

o 11401606

TD
15



**Análisis genético y molecular de la
regulación transcripcional de HIV-1
en *Saccharomyces cerevisiae***

**Manuela Vanti
Tesis Doctoral
Universidad de Sevilla
2006**



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA
BIBLIOTECA

TD

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para que mi Tesis Doctoral Análisis genético de la regulación homeopéptica de HIV-1 de Saccharomyces Cerevisiae sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

- Consulta en depósito.
- Préstamo interbibliotecario.
 - Reproducción parcial.
 - Reproducción total.
 - Tipo de Usuarios.
 - Otros términos.

Firmado:

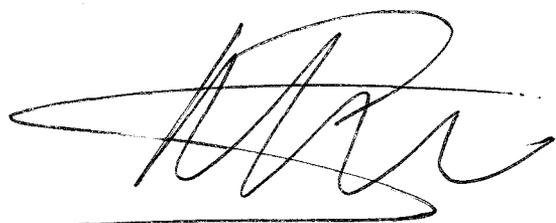
Sevilla, a 3 de Julio de ~~199~~ 2006

Análisis genético y molecular de la regulación transcripcional de HIV-1 en *Saccharomyces cerevisiae*

Trabajo realizado en el Departamento de Genética,
Facultad de Biología, Universidad de Sevilla para
optar al grado de Doctor en Biología Molecular y
Celular por la licenciada Manuela Vanti

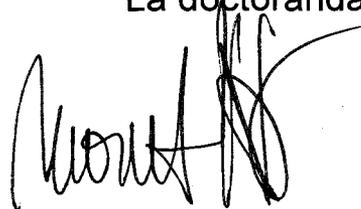
Sevilla, Abril del 2006

El Director de la Tesis



Dr. Sebastián Chávez de Diego

La doctoranda



Manuela Vanti

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARÍA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 190 número 99 del libro
correspondiente.

Sevilla, 20 de Abril de 2006

El Jefe del Negociado de Tesis

Ricardo Lafuente

ÍNDICE GENERAL

1	Introducción	1
1.1	El Virus de la Inmunodeficiencia Humana	3
1.1.1	Descripción del HIV y de su ciclo de replicación.	3
1.1.1.1	Las primeras fases de la infección: la fusión y el desnudamiento.	3
1.1.1.2	La retrotranscripción y el transporte: síntesis del DNA bicatenario y su migración al nucleo.	4
1.1.1.3	La integración.	5
1.1.1.4	Los productos de la transcripción, su transporte al citoplasma y la síntesis de los precursores proteicos.	6
1.1.1.5	La formación de las nuevas partículas víricas: el ensamblaje y la maduración	7
1.2	Homologías entre la maquinaria transcripcional de <i>S. cerevisiae</i> y la humana.	8
1.2.1	La RNA polimerasa II y la fosforilación del CTD	10
1.2.2	Las quinasas y la fosfatasa del CTD	11
1.2.2.1	Cdk8/Ciclina	11
1.2.2.2	TFIIH	11
1.2.2.3	P-TEFb	12
1.2.2.4	La fosfatasa Fcp1	13
1.2.3	Factores transcripcionales	14
1.2.3.1	DSIF	14
1.2.3.2	TFIIS	16
1.2.4	Factores que influyen en la estructura de la cromatina	17
1.2.4.1	SAGA	17
1.2.4.2	Rpd3	18
1.2.4.3	SWI/SNF	18
1.2.4.4	ISWI	19
1.2.4.5	FACT	20
1.2.4.6	Spt6	20
1.2.4.7	Chd1	21
1.2.4.8	El complejo Paf1	21
1.3	El sistema transcripcional del virus y su regulación en la célula: TAR, Tat, P-TEFb.	22
1.3.1	La transcripción de HIV-1	22
1.3.2	La LTR viral y el dominio TAR.	25
1.3.3	Tat	26
1.3.4	P-TEFb	29
1.4	Antecedentes de expresión heteróloga de HIV en <i>S. cerevisiae</i>	31
1.5	Retrotransposones de levadura	34
2	Objetivos	37

3	Resultados.....	41
3.1	Estudio del sistema transcripcional de HIV-1 en <i>S. cerevisiae</i>	43
3.1.1	Construcción y análisis de la expresión de sistemas híbridos HIV-levadura... 43	43
3.1.2	Caracterización del sistema GAL1-HIV: análisis del extremo 5' del mRNA de HIV sintetizado a partir del plásmido pGAL1-HIV en <i>S. cerevisiae</i>	45
3.1.3	Construcciones de sistemas de expresión de la proteína vírica Tat y de los principales factores humanos específicos: la ciclina T1 y la quinasa Cdk9.	48
3.1.4	Reconstitución del sistema TAR-Tat-P-TEFb en levadura.	51
3.1.5	Efecto de TAR sobre la transcripción en presencia de los factores transcripcionales.	53
3.2	Influencia del dominio TAR en la transcripción basal: el sistema híbrido δ HIV.	55
3.2.1.1	Análisis de la distribución de la RNAPolIII.....	59
3.2.1.2	Efecto de la estructura de TAR en el mRNA sobre la transcripción de HIV.	61
3.3	Análisis genético	64
3.3.1	Efecto de mutaciones que afectan a la fosforilación del CTD sobre la transcripción del HIV en la levadura.	64
3.3.2	Efecto de mutaciones en genes SPT relacionados con la estructura de cromatina sobre la transcripción de HIV en la levadura.	66
3.3.3	El complejo SAGA y Rpd1: efecto de la acetilación de histonas en la transcripción de HIV.	69
3.3.4	Dst1	71
3.3.5	Efecto de mutaciones en los genes del complejo Isw1 sobre la transcripción de HIV en la levadura.	73
3.4	Efecto de mutaciones de algunas subunidades del complejo Paf1 sobre la transcripción de HIV en la levadura.	75
3.5	Análisis <i>in vivo</i> del posicionamiento de cromatina en la secuencia de HIV clonada en δ HIV y δ HIVTARless.	77
4	Discusión	85
4.1	Respuesta de GAL1-HIV a Tat y P-TEFb.	87
4.2	δ HIV y δ HIVTARless permiten el estudio de la transcripción basal de HIV-1 en <i>S. cerevisiae</i>	91
4.2.1	El extremo 5' transcrito del HIV ejerce un efecto negativo sobre la expresión del virus en la levadura de forma dependiente del estado de activación del promotor	91
4.2.2	La RNAPolIII está pausada en el extremo 5' de δ HIV.....	94
4.2.3	Dos mecanismos distintos producen la pausa de la RNAPolIII: contribución de la estructura del mRNA TAR y papel de Spt4 en la expresión de δ HIV y δ HIVTARless.	95
4.3	Análisis genético de HIV-1 en mutantes de <i>S. cerevisiae</i>	97
4.3.1	Grupo1: factores que no influyen en la expresión de δ HIV y δ HIVTARless	98
4.3.2	Grupo2: factores que alteran la intensidad de la expresión de δ HIV y δ HIVTARless	100

4.3.3	Grupo 3: factores que anula la diferencia de expresión entre δ HIV y δ HIVTARless	105
4.3.4	Grupo 4: factores que influyen negativamente en la expresión de δ HIV	107
4.4	Contribución del posicionamiento de nucleosomas a la regulación de la elongación transcripcional temprana de HIV	111
5	Conclusiones	119
6	Materiales y métodos	123
6.1	Medios de cultivo y condiciones de crecimiento	125
6.1.1	Medios de cultivo para levadura	125
6.1.2	Medios de cultivo para bacterias	125
6.1.3	Condiciones de crecimiento	126
6.2	Antibióticos, drogas, enzimas, vectores e inhibidores	126
6.3	Cepas	129
6.3.1	Cepas de <i>Escherichia coli</i>	129
6.3.2	Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	129
6.3.3	Análisis genético en levaduras	130
6.4	Plásmidos	131
6.5	Transformaciones	134
6.5.1	Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> DH5 α	134
6.5.1.1	Método del TB	134
6.5.2	Transformación de bacterias	134
6.5.3	Transformación de levaduras	135
6.6	Análisis de expresión génica a partir del promotor de <i>GAL1</i>	135
6.7	Análisis de expresión génica a partir del promotor δ	136
6.8	Ensayo de actividades enzimáticas	136
6.8.1	Ensayo de β -galactosidasa en caja	136
6.8.2	Ensayo de actividad fosfatasa ácida	136
6.9	Extracción de ácidos nucleicos	137
6.9.1	Preparación de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> a pequeña escala por lisis alcalina (miniprep)	137
6.9.2	Preparación de DNA "carrier"	137
6.9.3	Preparación de RNA de levaduras	138
6.10	Electroforesis de ácidos nucleicos	138
6.10.1	Geles de agarosa para DNA	138
6.10.2	Geles de agarosa para RNA	139
6.11	Purificación de DNA a partir de geles de agarosa	139
6.11.1	Método del fenol	139
6.11.2	Kit de purificación GFX TM (Amersham)	139
6.12	Marcajes radioactivos de ácidos nucleicos	140

6.12.1	Marcaje de sondas de DNA por "random primer"	140
6.12.2	Marcaje de sondas por PCR.....	140
6.12.3	Marcaje 5'terminal de un cebador.....	140
6.13	Transferencia de ácidos nucleicos a membranas.....	142
6.13.1	Transferencia de dna	142
6.13.2	Transferencia de RNA.....	142
6.14	Hibridación de DNA (Southern).....	142
6.15	Hibridación de RNA (northern).....	143
6.15.1	.Rehibridación de filtros.....	143
6.16	Cuantificación de filtros	143
6.17	Detección de la expresión heteróloga de TAT <i>in vivo</i> por sistema de triple híbrido.....	144
6.18	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	144
6.18.1	Cebadores de PCR usados en esta tesis	145
6.19	Geles desnaturalizantes de proteínas (SDS-Poliacrilamida).....	146
6.20	Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa.....	147
6.21	Inmunodetección de proteínas en gel (western).....	148
6.22	Extensión de un cebador mediante transcriptasa inversa (primer extension)	148
6.23	Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).....	150
6.23.1	Preparación del cultivo	150
6.23.2	Preparación del extracto celular y rotura del DNA.....	151
6.23.3	Inmunoprecipitación	151
6.23.4	Procesamiento del input y del precipitado.	152
6.24	Análisis de la estructura de la cromatina.	153
6.24.1	Digestión parcial con la MNasa.....	153
6.24.1.1	Obtención de esferoplastos.....	153
6.24.1.2	Digestión con MNasa.....	153
6.24.1.3	Extracción de DNA desde los esferoplastos.....	153
6.24.2	Mapeo de los sitios de resistencia de la MNasa por marcaje indirecto de extremos (indirect end-labeling).....	154
6.24.3	Mapeo de nucleosomas por sensibilidad a MNasa	154
7	Bibliografía.....	CLVII

1.1 El Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV) es el agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia humana adquirida (SIDA), una patología que hoy afecta a 40 millones de personas (<http://unaids.org>).

Por la suma relevancia que posee en campo médico y por el impacto que ha causado sobre los hábitos de gran parte de la sociedad a nivel mundial, el esfuerzo investigador volcado en el estudio de este virus ha sido elevado.

Más de dos décadas después de la detección del primer caso documentado de SIDA y del aislamiento del agente etiológico (Gallo et al., 1983), se ha desarrollado una terapia farmacológica que ha permitido aumentar sensiblemente el tiempo de supervivencia de los enfermos. Sin embargo no se dispone todavía de una vacuna profiláctica o terapéutica que, a causa de las dificultades encontradas para controlar el virus por vía farmacológica, parece ser la solución para la cura y erradicación de la enfermedad.

1.1.1 Descripción del HIV y de su ciclo de replicación.

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana pertenece a la familia *Retroviridae*, genero lentivirus. Se conocen dos serotipos de HIV: el HIV-1, difundido en todo el mundo y el HIV-2, más común en el África ecuatorial.

En la partícula viral se pueden distinguir una envuelta externa, la pericápsida, constituida por una doble capa fosfolipídica y una parte central, o nucleocápsida, donde se hallan dos copias del genomio (+RNA), moléculas de tRNA y algunas enzimas.

1.1.1.1 Las primeras fases de la infección: la fusión y el desnudamiento.

La infección empieza cuando la partícula viral entra en contacto con una célula diana y funde la pericápsida con la membrana celular. El HIV-1 presenta un elevado tropismo hacia los receptores CD4 presentes en los linfocitos T *helper* CD4+, aunque se ha demostrado (Clapham and McKnight, 2001) cierta permisividad al virus por parte de otros tipos de células del sistema inmune,

células dendríticas, células endoteliales y precursores del sistema hematopoiético.

La glicoproteína de superficie gp120 presente en la pericápsida se une al receptor CD4 y activa gp41, una glicoproteína transmembranal del virus, que induce la fusión de la pericápsida con la membrana celular y la entrada de la nucleocápsida en el citoplasma de la célula infectada. Es probable que algún factor celular presente en los linfocitos T CD4+ activados favorezca el desnudamiento (*uncoating*) del virus (Auewarakul et al., 2005; de Noronha et al., 2001), aunque los actuales conocimientos no permiten todavía aclarar la dinámica de este proceso.

1.1.1.2 La retrotranscripción y el transporte: síntesis del DNA bicatenario y su migración al núcleo.

El genomio desnudo del virus se encuentra unido a varias proteínas enzimáticas celulares y virales, entre ellas la retrotranscriptasa (RT). La RT es una enzima codificada por los retrovirus que posee actividades DNA-polimerasa RNA-dependiente, DNA-polimerasa DNA-dependiente y ribonucleasa H. La forma activa es constituida por dos heterodímeros cuyas subunidades son un polipeptido de 66 kDa (p66) que actúa como polimerasa y otro polipeptido de 51 kDa (p55) que desarrolla la actividad ribonucleasa (Hottiger and Hubscher, 1996). La función de la RT es sintetizar una molécula de DNA bicatenario a partir de la molécula de RNA genómico viral utilizando como cebador una molécula de tRNA-Lys celular que se encuentra en la nucleocápsida y procede del anterior ciclo de replicación.

Si el linfocito T infectado pasa de un estado activo a uno quiescente por falta de estímulo antigénico, el DNA recién sintetizado permanece en el citoplasma aunque es inestable (Lassen et al., 2004).

Por el contrario, en los linfoblastos T CD4+, el DNA viral entra en el núcleo para integrarse en el genomio celular. El transporte del complejo de preintegración, constituido por el DNA bicatenario y factores virales y celulares, ocurre a través de poros nucleares tras el reconocimiento de la integrasa viral por parte de las nucleoporinas (Gallay et al., 1997). Popov y colaboradores

(Popov et al., 1998) han demostrado que la proteína viral R (Vpr), un polipéptido que se encuentra en la nucleocápsida y forma parte del complejo de preintegración, también regula positivamente el transporte. Vpr, además, causa un bloqueo del ciclo celular en el estadio G2 (Jowett et al., 1995) (Yoshizuka et al., 2005; Zimmerman et al., 2004) produciendo un cambio en la fisiología celular que favorece, por un mecanismo todavía desconocido, las primeras fases de la replicación viral (Groschel and Bushman, 2005).

1.1.1.3 La integración.

La siguiente fase del ciclo de replicación del HIV consiste en la integración del DNA bicatenario viral en el genoma celular. En el complejo de preintegración se encuentra la integrasa, una enzima de origen viral encargada de llevar a cabo este proceso que consta de tres pasos: en primer lugar se produce un corte endonucleolítico en una secuencia altamente conservada en el 5' y 3' LTR (long terminal repeat), luego se lleva a cabo una reacción de corte del genoma celular preferentemente en intrones de genes de elevado nivel de expresión en los linfocitos T activos (Han et al., 2004). La reacción de corte es acoplada a la ligación del extremo 3' del DNA viral con el extremo 5' libre del DNA celular. Por último, enzimas celulares reemplazan los nucleótidos eliminados en el corte endonucleolítico del primer paso.

Una vez integrado, el genoma de HIV-1 puede ser activamente transcrito y traducido, dando lugar a las proteínas estructurales y funcionales necesarias para el ensamblaje de las nuevas partículas víricas, o quedarse en estado de latencia. El estadio de latencia posterior a la integración es el que mayoritariamente afecta a pacientes tratados con la terapia antiretroviral actualmente en uso (HAART, highly active antiretroviral therapy) y representa el mayor obstáculo a la curación de la infección por vía farmacológica. Este estado puede persistir durante años incluso cuando no existe viremia y puede ocultar mutantes resistentes a los fármacos antiretrovirales (Finzi et al., 1999).

Un bajo nivel de expresión del virus caracteriza el estado de latencia en los linfocitos T CD4+ y este efecto parece ser causado por una serie de mecanismos (revisados por Lassen, 2004 (Lassen et al., 2004) que dependen

de la fisiología del linfocito en estado inactivo, de las defensas de la célula frente al agente infeccioso y de la estrategia replicativa del mismo virus.

La transcripción, la fase siguiente a la integración en el ciclo replicativo de HIV-1, siendo el objeto de esta tesis, se tratará con más detalle en el apartado 1.3.1.

1.1.1.4 Los productos de la transcripción, su transporte al citoplasma y la síntesis de los precursores proteicos.

El genoma del HIV codifica tres tipos de mRNA que se originan por procesamiento alternativo y que difieren por su longitud. En las primeras fases de la infección en el núcleo se encuentran preferentemente moléculas de RNA de 2Kb aproximadamente que codifican seis proteínas reguladoras detalladas en la Tabla1.

Tabla1. Proteínas reguladoras codificadas por HIV-1.

<i>Denominación</i>	<i>Función</i>
vif (viral infectivity factor)	Infectividad.
tat (trans-activator of transcription)	Activador transcripcional.
rev (regulator of virion expression)	Regulador de la expresión de las proteínas estructurales.
nef (negative expression regulatory factor)	Persistencia de células infectadas.
vpr (virus protein R)	Transporte del complejo de preintegración. Regulador del ciclo celular.
vpu (virus protein U)	Ensamblaje y liberación de los viriones.

Sucesivamente se producen moléculas de mRNA de 4-5Kb codificadas por el gen *env* que dan lugar, primero, a precursores proteicos glicosilados y luego a las glicoproteínas de membrana gp120 y gp41, por la acción de una endopeptidasa celular.

Al mismo tiempo es posible detectar en el núcleo transcritos de 9 Kb que no han sufrido procesamiento de intrones (*splicing*). En el citoplasma estos mRNA, bien serán encapsidados para constituir el genomio de los nuevos viriones, bien serán traducidos dando lugar a las proteínas de la cápsida y de la matriz, codificadas por el gen *gag*, o a las proteínas enzimáticas virales (RT, integrasa, proteasa), codificadas por el gen *pol*.

La molécula de mRNA correspondiente al transcrito completo contiene intrones y necesita para su transporte al citoplasma la proteína Rev. Esta se une al RNA a través de un dominio de reconocimiento RRE (Rev responsive element) localizado en la proximidad del extremo 3' del gen *env* y ausente en los mRNA que codifican las proteínas reguladoras. Rev unido a RRE recluta algunas proteínas del complejo CRM1 que conduce el mRNA a través del poro nuclear hasta el citoplasma (Cullen, 2003).

