |
| 3.6. La sobreexpresión de <i>SUB1</i> confiere mayor resistencia al H ₂ O ₂ | 80 |
| 3.7. Los niveles de Sub1 disminuyen durante el estrés oxidativo | 81 |
| 3.8. Sub1 es importante para la supervivencia celular en respuesta al estrés térmico extremo | 83 |
| 3.9. Los niveles de Sub1 disminuyen en respuesta al estrés térmico subletal | 86 |
| 3.10. La supervivencia celular y los niveles de Sub1 también se correlacionan en respuesta al estrés térmico extremo | 87 |
| 3.11. Sub1 influye en la transcripción de la chaperona Hsp104, pero no es esencial en la termotolerancia inducida | 92 |
| 3.12. Los niveles de Sub1 experimentan cambios en respuesta al tratamiento salino severo | 95 |
| 3.13. Sub1 podría ser fosforilado para su degradación | 97 |
| 3.14. Los niveles de Sub1 están regulados por la quinasa Srb10 <i>in vivo</i> en condiciones de estrés | 101 |
| 3.15. Sub1 y Msn2 experimentan cambios similares en ausencia de <i>SRB10 in vivo</i> | 105 |
| 4. DISCUSIÓN | 109 |
| 4.1. Análisis funcional de Sub1 | 110 |
| 4.1.1. El dominio de unión a DNA de Sub1 esta funcionalmente conservado | 110 |
| 4.1.2. ¿La capacidad de unión del DBD de Sub1 por sí sola es suficiente para determinar la presencia de Sub1 en los promotores de los genes? .. | 112 |
| 4.1.3. Nuevas funciones para la región CT de Sub1 | 115 |
| 4.1.4. Un modelo de trabajo: Sub1, dos regiones, dos funciones, iniciación versus elongación | 117 |
| 4.2. Consideraciones sobre Sub1 como factor de supervivencia celular en respuesta a estrés | 123 |
| 4.2.1. Sub1 es esencial para la supervivencia celular en respuesta a condiciones de estrés extremas, pero prescindible en condiciones óptimas..... | 123 |
| 4.2.2. ¿Cuál es el sentido de la degradación de Sub1 durante el curso del estrés? | 127 |
| 4.2.3. ¿Es Sub1 una proteína de estrés? | 129 |
| 5. CONCLUSIONES | 132 |
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS | 134 |
| 6.1. Material Biológico | 135 |
| 6.1.1. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 135 |
| 6.1.2. Cepas de <i>Escherichia coli</i> | 135 |
| 6.2. Plásmidos | 135 |
| 6.3. Medios de Cultivo | 135 |
| 6.3.1. Medios de cultivo para levaduras | 135 |
| 6.3.2. Medios de cultivo para bacterias | 137 |
| 6.4. Condiciones de crecimiento | 137 |
| 6.5. Técnicas Genéticas | 138 |
| 6.5.1. Transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 138 |

| | |
|--|-----|
| 6.5.2. Modificación génica en levaduras | 138 |
| 6.5.3. Transformación de <i>Escherichia coli</i> | 139 |
| 6.5.4. Electroporación de <i>Escherichia coli</i> | 139 |
| 6.5.5. Preparación de células competentes de <i>Escherichia coli</i> | 139 |
| 6.6. Métodos de manipulación y análisis de Ácidos Nucleicos | 140 |
| 6.6.1. Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> | 140 |
| 6.6.2. Aislamiento de DNA genómico de levadura | 140 |
| 6.6.3. Aislamiento de RNA total de levadura | 140 |
| 6.6.4. Electroforesis de ácidos nucleicos | 141 |
| 6.6.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y transcripción reversa (RT) | 142 |
| 6.6.6. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) | 142 |
| 6.6.7. Transcripción reversa (RT) | 143 |
| 6.6.8. <i>Transcriptional run-on</i> o TRO: detección del RNA naciente | 143 |
| 6.6.8.1. <i>Run-on</i> y extracción de RNA | 143 |
| 6.6.8.2. Hibridación, exposición y análisis | 144 |
| 6.6.8.3. Fijación de sondas de DNA mediante <i>slot blot</i> | 144 |
| 6.6.9. Oligonucleótidos | 145 |
| 6.7. Métodos de Manipulación y análisis de proteínas | 145 |
| 6.7.1. Obtención de extractos proteicos y cuantificación de proteínas ... | 145 |
| 6.7.2. Inmunoprecipitaciones y co-inmunoprecipitaciones de proteínas | 146 |
| 6.7.3. Análisis por <i>Western Blot</i> | 146 |
| 6.7.4. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) | 147 |
| 6.7.4.1. Preparación y fijación del cultivo | 147 |
| 6.7.4.2. Preparación del extracto celular y fragmentación del DNA ... | 147 |
| 6.7.4.3. Inmunoprecipitación | 148 |
| 6.7.4.4. Procesamiento del INPUT y del PRECIPITADO | 148 |
| 6.7.4.5. Anticuerpos | 149 |
| 6.8. Ensayos de actividades enzimáticas | 149 |
| 6.8.1. Ensayo de actividad fosfatasa ácida y cálculo de <i>ratio GLAM</i> | 149 |
| 6.9. Antibióticos, drogas, inhibidores y enzimas | 150 |
| 6.9.1. Antibióticos | 150 |
| 6.9.2. Drogas e inhibidores | 150 |
| 6.9.3. Enzimas y otros reactivos | 151 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA | 158 |
| 8. ABREVIATURAS | 186 |

| | |
|--|----|
| Figura 1I. Etapas de la transcripción eucariota | 4 |
| Figura 2I. Cambio conformacional de la polimerasa y escape del promotor... | 6 |
| Figura 3I. Estructura de la RNAPII eucariota..... | 16 |
| Figura 4I. Perfil de fosforilación del CTD de <i>S. cerevisiae</i> | 18 |
| Figura 5I. Comparación de secuencias entre Sub1 y PC4 | 21 |
| Figura 6I. Modelo esquemático mostrando la localización hipotética de Sub1 durante la iniciación y la elongación de la transcripción en base a los resultados obtenidos en Garavís <i>et al.</i> 2017 | 26 |
| Figura 1R. La conformación que adopta PC4 para unirse al DNA podría ser similar en Sub1 | 38 |
| Figura 2R. Los residuos que interaccionan con el DNA están conservados en Sub1 y PC4..... | 39 |
| Figura 3R. Análisis de los mutantes del dominio de unión a DNA de Sub1 y del mutante carente del CT..... | 42 |
| Figura 4R. La función de los residuos clave para la interacción de PC4 con el DNA se encuentra conservada en Sub1 | 43 |
| Figura 5R. Efecto de la delección del CT de Sub1 en su asociación a la cromatina..... | 44 |
| Figura 6R. La región CT de Sub1 interviene en la eficiencia de la elongación de transcritos largos | 49 |
| Figura 7R. Sub1 regula la transcripción del gen <i>IMD2</i> | 50 |
| Figura 8R. El dominio de unión a DNA y la región CT de Sub1 son importantes para la regulación del gen <i>IMD2</i> | 51 |
| Figura 9R. La transcripción de los genes <i>IMD2</i> y <i>PMA1</i> requiere de la región CT de Sub1 | 55 |
| Figura 10R. La región CT de Sub1 influye no sólo a la asociación de Rpb1 al gen <i>IMD2</i> durante la elongación transcripcional, sino también a los niveles de expresión del mismo | 57 |
| Figura 11R. La delección del CT de Sub1 disminuye la asociación de Rpb1 al gen largo <i>GALI-YLR454w</i> | 59 |
| Figura 12R. La región CT de Sub1 influye en la tasa de elongación transcripcional | 61 |
| Figura 13R. El dominio de unión a DNA de Sub1 no influye sobre la tasa de elongación de la transcripción | 63 |
| Figura 14R. La delección de la región CT de Sub1 disminuye los niveles de RNAPII activa y competente para elongar | 64 |
| Figura 15R. Estrategia para la construcción de los mutantes de la región del CT de Sub1 | 66 |
| Figura 16R. Análisis de expresión de los mutantes en la región del CT de Sub1..... | 68 |
| Figura 17R. Las delecciones parciales de la región del CT de Sub1 revelan la existencia de subregiones funcionales | 69 |
| Figura 19R. Sub1 dimeriza <i>in vivo</i> | 71 |
| Figura 20R. La delección de <i>SUB1</i> provoca sensibilidad al H ₂ O ₂ y altera la supervivencia celular..... | 78 |
| Figura 21R. La región CT de Sub1 es importante para la resistencia al H ₂ O ₂ .. | 79 |
| Figura 22R. La sobreexpresión de <i>SUB1</i> permite sobrevivir mejor a las células en respuesta al estrés oxidativo | 80 |
| Figura 23R. Los niveles de Sub1 disminuyen en respuesta a estrés oxidativo | 82 |

| | |
|--|-----|
| Figura 24R. Los mutantes del dominio de unión a DNA de Sub1 muestran diferencias en los niveles de Sub1 en respuesta al estrés oxidativo..... | 82 |
| Figura 25R. Sub1 es importante para la supervivencia celular en respuesta al estrés térmico extremo | 84 |
| Figura 26R. Los niveles de Sub1 disminuyen en respuesta al estrés térmico extremo..... | 86 |
| Figura 27R. Las células más tolerantes al estrés térmico presentan niveles mayores de Sub1 | 88 |
| Figura 28R. Sub1 participa en la transcripción de los genes <i>ALD3</i> y <i>CYC7</i> .. | 91 |
| Figura 29R. La carencia de <i>SUB1</i> no altera la viabilidad de las células cuando hay termotolerancia inducida | 93 |
| Figura 30R. El mutante <i>sub1-FRN54-56-HA</i> posee mayores niveles intrínsecos del mRNA <i>HSP104</i> | 94 |
| Figura 31R. Los niveles de Sub1 disminuyen drásticamente en respuesta a estrés osmótico extremo | 96 |
| Figura 32R. La delección de <i>SUB1</i> causa sensibilidad a elevadas concentraciones de NaCl | 97 |
| Figura 33R. Mutaciones en las serinas de la región NT de Sub1 retrasan levemente su degradación | 99 |
| Figura 34R. La mutación de las serinas 2 y 13 de Sub1 alteran su asociación a la cromatina <i>in vivo</i> | 100 |
| Figura 35R. <i>SUB1</i> y <i>SRB10</i> interaccionan genéticamente | 102 |
| Figura 36R. Sub1 se estabiliza en ausencia de <i>SRB10</i> en respuesta a estrés térmico | 103 |
| Figura 37R. <i>SUB1</i> se estabiliza en ausencia de <i>SRB10</i> en respuesta a estrés oxidativo | 104 |
| Figura 38R. <i>Srb10</i> influyen en los niveles de <i>Msn2</i> y Sub1 en células sometidas a estrés oxidativo | 107 |
| Figura 39R. Sub1 y <i>Msn2</i> se comportan de manera similar durante el estrés térmico no letal | 107 |
| Figura 1D. Modelo para el rol de Sub1 durante todo el ciclo de la transcripción | 118 |
| Figura 2D. Modelo esquemático de la localización hipotética de Sub1 durante la elongación de la transcripción | 120 |

| | |
|---|-----|
| Tabla 1. Factores de elongación | 11 |
| Tabla 2. Composición específica del <i>dropout mix</i> | 136 |
| Tabla 3. Lista de cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 152 |
| Tabla 4. Lista de plásmidos | 153 |
| Tabla 5. Oligonucleótidos empleados | 154 |
| Tabla 6. Lista de anticuerpos primarios y secundarios | 157 |

4. INTRODUCCIÓN

La regulación de la expresión génica, la división celular y la diferenciación en las células eucariotas y procariotas, se encuentran ligados a uno o varios de los mecanismos de empaquetamiento, replicación, recombinación y transcripción del DNA contenido en su genoma. La importancia que tienen las interacciones de proteínas con el DNA en estos mecanismos básicos para la vida de todos los organismos ha hecho que el entendimiento de la naturaleza de dichas interacciones conlleve a una mejor comprensión de los procesos inherentes para su supervivencia (Freemont *et al.*, 1991; Pabo & Sauer, 1992). Dentro de estos mecanismos básicos, la transcripción eucariota consiste en un evento finamente regulado en el tiempo y en el espacio que comienza con la interacción de una proteína activadora con una secuencia específica en el DNA, que a su vez promueve el reclutamiento de otras proteínas (Shandilya & Roberts, 2012).

Se sabe que para aquellas proteínas que se unen al DNA directamente sin intermediarios, el reconocimiento específico depende de contactos estáticos con las bases o con los grupos fosfatos de los nucleótidos intervinientes. Aun así, resultados recientes indican que los residuos de la proteína más alejados del contexto de la unión pueden influir decisivamente en la selectividad o afinidad de la misma a través de interacciones transitorias y/o dinámicas con la interfase de unión. Estas regiones generalmente no adoptarían una estructura bien definida, incluso en su unión con el DNA, formando complejos laxos (Fuxreiter *et al.*, 2011). En el otro extremo, se encuentran proteínas que no poseen afinidad por secuencias específicas de DNA de manera directa, sino que pueden estar formando parte de complejos aún mayores, donde las regiones de la proteína alejadas de la zona empleada en la interacción pueden ser los verdaderos determinantes de sus propiedades. En todos estos casos, el estudio de la regulación y caracterización estructural de estas proteínas pueden acercarnos a la comprensión de su actividad específica, como así también al entendimiento más acabado del proceso en el que participan.

En este estudio, pretendemos contribuir con nuevos detalles sobre la función del coactivador transcripcional Sub1 de *Saccharomyces cerevisiae*, una proteína de unión a DNA, tanto en condiciones normales de crecimiento, como en situaciones de estrés severo, a través del análisis de sus distintos dominios. A su vez, esto permitirá ampliar el conocimiento general sobre la elongación de la transcripción por la RNA polimerasa II (RNAPII) en el contexto de la regulación de la expresión génica eucariota. El estudio se ha realizado en la levadura *S. cerevisiae*, no sólo porque reúne las prestaciones del ya conocido modelo de estudio con respecto a la simplicidad de su mantenimiento,

manipulación y conocimiento completo de su genoma (Goffeau *et al.*, 1996), sino porque en este organismo se han realizado trabajos seminales en las áreas de estructura-función de proteínas, transcripción y respuesta al estrés. A continuación, se describen los procesos y actores principales involucrados en la transcripción del RNA, mencionando la participación de Sub1 en dicho proceso, y los aspectos generales de la respuesta celular a estímulos ambientales.

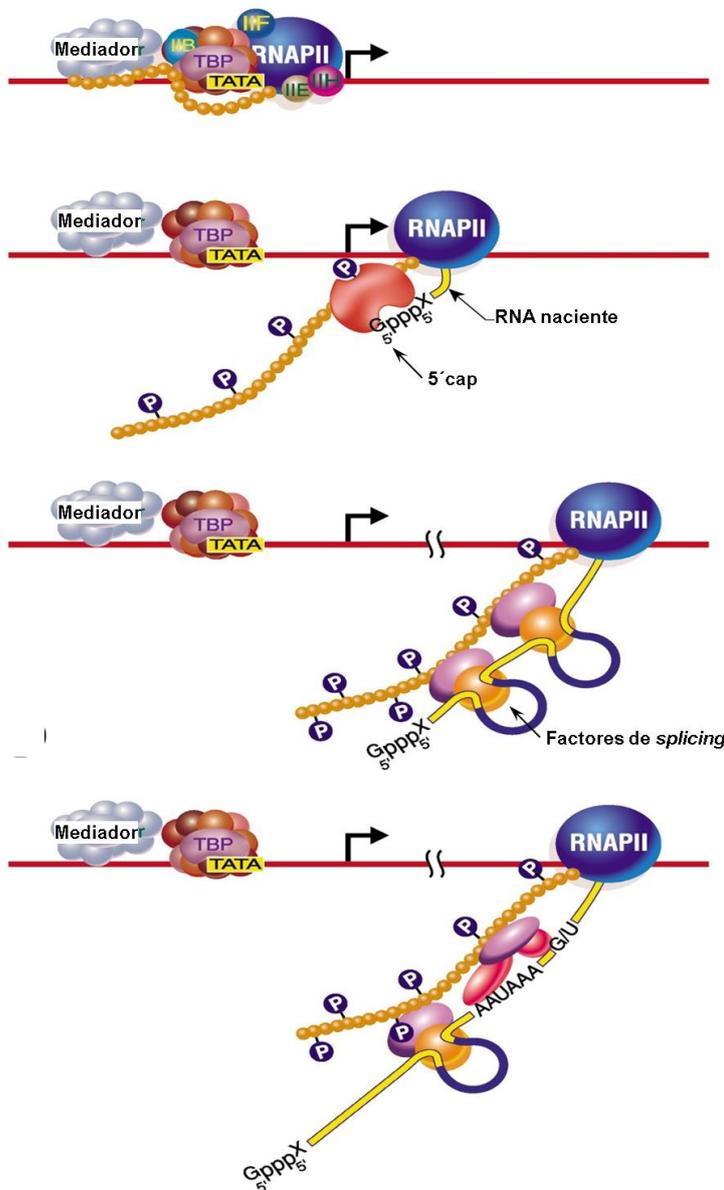
1.1. El ciclo de transcripción de la RNAPII.

En términos sencillos, se pueden diferenciar cuatro etapas durante el ciclo de transcripción llevado a cabo por la RNAPII: pre-iniciación, iniciación, elongación y terminación (Figura 1I; Orphanides & Reinberg, 2002; Shandilya & Roberts, 2012). Cada una de las etapas del ciclo de la transcripción por la RNAPII se encuentra finamente regulada a varios niveles: 1) Regulación de la actividad de la propia polimerasa, principalmente por medio de la fosforilación de su subunidad mayor Rpb1, que coordina la interacción de factores necesarios para la biogénesis de los transcritos; 2) Regulación por factores en *trans*: factores generales de la transcripción (GTF), activadores, represores, co-activadores y co-represores, factores de elongación y de terminación; 3) Regulación en *cis*, entre los que se incluyen secuencias en la vecindad de los genes, como los promotores, las secuencias reguladoras potenciadoras (*enhancers*), silenciadoras (*silencers*), las secuencias de *splicing*, de terminación y procesamiento del RNA; y 4) Regulación por la estructura de la cromatina, donde los nucleosomas representan una barrera para la iniciación y la elongación de la transcripción (Fuda *et al.*, 2009; Harlen & Churchman, 2017; Kadonaga, 2004; Rando & Winston, 2012).

1.1.1. Preiniciación de la transcripción.

Una característica común a todas las RNAPs eucariotas es su incapacidad para reconocer, por sí solas, la secuencia específica que determina el inicio de la transcripción. Por lo tanto, es necesaria la participación de otras proteínas para posicionar a la RNAPII sobre los promotores génicos, las que en conjunto formarán un complejo competente para la iniciación, denominado Complejo de Preiniciación (PIC). La RNAPII no fosforilada se ensambla sobre el *core* del promotor junto con varios

GTFs y coactivadores (como el Complejo Mediador y Sub1, entre otros), para formar el PIC (Bushnell *et al.*, 2004; Sikorski *et al.*, 2011).



Preiniciación

Previo a la iniciación de la transcripción la RNAPII no fosforilada se encuentra asociada al mediador y a otros componentes de la maquinaria de transcripción, como los GTFs e incluso factores de terminación (no señalados en el esquema).

Iniciación

Se sintetizan los primeros nucleótidos del RNA naciente. En este paso, la fosforilación del CTD de la RNAPII durante la iniciación, permite el reclutamiento de las enzimas del *capping*. La maquinaria de transcripción sufre una pausa y luego escapa del promotor.

Elongación

Posteriores fosforilaciones del CTD luego del escape del promotor, constituyen una señal para el reemplazo de los factores de iniciación por los de elongación para la extensión del transcrito y para el reclutamiento de factores para *splicing* del RNA, ente otros.

Terminación

La RNAPII alcanza las señales de terminación que promueven la liberación del transcrito de la RNAPII y ambos del DNA molde para finalizar el ciclo transcripcional. También se reclutan los factores que realizarán el corte y poliadenilación del pre-mRNA durante el procesamiento postranscripcional.

Figura 11. Etapas de la transcripción eucariota. Esquema general que muestra las etapas de la transcripción eucariota, donde se ilustran algunos complejos multiproteicos como el Complejo Mediador, los factores generales de la transcripción (IIB, IIF, IIE), la TBP (componente de TFIID) y los factores que realizan el *capping* en el extremo 5' del RNA naciente. También se señalan las fosforilaciones en el extremo CTD de la RNAPII, el *splicing* del RNA que se está transcribiendo y las señales que determinaran el corte y poliadenilación del RNA después de la terminación de la transcripción (tomado de Orphanides & Reinberg, 2002).

La formación del PIC comienza con la unión del factor general de la transcripción TFIID a los promotores eucariotas. El TFIID es un complejo multiproteico que contiene

a la TBP (*TATA Binding Protein*) que permite y regula la nucleación del PIC de manera secuencial (revisado por Gupta *et al.*, 2016). Esto es seguido por la entrada del resto de GTFs y de la RNAPII. En primer término, la TBP y sus factores asociados (TAFs), que conforman el TFIID, reconocen el elemento TATA del promotor (en aquellos promotores que poseen esta secuencia), distorsionan el DNA y facilitan el ensamblaje ordenado de otros GTFs. Dentro de los factores que se unen al *core* del promotor, está el TFIIA que estabiliza la interacción entre TBP y el DNA sobre el elemento TATA. Luego, las secuencias que flanquean la caja TATA pueden ser reconocidas por TFIIB. Este GTF es crítico para la formación de un complejo ternario estable que involucra a la TBP unida al DNA (Deng & Roberts, 2007). Después, la RNAPII se une a dicho *core* junto con TFIIF, estabilizando el PIC formado. A continuación, el Complejo Mediador y los factores TFIIH y TFIIE son reclutados. El TFIIH, que está formado por 10 subunidades, junto con el TFIIE, controla la transición dependiente de ATP desde el PIC cerrado (estable pero inactivo), al complejo abierto (revisado por Shandilya & Roberts, 2012).

Los componentes del PIC, además de reconocer las secuencias promotoras, reclutar y posicionar a la polimerasa en el promotor y estabilizar la burbuja de transcripción, son determinantes en la selección del sitio de inicio de la transcripción (TSS) y para facilitar posteriormente la salida del promotor del complejo en cuestión. Sin embargo, aunque este PIC es suficiente para que se lleve a cabo la transcripción basal *in vitro*, la transcripción *in vivo* requiere de la asociación de factores reguladores adicionales como, por ejemplo, los coactivadores (revisado por Hahn & Young, 2011; Krasnov *et al.*, 2016).

La caja TATA fue el primer *core* o consenso de promotor en ser descubierto (Lifton *et al.*, 1978), y es el mejor conocido. Este a su vez puede estar flanqueado por otras secuencias que modifican su actividad, como los motivos BRE (*TFIIB Recognition Elements*) (Deng & Roberts, 2007). Sin embargo, hay cada vez más evidencias de que no hay un *core* de promotor universal. Según diversos estudios, los promotores que dependen de la secuencia TATA estarían presentes sólo entre el 10 al 40 % de los genes de mamífero y levadura (Carninci *et al.*, 2006; Cooper *et al.*, 2006). Otras secuencias consenso que articulan funciones equivalentes a TATA están siendo descubiertas. Entre éstas está el elemento Inr (Iniciador). Este se encuentra rodeando el TSS y es probablemente el motivo de promotor más común (Yang *et al.*, 2007). Aunque se ha encontrado que varios factores interaccionan con el Inr, la unión de TFIID es el

que mejor se correlaciona con la actividad de esta secuencia en la iniciación de la transcripción (revisado por Juven-Gershon & Kadonaga, 2010).

1.1.2. Iniciación de la transcripción: activación del PIC y escape del promotor.

El PIC posicionado en el promotor es un complejo estable, pero inactivo, denominado Complejo de Transcripción Cerrado. La transición del PIC del estado cerrado al estado abierto implica un cambio de conformación de la polimerasa durante el cual el DNA de doble cadena del promotor (dsDNA) accede al centro activo de la enzima a través del dominio *cleft* de la misma (Sainsbury *et al.*, 2015). Luego, la actividad ATPasa y helicasa del factor TFIIF provocará la separación de las dos hebras del DNA, aproximadamente unas 15 pb alrededor del TSS, permitiendo el posicionamiento de la cadena molde (ssDNA) en el centro activo de la polimerasa (Dvir *et al.*, 1997; Holstege *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1992; Yan & Gralla, 1997). Esto resulta en la formación de una burbuja de transcripción (Figura 2I-A y B) (Brueckner *et al.*, 2009).

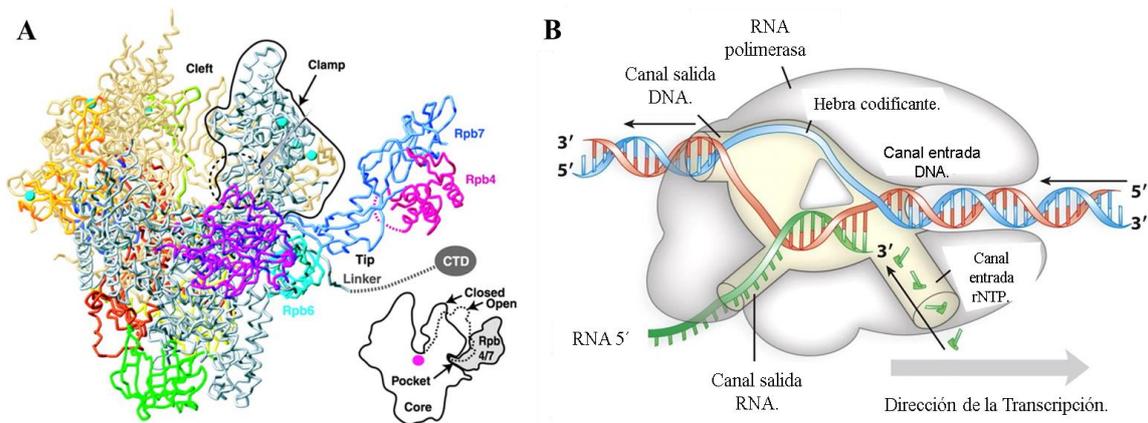


Figura 2I. Cambio conformacional de la polimerasa y escape del promotor. (A) Arquitectura de la RNAPII donde se señalan el módulo *cleft*, que contiene el sitio activo de la enzima y que inicialmente contendrá el dsDNA; el módulo *clamp*, cuyo cambio conformacional determinará la transición de complejo cerrado a complejo abierto (esquema inferior izquierdo); y el extremo CTD de la subunidad Rpb1 que será sustrato de modificaciones postraduccionales (línea de puntos). Además, se indica la posición del dímero Rpb4/7 en ambos esquemas (tomado de Armache *et al.*, 2003). (B) Esquema mostrando la formación de la burbuja de transcripción en el sitio activo de la enzima. Cuando el transcrito alcanza una longitud considerable, puede establecer contactos fuera del canal de salida del RNA, determinando la separación RNA-DNA molde y donde la polimerasa pasará a contener un híbrido RNA-DNA estable en su centro activo.

La RNAPII presenta una morfología que recuerda a una pinza de cangrejo, constituida por cuatro módulos estructurales (Cramer *et al.*, 2001; Gnatt *et al.*, 2001). El “núcleo” o *core*, donde reside el centro activo de la enzima; el módulo “mandíbula-lóbulo” o *jaw-lobe* que, junto con el módulo “plataforma” o *shelf*, contribuye a la entrada del DNA al centro activo; y el módulo “cepo” o *clamp* que, como dijimos, a través de un cambio de conformación, pasa de un estado abierto, que permite el acceso del dsDNA al centro activo, a un estado cerrado, que posiciona el ssDNA en el centro activo. Por su parte, el dímero Rpb4/7 de la polimerasa promueve la conformación cerrada del *clamp*, lo que a su vez favorece la formación del enlace fosfodiéster entre los dos primeros NTPs (Figura 2I-A) (Armache *et al.*, 2003; Bushnell & Kornberg, 2003). La conformación cerrada de la maquinaria de iniciación facilita la separación del híbrido DNA-RNA en el extremo de la burbuja de transcripción, lo que favorecerá la procesividad durante la elongación (Cramer, 2004; Gnatt *et al.*, 2001).