Rev, además de favorecer la acumulación de estos mRNA en el citoplasma, facilita la asociación a la maquinaria traduccional aumentando en dos ordenes de magnitud la traducción del precursor codificado por *gag* (Boris-Lawrie et al., 2001). Por desfase programado se genera un precursor polipeptídico más largo, *gag-pol*, en cantidad 20:1 (*gag:gag-pol*).

1.1.1.5 La formación de las nuevas partículas víricas: el ensamblaje y la maduración

Los precursores proteicos anteriormente descritos se desplazan a la periferia celular y, a través de una secuencia de empaquetamiento presente en el extremo 5' del genomio denominada Ψ , el precursor *gag* se une a dos moléculas de RNA viral. Los precursores interactúan entre ellos formando agregados en la cara citoplásmica de la membrana donde se han fusionado las glicoproteínas virales gp120 y gp41. Esto induce una curvatura en la membrana que termina con la gemación y la liberación del virión. Durante la gemación se produce la maduración de la partícula viral, lo que consiste en el corte realizado por la proteasa viral de los precursores *gag* y *gag-pol* en los diferentes polipéptidos estructurales y enzimáticos. Este último suceso da lugar

a la condensación de la nucleocápsida y a la formación de un virión capaz de empezar otro ciclo de replicación (Freed, 1998).

1.2 Homologías entre la maquinaria transcripcional de *S. cerevisiae* y la humana.

Entre la levadura *S. cerevisiae* y las células de organismos eucarióticos superiores existe un elevado grado de conservación por lo que concierne los mecanismos y los efectores de las funciones celulares básicas. El control de la expresión de los genes eucarióticos posee una enorme importancia en el correcto desarrollo y en la homeostasis de los organismos pluricelulares y la transcripción lleva a cabo un papel principal en este proceso. El estudio de los factores que en ella intervienen y los mecanismos que en ella operan (revisado por (Reines et al., 1999; Sims et al., 2004a; Sims et al., 2004b; Zorio and Bentley, 2004) ha recibido un notable impulso en la última década, gracias a los avances en los conocimientos genómicos y a nuevas técnicas que permiten investigar a gran escala las redes de interacciones físicas y funcionales que mantienen los factores transcripcionales. Sin embargo falta por saber si los elementos identificados hasta el momento son todos los que intervienen, cuáles son las funciones específicas de todos y cada uno de los factores y, en el caso de las funciones redundantes, cuál es la contribución de cada factor al conjunto del proceso. Tampoco sabemos si todos los genes necesitan por igual del conjunto de factores auxiliares o, en caso contrario, qué características determinan la necesidad de un determinado factor de transcripción. Una gran parte de la información disponible procede de experimentos bioquímicos realizados en sistemas animales (Orphanides and Reinberg, 2002) que han permitido definir actividades implicadas en el proceso y purificar los factores responsables.

Tabla 2. Factores implicados en la transcripción en eucariotas.

Células humanas	<i>S. cerevisiae</i>	Función principal
RNA polimerasa II (CTD)	<i>RPB1 (CTD)</i>	regula las interacciones entre al RNAPolIII y los factores que intervienen en la síntesis y procesamiento del mRNA
Cdk8/Ciclina C	<i>SRB10/SRB11</i>	impide la formación del PIC
TFIIH	<i>KIN28</i>	fosforila la Ser-5 del CTD
P-TEFb	<i>BUR1-BUR2, CTDK1</i>	fosforila la Ser-2 del CTD, Spt5 t Rad6-Bre1
FCP1	<i>FCP1</i>	desfosforila el CTD
DSIF	<i>SPT4, SPT5</i>	estabiliza la pausa en la región 5' transcrita, estimula la elongación
TFIIS	<i>DST1</i>	estimula la actividad endonucleolítica de la RNAPolIII bloqueada sobre el mRNA naciente
SAGA	<i>GCN5, SPT3, SPT8...</i>	acetila histonas y recluta factores transcripcionales al promotor
HDAC*	<i>RPD3, SIN3, UME1...</i>	desacetila histonas
hSpt6	<i>SPT6</i>	estimula la elongación, reposiciona nucleosomas
FACT	<i>SPT16, POB3</i>	estimula la elongación, remodela cromatina
hCHD1	<i>CHD1</i>	remodela cromatina, interactúa con factores de elongación y se encuentra en la región transcrita.
complejo PAF1	<i>PAF1, RTF1, LEO1, CTR9, CDC73</i>	estimula la elongación, interactúa con factores de elongación y se encuentra en la región transcrita.
hSWI/SNF*	<i>SWI/SNF</i>	desestabiliza nucleosomas y actúa como activador o como represor de la transcripción dependiendo de interacciones con otros factores
hISW* ¹	<i>ISWI, IOC2, IOC3, IOC4</i>	remodela cromatina, contribuye a la distribución de la RNAPolIII a lo

Para mayor simplicidad solo se indica una forma de los complejo señalados con asterisco.

Otra gran aportación a la comprensión de la dinámica de la transcripción proviene del estudio de este proceso en *S. cerevisiae*, un organismo unicelular cuya maquinaria transcripcional presenta un elevado grado de homología con la de los eucariotas superiores.

Aunque, obviamente, no es posible afirmar que la totalidad de los elementos celulares implicados en el control de la transcripción específica de cada gen humano estén conservados en la levadura, sí es cierto que los factores generales, también los que regulan la transcripción del HIV-1, tienen homólogos en *S. cerevisiae*. En la tabla 2 se resumen los factores que se describirán a continuación.

1.2.1 La RNA polimerasa II y la fosforilación del CTD

La pieza central de la maquinaria transcripcional es la RNA polimerasa. Esta es la enzima dedicada a la síntesis de los RNA mensajeros, entre ellos los mRNA codificados por los genes del HIV-1, y muchos RNA nucleares pequeños (snRNA). La RNA pol II está formada por 12 subunidades codificadas por los genes *RPB1* a *RPB12*.

Las subunidades Rpb1 y Rpb2 son las de mayor tamaño y las más conservadas. En distintas ocasiones a lo largo de este capítulo se ha destacado la importancia que posee el CTD de la Rpb1 en el control de la transcripción ya que en función del patrón de fosforilación del CTD varía su afinidad a los distintos factores transcripcionales. El dominio carboxiterminal de la Rpb1 de la levadura es idéntico al de humanos en un 99,2% (Morris et al., 2005). Los dos están formados por un conjunto de repeticiones en tandem del heptapéptido Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser que en *S. cerevisiae* está repetido 26 veces y en humanos 52. Según Guo y Stiller (Guo and Stiller, 2005), el elevado grado de conservación del CTD puede estar correlacionado con la conservación de las quinasas del CTD Cdk7 de TFIIH y Cdk8 del Mediador.

El patrón de fosforilación del CTD humano y de levadura es objeto de controversia: Cheng y Sharp (Cheng and Sharp, 2003) han observado que en el promotor la RNAPolIII de humanos está fosforilada en Ser-5 y en la Ser-2 y está pausada cerca de la zona de inicio de la transcripción, mientras en los promotores de levadura solo se detecta la Ser-5 fosforilada y no se produce la pausa; Morris *et al.* (Morris et al., 2005) no observan diferencias en el patrón de fosforilación en la mayoría de los genes de levadura y de humanos y confirman la imposibilidad de detectar una pausa de la RNAPolIII en la elongación temprana. Queda por establecer si los datos obtenidos con anticuerpos específicos contra la Ser-2 fosforilada son realmente fiables (Jones et al., 2004), y, en caso positivo, sería de enorme interés confirmar que la conservación del CTD en la escala evolutiva no se limita solo a la secuencia sino también al código que ella sostiene.

1.2.2 Las quinasas y la fosfatasa del CTD

Las quinasas del CTD están conservadas desde la levadura hasta humanos mientras las ciclinas presentan un nivel de homología inferior.

1.2.2.1 Cdk8/Ciclina

El par ciclin-quinasa Cdk8/ciclina C (Srb10/Srb11 en levadura) se asocia con MED12 (Srb8) y MED13 (Srb9), dando lugar a un subcomplejo proteico presente en una parte de la población de Mediador. Este subcomplejo, altamente conservado entre los eucariotas, impide la formación del complejo de preiniciación fosforilando el CTD antes de unirse al promotor (Borggreffe et al., 2002; Boube et al., 2002; Liu et al., 2001) (Samuelsen et al., 2003).

1.2.2.2 TFIIH

Cdk7, la subunidad quinasa de TFIIH, es el homólogo humano de la quinasa Kin28 de *S. cerevisiae*. TFIIH está implicado en la reparación del DNA (Le Page et al., 2000) en el control de ciclo celular (Larochelle et al., 1998) y en la regulación de la transcripción (Zurita and Merino, 2003). El papel principal que TFIIH desarrolla en la transcripción es la fosforilación del CTD en la Ser-5. Este patrón de fosforilación es un requisito necesario para el reclutamiento de

varios factores transcripcionales a la RNAPolIII, entre ellos las enzimas dedicadas al procesamiento del extremo 5' del pre-mRNA y de la metilasa de histonas Set1, y está asociado con la salida del promotor por parte de la maquinaria transcripcional y con la primeras fases de la elongación (revisado por Sims, 2004). *KIN28* es un gen esencial en la levadura y en humanos mutaciones que afectan a la funcionalidad del complejo provocan enfermedades como el xeroderma pigmentoso o la tricotiodistrofia (Zurita and Merino, 2003).

1.2.2.3 P-TEFb

Por lo que concierne al par ciclin-quinasa P-TEFb (positive transcription elongation factor b), se han aislado posibles homólogos en *S. cerevisiae* son el complejo CTDK1, cuya quinasa es codificada por el gen *CTK1* (Sternier *et al.*, 1995), y el par ciclin-quinasa Bur1/Bur2 (Yao *et al.*, 2000) (Murray *et al.*, 2001).

Ctk1 fosforila *in vivo* la Ser2 del CTD (Cho *et al.*, 2001), característica de la RNAPolIII elongante. *CTK1* no es un gen esencial en la levadura y un estudio ha demostrado que en *ctk1Δ* disminuyen los niveles de fosforilación de la Ser-2 del CTD, pero no se afecta la distribución de la RNAPolIII a lo largo de la zona transcrita (Ahn *et al.*, 2004). Así mismo, la presencia de los factores que acompañan a la RNAPolIII durante la elongación como Spt5, FACT y el complejo Paf1 (RNAPol associated factor) no varía en ausencia de la proteína (Ahn, 2004 #124}. Por lo tanto, las interacciones genéticas que Ctk1 presenta con Spt4/Spt5 y el complejo Paf1 (Lindstrom and Hartzog, 2001) (Squazzo *et al.*, 2002) no se deben a una relación entre la fosforilación del CTD llevada a cabo por CTDK-1 y el reclutamiento de estos factores a la maquinaria transcripcional. Ahn y sus colaboradores (2004) han demostrado que la presencia en la zona 3' de factores involucrados en el corte y poliadenilación del transcrito, como Rna14, Rna15, Cft1 y Cft2, es dependiente de *CTK1*, aunque la poliadenilación se desarrolle de forma normal en *ctk1Δ*.

El papel *in vivo* del complejo Bur1/Bur2 no está todavía bien definido, datos *in vitro* sugieren que la quinasa Bur1 fosforila la Ser-5 (Murray *et al.*, 2001) de

las repeticiones heptapeptídicas del CTD pero en ausencia de complejo funcional el patrón de fosforilación del CTD no varía (Keogh et al., 2003). En un trabajo más reciente se ha caracterizado una de las funciones de Bur1/Bur2 que vincula este complejo a la regulación de la elongación. Wood et al. (2005) han demostrado que Bur2 es necesario para la activación de Rad6. El complejo Rad6/Bre1 se encarga de la monoubiquitinación de la histona H2B, requisito para que ocurra la metilación de H3 por parte de COMPASS y Dot1. Esta modificación contribuye a la regulación de la transcripción (Gerber and Shilatifard, 2003) en las fases siguientes a la iniciación (Morillon et al., 2005). El complejo Paf1 también regula la activación de Rad6 y el reclutamiento de COMPASS a la RNAPolIII (Wood et al., 2003). En *bur2Δ* se produce una disminución en la zona transcrita de la presencia del complejo Paf1 (Wood et al., 2005). De esta forma Bur2 regula la metilación de la histona H3 también a través del complejo Paf1.

A la luz de estos resultados, se tiende a pensar que Bur1 y Ctk1 desarrollan un papel distinto, aunque coordinado, en la elongación de la transcripción (Cho et al., 2001; Keogh et al., 2003; Yao et al., 2000; Yao and Prelich, 2002). Es posible que estos complejos en la levadura lleven a cabo conjuntamente el papel que P-TEFb desarrolla en humanos. Keogh et al. (2003) sugieren un escenario en el que Ctk1 y Bur1 fosforilan respectivamente el CTD y Spt5, ambos sustratos de P-TEFb. No es solo la fosforilación de las serinas del CTD lo que determina la salida de la RNAPolIII del promotor y la adquisición de su plena procesividad. Cada vez parece más convincente el modelo según el que la regulación de la elongación depende de una serie de modificaciones, entre ellas fosforilaciones de distintos sustratos, que involucran varios factores transcripcionales y que en la levadura ocurren por obra de más de un complejo.

1.2.2.4 La fosfatasa Fcp1

La fosfatasa del CTD Fcp1 es otra proteína esencial altamente conservada en humanos y en levadura. Su función principal es desfosforilar los dos residuos de Ser del CTD *in vivo* (Yeo et al., 2003), aunque *in vitro* muestra

mayor eficiencia sobre la Ser-5 (Kong et al., 2005). Fcp1 presenta interacciones genéticas con Rpb1 (Kobor et al., 1999), Spt4/Spt5 (Lindstrom and Hartzog, 2001) y con el complejo Paf1 (Costa and Arndt, 2000). Es posible que Fcp1 ejerza además una función positiva sobre la transcripción independiente de su actividad catalítica (Kong et al., 2005)

1.2.3 Factores transcripcionales

1.2.3.1 DSIF

DSIF es un complejo formado por dos subunidades que se corresponden a los homólogos de los factores de transcripción de *S. cerevisiae* Spt4 y Spt5 (Wada et al., 1998b; Yamaguchi, 1999). Su papel en la regulación de la expresión del HIV-1 y de los genes eucarióticos es fundamental aunque todavía controvertido. DSIF fue aislado de extractos nucleares de células HeLa y se le atribuyó un papel negativo en la elongación transcripcional ya que causa la parada de la RNAPolIII en presencia de 5,6-dicloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazol (DRB) (Wada et al., 1998b; Yamaguchi et al., 1999). Estudios *in vitro* indican que DSIF actúa como un regulador negativo de la elongación por su capacidad de aumentar la tendencia de la RNAPolIII a quedarse pausada (Yamaguchi et al., 2002), (Renner et al., 2001). El sistema transcripcional del HIV es regulado por la acción de DSIF que, en cooperación con el complejo NELF, produce una pausa estable de la RNAPolIII tras la transcripción de TAR (Fujinaga et al., 2004) (Yamaguchi et al., 2002). Otros genes también presentan este tipo de regulación. En los genes de *heat-shock* de *Drosophila*, por ejemplo, DSIF, NELF y la RNAPolIII están localizados en la zona promotora; tras la inducción de la transcripción, NELF abandona a la RNAPolIII mientras Spt5 sigue interactuando con la maquinaria transcripcional (Andrulis, 2000 wu, 2003). Tat elimina la pausa inducida por DSIF a través de la fosforilación que P-TEFb lleva a cabo sobre el CTD de la RNAPolIII, sobre Spt5 (Kim and Sharp, 2001) (Bourgeois et al., 2002; Shim et al., 2002) y sobre NELF (Fujinaga et al., 2004). La regulación negativa de la transcripción por parte de DSIF es dependiente también de otras modificaciones post-

traduccionales de la subunidad Spt5. Kwak y sus colaboradores (Kwak et al., 2003) han demostrado que la metilación que PRMT1 y PRMT5 llevan a cabo sobre Spt5 causa una disminución de la actividad transcripcional mediada por Tat y afecta la interacción entre la Spt5 y la RNAPolIII. Aunque DSIF actúe como un factor negativo en la regulación de la expresión de HIV-1 mediada por Tat, existen muchas evidencias que apuntan también a un efecto positivo sobre la elongación por parte de Spt4 y Spt5. Spt4 es necesario para la transcripción de genes largos con un elevado contenido G+C (Rondón et al. 2003). Mason *et al.* (2005) han demostrado que la procesividad de la RNAPolIII depende de Spt4 y que esa dependencia se hace más fuerte en presencia de 6-AU. Otros factores implicados en la elongación, como Dst1, Ctk1, Rtf1 y Cdc73, son necesarios para mantener la procesividad de la RNAPolIII solo en presencia de la droga. Datos *in vitro* demuestran que Spt5 también mantiene la procesividad de la RNAPolIII (Wada et al., 1998a). Esto podría indicar que el complejo Spt4/Spt5 aumenta la estabilidad de la maquinaria transcripcional que, en presencia de drogas como el 6-AU, está perjudicada a causa de un aumento de la frecuencia de pausa. Los resultados obtenidos *in vitro* por Bourgeois *et al.* (Bourgeois et al., 2002) apuntan en esta dirección: Spt5 junto a Tat reduce la tendencia de la RNAPolIII a quedarse pausada y previene la disociación prematura del mRNA de la maquinaria transcripcional. El efecto negativo de DSIF se desarrolla en una fase temprana de la elongación cuando la RNAPolIII ha sintetizado moléculas de mRNA de pequeño tamaño. En esta fase, la pausa de la maquinaria transcripcional permitiría el correcto procesamiento del extremo 5' de la molécula de pre-mRNA. Existe una conexión física y funcional entre DSIF y el proceso de *capping* que parecen confirmar esta hipótesis. Spt5 interactúa con las enzimas encargadas del *capping* en células humanas (Wen and Shatkin, 1999) y de *Saccharomyces pombe* (Pei and Shuman, 2002).

Parece que el procesamiento del extremo 5' influye también en el procesamiento del pre-mRNA. Lindstrom *et al.* (2003) y Xiao et al (2005) han demostrado que en mutantes de *spt4*, *spt5* y también en mutantes que están

afectados en *CEG1*, el gen que codifica la guanililtransferasa de *S. cerevisiae*, el procesamiento de intrones de varios genes no se lleva a cabo correctamente.