Los primeros enlaces fosfodiéster entre los primeros 9 nucleótidos ocurre mientras la RNAPII sigue situada sobre el promotor. Este RNA naciente a su vez, puede estar sujeto a una terminación prematura, que produce la liberación de pequeños transcritos que serán degradados rápidamente. Este fenómeno, que se conoce como iniciación abortiva ocurre *in vitro* e *in vivo*, en eucariotas y procariontes (Lee, Nguyen *et al.*, 2010). La fase de iniciación termina cuando la enzima extiende exitosamente la cadena más allá de esta longitud y se escapa del promotor. El escape del promotor supone que la polimerasa rompa sus contactos con esta región del DNA, se libere de algunos de los componentes del PIC y establezca una unión más fuerte y estable con el RNA naciente. Así, cuando el transcrito alcanza una longitud de 8-9 nucleótidos, es lo suficientemente largo como para establecer contactos fuera del canal de salida del RNA, determinando la separación RNA-DNA molde y un nuevo cambio conformacional en la polimerasa, que pasará a contener un híbrido RNA-DNA estable en su centro activo (Figura 2I-B) (Westover *et al.*, 2004). Además, la liberación del factor TFIIB produce el colapso de la burbuja de transcripción, de manera que se reasocian las dos hebras del DNA en su extremo *aguas arriba*, favoreciéndose así la salida de la polimerasa del promotor e iniciándose la elongación (Kostrewa *et al.*, 2009).

1.1.3. Elongación: la extensión activa del transcrito.

En lo que respecta a los mecanismos de regulación de la transcripción, tradicionalmente, la investigación ha estado centrada en los procesos que ocurren en la etapa de la iniciación, por ser una etapa limitante en la síntesis de los transcritos. Pero desde hace varias décadas son numerosas las evidencias experimentales que sugieren que los procesos que ocurren *aguas abajo* de las zonas promotoras de los genes tienen un gran peso sobre la expresión génica global (Kwak & Lis, 2013). Específicamente, ha habido un extraordinario incremento en la descripción de nuevas proteínas que influyen en la elongación de la transcripción, ya sea superando el bloqueo transcripcional, facilitando el pasaje de la maquinaria de transcripción por la cromatina, el procesamiento, el empaquetamiento, o involucradas en la calidad y exportación del mRNA (Chanarat *et al.*, 2011; Jimeno *et al.*, 2011; Kruk *et al.*, 2011; Mason & Struhl, 2005; Perales & Bentley, 2009). El estudio de los mecanismos empleados por estos factores ha sugerido que la fase de elongación está altamente regulada en células eucariotas y conectada co-transcripcionalmente con otros procesos nucleares, como la remodelación de la cromatina, la reparación del DNA, la recombinación y la replicación (Selth *et al.*, 2010).

La RNAPII transcribiendo activamente posee dos cualidades muy importantes: una alta procesividad y una tasa de elongación constante. Estas pueden verse comprometidas durante la elongación y cuya garantía es imprescindible para la producción del transcrito maduro (Nechaev & Adelman, 2011). La procesividad puede definirse como la capacidad de la polimerasa para progresar a lo largo del gen que se está transcribiendo sin disociarse de él, mientras que la tasa de elongación puede considerarse como la velocidad a la que la polimerasa avanza (Mason & Struhl, 2005).

Durante la elongación, la polimerasa debe superar ciertas dificultades. Cada vez que la RNAPII añade un nucleótido es susceptible de detenerse, ya sea momentáneamente (pausa), o indefinidamente (bloqueo) (Reines *et al.*, 1996), de manera que las condiciones de transcripción determinan la aparición de pausas. Así, por ejemplo, cuando la concentración de nucleótidos es baja, debido a mutaciones o a la adición de drogas que disminuyen el reservorio de GTP y UTP disponibles como son el 6-azauracilo (6AU) o el micofenolato (MPA), la tasa de elongación disminuye aumentando la frecuencia de las mismas (Jonkers & Lis, 2015; Mayer *et al.*, 2017).

1.1.3.1. La transcripción a través de la cromatina.

El grado del empaquetamiento del DNA en el nucleosoma representa una barrera que afecta la accesibilidad y procesividad de las polimerasas de RNA (y DNA). La RNAPII es propensa a sufrir pausas en los principales sitios de contacto entre DNA-histona (Dangkulwanich *et al.*, 2013), principalmente éstos corresponden a contactos del DNA con los dímeros H2A/H2B y el tetrámero H3/H4 (Bondarenko *et al.*, 2006). Existen varias estrategias que pueden salvar el impedimento de los nucleosomas y que al mismo tiempo constituyen puntos de regulación de la expresión génica. Los nucleosomas no abandonan los genes moderadamente activos, sino que se deslocalizan, o la cromatina se vuelve menos densa cuando aumenta la tasa de transcripción (Weiner *et al.*, 2010). Particularmente, las histonas H2A/H2B sufren desplazamiento o intercambio a una velocidad mucho más alta que las histonas H3/H4. Esto ocurre mediante la formación de un pequeño *loop* de DNA intranucleosomal (\emptyset -*loop*), que contiene a la enzima transcribiendo. En contraste, en genes con intensa transcripción, todo el *core* de histonas es desplazado/intercambiado en las regiones transcritas, lo que resulta en una profunda remodelación de la cromatina (Katan-Khaykovich & Struhl, 2011).

Todo esto es posible gracias a las modificaciones post-traduccionales de las histonas en concierto con los complejos de remodeladores de la cromatina ATP-dependientes que favorecen o relajan las uniones de estas proteínas básicas con el DNA. Los residuos de lisina del extremo amino de las histonas son blanco de modificaciones covalentes tales como acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación y sumoilación. Actualmente, se conocen muchas de las enzimas responsables de estas modificaciones, así como las proteínas encargadas de la eliminación de las mismas (Kouzarides, 2007; Yang & Seto, 2007). Estas pueden combinarse formando verdaderos códigos que regulan el posicionamiento o degradación de las histonas (revisado por Kulaeva *et al.*, 2013; Rando & Winston, 2012). De esta manera, los complejos remodeladores como SWI/SNF en levaduras, reconocen específicamente estas marcas en las histonas y, a través de la hidrólisis del ATP, desenrollan, movilizan, intercambian o eliminan histonas generando una cromatina más laxa que permite el tránsito o reclutamiento del complejo de la RNAPII (Tang *et al.*, 2010).

Debemos destacar que el paso de la RNAPII genera varios estados nucleosómicos intermedios a medida que los contactos DNA-histona se rompen y luego se forman por

delante y por detrás del complejo de transcripción. Estos intermediarios “pausados” constituyen dianas obvias de los factores de la elongación de la transcripción. Particularmente, se halló que Spt4/5 (ver siguiente sección), afecta la cinética del enrollamiento del DNA y estabiliza al intermediario nucleosomal, intensificando la interacción DNA-histona, lo que permite coordinar el movimiento mecánico de la RNAPII a través del nucleosoma (Crickard *et al.*, 2017).

1.1.3.2. Los factores de la elongación de la transcripción.

Como hemos adelantado, la elongación de la transcripción por la RNAPII es un proceso muy complejo, finamente regulado, en la que intervienen no sólo factores de elongación, sino multitud de proteínas que de manera más o menos directa influyen sobre la misma. En la Tabla 1 se resumen los factores más importantes.

Aunque los factores de elongación participan en varios niveles de la transcripción simultáneamente, en términos generales estos pueden actuar sobre dos grandes aspectos. Por un lado, modulando la actividad de la RNAPII, por ejemplo, mediante modificaciones postraduccionales, asociándose con el complejo de transcripción desde las regiones próximas al promotor hasta las regiones de corte y poliadenilación o sitios de terminación (Jonkers & Lis, 2015; Saunders *et al.*, 2006). Y, por otro lado, pueden actuar sobre la cromatina facilitando la elongación del transcrito al promover cambios en el estatus de la cromatina generando un complejo código de modificaciones sobre las histonas (revisado por Rando & Winston, 2012; Tanny, 2014). Además, pueden facilitar la coordinación de la elongación con otros procesos como el procesamiento y transporte de los transcritos (revisado por Molina-Navarro *et al.*, 2011).

Como hemos adelantado, un buen ejemplo de un factor de elongación multifacético lo representa Spt5. Junto con Spt4, forma un heterodímero (Spt4/5) que forma parte del complejo de elongación de la RNAPI y RNAPII (Viktorovskaya *et al.*, 2011). Spt5 es esencial para la viabilidad celular y facilita la procesividad de la RNAPII al estabilizar la burbuja de transcripción en el centro activo de la polimerasa mediante su interacción con ésta. Además, simultáneamente favorece una conformación abierta de la cromatina. Spt5 también interacciona con la maquinaria de *capping*, cuya asociación al complejo de transcripción es coincidente con la pausa de la polimerasa (Glover-Cutter *et al.*, 2008).

Tabla 1. Factores de elongación.

| FACTOR | ACTIVIDAD | REFERENCIAS |
|--------------------------|---|--|
| DSIF (Spt4/5) | Evolutivamente conservado de bacterias a eucariotas. Colabora en el establecimiento de la pausa junto con NELF en eucariotas superiores. Contribuye a la procesividad de la RNAPII. | (Martinez-Rucobo <i>et al.</i> , 2011; Mayer <i>et al.</i> , 2010; Peterlin & Price, 2006; Venters <i>et al.</i> , 2011; Yamada <i>et al.</i> , 2006). |
| NELF | Exclusivo de humanos y <i>Drosophila</i> . Participa en el establecimiento de la pausa. | (Narita <i>et al.</i> , 2003; Renner <i>et al.</i> , 2001; Yamaguchi <i>et al.</i> , 2002). |
| TFIIS (Dst1) | Principal factor regulador del <i>backtracking</i> de la RNAPII. Estimula su actividad endonucleasa y favorece la procesividad. | (Awrey <i>et al.</i> , 1997; Fish & Kane, 2002; Izban & Luse, 1992; Komissarova & Kashlev, 1997). |
| PAF | Favorece una conformación accesible de la cromatina al complejo de elongación, actuando como plataforma para el reclutamiento de modificadores epigenéticos. | (Jaehning, 2010; Kim & Buratowski, 2009; Laribee <i>et al.</i> , 2005; Wood <i>et al.</i> , 2003; Xiao <i>et al.</i> , 2005; Zhu <i>et al.</i> , 2005). |
| FACT | Remodelador de la cromatina. Contribuye a la procesividad, facilitando el ensamblaje/desensamblaje de los nucleosomas durante la transcripción. | (Jimeno-Gonzalez <i>et al.</i> , 2006; Kaplan <i>et al.</i> , 2003; Mason & Struhl, 2003; Orphanides <i>et al.</i> , 1998; Orphanides <i>et al.</i> , 1999). |
| Spt6 | Remodelador de la cromatina. Se asocia a la histona H3, y es capaz de ensamblar nucleosomas <i>in vitro</i> . Su mutación altera la estructura de la cromatina <i>in vivo</i> . | (Bortvin and Winston, 1996; Kaplan <i>et al.</i> , 2003; Swanson and Winston, 1992; Winston <i>et al.</i> , 1984). |
| Ccr4-Not | Favorece la activación de una polimerasa pausada contribuyendo a la resolución de un estado de <i>backtracking</i> . | (Kruk <i>et al.</i> , 2011). |

Se listan los más conocidos y estudiados hasta el momento. De todos estos factores de elongación, Spt5 es el único que se encuentra evolutivamente conservado todos los dominios, *Bacteria*, *Archea* y *Eukarya* (Guo *et al.*, 2008). Spt5 se asocia con Spt4 para formar complejo esencial durante la elongación.

Spt5 es el único factor de transcripción que se encuentra evolutivamente conservado en todos los reinos (Martinez-Rucobo *et al.*, 2011). En concreto, se conserva el dominio NGN que le permite unirse a la cadena no molde del DNA y a una región de DNA dúplex adyacente al nacimiento de la burbuja de transcripción, estabilizando el híbrido RNA-DNA en el centro activo de la enzima. De esta manera, Spt5 evita la reasociación de las dos cadenas del DNA, lo que influye sobre la procesividad de la polimerasa (revisado por Hartzog & Fu, 2013). La función de Spt5 es regulada mediante la fosforilación de su dominio C-terminal por la quinasa Bur1 (Cdk9 en humanos), que a su vez regula modificaciones epigenéticas en las histonas haciendo

accesible la cromatina al complejo de transcripción (Jaehning, 2010). Hace unos años, además, en nuestro laboratorio describimos que el coactivador transcripcional Sub1 interacciona con el complejo Spt4/5, estabilizando la unión Spt5-Rpb1, e influyendo así en la tasa de elongación de la transcripción de la RNAPII (García *et al.*, 2012).

En un estudio realizado por Mason & Struhl (2005), se clasificaron los factores de elongación en base a los efectos que provocan sus mutaciones en la procesividad de la polimerasa. De esta manera, hay mutaciones que reducen la procesividad y mutaciones que reducen la procesividad, pero solamente en presencia de 6AU (Mason & Struhl, 2005). Estos autores describieron cómo numerosas mutaciones en distintos factores de elongación pueden afectar a la procesividad de la polimerasa sin alterar la tasa de elongación, mientras que mutaciones que afectaban a la tasa afectaban siempre a la procesividad. Sin embargo, nuevos trabajos han puesto en duda esta clasificación, ya que mutaciones en factores como el complejo Ccr4-Not, incrementan la procesividad a la vez que disminuyen la tasa de elongación (Kruk *et al.*, 2011). Incluso se ha encontrado que el mutante *spt5-242* del factor de elongación Spt5, tiene afectada la tasa de elongación de la polimerasa, pero no la procesividad de la misma (Quan & Hartzog, 2010).

1.1.4. Terminación de la transcripción.

La terminación de la transcripción involucra la liberación del transcrito de la RNAPII y la disociación de ambos del DNA molde (Porrua & Libri, 2015; Richard & Manley, 2009). La RNAPII liberada es luego reciclada, siendo capaz de entrar en una nueva ronda de transcripción. Además, la terminación no está limitada a las secuencias 3' de los genes, ya que puede tener lugar a lo largo de toda la *ORF* (Kuehner *et al.*, 2011).

Dos vías de terminación han sido descritas, una para la mayoría de los genes codificantes de proteínas por la RNAPII y acoplada a la poliadenilación (Proudfoot & O'Sullivan, 2002) y otra para los *small nucleolar RNAs* (snoRNAs) y los *small nuclear RNAs* (snRNAs) que carecen de cola poli(A) y cuyo extremo 3' se genera por corte endonucleolítico y/o exonucleolítico. En el primer caso, la terminación involucra la liberación del transcrito de RNA y la disociación de la RNAPII del molde de DNA (revisado por Richard & Manley, 2009). Existen principalmente dos modelos para explicar este fenómeno, uno es el denominado “torpedo”. Este propone la acción de una

exonucleasa 5'-3' encargada de degradar co-transcripcionalmente al fragmento de RNA ubicado *aguas abajo* del sitio de corte, hasta alcanzar a la polimerasa provocando su desprendimiento del molde de DNA, liberándola y causando la finalización de la transcripción (Loya & Reines, 2016). El segundo mecanismo es conocido como “modelo alostérico” o “modelo anti-terminador”. Este propone que, cuando la polimerasa pasa sobre la señal de poliadenilación, se inducen cambios conformacionales en el complejo de elongación, causando el reemplazo de sus factores por los de terminación. Aunque ambos modelos se basan en el reconocimiento del sitio poli(A), una diferencia fundamental es que solo el modelo “torpedo” depende de un correcto corte endonucleolítico del RNA naciente para crear el sitio de entrada para la exonucleasa 5'-3' (Rosonina *et al.*, 2006). Aun así, actualmente se cree que la terminación podría llevarse a cabo por un proceso en el que se solapan ambos modelos (revisado por Kuehner *et al.*, 2011).

Por otra parte, los *noncoding* RNAs, incluyendo los snoRNAs, los transcritos crípticos (CUTs, *Cryptic Unstable Transcripts*), y muchos RNA regulatorios, son terminados en *S. cerevisiae* a través de una vía dirigida por las proteínas de unión a RNA Nrd1, Nab3; y la helicasa de RNA Sen1. El complejo Nrd-Nab3 es reclutado a la RNAPII en etapas iniciales por fosforilaciones en la Serina5 del dominio carboxilo-terminal (CTD) de la subunidad mayor de la polimerasa, Rpb1, formando un gran complejo con otras proteínas (revisado por Arndt & Reines, 2015). Durante la terminación, Nrd1 y Nab3 actúan como sensores que detectan secuencias de terminación específicas en los transcritos nacientes, así la vía Nrd1-Nab3-Sen1 involucrada en la producción de *noncoding* RNAs es clave en la determinación del control de la calidad de la transcripción (Franco-Echevarría *et al.*, 2017). De forma similar a los mecanismos que dependen de los sitios poli(A), la interacción de estos factores con el CTD de la RNAPII y con sus secuencias de unión en el RNA, podrían provocar cambios conformacionales en la polimerasa. Sin embargo, en lugar de desalojar a la RNAPII como en los modelos anteriores, se ha propuesto que Sen1 permite la terminación de la transcripción mediante el desenrollamiento del híbrido RNA-DNA del sitio activo de la enzima. Aun así, ninguno de los mecanismos de terminación comentados parece ser excluyentes unos de otros, por ejemplo, se ha demostrado que Sen1 también contribuye a la terminación de los RNA con colas poli(A) (Kuehner *et al.*, 2011; revisado por Porrua & Libri, 2015).

1.1.5. Transcripción y procesamiento del RNA.

Actualmente está claro que todas las etapas del ciclo transcripcional se encuentran estrictamente coordinadas entre sí y con el procesamiento de los transcritos. El RNA que se está transcribiendo experimenta una serie de modificaciones en sus extremos 5' y 3' que determinan su destino. Primero, la modificación del extremo 5' ocurre al inicio de la elongación transcripcional luego de la síntesis de 20 a 30 nucleótidos, donde se agrega una caperuza de 7-metilguanosina (CAP) sobre el enlace trifosfato del primer nucleótido añadido al RNA naciente, lo que evita su degradación. Esta modificación no solo es necesaria para la eficiente expresión génica, sino que también promueve el *splicing*, la poliadenilación, la exportación al citoplasma y la iniciación de la traducción (revisado por Cowling & Cole, 2010). Para la adición de la caperuza, la RNAPII se detiene cerca del promotor, momento en que la fosforilación de la Ser5 en el CTD (ver más adelante), estimula el reclutamiento de los factores necesarios para ello.

Por otra parte, numerosas investigaciones independientes permitieron establecer que la información presente en los pre-mRNAs eucariotas es procesada de tal forma que los intrones pueden ser eliminados para dar lugar a un mRNA maduro constituido por exones ligados (revisado por Kornblihtt *et al.*, 2004). La reacción se conoce como *splicing* y es llevada a cabo por un complejo macromolecular ribonucleoproteico, el *spliceosoma*, descubierto inicialmente en levaduras (Brody & Abelson, 1985). Aunque solo el 3% de los genes de levaduras posee intrones, se trata de un proceso altamente conservado en eucariotas (Valadkhan, 2005). Incluso, el *splicing* es considerado como un importante punto de regulación entre la transcripción y la traducción (revisado por Kornblihtt *et al.*, 2013).

El *spliceosoma* se ensambla sobre “sitios de *splicing*” (en 5' y 3' del intrón a procesar), presentes en el pre-mRNA y cataliza las dos reacciones de transesterificación que comprende el *splicing*. Este proceso ocurre de manera co-transcripcional y estimulado por las fosforilaciones que ocurren en el CTD de la Rpb1 durante una pausa en el extremo 3' de los intrones, constituyendo otra instancia para el control de la expresión génica (Alexander *et al.*, 2010). Así por ejemplo, el *splicing* del último intrón promueve la terminación y poliadenilación (Millevoi *et al.*, 2006).

Por último, la terminación de la transcripción por la RNAPII también esta acoplada al procesamiento de los extremos 3' de los pre-mRNA, e incluso puede influir en el *splicing* y la iniciación de la transcripción en los promotores de los genes

(Buratowski, 2005; Mapendano *et al.*, 2010). De esta manera, tampoco la terminación representa una etapa aislada del resto del metabolismo del RNA. En particular, la conexión entre terminación y poliadenilación de la transcripción se estableció desde finales de los 80's con el descubrimiento de que ambos procesos son dependientes de las mismas secuencias de DNA en el extremo 3' de los genes (Connelly & Manley, 1988; Logan *et al.*, 1987). Luego, esta conexión fue reforzada aún más cuando se encontró que algunos de los factores requeridos para la terminación también lo son para el corte y poliadenilación del mRNA (Proudfoot, 2004; 2011).

La poliadenilación en el extremo 3', que incluye la adición de una cola poli(A) luego del corte endonucleolítico del pre-mRNA durante la terminación, es realizada por varios complejos proteicos que interaccionan de manera cooperativa entre sí, y donde algunos de sus factores están involucrados en el *splicing* y el transporte del mRNA maduro hacia el citoplasma (revisado por Mandel *et al.*, 2008; Millevoi & Vagner, 2010). Por ejemplo, se ha demostrado que el factor de poliadenilación y corte CPSF, es necesario para que ocurra un *splicing* eficiente, y que, por otro lado, mutaciones en el sitio de unión del pre-mRNA de la partícula ribonucleoproteica U2 snRNP, que pertenece al *spliceosoma*, reduce dramáticamente la eficiencia del corte del transcrito. De esta manera, estos factores contribuyen al acoplamiento que existe entre el procesamiento en 3' de los pre-mRNA y el *splicing* (Kyburz *et al.*, 2006).

1.2. La regulación de la RNAPII por fosforilación.

Como adelantamos al principio de esta introducción, uno de los mecanismos más importantes de regulación de la RNAPII son las modificaciones post-traduccionales de la misma. Entre estas modificaciones, la más importante y más estudiada hasta el momento, es la fosforilación de las serinas del CTD de su subunidad mayor, Rpb1.

Las RNA polimerasas (RNAPs) son enzimas celulares clave, responsables de la transcripción dependiente de DNA en todos los organismos vivos. Solo una RNAP está presente en bacterias y arqueas, mientras que en todos los integrantes del dominio *Eukarya* hay tres RNAPs (I, II y III), además de las RNAPIV y V halladas exclusivamente en plantas (Jun *et al.*, 2011; Werner & Grohmann, 2011). Todas las RNAPs están relacionadas evolutivamente y tienen propiedades estructurales y funcionales comunes. La mínima organización estructural conservada está representada por la enzima de las bacterias, que contiene sólo 5 subunidades (α , α' , β , β' , ω). La

RNAP *Archaea* se compone de 12 subunidades, y en *Eukarya* encontramos de 12 a 17 subunidades (Cramer, 2002; Cramer *et al.*, 2008; Werner & Grohmann, 2011). Específicamente, la RNAPII de *S. cerevisiae* de 12 subunidades, Rpb1 a Rpb12, se disocia en un núcleo o *core* de 10 subunidades y el heterodímero Rpb4/Rpb7, que forma el dominio *tallo* o *stalk* (Figura 3I) (Armache *et al.*, 2003; Cramer, 2004). Aunque las subunidades catalíticas de las tres RNAPs eucariotas comparten homología entre sí y con la subunidad mayor de la RNAP bacteriana (Allison *et al.*, 1985), exclusivamente la subunidad mayor de la RNAPII (Rpb1) contiene un inusual CTD, evolutivamente conservado, cuya función es crucial en la biogénesis del mRNA (Eick & Geyer, 2013; Zaborowska *et al.*, 2016).

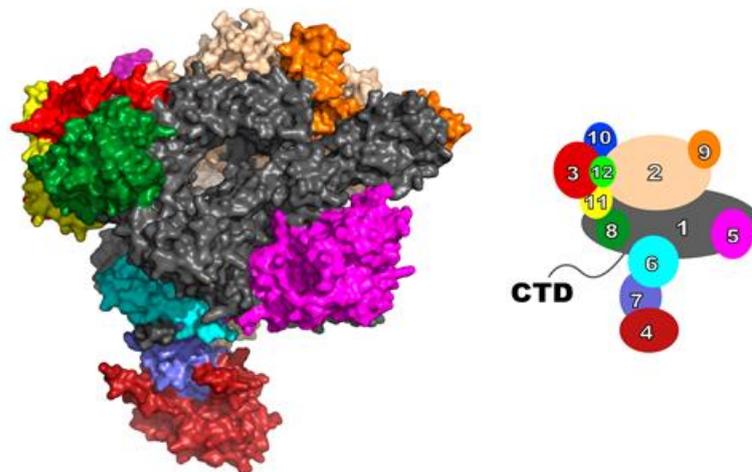


Figura 3I. Estructura de la RNAPII eucariota. Representación de la superficie del complejo RNAPII (panel izquierdo), y un diagrama de bolas mostrando la localización de sus 12 subunidades y del CTD desestructurado de Rpb1 (panel derecho; tomado de Garavís & Calvo, 2017).

1.2.1. La fosforilación del CTD de la subunidad mayor de la RNAPII, Rpb1.

El dominio carboxilo terminal de la subunidad mayor, Rpb1, conocido comúnmente como CTD, constituye un punto de convergencia central en la regulación de la transcripción en todos sus niveles a través de distintas modificaciones post-traduccionales. Este dominio está compuesto por repeticiones en tándem de 7 residuos consenso: Tyr1-Ser2-Pro3-Thr4-Ser5-Pro6-Ser7 (Y1S2P3T4S5P6S7), que aumentan en número en relación al incremento de la complejidad genómica de las especies y que constituyen las dianas de dichas modificaciones postraduccionales (Bushnell *et al.*, 2002). Aunque existe un amplio abanico de posibles modificaciones del CTD, como fosforilación de la tirosina 1 (Tyr1) y la treonina 4 (Thr4) (Heidemann *et al.*, 2013),

glicosilación en múltiples serinas y treoninas, isomerización de las prolinas (Pro3 y Pro6), y acetilación y metilación de arginina y lisina del CTD en células humanas (Arg1810 y Lys7) (Sims *et al.*, 2011; Voss *et al.*, 2015) es la fosforilación de las serinas la que mayor importancia funcional parece tener (Buratowski, 2009; Perales & Bentley, 2009; Phatnani & Greenleaf, 2006). De éstas, la fosforilación de las serinas 2 y 5 son las de mayor relevancia durante la transcripción en general (Schüller *et al.*, 2016; Suh *et al.*, 2016). Estas fosforilaciones, en combinación con el número de repeticiones de la secuencia consenso, suponen una amplia variedad de patrones del CTD que ha recibido la denominación de “Código del CTD”. Dicho código determina el reclutamiento secuencial y coordinado de multitud de factores requeridos tanto para la biogénesis del RNA, como para su transporte y la modificación de la cromatina durante la transcripción (Corden, 2016; Jasnovidova & Stefl, 2013).

Inicialmente, la RNAPII no fosforilada se ensambla junto con los GTFs y coactivadores para formar el PIC sobre el *core* del promotor (Bushnell *et al.*, 2004). Durante la iniciación de la transcripción y hasta el escape del promotor, el nivel de fosforilación de Ser5 del hexapéptido consenso del CTD se incrementa hasta alcanzar un máximo en la zona 5' del gen, a partir del cual sus niveles comienzan a decaer, a la vez que el CTD comienza a fosforilarse principalmente en la Ser2 (Komarnitsky, Cho, & Buratowski, 2000). Se considera que el cambio en el estatus de fosforilación del CTD de la RNAPII de Ser5 a Ser2, determina la transición entre iniciación y elongación (Figura 4I). En resumen, los niveles más altos de fosforilación en Ser5 se encuentran asociados a los promotores y regiones 5' de los genes y se mantienen o van disminuyendo hacia regiones 3'. Por el contrario, la fosforilación en Ser2 es la principal modificación en las secuencias codificantes y 3' de los genes, alcanzando un pico máximo al término de la transcripción que es necesario para el reclutamiento de los factores de terminación y poliadenilación (Bataille *et al.*, 2012; Calvo & García, 2012).

Las distintas fosforilaciones van acopladas a defosforilaciones específicas en los momentos precisos de la transcripción. Así, la defosforilación de los residuos Ser5 tiene lugar en la transición iniciación-elongación; mientras que la defosforilación en Ser2 ocurre al final de la transcripción, permitiendo el reciclaje de la RNAPII y la reiniciación (Buratowski, 2009). De esta manera, la fosforilación diferencial del CTD promueve el intercambio de factores de iniciación y elongación durante el escape del promotor (Pokholok *et al.*, 2002), el intercambio entre factores de elongación y de procesamiento en 3'bb', así como de *splicing* (Hsin & Manley, 2012; Kim *et al.*, 2004;

Tietjen *et al.*, 2010), y el reciclaje de la RNAPII (Zhang *et al.*, 2012). Además, la fosforilación del CTD, como ya hemos adelantado, coordina la biogénesis de los mRNAs con otros eventos nucleares (Hirose & Manley, 2000; McCracken *et al.*, 1997).

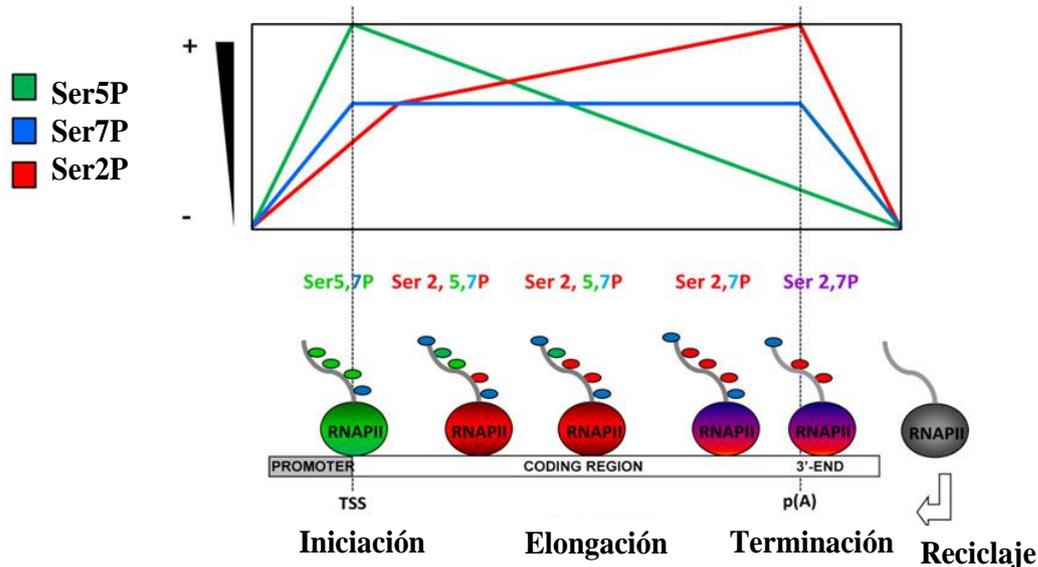


Figura 4I. Perfil de fosforilación del CTD de *S. cerevisiae*. Durante la iniciación de la transcripción y el escape del promotor, se fosforilan las Ser5 del CTD (en verde). Al mismo tiempo, se fosforilan las Ser7 (en azul), estableciéndose una marca bivalente tanto en genes codificantes de proteínas, como en no codificantes. Poco después de la disociación del promotor, la marca de Ser5P se elimina rápidamente, mientras que van acumulándose marcas de Ser2P (en rojo) y continúa la fosforilación de las Ser7. Por último, todas las marcas de fosforilación del CTD se eliminan al final de la transcripción y la polimerasa hipofosforilada (en gris) está lista para ensamblarse de nuevo en el PIC y reiniciar la transcripción. Los círculos pequeños coloreados representan los residuos fosforilados de la secuencia consenso. Los círculos grandes, las distintas formas fosforiladas de la RNAPII durante la iniciación, la elongación y la terminación. Imagen modificada desde (Calvo & García, 2012).

1.2.2. Enzimas modificadoras de los niveles de fosforilación de la RNAPII.

En *S. cerevisiae* se han descrito enzimas tipo CDK (*Cyclin-Dependent-Kinases*) capaces de fosforilar los residuos serina del CTD de la RNAPII. Estas se encuentran evolutivamente conservadas en mamíferos, con diferente especificidad de sustrato sobre las serinas del CTD, actúan en momentos distintos a lo largo del ciclo de la transcripción y de manera coordinada con varias fosfatasa. En levadura estas son Srb10 y Kin28, conocidas como las quinasas de iniciación, Ctk1 y Bur1, las quinasas de elongación. En cuanto a las fosfatasa, también son cuatro: Rtr1, Ssu72, Fcp1 y Glc7. Como hemos dicho, todas estas enzimas, en conjunto, gobiernan la fosforilación del CTD durante la biogénesis del ARNm (Allepuz-Fuster *et al.*, 2014; Hsin *et al.*, 2011; Hsu *et al.*, 2014; Jeronimo *et al.*, 2013; Krishnamurthy *et al.*, 2004; Schrieck *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2012).

Tres factores adicionales intervienen en la modulación de los niveles de fosforilación del CTD: Ess1, Rpb4/7 y Sub1 (Allepuz-Fuster *et al.*, 2014; García *et al.*, 2010; Hanes, 2014). La peptidil prolil *cis-trans* isomerasa Ess1, promueve la función de la fosfatasa de Ser5P y Ser7P del CTD, Ssu72 (Krishnamurthy *et al.*, 2004; Rosado-Lugo & Hampsey, 2014; Zhang *et al.*, 2012), para catalizar el cambio de estado de isomerización de las prolinas del CTD en levadura (Hanes, 2014).

Estructuralmente, el heterodímero Rpb4/7 es un subcomplejo que sobresale a modo de tallo y que se extiende desde el cuerpo principal del complejo de la RNAPII (Figura 3I, Armache *et al.*, 2005). La mayoría de los contactos entre Rpb4/7 y el *core* del complejo, ocurren entre Rpb7 y las subunidades Rpb1 y Rpb6, siendo Rpb4 básicamente requerida para la interacción de Rpb7 con la base de la RNAPII (Armache *et al.*, 2005; Bushnell & Kornberg, 2003). Rpb7, pero no Rpb4, es esencial para la viabilidad celular (McKune *et al.*, 1993; Woychik & Young, 1989). En *S. cerevisiae*, Rpb4/7 participa en una amplia gama de actividades bajo una variedad de condiciones (Choder, 2004; Sharma & Kumari, 2013). Particularmente, este dímero es necesario para la transcripción dependiente de promotor *in vitro* y está implicado también en la elongación y terminación (Sharma & Kumari, 2013), además es importante para el reclutamiento co-transcripcional de factores necesarios para la formación del extremo 3' del mRNA y snoRNA (Runner *et al.*, 2008). La localización del tallo cerca del canal de salida de la RNA y del CTD de Rpb1, sugirió que podría desempeñar un papel importante, no sólo en el reclutamiento de factores importantes para la biogénesis de RNA (Runner *et al.*, 2008), sino también para las modificaciones de CTD (Allepuz-Fuster *et al.*, 2014). Recientemente, en nuestro laboratorio se ha demostrado que el heterodímero Rpb4/7, en *S. cerevisiae*, juega un papel importante en el reclutamiento de las fosfatasas Ssu72 y Fcp1 (Allepuz-Fuster *et al.*, 2014), por lo tanto, en la modulación de los niveles de fosforilación de CTD. Asimismo, es requerido para el reclutamiento de Sub1 (Garavís *et al.*, 2017), quien a su vez está implicado en la modulación de la fosforilación del CTD durante todo el ciclo de transcripción (García *et al.*, 2010). De hecho, Sub1 influye sobre los niveles de fosforilación de las Ser5 y Ser2 por diversos mecanismos, pero probablemente a través de su interacción con Rpb4/7 en ambos casos (Calvo & Manley, 2005; Garavís *et al.*, 2017; García *et al.*, 2010). Puesto que Sub1 es el objeto de estudio de esta Tesis doctoral, nos centraremos en este factor en la siguiente sección.

1.3. Los coactivadores transcripcionales Sub1/PC4.

1.3.1. Semejanzas y diferencias estructurales entre Sub1 y PC4.

PC4 es una proteína con 127 aminoácidos con un dominio regulador N-terminal que abarca los aminoácidos 1 al 63, y un dominio C-terminal con capacidad de unión a DNA de cadena sencilla y dimerización, ubicado entre los aminoácidos 63-127 (Ge & Roeder, 1997; Kretzschmar *et al.*, 1994; Brandsen *et al.*, 1997) (Fig. 5A). La región N-terminal es importante para las interacciones de PC4 con diferentes dominios de activación (Ge & Roeder, 1994) y para la unión a DNA de doble cadena no específica de secuencia (Kaiser *et al.*, 1995). Esta región NT de PC4 comprende una zona desestructurada que contiene dos dominios ácidos ricos en serinas (SEAC). Posee un total de 17 serinas, ubicadas en los aminoácidos 9 a 22 y 50 a 61 respectivamente. Estos están separados por una región rica en lisinas entre los aminoácidos 23 a 41 que parecen ser requeridos para su función en la activación de la transcripción (Kaiser *et al.*, 1995). En el caso de Sub1 esta región contiene solamente 5 residuos serina (Henry *et al.*, 1996).

Por su parte, Sub1 consta de 292 aminoácidos. Tradicionalmente se ha considerado que lo constituyen sólo dos dominios: el dominio N-terminal, que comprende aproximadamente los primeros 105 aminoácidos, y un dominio C-terminal con los restantes 185 aminoácidos (Figura 5I-A). El dominio de unión a DNA de Sub1 se encuentra en la región N-terminal (residuos 32-105), mientras que en PC4 está en la región C-terminal (residuos 63-127). Como adelantamos, este dominio en particular es la región de la proteína que conserva una gran homología de secuencia (48% de identidad y 26% de similitud) (Henry *et al.*, 1996; Knaus *et al.*, 1996), donde algunos residuos como la lisina (K) 45, la fenilalanina (F) 54 y la tirosina (Y) 66, que corresponden a K68, F77 y W89, respectivamente, en PC4, podrían ser claves en la interacción con el DNA (Figura 5I-B) (Brandsen *et al.*, 1997; Werten & Moras, 2006). Sub1, además, contiene una extensión carboxi-terminal, ausente en PC4, que constituye casi las dos terceras partes de la proteína total y cuya función se desconoce (Henry *et al.*, 1996; Knaus *et al.*, 1996). Hasta ahora, la estructura cristalográfica de Sub1 no ha sido resuelta.

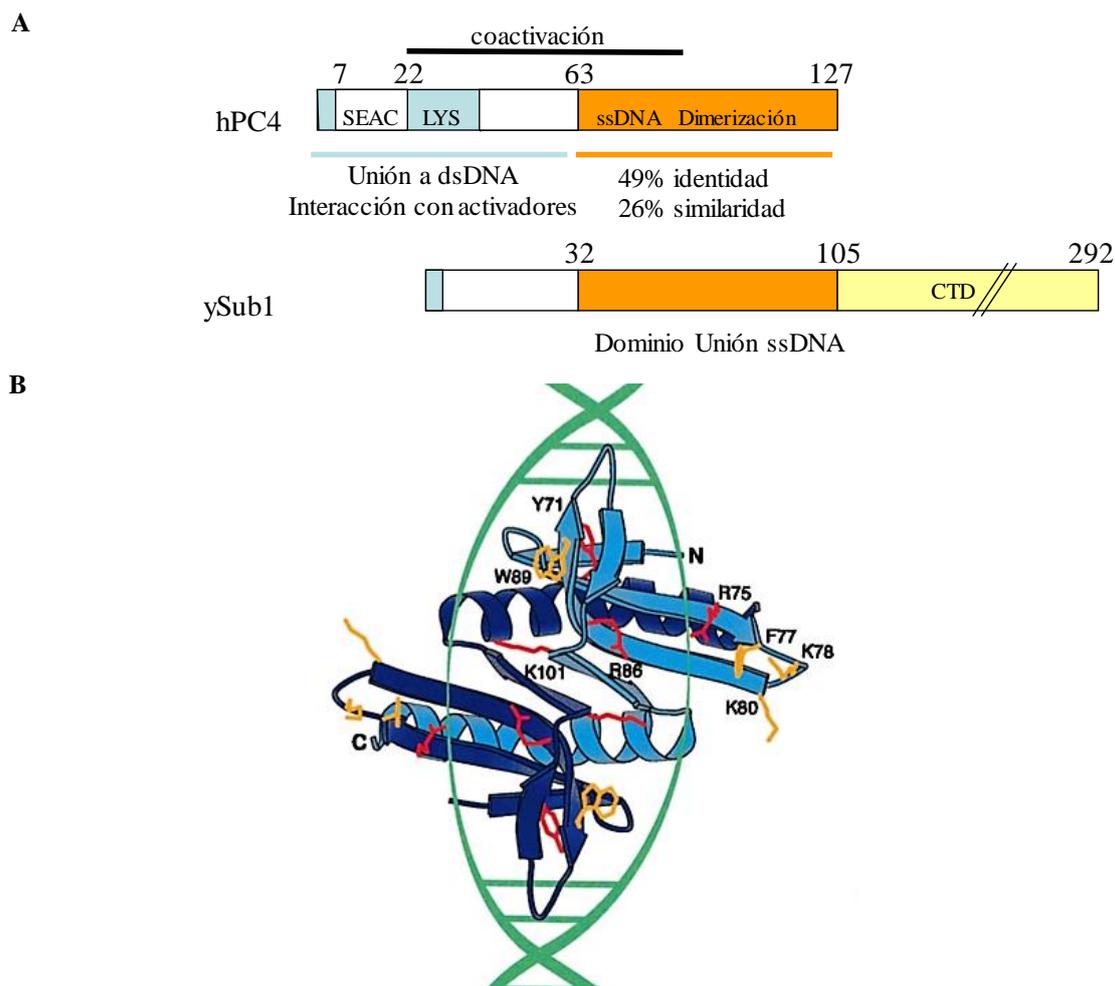


Figura 5I. Comparación de secuencias entre Sub1 y PC4. (A) Esquema ilustrativo de las posiciones relativas de los diferentes dominios de Sub1 en levadura (ySub1) y PC4 en humanos (hPC4). (B) Modelo esquemático que muestra el modelo de interacción de PC4, como dímero (en azul), y el dsDNA (en verde). Se muestran residuos relevantes en la asociación PC4-dsDNA, como por ejemplo W89 (tomado de Werten *et al.*, 1999).

En términos comparativos, ortólogos de PC4 se han hallado en todos los genomas eucariotas secuenciados hasta la fecha (Huang *et al.*, 2015). Una de estas proteínas ortólogas que podría aportar nuevos datos sobre la biología de la familia Sub1/PC4, es el cofactor de transcripción MoSub1 perteneciente al hongo patógeno *Magnaporthe oryzae* (Huang *et al.*, 2012), donde actúa como factor general que controla su desarrollo. Su estructura cristalina fue resuelta y reveló que tiene un dominio de unión a DNA en su extremo N-terminal similar al de Sub1/PC4. La superposición de los C α (carbonos-alfa) de MoSub1 con los de las estructuras de PC4 y PC4-ssDNA reveló el alto grado de homología estructural entre ellos. Además, los puentes de hidrogeno y las interacciones salinas en la superficie de dimerización están formados por residuos conservados en

PC4. De hecho, se ha sugerido que al menos dicha superficie se conserva en los tres factores de transcripción PC4, Sub1 y MoSub1 (Huang *et al.*, 2012). Por otra parte, el sitio de unión a DNA de MoSub1 fue predicho por superposición de su estructura a la de PC4-ssDNA (Werten & Moras, 2006), donde los aminoácidos críticos en la interacción con el DNA conservan posiciones similares entre ambos. Los residuos que, como mencionamos anteriormente, son determinantes en la unión de la proteína al DNA (F77 y W89 entre otros, según numeración de PC4), también se encuentran altamente conservados con respecto a MoSub1. Sin embargo, este factor contiene un segmento de residuos carboxilo terminales no conservado, pero que está presente en Sub1. Por lo tanto, en la extensión carboxilo-terminal de estas proteínas podrían residir las diferencias funcionales encontradas entre PC4 y Sub1 (Huang *et al.*, 2012).

Sorprendentemente, hace poco se han encontrado homólogos no eucariotas de PC4. Empleando las herramientas para alineación de secuencias genómicas a partir del dominio de unión a ssDNA de PC4, se halló que la *Archea* metanógena *Methanosaeta harundinaceae*, posee un gen con un 29,2% de identidad con respecto al mismo dominio de la versión humana. Otros 51 posibles homólogos fueron detectados en genomas de eubacterias con un 12-35% de identidad de secuencia aminoacídica (residuos 63-127) con respecto al dominio humano en cuestión. Incluso, se reportaron 8 posibles homólogos codificados en genomas de bacteriófagos, aunque con discutible significación estadística. Entre ellos, el bacteriófago T5 (Steigemann *et al.*, 2013; Werten *et al.*, 2016). Estas homologías recientes podrían arrojar luz sobre la función y evolución de estas proteínas de unión a DNA.

1.3.2. Características funcionales de PC4.

Las proteínas de unión a ssDNA juegan un papel clave en la mayoría de los procesos metabólicos asociados al DNA (Kodadek, 1998). Estas proteínas son halladas en burbujas de replicación, intermediarios de la recombinación, y sitios de daño en el DNA, donde en general protegen de la reasociación y degradación de las cadenas, y favorecen el reclutamiento de enzimas para la síntesis y reparación del DNA. Una proteína modelo de estas características es la proteína de replicación A (RPA) (Fanning *et al.*, 2006; Richard *et al.*, 2009). En esta categoría de proteínas encontramos a los coactivadores Sub1/PC4.

La denominación de PC4 (*Positive Coactivator 4*) viene dada por su propiedad como coactivador positivo necesario para la transcripción en sistemas reconstituidos *in vitro* (Ge & Roeder, 1994; Kretzschmar *et al.*, 1994). Sin embargo, su papel en este sistema es dual: PC4 puede activar la transcripción a bajas concentraciones, pero la inhibe en altas concentraciones (Fukuda *et al.*, 2003; Ge & Roeder, 1994; Werten, Stelzer, *et al.*, 1998). Dicha inhibición se ve aliviada cuando se incrementan los niveles de los factores de transcripción TFIIH o TFIID (Fukuda *et al.*, 2003; Wu & Chiang, 1998). La actividad reguladora de PC4 podría estar basada en su interacción directa con el factor de transcripción TFIIA y con su unión no específica con la hebra doble de DNA a través de una región rica en lisinas (Kaiser *et al.*, 1995; Werten, Stelzer, *et al.*, 1998). Está ampliamente aceptado que PC4 juega un rol fundamental en la transcripción mediante su asociación directa con varios activadores transcripcionales (Akimoto *et al.*, 2014; Thomas & Chiang, 2006). Además, PC4 también parece tener una elevada afinidad por el DNA de cadena sencilla, aunque notablemente su dominio conservado de unión a DNA ha demostrado ser prescindible para la activación de la transcripción (Werten, Stelzer *et al.*, 1998). La estructura cristalina del complejo PC4-ssDNA ha sido resuelta, mostrando que PC4 forma homodímeros e interactúa con una región de 5 nucleótidos en dos hebras opuestas de DNA (Brandsen *et al.*, 1997; Werten, Stelzer, *et al.*, 1998; Werten & Moras, 2006).

Otras funciones ya conocidas de PC4 lo relacionan con la terminación y la reiniciación de la transcripción por la RNAP III (Wang & Roeder, 1998), así como en respuesta al daño al DNA (ver sección 1.3.4.-1.3.5.). Recientemente, se ha demostrado en sistemas reconstituidos *in vitro*, que la activación transcripcional de la RNAPIII por el factor p300, es fuertemente dependiente de PC4 mediante la estabilización del factor general de la iniciación TFIIC al DNA en regiones promotoras y terminadoras de los genes de los tRNAs (Mertens & Roeder, 2008). Por último y más recientemente, nuevas funciones están emergiendo con respecto a la participación de PC4 en la estabilidad genómica (Lopez *et al.*, 2017; Mortusewicz *et al.*, 2008; Mortusewicz *et al.*, 2016).

1.3.3. Características funcionales de Sub1.

Cuando Sub1 fue identificado y caracterizado por primera vez, sólo se le adscribieron funciones relacionadas con la iniciación de la transcripción, debido en gran medida a la homología que comparte con la proteína humana PC4 (Henry *et al.*, 1996).

Inicialmente, se describió que su expresión en alto número de copias era capaz de suprimir los defectos de crecimiento de varios mutantes de TFIIB, codificado por el gen *SUA7*. Además, se observó que la delección de *SUB1* en combinación con mutaciones en *SUA7*, es letal sintética (Knaus *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1999). Posteriormente, se demostró *in vitro* que Sub1 interacciona físicamente con TFIIB y con TBP de manera excluyente y que, al menos *in vitro*, la interacción Sub1-TFIIB es más fuerte cuando Sub1 está defosforilado, cuando también es más fuerte su afinidad por el DNA (Henry *et al.*, 1996; Knaus *et al.*, 1996). Estos primeros trabajos indicaban que Sub1 está formando parte de la maquinaria de transcripción basal, asociada a los promotores durante la iniciación, como su ortólogo humano. En base a esto se propuso un modelo según el cual Sub1 podría actuar como un factor que podría promover la salida del TFIIB del complejo de transcripción tras la iniciación, al interrumpir la unión de éste con la proteína TBP (Knaus *et al.*, 1996). Años más tarde se demostraría que, de hecho, Sub1 es un componente funcional del PIC (Sikorski *et al.*, 2011) y que participa en la selección del TSS (Braberg *et al.*, 2013). Sin embargo, Sub1 difiere de PC4 en al menos dos cuestiones. Ambos tienen papeles positivos y negativos en la iniciación de la transcripción, pero mientras que el efecto estimulador de PC4 requiere de un activador adicional (Malik *et al.*, 1998), Sub1 activa directamente la transcripción de la RNAPII *in vitro*. En segundo lugar, Sub1 interactúa con TFIIB, pero no con el TFIIA, lo que sí hace PC4 (Ge & Roeder, 1994; Knaus *et al.*, 1996). Los motivos de estas diferencias son aún desconocidas, pero sería razonable buscarlas en las estructuras y las funciones de los dominios particulares que los diferencian.

De manera interesante, estudios posteriores develaron que Sub1 está implicado en otras etapas diferentes a la de iniciación de la transcripción. En el año 2001 se descubrió que Sub1 interacciona y participa junto con el factor de poliadenilación Rna15, en la terminación de los pre-mRNAs, y que esta interacción está evolutivamente conservada en las proteínas homólogas humanas PC4 y CstF64, respectivamente (Calvo & Manley, 2001). Ambas proteínas, Sub1 y Rna15, se asocian a los promotores y viajan con el complejo de transcripción a lo largo de los genes (Calvo & Manley, 2005), por lo que se ha propuesto una función de anti-terminación para Sub1, probablemente impidiendo la terminación/poliadenilación temprana durante la transcripción (Calvo & Manley, 2001). De esta manera, Sub1 fue uno de los primeros factores identificados, además de la propia RNAPII, que participa en la coordinación de las distintas etapas de la transcripción, constituyendo un nexo entre procesos que tienen lugar en el promotor con

aquellos que ocurren en las regiones 3' de los genes. Más tarde, estos hallazgos fueron corroborados cuando se encontró que Sub1 también interacciona con otro factor de terminación/poliadenilación, Pta1 (He *et al.*, 2003).

Posteriormente, se hallaron evidencias de que Sub1 es reclutado a los promotores de genes de expresión inducible, como el gen *IMD2* (IMP deshidrogenasa 2) que da respuesta a la carencia de GTP en la célula (Koyama *et al.*, 2008), o a genes que participan en la respuesta al estrés osmótico (Rosonina *et al.*, 2009). En el primer caso, es muy probable que Sub1 regule la transcripción del gen *IMD2* mediando la selección del sitio de inicio de la transcripción (Braberg *et al.*, 2013), dependiendo del pool celular de GTP y UTP. En el segundo caso, donde se relacionaba por primera vez a Sub1 con la respuesta a estrés, se observó que, en genes de expresión constitutiva Sub1 se asocia a los promotores génicos después de los GTFs. Sin embargo, tras la exposición celular a estrés osmótico, la asociación de Sub1 se redirecciona a genes de respuesta a este tipo de estrés donde promueve la unión de los GTFs (Rosonina *et al.*, 2009).

Por otra parte, nuestro grupo aportó evidencias que indican que Sub1 regula globalmente la fosforilación del dominio CTD de la RNAPII durante todo el ciclo de transcripción. Sub1 favorece la función de la quinasa de pre-iniciación Srb10, al mismo tiempo que inhibe la función de las quinasas de iniciación Kin28, y de elongación Bur1 y Ctk1. Así, puede afectar a los niveles de fosforilación del CTD de la RNAPII, ya sea de las Ser5 o Ser2, al modular la función de la quinasa Kin28, por un lado, y la de la quinasa Ctk1 y la fosfatasa Fcp1 por otro, respectivamente (García *et al.*, 2010). Recientemente, durante la escritura de esta Tesis, y posteriormente a la obtención de los resultados aquí presentados, se ha descubierto que Sub1 interacciona con las subunidades Rpb4/7 de la RNAPII, que lo mantienen establemente asociado al PIC (Garavís *et al.*, 2017, revisado por Calvo, 2018), probablemente a través de su interacción con la región CT de Sub1. Además, se ha demostrado que se asocia a la fosfatasa de elongación, Fcp1 (Figura 6I). Todos estos resultados, en su conjunto, indican claramente que Sub1 tiene una función *aguas abajo* de la zona promotora, no descrita para PC4, corroborando el papel de Sub1 durante la elongación de la transcripción y arrojando luz sobre el mecanismo por el cual Sub1 puede actuar durante la iniciación y la elongación. Al respecto, hemos demostrado que Sub1 se asocia a lo largo de toda la secuencia génica y de forma dependiente de transcripción, influyendo en la interacción entre Spt5, con el que también se asocia, y la RNAPII. De esta manera

Sub1 es capaz de regular la elongación de la transcripción, influyendo principalmente en la tasa de elongación de la misma, lo que en conjunto señalan a Sub1 como un verdadero factor de elongación, regulando la tasa de transcripción y, en consecuencia, el *splicing* (García *et al.*, 2012). Además, de acuerdo con esto, recientemente se ha descrito la relación funcional de Spt5 y Sub1 en genes de respuesta a estrés osmótico controlados por el factor transcripcional Hot1 (Gomar-Alba & Del Olmo, 2016).

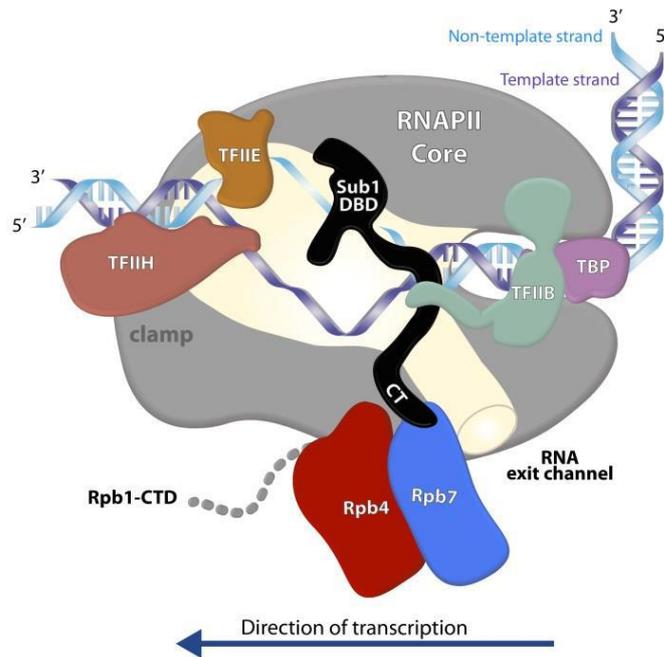


Figura 6I. Modelo esquemático mostrando la localización hipotética de Sub1 durante la iniciación y la elongación de la transcripción en base a los resultados obtenidos en Garavís *et al.*, 2017. Durante la iniciación, Sub1 está unido al promotor interactuando con el DNA *aguas arriba* en la unión entre DNA de cadena simple y doble a través de su dominio de unión a DNA (Sub1 DBD). La localización propuesta de Sub1 en este modelo explica la interacción física y genética informada de Sub1 con los GTFs TFIIB, TFIIE y TFIIF. La región CT, intrínsecamente desordenada de Sub1 (Sub1 CT) puede extenderse para interactuar directamente con Rpb4/7 y así mantener a Sub1 establemente asociado a los promotores génicos durante la iniciación (tomado de Garavís & Calvo, 2017).