1.2.3.2 TFIIS

TFIIS es otro factor transcripcional que está conservado en los organismos eucarióticos. TFIIS promueve que la RNAPolIII elongante salga de un bloqueo causado por características intrínsecas de la secuencia de DNA, por la presencia de proteínas asociadas al DNA o por drogas que favorecen el establecimiento de pausas, como el ácido micofenólico o el 6-AU. Su función es estimular la actividad catalítica intrínseca de la RNAPolIII para producir un corte endonucleolítico en el mRNA naciente. Cuando este corte se produce la enzima retrocede algunos nucleótidos sobre el molde de DNA y esto permite el posicionamiento correcto de la molécula de RNA con respecto al sitio catalítico y que se reanude la síntesis. TFIIS interactúa físicamente con la RNAPolIII (Wu et al., 1996) a lo largo de la región codificante de genes inducibles y constitutivos (Prather et al., 2005a). *DST1*, que codifica el homólogo de TFIIS en *S. cerevisiae*, presenta interacciones genéticas con genes implicados a la elongación transcripcional como *SPT5* (Lindstrom and Hartzog, 2001), *SPT16* (Orphanides et al., 1999), *RTF1* (Costa and Arndt, 2000) *CTK1* (Jona et al., 2001). El mutante *dst1Δ* es viable y no presenta ningún tipo de defectos de crecimiento. *DST1* se vuelve esencial en presencia de drogas que disminuyen la disponibilidad de nucleótidos en la célula como el 6-azauracilo (6-AU) y el ácido micofenólico. Durante varios años se ha considerado TFIIS como el paradigma del factor transcripcional que regula la elongación. Sin embargo recientemente se está valorando la posibilidad que TFIIS esté implicado también en la regulación de la iniciación transcripcional. Hay datos genéticos, estudios *in vivo* e *in vitro* que apuntan en esta dirección, como las interacciones que existen entre *dst1Δ* y mutaciones en *KIN28*, la quinasa de TFIIF Lindstrom, 2001 #177}, o con las subunidades del Mediador *SRB5*, *SIN4*, y *GAL11* (Malagon et al., 2004). Datos *in vivo* indican que TFIIS está presente en el promotor del gen *GAL1* de levadura de forma dependiente de

SAGA y que contribuye al reclutamiento de TBP (TATA binding protein) a la caja TATA. TFIIIS es también un factor clave cuando la pausa que la RNAPolIII sufre en la zona próxima al promotor se convierte en un arresto de la enzima (Kireeva et al., 2005).

1.2.4 Factores que influyen en la estructura de la cromatina

Las proteínas histónicas, la composición de los nucleosomas así como los complejos remodeladores de cromatina están conservados en los eucariotas.

Los nucleosomas reducen la tasa de elongación de la RNAPolIII *in vitro*, provocando que la enzima se pause antes de alcanzar el punto de terminación (Izban and Luse, 1991) Para que la transcripción sea eficiente es necesario que la cromatina sea modificada. Las células eucarióticas disponen de dos mecanismos que facilitan la transcripción de un molde cromatinizado: la modificación covalente de las histonas y la remodelación dependiente de ATP.

La cola constituye el principal sustrato para las modificaciones que sufren las histonas: acetilación, metilación, fosforilación y ubiquitinación. Algunas modificaciones, como la acetilación de las colas amino-terminales de las histonas, tienen el objetivo de desestabilizar la estructura de la cromatina para que el molde de DNA sea más accesible a la maquinaria transcripcional y a los remodeladores de cromatina (Struhl, 1998). El grado de acetilación de las histonas es el resultado de la acción de las acetiltransferasas de histonas (HAT) y de las desacetilasas de histonas (HDAC).

1.2.4.1 SAGA

SAGA es un complejo multiproteico, conservado entre eucariotas (Daniel et al., 2004; Martinez et al., 2001; Yu et al., 2000), que lleva a cabo varias funciones que tienen como principal objetivo la regulación de la iniciación transcripcional a través de dos mecanismos fundamentales: la modificación de las histonas en la zona promotora y el reclutamiento de factores generales de la transcripción en el complejo de pre-iniciación (Wu, 2004).

Gcn5 es la subunidad catalítica que lleva a cabo la acetilación de las colas de histonas y su actividad enzimática es regulada por Ada2 y Ada3 (Grant et

al., 1997). Spt3 y Spt8 controlan las interacciones entre la caja TATA y TBP en varios promotores (Dudley et al., 1999). Tra1 interactúa *in vitro* con un amplio número de activadores transcripcionales y se piensa que desarrolla un importante papel en el reclutamiento de SAGA al promotor (Brown et al., 2001). Otras subunidades, como Spt7, Spt20 y Ada1, estructuran el complejo. Existe una forma alternativa de SAGA, denominada SLIK (SAGA like) que se diferencia del primer complejo por la ausencia de Spt8 (Pray-Grant et al., 2005).

1.2.4.2 Rpd3

Entre los complejos que poseen actividad desacetilasa de histonas destaca Sin3/HDAC. Rpd3 es su subunidad catalítica que desarrolla un importante papel en procesos de represión y silenciamiento génico y en la regulación a nivel global de los niveles de acetilación de histonas (revisado por (Lieb and Clarke, 2005). Rpd3 se ha encontrado en dos complejos, RPD3 (S) y RPD3 (L) que, a parte de la subunidad catalítica, comparten las proteínas Sin3 y Ume1. RPD (S) se une a los nucleosomas de la región 3' transcrita de forma dependiente de la metilación de la Lys36 de las histonas H3 y promueve la desacetilación de las histonas posicionadas en esta zona (Lieb and Clarke, 2005). RPD (L) está implicado en fenómenos de silenciamiento telomérico. El complejo contiene subunidades específicas que dirigen la actividad desacetilasa a la zona promotora y producen la represión de la transcripción (Silverstein and Ekwall, 2005).

1.2.4.3 SWI/SNF

SWI/SNF es un complejo remodelador de cromatina con actividad ATPasa que incluye varias proteínas conservadas y otras subunidades no conservadas. La subunidad Snf5 es necesaria para la remodelación de la cromatina *in vivo*. SWI/SNF ejerce un papel positivo sobre la transcripción ya que su acción es necesaria para la remodelación de la cromatina en el promotor de IFN- β que permite la unión de TBP a la TATA. Sin embargo hay evidencias experimentales que indican que este complejo puede actuar como

un represor de la transcripción (Martens and Winston, 2003). Todavía no se conoce el mecanismo molecular que determina la función de este complejo pero se especula que por un lado SWI/SNF pueda actuar como represor a través de interacciones directas con al cromatina de promotores inactivos o a través de la unión a otros factores como el complejo Sin3/HDAC,(Martens and Winston, 2003).

1.2.4.4 ISWI

Ente los complejos remodeladores dependiente de ATP destaca el complejo ISWI

ISWI (imitation switch) es un importante regulador de la transcripción que actúa en la iniciación (Kent et al., 2001) y en distintas fases de la elongación y (Morillon et al., 2003). En humanos ha sido posible aislar en homólogo de *Isw1p* pero todavía no se ha podido aclarar si estas proteínas desarrollan una actividad parecida en los dos organismos (Sims et al., 2004a). En la levadura se han aislado dos complejos (Vary et al., 2003) ISWI: *Isw1* posee actividad ATPasa y es la subunidad común a los dos complejos, se encuentra unida al factor accesorio *loc3* en ISW1a o a *loc2* y *loc4* en ISW1b (revisado por (Mellor and Morillon, 2004). *Isw1* controla distintas etapas de la transcripción en función de las subunidades a las que se une. ISW1a regula negativamente la iniciación actuando sobre la estructura de la cromatina en el promotor (Morillon et al., 2003). ISW1b regula y acopla la elongación a la maduración del mRNA y a la terminación de la transcripción. Las diferentes subunidades de este complejo regulan específicamente el nivel de fosforilación del CTD, *loc2* es necesario para la fosforilación de la Ser-5 y *loc4* para la fosforilación de la ser-2 (Morillon et al., 2003) *loc4* regula también la presencia de factores encargados del corte y de al poliadenilación del mRNA y de la metilación de la histonas H3. Esto sugiere que *loc2* y *loc4* aunque pertenezcan al mismo complejo, actúan de forma distinta. *Isw1* parece estar implicado en el control de la pausa de la RNAPolIII que ocurre en la zona 5' de genes activamente transcritos y en un mecanismo de control del mRNA basado en la terminación prematura de la transcripción. Este mecanismo, opuesto a la acción de Spt4

(Morillon et al., 2005; Morillon et al., 2003) está regulado por el estado de metilación de las histonas H3 (Morillon et al., 2005), que determina el reclutamiento de Isw1 a la cromatina (Santos-Rosa et al., 2003) y la distribución de la RNAPolIII a lo largo de la zona transcrita.

1.2.4.5 FACT

Entre los complejos remodeladores de cromatina no dependientes de ATP recordamos FACT (facilitates chromatin transcription). Su acción se desarrolla en una fase posterior a la apertura del promotor y es necesaria para la transcripción sobre moldes cromatinizados. FACT es un heterodímero costituido por hSpt16 and SSRP1 (structure specific recognition protein-1) (Orphanides et al., 1999), y en levadura por Spt16 (Winston and Sudarsanam, 1998), Pob3 (Wittmeyer and Formosa, 1997), y Nhp6. Spt16 y Pob3 presentan interacciones genéticas con Spt4, Spt5, Spt6, Chd1 y el complejo Paf1(Lindstrom and Hartzog, 2001); (Simic et al., 2003), Krogan 2002 (Squazzo et al., 2002); Spt16 interacciona con la RNAPolIII a lo largo de la región codificante de genes activamente transcritos(BUSCA) de forma dependiente de TFIIH (Mason and Struhl, 2005).

1.2.4.6 Spt6

Otra proteína implicada en la remodelación de cromatina durante la elongación es Spt6. Este factor interactúa con las histonas H3 (Bortvin and Winston, 1996) mientras FACT se une a los dímeros H2A-H2B (Orphanides et al., 1999), ambas proteínas in vitro son capaces de reposicionar histonas en el DNA (Bortvin and Winston, 1996; Orphanides et al., 1999). Esto sugiere que la función de Spt6 y FACT es facilitar el paso de la RNAPolIII a través de la cromatina desestabilizando de forma reversible la estructura del nucleosoma y reposicionando los nucleosomas tras el paso de la RNAPolIII. Spt6 interactúa genéticamente con Spt4 y Spt5 (Swanson and Winston, 1992). y con subunidades el complejo Swi/Snf (Bortvin and Winston, 1996). Mutaciones de *spt6* causan alteraciones en la estructura de la cromatina (Bortvin and Winston, 1996) y aparición de transcritos anómalos, debido a la activación de la

transcripción a partir de sitios crípticos de inicio presentes en la zona codificante de algunos genes (Kaplan et al., 2003). hSpt6 actúa como un factor positivo de la elongación, tanto aisladamente como junto a TFIIS (Endoh et al., 2004). En la levadura se han detectado varias interacciones que sugieren que Spt6 participa al control de la elongación transcripcional: Spt6 se encuentra unido a FACT y a Spt5 (Krogan et al., 2002) y presenta interacciones genéticas con TFIIS y el complejo Paf1 (Costa and Arndt, 2000; Hartzog et al., 2002). Además, ciertas mutaciones en *spt6* provocan la aparición de un fenotipo de sensibilidad a 6-AU (Hartzog et al., 1998).

1.2.4.7 Chd1

Chd1 es otra ATPasa que remodela nucleosomas *in vitro* y regula la transcripción en distintas fases. Pray-Grant *et al.* (Pray-Grant et al., 2005) han demostrado que Chd1 interactúa físicamente con SAGA y SLIK. También se ha demostrado que Chd1 presenta interacciones físicas y genéticas con el complejo Paf1, DSIF, y FACT y que se une a cromatina en la región codificante de genes activamente transcritos (Simic et al., 2003). Estos resultados apuntan a un papel de Chd1 en la elongación transcripcional.

1.2.4.8 El complejo Paf1

Paf1 es un complejo que se asocia a la cromatina de la zona promotora y de la región codificante de los genes activamente transcritos (Krogan et al., 2002). Mutantes afectados en una de las 5 subunidades que constituyen el complejo (Paf1, Leo1, Cdc73, Ctr9 y Rtf1) presentan fenotipos relacionados con defectos en elongación como el fenotipo Spt y la sensibilidad a 6-AU (Squazzo et al., 2002). El complejo Paf1 interactúa físicamente con la RNAPolIII (Mueller, 2004), con Spt5 (Squazzo et al., 2002) y con FACT (Squazzo et al., 2002). Interacciones genéticas con varios factores transcripcionales implicados en la regulación de la estructura de la cromatina durante la elongación como FACT (Squazzo et al., 2002) y Chd1 (Simic et al., 2003) sugieren la posibilidad que el complejo Paf1 esté implicado en este proceso. Recientes estudios apoyan esta hipótesis. Xiao y colaboradores (Xiao et al., 2005a) y Wood y colaboradores

(Wood et al., 2005) han demostrado que Bur1/Bur2, el complejo Paf1 y Bre1/Rad6 interactúan para producir la monoubiquitinación de H2B, requisito para que ocurra la metilación de H3 por parte de Set1 y Set2. Esta modificación contribuye a la regulación de la transcripción (Gerber y Shilatifard, 2003) en las fases siguientes a la iniciación (Morillon et al., 2005).

1.3 El sistema transcripcional del virus y su regulación en la célula: TAR, Tat, P-TEFb.

El estudio de la maquinaria transcripcional del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1) (revisado por (Karn, 1999); (Bannwarth and Gatignol, 2005) ha puesto de manifiesto que este virus regula su expresión génica a través del control de varios procesos, entre los que destaca la elongación transcripcional. Esta peculiaridad hace que el sistema transcripcional del HIV se haya convertido en un interesante instrumento para estudiar la elongación transcripcional y las interacciones que se desarrollan en este contexto.

Los principales elementos que regulan la transcripción del genoma del HIV-1 son el dominio TAR del RNA viral, la proteína Tat y el complejo P-TEFb. A continuación se procederá a una breve descripción de la dinámica de la transcripción en el HIV-1 y de los factores principales que la regulan. Asimismo se intentarán aclarar algunos aspectos de la compleja red de interacciones existentes entre reguladores de la transcripción de origen celular y viral, proteínas enzimáticas y estructurales y complejos remodeladores de la cromatina.

1.3.1 La transcripción de HIV-1.

La iniciación de la transcripción en el LTR viral sigue la normal dinámica de las células eucarióticas (revisado por (Roeder, 2005)) y necesita además varios reguladores celulares, algunos de ellos típicos de los linfocitos.

Tras la apertura del promotor se ensambla el complejo de preiniciación (PIC).

Varios factores generales de la transcripción (GTFs) se requieren para este proceso y el posterior inicio de la transcripción. En primer lugar TFIID se une al promotor a través de la TBP. Esa interacción es estabilizada por TFIIA (Coleman et al., 1999). TFIIB lleva la polimerasa al promotor mediante su capacidad de unirse a TBP, a la RNA polimerasa II (RNAPolII) y a la secuencia BRE, situada aguas abajo de TATA (Conaway and Conaway, 1991) (Flores et al., 1991; Killeen et al., 1992). TFIIF estabiliza la unión y recluta TFIIIE y TFIIH, que facilitan el inicio de la transcripción y la salida de la RNA polimerasa del promotor. Muchas de las interacciones entre GTFs y RNA polII ocurren a través de CSRP. Este complejo, homólogo humano del Mediador, estimula también la acción del par ciclín/quinasa perteneciente a TFIIH, ciclina H/ Cdk7. El sustrato preferente de Cdk7 es el dominio carboxiterminal (CTD) de la subunidad RPB1 de la RNA polII y más concretamente de los residuos de serina en posición 5 (Ser-5) de las repeticiones heptapeptídicas que constituyen el CTD. La hiperfosforilación del CTD en estos residuos aminoacídicos produce un remplazamiento en el tipo de proteínas que interactúan con la RNAPolII a favor de los factores de elongación.

Los primeros pasos de la elongación de la transcripción se caracterizan por la inestabilidad del complejo transcripcional y por la escasa procesividad de la RNAPolII, lo que se refleja en la aparición de transcritos cortos no poliadenilados. La transcripción de las primeras 59 pb del genoma del HIV-1 lleva a la síntesis de un dominio de RNA denominado TAR (trans-activation responsive region) que, junto a la proteína viral Tat (trans-activator of transcription), desarrolla un papel clave en la regulación de la transcripción del virus.

En ausencia de Tat la RNAPolII se detiene tras haber transcrito la secuencia de DNA que codifica TAR (Palangat et al., 1998) y se mantiene allí unida a los factores negativos de la elongación DSIF (DRB sensitivity inducing factor) y NELF (negative elongation factor) (Chiu et al., 2001). La interacción de Tat con el dominio TAR provoca la activación de la proteína que, en la nueva conformación, puede interactuar con P-TEFb, formando un complejo ternario

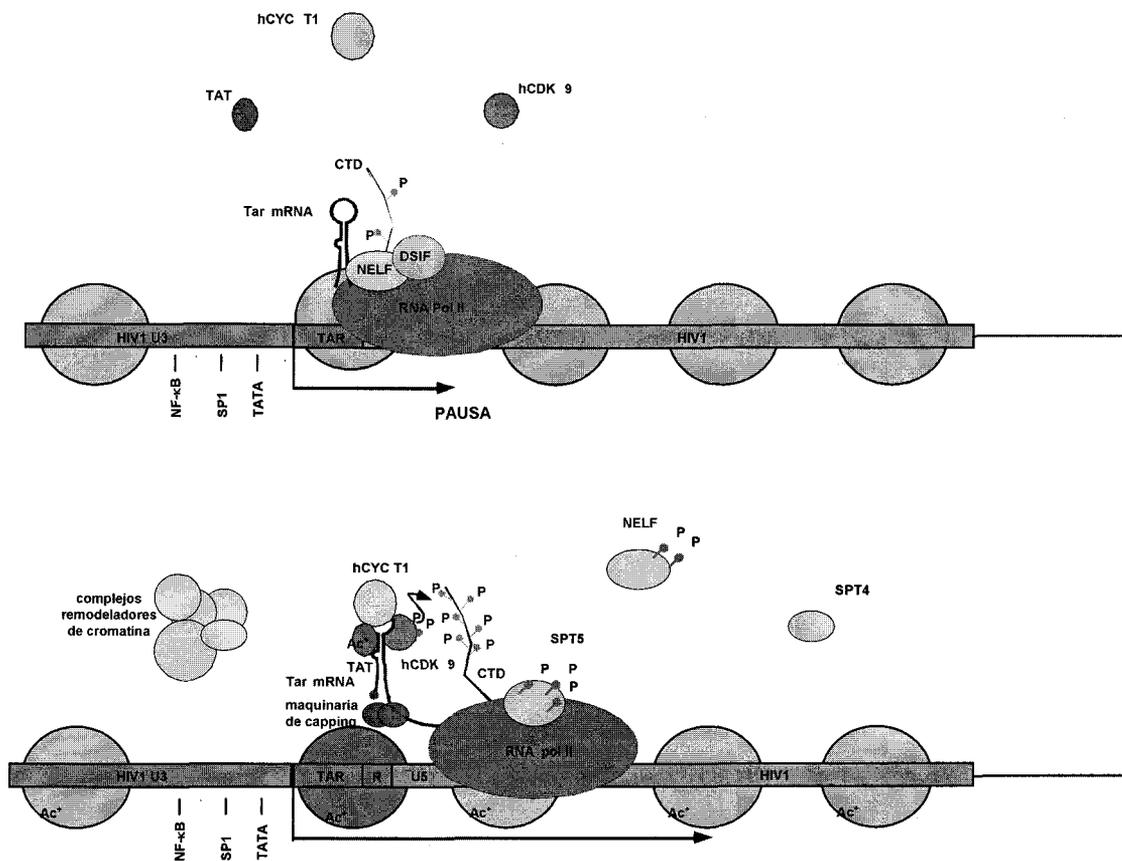


Figura 1. Representación de la regulación de la elongación transcripcional de HIV-1 mediada por Tat: (A) la RNApolIII sufre una pausa tras transcribir el dominio TAR, se encuentra unida a DSIF y NELF y su CTD está hipofosforilado. En el genoma de HIV-1 posicionan establemente nucleosomas desacetilados (círculos celestes). (B) Tat recluta la forma del complejo P-TEFb constituida por hCycT1 y Cdk9 y se unen a TAR. Cdk9 se autofosforila y fosforila el CTD de la RNApolIII, Spt5, provocando su separación de Spt4 y NELF, que se aleja de la RNApolIII. Tat interactúa con la maquinaria de capping promoviendo el procesamiento del extremo 5' del mRNA TAR. Se establecen interacciones entre Tat y complejos remodeladores de cromatina como SWI/SNF y complejos acetiltransferasas como CBP/p300 y que acetilan Tat y los nucleosomas posicionados en el HIV-1. El nucleosoma que protege el extremo 5' transcrito se remodela (círculo gris).

constituido por Tat, TAR y P-TEFb, en conjunto mucho más estable que la simple interacción TAR-Tat.

P-TEFb está constituido por la ciclina T1, que interacciona específicamente con Tat, y por Cdk9, que, tras la activación del complejo Tat-ciclina T1, se autofosforila. Cdk9, asimismo, lleva a cabo la hiperfosforilación del CTD en las serinas situadas en posición 2 (Ser-2) de las repeticiones heptapeptídicas y la fosforilación de Spt5 (Zhou et al., 2004) (Yamada et al., 2006), subunidad del complejo DSIF, y de NELF-E, subunidad de NELF (Fujinaga et al., 2004).

La fosforilación de Spt5 y su metilación (Sims et al., 2004a) parecen ser requisitos indispensables para la apertura del complejo DSIF: Spt4, la otra proteína que en humanos constituye DSIF, y NELF abandonan la RNAPolIII. El cambio en el patrón de fosforilación del CTD y una serie de interacciones que Tat desarrolla con numerosos factores de elongación (véase apartado 1.3.3) producen la formación del complejo de elongación transcripcional (TEC), etapa fundamental para que la RNAPolIII pueda, finalmente, llevar a cabo eficientemente la transcripción del genoma viral.

1.3.2 La LTR viral y el dominio TAR.

En la LTR viral se diferencian tres regiones: U3, R, U5 (Figura 1) (Haseltine, 1991). En la región U3 se encuentran dominios de unión a factores generales de la transcripción (GTFs) como la caja TATA (nucleótido -22) o, una secuencia rica en GC donde se une el factor transcripcional Sp-1. Más lejos del sitio de inicio de la transcripción, se encuentran dos secuencias de unión para el factor NFAT (nuclear factor of activated T cells) y otras dos secuencias de unión para NF- κ B (nuclear factor- κ B), un regulador de la transcripción de genes que codifican factores implicados en la activación de los linfocitos en respuesta al estímulo antigénico.

En el extremo 5' del HIV-1 posicionan 5 nucleosomas (Verdin, 1991). Los primeros dos nucleosomas (nuc-0 y nuc-1) posicionan respectivamente en la región U3 y en la región R que coincide con el principio de la región transcrita. En la región que separa estos nucleosomas, que mide aproximadamente 250 pb, se encuentran la caja TATA y las secuencias de unión de NF- κ B y Sp1. Tat se une a estos factores y a complejos remodeladores de cromatina para inducir al apertura del LTR viral.

TAR es un dominio de RNA constituido por los primeros 59 nucleótidos transcritos del genoma del HIV (Berkhout and Jeang, 1989) y ocupa la primera parte de la zona R del LTR viral. Sobre la zona R posiciona el segundo nucleosoma (nuc-1) presente en el extremo 5' transcrito del HIV-1, que es

desplazado de forma dependiente de Tat para permitir las primeras fases de la transcripción (Verdin et al., 1993). TAR presenta una estructura secundaria tipo "stem-loop", que se caracteriza por una extrema estabilidad y una gran resistencia a las nucleasas (Karn, 1999). En la proximidad del ápice de esta estructura se encuentra un dominio rico en residuos uracílicos, que es el sitio que reconoce Tat en el RNA naciente. El ápice, rico en residuos G-C, es el sitio de unión al RNA de la ciclina T1. La integridad de los dos dominios es fundamental para la transactivación mediada por Tat-P-TEFb (Fujinaga et al., 1998) así como para el mantenimiento de la estructura secundaria (Selby et al., 1989).

La RNAPolIII al transcribir TAR entra en una fase de pausa. En ese estado DSIF se une al CTD desfosforilado y NELF se une a través de la subunidad NELF-E al tallo de TAR (Fujinaga et al., 2004). Se piensa que la estabilización de la pausa favorezca la síntesis de la caperuza sobre mRNA TAR aumentando la estabilidad del transcrito naciente.

1.3.3 Tat

El transactivador de la transcripción (Tat) del virus de la inmunodeficiencia humana es un pequeño polipéptido de 101 aminoácidos que desarrolla un papel esencial en la transcripción del genoma del HIV-1 y en la replicación viral.

Tat se une a TAR y a través de esta interacción Tat recluta al promotor una amplia serie de complejos transcripcionales, entre ellos P-TEFb. La formación del complejo Tat-TAR-P-TEFb activa Cdk9, que fosforila varios sustratos surtiendo distintos efectos en el escenario transcripcional del HIV-1. Cdk9 fosforila principalmente la subunidad Rpb1 de la RNAPolIII en las Ser-2 del CTD y esta modificación confiere a la enzima la procesividad suficiente para transcribir los genes del HIV-1. (Ni et al., 2004; Zhou et al., 2004)

Aunque P-TEFb es probablemente el cofactor de Tat más importante para no es el único. Tat se ha revelado como una pieza clave en el control de la expresión del HIV actuando sobre otros procesos además de sobre la

regulación de la elongación. Tat controla la iniciación de la transcripción del genoma del HIV1 interactuando con TFIIH y estimulando *in vitro* la fosforilación del CTD por la quinasa Cdk7 de TFIIH (Parada et al., 1995). Según un reciente estudio (Raha et al., 2005), la presencia de Tat es suficiente para ensamblar *in vivo* un complejo de transcripción alternativo en el LTR viral constituido por la RNAPolIII, P-TEFb y TBP sin el auxilio de los factores asociados a TBP (TAFs), normalmente presentes en la mayoría de los promotores de los genes transcritos por la RNAPolIII.

Tat controla también el estado de fosforilación de la RNAPolIII inhibiendo Fcp1, la principal fosfatasa del CTD (Marshall et al., 1998), lo que probablemente evita un prematuro desensamblaje de la RNAPolIII de la región transcrita.

En los últimos años numerosos estudios sugieren que la síntesis de mRNA es un proceso en el que las reacciones de transcripción, capping, procesamiento del pre-mRNA, poliadenilación y transporte se encuentran acopladas la una a la otra de modo que factores implicados en una fase participan directamente e influyen a otra (Zorio and Bentley, 2004). Una multitud de resultados sugieren que, de forma directa o indirecta, Tat coordina e integra estos procesos actuando en el marco de una estrategia molecular dirigida a aumentar la expresión del genoma del HIV.

Se ha demostrado que Tat regula las modificaciones del extremo 5' del mRNA de HIV1, interactuando con la trifosfato-metiltransferasa Mce1 *in vitro* (Chiu et al., 2001) e *in vivo* (Chiu et al., 2002) y aumentando la síntesis de la caperuza (Chiu et al., 2002).

El cofactor de Tat, TAT-SF1, es una fosfoproteína que presenta una elevada homología con el factor de splicing de levadura Cus2p y forma un complejo con los snRNA U1 y U2, PTEF-b, la subunidad RAP30 de TFIIF, Spt5 y RNA Pol II (Fong and Zhou, 2001). SKIP, otro factor implicado en el procesamiento del mRNA, se une a P-TEFb y aumenta la transcripción mediada por Tat (Bres et al., 2005).

Diversos estudios indican que Tat regula la organización de la cromatina posicionada en el genoma de HIV integrado para aumentar la accesibilidad del molde a la maquinaria transcripcional. Se ha demostrado que la proteína Tat actúa de manera sinérgica con NF- κ B y Sp1 (Pazin et al., 1996) (Pumfery et al., 2003). Sp1, NF- κ B y Tat interactúan con las acetiltransferasas CBP/p300 y pCAF y con el complejo remodelador de cromatina SWI/SNF, los dirigen hacia el promotor y promueven una conformación más laxa de la cromatina en esa zona. El efecto más evidente del cambio en el entorno cromatínico que se produce por activación de la transcripción en la LTR viral es la remodelación del nuc-1 que solapa con el inicio de la región transcrita (Coull et al., 2002).

En células donde se ha integrado una copia del genoma del HIV, existe heterogeneidad en la expresión del virus: Jordan *et al.* (2001) han demostrado que la expresión de los distintos clones está relacionada con la accesibilidad del extremo 5' transcrito del HIV. (Jordan et al., 2001) Además ha sido posible demostrar que Tat interactúa físicamente con enzimas acetiltransferasas (Marzio et al., 1998) formando complejos ternarios proteína-proteína-DNA (revisado por (Pumfery et al., 2003).

Tanto Tat como las histonas posicionadas en los genes del HIV-1 sufren acetilación. Esta modificación se produce en el transactivador Tat en tres residuos de lisina (lys-28, lys-50, lys-51) y confiere especificidad de unión a distintas proteínas en función del patrón de acetilación (Caron et al., 2003; Kiernan et al., 1999) La hiperacetilación de histonas favorece el desensamblaje de la cromatina y se asocia a genes transcritos. Es una modificación necesaria para que se desarrolle eficientemente la expresión viral, como demuestra el hecho que los nucleosomas en estado de represión de la transcripción se encuentran en forma desacetilada y que inhibidores específicos de desacetilasas de histonas producen una activación de la transcripción del HIV-1 (Pumfery et al., 2003).

Las histonas asociadas a genes activamente transcritos o reprimidos también presentan un patrón de metilación distinto. Un estudio (Zhou et al., 2004) ha demostrado que la activación de P-TEFb mediada por Tat-TAR

favorece la aparición del patrón de metilación asociado a la transcripción activa, o sea la metilación de las histonas H3 en las lisinas 4 y 36.

1.3.4 P-TEFb

P-TEFb es un heterodímero constituido por la quinasa Cdk9 y la ciclina T o la ciclina K.

Existen tres tipos de ciclinas T, la ciclina T1 y la ciclina T2a y T2b. Todas ellas interactúan con Cdk9 y con RNA pero sólo la ciclina T1 es capaz de unirse a Tat. Para ello es imprescindible un residuo de cisteína (C261) dentro del TRM (Tat:TAR recognition motive) (Garber et al., 1998) Este residuo está conservado en la ciclina T1 de primates pero no en el homólogo murino, uno de los elementos que hace que los ratones no desarrollen la enfermedad.

Cdk9 presenta 2 isoformas una de 42kDa y otra, identificada más recientemente, de 55kDa, que se genera por activación de un promotor aguas arriba en varios tipo celulares (Shore et al., 2003).

P-TEFb se une al CTD de la subunidad Rpb1 de la RNAPolIII y fosforila preferentemente las serinas en posición 2 de las repeticiones heptapeptídicas que constituyen el CTD. Según el modelo actualmente aceptado (revisado por (Sims et al., 2004a) (Meinhart et al., 2005), la fosforilación de las Ser-2 es una característica de la RNAPolIII elongante y se asocia a zonas distales del promotor de los genes transcritos.

Este complejo lleva a cabo la regulación de la expresión de un amplio conjunto de genes; Chao y Price (Chao and Price, 2001) han calculado que tras una hora de exposición a flavopiridol, un análogo del ATP que inhibe selectivamente la actividad quinasa de Cdk9 (Chao et al., 2000), la síntesis de mRNA en células HeLa disminuye de un 70% y la inhibición completa causa apoptosis. La eliminación del homólogo de la Cdk9 o de las ciclinas T en *Caenorhabditis elegans* reduce la fosforilación de las Ser-2 que afecta especialmente la expresión de genes activos en fase temprana del desarrollo y causa la muerte del embrión (Shim et al., 2002). Por otro lado, la sobreexpresión de la ciclina T1 en ratones provoca un aumento de la actividad

de Cdk9 que se refleja en un aumento del tamaño de los miocitos cardíacos y del corazón en general (Sano et al., 2002).

Como otras Cdk, la actividad de P-TEFb es regulada por un inhibidor específico. Dos estudios publicados al mismo tiempo (Nguyen et al., 2001; Yang et al., 2001) demostraron que *in vivo* existe un tipo de complejo P-TEFb distinto del par ciclín/quinasa aislado anteriormente (Mancebo et al., 1997; Peng et al., 1998a; Peng et al., 1998b). El nuevo complejo es más grande, es inactivo y junto al par ciclín/quinasa está constituido por 7SK, un RNA nuclear pequeño, y por la proteína HEXIM-1(hexamethylene bisacetamide-induced protein 1) (Yik et al., 2003) (Michels et al., 2004) o su parólogo, HEXIM-2 (Byers et al., 2005).

El balance entre complejo grande y complejo pequeño, que en células HeLa es 1:1, se desplaza rápidamente hacia la forma activa en respuesta a estrés celular inducido por rayos UV, DRB (un análogo del ATP que inhibe la actividad quinasa de Cdk9 (Zandomeni and Weinmann, 1984; Zandomeni et al., 1986) y actinomycina D (Nguyen et al., 2001, 2001)(Casse et al., 1999; Garriga and Grana, 2004).

Todavía no ha sido posible aclarar el mecanismo y las razones que están en la base de la modulación diferencial supuestamente llevada a cabo por Hexim-1 y Hexim-2 (Byers et al., 2005). Parece interesante destacar que la sofisticación del control de la actividad de P-TEFb es proporcional al nivel evolutivo del organismo: en *Saccharomyces cerevisiae* y *C. elegans* donde se han aislado homólogos de este complejo, no existen proteínas con función similar a Hexim; en artrópodos y *Drosophila* se han encontrado homólogos de este tipo, y, finalmente, sólo en mamíferos se ha producido una duplicación del gen que ha dado origen a dos proteínas con función parecida.

P-TEFb es un elemento indispensable para una eficiente expresión de los genes del HIV-1 hacia los que es dirigido. Como se ha anteriormente descrito, Tat se une a la subunidad reguladora del par ciclín/quinasa, participa en la unión de P-TEFb al dominio de RNA TAR y la estabiliza. Algunos investigadores especulan sobre la sugerente hipótesis que Tat y TAR sean los

antagonistas moleculares de las proteínas Hexim y 7SK que el virus utiliza para asegurarse la presencia de P-TEFb en su maquinaria transcripcional. No se han encontrado homologías estructurales significativas en la secuencia de estas moléculas, sin embargo hay resultados que apoyan esta hipótesis. Entre ellos cabe destacar que la sobreexpresión de Hexim1 inhibe la activación de la transcripción mediada por Tat (Fraldi et al., 2005), que la integridad del dominio de unión a 7SK (Fraldi et al., 2005) o a P-TEFb (Michels et al., 2004) de Hexim1 es necesaria para que se produzca inhibición de la actividad de Tat y que *in vitro* Hexim-1 y Tat se excluyen recíprocamente en la unión a la Ciclina T1 (Schulte et al., 2005).

1.4 Antecedentes de expresión heteróloga de HIV en *S. cerevisiae*.

La levadura presenta un elevado grado de homología con los eucariotas superiores por lo que concierne a las funciones celulares básicas y es un organismo eucariótico simple, manejable y sobre todo susceptible de ser estudiado genéticamente. La larga experiencia genética acumulada con este organismo, para el que se disponen de toda clase de técnicas de manipulación y análisis molecular, ha resultado ser una importante ventaja en el estudio de sistemas animales cuyos mecanismos genéticos difícilmente pueden ser diseccionados en el contexto celular de elección. Si el sistema objeto del estudio es además un agente patógeno, como el virus del HIV-1, la manipulación del material genético es extremadamente más sencilla gracias a la total bioseguridad que caracteriza la levadura y que consiente su uso en infraestructuras con bajo nivel de contención.

Trabajos precedentes han demostrado que dianas celulares de algunos factores virales están conservadas en la levadura donde la expresión de las proteínas víricas de interés ha reproducido un fenotipo similar al observado en células humanas infectadas o en sistemas celulares reconstituidos *in vitro*.

Es el caso por ejemplo de la proteína viral R (Vpr) que causa un bloqueo de ciclo celular en el estadio G2 actuando sobre varios sistemas que controlan el check-point entre la fase G2/M (resumidos en Yoshizaka, 2005). Vpr es capaz de inhibir el crecimiento de *Saccharomyces pombe* (He et al., 1995; Re et al., 1995) (Zhao et al., 1996) (Macreadie et al., 1995).

Un reciente estudio (Nakazawa, 2005) ha demostrado que el dominio carboxiterminal de la proteína es necesario para producir la inhibición del crecimiento, tanto de las células humanas como de la levadura, y que en ambos organismos el efecto no está ligado a la localización nuclear de la proteína.

Caumont y sus colaboradores (Caumont et al., 1996) han descrito que la expresión heteróloga de la integrasa viral (IN) causa letalidad en un mutante *rad52Δ* de *S. cerevisiae* por efecto de cortes endonucleolíticos no específicos de secuencia que causan daños en el genomio de levadura. Esta actividad de la integrasa viral ha sido detectada en sistemas celulares *in vitro* (Katzman and Sudol, 1996) pero se desconoce su relevancia en células humanas infectadas. La caracterización genética en *S. cerevisiae* ha evidenciado que Snf5 (Parissi et al., 2000), un regulador transcripcional componente del complejo SWI/SNF, suprime este fenotipo. Tanto Rad52 como Snf5 están conservadas en humanos.

Un resultado más alentador aún ha sido logrado por Nissley y sus colaboradores (1996) que han reconstruido el sistema de retrotranscripción del HIV en *S. cerevisiae*. Los autores han construido un híbrido Ty1-HIV, denominado HART, sustituyendo la secuencia que codifica la retrotranscriptasa del retrotransposón endógeno Ty1 por el gen de la retrotranscriptasa del virus (RT). La expresión heteróloga de la retrotranscriptasa en el contexto de este sistema híbrido HIV-levadura ha dado lugar a una enzima activa. Gracias al híbrido HART ha sido posible estudiar distintos aspectos del mecanismo de la retrotranscripción, pero quizás sea aún más interesante la aplicación que este sistema podría tener en campo farmacológico. De hecho con este modelo ha sido posible, con un simple

ensayo genético, medir la actividad de la retrotranscriptasa y se ha demostrado que inhibidores no nucleosídicos de la RT (NNRTI), actualmente empleados en la terapia antiretroviral en uso, mantienen en la levadura el efecto negativo sobre la retrotranscriptasa. Por ello este sistema podría ser adecuado para el ensayo preliminar de nuevas drogas formuladas contra la retrotranscriptasa, la diana farmacológica de mayor interés en el desarrollo de nuevos antiretrovirales, disminuyendo los costes y el empleo de sistemas animales *in vivo*.