Con el advenimiento de la genómica funcional, se realizaron nuevos aportes a la biología de Sub1. Además, de demostrar su papel en la selección del TSS por la RNAPII ya comentado (Braberg *et al.*, 2013), se evidenció que Sub1 también participa en la transcripción por la RNAPIII. Como en el caso de la RNAPII, Sub1 actúa en diferentes etapas del ciclo transcripcional de la RNAPIII, al estimular la iniciación y reiniciación de la transcripción *in vitro*, posiblemente por medio de su interacción con factores de transcripción de esta polimerasa (Tavenet *et al.*, 2009). Debido a la importancia de esta función, no es raro que se trate de una actividad conservada, ya que como adelantamos anteriormente, la versión humana PC4 también tiene un rol en la

terminación y la reiniciación de la transcripción por la RNAPIII (Mertens & Roeder, 2008; Wang & Roeder, 1998).

Interesantemente, Sub1 se asocia a los promotores de todos los genes relacionados con la maquinaria de síntesis de proteínas (genes de RNA ribosomales, tRNAs y genes de las proteínas ribosomales) (Tavenet *et al.*, 2009). La expresión de estos genes representa aproximadamente el 80% de la transcripción nuclear que ocurre en las células en crecimiento activo, y que son fuertemente reprimidos cuando las células entran en fase estacionaria. La delección de *SUB1* se correlaciona con la disminución de la eficiencia de la transcripción de la RNAPIII, aunque no afecta la tasa de crecimiento de las células en fase exponencial (Acker *et al.*, 2014). De hecho, Sub1 ha sido descrito como un efector de la RNAPIII por su requerimiento para una óptima reactivación de la transcripción en la etapa de recuperación, lo que es experimentado por células que sufren estrés nutricional. Así, una posibilidad es que el rol de Sub1 en la transcripción sea especialmente importante para una serie de genes determinados, como los relacionados con la síntesis de proteínas, o con circuitos regulatorios específicos, como son los de la respuesta a estrés osmótico o disponibilidad de nucleótidos como el caso del gen *IMD2* (Acker *et al.*, 2014; Gomar-Alba & Del Olmo, 2016; Koyama *et al.*, 2008; Rosonina *et al.*, 2009). Cabe resaltar que Sub1/PC4 pertenecen a un grupo muy reducido de factores que participan en la transcripción tanto de la RNAPII, como de la RNAPIII. Entre estos encontramos al GTF TFIIS, a factores específicos como los supresores tumorales de la proteína retinoblastoma (pRB) y p53, Myc, varios complejos modificadores de la cromatina como histonas acetilasas y desacetilasas, y a factores de transcripción asociados a la RNAP II que se han encontrado también en genes de clase III (Yox1, Fkh1, Reb1, Yap6) (Acker *et al.*, 2013; Gjidoda & Henry, 2013; Rosonina *et al.*, 2009; Tavenet *et al.*, 2009; White, 2011). Actualmente, se desconoce si Sub1 podría también actuar como un regulador de la transcripción de la RNAPI. Sin embargo, en base al peso de los datos disponibles, es claro que el rol de Sub1 en la regulación de la transcripción en particular, y en la expresión del genoma en general, es más complejo e importante de lo previsto.

Hasta el momento se desconocían en gran medida los mecanismos por los que Sub1 participa en todos estos procesos, aunque nuevas evidencias obtenidas en nuestro laboratorio, y que discutiremos más adelante a lo largo de esta Tesis, nos permitirá elucidar dichos mecanismos.

1.3.4. Sub1 y la respuesta a estrés.

La mayoría, sino todas las formas de estrés exógeno o endógeno terminan por afectar las propiedades de las macromoléculas intracelulares, de las que no está exento el DNA. Por su importancia obvia, las células cuentan con un complejo abanico de mecanismos para tolerar o reparar este tipo de daño. Siendo Sub1 una proteína de unión a DNA no específica de secuencia, no sorprende encontrarla relacionada con mecanismos de respuesta al daño al DNA. En este sentido, se ha vinculado a Sub1/PC4 con varios procesos reparativos específicos, como las lesiones directas en el DNA (Batta *et al.*, 2009; Mortusewicz *et al.*, 2008; Yu & Volkert, 2013) y el daño oxidativo (Wang *et al.*, 2004). Además, se le ha relacionado con el estrés osmótico (Rosonina *et al.*, 2009; Gomar-Alba & Del Olmo, 2016).

Para el caso del daño debido a ROS (Especies Reactivas del Oxígeno), se ha mostrado que PC4 y Sub1 confieren resistencia al peróxido de hidrógeno, evitando la aparición de mutagénesis oxidativa, espontánea e inducida. Específicamente, cuando se expresaron mutantes de delección de PC4 en bacterias con un fenotipo propenso a sufrir mutaciones oxidativas, se mostró que la actividad de resistencia a la oxidación conferida por PC4 a estas células, es dependiente de su capacidad de unión a ssDNA. Debido a esto, se propuso que la propiedad anti-mutadora de PC4, y por comparación la de Sub1, residía en el dominio de unión a DNA, ya que aquellas versiones de la proteína con mutaciones con pérdida de función en dicho dominio no mostraron el fenotipo de resistencia de la cepa silvestre (Wang *et al.*, 2004). Estos autores, sugirieron que Sub1 confiere a las células resistencia al daño oxidativo inducido por H₂O₂ en levaduras, y PC4 confiere resistencia a mutaciones espontáneas en bacterias, respectivamente (Wang *et al.*, 2004).

En el mismo sentido y con respecto a las lesiones en el DNA, el mutante de delección *sub1Δ* ha mostrado un defecto severo en la reparación de roturas de plásmidos linearizados transformados, mientras que es totalmente capaz de reparar roturas cromosómicas. Esta capacidad diferenciada sugiere que *SUB1* es requerido para la reparación mediante NHEJ o recombinación de extremos no homólogos (*Non-Homologous End Joining*), en plásmidos, pero no en cromosomas (Yu & Volkert, 2013). El rol prescindible de Sub1 en la reparación cromosómica sugiere que este coactivador no es un componente imprescindible del *core* central de proteínas que constituyen la vía de reparación por NHEJ (Yu & Volkert, 2013).

Por otra parte, cuando las células son sometidas a condiciones de elevada osmolaridad, muchos genes de respuesta son activados por varios factores de transcripción diferentes controlados por la quinasa Hog1 (de Nadal *et al.*, 2002; Hohmann, 2015). Uno de esos factores es Hot1, que regula la biosíntesis de glicerol como respuesta protectora frente a estas condiciones, al facilitar el reclutamiento de la RNAPII a los promotores de los genes correspondientes (Gomar-Alba *et al.*, 2015). En células *hog1Δ*, se ha mostrado que Sub1 es reclutado rápida y específicamente a los promotores de un subconjunto de estos genes, modulando su transcripción (Rosonina *et al.*, 2009). Más recientemente, se ha demostrado que es el factor de transcripción Hot1 el que recluta a Sub1 a los genes de respuesta a estrés osmótico, e influye en la asociación tanto de Sub1, como de Spt4/5 a las regiones codificantes de estos genes (Gomar-Alba & Del Olmo, 2016), confirmando nuevamente la participación de Sub1 en la elongación de la transcripción (García *et al.*, 2012).

La cascada de apareamiento sexual en levaduras (*mating pathway*) es también un poderoso sistema para estudiar las vías de activación de quinasas y la regulación de la transcripción. En este sistema, Sliva y col. (Sliva *et al.*, 2016) realizaron un complejo trabajo de escrutinio a escala global combinando la separación por citometría de flujo de mutantes con genes reportero, con Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP) y secuenciación masiva. Estos pudieron identificar nuevos mutantes con patrones alterados en la expresión de los genes involucrados en esta vía, en respuesta a las feromonas de apareamiento o al crecimiento vegetativo. Notablemente, identificaron que en células *sub1Δ* la transcripción basal de algunos de estos genes se encuentra incrementada, pero en condiciones de inducción no se encontraron diferencias en los niveles de RNA con respecto al *wt*. La explicación de este fenómeno sería la misma que para la regulación del gen *IMD2* por Sub1: la selección del TSS de los genes involucrados en esta cascada en cuestión (Braberg *et al.*, 2013). Más aún, realizaron el primer ChIP-Seq de Sub1, mostrando que se une al promotor de aproximadamente la mitad de los genes en el genoma bajo condiciones de crecimiento vegetativo, y significativamente se identificaron genes sobreexpresados y reprimidos en comparación con la cepa silvestre. De forma similar, Gupta y col. (Gupta *et al.*, 2015), describieron que cuando las células sufren deprivación de nutrientes, disminuyen los niveles de Sub1, lo que las lleva a inducir genes de esporulación. Por lo tanto, estos datos no solo otorgan a Sub1 un papel en la regulación de los genes inducibles por feromonas o

crecimiento vegetativo, sino que sitúan a este coactivador dentro de amplios circuitos regulatorios de respuesta frente a estímulos ambientales.

1.3.5. Sub1/PC4 y el mantenimiento de la estabilidad genómica.

En eucariotas, la información genética está contenida en el dsDNA, esencialmente porque el dsDNA es más estable y menos propenso a las mutaciones que el ssDNA. Sin embargo, el uso de la información genética exige desenrollar el DNA duplex, lo que resulta en la inevitable exposición de ssDNA en muchos procesos celulares, incluyendo la transcripción, replicación y recombinación. Por lo tanto, el ssDNA es probablemente una de las estructuras intermediarias del DNA más abundantes e importantes en la célula. El ssDNA sin protección es bastante susceptible a la degradación nucleolítica y al ataque químico y, por lo tanto, un buen sustrato para las mutaciones. Con el fin de evitar dichas mutaciones, en el transcurso de procesos celulares dependiente de ADN, las proteínas de unión a ssDNA (ssDBPs) cubren y protegen al ssDNA, evitando así su daño (Liu & Huang, 2016; Wu *et al.*, 2016).

Estas ssDBPs no solo están involucradas en mecanismos reparativos contra estímulos específicos, sino que tienen una función más general al participar en el mantenimiento de la estabilidad genómica. Pueden unirse a ssDNA independientemente de su secuencia y con alta afinidad. Así, las ssDBPs interactúan con otras proteínas y con el ssDNA formando complejos que favorecen otros procesos, además de la reparación propiamente dicha, como la recombinación (Broderick *et al.*, 2010; Marceau, 2012). Este es el caso del ya conocido complejo RPA, que juega un papel crucial en el metabolismo del DNA eucariota. Por ejemplo, RPA está implicado en una variedad de vías de reparación del ADN, que incluyen la reparación por escisión de nucleótido (NER, *Nucleotide Excision Repair*), la reparación por escisión de base (BER, *Base Excision Repair*), la reparación de bases mal apareadas (MMR, *Miss Macht Repair*), las roturas de doble cadena en el DNA (DSBs, *Double-Strand Breaks*), y la reparación por recombinación (Broderick *et al.*, 2010; Liu & Huang, 2016; Marceau, 2012; Wu *et al.*, 2016). Solamente un trabajo hasta el momento ha implicado a RPA en la transcripción. En este trabajo se observó que en *S. cerevisiae*, el reclutamiento de RPA a los promotores de los genes aumenta en ausencia de Sub1 o de un dominio funcional de

unión a DNA, sugiriendo que RPA y Sub1 compiten por un sitio común de unión durante la transcripción (Sikorski *et al.*, 2011).

Por otra parte, se ha mostrado que en ausencia de Sub1, cuando se somete a las células a mutagénesis por desaminación, ésta se concentra especialmente en los promotores de los genes, sugiriendo que Sub1 protege al DNA en estas regiones cuando se encuentran como ssDNA durante la iniciación de la transcripción (Lada *et al.*, 2015). Esto coincide con el papel de Sub1 en el mantenimiento de la burbuja de transcripción abierta, mediante su unión a la hebra de DNA no molde como lo sugirieron Sikorski y col. (2011).

En el caso de PC4, éste también parece tener un papel en la replicación del DNA (Mortusewicz *et al.*, 2016; Pan *et al.*, 1996) y en la condensación de la cromatina (Das *et al.*, 2006; Das *et al.*, 2010). Además, se ha mostrado que PC4 es fosforilado por las quinasas Aurora, señalando que tendría un papel durante la progresión del ciclo celular (Dhanasekaran *et al.*, 2016), y en la activación de la proteína supresora de tumores p53. Por lo tanto, PC4 en sí mismo, podría actuar como un verdadero supresor de la actividad de tumores (Banerjee *et al.*, 2004; Batta & Kundu, 2007; Batta *et al.*, 2009; Kishore *et al.*, 2007), ampliando el espectro de acción de esta proteína.

Por último, muy recientemente, se ha descubierto una novedosa función para Sub1 y PC4. Ambas proteínas, como las ssDBPs, tienen la capacidad de reconocer las estructuras formadas en el DNA que se conocen como G-cuádruplex (Gao *et al.*, 2015; Lopez *et al.*, 2017). Sub1 específicamente, se localiza *in vivo* en el DNA-G4 que se forma co-transcripcionalmente, contribuyendo a la supresión de la inestabilidad genómica inducida por estas estructuras durante la transcripción activa (Lopez *et al.*, 2017). Se ha propuesto que Sub1 suprime la inestabilidad genómica asociada a G4, facilitando el reclutamiento de la helicasa Pif1 para resolver estas estructuras. Claramente, las proteínas de unión a DNA, como Sub1, son esenciales en el mantenimiento de la estabilidad genómica y de los procesos que dependen de esta, como por ejemplo la transcripción.

2. OBJETIVOS

1. Estudiar la participación del dominio de unión a ssDNA y la región carboxilo-terminal de Sub1, en su asociación a la cromatina y en la elongación transcripcional.
2. Investigar si Sub1 participa en la respuesta a distintas formas de estrés severo y/o en la supervivencia celular.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material Biológico.

Para la realización de esta Tesis doctoral se ha empleado como modelo de estudio la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Diferentes cepas de la bacteria *Escherichia coli* se han utilizado como herramienta de biología molecular en experimentos de clonación y amplificación de plásmidos.

6.1.1. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

La mayoría de las estirpes utilizadas, exceptuando algunas cedidas por otros laboratorios, se construyeron en los fondos genéticos W303 (*Mat a/α ade2-1 his 3-11,15 leu2-3,112, trp1-1, ura3-1*) (Thomas & Rothstein, 1989) y BY4741/BY4742 (*Mat a his3Δ1 leu2ΔO met15ΔO ura3ΔO/ Mat a his3Δ1 leu2ΔO lys2ΔO ura3ΔO*) (Baker Brachmann *et al.*, 1998). Las cepas utilizadas se especifican en la Tabla 3.

6.1.2. Cepas de *Escherichia coli*.

Gran parte de los experimentos con bacterias se realizaron con la cepa DH5α [F-*endA1 gyr96 hsdR17 ΔlacU169 (f80lacZΔM15) recA1 relA1 supE44-thi-1*] (Hanahan, 1983). La amplificación de los vectores con mutaciones en el dominio de unión a DNA de Sub1, se hizo con DH10α, derivada de la cepa DH5α [F-*mcrA (mrr-hsd RMS101 mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Strr) endA1 nupG fhuA::IS2*].

6.2. Plásmidos.

En la Tabla 4 se detallan los plásmidos que se emplearon para la obtención de módulos de integración con los que se transformaron las células de levadura, para la construcción de mutantes de delección o para el etiquetado de proteínas. También, se recogen los plásmidos utilizados para el ensayo *GLAM* y los empleados para las demás construcciones llevadas a cabo en el transcurso de este trabajo.

6.3. Medios de Cultivo.

6.3.1. Medios de cultivo para levaduras.

-Medio rico YEPD (Yeast Extract-Peptone-Dextrose): 1 % (p/v) de extracto de levadura, 2 % (p/v) de bacto-peptona y 2 % (p/v) de glucosa.

-Medio rico YEPD+KAN: 1% (p/v) de extracto de levadura, 2 % (p/v) de bacto-peptona y 2 % (p/v) de glucosa, suplementado con 200ug/ml de disulfato de G418.

-Medio rico YEP-Gal: 1 % (p/v) de extracto de levadura, 2 % (p/v) de bacto-peptona y 2 % (p/v) de galactosa.

-Medio SC: 0,67 % (p/v) de bases nitrogenadas (YNB) sin aminoácidos, 2 % (p/v) de glucosa y 0,2 % (p/v) de *dropout mix* selectivo. El *dropout mix* es una combinación definida de suplementos como aminoácidos y bases nitrogenadas, entre otros componentes, como se detalla a continuación, excepto el/los suplemento/s de selección de la/s auxotrofía/s correspondiente/s (Tabla 2).

Tabla 2. Composición específica del *dropout mix*.

| <i>Dropout mix</i> | | | |
|--------------------|-------|----------------------------------|--------|
| Adenina | 0,5 g | Leucina | 10,0 g |
| Alanina | 2,0 g | Lisina | 2,0 g |
| Arginina | 2,0 g | Metionina | 2,0 g |
| Asparagina | 2,0 g | Ácido <i>para</i> -aminobenzoico | 2,0 g |
| Ácido aspártico | 2,0 g | Fenilalanina | 2,0 g |
| Cisteína | 2,0 g | Prolina | 2,0 g |
| Glutamina | 2,0 g | Serina | 2,0 g |
| Ácido glutámico | 2,0 g | Treonina | 2,0 g |
| Glicina | 2,0 g | Triptófano | 2,0 g |
| Histidina | 2,0 g | Tirosina | 2,0 g |
| Inositol | 2,0 g | Uracilo | 2,0 g |
| Isoleucina | 2,0 g | Valina | 2,0 g |

Cuando fue necesario, los medios se suplementaron con los aminoácidos apropiados en función de las auxotrofías de las cepas utilizadas y en las siguientes

proporciones: 3 ml/L o 0,1 ml/placa de histidina-HCl 100 mM, 10 ml/L o 0,2 ml/placa de isoleucina-valina 50 mM, 20 ml/L o 0,2 ml/placa de leucina 100 mM, y 10 ml/L o 0,1 ml/placa de triptófano 40 mM. En el caso de las cepas auxótrofas para uracilo y adenina, los medios se suplementaron con las siguientes concentraciones: 10 ml/L o 0,25 ml/placa de uracilo 20 mM, y 15 ml/L o 0,2 ml/placa de adenina 10 mM. La preparación de los medios se llevó a cabo utilizando agua destilada. En el caso de medios de cultivo sólidos, se añadió agar en una concentración final del 2%.

6.3.2. Medios de cultivo para bacterias.

-Medio rico LB (Luria-Bertani): 0,5 % (p/v) de extracto de levadura, 1 % (p/v) de bacto-triptona y 1 % (p/v) de NaCl.

-Medio rico LB+Ampicilina: medio LB suplementado con ampicilina sódica a una concentración final de 100 µg/ml añadida tras el autoclavado.

-Medio rico Glicerol-Extracto de Levadura-Triptona (GYT): 10 % (v/v) de glicerol, 0,125 % (p/v) de extracto de levadura y 0,25 % (p/v) de triptona.

La preparación de los medios se llevó a cabo utilizando agua destilada. En el caso de los medios de cultivo sólidos, se añadió agar a una concentración final del 2 %.

6.4. Condiciones de crecimiento.

Para casi todos los experimentos, los preinóculos de levadura crecieron hasta saturación toda la noche a 28 °C en YEPD o SC dependiendo de la cepa en particular. Los inóculos correspondientes se mantuvieron en las mismas condiciones de temperatura y con agitación de 200 rpm y salvo que se indique lo contrario, se incubó hasta que los cultivos alcanzaron la fase exponencial de crecimiento. Para ello se controlaron mediante la medición de absorbancia por espectrofotometría a 600 nm (OD_{600nm}). En algunos experimentos, como se detalla más adelante, los cultivos fueron sometidos a estímulos estresantes. Para provocar un choque térmico, el inóculo es crecido hasta una OD_{600nm} de 0.5, dividido en dos partes y centrifugado. Una parte es resuspendida medio de cultivo precalentado y mantenido a 37 o 50 °C durante tiempo variable según se indique, la otra parte utilizada como control fue resuspendida en medio fresco a 28 °C y tratada en forma paralela al inóculo problema. Para detener el estímulo, los inóculos fueron centrifugados nuevamente y resuspendidos en medio a 28

°C para realizar ensayos de viabilidad celular, o bien congelado rápidamente con hielo seco para la obtención de proteínas o ácidos nucleicos. En otros casos, se le agregó al medio de cultivo del inóculo en crecimiento H₂O₂ o NaCl en las concentraciones y tiempos señalados en los experimentos. En medio sólido, las temperaturas de incubación fueron de 25, 28 y 37 °C, las cuales se combinaron en algunos casos con las formas de estrés mencionadas, según se especifique.

Las bacterias se incubaron a 37 °C en todos los casos, salvo que se indique lo contrario.

6.5. Técnicas Genéticas.

6.5.1. Transformación de *Saccharomyces cerevisiae*.

Para la transformación de levaduras se siguió la técnica del acetato de litio descrito por Gietz y col. (Gietz *et al.*, 1995), y modificado según Amberg (Amberg & Strathern, 2005). Las células competentes se obtuvieron a partir de cultivos incubados en YEPD hasta una OD_{600nm} de 1.0 (~2x10⁷ células/ml). Se utilizaron 5 ml de cultivo para cada transformación y las concentraciones de DNA empleadas variaron desde 100 ng hasta 1-2 µg, según las necesidades de los experimentos. Para la selección de los transformantes, las células se plaquearon en medios SC selectivos. En el caso de la selección mediante marcadores de resistencia a G418, las células se incubaron 2 horas en YEPD a 28°C en agitación, previamente a su plaqueo en YEPD con G418 a una concentración final de 100 µg/ml.

6.5.2. Modificación génica en levaduras.

Las cepas originales de esta tesis se construyeron por métodos genéticos de cruzamientos o por reemplazamiento génico en el caso de tratarse de un gen no esencial, usando la técnica descrita por Longtine y col. (Longtine *et al.*, 1998). El reemplazamiento génico permite la delección de un gen o la adición de un epítipo en un solo paso. Como molde para la reacción de PCR, se utilizaron varios plásmidos que contienen distintos módulos o *cassettes* que codifican marcadores de selección (*TRP1*, *his5+*, *kan^r*) y/o distintos epítipos (HA, MYC, Flag) (Tabla 4). En la reacción se utilizaron como cebadores oligonucleótidos quimera que anillan en el gen diana que se quiere modificar y en los módulos correspondientes. El DNA amplificado se utilizó para

transformar las levaduras. Los reemplazamientos se comprobaron por PCR usando cebadores externos a la zona sustituida y que detectan el marcador génico utilizado para tal propósito. En el caso de la adición de epítomos, se utilizaron cebadores que anillan con el marcador de selección adyacente al epítomo y con el gen diana, respectivamente.

6.5.3. Transformación de *Escherichia coli*.

Un volumen de 25-100 μ l de células competentes DH5- α se mezcló con 100 pg-100 ng de DNA, y se incubaron en hielo durante 20 minutos. A continuación, se sometieron a un choque térmico de 2 minutos a 37 °C. Tras ello, se añadieron 400 μ l de medio LB y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Las células se recogieron por centrifugación y se sembraron en placas de LB+Amp.

6.5.4. Electroporación de *Escherichia coli*.

Siguiendo el método descrito por Dower y col. (Dower *et al.*, 1988), 10-100ng de DNA se mezclaron de 20-40 μ l de células electrocompetentes DH10- α previamente descongeladas en hielo. La mezcla se transfirió a cubetas de electroporación de 2 mm de separación entre electrodos, y se mantuvo durante unos minutos en hielo. Se fijó el electroporador en 2,5 mA (MicroPulser Electroporator, BioRad) y se dio un pulso de corriente a la cubeta de 3-5 ms. La mezcla se retiró de la cubeta a un tubo con 1ml de LB frío y se dejó incubando a 37 °C durante 1 hora. Luego se centrifugaron las células y se plaquearon en LB-agar con ampicilina, y se dejó a 37 °C hasta que se hicieron visibles las colonias transformadas.

6.5.5. Preparación de células competentes de *Escherichia coli*.

La preparación de células electrocompetentes fue adaptado de Ausubel (Ausubel, 2003). Partiendo de un inóculo de células DH10- α crecido durante toda la noche en medio LB, se realizó una dilución inicial en medio fresco de $OD_{600}=0.1$. El cultivo se mantuvo en agitación constante a 37 °C. Una vez que se alcanzó la $OD_{600}=0.4$, éste se transfirió a un baño frío durante 15 minutos para detener el crecimiento. A continuación, las células fueron lavadas 3 veces con glicerol al 10% centrifugando a 10.000 rpm durante 10 minutos y 4 °C cada vez. Para 1000 ml de cultivo, el *pellet* resultante se resuspendió en 2 ml de medio 2xGYT previamente frío y se congelaron

alícuotas de 100 μ l con nitrógeno líquido, para su almacenamiento. Las células competentes DH5 α fueron preparadas por el personal técnico del Instituto de Biología Funcional y Genómica, siguiendo el protocolo descrito por Kushner (Kushner, 1978).

6.6. Métodos de manipulación y análisis de Ácidos Nucleicos.

6.6.1. Aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli*.

Para la obtención de DNA plasmídico a pequeña escala se utilizó el sistema comercial Nucleospin® *Ready-to-use system for fast purification of nucleic acids* de Macherey-Nagel, siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.6.2. Aislamiento de DNA genómico de levadura.

La obtención de DNA genómico de levadura se realizó a partir de cultivos de 5ml de YEPD crecidos a 28°C durante toda la noche según Amberg (Amberg, DB; Strathern, 2005). Las células se recogieron por centrifugación y se lavaron con agua estéril. Al sedimento de células se añadieron 200 μ l de tampón de lisis (tritón X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH=8,0; EDTA 1 mM), 200 μ l de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y 200 μ l de perlas de vidrio de 45 μ m. La mezcla se agitó en el vórtex durante 4 minutos. Seguidamente, se añadieron 200 μ l de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM a pH=8,0) y se centrifugó a temperatura ambiente durante 5 minutos a 13.200 rpm. Se recogió la fase acuosa en un tubo nuevo, se añadieron dos volúmenes de etanol 96% (v/v) frío y se centrifugó a 4°C durante 5 minutos a 13.200 rpm. Se eliminó el sobrenadante por aspiración y el precipitado se resuspendió en 400 μ l de TE 1X. Posteriormente, se añadieron 3 μ l de RNasa A [10 mg/ml] y se incubó a 37°C durante 15 minutos, tras lo cual se añadieron 10 μ l de acetato amónico 4M y 1 ml de etanol 96% (v/v) frío, se mezcló por inversión y se centrifugó a 13.200 rpm durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se eliminó y el DNA precipitado se lavó con etanol al 70% (v/v). Finalmente, el DNA genómico se resuspendió en TE estéril y se guardó a -20°C hasta su utilización en los ensayos correspondientes.

6.6.3. Aislamiento de RNA total de levadura.

El ARN total de *S. cerevisiae* se preparó según el protocolo descrito por Schmitt y col. (1990). Las células se recogieron por centrifugación y se lavaron con agua estéril. Después se resuspendieron en 200 µl de tampón AE (NaAc 50mM, EDTA 10mM, pH=5,2), a los que se añadió 1/10 del volumen de SDS 10%. A esta mezcla se añadieron posteriormente 1,2 volúmenes de fenol ácido saturado calentado a 65 °C. Durante 5 minutos, la muestra se sometió a intervalos de 20 segundos de agitación en el vórtex, seguidos de 20 segundos de incubación a 65 °C, tras lo cual se congeló en hielo seco y seguidamente se centrifugó a temperatura ambiente durante 10 minutos a 8.000 rpm. Con la fase acuosa recuperada a un tubo nuevo, se repitió la extracción con fenol ácido caliente. Seguidamente, se realizó una nueva extracción con fenol ácido:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). El RNA se precipitó con 1/10 del volumen de AcNa 3 M pH=5,2 y 2 volúmenes de etanol 96% (v/v) frío. Se incubó en hielo seco durante al menos 20 minutos y se centrifugó a 4 °C durante 20 minutos a 13.200 rpm. Por último, el RNA se lavó con etanol 70% (v/v) y se resuspendió en 50 µl de agua. La concentración de RNA se determinó por espectrofotometría en un equipo NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific), analizando la absorbancia a 260 nm. La integridad del RNA se comprobó por electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (EtBr). El agua destilada y todas las soluciones acuosas utilizadas fueron previamente tratadas con DEPC al 0,1% (v/v) y autoclavadas.