El estudio del sistema transcripcional del HIV-1 en la levadura tiene algunos antecedentes descritos en la bibliografía. Un primer estudio llevado a cabo en *S. pombe* (Toyama et al., 1992) demostró que Tat no producía en la levadura la transactivación de la LTR viral. Subramanian y sus colaboradores (1994) investigaron sobre la capacidad de Tat de activar la transcripción *in vivo* de un gen de *S. cerevisiae* dirigiéndolo al promotor a través de un dominio de unión a DNA de un activador transcripcional de la levadura. Para ello construyeron varias fusiones de la proteína vírica completa o partes de ellas con el dominio de unión a DNA del la proteína de levadura Gal4. Midiendo la actividad transcripcional inducida por este transactivador híbrido sobre el gen GAL1 observaron que la fusión que comprendía el dominio transactivador mínimo era capaz de producir la inducción del promotor GAL1 en la levadura (Southgate and Green, 1995).

Un estudio más reciente (Daviet et al., 1998) ha demostrado que la LTR viral es un promotor débil en la levadura *S. cerevisiae* pero que conservando la caja TATA y TAR y eliminando los sitios de unión a SP1 y NF- κ B era posible alcanzar una actividad comparable al promotor de levadura *CYC1*. Ni este promotor reducido, ni la LTR completa podían ser activados por Tat.

Estos resultados sugieren que la LTR viral es un promotor que presenta un nivel de transcripción basal muy bajo en la levadura, aunque cabe destacar que en células humanas mantiene esta característica. Probablemente la LTR es un promotor muy especializado para el contexto celular de la levadura. Además, su función principal no es el control directo de la actividad de la

polimerasa, sino el ensamblaje de un complejo transcripcional susceptible de ser regulado en una fase posterior a la iniciación.

1.5 Retrotransposones de levadura

Los retrotransposones son un tipo de elementos genéticos que llevan a cabo su replicación a través de un intermediario de RNA y que presentan numerosas similitudes con los retrovirus. En el genoma de *S. cerevisiae* se han identificado 5 familias de retrotransposones, Ty1-5 siendo los de la familia Ty1 los más abundantes (30 copias por genoma haploide). Todos comparten la misma estructura. Miden aproximadamente 6Kb, en sus extremos se encuentran dos zonas reguladoras de aproximadamente 300pb que se denominan LTR o elementos δ . Las LTRs flanquean dos marcos abiertos de lectura, *TYA* y *TYB*, análogos a los genes retrovirales *gag* y *pol*. La RNAPolIII transcribe estos genes generando una molécula de RNA que será empleada bien para la traducción, bien para la retrotranscripción. Al igual que los retrovirus, los retrotransposones necesitan una molécula de tRNA como cebador de la retrotranscripción. La proteína Ty1A constituye el componente estructural de la VLP (virus like particle) y la poliproteína Ty1A-Ty1B genera, por acción de la proteasa del retrotransposón (Garfinkel et al., 1991), las enzimas que también están codificadas en los genes de los retrovirus: la proteasa, la integrasa, la retrotranscriptasa y el dominio catalítico de la RNAasa H. El cDNA de cadena doble que se genera por retrotranscripción dentro de la partícula pseudo viral se integra en el genoma de la levadura por obra de la integrasa o por recombinación homóloga con elemento genómicos. Condiciones de stress celular activan la transcripción de los retrotransposones cuya expresión está normalmente inhibida. El promotor de los Ty1, o elemento δ , presenta una estructura muy similar a la de los promotores de eucariotas superiores y es regulado por varios factores transcripcionales y complejos remodeladores de cromatina como ISWI (Kent et al., 2001) SAGA

(Morillon et al., 2002; Pollard and Peterson, 1997) y Swi/Snf (Todeschini et al., 2005).

Un último elemento que muestra la cercanía entre los Ty y sus homólogos animales es APOBEC3G, una deaminasa que convierte la citosina en uracilo. Su acción produce un efecto inhibitorio sobre la replicación de varios retrovirus entre ellos el HIV-1 (Bukrinskaia et al., 2005) la expresión heteróloga de la proteína humana en *S. cerevisiae* causa una inhibición de la replicación de los Ty1 según el mismo mecanismo de acción (Dutko et al., 2005; Schumacher et al., 2005).

2 Objetivos

El objetivo principal de esta tesis ha sido reconstruir el sistema transcripcional del HIV-1 en *S. cerevisiae* para llevar a cabo un estudio *in vivo* de la expresión del virus aprovechando el amplio conjunto de herramientas genéticas y moleculares que ofrece la levadura.

Para ello hemos construido unidades transcripcionales híbridas formadas por promotores de la levadura fusionados transcripcionalmente a la citada región de HIV-1, que han sido analizadas genética- y molecularmente.

Con objeto de estudiar el comportamiento de estas unidades transcripcionales en presencia de los factores reguladores del virus previamente caracterizados en células humanas, hemos procedido asimismo a la expresión en la levadura de la proteína viral Tat y de los factores celulares humanos hCycT1 y Cdk9.

3 Resultados

3.1 Estudio del sistema transcripcional de HIV-1 en *S. cerevisiae*.

3.1.1 Construcción y análisis de la expresión de sistemas híbridos HIV-levadura.

Con objetivo de estudiar la transcripción del virus del HIV-1 diseñamos un nuevo sistema de expresión.

Trabajos anteriores habían demostrado que el LTR viral no es un promotor activo en la levadura (Daviet et al., 1998; Subramanian and Chinnadurai, 1992). Por ello decidimos utilizar un promotor endógeno de *S. cerevisiae* como *GAL1* por el que se dispone de una caracterización muy exhaustiva por lo que concierne los mecanismos de regulación transcripcional y su estructura cromatínica.

Construimos un plásmido centromérico, pGAL1-HIV, con una fusión traduccional entre los nucleótidos -21/+671 del HIV y la secuencia codificante del gen de levadura *PHO5* y la clonamos bajo el promotor inducible *GAL1* (Fig. 2A). El uso de la galactosa como fuente de carbono activa este promotor permitiendo alcanzar un nivel de expresión alto (Yocum et al., 1984). En la secuencia del genoma de HIV clonada están comprendidas una pequeña parte de la región U3, la región R, que inicia con el dominio TAR, la región U5, el dominio de encapsidación Ψ y parte del precursor gag y corresponde a la zona donde posicionan los nucleosomas nuc-1, nuc-2 y nuc-3 en el provirus integrado (Verdin et al., 1993).

La fusión HIV-*PHO5* se realizó con la intención de seguir la actividad transcripcional del sistema mediante el simple ensayo enzimático de la fosfatasa ácida codificada por *PHO5*.

La cepa de *S. cerevisiae* W303-1a fue transformada con los plásmidos pGAL1-HIV, pSch202, que contiene el gen *PHO5* clonado bajo el promotor *GAL1* (Fig. 2A) (Chavez and Aguilera, 1997). Para comprobar que la fusión se expresase correctamente llevamos a cabo ensayos de northern de los

transformantes pGAL1-HIV y pSch202 tras 0, 30, 90, 180 minutos de cultivo en galactosa. La hibridación con la sonda PHO5 (Fig. 2.b)

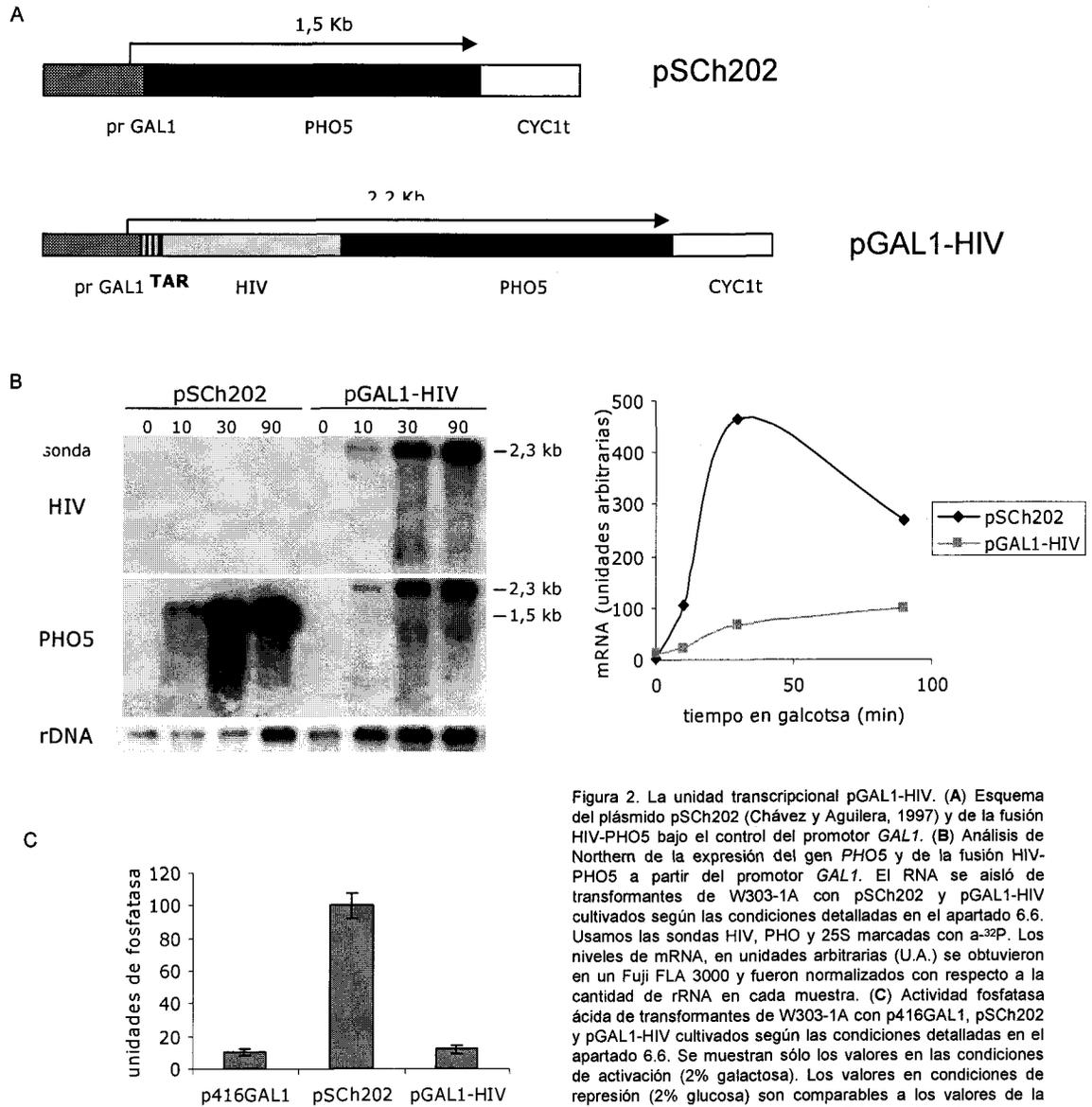


Figura 2. La unidad transcripcional pGAL1-HIV. (A) Esquema del plásmido pSch202 (Chávez y Aguilera, 1997) y de la fusión HIV-PHO5 bajo el control del promotor GAL1. (B) Análisis de Northern de la expresión del gen PHO5 y de la fusión HIV-PHO5 a partir del promotor GAL1. El RNA se aisló de transformantes de W303-1A con pSch202 y pGAL1-HIV cultivados según las condiciones detalladas en el apartado 6.6. Usamos las sondas HIV, PHO y 25S marcadas con α - 32 P. Los niveles de mRNA, en unidades arbitrarias (U.A.) se obtuvieron en un Fuji FLA 3000 y fueron normalizados con respecto a la cantidad de rRNA en cada muestra. (C) Actividad fosfatasa ácida de transformantes de W303-1A con p416GAL1, pSch202 y pGAL1-HIV cultivados según las condiciones detalladas en el apartado 6.6. Se muestran sólo los valores en las condiciones de activación (2% galactosa). Los valores en condiciones de represión (2% glucosa) son comparables a los valores de la fosfatasa ácida endógena en condiciones de activación del promotor GAL1 (p416GAL1 en 2% galactosa).

permitió detectar un transcrito de 1,5 Kb correspondiente a la longitud del mRNA de PHO5 y de 2,3 Kb correspondiente a la longitud esperada para el mRNA de la fusión HIV-PHO5. En la parte superior de la misma figura se muestra el resultado de la hibridación del mismo filtro con la sonda HIV que, como era de esperar, fue negativo en el caso del mRNA extraído de los transformantes con la construcción pSch202 y concordaba con lo observado

en la hibridación con la sonda PHO5 por lo que concierne a los transformantes con pGAL1-HIV.

Llevamos a cabo ensayos de fosfatasa ácida en condición de inducción del promotor GAL1 (cultivo en galactosa) a los transformantes que llevaban los plásmidos pSch212, GAL1-HIV. Se utilizó como control para medir la actividad de la proteína Pho5 endógena un transformante que llevaba el vector p416-GAL1 (Mumberg et al., 1994) que es idéntico a de pSch202 pero carece del gen *PHO5*. Como se puede observar en la Fig 2C, en el caso del plásmido pGAL1-HIV no pudimos medir una actividad enzimática superior a la actividad de la fosfatasa endógena (p416-GAL1), mientras que la actividad detectada en el transformante de pSch202, en condiciones de activación del promotor, fue 25 veces superior a la endógena. En condiciones de represión del promotor (cultivo en glucosa) la actividad medida en los transformantes pSch202 y pGAL1-HIV no difería significativamente del control.

En conjunto, estos resultados nos indicaron que la transcripción de la fusión HIV-PHO5 a partir del plásmido GAL1-HIV se llevaba a cabo correctamente. El promotor *GAL1*, además, daba lugar a una acumulación de mRNA abundante y fácilmente detectable por Northern.

A pesar de que la transcripción de HIV-PHO5 se desarrollase de forma correcta, los ensayos de fosfatas ácida mostraron que la fusión no generaba una proteína enzimáticamente activa posiblemente por la escasa estabilidad del transcrito, por defectos en su traducción o por falta de función de la proteína de fusión.

Decidimos por ello seguir utilizando la hibridación northern como técnica para analizar la expresión del sistema.

3.1.2 Caracterización del sistema GAL1-HIV: análisis del extremo 5' del mRNA de HIV sintetizado a partir del plásmido pGAL1-HIV en *S. cerevisiae*

La secuencia TAR del mRNA de HIV es imprescindible para la transactivación por Tat en células humanas. Era nuestra intención estudiar la interacción de Tat con TAR utilizando el plásmido pGAL1-HIV para expresar este fragmento del genoma vírico. Por ello comprobamos que este dominio se transcribiese correctamente en la levadura, analizando por primer extension el extremo 5' del transcrito generado por el plásmido pGAL1-HIV.

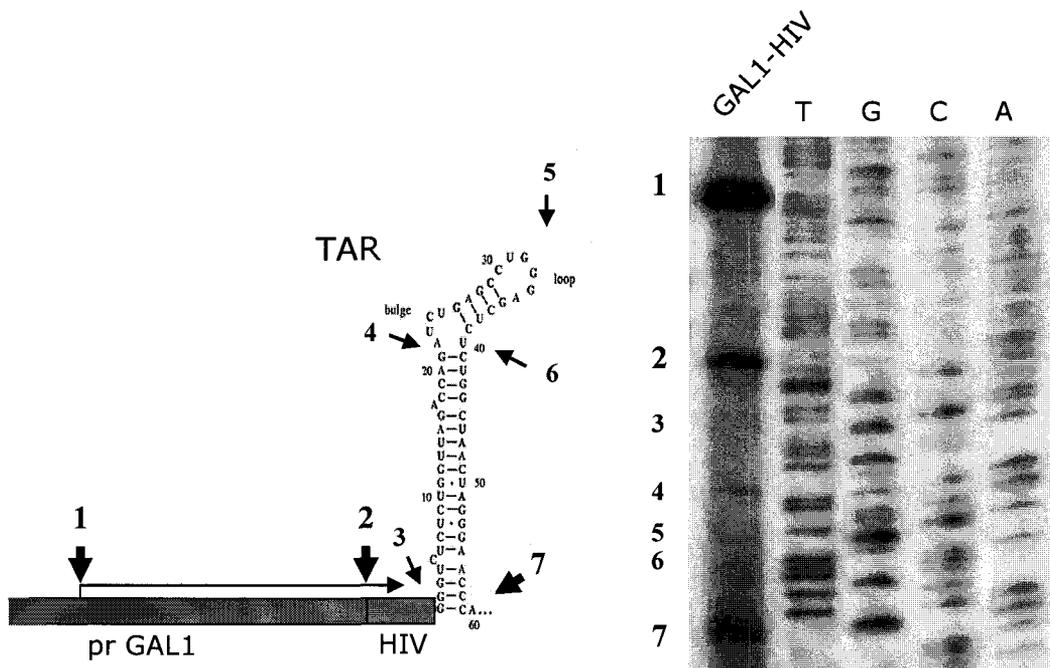


Figura 3. Primer extension de un molde de RNA HIV-PHO5 transcrito desde el promotor GAL1. Se usaron como molde 25µg de RNA total extraído de un transformante de la estirpe W303-1A con pGAL1-HIV. La extensión se hizo a partir del cebador Primer Tar, complementario a los nucleótidos +111/+129 del mRNA de HIV-1 NL43. La reacción de secuenciación se llevó a cabo sobre el DNA plasmídico pGAL1-HIV con el mismo oligonucleótido. En el esquema del extremo 5' de la región transcrita las flechas indican las posiciones de las señales más prominentes del resultado del experimento de primer extension. El grosor de la flecha es proporcional a la intensidad de la señal.

Se marcó radioactivamente un oligonucleótido antisentido correspondiente a los nucleótidos +111/+129 según el sitio de inicio de la transcripción del HIV en células humanas. El oligonucleótido se hibridó con RNA extraído de transformantes de la cepa BY4741 con el plásmido pGAL1-HIV y se llevó a cabo una reacción de retrotranscripción con la retrotranscriptasa SuperScript™ II, RNAsaH (Invitrogen).

El análisis del extremo 5' muestra la presencia de dos bandas mayoritarias (Fig. 3): la primera es el inicio de la transcripción del promotor GAL1, mientras la segunda corresponde con el primer nucleótido del fragmento del HIV clonado en este vector. Es interesante destacar la aparición de bandas de intensidad inferior a las precedentes que corresponden con el inicio del dominio TAR (banda 3), que también es el sitio de inicio de la transcripción en la LTR viral en células humanas; con la protuberancia de la estructura secundaria de TAR donde se une Tat (banda 4); con el ápice del tallo (banda 5); sitio de unión de la Ciclina T1, con una distorsión de la estructura del tallo presente junto a la protuberancia (banda 6); y finalmente con los últimos nucleótidos de TAR (banda 7). Existe la posibilidad que estas bandas se hayan generado a causa de bloqueos de la retrotranscriptasa ocasionados por la estructura secundaria del molde de mRNA (School;). Esto concordaría con la intensidad de estas bandas, inferior con respecto a la del inicio de la transcripción del promotor GAL1 y a la de los primeros nucleótidos de HIV, y con su localización, en correspondencia con sitios críticos en la estructura secundaria del dominio TAR.

Este resultado nos indica que el plásmido pGAL1-HIV es un sistema adecuado a la expresión de TAR ya que la mayoría de los transcritos inician de acuerdo con lo esperado para el promotor *GAL1*, algunas decenas de pares de bases antes del fragmento de HIV clonado, asegurando la transcripción del dominio TAR. La intensidad de la segunda banda induce a pensar que exista un sitio de iniciación secundario que corresponde con el inicio del fragmento de HIV clonado en el vector. En todo caso el mRNA sintetizado a partir de ese punto contendría también el dominio TAR íntegro ya que este sitio se encuentra 20 pb antes de TAR.

3.1.3 Construcciones de sistemas de expresión de la proteína vírica Tat y de los principales factores humanos específicos: la ciclina T1 y la quinasa Cdk9.

P414GPD-Tat, p415GPD-CycT1 y p413GPD-Cdk9-FLAG han sido obtenidos clonando los cDNA de Tat, hCycT1, FLAG-hCdk9 en los plásmidos p414GPD (marcador *TRP1*), p415GPD (marcador *LEU2*) y p413GPD (marcador *HIS3*) respectivamente (Mumberg et al., 1995). El promotor *GPD*, que regula la expresión de estos factores en las construcciones diseñadas para este estudio, es un promotor constitutivo de levadura que alcanza niveles de expresión elevados (Mumberg et al., 1995).

Se ha comprobado la correcta expresión en levadura de los factores hCycT1 y FLAG-Cdk9 por inmunodetección western utilizando anticuerpos primarios específicos contra hCycT1 y anticuerpos contra el epítipo FLAG respectivamente. En la Fig. 4A se muestran los resultados de la ensayar los extractos procedentes de transformantes de p415GPD-CycT1 y p415GPD: en

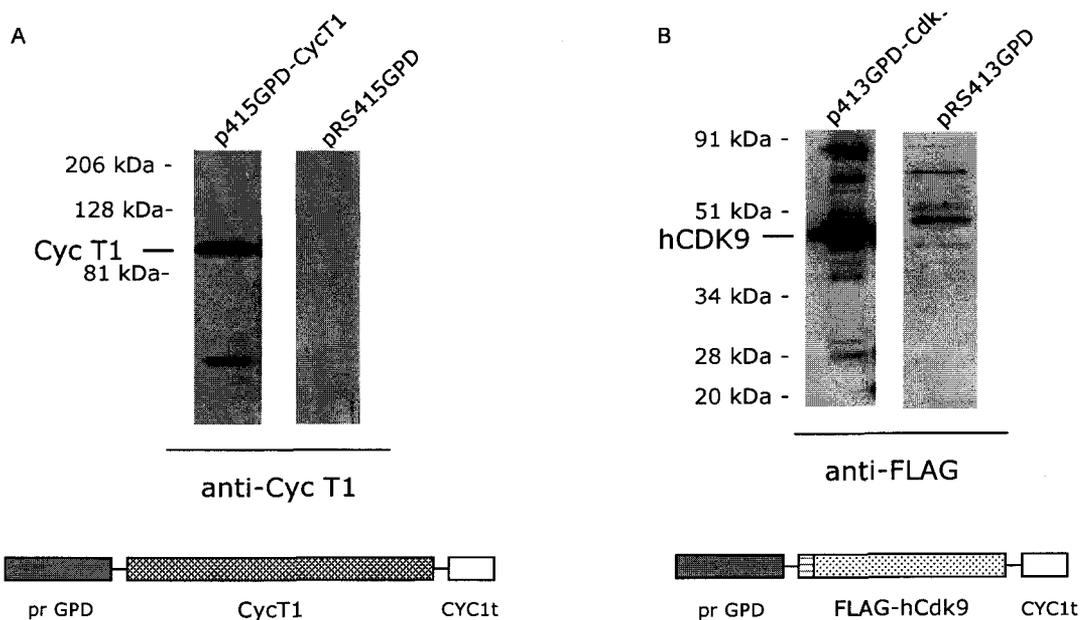


Figura 4. Expresión heteróloga de hCycT1 (A) y FLAG-hCdk9 (B) en *S. cerevisiae*. (A) Esquema del plásmido pGPD415-CycT1 que lleva la secuencia codificante de hCycT1 bajo el promotor GPD y aguas arriba del terminador de *CYC1*. Análisis de western de transformante de W303-1A con p415GPD y P415GPD-CycT1 con anticuerpos anti-hCycT1. (B) Esquema del plásmido pGPD413Cdk9 que lleva la fusión FLAG-hCdk9 bajo el promotor GPD y aguas arriba del terminador de *CYC1*. Análisis de western de transformante de W303-1A con p413GPD y P413GPD-Cdk9 con anticuerpos anti-FLAG.

el carril correspondiente al extracto del transformante p415GPD-CycT1 se detecta la presencia de una proteína de 87 KDa, peso molecular aparente esperado para hCycT1 (Peng et al., 1998b); no se detecta ninguna señal en el carril correspondiente el control negativo. En la Fig. 4B se muestran los resultados de la hibridación de los extractos procedentes de transformantes de p413GPD-Cdk9 y p413GPD: en el primer caso se observa la presencia de una banda mayoritaria, ausente en el control negativo, de aproximadamente 45 kDa, el peso molecular aparente esperado para FLAG-hCdk9 (Peng et al., 1998b)

No ha sido posible comprobar la correcta expresión de p414GPD-Tat por western con anticuerpos específicos contra Tat. En la literatura se describen varias estrategias para obviar la escasa especificidad que suelen presentar los anticuerpos anti-Tat; la más frecuente es construir una fusión de Tat con un epítipo o con una proteína de alto peso molecular como GFP. Considerando las pequeñas dimensiones de Tat (aproximadamente 10 kDa) hemos preferido no añadir estructuras ajenas a la proteína silvestre para evitar posibles problemas de expresión o de función de Tat en un contexto celular distinto al de elección.

Por todo ello, para comprobar la correcta expresión de Tat en levadura a partir del promotor GPD (Fig.5A), hemos recurrido a un sistema *in vivo* de triple híbrido puesto a punto por Fraldi *et al.* (2001) y modificado en este estudio (apartado 6.17), que se basa en el reconocimiento altamente específico del dominio TAR por hCycT1 (Bieniasz, 1998 #372); (Garber et al., 1998); (Chen et al., 1999). Para ello fue necesario clonar la fusión GPD-Tat en p413GPD para utilizar como marcador de auxotrofia el gen *HIS3* siendo la estirpe protótrofa para el triptófano, marcador del plásmido p414GPD-Tat. Como se puede observar en el esquema de la Fig. 5B, este sistema está constituido por una proteína de fusión entre hCycT1 y el dominio de activación de la transcripción de *GAL4* y otra proteína de fusión entre el dominio de unión a DNA de LexA y el dominio de unión a RNA de la proteína de cubierta del fago MS2; la proteína de MS2 reconoce un dominio de RNA de MS2 que, en este sistema, se

expresa fusionado al dominio TAR. Las dos proteínas de fusión, el RNA híbrido y el plásmido p414GPD-Tat se expresan en la cepa MV-coat que lleva una copia de *lacZ* integrada aguas abajo de la secuencia activadora de LexA. En presencia de la proteína Tat se produce una interacción de los tres elementos, TAR, Tat y hCycT1 y se activa la transcripción del gen informador *lacZ*. Esto se traduce en la aparición de la actividad β -galactosidasa, detectable mediante un simple ensayo enzimático.

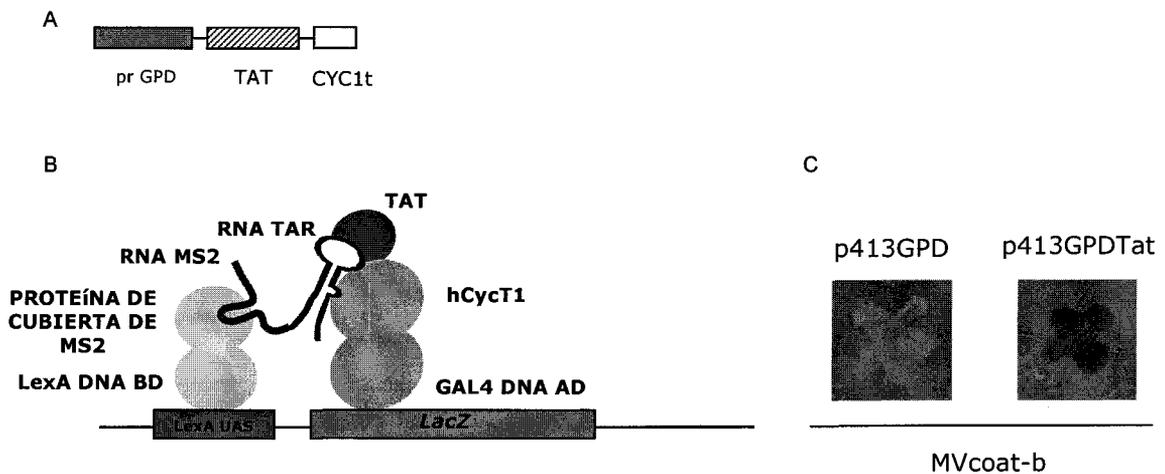


Figura 5. Expresión heteróloga de Tat. (A) Esquema del plásmido pGPD414-Tat que lleva la secuencia codificante de Tat bajo el promotor GPD y aguas arriba del terminador de *CYC1*. (B) Esquema del sistema de triple híbrido (Fraldi *et al.*, 2001; apartado 6.17 de esta tesis) usado para detectar *in vivo* la expresión de Tat en la levadura. La proteína de fusión que contiene el dominio de unión a DNA de LexA y el dominio de unión a RNA de la proteína de cubierta de MS2 (círculos celestes) se localiza en la región reguladora aguas arriba del gen informador *lacZ*. hCycT1 está fusionada al dominio de activación de la transcripción de *GAL4* (círculos verdes). La molécula de RNA híbrido (línea azul) está constituida por dos sitios de unión de RNA de MS2 y el dominio de RNA TAR. Tat (círculo rojo) se une a TAR y a hCycT1, la formación del complejo ternario TAR-Tat-hCycT1 recluta el dominio de activación de *GAL4* al operador LexA y produce la expresión de *lacZ*. (C) Ensayo cualitativo de β -galactosidasa de transformantes de la cepa MVcoat-b con p413GPD y p413GPD-Tat. p413GPD-Tat, pero no p413GPD, produce la activación del sistema de triple híbrido, lo que se refleja en la aparición de la tinción azul tras el tratamiento de las células con SDS y X-gal.

En la Fig. 5C se muestran los resultados de un ensayo de β -galactosidasa, mediante x-gal con agarosa de cobertera, realizado sobre la cepa MV-coat transformada con los vectores de expresión para hCycT1 y TAR, y la construcción que porta el cDNA de Tat utilizado en este estudio o bien el vector vacío. Como se puede observar, sólo en el primer caso se detecta la activación del sistema, que se manifiesta con la aparición de la tinción azul debida a la reacción de la β -galactosidasa sobre el sustrato cromogénico. Observamos que en ausencia de Tat no se detecta esta tinción y por ello podemos concluir que la activación de este sistema depende de la presencia

de Tat en la levadura y que la proteína es funcional y reconocible por los factores con los que constituye el complejo de activación Tat TAR y hCycT1.

Concluimos que los plásmidos diseñados para expresar los dos factores celulares hCycT1 y Cdk9 y el transactivador vírico Tat consiguen una correcta expresión de las tres proteínas en *S. cerevisiae*.

3.1.4 Reconstitución del sistema TAR-Tat-P-TEFb en levadura.

Los resultados precedentemente descritos habían demostrado que con el uso de un promotor de levadura fuerte como *GAL1* era posible obtener en la levadura una expresión elevada y correcta de la parte del genoma de HIV que nos interesa y que la expresión heteróloga de los principales factores implicados en la regulación de la transcripción del virus daba lugar a proteínas funcionales. Estos eran requisitos imprescindibles para realizar uno de los objetivos principales de este trabajo: averiguar si la levadura *S. cerevisiae* presenta un entorno celular adecuado para el estudio del sistema transcripcional del HIV.

Por ello transformamos la cepa silvestre de *S. cerevisiae* W303 con los sistemas de expresión p414GPD-Tat, p415GPD-CycT1 y p413GPD-Cdk9-FLAG así como varias combinaciones de ellos, junto al plásmido pGAL1-HIV con objeto de comprobar el efecto de los factores transcripcionales Tat, hCycT1 y Cdk9 sobre la transcripción de HIV en la levadura. Como control en los ensayos de northern se utilizaron transformantes que sólo llevaban la construcción pGAL1-HIV y los tres vectores que se habían empleado para la expresión de las proteínas humanas y víricas (p414GPD, p415GPD, y p413GPD) En la Fig. 6 se representa la media de las cuantificaciones normalizadas procedentes de estos ensayos.

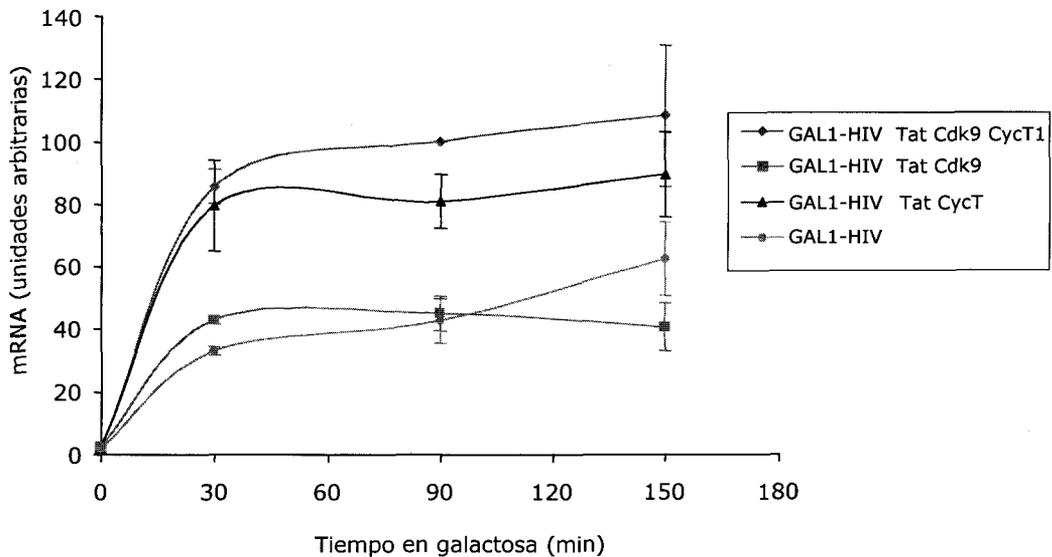


Figura 6. Resultados de la inducción de pGAL1-HIV en presencia de los factores transcripcionales que se indican. Se representa la media de la cuantificación normalizada de 4 experimentos de northern de pGAL1-HIV. El RNA se aisló de transformantes de W303-1A con pGAL1-HIV y con los plásmidos p413GPD-Cdk9, p414GPD-Tat, p415GPD-CycT1, según se indica, cultivados en condiciones de activación de la transcripción, como se detalla en el apartado 6.6. Usamos las sondas HIV y 25S marcadas con α - 32 P. Los niveles de mRNA, en unidades arbitrarias (U.A.), se obtuvieron en un Fuji FLA 3000 y fueron normalizados con respecto a la cantidad de rRNA en cada muestra.

En presencia del transactivador vírico Tat y del par ciclin-quinasa P-TEFb se detectó un aumento de la acumulación de mRNA HIV de 2,5 veces con respecto al control.

Este resultado indica que la maquinaria transcripcional de *S. cerevisiae* es sensible al efecto positivo determinado por las proteínas TAT, hCycT1 y hCdk9. Aunque la magnitud del incremento de la actividad transcripcional no es comparable con la alcanzada en células humanas, sí es posible afirmar que en la levadura el comportamiento del sistema sigue la misma tendencia que se observa en el entorno celular natural de HIV.

También fue posible detectar una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control en la cinética de acumulación correspondiente a los transformantes que expresaban exclusivamente Tat y hCycT1. En el sistema completo el nivel de acumulación de mRNA a tiempo intermedio (90 minutos tras añadir la galactosa) es mayor con respecto al sistema parcialmente

reconstituido, confirmándose que, en presencia de los tres factores, se alcanza el nivel máximo de actividad transcripcional. Si bien es verdad que las dos cinéticas de inducción en algunos puntos no presentan diferencias estadísticamente significativas.

Las cinéticas de inducción de los transformantes que llevaban las construcciones p414GPD-Tat, p413GPD-Cdk9-FLAG y GAL1-HIV tampoco difieren estadísticamente con respecto al control.

Estos resultados parecen indicar que la ciclina T1 humana conserva en la levadura su papel clave en el reconocimiento altamente específico de Tat sobre el dominio TAR. A diferencia de la ciclina, hCdk9 parece influir en menor medida en la activación del sistema en levadura. De hecho en presencia de hCycT1 y Tat se alcanzan niveles de acumulación de mRNA muy parecidos a los que se consiguen reconstituyendo completamente el sistema.

3.1.5 Efecto de TAR sobre la transcripción en presencia de los factores transcripcionales.

Tras reconstruir el sistema transcripcional del virus en la levadura de forma completa y definir la dependencia de éste en relación a los principales factores transcripcionales decidimos determinar el papel del elemento regulador en *cis* TAR.

Para ello construimos el vector pGAL1-HIVTARless que difiere de GAL-HIV por la eliminación de un fragmento de 99pb que incluye la secuencia completa de TAR (Fig. 7A) y ensayamos la actividad transcripcional de los plásmidos pGAL1-HIV y pGAL1-HIVTARless en presencia o en ausencia de las proteínas reguladoras.

Como se observa en la Fig. 7B, el patrón de expresión del plásmido pGAL1-HIV y pGAL1-HIVTARless es muy similar, sugiriendo que la transcripción del genomio viral en la levadura a partir del promotor *GAL1* no se ve afectada por la presencia de TAR. Por otro lado, la ausencia de TAR anula el efecto positivo que los factores transcripcionales TAT, Cdk9, hCycT1 han demostrado tener sobre este sistema (apartado 3.1.4). Este dato indica que también en *S.*

cerevisiae TAR es una pieza necesaria al desarrollo de la actividad de las proteínas reguladoras.

De forma coherente con esta observación, los valores mas altos de acumulación de mRNA se obtuvieron cuando estaban presentes los cuatro elementos reguladores Tat, hCdk9, hCycT1 y TAR que definimos como los elementos imprescindibles para constituir una forma funcional en la levadura del sistema de regulación de la elongación transcripcional del HIV.