6.6.4. Electroforesis de ácidos nucleicos.

La separación de fragmentos de DNA se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa. Dependiendo del tamaño de las moléculas a separar, se usaron geles de concentración de agarosa variable (0,8%-2% p/v) preparados en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM) y conteniendo EtBr (0,5 µg/ml). A las muestras se les añadió tampón de carga 6X (azul de bromofenol 0,25% (p/v), xilen cianol 0,25% (p/v), glicerol 30% (v/v)). Las separaciones electroforéticas se realizaron a voltaje constante (50-120V) en tampón TAE. Para visualizar el DNA mediante iluminación con luz UV, se utilizó el equipo Gel Doc XR (Bio-Rad) equipado con una cámara CCD para la captura de imágenes. Los tamaños de las moléculas se estimaron por comparación con el marcador de peso molecular *1Kb Plus DNA ladder* (Invitrogen). Para la electroforesis de RNA, se prepararon geles de agarosa de una concentración 1,8-2,0% en tampón TAE y con EtBr (0,5 µg/ml), en los que se cargó 1µg del RNA extraído. Las electroforesis se

realizaron a voltaje constante (70-110V) durante aproximadamente 40 minutos. En este caso, se prestó especial cuidado con el lavado de las cubetas de electroforesis, que se trataron previamente con SDS 1% (p/v).

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

Para la realización de PCRs de forma rutinaria en el laboratorio, se utilizaron dos polimerasas. La polimerasa *Expand High Fidelity PCR System* (Roche), para la amplificación con alta fidelidad de módulos de integración utilizados en la construcción de cepas; la polimerasa *KapaTaq Ready Mix DNA polymerase* (Kapa Biosystems) para la amplificación desde DNA genómico purificado, cDNA o incluso directamente desde una pequeña cantidad de biomasa de células (o colonias aisladas) de *S. cerevisiae*, para la comprobación de cepas y otros procedimientos frecuentes. Ambas enzimas se usaron según las recomendaciones del fabricante. En el caso de las PCRs de colonia, previamente estas se calentaron en un microondas durante 2 minutos a la máxima potencia para lisar la pared. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador T Personal (Biometra). La longitud de los ciclos de extensión y la temperatura de anillamiento fue variable, dependiendo del tamaño del fragmento a amplificar y de la temperatura de fusión de los oligonucleótidos (T_m), respectivamente.

6.6.6. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).

Las qPCRs correspondientes al estudio de la elongación transcripcional y para el análisis del DNA purificado en los experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se realizaron con el equipo *CFX96 Real-time System* (Bio-Rad).

Para la reacción de PCR se utilizaron los reactivos del paquete comercial SYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time) (Takara), siguiendo las instrucciones del fabricante y los requerimientos específicos de cada termociclador. El fluorocromo intercalante utilizado para la cuantificación del DNA de las muestras es el SYBR® Green. La reacción tipo constó de 1 ciclo de 30 segundos a 95 °C, 40 ciclos de 5 segundos a 95 °C para la desnaturalización, y 31 segundos a 60 °C para el anillamiento y la extensión, y un ciclo de disociación, para comprobar la obtención de un único producto de amplificación en la reacción.

La cuantificación se hizo mediante una recta patrón, donde se representa el ciclo umbral de amplificación exponencial (Ct) frente a la cantidad relativa de DNA. La recta se compone de 4 diluciones seriadas con un factor de 10 a partir de una muestra de DNA total. Para las cuantificaciones de los experimentos de CHIP se utilizó el DNA total correspondiente a una muestra INPUT. El primer punto suele ser una dilución 1/10 del INPUT. A cada punto de esta recta se le otorga un valor arbitrario a partir de los cuales el equipo estimará la cantidad de DNA presente en las muestras problema. Para el análisis de datos se utilizaron los programas Bio-Rad CFX Manager 2.0 (Bio-Rad).

6.6.7. Transcripción reversa (RT).

Para la síntesis de cDNA mediante RT, inicialmente se trataron 2 µg de RNA total con 0,5 µl de DNasa I (1 U/µl, Roche) por muestra, en un volumen final de 50 µl con el tampón recomendado por el fabricante. Las mezclas se incubaron a 37 °C durante 20 minutos. Para la síntesis de cDNA, se tomaron 200ng de RNA tratado con DNasa, y se usó el *kit* comercial *iScript™ cDNA Synthesis kit* (BioRad) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Para las PCR convencionales se utilizaron 0,5 µl de la reacción de RT. En las qPCR, a 5 µl de reacción se añadieron 20 µl de agua DEPC, y de esta dilución se usó 1,0 µl.

6.6.8. *Transcriptional run-on* o TRO: detección del RNA naciente

Los ensayos de *run-on* se realizaron según los protocolos descritos previamente (Calvo & Manley, 2001; Rodríguez-Gil *et al.*, 2010).

6.6.8.1. Run-on y extracción de RNA.

Las células se crecieron en 25 ml de medio rico YEPGal a 28 °C hasta alcanzar una OD_{600nm} de 0.3-0.4. Los cultivos se recogieron por centrifugación a 3.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Para su permeabilización, el sedimento de células se resuspendió en 5 ml de sarcosil 0,5% (p/v) y se volvió a centrifugar a temperatura ambiente a 3.000 rpm otros 5 minutos. Después, las células se transfirieron a un tubo de 1,5 ml, usando 1 ml de sarcosil 0,5% (p/v), y se volvieron a centrifugar hasta retirar completamente el sobrenadante. La transcripción se realizó resuspendiendo

las células en 60 µl de agua destilada estéril, añadiendo 79 µl de mezcla de transcripción (60 µl de tampón de transcripción 2,5X: Tris-HCl 50 mM, pH=7,7, KCl 500 mM, MgCl₂ 80 mM, 8 µl de una mezcla de rNTPs 10 mM cada uno, 3 µl de DTT 0,1 M, y 8 µl de ³²rUTP 3000 Ci/mmol) e incubando durante 5 minutos a 30 °C. La reacción se paró con 800 µl de agua DEPC fría y se centrifugaron las células para eliminar los nucleótidos no incorporados. Finalmente, se aisló el RNA total empleando el método ya descrito en secciones anteriores.

6.6.8.2. Hibridación, exposición y análisis.

El RNA marcado se utilizó para hibridar una membrana de nylon que contenía 8 sondas de DNA fijadas mediante *slot blot* y correspondientes a: 6 regiones de 300 pb de secuencia conocida del gen *YLR454w*, situadas la primera de todas en el ATG, y el resto a 0.5 Kb, 1 Kb, 2 Kb, 4 Kb, 6 Kb y 8Kb, DNA plasmídico, como control negativo; y una sonda correspondiente al rDNA 18S, como control positivo. Estas sondas se amplificaron por PCR, y se purificaron utilizando el kit comercial *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare). Antes de la hibridación de la membrana, el RNA se fragmentó añadiendo 25 µl de NaOH 0,2 N e incubándolo durante 5 minutos en hielo. Posteriormente se neutralizó con igual cantidad de HCl 0,2 N. Tras haber pre-hibridado la membrana durante 1 hora a 65 °C en una solución que contenía Na₂HPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM, y SDS 7% (p/v), pH=7,2, se realizó la hibridación con el RNA marcado e hidrolizado en 3 ml de la misma solución durante 24 horas a 65 °C. Después de la hibridación, se realizaron dos lavados de 20 minutos a 65 °C con una solución que contenía SSC1X y SDS 0,1% (p/v). Las membranas se expusieron durante 24 horas a -80°C, utilizando películas de autorradiografía. La señal radiactiva se capturó en pantallas radiosensibles (BAS-IP MS2040; Fujifilm), que se escanearon en un sistema Phosphorimager, *Personal Molecular Imager* (Bio-Rad). Las imágenes se analizaron y cuantificaron con el programa QuantityOne v4.6.6. (Bio-rad). Los valores obtenidos para cada sonda individual se sustrajeron del valor correspondiente al control negativo y se relativizaron respecto del control positivo. El valor obtenido se normalizó a su vez frente al valor correspondiente a la sonda ATG.

6.6.8.3. Fijación de sondas de DNA mediante *slot blot*.

Una membrana de Nylon *Nytran Super Charge* (Schleider&Schuell BioScience) de tamaño adecuado se colocó dentro de un dispositivo *Hybri-Slot* (Whatman Biometra), que contiene dos filas de doce pocillos en línea. En ocho de estos pocillos se cargaron 500 µl de una solución tampón SCC 6X (NaCl 3 M, citrato sódico 0,3 M, pH=7,0 ajustado con NaOH), que se hizo pasar a través de la membrana utilizando una bomba de vacío conectada al dispositivo de *slot blot*. Seguidamente, se repitió este mismo paso para las muestras de DNA (100 ng de DNA en SSC 6X en un volumen final de 400 µl, desnaturizado en un baño a 100 °C durante 10 minutos). Tras ello, la membrana se retiró del dispositivo y se incubó en una solución de desnaturalización (NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M) a temperatura ambiente durante 10 minutos, e inmediatamente después se transfirió a una solución de neutralización (NaCl 1 M, Tris-HCl 0,5 M, pH=7,0) y se incubó otros 5 minutos. La membrana se dejó secar sobre papel Whatman 3M y se irradió con 1200 J/m² de luz UV en una cámara *Stratalinker* (Stratagene) para la inmovilización del DNA.

6.6.9. Oligonucleótidos.

En la Tabla 4, se detallan los oligonucleótidos utilizados para llevar a cabo las PCR cuantitativas de los experimentos de ChIP, RT-PCR y TRO.

6.7. Métodos de manipulación y análisis de proteínas.

6.7.1. Obtención de extractos proteicos y cuantificación de proteínas.

La preparación de extractos proteicos en condiciones nativas se preparó en tampón de lisis con HEPES KOH 20 mM pH=7,6; acetato potásico 200 mM, glicerol 10% (v/v) y EDTA 1 mM, conteniendo inhibidores de proteasas y fosfatasa (cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma) dilución 1/10, PMSF 10 mM, NaF 10 mM, ortovanadato sódico 20 mM. La lisis celular se llevó a cabo por rotura mecánica), usando perlas de vidrio de 45 µm y un sistema Fast Prep. En el caso de los ensayos de co-inmunoprecipitación, la rotura celular se realizó también por lisis mecánica en nitrógeno líquido usando un sistema Freezer/Mill 6770 (Spex Sample Prep). La cuantificación de la concentración de proteínas en los extractos se estimó a partir de la

medida de absorbancia a 280 nm realizada por espectrofotometría en un NanoDrop 1000.

6.7.2. Inmunoprecipitaciones y co-inmunoprecipitaciones de proteínas.

Para los ensayos de inmunoprecipitación y co-inmunoprecipitación de proteínas, los extractos totales de proteínas en primer lugar se clarificaron, incubándolos durante 1 hora a 4 °C con 20 µl de proteína A-sefarosa (Amersham) equilibrada en tampón de lisis. Esta incubación se realizó para reducir las uniones inespecíficas. Posteriormente, se llevó a cabo una centrifugación para recuperar los sobrenadantes a un tubo nuevo. La inmunoprecipitación se realizó por incubación de 1-5 mg de extractos proteicos clarificados (en función de los niveles de expresión celulares de la proteína y de la calidad del anticuerpo) con el anticuerpo específico (concentración variable; normalmente 1 µg de anticuerpo por 1 mg de proteínas) y 20 µl de proteína A-sefarosa equilibrada en tampón de lisis. La incubación se realizó a 4 °C en un tiempo variable de 2-3 horas a toda la noche, tras lo cual se llevaron a cabo lavados sucesivos de las inmunoprecipitaciones con tampón de lisis. Por último, los inmunoprecipitados se y se analizaron mediante *Western Blot*.

6.7.3. Análisis por *Western Blot*.

Salvo que se indique lo contrario, el análisis de proteínas por *Western Blot* se realizó en condiciones desnaturalizantes utilizando geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). A los extractos proteicos se les añadió tampón de carga Laemmli 6X y se calentaron durante 5 minutos a 100 °C. La electroforesis se realizó a voltaje constante (70-120V) usando un tampón de carrera que contiene Tris-base 25 mM, glicina 250 mM y SDS 0,1% (p/v). Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore) por electrotransferencia húmeda a 200 mA, durante 2 horas en frío. El tampón de transferencia contiene Tris-base 50 mM, glicina 380 mM y metanol 10% (v/v). La membrana se bloqueó con leche en polvo 5% (p/v) en tampón PBS (NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂ PO₄ 10 mM, KCl 2,7 mM, pH=7,4), por incubación a temperatura ambiente durante 15 minutos. El anticuerpo primario se diluyó en una solución con leche en polvo 1 % (p/v) en PBS. El tiempo de incubación con el anticuerpo primario varió en función de las características particulares de cada

anticuerpo, desde 1 hora a temperatura ambiente a toda la noche a 4 °C. La membrana se lavó tres veces con PBS 1X durante 5 minutos. El anticuerpo secundario se diluyó en la misma solución utilizada para diluir el primario. La incubación se realizó a temperatura ambiente durante 30 minutos, seguida de 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X. Para la detección de las proteínas se utilizó el sistema de quimioluminiscencia de *Pierce® ECL Western Blotting Substrate* (Thermo scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los anticuerpos se detallan en la Tabla 6.

6.7.4. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).

Los experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se realizaron siguiendo el protocolo descrito en Calvo & Manley (2005) y García et al 2010, 2012).

6.7.4.1. Preparación y fijación del cultivo.

Se utilizaron células crecidas en medio rico YEPD o SC hasta una OD_{600nm} de 0.5-0.6 a 28 °C. Para las ChIP de Rpb1 o Sub1-HA en presencia de 6AU, las células se crecieron en medio SC sin uracilo hasta una OD_{600nm} de 0.5, momento en el que el cultivo se dividió en dos partes y se añadió la droga a una concentración de 50-100 µg/ml a una de ellas. Ambas mitades se incubaron durante 1 hora a 28 °C. Para unir covalentemente las proteínas al DNA, las células se fijaron por tratamiento con formaldehído al 1%, durante 20 minutos en agitación a temperatura ambiente. El entrecruzamiento se detuvo por adición de glicina a una concentración final de 360 mM, incubándose 5 minutos más. Por último, las células se centrifugaron a 5.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C y se lavaron dos veces con tampón TBS frío (Tris-HCl 20 mM pH=7,6; y NaCl 150 mM) y una vez con tampón de lisis FA (HEPES-KOH 100 mM, NaCl 300 mM, EDTA 2 mM, Tritón x-100 2% (v/v), deoxicolato sódico 0,2% (p/v), SDS 0,1% (p/v). En este punto las células se congelaron a -80 °C o se procedió a la preparación de los extractos y la fragmentación del DNA.

6.7.4.2. Preparación del extracto celular y fragmentación del DNA

Las células se resuspendieron en 500 µl de tampón de lisis con inhibidores de proteasas (cóctel de inhibidores (Sigma) dilución 1/10, PMSF 10 mM) y fosfatasa

(NaF 10 mM, ortovanadato sódico 20 mM). A continuación, se añadió un volumen de perlas de vidrio de 45 μm similar al volumen de sedimento celular y se lisaron las células en un sistema Fast Prep, realizando 5 pulsos de 30 segundos a 4,5 K, dejando las células 1 minuto en hielo en los intervalos entre los pulsos. Posteriormente, se eliminaron las perlas de vidrio por centrifugación. Se añadió 1 ml más de tampón de lisis con inhibidores al lisado celular y se sonicó en un sistema Bioruptor Plus TM (Diagenode) hasta fragmentar el DNA en fragmentos de un tamaño de 300-500 pb. A continuación, se centrifugó a 13.200 rpm durante 10 minutos a 4 °C, para eliminar los restos celulares y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se añadió sarcosil a una concentración final 1% (p/v) y se cuantificó la concentración de proteínas en un NanoDrop.

6.7.4.3. Inmunoprecipitación.

De manera estándar, se inmunoprecipitaron 20 mg de proteínas con el anticuerpo específico requerido en cada experimento concreto, con 20 μl de proteína A-sefarosa (Amersham), equilibradas con tampón de lisis. Tomamos 1/10 del volumen a inmunoprecipitar, como muestra control de DNA total (INPUT). Inicialmente, las inmunoprecipitaciones se realizaron incubando los extractos con los anticuerpos durante 3-4 horas a 4 °C en agitación suave. A continuación, se añadieron la proteína A y el ssDNA y se dejó incubando toda la noche en las mismas condiciones. Al finalizar, se realizaron dos lavados sucesivos de la resina con 1400 μl de tampón de lisis, un lavado con 1400 μl tampón de lisis con NaCl 500 mM, un lavado con 1400 μl del tampón de LiCl (Tris-HCl 10 mM pH=8,0, LiCl 250 mM, NP-40 0,5% (v/v), deoxicolato sódico 0,5% (p/v), EDTA 1 mM) y un lavado con 1400 μl de tampón TE. A todos los lavados les siguió una centrifugación en frío a 5000 rpm durante 30 segundos. Después del último lavado, la resina se resuspendió en 100 μl de tampón TE con 20 μg de RNasa A para digerir el RNA. En este punto, las muestras INPUT también se trataron con RNasa A. Posteriormente, las proteínas se eluyeron de la resina mediante dos incubaciones sucesivas con 250 μl de tampón de elución (NaHCO₃ 0,1 M, SDS 1% (p/v), durante 15 minutos a temperatura ambiente y en agitación. Las dos eluciones se juntaron en un mismo tubo. El volumen de las muestras INPUT se ajustó hasta 500 μl añadiendo tampón de elución.

6.7.4.4. Procesamiento del INPUT y del PRECIPITADO

Para revertir la fijación y separar las proteínas del DNA, las muestras se incubaron durante 6 horas a 65 °C. Tras ello, se digirieron las proteínas por adición de 25 µl de Tris-HCl 1M 10 µl de EDTA 0,5 M pH=8,0 y 20 µg de proteinasa K y posterior incubación a 37 °C durante 1 hora. Se realizó una extracción con 500 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), utilizando columnas Phase-lock (5-Prime) y por centrifugación a temperatura ambiente durante 5 minutos. La fase acuosa se recuperó a un tubo nuevo y se dejó precipitando toda la noche a -20 °C con 1/10 del volumen de acetato sódico 0,3 M pH=5,2; 2,5 volúmenes de etanol 96% (v/v) y 1 µl de glicógeno (Roche). Al finalizar, las muestras se centrifugaron a 13.200 rpm durante 30-40 minutos a 4 °C y el precipitado correspondiente se lavó con etanol 70% (v/v). El precipitado se secó por centrifugación en vacío y se resuspendió en 100 µl de TE. Por último, se realizó una purificación del DNA utilizando las columnas de purificación *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare), El DNA se eluyó de las columnas con 70 µl del tampón de elución. Se utilizó 1 µl de una dilución 1/20 de las muestras INPUT y 1 µl directamente de los precipitados para llevar a cabo las qPCRs.

6.7.4.5. Anticuerpos

Los anticuerpos usados en esta tesis se describen en la Tabla 6.

6.8. Ensayos de actividades enzimáticas.

6.8.1. Ensayo de actividad fosfatasa ácida y cálculo del *ratio GLAM*.

El ensayo de actividad fosfatasa ácida y el cálculo del *ratio GLAM* (*Gene Length-dependent Accumulation of mRNA*) se llevaron a cabo como describe Morillo-Huesca y col. (Morillo-Huesca *et al.*, 2006). Las células se crecieron a 28 °C en medio SC con galactosa 2% (p/v), como fuente de carbono, hasta una OD_{600nm} de 0.4. Las células se recogieron por centrifugación, se lavaron con agua y se resuspendieron en 1,5 ml de agua. El ensayo se llevó a cabo con 30 µl de la suspensión celular, más 70 µl de agua, 350 µl de tampón acetato sódico (acetato sódico 70 mM, pH=4,0) y 50 µl de para-nitrofenilfosfato (pNPP, 5 mg/ml), como sustrato de la reacción. La mezcla se incubó a

37 °C durante 10 minutos. La reacción se detuvo añadiendo 100 µl de TCA al 25% (v/v). Posteriormente, se añadieron 600 µl de Na₂CO₃ saturado (~3M) y se midió la absorbancia a 405 nm por espectrofotometría. Las unidades de actividad fosfatasa ácida se calcularon a través de la siguiente fórmula: Actividad fosfatasa ácida = (OD_{405nm} x 0.066) / (OD_{600nm} x V x t). Siendo 0.066 un factor de corrección; OD_{600nm}: la densidad óptica a 600 nm de una dilución 1/5 de la suspensión de células; V: volumen de células utilizado en el ensayo, en ml (en nuestro caso, 0.03ml) t: tiempo de reacción, en nuestro caso 10 minutos.

El ratio *GLAM* se determinó calculando la actividad fosfatasa ácida en cepas que contenían los plásmidos con las construcciones de *PHO5* correspondientes: (pSch202, pSch212, pSch209) y el plásmido vacío (YCplac33) (Tabla 4). Este último se utilizó para cuantificar la actividad fosfatasa ácida endógena, que se restó a la actividad derivada de las construcciones mencionadas. A partir de la media obtenida de al menos tres replicas independientes, se calcularon los cocientes de actividad fosfatasa ácida entre las distintas unidades transcripcionales largas (correspondientes *PHO5-lacZ* y *PHO5-LAC4*) y la unidad transcripcional más corta (*PHO5*).

6.9. Antibióticos, drogas, inhibidores y enzimas.

6.9.1. Antibióticos.

-Ampicilina, Amp (Apollo): antibiótico β-lactámico que inhibe la división celular de *E. coli* impidiendo la síntesis de la pared celular. Se utiliza para seleccionar células bacterianas que lleven un plásmido con el marcador de resistencia correspondiente.

-G418, geneticina® (Apollo): antibiótico aminoglicosídico. Bloquea la síntesis de proteínas interfiriendo con la función de la subunidad 80S del ribosoma eucariota (Jimenez & Davies, 1980). Se usa para seleccionar y mantener células eucariotas que lleven el gen de *E.coli* de resistencia a *Kanamicina* (*Kan*).

6.9.2. Drogas e inhibidores.

-6-Azauracilo (6AU) (Sigma): inhibidor de la inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa (IMPDH), enzima que participa en la ruta de síntesis de nucleótidos de guanina. Este compuesto se usa para testar defectos en la etapa de elongación de la transcripción.

-Cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma): mezcla de distintos inhibidores de proteasas de serinas, de cisteínas, metaloproteasas, y proteasas ácidas.

-Diétil-dicarbonato (DEPC) (Sigma): inactivador de la RNasa A.

-PMSF (Sigma): (phenylmethanesulfonyl fluoride) inhibidor de proteasas de serinas y cisteínas.

-Fluoruro sódico (NaF) (Sigma): inhibidor de fosfatasas de serina y treonina.

-Ortovanadato sódico (Sigma): inhibidor de tirosina-fosfatasas.

6.9.3. Enzimas y otros reactivos.

-DNasa I (Invitrogen): digiere DNA de cadenas sencilla y doble hasta oligodeoxyribonucleótidos con un fosfato 5' libre.

-Endonucleasas de restricción (Fermentas): endonucleasas de DNA con dianas específicas de secuencia.

-Polimerasa termoestable de DNA (Expand High Fidelity PCR System/Roche): Polimerasa para PCRs que requieren alta fidelidad de la secuencia amplificada.

-Polimerasa termoestable de DNA (KapaTaq Ready Mix DNA polymerase/ Kapa Biosystems).

-PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Takara): mezcla de reactivos para la reacción de retrotranscripción.

-SYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time) (Takara): combinación de reactivos para la realización de PCR cuantitativa.

-RNasa A (Sigma): nucleasa que degrada RNA de cadena sencilla.

Tabla 3. Lista de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

| | | |
|----------|--|--------------------------------|
| OCSC159 | <i>Mat a his3Δ200 leu2Δ1 trp1Δ63 ura3-52 lys2Δ202 SRB10-HA3::TRP1 (KL) sub1::URA3</i> | Este trabajo |
| OCSC166 | <i>Mat α ade2-1 his 3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 sub1::URA3</i> | Este trabajo |
| OCSC261 | <i>Mat α ade2-1 his 3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 srb10::KAN</i> | Este trabajo |
| OCSC264 | <i>Mat α ade2-1 his 3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 srb10::KAN sub1::URA3</i> | Este trabajo |
| OCSC267 | <i>Mat α ade2-1 his 3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ADH1-SUB1</i> | Este trabajo |
| OCSC268 | <i>Mat α ade2-1 his 3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 srb10::KAN sub1::URA3 ADH1-SUB1</i> | Este trabajo |
| OCSC301 | <i>Mat a his4-912δlys2-128δ suc2Δuas (-1900/-390) ura3-52 trp1Δ63 sub1::URA3</i> | Este trabajo |
| OCSC1739 | <i>Mat a ade2-1 his 3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 sub1::KAN pRS314 pRS316</i> | Este trabajo |
| OCSC1740 | <i>Mat a ade2-1 his 3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 sub1::URA3 [Sub1-6HA::TRP1 HIS3 CEN] pRS316</i> | Este trabajo |
| OCSC1601 | <i>Mat a, his3 Δ1 leu2 ΔO met15 Δ0 ura3 ΔO pRS316</i> | Este trabajo |
| OCSC1602 | <i>Mat a, his3 Δ1 leu2 ΔO met15 Δ0 ura3 ΔO sub1::HIS3 pRS316</i> | Este trabajo |
| OCSC1768 | <i>Mat a, his3 Δ1 leu2 ΔO met15 Δ0 ura3 ΔO TRP1::HISG URA3::GAL1-YLR454w sub1::KanMX</i> | Este trabajo |
| OCSC175 | <i>Mat α ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2,3 trp1-1 ura3-1 spt4::URA3 sub1::KanMX</i> | Este trabajo |
| YSB776 | <i>Mat a his3 Δ200 leu2 Δ1 trp1 Δ63 ura3-52 lys2 Δ202 SRB10-HA3::TRP (KL)</i> | S. Buratowsky |
| MGSC339 | <i>Mat α ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2,3 trp1-1 ura3-1 spt4::URA3</i> | A. Aguilera |
| GYLR-3A | <i>Mat a, his3 Δ1 leu2 ΔO met15 Δ0 ura3 ΔO TRP1::HISG URA3::GAL1-YLR454w</i> | (Jimeno-Gonzalez et al., 2010) |

Tabla 4. Lista de plásmidos. Se indica una breve descripción del uso de cada plásmido y su fuente.

| Plásmido | Descripción | Fuente |
|---------------------|---|---------------------------------------|
| pFA6a-KanMX6 | Integración del marcador <i>KanMX6</i> para delecionar genes. | (Longtine <i>et al.</i> , 1998) |
| pYM3 | Integración de 6 copias del epítipo HA con marcador <i>TRP1</i> de <i>Kluyveromyces lactis</i> . | (Knop <i>et al.</i> , 1999) |
| pFA6a-13Myc-His3MX6 | Integración de 13 copias del epítipo Myc con marcador <i>His3MX6</i> (<i>his5+</i> de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>). | (Longtine <i>et al.</i> , 1998) |
| pFa6a-3xFLAGKanMX6 | Integración de 3 copias del epítipo FLAG con marcador <i>KanMX6</i> . | (Funakoshi & Hochstrasser, 2009) |
| YCplac33 | Vector de clonación centromérico con marcador <i>URA3</i> . | (Gietz & Sugino, 1988) |
| pSch202 | Plásmido centromérico con marcador <i>URA3</i> que contiene la ORF del gen <i>PHO5</i> bajo control del promotor <i>GAL1</i> . | (Morillo-Huesca <i>et al.</i> , 2006) |
| pSch212 | pSch202 con la región codificante del gen <i>PHO5</i> fusionado a la región 3'-UTR del gen <i>lacZ</i> de <i>E.coli</i> . | (Morillo-Huesca <i>et al.</i> , 2006) |
| pSch209-LAC4 | pSch202 con la región codificante del gen <i>PHO5</i> fusionado a la región 3'-UTR del gen <i>LAC4</i> de <i>Kluyveromyces lactis</i> . | (Morillo-Huesca <i>et al.</i> , 2006) |
| pRS316 | Vector de clonación centromérico con marcador <i>URA3</i> . | (Sikorski y Hieter 1989) |
| pRS314 | Vector de clonación centromérico con marcador <i>LEU2</i> . | (Sikorski y Hieter 1989) |
| pRS313 | Vector de clonación centromérico con marcador <i>HIS3</i> . | (Sikorski y Hieter 1989) |
| pDM366 | Plásmido 2 μ que contiene la ORF del gen <i>URA3</i> flanqueado por secuencias repetitivas <i>hisG</i> , flanqueadas a su vez por secuencias 5' y 3' del gen <i>SUB1</i> . Utilizado en la construcción de cepas <i>sub1Δ::URA3</i> . | (Knaus <i>et al.</i> , 1996) |
| pO23 | Vector de clonación centromérico <i>URA3</i> , que contiene el gen <i>SUB1</i> marcado con el epítipo FLAG bajo el promotor <i>ADHI</i> . | J.L. Manley |
| pOC2 | Vector de clonación centromérico que contiene el gen <i>SUB1</i> bajo su propio promotor con marcador <i>HIS3</i> , etiquetado con 6HA en su extremo C-Terminal, y con marcador de selección <i>TRP1</i> . | (García <i>et al.</i> , 2010) |