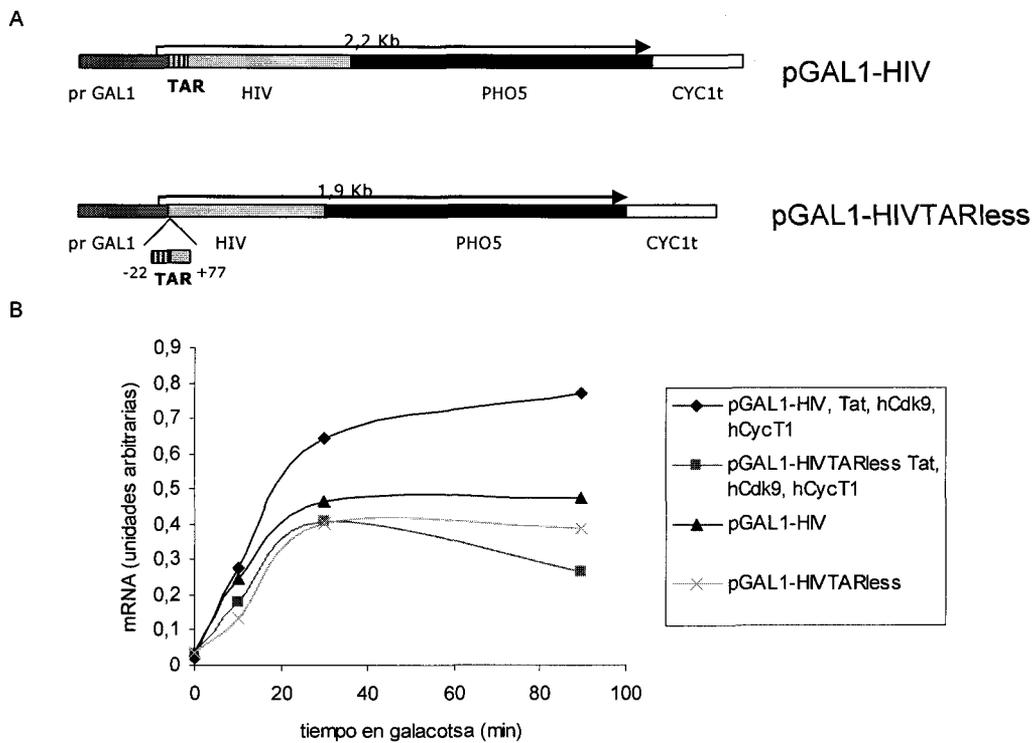


Figura 7. La unidad transcripcional pGAL1-HIVTARless. (A) El plásmido pGAL1-HIVTARless se ha obtenido eliminando la secuencia comprendida entre los nucleótidos -22/+77 respecto al inicio de la transcripción de HIV-1 en células humanas que coincide con el primer nucleótido de TAR. (B) Resultados de la inducción de pGAL1-HIV y pGAL1-HIVTARless en presencia de los factores transcripcionales que se indican. El RNA se aisló de transformantes de W303-1A con pGAL1-HIV o pGAL1-HIVTARless con los plásmidos p413GPD-Cdk9, p414GPD-Tat, p415GPD-CycT1 o con los respectivos vectores. Los transformantes se cultivaron en condiciones de activación de la transcripción, como detallado en el apartado 5.6. Usamos las sondas HIV y 25S marcadas con α - 32 P. Los niveles de mRNA, en unidades arbitrarias (U.A.), se obtuvieron en un Fuji FLA 3000 y fueron normalizados con respecto a la cantidad de rRNA en cada muestra

Dada la similitud entre el comportamiento del sistema desarrollado en esta tesis y el sistema transcripcional del HIV en células humanas nos interrogamos acerca del papel de TAR, ya que los resultados obtenidos presentaban algunas posibles discordancias con lo esperado. Como anteriormente se ha comentado, la falta de TAR no producía una alteración del patrón de expresión en ausencia de las proteínas reguladoras. Sin embargo, la activación de la

transcripción producida por Tat, hCdk9, hCycT1 es dependiente de TAR. En la literatura se tiende a definir a TAR como un regulador negativo de la elongación transcripción aunque, se describen escasas evidencias del papel de TAR sobre la transcripción basal. Por el contrario, está caracterizado de forma exhaustiva el papel fundamental que ejerce en la transactivación mediada por TAT.

Nos preguntamos si el papel de TAR es realmente determinante solo en la activación producida por las proteínas reguladoras o bien si el sistema puesto a punto, aunque hubiese proporcionado resultados satisfactorios por lo que concierne a la reconstrucción del sistema transcripcional del HIV, no era adecuado para evidenciar un posible efecto de TAR sobre la transcripción basal del genomio viral en la levadura.

Era posible, de hecho, que las características del promotor *GAL1* que habían motivado su elección, como el elevado nivel de expresión alcanzable, fuesen una desventaja a la hora de esclarecer un posible efecto negativo sobre la transcripción de un elemento tan próximo al promotor.

3.2 Influencia del dominio TAR en la transcripción basal: el sistema híbrido δ HIV.

Los retrotransposones de levadura están funcionalmente y estructuralmente relacionados con los retrovirus. Se propagan a través de un intermediario de RNA, codifican una retrotranscriptasa y producen partículas similares a los virus (VLP). Las similitudes estructurales que comparten con los retrovirus conciernen los precursores codificados que en ambos casos son gag, pol y también a sus promotores: dos secuencias repetidas en los extremos 5' y 3' denominadas LTR o elementos δ en los Ty.

Además de estas analogías, el estudio de los retrotransposones ha puesto de manifiesto que el control de su expresión se realiza a través de una amplia gama de factores transcripcionales. Muchos de ellos se aislaron gracias a su papel en el mantenimiento de un fenotipo transcripcional generado por la

inserción de Ty en genes de interés, de aquí el nombre con el que se denomina este grupo de genes: SPT (Suppressor of Ty insertion mutations) (Winston et al., 1984; Winston et al., 1987).

Entre los genes SPT recordamos *SPT4* y *SPT5*, cuyos homólogos humanos codifican el complejo DSIF (Wada et al., 1998a), que favorecen una pausa de la RNAPolIII elongante en la zona próxima al promotor. Se ha propuesto que esta pausa favorece el correcto procesamiento del extremo 5' del pre-mRNA. (Wen and Shatkin, 1999), (Sims et al., 2004a), (Moteki and Price, 2002) En el caso del HIV, esta pausa es estable y es utilizada para regular la expresión del virus en el nivel de la elongación transcripcional temprana.

Con el objetivo de evidenciar un posible efecto del dominio TAR sobre la elongación transcripcional del HIV diseñamos una nueva unidad transcripcional quimérica levadura/HIV1, en la que el promotor de levadura presentara un mayor grado de similitud con la estructura del promotor vírico. Por ello construimos un plásmido en el que fusionamos la LTR del retrotransposón Ty1 (elemento δ) con el dominio TAR; denominamos a este plásmido p δ HIV

En el plásmido p δ HIV clonamos bajo el promotor δ la fusión transcripcional HIV-PHO5, de forma que el inicio de la transcripción del HIV en células humanas coincidiera con el del retrotransposón. De esta manera intentamos mantener la localización del dominio TAR exactamente en el extremo 5' del mRNA, tal como ocurre en el mRNA del HIV1.

De forma análoga clonamos bajo el promotor δ la fusión HIV-TARless en la que eliminamos los nucleótidos +21 a +224 del HIV, produciendo una profunda reorganización del extremo 5' (Fig. 8A).

Ensayamos por northern la expresión de p δ HIV y p δ HIVTARless en *S. cerevisiae* y detectamos la aparición de transcritos de 2,1Kb y 1,9Kb, longitudes esperadas para p δ HIV p δ HIVTARless respectivamente. El análisis de la expresión de p δ HIV y p δ HIVTARless reveló que en tres fondos silvestres diferentes la acumulación de mRNA de p δ HIV era siempre inferior a la de p δ HIVTARless. Esta disminución, de entre 2 y 3 veces es improbable que sea

debida a un simple efecto de longitud, ya que el transcrito HIVTARless-PHO5 es inferior al transcrito completo en tan solo un décimo de su longitud total. Concluimos que este efecto era debido a la presencia en el extremo 5' de algún elemento regulador en *cis* o de una secuencia de unión a un factor en *trans* que actúa de forma negativa sobre la transcripción de este sistema.

La variación de la actividad transcripcional del p δ HIV con respecto a

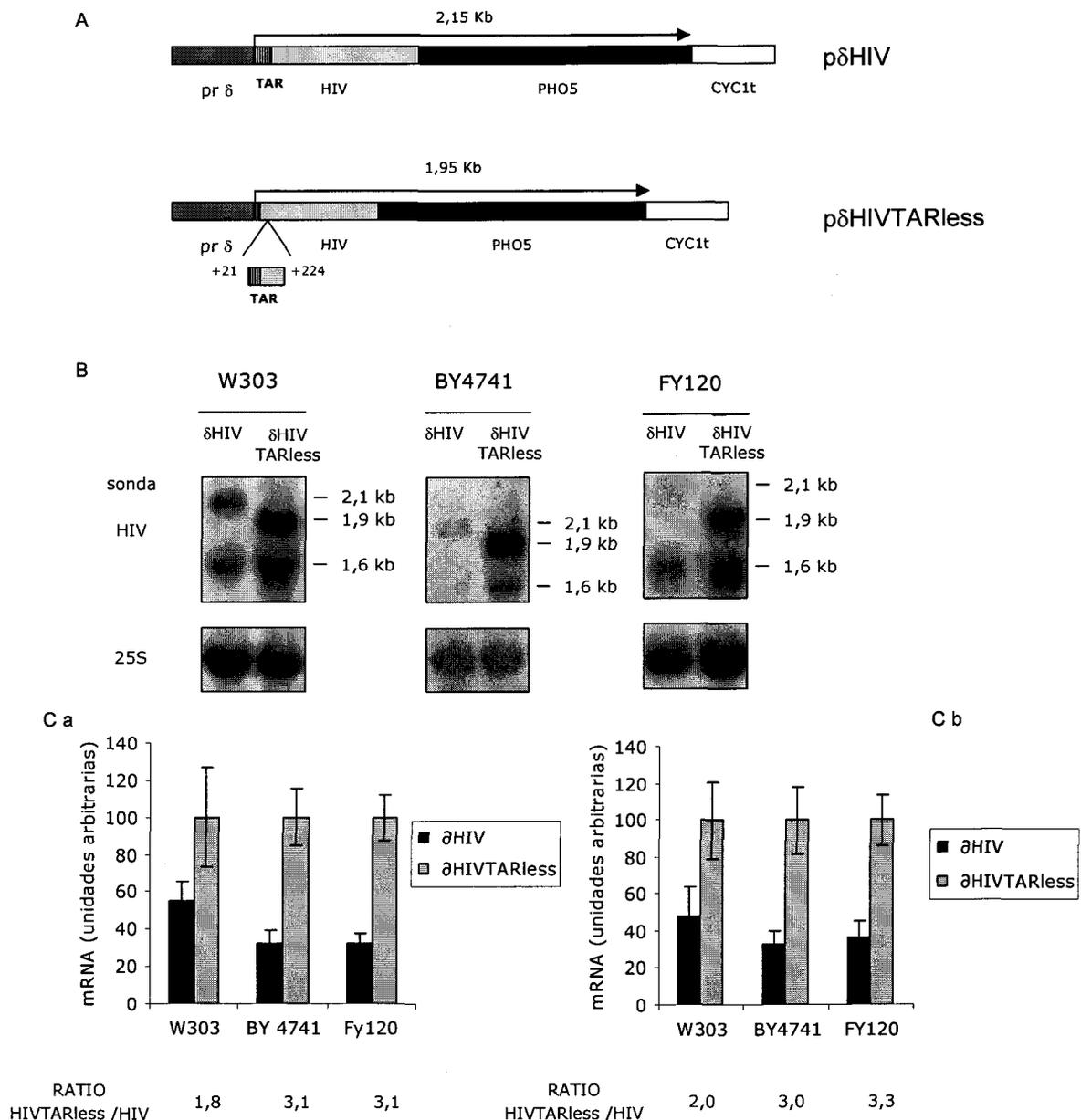


Figura 8. Las unidades transcripcionales p δ HIV y p δ HIVTARless. (A) Esquema de los plásmidos p δ HIVTAR y p δ HIVTARless. p δ HIVTARless difiere de p δ HIV por la ausencia de la secuencia comprendida entre los nucleótidos +21/+224 (numerados respecto del inicio de la transcripción de HIV-1 en células humanas). (B) Análisis de la transcripción de p δ HIV y p δ HIVTARless en tres fondos silvestres de *S. cerevisiae* distintos. El RNA se aisló de transformantes de W303-1A, BY4741 y FY120 cultivados en las condiciones descritas en el apartado 6.7. Se muestra un ejemplo de hibridación del RNA con las sondas HIV y 25S marcadas con α - 32 P. (C) Se representa la media de las cuantificaciones normalizadas (a) del RNA correspondiente a las fusiones HIV-PHO5 (2,1Kb) y HIVTARless-PHO5 (1,9Kb) y (b) del RNA de 1,6 Kb. La media se calculó de acuerdo con los resultados de un número de experimentos variable entre 3 y 19 según la estirpe. Los niveles de mRNA, en unidades arbitrarias (U.A.), se obtuvieron en un Fuji FLA 3000 y fueron normalizados con respecto a la cantidad de rRNA en cada muestra. Se enseña el cociente entre el valor medio de acumulación de RNA de HIVTARless y el valor medio de RNA de HIV.

p δ HIVTARless es representada por el cociente entre el valor normalizado de acumulación del mRNA HIVTARless-PHO5 frente a HIV-PHO5. En la Fig. 8C se representa la media normalizada de todos los datos relativos a las cepas silvestres analizadas en este estudio y agrupadas según el fondo genético. Hay que destacar que este valor es distinto en los fondos genéticos examinados. Siendo mayor la variación en las cepas BY4741 y FY120 (ambas provenientes del fondo S288C), para este estudio se utilizaron preferentemente cepas silvestres y mutantes que presentasen este fondo genético.

En la Fig. 8B se observa la presencia de un mRNA del tamaño de 1,6kb además de los mRNA correspondientes al tamaño esperado de las fusiones HIV-PHO5 y HIVTARless-PHO5. Es probable que este transcrito corresponda a un mRNA procesado. En el genomio del HIV son muy abundantes los sitios de splicing ya que el procesamiento alternativo es un importante mecanismo de regulación postranscripción que controla la síntesis de varias de las proteínas codificadas por el virus. La acumulación del mRNA de 1,6Kb sigue un patrón prácticamente idéntico al de los mRNA completos, tanto en los fondos silvestres como en los mutantes en los que se cuantificó la acumulación de dicho mRNA. Por ello decidimos omitir en las siguientes figuras el mRNA de 1,6Kb y su cuantificación.

Como anteriormente se ha comentado, las fusiones δ HIV y δ HIVTARless pusieron de manifiesto un efecto negativo de TAR que no había sido posible observar con las fusiones GAL1-HIV y GAL1-HIVTARless. Nos preguntamos si este patrón de expresión podía variar al eliminar el gen *SPT4*, homólogo en *S. cerevisiae* de una de las subunidades de un conocido regulador negativo de la expresión de HIV, DSIF. Por ello introdujimos en una cepa *spt4* Δ y en un silvestre isogénico los plásmidos p δ HIV y p δ HIVTARless y analizamos la acumulación de mRNA por northern. Los resultados, representados en la Fig. 9B, muestran que la ausencia de Spt4 disminuye la diferencia entre los niveles de mRNA. El cociente entre ambos se reduce a la mitad. Es interesante notar

que esta variación es debida a un aumento del nivel de expresión de δ HIV ya que la expresión de δ HIVTARless no varía significativamente en el mutante *spt4 Δ* , mientras que la expresión de δ HIV aumenta mas del doble cuando se elimina Spt4.

Los resultados descritos en este apartado nos llevan a concluir que el uso de la LTR de Ty1 para la expresión de HIV ha permitido reconstruir en la levadura las características de su expresión basal, inhibida por un elemento regulador que se localiza en los primeros 200 nucleótidos de la región transcrita del HIV.

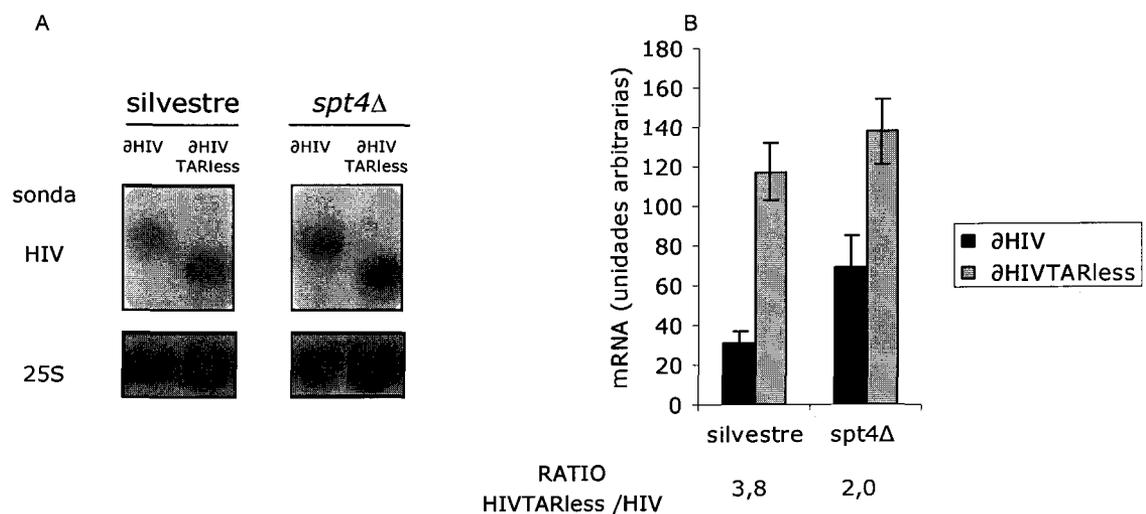


Figura 9. Análisis de la transcripción de δ HIV y δ HIVTARless en el mutante *spt4 Δ* y en el silvestre isogénico BY4741. (A) Se muestra un ejemplo de hibridación del RNA con las sondas HIV y 25S marcadas con α - 32 P. (B) Se representa la media de la cuantificación de RNA de HIV-PHO5 y HIVTARless-PHO5 de 3 experimentos de northern. Los niveles de mRNA, en unidades arbitrarias (U.A.), se obtuvieron en un Fuji FLA 3000 y fueron normalizados con respecto a la cantidad de rRNA en cada muestra. Se enseña el cociente entre el valor medio de acumulación de RNA de HIVTARless y el valor medio de RNA de HIV.

El experimento anterior sugiere a su vez que Spt4 juega un papel negativo durante la transcripción de HIV en la levadura similar al desempeñado por DSIF en las células humanas, que depende de la zona 5' de la región transcrita de HIV.