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados. Se detalla la secuencia y la utilidad de cada cebador.

| Oligonucleótido | Secuencia | Utilizado en: |
|----------------------------|--------------------------------|----------------------|
| <i>ACT1</i> (-376) | TACCCGCCACGCGTTTTTTTCTTT | qPCR |
| <i>ACT1</i> (-120) | GGTTTGAGTAGAAAGGGGAAGGAAGA | qPCR |
| <i>ACT1</i> (+1) | ATGGATTCTGAGGTTGCTGCTTTGG | qPCR |
| <i>ACT1</i> (+300) | GTCCAGTTGGTGACAATACCGT | qPCR |
| <i>ACT1</i> (+757) | GTATTGTTTTGGATTCCGGTGATGGTGTTA | qPCR |
| <i>ACT1</i> (+1015) | ATTGAAGAAGATTGAGCAGCGTTTG | qPCR |
| <i>ADHI</i> (-235) | TTCCTTCCTTCATTACGCACACT | qPCR |
| <i>ADHI</i> (-13) | GTTGATTGTATGCTTGGTATAGCTTG | qPCR |
| <i>ADHI</i> (+146) | ACGCTTGGCACGGTACTG | qPCR y RT-PCR |
| <i>ADHI</i> (+372) | ACCGTCGTGGGTGTAACCAGA | qPCR y RT-PCR |
| <i>GALI</i> (-556) | ATATGTTGTGGAAATGTAAAGAGCC | qPCR |
| <i>GALI</i> (-276) | TACTGCCAATTTTTCTCTTCATAAC | qPCR |
| <i>GALI-YLR454w</i> (-194) | CTGGGGTAATTAATCAGCGAAGCGATG | qPCR |
| <i>YLR454w</i> (+35) | CACTTGTACAGTAGAACATTAATCGGAAAC | qPCR |
| <i>YLR454w</i> (+392) | CGCAATTAGTCAACAACGATATCACGATTG | qPCR y TRO |
| <i>YLR454w</i> (+605) | CCTACTGAAGTCCATCCTTCAGAGG | qPCR |
| <i>YLR454w</i> (+945) | CAATACCAACAGGTTTCAGAAATGAGATGC | qPCR y TRO |
| <i>YLR454w</i> (+1147) | GAGAGAACAAATTGGTTTCGCCAAATATCG | qPCR |
| <i>YLR454w</i> (+1986) | CATATCATCCACCCTAGGTGCTAGGTCCG | qPCR y TRO |
| <i>YLR454w</i> (+2199) | GAGCTGACCAGACCTAACCATAGTAGCGTG | qPCR |
| <i>YLR454w</i> (+4069) | AGATATTACTCG TTGTTTCGTGC CCAG | qPCR y TRO |
| <i>YLR454w</i> (+4268) | TCCCAAACCCTAGTTTAACAGAAG | qPCR |
| <i>YLR454w</i> (+5904) | CGTACTGTTGAAATGGAACGAGGACGC | qPCR |
| <i>YLR454w</i> (+6074) | ATCGCTTCATACTCGTTGTATCATCAGTC | qPCR |
| <i>YLR454w</i> (+7701) | GAGGGTCACA GATCTATTAC TTGCCC | qPCR |
| <i>YLR454w</i> (+7850) | GTTGTGAGTTGCTTCAGTGGTGAAGTG | qPCR |
| <i>YLR454w</i> (+1) | ATGTTCTACTGTACAAGTGCC | TRO |
| <i>YLR454w</i> (+350) | CCCCATTGAGCCAGTATTGTG | TRO |
| <i>YLR454w</i> (+1284) | CGGACAAGAGGACGTAAAGACTTTAATG | TRO |
| <i>YLR454w</i> (+2281) | GTTCCAAAGATGATTTACCTCTGTCCG | TRO |
| <i>YLR454w</i> (+4348) | AGCATATAGGGACTTTTTGC | TRO |

| | | |
|-------------------------|-------------------------------|--------|
| <i>YLR454w</i> (+6259) | CACAAGCTTCTGGATTTTCCAGGGA | TRO |
| <i>YLR454w</i> (+7580) | GAGATCAAGTGATTATATGATCGTTGAAG | TRO |
| <i>YLR454w</i> (+7845) | ATGGCTCCGTGTAGGAATTATAAGTTGTG | TRO |
| Intergénico CVII 5' | TCCGTAAAACCAGTAACAAGCA | qPCR |
| Intergénico CVII 3' | ACTTTTCAATTTGCGCTTCC | qPCR |
| <i>IMD2</i> (-352) | TCTCGAAGAAAGCGGAAAAA | qPCR |
| <i>IMD2</i> (-195) | AGCCACGAAACTGAGAAAA | qPCR |
| <i>IMD2</i> (+274) | TGGGTGGTATCGTTTCATT | qPCR |
| <i>IMD2</i> (+488) | CCCACCAACTTTGCATTCT | qPCR |
| <i>IMD2</i> (+1265) | CGCCATGCAAAAGACTGGTA | qPCR |
| <i>IMD2</i> (+1371) | GTCAACGACAGCACCGGAG | qPCR |
| <i>PGK1</i> (-131) | GGTCAATGCAAGAAATAC | qPCR |
| <i>PGK1</i> (-31) | TACTTCCTTGATGATCTG | qPCR |
| <i>PGK1</i> (+275) | CACCTTCTGAACGACTGTGTC | qPCR |
| <i>PGK1</i> (+404) | AAAGAGCTCAATTCGTGTCTG | qPCR |
| <i>PGK1</i> (+1091) | TAACACCGTCATCATTGGT | qPCR |
| <i>PGK1</i> (+1205) | CAACACCTGGCAATTCCTT | qPCR |
| <i>PHO5</i> (+78) | CGATGTGACAAGATTG | RT-PCR |
| <i>PHO5</i> (+563) | GATGTTGAATTGGTCAC | RT-PCR |
| <i>PMA1</i> (-370) | GGTACCGCTTATGCTCCCCTCCAT | qPCR |
| <i>PMA1</i> (-90) | CTTTTGAATGTGTGTATAAAAAGAGAG | qPCR |
| <i>PMA1</i> (+168) | CGACGACGAAGACAGT GATAACG; | qPCR |
| <i>PMA1</i> (+376) | ATTGAATTGGACCGACGAAAACAT AAC | qPCR |
| <i>PMA1</i> (+584) | AAGTCGTCCAGGTGATATTTTGCA | qPCR |
| <i>PMA1</i> (+807) | AACGAAAGTGTGTCACCGGTAGC | qPCR |
| <i>PMA1</i> (+1010) | GTTTGCCAGCTGTCGTTACCACCAC | qPCR |
| <i>PMA1</i> (+1235) | GCAGC CAAACAAGCAGTCAACATCAAG | qPCR |
| <i>PMA1</i> (+2018) | CTATTATTGA TGCTTTGAAGACCTCCAG | qPCR |
| <i>PMA1</i> (+2290) | TGCCAAAATAATAGACATACCCATAA | qPCR |
| <i>PMA1</i> (+2552) | ATATTGTTACTGTCGTCCGTGTCTGGAT | qPCR |
| <i>PMA1</i> (+2757) | ATTAGGTTTCCTTTTCGTGTTGAGTAGA | qPCR |
| <i>PYK1</i> (-327) | GAATGCTTGTGATGTCT TCCAAGT | qPCR |
| <i>PYK1</i> (-23) | TGATTGGTGTCTTGAAATAGAAACA | qPCR |
| <i>PYK1</i> (+195) | CAACGCCAGAAAGTCCGAAGAA | qPCR |
| <i>PYK1</i> (+358) | GTACATGATCTTGTGTCACAAGC | qPCR |
| <i>PYK1</i> (-750) | CGACGAAATCTTGAAGGTCCTG | qPCR |
| <i>PYK1</i> (-750) | GCTCTGGTTGGTCTTGGGTTGTA | qPCR |

| | | |
|---------------------|--------------------------------|--------|
| <i>PYKI</i> (+1040) | CTATGGCTGAAACCGCTGTCATTG | qPCR |
| <i>PYKI</i> (+1267) | CAGCTCTTGGGCATCTGGTAAC | qPCR |
| <i>SRB10</i> (+631) | GTCGAGAATTGCACAAC | RT-PCR |
| <i>SRB10</i> (+775) | GTATCATCCTTTTTTCGG | RT-PCR |
| <i>SUB1</i> (+1) | CATGCCATGGGTATGTCATATTACAACAGG | RT-PCR |
| <i>SUB1</i> (+861) | CATGCCATGGGTTTATTCTTCTTCACTTAT | RT-PCR |
| <i>18S</i> (+1274) | CATGGCCGTTCTTAGTTGGT | RT-PCR |
| <i>18S</i> (+1403) | ATTGCCTCAAACCTCCATCG | RT-PCR |

Tabla 6. Lista de anticuerpos primarios y secundarios. Se detalla la especificidad, el origen y la fuente de los anticuerpos primarios. Para los anticuerpos secundarios se muestra la especificidad, sus enzimas conjugadas y la fuente.

| Proteína | Origen | Epítipo | Fuente |
|------------------|---------------|--|---------------|
| Rpb1 (8WG16). | Ratón. | Dominio C-terminal de la subunidad Rpb1 de la RNAPII (CTD). | Covance |
| Pgk1 (22C5). | Ratón. | 3-Fosfoglicerato quinasa (Pgk1). | Mol.Probes |
| Msn2-FLAG (M5). | Ratón. | DYKDDDDK | Sigma |
| Sub1-HA (12CA5). | Ratón. | YPYDVPDYA | Roche |
| Sub1-MYC (9E10). | Ratón. | Aminoácidos 408-439 del extremo C- terminal de la proteína c-Myc humana. | Santa Cruz |

| Anticuerpos secundarios | | |
|---|--------------------|---------------|
| Especificidad | Conjugación | Fuente |
| Ratón. | Peroxidasa. | Sigma |
| Conejo. | Peroxidasa. | Sigma |
| Cabra. | Peroxidasa. | Sigma |
| Proteína A, región Fc de la Hc de IgG, IgA e IgM. | Peroxidasa. | Sigma |

7. BIBLIOGRAFÍA

- Acker, J., Conesa, C., & Lefebvre, O. 2013. Yeast RNA polymerase III transcription factors and effectors. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1829(3–4): 283–95.
- Acker, J., Nguyen, N.-T.-T., Vandamme, M., Tavenet, A., Briand-Suleau, A., et al. 2014. Sub1 and Maf1, two effectors of RNA polymerase III, are involved in the yeast quiescence cycle. (J. Quinn, Ed.) *PloS One*, 9(12): e114587.
- Akimoto, Y., Yamamoto, S., Iida, S., Hirose, Y., Tanaka, A., et al. 2014. Transcription cofactor PC4 plays essential roles in collaboration with the small subunit of general transcription factor TFIIE. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 19(12): 879–90.
- Akoulitchev, S., Chuikov, S., & Reinberg, D. 2000. TFIIF is negatively regulated by cdk8-containing mediator complexes. *Nature*, 407(6800): 102–6.
- Albuquerque, C. P., Smolka, M. B., Payne, S. H., Bafna, V., Eng, J., et al. 2008. A Multidimensional Chromatography Technology for In-depth Phosphoproteome Analysis. *Molecular & Cellular Proteomics*, 7(7): 1389–1396.
- Alexander, R. D., Innocente, S. A., Barrass, J. D., & Beggs, J. D. 2010. Splicing-Dependent RNA Polymerase Pausing in Yeast. *Molecular Cell*, 40(4): 582–593.
- Allepuz-Fuster, P., Martínez-Fernández, V., Garrido-Godino, A. I., Alonso-Aguado, S., Hanes, S. D., et al. 2014. Rpb4/7 facilitates RNA polymerase II CTD dephosphorylation. *Nucleic Acids Research*, 42(22): 13674–88.
- Allison, L. A., Moyle, M., Shales, M., & Ingles, C. J. 1985. Extensive homology among the largest subunits of eukaryotic and prokaryotic RNA polymerases. *Cell*, 42(2): 599–610.
- Amberg, DB; Strathern, J. 2005. No Title. *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor.
- Amorós, M., & Estruch, F. 2001. Hsf1p and Msn2/4p cooperate in the expression of *Saccharomyces cerevisiae* genes HSP26 and HSP104 in a gene- and stress type-dependent manner. *Molecular Microbiology*, 39(6): 1523–32.
- Aranda, A., & del Olmo, M. 2003. Response to acetaldehyde stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* involves a strain-dependent regulation of several ALD genes and is mediated by the general stress response pathway. *Yeast*, 20(8): 747–759.
- Arimbasseri, A. G., Rijal, K., & Maraia, R. J. 2014. Comparative overview of RNA polymerase II and III transcription cycles, with focus on RNA polymerase III termination and reinitiation. *Transcription*, 5(1): e27369.

- Armache, K.-J., Kettenberger, H., & Cramer, P. 2003. Architecture of initiation-competent 12-subunit RNA polymerase II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(12): 6964–8.
- Armache, K.-J., Mitterweger, S., Meinhart, A., & Cramer, P. 2005. Structures of Complete RNA Polymerase II and Its Subcomplex, Rpb4/7. *Journal of Biological Chemistry*, 280(8): 7131–7134.
- Arndt, K. M., & Reines, D. 2015. Termination of Transcription of Short Noncoding RNAs by RNA Polymerase II. *Annual Review of Biochemistry*, 84(1): 381–404.
- Ausubel, F. 2003. No Title. *Current Protocols in Molecular Biology*.
- Baker Brachmann, C., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., et al. 1998. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: A useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*, 14(2): 115–132.
- Banerjee, S., Kumar, B. R. P., & Kundu, T. K. 2004. General transcriptional coactivator PC4 activates p53 function. *Molecular and Cellular Biology*, 24(5): 2052–62.
- Bataille, A. R., Jeronimo, C., Jacques, P.-É., Laramée, L., Fortin, M.-È., et al. 2012. A Universal RNA Polymerase II CTD Cycle Is Orchestrated by Complex Interplays between Kinase, Phosphatase, and Isomerase Enzymes along Genes. *Molecular Cell*, 45(2): 158–170.
- Batta, K., & Kundu, T. K. 2007. Activation of p53 function by human transcriptional coactivator PC4: role of protein-protein interaction, DNA bending, and posttranslational modifications. *Molecular and Cellular Biology*, 27(21): 7603–14.
- Batta, K., Yokokawa, M., Takeyasu, K., & Kundu, T. K. 2009. Human transcriptional coactivator PC4 stimulates DNA end joining and activates DSB repair activity. *Journal of Molecular Biology*, 385(3): 788–99.
- Benton, M. G., Somasundaram, S., Glasner, J. D., & Palecek, S. P. 2006. Analyzing the dose-dependence of the *Saccharomyces cerevisiae* global transcriptional response to methyl methanesulfonate and ionizing radiation. *BMC Genomics*, 7(1): 305.
- Berry, D. B., & Gasch, A. P. 2008. Stress-activated genomic expression changes serve a preparative role for impending stress in yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 19(11): 4580–7.
- Birse, C. E., Minvielle-Sebastia, L., Lee, B. A., Keller, W., & Proudfoot, N. J. 1998. Coupling termination of transcription to messenger RNA maturation in yeast.

- Science (New York, N.Y.)*, 280(5361): 298–301.
- Bochkarev, A., Pfuetzner, R. A., Edwards, A. M., & Frappier, L. 1997. Structure of the single-stranded-DNA-binding domain of replication protein A bound to DNA. *Nature*, 385(6612): 176–81.
- Bondarenko, V. A., Steele, L. M., Újvári, A., Gaykalova, D. A., Kulaeva, O. I., et al. 2006. Nucleosomes Can Form a Polar Barrier to Transcript Elongation by RNA Polymerase II. *Molecular Cell*, 24(3): 469–479.
- Bordo, D., & Argos, P. 1991. Suggestions for ‘safe’ residue substitutions in site-directed mutagenesis. *Journal of Molecular Biology*, 217(4): 721–9.
- Bose, S; Dutko, J. Z. R. 2005. Genetic factors that regulate the attenuation of the general stress response of yeast. - PubMed - NCBI. *Genetics*, 169(3): 1215–26.
- Boy-Marcotte, E., Perrot, M., Bussereau, F., Boucherie, H., & Jacquet, M. 1998. Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 180(5): 1044–52.
- Braberg, H., Jin, H., Moehle, E. A., Chan, Y. A., Wang, S., et al. 2013. From structure to systems: high-resolution, quantitative genetic analysis of RNA polymerase II. *Cell*, 154(4): 775–88.
- Brandsen, J., Werten, S., van der Vliet, P. C., Meisterernst, M., Kroon, J., et al. 1997. C-terminal domain of transcription cofactor PC4 reveals dimeric ssDNA binding site. *Nature Structural Biology*, 4(11): 900–3.
- Breslow, D. K., Cameron, D. M., Collins, S. R., Schuldiner, M., Stewart-Ornstein, J., et al. 2008. A comprehensive strategy enabling high-resolution functional analysis of the yeast genome. *Nature Methods*, 5(8): 711–718.
- Brewster, J. L., de Valoir, T., Dwyer, N. D., Winter, E., & Gustin, M. C. 1993. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science (New York, N.Y.)*, 259(5102): 1760–3.
- Broderick, S., Rehmet, K., Concannon, C., & Nasheuer, H.-P. 2010. Eukaryotic single-stranded DNA binding proteins: central factors in genome stability. *Sub-Cellular Biochemistry*, 50: 143–63.
- Brody, E., & Abelson, J. 1985. The spliceosome: yeast pre-messenger RNA associates with a 40S complex in a splicing-dependent reaction. *Science (New York, N.Y.)*, 228(4702): 963–7.
- Brueckner, F., Armache, K.-J., Cheung, A., Damsma, G. E., Kettenberger, H., et al.

2009. Structure–function studies of the RNA polymerase II elongation complex. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 65(2): 112–120.
- Buratowski, S. 2005. Connections between mRNA 3' end processing and transcription termination. *Current Opinion in Cell Biology*, 17(3): 257–261.
- Buratowski, S. 2009. Progression through the RNA polymerase II CTD cycle. *Molecular Cell*, 36(4): 541–6.
- Bushnell, D. A., Cramer, P., & Kornberg, R. D. 2002. Structural basis of transcription: -Amanitin-RNA polymerase II cocrystal at 2.8 Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(3): 1218–1222.
- Bushnell, D. A., & Kornberg, R. D. 2003. Complete, 12-subunit RNA polymerase II at 4.1-Å resolution: Implications for the initiation of transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(12): 6969–6973.
- Bushnell, D. A., Westover, K. D., Davis, R. E., & Kornberg, R. D. 2004. Structural Basis of Transcription: An RNA Polymerase II-TFIIB Cocrystal at 4.5 Å. *Science*, 303(5660): 983–988.
- Calvo, O.; García, A. 2012. RNA Polymerase II Phosphorylation and Gene Expression Regulation. In C. Huang (Ed.), *Protein Phosphorylation in Human Health*: 151–194. Londres, Reino Unido: IntechOpen.
- Calvo, O. 2018. Sub1 and RNAPII, until termination does them part. *Transcription*, 9(1): 52–60.
- Calvo, O., & Manley, J. L. 2001. Evolutionarily conserved interaction between CstF-64 and PC4 links transcription, polyadenylation, and termination. *Molecular Cell*, 7(5): 1013–23.
- Calvo, O., & Manley, J. L. 2003. Strange bedfellows: polyadenylation factors at the promoter. *Genes & Development*, 17(>11): 1321–1327.
- Calvo, O., & Manley, J. L. 2005. The transcriptional coactivator PC4/Sub1 has multiple functions in RNA polymerase II transcription. *The EMBO Journal*, 24(5): 1009–20.
- Carninci, P., Sandelin, A., Lenhard, B., Katayama, S., Shimokawa, K., et al. 2006. Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. *Nature Genetics*, 38(6): 626–635.
- Castells-Roca, L., Mühlenhoff, U., Lill, R., Herrero, E., & Bellí, G. 2011. The oxidative stress response in yeast cells involves changes in the stability of Aft1 regulon mRNAs. *Molecular Microbiology*, 81(1): 232–48.

- Causton, H. C., Ren, B., Koh, S. S., Harbison, C. T., Kanin, E., et al. 2001. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Molecular Biology of the Cell*, 12(2): 323–37.
- Chanarat, S., Seizl, M., & Strässer, K. 2011. The Prp19 complex is a novel transcription elongation factor required for TREX occupancy at transcribed genes. *Genes & Development*, 25(11): 1147–58.
- Chechik, G., Oh, E., Rando, O., Weissman, J., Regev, A., et al. 2008. Activity motifs reveal principles of timing in transcriptional control of the yeast metabolic network. *Nature Biotechnology*, 26(11): 1251–9.
- Chi, Y., Huddleston, M. J., Zhang, X., Young, R. A., Annan, R. S., et al. 2001. Negative regulation of Gcn4 and Msn2 transcription factors by Srb10 cyclin-dependent kinase. *Genes & Development*, 15(9): 1078–92.
- Choder, M. 2004. Rpb4 and Rpb7: subunits of RNA polymerase II and beyond. *Trends in Biochemical Sciences*, 29(12): 674–81.
- Connelly, S., & Manley, J. L. 1988. A functional mRNA polyadenylation signal is required for transcription termination by RNA polymerase II. *Genes & Development*, 2(4): 440–52.
- Cooper, K. F., Mallory, M. J., Smith, J. B., & Strich, R. 1997. Stress and developmental regulation of the yeast C-type cyclin Ume3p (Srb11p/Ssn8p). *The EMBO Journal*, 16(15): 4665–4675.
- Cooper, S. J., Trinklein, N. D., Anton, E. D., Nguyen, L., & Myers, R. M. 2006. Comprehensive analysis of transcriptional promoter structure and function in 1% of the human genome. *Genome Research*, 16(1): 1–10.
- Corden, J. L. 2016. Pol II CTD Code Light. *Molecular Cell*, 61(2): 183–4.
- Cowling, V. H., & Cole, M. D. 2010. Myc Regulation of mRNA Cap Methylation. *Genes & Cancer*, 1(6): 576–579.
- Cramer, P. 2002. Common structural features of nucleic acid polymerases. *BioEssays*, 24(8): 724–729.
- Cramer, P. 2004. RNA polymerase II structure: from core to functional complexes. *Current Opinion in Genetics & Development*, 14(2): 218–226.
- Cramer, P., Armache, K.-J., Baumli, S., Benkert, S., Brueckner, F., et al. 2008. Structure of eukaryotic RNA polymerases. *Annual Review of Biophysics*, 37: 337–52.
- Cramer, P., Bushnell, D. A., & Kornberg, R. D. 2001. Structural Basis of Transcription:

- RNA Polymerase II at 2.8 Angstrom Resolution. *Science*, 292(5523): 1863–1876.
- Crickard, J. B., Lee, J., Lee, T.-H., & Reese, J. C. 2017. The elongation factor Spt4/5 regulates RNA polymerase II transcription through the nucleosome. *Nucleic Acids Research*, 45(11): 6362–6374.
- Dangkulwanich, M., Ishibashi, T., Liu, S., Kireeva, M. L., Lubkowska, L., et al. 2013. Complete dissection of transcription elongation reveals slow translocation of RNA polymerase II in a linear ratchet mechanism. *ELife*, 2. <https://doi.org/10.7554/eLife.00971>.
- Das, C., Gadad, S. S., & Kundu, T. K. 2010. Human positive coactivator 4 controls heterochromatinization and silencing of neural gene expression by interacting with REST/NRSF and CoREST. *Journal of Molecular Biology*, 397(1): 1–12.
- Das, C., Hizume, K., Batta, K., Kumar, B. R. P., Gadad, S. S., et al. 2006. Transcriptional coactivator PC4, a chromatin-associated protein, induces chromatin condensation. *Molecular and Cellular Biology*, 26(22): 8303–15.
- Davidson, J. F., Whyte, B., Bissinger, P. H., & Schiestl, R. H. 1996. Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(10): 5116–21.
- de Nadal, E., Alepuz, P. M., & Posas, F. 2002. Dealing with osmostress through MAP kinase activation. *EMBO Reports*, 3(8): 735–40.
- de Nadal, E., Ammerer, G., & Posas, F. 2011. Controlling gene expression in response to stress. *Nature Reviews. Genetics*, 12(12): 833–45.
- Deng, W., & Roberts, S. G. E. 2007. TFIIB and the regulation of transcription by RNA polymerase II. *Chromosoma*, 116(5): 417–29.
- Dettmann, A., Jäschke, Y., Triebel, I., Bogs, J., Schröder, I., et al. 2010. Mediator subunits and histone methyltransferase Set2 contribute to Ino2-dependent transcriptional activation of phospholipid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Genetics and Genomics*, 283(3): 211–221.
- Dhanasekaran, K., Kumari, S., Boopathi, R., Shima, H., Swaminathan, A., et al. 2016. Multifunctional human transcriptional coactivator protein PC4 is a substrate of Aurora kinases and activates the Aurora enzymes. *The FEBS Journal*, 283(6): 968–85.
- Dower, W. J., Miller, J. F., & Ragsdale, C. W. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research*, 16(13): 6127–45.

- Durchschlag, E., Reiter, W., Ammerer, G., & Schüller, C. 2004. Nuclear localization destabilizes the stress-regulated transcription factor Msn2. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(53): 55425–32.
- Dvir, A., Conaway, R. C., & Conaway, J. W. 1997. A role for TFIIF in controlling the activity of early RNA polymerase II elongation complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(17): 9006–10.
- Eick, D., & Geyer, M. 2013. The RNA Polymerase II Carboxy-Terminal Domain (CTD) Code. *Chemical Reviews*, 113(11): 8456–8490.
- Escobar-Henriques, M., Collart, M. A., & Daignan-Fornier, B. 2003. Transcription initiation of the yeast IMD2 gene is abolished in response to nutrient limitation through a sequence in its coding region. *Molecular and Cellular Biology*, 23(17): 6279–90.
- Estruch, F. 2000. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(4): 469–86.
- Ezeokonkwo, C., Ghazy, M. A., Zhelkovsky, A., Yeh, P.-C., & Moore, C. 2012. Novel interactions at the essential N-terminus of poly(A) polymerase that could regulate poly(A) addition in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 586(8): 1173–8.
- Fanning, E., Klimovich, V., & Nager, A. R. 2006. A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways. *Nucleic Acids Research*, 34(15): 4126–37.
- Farrugia, G., & Balzan, R. 2012. Oxidative Stress and Programmed Cell Death in Yeast. *Frontiers in Oncology*, 2: 64.
- Finlay, C. A., Hinds, P. W., Tan, T. H., Eliyahu, D., Oren, M., et al. 1988. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Molecular and Cellular Biology*, 8(2): 531–9.
- Flick, K., & Kaiser, P. 2012. Protein degradation and the stress response. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 23(5): 515–22.
- Franco-Echevarría, E., González-Polo, N., Zorrilla, S., Martínez-Lumbreras, S., Santiveri, C. M., et al. 2017. The structure of transcription termination factor Nrd1 reveals an original mode for GUAA recognition. *Nucleic Acids Research*, 45(17): 10293–10305.
- Freemont, P. S., Lane, A. N., & Sanderson, M. R. 1991. Structural aspects of protein-DNA recognition. *The Biochemical Journal*, 278 (Pt 1): 1–23.

- Fuda, N. J., Ardehali, M. B., & Lis, J. T. 2009. Defining mechanisms that regulate RNA polymerase II transcription in vivo. *Nature*, 461(7261): 186–192.
- Fukuda, A., Tokonabe, S., Hamada, M., Matsumoto, M., Tsukui, T., et al. 2003. Alleviation of PC4-mediated transcriptional repression by the ERCC3 helicase activity of general transcription factor TFIID. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(17): 14827–31.
- Fuxreiter, M., Simon, I., & Bondos, S. 2011. Dynamic protein–DNA recognition: beyond what can be seen. *Trends in Biochemical Sciences*, 36(8): 415–423.
- Gaillard, H., Tous, C., Botet, J., González-Aguilera, C., Quintero, M. J., et al. 2009. Genome-Wide Analysis of Factors Affecting Transcription Elongation and DNA Repair: A New Role for PAF and Ccr4-Not in Transcription-Coupled Repair. (J. M. Ford, Ed.) *PLoS Genetics*, 5(2): e1000364.
- Galdieri, L., Mehrotra, S., Yu, S., & Vancura, A. 2010. Transcriptional Regulation in Yeast during Diauxic Shift and Stationary Phase. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 14(6): 629–638.
- Gallego, O., Specht, T., Brach, T., Kumar, A., Gavin, A.-C., et al. 2013. Detection and characterization of protein interactions in vivo by a simple live-cell imaging method. (J. Keen, Ed.) *PloS One*, 8(5): e62195.
- Gao, J., Zybailov, B. L., Byrd, A. K., Griffin, W. C., Chib, S., et al. 2015. Yeast transcription co-activator Sub1 and its human homolog PC4 preferentially bind to G-quadruplex DNA. *Chem. Commun.*, 51(33): 7242–7244.
- Garavís, M., & Calvo, O. 2017. Sub1/PC4, a multifaceted factor: from transcription to genome stability. *Current Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0715-6>.
- Garavís, M., González-Polo, N., Allepuz-Fuster, P., Louro, J. A., Fernández-Tornero, C., et al. 2017. Sub1 contacts the RNA polymerase II stalk to modulate mRNA synthesis. *Nucleic Acids Research*, 45(5): 2458–2471.
- García, A., Collin, A., & Calvo, O. 2012. Sub1 associates with Spt5 and influences RNA polymerase II transcription elongation rate. *Molecular Biology of the Cell*, 23(21): 4297–312.
- García, A., Rosonina, E., Manley, J. L., & Calvo, O. 2010. Sub1 globally regulates RNA polymerase II C-terminal domain phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology*, 30(21): 5180–93.
- Garreau, H., Hasan, R. N., Renault, G., Estruch, F., Boy-Marcotte, E., et al. 2000. Hyperphosphorylation of Msn2p and Msn4p in response to heat shock and the

- diauxic shift is inhibited by cAMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology (Reading, England)*, 146 (Pt 9)(9): 2113–20.
- Gasch, A. P., Huang, M., Metzner, S., Botstein, D., Elledge, S. J., et al. 2001. Genomic expression responses to DNA-damaging agents and the regulatory role of the yeast ATR homolog Mec1p. *Molecular Biology of the Cell*, 12(10): 2987–3003.
- Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., et al. 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular Biology of the Cell*, 11(12): 4241–57.
- Gasch, A. P., & Werner-Washburne, M. 2002. The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation. *Functional & Integrative Genomics*, 2(4–5): 181–192.
- Ge, H., & Roeder, R. G. 1994. Purification, cloning, and characterization of a human coactivator, PC4, that mediates transcriptional activation of class II genes. *Cell*, 78(3): 513–23.
- Giaever, G., Chu, A. M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., et al. 2002. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*, 418(6896): 387–91.
- Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, A. R., & Woods, R. A. 1995. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*, 11(4): 355–360.
- Gjidoda, A., & Henry, R. W. 2013. RNA polymerase III repression by the retinoblastoma tumor suppressor protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1829(3–4): 385–92.
- Glover-Cutter, K., Kim, S., Espinosa, J., & Bentley, D. L. 2008. RNA polymerase II pauses and associates with pre-mRNA processing factors at both ends of genes. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(1): 71–8.
- Gnatt, A. L., Cramer, P., Fu, J., Bushnell, D. A., & Kornberg, R. D. 2001. Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5523): 1876–82.
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., et al. 1996. Life with 6000 genes. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5287): 546, 563–7.
- Gomar-Alba, M., Amaral, C., Artacho, A., D’Auria, G., Pimentel, C., et al. 2015. The C-terminal region of the Hot1 transcription factor binds GGGACAAA-related sequences in the promoter of its target genes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(12): 1385–1397.

- Gomar-Alba, M., & Del Olmo, M. 2016. Hot1 factor recruits co-activator Sub1 and elongation complex Spt4/5 to osmostress genes. *The Biochemical Journal*, 473(19): 3065–79.
- González-Párraga, P., Sánchez-Fresneda, R., Martínez-Esparza, M., & Argüelles, J.-C. 2008. Stress responses in yeasts: what rules apply? *Archives of Microbiology*, 189(4): 293–6.
- Görner, W., Durchschlag, E., Martinez-Pastor, M. T., Estruch, F., Ammerer, G., et al. 1998. Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes & Development*, 12(4): 586–97.
- Grably, M. R., Stanhill, A., Tell, O., & Engelberg, D. 2002. HSF and Msn2/4p can exclusively or cooperatively activate the yeast HSP104 gene. *Molecular Microbiology*, 44(1): 21–35.
- Granneman, S., & Tollervey, D. 2007. Building Ribosomes: Even More Expensive Than Expected? *Current Biology*, 17(11): R415–R417.
- Grohmann, D., & Werner, F. 2011. Cycling through transcription with the RNA polymerase F/E (RPB4/7) complex: structure, function and evolution of archaeal RNA polymerase. *Research in Microbiology*, 162(1): 10–18.
- Guo, M., Xu, F., Yamada, J., Egelhofer, T., Gao, Y., et al. 2008. Core Structure of the Yeast Spt4-Spt5 Complex: A Conserved Module for Regulation of Transcription Elongation. *Structure*, 16(11): 1649–1658.
- Gupta, K., Sari-Ak, D., Haffke, M., Trowitzsch, S., & Berger, I. 2016. Zooming in on Transcription Preinitiation. *Journal of Molecular Biology*, 428(12): 2581–2591.
- Gupta, R., Sadhale, P. P., & Vijayraghavan, U. 2015. SUB1 Plays a Negative Role during Starvation Induced Sporulation Program in *Saccharomyces cerevisiae*. (V. Chaturvedi, Ed.) *PloS One*, 10(7): e0132350.
- Hahn, S., & Young, E. T. 2011. Transcriptional Regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: Transcription Factor Regulation and Function, Mechanisms of Initiation, and Roles of Activators and Coactivators. *Genetics*, 189(3): 705–736.
- Hampsey, M., & Reinberg, D. 1997. Transcription: why are TAFs essential? *Current Biology: CB*, 7(1): R44–6.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4): 557–80.
- Hanes, S. D. 2014. The Ess1 prolyl isomerase: Traffic cop of the RNA polymerase II transcription cycle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory*

- Mechanisms*, 1839(4): 316–333.
- Haring, M., Offermann, S., Danker, T., Horst, I., Peterhansel, C., et al. 2007. Chromatin immunoprecipitation: optimization, quantitative analysis and data normalization. *Plant Methods*, 3(1): 11.
- Harlen, K. M., & Churchman, L. S. 2017. The code and beyond: transcription regulation by the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(4): 263–273.
- Hartzog, G. A., & Fu, J. 2013. The Spt4-Spt5 complex: a multi-faceted regulator of transcription elongation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1829(1): 105–15.
- Hartzog, G. A., Wada, T., Handa, H., & Winston, F. 1998. Evidence that Spt4, Spt5, and Spt6 control transcription elongation by RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Development*, 12(3): 357–69.
- Hasan, R., Leroy, C., Isnard, A.-D., Labarre, J., Boy-Marcotte, E., et al. 2002. The control of the yeast H₂O₂ response by the Msn2/4 transcription factors. *Molecular Microbiology*, 45(1): 233–41.
- He, X., Khan, A. U., Cheng, H., Pappas, D. L., Hampsey, M., et al. 2003. Functional interactions between the transcription and mRNA 3' end processing machineries mediated by Ssu72 and Sub1. *Genes & Development*, 17(8): 1030–42.
- Heidemann, M., Hintermair, C., Voß, K., & Eick, D. 2013. Dynamic phosphorylation patterns of RNA polymerase II CTD during transcription. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(1): 55–62.
- Henry, N. L., Bushnell, D. A., & Kornberg, R. D. 1996. A yeast transcriptional stimulatory protein similar to human PC4. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(36): 21842–7.
- Hillenmeyer, M. E., Fung, E., Wildenhain, J., Pierce, S. E., Hoon, S., et al. 2008. The chemical genomic portrait of yeast: uncovering a phenotype for all genes. *Science (New York, N.Y.)*, 320(5874): 362–5.
- Hinnebusch, A. G., & Natarajan, K. 2002. Gcn4p, a master regulator of gene expression, is controlled at multiple levels by diverse signals of starvation and stress. *Eukaryotic Cell*, 1(1): 22–32.
- Hirayoshi, K., & Lis, J. T. 1999. Nuclear run-on assays: assessing transcription by measuring density of engaged RNA polymerases. *Methods in Enzymology*, 304: 351–62.
- Hirose, Y., & Manley, J. L. 2000. RNA polymerase II and the integration of nuclear

- events. *Genes & Development*, 14(12): 1415–29.
- Hohmann, S. 2015. An integrated view on a eukaryotic osmoregulation system. *Current Genetics*, 61(3): 373–82.
- Holloway, A. F., Occhiodoro, F., Mittler, G., Meisterernst, M., & Shannon, M. F. 2000. Functional interaction between the HIV transactivator Tat and the transcriptional coactivator PC4 in T cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(28): 21668–77.
- Holstege, F. C., Jennings, E. G., Wyrick, J. J., Lee, T. I., Hengartner, C. J., et al. 1998. Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell*, 95(5): 717–28.
- Holstege, F. C. P., Fiedler, U., & Timmers, H. T. 1997. Three transitions in the RNA polymerase II transcription complex during initiation. *The EMBO Journal*, 16(24): 7468–7480.
- Hsin, J.-P., & Manley, J. L. 2012. The RNA polymerase II CTD coordinates transcription and RNA processing. *Genes & Development*, 26(19): 2119–37.
- Hsin, J.-P., Sheth, A., & Manley, J. L. 2011. RNAP II CTD Phosphorylated on Threonine-4 Is Required for Histone mRNA 3' End Processing. *Science*, 334(6056): 683–686.
- Hsu, P. L., Yang, F., Smith-Kinnaman, W., Yang, W., Song, J.-E., et al. 2014. Rtr1 Is a Dual Specificity Phosphatase That Dephosphorylates Tyr1 and Ser5 on the RNA Polymerase II CTD. *Journal of Molecular Biology*, 426(16): 2970–2981.
- Huang, J., Zhao, Y., Huang, D., Liu, H., Justin, N., et al. 2012. Structural features of the single-stranded DNA-binding protein MoSub1 from *Magnaporthe oryzae*. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 68(Pt 9): 1071–6.
- Huang, J., Zhao, Y., Liu, H., Huang, D., Cheng, X., et al. 2015. Substitution of tryptophan 89 with tyrosine switches the DNA binding mode of PC4. *Scientific Reports*, 5(1): 8789.
- Hyle, J. W., Shaw, R. J., & Reines, D. 2003. Functional distinctions between IMP dehydrogenase genes in providing mycophenolate resistance and guanine prototrophy to yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(31): 28470–8.
- Jaehning, J. A. 2010. The Paf1 complex: platform or player in RNA polymerase II transcription? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1799(5–6): 379–88.
- Jasnovidova, O., & Stefl, R. 2013. The CTD code of RNA polymerase II: a structural view. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, 4(1): 1–16.
- Jelinsky, S. A., Estep, P., Church, G. M., & Samson, L. D. 2000. Regulatory networks

- revealed by transcriptional profiling of damaged *Saccharomyces cerevisiae* cells: Rpn4 links base excision repair with proteasomes. *Molecular and Cellular Biology*, 20(21): 8157–67.
- Jenks, M. H., O'Rourke, T. W., & Reines, D. 2008. Properties of an Intergenic Terminator and Start Site Switch That Regulate IMD2 Transcription in Yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 28(12): 3883–3893.
- Jeronimo, C., Bataille, A. R., & Robert, F. 2013. The writers, readers, and functions of the RNA polymerase II C-terminal domain code. *Chemical Reviews*, 113(11): 8491–522.
- Jimenez, A., & Davies, J. 1980. Expression of a transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces*. *Nature*, 287(5785): 869–71.
- Jimeno, S., Tous, C., Garcia-Rubio, M. L., Ranés, M., Gonzalez-Aguilera, C., et al. 2011. New Suppressors of THO Mutations Identify Thp3 (Ypr045c)-Csn12 as a Protein Complex Involved in Transcription Elongation. *Molecular and Cellular Biology*, 31(4): 674–685.
- Jonker, H. R. A., Wechselberger, R. W., Pinkse, M., Kaptein, R., & Folkers, G. E. 2006. Gradual phosphorylation regulates PC4 coactivator function. *The FEBS Journal*, 273(7): 1430–44.
- Jonkers, I., & Lis, J. T. 2015. Getting up to speed with transcription elongation by RNA polymerase II. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 16(3): 167–77.
- Jun, S.-H., Reichlen, M. J., Tajiri, M., & Murakami, K. S. 2011. Archaeal RNA polymerase and transcription regulation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 46(1): 27–40.
- Juven-Gershon, T., & Kadonaga, J. T. 2010. Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. *Developmental Biology*, 339(2): 225–9.
- Kadonaga, J. T. 2004. Regulation of RNA polymerase II transcription by sequence-specific DNA binding factors. *Cell*, 116(2): 247–57.
- Kaiser, K., Stelzer, G., & Meisterernst, M. 1995. The coactivator p15 (PC4) initiates transcriptional activation during TFIIA-TFIID-promoter complex formation. *The EMBO Journal*, 14(14): 3520–7.
- Kanshin, E., Kubiniok, P., Thattikota, Y., D'Amours, D., & Thibault, P. 2015. Phosphoproteome dynamics of *Saccharomyces cerevisiae* under heat shock and cold stress. *Molecular Systems Biology*, 11(6): 813.

- Katan-Khaykovich, Y., & Struhl, K. 2011. Splitting of H3-H4 tetramers at transcriptionally active genes undergoing dynamic histone exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(4): 1296–301.
- Kim, M., Krogan, N. J., Vasiljeva, L., Rando, O. J., Nedeá, E., et al. 2004. The yeast Rat1 exonuclease promotes transcription termination by RNA polymerase II. *Nature*, 432(7016): 517–22.
- Kimura, M., Suzuki, H., & Ishihama, A. 2002. Formation of a carboxy-terminal domain phosphatase (Fcp1)/TFIIF/RNA polymerase II (pol II) complex in *Schizosaccharomyces pombe* involves direct interaction between Fcp1 and the Rpb4 subunit of pol II. *Molecular and Cellular Biology*, 22(5): 1577–88.
- Kishore, A. H., Batta, K., Das, C., Agarwal, S., & Kundu, T. K. 2007. p53 regulates its own activator: transcriptional co-activator PC4, a new p53-responsive gene. *The Biochemical Journal*, 406(3): 437–44.
- Knaus, R., Pollock, R., & Guarente, L. 1996. Yeast SUB1 is a suppressor of TFIIB mutations and has homology to the human co-activator PC4. *The EMBO Journal*, 15(8): 1933–40.
- Kobor, M. S., Archambault, J., Lester, W., Holstege, F. C., Gileadi, O., et al. 1999. An unusual eukaryotic protein phosphatase required for transcription by RNA polymerase II and CTD dephosphorylation in *S. cerevisiae*. *Molecular Cell*, 4(1): 55–62.
- Kodadek, T. 1998. Mechanistic parallels between DNA replication, recombination and transcription. *Trends in Biochemical Sciences*, 23(2): 79–83.
- Komarnitsky, P., Cho, E. J., & Buratowski, S. 2000. Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes & Development*, 14(19): 2452–60.
- KORNBLIHTT, A. R., de la Mata, M., Fededa, J. P., Munoz, M. J., & Nogues, G. 2004. Multiple links between transcription and splicing. *RNA*, 10(10): 1489–1498.
- Kornblihtt, A. R., Schor, I. E., Alló, M., Dujardin, G., Petrillo, E., et al. 2013. Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 14(3): 153–65.
- Kostrewa, D., Zeller, M. E., Armache, K.-J., Seizl, M., Leike, K., et al. 2009. RNA polymerase II-TFIIB structure and mechanism of transcription initiation. *Nature*, 462(7271): 323–30.

- Kouzarides, T. 2007. SnapShot: Histone-Modifying Enzymes. *Cell*, 131(4): 822–822.e1.
- Koyama, H., Sumiya, E., Nagata, M., Ito, T., & Sekimizu, K. 2008. Transcriptional repression of the IMD2 gene mediated by the transcriptional co-activator Sub1. *Genes to Cells : Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 13(11): 1113–26.
- Krasnov, A. N., Mazina, M. Y., Nikolenko, J. V., & Vorobyeva, N. E. 2016. On the way of revealing coactivator complexes cross-talk during transcriptional activation. *Cell & Bioscience*, 6(1): 15.
- Kretzschmar, M., Stelzer, G., Roeder, R. G., & Meisterernst, M. 1994. RNA polymerase II cofactor PC2 facilitates activation of transcription by GAL4-AH in vitro. *Molecular and Cellular Biology*, 14(6): 3927–37.
- Krishnamurthy, S., He, X., Reyes-Reyes, M., Moore, C., & Hampsey, M. 2004. Ssu72 Is an RNA polymerase II CTD phosphatase. *Molecular Cell*, 14(3): 387–94.
- Kruk, J. A., Dutta, A., Fu, J., Gilmour, D. S., & Reese, J. C. 2011. The multifunctional Ccr4-Not complex directly promotes transcription elongation. *Genes & Development*, 25(6): 581–93.
- Kuehner, J. N., & Brow, D. A. 2008. Regulation of a Eukaryotic Gene by GTP-Dependent Start Site Selection and Transcription Attenuation. *Molecular Cell*, 31(2): 201–211.
- Kuehner, J. N., Pearson, E. L., & Moore, C. 2011. Unravelling the means to an end: RNA polymerase II transcription termination. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(5): 283–294.
- Kulaeva, O. I., Hsieh, F.-K., Chang, H.-W., Luse, D. S., & Studitsky, V. M. 2013. Mechanism of transcription through a nucleosome by RNA polymerase II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(1): 76–83.
- Kushner, S. 1978. An improved method for transformation of Escherichia coli with ColEI derived plasmids. In H. W. Boyer & S. Nicosia (Ed.), *Genetic Engineering*: 17–23. Amsterdam: Elsevier, North Holland.
- Kwak, H., & Lis, J. T. 2013. Control of Transcriptional Elongation. *Annual Review of Genetics*, 47(1): 483–508.
- Kwast, K. E., Burke, P. V., Staahl, B. T., & Poyton, R. O. 1999. Oxygen sensing in yeast: evidence for the involvement of the respiratory chain in regulating the transcription of a subset of hypoxic genes. *Proceedings of the National Academy*

- of Sciences of the United States of America*, 96(10): 5446–51.
- Kyburz, A., Friedlein, A., Langen, H., & Keller, W. 2006. Direct Interactions between Subunits of CPSF and the U2 snRNP Contribute to the Coupling of Pre-mRNA 3' End Processing and Splicing. *Molecular Cell*, 23(2): 195–205.
- Lada, A. G., Kliver, S. F., Dhar, A., Polev, D. E., Masharsky, A. E., et al. 2015. Disruption of Transcriptional Coactivator Sub1 Leads to Genome-Wide Redistribution of Clustered Mutations Induced by APOBEC in Active Yeast Genes. *PLOS Genetics*, 11(5): e1005217.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259): 680–5.
- Lallet, S., Garreau, H., Poisier, C., Boy-Marcotte, E., & Jacquet, M. 2004. Heat shock-induced degradation of Msn2p, a *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor, occurs in the nucleus. *Molecular Genetics and Genomics : MGG*, 272(3): 353–62.
- Larschan, E., & Winston, F. 2005. The *Saccharomyces cerevisiae* Srb8-Srb11 complex functions with the SAGA complex during Gal4-activated transcription. *Molecular and Cellular Biology*, 25(1): 114–23.
- Lee, S., Nguyen, H. M., & Kang, C. 2010. Tiny abortive initiation transcripts exert antitermination activity on an RNA hairpin-dependent intrinsic terminator. *Nucleic Acids Research*, 38(18): 6045–6053.
- Li, X., Gerber, S. A., Rudner, A. D., Beausoleil, S. A., Haas, W., et al. 2007. Large-Scale Phosphorylation Analysis of α -Factor-Arrested *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Proteome Research*, 6(3): 1190–1197.
- Lifton, R. P., Goldberg, M. L., Karp, R. W., & Hogness, D. S. 1978. The organization of the histone genes in *Drosophila melanogaster*: functional and evolutionary implications. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 42 Pt 2: 1047–51.
- Lindahl, R. 1992. Aldehyde Dehydrogenases and Their Role in Carcinogenesis. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 27(4–5): 283–335.
- Lindquist, S., & Craig, E. A. 1988. The Heat-Shock Proteins. *Annual Review of Genetics*, 22(1): 631–677.
- Lindquist, S., & Kim, G. 1996. Heat-shock protein 104 expression is sufficient for thermotolerance in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(11): 5301–6.
- Lindstrom, D. L., Squazzo, S. L., Muster, N., Burckin, T. A., Wachter, K. C., et al.

2003. Dual roles for Spt5 in pre-mRNA processing and transcription elongation revealed by identification of Spt5-associated proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 23(4): 1368–78.
- Liu, T., & Huang, J. 2016. Replication protein A and more: single-stranded DNA-binding proteins in eukaryotic cells. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 48(7): 665–670.
- Logan, J., Falck-Pedersen, E., Darnell, J. E., & Shenk, T. 1987. A poly(A) addition site and a downstream termination region are required for efficient cessation of transcription by RNA polymerase II in the mouse beta maj-globin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(23): 8306–10.
- Longtine, M. S., Mckenzie III, A., Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., et al. 1998. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14(10): 953–961.
- Lopez, C. R., Singh, S., Hambarde, S., Griffin, W. C., Gao, J., et al. 2017. Yeast Sub1 and human PC4 are G-quadruplex binding proteins that suppress genome instability at co-transcriptionally formed G4 DNA. *Nucleic Acids Research*, 45(10): 5850–5862.
- Loya, T. J., & Reines, D. 2016. Recent advances in understanding transcription termination by RNA polymerase II. *F1000Research*, 5: 1478.
- Mager, W. H., & Ferreira, P. M. 1993. Stress response of yeast. *The Biochemical Journal*, 290 (Pt 1): 1–13.
- Malik, S., Guermah, M., & Roeder, R. G. 1998. A dynamic model for PC4 coactivator function in RNA polymerase II transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(5): 2192–7.
- Mandel, C. R., Bai, Y., & Tong, L. 2008. Protein factors in pre-mRNA 3'-end processing. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(7–8): 1099–1122.
- Mapendano, C. K., Lykke-Andersen, S., Kjems, J., Bertrand, E., & Jensen, T. H. 2010. Crosstalk between mRNA 3' end processing and transcription initiation. *Molecular Cell*, 40(3): 410–22.
- Marceau, A. H. 2012. Functions of single-strand DNA-binding proteins in DNA replication, recombination, and repair. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 922: 1–21.
- Marianayagam, N. J., Sunde, M., & Matthews, J. M. 2004. The power of two: protein

- dimerization in biology. *Trends in Biochemical Sciences*, 29(11): 618–25.
- Martínez-Pastor, M. T., Marchler, G., Schüller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H., et al. 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *The EMBO Journal*, 15(9): 2227–35.
- Martinez-Rucobo, F. W., Sainsbury, S., Cheung, A. C. M., & Cramer, P. 2011. Architecture of the RNA polymerase-Spt4/5 complex and basis of universal transcription processivity. *The EMBO Journal*, 30(7): 1302–10.
- Mason, P. B., & Struhl, K. 2005. Distinction and relationship between elongation rate and processivity of RNA polymerase II in vivo. *Molecular Cell*, 17(6): 831–40.
- Mathis, A. D., Naylor, B. C., Carson, R. H., Evans, E., Harwell, J., et al. 2017. Mechanisms of In Vivo Ribosome Maintenance Change in Response to Nutrient Signals. *Molecular & Cellular Proteomics*, 16(2): 243–254.
- Mayer, A., Landry, H. M., & Churchman, L. S. 2017. Pause & go: from the discovery of RNA polymerase pausing to its functional implications. *Current Opinion in Cell Biology*, 46: 72–80.
- Mayer, A., Lidschreiber, M., Siebert, M., Leike, K., Söding, J., et al. 2010. Uniform transitions of the general RNA polymerase II transcription complex. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(10): 1272–1278.
- McAlister, L., & Finkelstein, D. B. 1980. Alterations in translatable ribonucleic acid after heat shock of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 143(2): 603–12.
- McAlister, L., Strausberg, S., Kulaga, A., & Finkelstein, D. B. 1979. Altered patterns of protein synthesis induced by heat shock of yeast. *Current Genetics*, 1(1): 63–74.
- McCracken, S., Fong, N., Yankulov, K., Ballantyne, S., Pan, G., et al. 1997. The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature*, 385(6614): 357–361.
- McKune, K., Richards, K. L., Edwards, A. M., Young, R. A., & Woychik, N. A. 1993. RPB7, one of two dissociable subunits of yeast RNA polymerase II, is essential for cell viability. *Yeast (Chichester, England)*, 9(3): 295–9.
- Medvedik, O., Lamming, D. W., Kim, K. D., & Sinclair, D. A. 2007. MSN2 and MSN4 Link Calorie Restriction and TOR to Sirtuin-Mediated Lifespan Extension in *Saccharomyces cerevisiae*. (A. Dillin, Ed.) *PLoS Biology*, 5(10): e261.
- Mertens, C., & Roeder, R. G. 2008. Different functional modes of p300 in activation of

- RNA polymerase III transcription from chromatin templates. *Molecular and Cellular Biology*, 28(18): 5764–76.
- Millevoi, S., Loulergue, C., Dettwiler, S., Karaa, S. Z., Keller, W., et al. 2006. An interaction between U2AF 65 and CF I(m) links the splicing and 3' end processing machineries. *The EMBO Journal*, 25(20): 4854–64.
- Millevoi, S., & Vagner, S. 2010. Molecular mechanisms of eukaryotic pre-mRNA 3' end processing regulation. *Nucleic Acids Research*, 38(9): 2757–2774.
- Molina-Navarro, M. M., Martinez-Jimenez, C. P., & Rodriguez-Navarro, S. 2011. Transcriptional Elongation and mRNA Export Are Coregulated Processes. *Genetics Research International*, 2011: 1–10.
- Morano, K. A., Grant, C. M., & Moye-Rowley, W. S. 2012. The Response to Heat Shock and Oxidative Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 190(4): 1157–1195.
- Morillo-Huesca, M., Vanti, M., & Chávez, S. 2006. A simple in vivo assay for measuring the efficiency of gene length-dependent processes in yeast mRNA biogenesis. *The FEBS Journal*, 273(4): 756–69.
- Mortusewicz, O., Evers, B., & Helleday, T. 2016. PC4 promotes genome stability and DNA repair through binding of ssDNA at DNA damage sites. *Oncogene*, 35(6): 761–70.
- Mortusewicz, O., Roth, W., Li, N., Cardoso, M. C., Meisterernst, M., et al. 2008. Recruitment of RNA polymerase II cofactor PC4 to DNA damage sites. *The Journal of Cell Biology*, 183(5): 769–76.
- Murakami, K., Tsai, K.-L., Kalisman, N., Bushnell, D. A., Asturias, F. J., et al. 2015. Structure of an RNA polymerase II preinitiation complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(44): 13543–13548.
- Murzin, A. G. 1993. OB(oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences. *The EMBO Journal*, 12(3): 861–7.
- Nathan, D. F., Vos, M. H., & Lindquist, S. 1997. In vivo functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 chaperone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(24): 12949–56.
- Navarro-Aviño, J. P., Prasad, R., Miralles, V. J., Benito, R. M., & Serrano, R. 1999. A proposal for nomenclature of aldehyde dehydrogenases in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of the stress-inducible ALD2 and ALD3 genes.

- Yeast (Chichester, England)*, 15(10A): 829–42.
- Nechaev, S., & Adelman, K. 2011. Pol II waiting in the starting gates: Regulating the transition from transcription initiation into productive elongation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1809(1): 34–45.
- Nedea, E., He, X., Kim, M., Pootoolal, J., Zhong, G., et al. 2003. Organization and function of APT, a subcomplex of the yeast cleavage and polyadenylation factor involved in the formation of mRNA and small nucleolar RNA 3'-ends. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(35): 33000–10.
- Nelson, C., Goto, S., Lund, K., Hung, W., & Sadowski, I. 2003. Srb10/Cdk8 regulates yeast filamentous growth by phosphorylating the transcription factor Ste12. *Nature*, 421(6919): 187–90.
- Nussbaum, I., Weindling, E., Jubran, R., Cohen, A., & Bar-Nun, S. 2014. Deteriorated stress response in stationary-phase yeast: Sir2 and Yap1 are essential for Hsf1 activation by heat shock and oxidative stress, respectively. (J. L. Folch-Mallol, Ed.) *PloS One*, 9(10): e111505.
- Orphanides, G., & Reinberg, D. 2002. A unified theory of gene expression. *Cell*, 108(4): 439–51.
- Pabo, C. O., & Sauer, R. T. 1992. Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annual Review of Biochemistry*, 61(1): 1053–95.
- Pan, Z. Q., Ge, H., Amin, A. A., & Hurwitz, J. 1996. Transcription-positive cofactor 4 forms complexes with HSSB (RPA) on single-stranded DNA and influences HSSB-dependent enzymatic synthesis of simian virus 40 DNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(36): 22111–6.
- Parsell, D. A., & Lindquist, S. 1993. The Function of Heat-Shock Proteins in Stress Tolerance: Degradation and Reactivation of Damaged Proteins. *Annual Review of Genetics*, 27(1): 437–496.
- Perales, R., & Bentley, D. 2009. Cotranscriptionality: the transcription elongation complex as a nexus for nuclear transactions. *Molecular Cell*, 36(2): 178–91.
- Phatnani, H. P., & Greenleaf, A. L. 2006. Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. *Genes & Development*, 20(21): 2922–36.
- Piper, P. W. 1993. Molecular events associated with acquisition of heat tolerance by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 11(4): 339–55.
- Plaschka, C., Larivière, L., Wenzek, L., Seizl, M., Hemann, M., et al. 2015. Architecture of the RNA polymerase II-Mediator core initiation complex. *Nature*,

- 518(7539): 376–80.
- Pokholok, D. K., Hannett, N. M., & Young, R. A. 2002. Exchange of RNA polymerase II initiation and elongation factors during gene expression in vivo. *Molecular Cell*, 9(4): 799–809.
- Porrua, O., & Libri, D. 2015. Transcription termination and the control of the transcriptome: why, where and how to stop. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(3): 190–202.
- Powers, T., & Walter, P. 1999. Regulation of ribosome biogenesis by the rapamycin-sensitive TOR-signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. (C. Kaiser, Ed.) *Molecular Biology of the Cell*, 10(4): 987–1000.
- Proudfoot, N. 2004. New perspectives on connecting messenger RNA 3' end formation to transcription. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(3): 272–8.
- Proudfoot, N. J. 2011. Ending the message: poly(A) signals then and now. *Genes & Development*, 25(17): 1770–1782.
- Proudfoot, N., & O'Sullivan, J. 2002. Polyadenylation: a tail of two complexes. *Current Biology: CB*, 12(24): R855-7.
- Quan, T. K., & Hartzog, G. A. 2010. Histone H3K4 and K36 methylation, Chd1 and Rpd3S oppose the functions of *Saccharomyces cerevisiae* Spt4-Spt5 in transcription. *Genetics*, 184(2): 321–34.
- Radonjic, M., Andrau, J.-C., Lijnzaad, P., Kemmeren, P., Kockelkorn, T. T. J. P., et al. 2005. Genome-Wide Analyses Reveal RNA Polymerase II Located Upstream of Genes Poised for Rapid Response upon *S. cerevisiae* Stationary Phase Exit. *Molecular Cell*, 18(2): 171–183.
- Ralsler, M., Wamelink, M. M. C., Latkolik, S., Jansen, E. E. W., Lehrach, H., et al. 2009. Metabolic reconfiguration precedes transcriptional regulation in the antioxidant response. *Nature Biotechnology*, 27(7): 604–5.
- Rando, O. J., & Winston, F. 2012. Chromatin and Transcription in Yeast. *Genetics*, 190(2): 351–387.
- Reines, D., Conaway, J. W., & Conaway, R. C. 1996. The RNA polymerase II general elongation factors. *Trends in Biochemical Sciences*, 21(9): 351–5.
- Richard, D. J., Bolderson, E., & Khanna, K. K. 2009. Multiple human single-stranded DNA binding proteins function in genome maintenance: structural, biochemical and functional analysis. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 44(2–3): 98–116.

- Richard, P., & Manley, J. L. 2009. Transcription termination by nuclear RNA polymerases. *Genes & Development*, 23(11): 1247–69.
- Richter, K., Haslbeck, M., & Buchner, J. 2010. The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death. *Molecular Cell*, 40(2): 253–266.
- Riles, L., Shaw, R. J., Johnston, M., & Reines, D. 2004. Large-scale screening of yeast mutants for sensitivity to the IMP dehydrogenase inhibitor 6-azauracil. *Yeast*, 21(3): 241–248.
- Robinson, P. J., Trnka, M. J., Bushnell, D. A., Davis, R. E., Mattei, P.-J., et al. 2016. Structure of a Complete Mediator-RNA Polymerase II Pre-Initiation Complex. *Cell*, 166(6): 1411–1422.e16.
- Rodrigues-Pousada, C., Menezes, R. A., & Pimentel, C. 2010. The Yap family and its role in stress response. *Yeast*, 27(5): 245–258.
- Rodríguez-Gil, A., García-Martínez, J., Pelechano, V., Muñoz-Centeno, M. de la C., Geli, V., et al. 2010. The distribution of active RNA polymerase II along the transcribed region is gene-specific and controlled by elongation factors. *Nucleic Acids Research*, 38(14): 4651–4664.
- Rodriguez, C. R., Cho, E. J., Keogh, M. C., Moore, C. L., Greenleaf, A. L., et al. 2000. Kin28, the TFIIH-associated carboxy-terminal domain kinase, facilitates the recruitment of mRNA processing machinery to RNA polymerase II. *Molecular and Cellular Biology*, 20(1): 104–12.
- Rosado-Lugo, J. D., & Hampsey, M. 2014. The Ssu72 phosphatase mediates the RNA polymerase II initiation-elongation transition. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(49): 33916–26.
- Rosonina, E., Kaneko, S., & Manley, J. L. 2006. Terminating the transcript: breaking up is hard to do. *Genes & Development*, 20(9): 1050–6.
- Rosonina, E., Willis, I. M., & Manley, J. L. 2009. Sub1 functions in osmoregulation and in transcription by both RNA polymerases II and III. *Molecular and Cellular Biology*, 29(8): 2308–21.
- Runner, V. M., Podolny, V., & Buratowski, S. 2008. The Rpb4 subunit of RNA polymerase II contributes to cotranscriptional recruitment of 3' processing factors. *Molecular and Cellular Biology*, 28(6): 1883–91.
- Sadeh, A., Movshovich, N., Volokh, M., Gheber, L., & Aharoni, A. 2011. Fine-tuning of the Msn2/4-mediated yeast stress responses as revealed by systematic deletion of Msn2/4 partners. (C. Boone, Ed.) *Molecular Biology of the Cell*, 22(17): 3127–

3138.

- Sainsbury, S., Bernecky, C., & Cramer, P. 2015. Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(3): 129–143.
- Sanchez, Y., & Lindquist, S. L. 1990. HSP104 required for induced thermotolerance. *Science (New York, N.Y.)*, 248(4959): 1112–5.
- Saunders, A., Core, L. J., & Lis, J. T. 2006. Breaking barriers to transcription elongation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(8): 557–567.
- Schang, L. M., Hwang, G. J., Dynlacht, B. D., Speicher, D. W., Bantly, A., et al. 2000. Human PC4 is a substrate-specific inhibitor of RNA polymerase II phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(9): 6071–4.
- Schoppee Bortz, P. D., & Wamhoff, B. R. 2011. Chromatin immunoprecipitation (ChIP): revisiting the efficacy of sample preparation, sonication, quantification of sheared DNA, and analysis via PCR. (Y. Dalal, Ed.) *PloS One*, 6(10): e26015.
- Schrieck, A., Easter, A. D., Etzold, S., Wiederhold, K., Lidschreiber, M., et al. 2014. RNA polymerase II termination involves C-terminal-domain tyrosine dephosphorylation by CPF subunit Glc7. *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(2): 175–179.
- Schüller, R., Forné, I., Straub, T., Schrieck, A., Texier, Y., et al. 2016. Heptad-Specific Phosphorylation of RNA Polymerase II CTD. *Molecular Cell*, 61(2): 305–314.
- Selth, L. A., Sigurdsson, S., & Svejstrup, J. Q. 2010. Transcript Elongation by RNA Polymerase II. *Annual Review of Biochemistry*, 79(1): 271–93.
- Seppä, L., Hänninen, A.-L., & Makarow, M. 2004. Upregulation of the Hsp104 chaperone at physiological temperature during recovery from thermal insult. *Molecular Microbiology*, 52(1): 217–225.
- Shandilya, J., & Roberts, S. G. E. 2012. The transcription cycle in eukaryotes: From productive initiation to RNA polymerase II recycling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(5): 391–400.
- Shaner, L., Gibney, P. A., & Morano, K. A. 2008. The Hsp110 protein chaperone Sse1 is required for yeast cell wall integrity and morphogenesis. *Current Genetics*, 54(1): 1–11.
- Sharma, N., & Kumari, R. 2013. Rpb4 and Rpb7: multifunctional subunits of RNA polymerase II. *Critical Reviews in Microbiology*, 39(4): 362–372.
- Shaw, R. J., & Reines, D. 2000. *Saccharomyces cerevisiae* transcription elongation

- mutants are defective in PUR5 induction in response to nucleotide depletion. *Molecular and Cellular Biology*, 20(20): 7427–37.
- SHERMAN, F. 2005. The importance of mutation, then and now: studies with yeast cytochrome. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 589(1): 1–16.
- Sikorski, T. W., Ficarro, S. B., Holik, J., Kim, T., Rando, O. J., et al. 2011. Sub1 and RPA Associate with RNA Polymerase II at Different Stages of Transcription. *Molecular Cell*, 44(3): 397–409.
- Sims, R. J., Rojas, L. A., Beck, D. B., Bonasio, R., Schüller, R., et al. 2011. The C-terminal domain of RNA polymerase II is modified by site-specific methylation. *Science (New York, N.Y.)*, 332(6025): 99–103.
- Sliva, A., Kuang, Z., Meluh, P. B., & Boeke, J. D. 2016. Barcode Sequencing Screen Identifies SUB1 as a Regulator of Yeast Pheromone Inducible Genes. *G3 (Bethesda, Md.)*, 6(4): 881–92.
- Smolka, M. B., Albuquerque, C. P., Chen, S. -h., & Zhou, H. 2007. Proteome-wide identification of in vivo targets of DNA damage checkpoint kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(25): 10364–10369.
- Söding, J., Biegert, A., & Lupas, A. N. 2005. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Research*, 33(Web Server issue): W244–8.
- Steigemann, B., Schulz, A., & Werten, S. 2013. Bacteriophage T5 encodes a homolog of the eukaryotic transcription coactivator PC4 implicated in recombination-dependent DNA replication. *Journal of Molecular Biology*, 425(22): 4125–33.
- Suh, H., Ficarro, S. B., Kang, U.-B., Chun, Y., Marto, J. A., et al. 2016. Direct Analysis of Phosphorylation Sites on the Rpb1 C-Terminal Domain of RNA Polymerase II. *Molecular Cell*, 61(2): 297–304.
- Taatjes, D. J. 2010. The human Mediator complex: a versatile, genome-wide regulator of transcription. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(6): 315–322.
- Takagi, Y., & Kornberg, R. D. 2006. Mediator as a General Transcription Factor. *Journal of Biological Chemistry*, 281(1): 80–89.
- Tang, L., Nogales, E., & Ciferri, C. 2010. Structure and function of SWI/SNF chromatin remodeling complexes and mechanistic implications for transcription. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 102(2–3): 122–128.
- Tanny, J. C. 2014. Chromatin modification by the RNA Polymerase II elongation complex. *Transcription*, 5(5): e988093.

- Tavenet, A., Suleau, A., Dubreuil, G., Ferrari, R., Ducrot, C., et al. 2009. Genome-wide location analysis reveals a role for Sub1 in RNA polymerase III transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(34): 14265–70.
- Thomas, B. J., & Rothstein, R. 1989. The genetic control of direct-repeat recombination in *Saccharomyces*: the effect of rad52 and rad1 on mitotic recombination at GAL10, a transcriptionally regulated gene. *Genetics*, 123(4): 725–38.
- Thomas, M. C., & Chiang, C.-M. 2006. The general transcription machinery and general cofactors. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 41(3): 105–78.
- Tietjen, J. R., Zhang, D. W., Rodríguez-Molina, J. B., White, B. E., Akhtar, M. S., et al. 2010. Chemical-genomic dissection of the CTD code. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(99): 1154–1161.
- Tombácz, I., Schauer, T., Juhász, I., Komonyi, O., & Boros, I. 2009. The RNA Pol II CTD phosphatase Fcp1 is essential for normal development in *Drosophila melanogaster*. *Gene*, 446(2): 58–67.
- Torreira, E., Louro, J. A., Pazos, I., González-Polo, N., Gil-Carton, D., et al. 2017. The dynamic assembly of distinct RNA polymerase I complexes modulates rDNA transcription. *ELife*, 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.20832>.
- Upadhyaya, R., Lee, J., & Willis, I. M. 2002. Maf1 is an essential mediator of diverse signals that repress RNA polymerase III transcription. *Molecular Cell*, 10(6): 1489–94.
- Valadkhan, S. 2005. snRNAs as the catalysts of pre-mRNA splicing. *Current Opinion in Chemical Biology*, 9(6): 603–608.
- Vergheze, J., Abrams, J., Wang, Y., & Morano, K. A. 2012. Biology of the Heat Shock Response and Protein Chaperones: Budding Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a Model System. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(2): 115–158.
- Viktorovskaya, O. V., Appling, F. D., & Schneider, D. A. 2011. Yeast Transcription Elongation Factor Spt5 Associates with RNA Polymerase I and RNA Polymerase II Directly. *Doi.Org*, (21): 18825–18833.
- Voss, K., Forné, I., Descostes, N., Hintermair, C., Schüller, R., et al. 2015. Site-specific methylation and acetylation of lysine residues in the C-terminal domain (CTD) of RNA polymerase II. *Transcription*, 6(5): 91–101.
- Wang, J.-Y., Sarker, A. H., Cooper, P. K., & Volkert, M. R. 2004. The single-strand

- DNA binding activity of human PC4 prevents mutagenesis and killing by oxidative DNA damage. *Molecular and Cellular Biology*, 24(13): 6084–93.
- Wang, W., Carey, M., & Gralla, J. D. 1992. Polymerase II promoter activation: closed complex formation and ATP-driven start site opening. *Science (New York, N.Y.)*, 255(5043): 450–3.
- Wang, Z., & Roeder, R. G. 1998. DNA topoisomerase I and PC4 can interact with human TFIIC to promote both accurate termination and transcription reinitiation by RNA polymerase III. *Molecular Cell*, 1(5): 749–57.
- Warner, J. R. 1999. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(11): 437–40.
- Weake, V. M., & Workman, J. L. 2010. Inducible gene expression: diverse regulatory mechanisms. *Nature Reviews. Genetics*, 11(6): 426–37.
- Weiner, A., Hsieh, T.-H. S., Appleboim, A., Chen, H. V., Rahat, A., et al. 2015. High-Resolution Chromatin Dynamics during a Yeast Stress Response. *Molecular Cell*, 58(2): 371–386.
- Weiner, A., Hughes, A., Yassour, M., Rando, O. J., & Friedman, N. 2010. High-resolution nucleosome mapping reveals transcription-dependent promoter packaging. *Genome Research*, 20(1): 90–100.
- Werner, F., & Grohmann, D. 2011. Evolution of multisubunit RNA polymerases in the three domains of life. *Nature Reviews. Microbiology*, 9(2): 85–98.
- Werten, S., Kohler, C., Bayer, N. J., Steinmetz, I., & Hinrichs, W. 2016. Structural analysis and knock-out of a Burkholderia pseudomallei homolog of the eukaryotic transcription coactivator PC4. *Gene*, 577(2): 140–147.
- Werten, S., Langen, F. W., van Schaik, R., Timmers, H. T., Meisterernst, M., et al. 1998. High-affinity DNA binding by the C-terminal domain of the transcriptional coactivator PC4 requires simultaneous interaction with two opposing unpaired strands and results in helix destabilization. *Journal of Molecular Biology*, 276(2): 367–77.
- Werten, S., & Moras, D. 2006. A global transcription cofactor bound to juxtaposed strands of unwound DNA. *Nature Structural & Molecular Biology*, 13(2): 181–2.
- Werten, S., Stelzer, G., Goppelt, A., Langen, F. M., Gros, P., et al. 1998. Interaction of PC4 with melted DNA inhibits transcription. *The EMBO Journal*, 17(17): 5103–11.
- Werten, S., Wechselberger, R., Boelens, R., van der Vliet, P. C., & Kaptein, R. 1999.

- Identification of the single-stranded DNA binding surface of the transcriptional coactivator PC4 by NMR. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(6): 3693–9.
- Westfall, P. J., Ballou, D. R., & Thorner, J. 2004. When the stress of your environment makes you go HOG wild. *Science (New York, N.Y.)*, 306(5701): 1511–2.
- Westover, K. D., Bushnell, D. A., & Kornberg, R. D. 2004. Structural Basis of Transcription: Separation of RNA from DNA by RNA Polymerase II. *Science*, 303(5660): 1014–1016.
- White, R. J. 2011. Transcription by RNA polymerase III: more complex than we thought. *Nature Reviews Genetics*, 12(7): 459–463.
- Woolford, J. L., & Baserga, S. J. 2013. Ribosome Biogenesis in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 195(3): 643–681.
- Woychik, N. A., & Young, R. A. 1989. RNA polymerase II subunit RPB4 is essential for high- and low-temperature yeast cell growth. *Molecular and Cellular Biology*, 9(7): 2854–9.
- Wu, S. Y., & Chiang, C. M. 1998. Properties of PC4 and an RNA polymerase II complex in directing activated and basal transcription in vitro. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(20): 12492–8.
- Wu, W. H., Pinto, I., Chen, B. S., & Hampsey, M. 1999. Mutational analysis of yeast TFIIB. A functional relationship between Ssu72 and Sub1/Tsp1 defined by allele-specific interactions with TFIIB. *Genetics*, 153(2): 643–52.
- Wu, Y., Lu, J., & Kang, T. 2016. Human single-stranded DNA binding proteins: guardians of genome stability. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 48(7): 671–677.
- Yale, J., & Bohnert, H. J. 2001. Transcript expression in *Saccharomyces cerevisiae* at high salinity. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(19): 15996–6007.
- Yamamoto, N., Maeda, Y., Ikeda, A., & Sakurai, H. 2008. Regulation of thermotolerance by stress-induced transcription factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 7(5): 783–90.
- Yan, M., & Gralla, J. D. 1997. Multiple ATP-dependent steps in RNA polymerase II promoter melting and initiation. *The EMBO Journal*, 16(24): 7457–67.
- Yang, C., Bolotin, E., Jiang, T., Sladek, F. M., & Martinez, E. 2007. Prevalence of the initiator over the TATA box in human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human TATA-less core promoters. *Gene*, 389(1): 52–65.
- Yang, X.-J., & Seto, E. 2007. HATs and HDACs: from structure, function and

- regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene*, 26(37): 5310–8.
- Young, R. A. 1991. RNA Polymerase II. *Annual Review of Biochemistry*, 60(1): 689–715.
- Yu, L., Ma, H., Ji, X., & Volkert, M. R. 2016. The Sub1 nuclear protein protects DNA from oxidative damage. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 412(1–2): 165–71.
- Yu, L., & Volkert, M. R. 2013. Differential Requirement for SUB1 in Chromosomal and Plasmid Double-Strand DNA Break Repair. (M. Lichten, Ed.) *PLoS ONE*, 8(3): e58015.
- Zaborowska, J., Egloff, S., & Murphy, S. 2016. The pol II CTD: new twists in the tail. *Nature Structural & Molecular Biology*, 23(9): 771–777.
- Zakrzewska, A., van Eikenhorst, G., Burggraaff, J. E. C., Vis, D. J., Hoefsloot, H., et al. 2011. Genome-wide analysis of yeast stress survival and tolerance acquisition to analyze the central trade-off between growth rate and cellular robustness. *Molecular Biology of the Cell*, 22(22): 4435–4446.
- Zhang, D. W., Mosley, A. L., Ramisetty, S. R., Rodríguez-Molina, J. B., Washburn, M. P., et al. 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(11): 8541–8551.
- Zhao, Y., Sohn, J.-H., & Warner, J. R. 2003. Autoregulation in the biosynthesis of ribosomes. *Molecular and Cellular Biology*, 23(2): 699–707.

ABREVIATURAS

6-AU - 6-Azauracilo

A - Adenina

ATP - Adenosín trifosfato

BER- reparación por escisión de base

C- Citosina

C α - carbonos-alfa.

CAP- caperuza de 7-metilguanosina.

CDK - Quinasa dependiente de ciclina - *Cyclin Dependent Kinase*

cDNA - DNA copia

ChIP - Inmunoprecipitación de Cromatina – *Chromatin Immunoprecipitation*

ChIP on chip - Inmunoprecipitación de Cromatina combinado con tecnología de microarray

Co-IP - Co-inmunoprecipitación.

CPF - Factor de Corte y Poliadenilación - *Cleavage Polyadenylation Factor*

CstF - Factor de Estimulación del Corte - *Cleavage Stimulation Factor*

CTD - Dominio Carboxilo - Terminal (referido a Rpb1) - *Carboxy-Terminal Domain*.

CUTs - Transcritos crípticos inestables - *Cryptic Unstable Transcripts*

DO - Densidad Óptica

DEPC - Dietil-dicarbonato

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DNP - Ditipo No Parental

DSIF - Factor de inducción de la sensibilidad a DRB- *DRB Sensitivity Inducing Factor*

DSBs- roturas de doble cadena en el DNA

dsDNA- DNA de doble cadena.

DTT - Ditiotreitól

EDTA – Ácido etilendiaminotetraacético

ESR- Respuesta al estrés ambiental - *Environmental stress response*

EtBr - Bromuro de Etidio

FACT - Complejo que facilita la transcripción a través de la cromatina-*Facilitates Chromatin Transcription*

G - Guanina

GLAM - Acumulación de mensajeros dependiente de longitud génica – *Gene Length-dependent Accumulation of mRNA*

GTF - Factor General de la Transcripción - *General Transcription Factor*

GTP - Guanín trifosfato

HA - Hemaglutinina

HSR- Respuesta al choque térmico - *Heat shock response*.

HSP- Proteínas de Respuesta al Choque térmico – *Heat Shock Proteins*

IMD2- Inosina monofosfato deshidrogenasa 2.

Inr- elemento iniciador.

IP - Inmunoprecipitación

IPTG - isopropil- β -D-tiogalactósido

Kb - Kilobase

MMR - *Miss Macht Repair* - reparación de bases mal apareadas.

ml - mililitro

mM - milimolar

MPA - micofenolato

mRNA - RNA mensajero

NHEJ - *Non-Homologous End Joining* - recombinación no homóloga.

NER- reparación por escisión de nucleótido.

NELF - Factor de Elongación Negativo - *Negative Elongation Factor*

ng - nanogramo

nm - nanometro

nt - nucleótidos

NTPs - nucleótidos trifosfato

°C – grados centígrado

ORF - marco de lectura abierto - *Open Reading Frame*

P-TEFb - Factor positivo de Elongación b - *Positive Transcription Elongation Factor b*

PAF - Factor Asociado a la RNAPII-*RNA polymerase II Associated Factor*

PAP - PoliA polimerasa – *PolyA polymerase*

pb - pares de bases

PBS - Tampón fosfato salino - *Phosphate Buffer Saline*

PCR - Reacción en Cadena de la Polimerasa - *Polymerase Chain Reaction*

PGK - 3-fosfoglicerato quinasa

PIC - Complejo de preiniciación-*Preinitiation Complex*

Poly-A - Poliadeninas

pre-mRNA – RNA mensajero transcrito primario

Pro - prolina

qPCR - PCR cuantitativa - *Quantitative PCR*

ROS- Especies Reactivas del Oxígeno.

RNA - Ácido Ribonucleico

RNAPI - RNA polimerasa I

RNAPII - RNA polimerasa II

RNAPIII - RNA polimerasa III

RNAPIV - RNA polimerasa IV

RNAPV - RNA polimerasa V

RNP - Ribonucleopartícula

RPA - Proteína de Replicación A-*Replication Protein A*

rpm - revoluciones por minuto

rRNA - RNA ribosomal

RT-PCR - PCR acoplada a Transcripción Reversa

RT-qPCR - PCR cuantitativa acoplada a Transcripción Reversa - *Quantitative RT-PCR*

SDS - Dodecil sulfato sódico – *Sodium dodecyl sulfate*

SEAC- dominios ácidos ricos en serinas.

Ser - Serina

Ser2 - Residuo/s de serina en posición 2 del heptapéptido consenso del dominio CTD de Rpb1.

Ser5 - Residuo/s de serina en posición 5 del heptapéptido consenso del dominio CTD de Rpb1.

Ser7- Residuo/s de serina en posición 7 del heptapéptido consenso del dominio CTD de Rpb1.

Ser2P - Forma fosforilada de Ser2.

Ser5P - Forma fosforilada de Ser5.

Ser7P- Forma fosforilada de Ser7.

siRNA - RNA pequeño de interferencia-*small interference RNA*

snoRNA - RNA pequeño nucleolar-*small nucleolar RNA*

snRNA - RNA pequeño nuclear – *small nuclear RNA*

ssDNA - DNA de cadena sencilla-*single strand DNA*

snRNP- ribonucleoproteica.

ssDBPs- proteínas de unión a ssDNA.

ssDBD- Dominio de unión a DNA de cadena sencilla- *ssDNA Binding Domain*.

T - Timina

TAFs- factores asociados a la transcripción.

TAE - Tris/Acetato/EDTA

TAFs - Factores Asociados a TATA - *TATA Associated Factors*

TBE - Tris/Borato/EDTA

TBP - Proteína de unión a TATA-*TATA Binding Protein*

TCR- Reparación Acoplada a la Transcripción - *Transcription Coupled Repair*

HATs - Acetil-transferasas de Histonas

TE - Tris/EDTA

Thr - Treonina

Tm - Temperatura de anillamiento - *Melting Temperature*

tRNA - RNA de transferencia

TRO - Run-On Transcripcional - *Transcriptional Run-On*

TSS - Sitio de Inicio de la Transcripción-*Transcription Start Site*

Tyr - Tirosina

U - Uracilo

mg - microgramo

ml - microlitro

UTP - Uridin-trifosfato

UV - Ultravioleta

V - Voltios

wt - cepa silvestre – *wild tipe*