3.2.1.1 Análisis de la distribución de la RNAPolIII

Decidimos estudiar la distribución de la RNAPolIII a lo largo de la región del HIV clonada en los plásmidos δ HIV y δ HIVTARless, con objeto de

comprobar si existe una relación entre el patrón de expresión de estas unidades transcripcionales y la presencia de la enzima a lo largo de la zona transcrita.

Para ello llevamos a cabo experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) utilizando la cepa ARG3, que contiene un alelo de *RPB1* (gen que codifica la subunidad mayor de la RNAPolIII) al que se le ha añadido un epítipo myc. Utilizamos anticuerpos anti-myc para inmunoprecipitar cromatina unida a Rpb1-myc. En la Fig. 10A se dibujan las regiones de HIV y HIVTARless amplificadas por PCR. El fragmento 5' corresponde con la región inmediatamente siguiente al dominio TAR, por ello el primer nucleótido amplificado se encuentra 60 pb aguas abajo con respecto al extremo 5' del mRNA δ HIV. El fragmento M en el caso de δ HIV corresponde a la zona intermedia y al extremo 5' en el caso de δ HIVTARless. El fragmento M se diseñó de forma que el primer nucleótido amplificado estuviera 60pb aguas abajo con

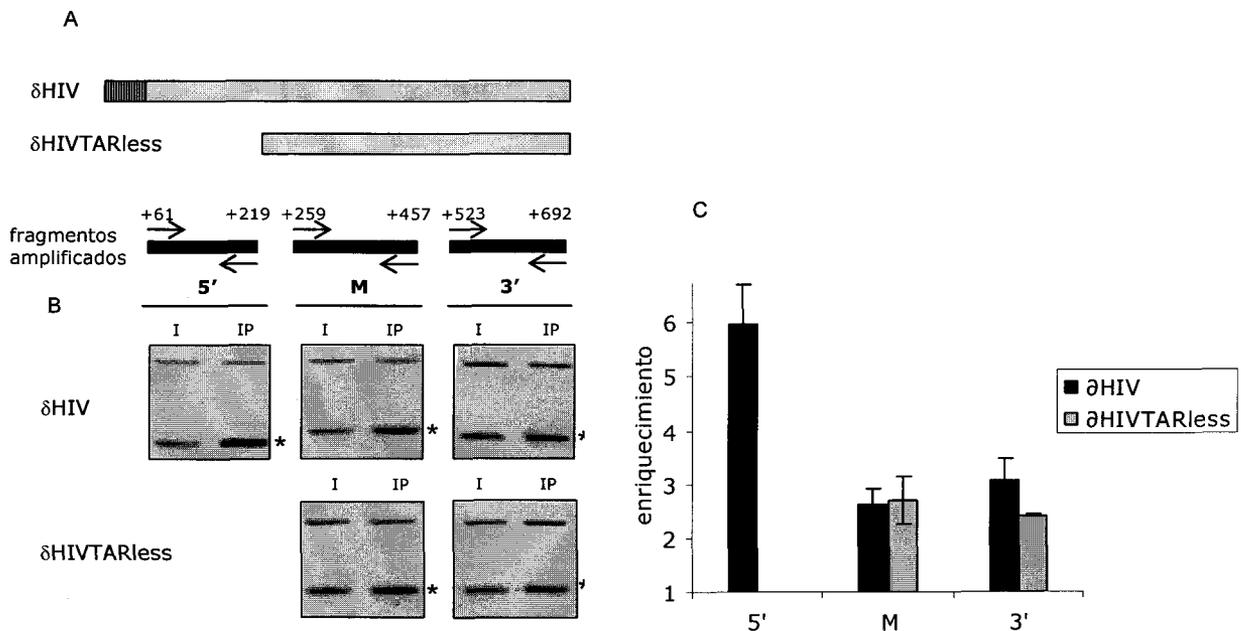


Figura 10. Análisis de inmunoprecipitación de cromatina de Rpb1-Myc en la cepa ARG3 transformada con p δ HIV y p δ HIVTARless. (A) Esquema en el que se indican las regiones de HIV amplificadas por PCR en p δ HIV y p δ HIVTARless. (B) Ejemplo de un gel de agarosa en el que se muestran los resultados de las PCRs para cada región, usando como molde el DNA inmunoprecipitado (IP) y sin inmunoprecipitar, o "input" (I). Se indica con el asterisco el producto de la amplificación con los cebadores específicos para cada región, la banda sin asterisco es el producto de la amplificación de la zona intergénica FUS1 (apartado 6.18.1) (C) Cuantificación de las PCRs. El enriquecimiento de la RNAPolIII en las distintas zonas de las construcciones analizadas se calculó como el cociente entre la intensidad de cada fragmento obtenido con los cebadores específicos y la de la región intergénica obtenida en la misma PCR para los inmunoprecipitados (IP) normalizadas respecto a la relación obtenida en el "input" (I). Se representa la media de los resultados de 3 experimentos independientes.

respecto al extremo 5' del mRNA de δ HIVTARless. El fragmento 3' corresponde con el extremo 3' de la región de HIV presente en las fusiones δ HIV y δ HIV-TARless.

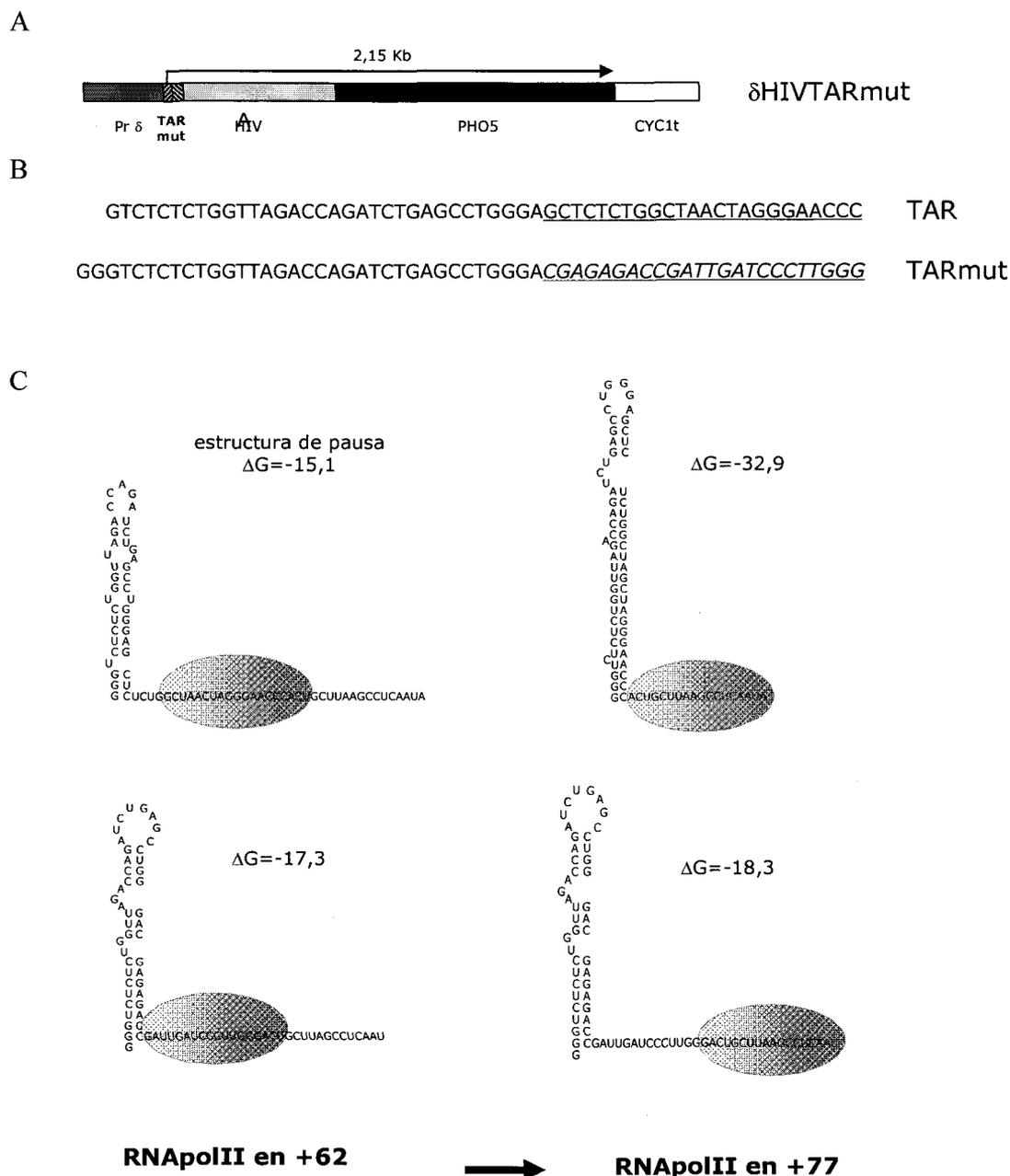
En la Fig. 10C se presenta la media de las cuantificaciones de la cantidad relativa de cada fragmento, normalizadas con respecto a la cantidad relativa del correspondiente control (input) y con respecto a la amplificación de una región no transcrita del gen que sirve como referencia. Como se puede observar, en la zona 5' del sistema δ HIV la densidad de la RNAPolIII es de dos veces mayor que en el resto del genoma de HIV presente (fragmento M y 3'). Por el contrario, no detectamos diferencias significativas entre las dos zonas analizadas en δ HIVTARless, que presenta valores de densidad de RNAPolIII muy similares a los de las mismas regiones en δ HIV. Sin embargo, en el caso de δ HIVTARless, el fragmento M amplifica corresponde al extremo 5' de la región transcrita; por ello concluimos que existe una diferencia significativa en lo que concierne la cantidad de RNAPolIII en el extremo 5' de la región transcrita. La interpretación más sencilla de esta diferencia es la existencia de RNAPolIII pausadas en la región 5', tal como ha sido descrito para el HIV en células humanas. Dicha pausa no se daría en δ HIVTARless.

3.2.1.2 Efecto de la estructura de TAR en el mRNA sobre la transcripción de HIV

Nos preguntamos si el elemento que afecta negativamente la transcripción de δ HIV podía ser la estructura secundaria de TAR en el mRNA de manera similar a las situaciones descritas en bacterias, donde determinadas estructuras secundarias del RNA en 5' a la RNA polimerasa aumentan la estabilidad de una pausa de la maquinaria transcripcional (Landick, 1997). En el caso de HIV-1, la pausa de la RNAPolIII ocurre inmediatamente después de haber transcrito TAR (Kessler and Mathews, 1992); (Parada et al., 1995). La enzima pausada en esta posición protege un fragmento de 16-20 nucleótidos (Gu and Reines, 1995; Gu et al., 1996), por ello el mRNA disponible para

formar una estructura secundaria es de tamaño inferior al del TAR completo (59 nucleótidos).

La pausa de la RNAPolIII en 3' a TAR en un sistema purificado *in vitro* ocurre aproximadamente entre los nucleótidos +62 y +65 del genómico viral (Palangat et al., 1998) y el mRNA disponible (42-44 nucleótidos) se pliega en una estructura secundaria alternativa al TAR (Fig. 11C) (Palangat et al., 1998). Según cálculos basados en el algoritmo de Zuker para predecir la estabilidad de estructuras secundarias de RNA (Mathews et al., 1999; Zuker, 2003) (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna/>) esta horquilla sería más



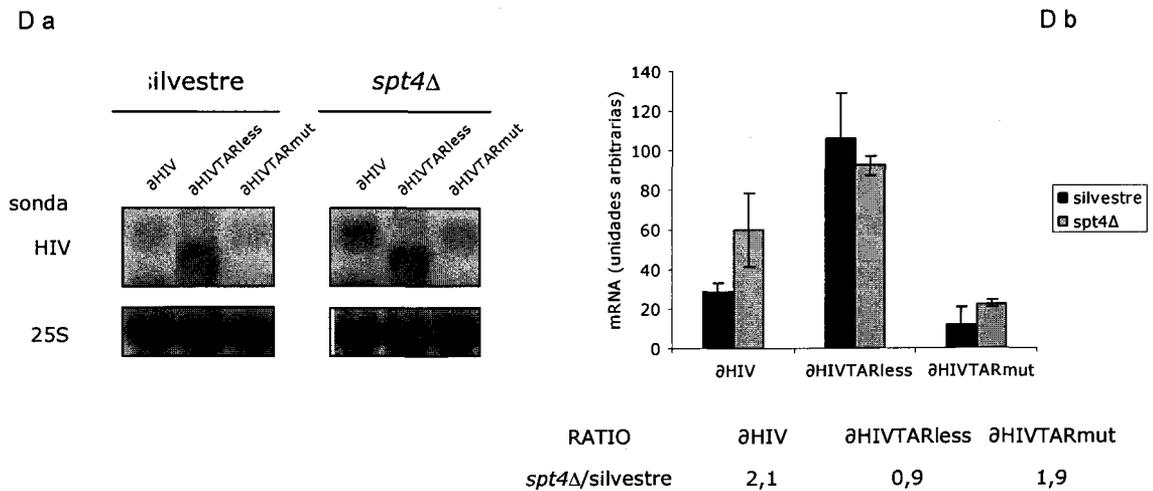


Figura 11. La unidad transcripcional p δ HIVTARmut. (A) Esquema del plásmido p δ HIVTARmut, (B) que lleva una mutación en el brazo derecho de la horquilla de TAR (secuencia subrayada en cursiva). (C) Estructuras de los primeros 44 nucleótidos de TAR y TAR mut y de las respectivas secuencias completas (59 nucleótidos) predichas según el método de Zuker (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna/>). El óvalo en gris indica la RNAPolIII pausada en el nucleótido +62 de HIV-1 (Palangat *et al.*, 1998) o transcribiendo aguas debajo del sitio de pausa. La RNAPolIII protege un fragmento de 18 nucleótidos (D) Análisis de la transcripción de p δ HIV, p δ HIVTARless y p δ HIVTARmut en el mutante *spt4Δ* y en el silvestre isogénico BY4741. (a) Se muestra un ejemplo de hibridación del RNA con las sondas HIV y 25S marcadas con α - 32 P. (b) Se representa la media de la cuantificación de RNA de 2 experimentos de northern correspondiente a las fusiones HIV-PHO5, HIVTARless-PHO5 y HIVTARmut-PHO5. Los niveles de mRNA, en unidades arbitrarias (U.A.), se obtuvieron en un Fuji FLA 3000 y fueron normalizados con respecto a la cantidad de rRNA en cada muestra. Se enseña el cociente entre el valor medio de acumulación de RNA de cada unidad transcripcional en *spt4Δ* frente al silvestre BY4741.

estable de la posible estructura que conserva parte del tallo de TAR, pero menos que la del TAR completo. Por lo tanto, la formación de la horquilla completa de TAR, que produciría un desplazamiento de la RNAPolIII de 18 nucleótidos hacia el extremo 3' de HIV, es favorecida bajo un punto de vista termodinámico. Sin embargo, la estructura que se forma cuando la RNAPolIII está pausada en el nucleótido +62 ejerce un efecto inhibitorio de forma dependiente de su estabilidad, lo que aumenta la duración de la pausa de la enzima *in vitro*. Nos preguntamos si era posible detectar *in vivo* un efecto sobre la expresión del HIV producido por la estructura secundaria del mRNA. Para comprobar esto construimos un nuevo plásmido, llamado δ HIVTARmut (Fig. 11A), en el que variamos la secuencia de parte del dominio TAR (en cursiva en la secuencia TARmut de la Fig 11B). Esta mutación no solo aumenta, aunque de forma ligera, la estabilidad de la horquilla alternativa que se forma durante la pausa, sino disminuye fuertemente la estabilidad del tallo de longitud completa, eliminando, de esta forma, la estructura de RNA positiva y manteniendo solo la estructura inhibitoria. Queremos destacar que esta mutación se diseñó intentando mantener inalteradas otras características que influyen sobre la transcripción como el posicionamiento de la cromatina en la

zona transcrita: Para ello conservamos el contenido G+C, sustituyendo la secuencia a mutar por una secuencia complementaria.

En la Fig. 11D se representa el resultado de los experimentos de northern llevados a cabo en una cepa silvestre y en un mutante *spt4Δ*. Observamos que, en el fondo silvestre, δ HIVTARmut produce niveles de acumulación de mRNA inferiores a los de δ HIV. Este resultado es un primer indicio que sugiere que la estructura secundaria del mRNA en 5' a la maquinaria transcripcional produce un efecto negativo sobre la expresión de TAR y apoya la hipótesis del establecimiento de una pausa o de un arresto de la RNAPolIII en el extremo 5' del HIV. En el mutante *spt4Δ* la expresión de δ HIVTARmut aumenta en una proporción similar a la de δ HIV, en claro contraste con δ HIVTARless, que prácticamente no se ve afectado por la ausencia de la proteína.

Esto parece indicar que la regulación de la transcripción del extremo 5' de HIV en *S. cerevisiae* posiblemente depende de varios mecanismos: uno de ellos relacionado con la estabilidad de la estructura secundaria en 5' a la RNAPolIII y otro dependiente de un factor adicional que no se ha alterado con las modificaciones realizadas en δ HIVTARmut y que sigue respondiendo a la eliminación de Spt4.

3.3 Análisis genético

3.3.1 Efecto de mutaciones que afectan a la fosforilación del CTD sobre la transcripción del HIV en la levadura.

Entre los requisitos fundamentales para que se de una correcta transcripción del HIV está el establecimiento de un adecuado patrón de fosforilación del CTD de la RNAPolIII. El virus ha desarrollado un sistema centrado en la fosforilación del CTD para regular su expresión y P-TEFb es, junto a Tat, la pieza clave en este sistema.

En *S. cerevisiae* se han identificado dos complejos que posiblemente lleven a cabo en la levadura el papel de la quinasa Cdk9 y de la ciclina T. Estos son

el par ciclin-quinasa Bur1/ Bur2 y el complejo CTDK-1 constituido por las proteínas Ctk1, Ctk2, y Ctk3.

El papel *in vivo* del primer complejo no está todavía bien definido, datos *in vitro* sugieren que la quinasa Bur1 fosforila la Ser-5 (Murray et al., 2001) de las repeticiones heptapeptídicas pero en ausencia de complejo funcional el patrón de fosforilación del CTD no varía (Keogh et al., 2003), aunque su función parece necesaria para reclutar el complejo Paf1 durante la transcripción (Wood et al., 2005) (Laribee et al., 2005) Ctk1, la subunidad quinasa de CTDK-1, fosforila *in vivo* la Ser2, modificación que caracteriza las RNA polimerasas II elongantes. Actualmente se tiende a pensar que Bur1 y Ctk1 sean parálogos de Cdk9 que conjuntamente llevan a cabo en la levadura el papel que Cdk9 desarrolla en humanos. Probablemente no es solo la fosforilación de las serinas del CTD la modificación que determina la salida del promotor de la RNA polIII y la adquisición de la plena procesividad si no una serie de modificaciones, entre ellas fosforilaciones de distintos substratos, que involucran varios factores transcripcionales y que en la levadura ocurren por obra de más de un complejo.

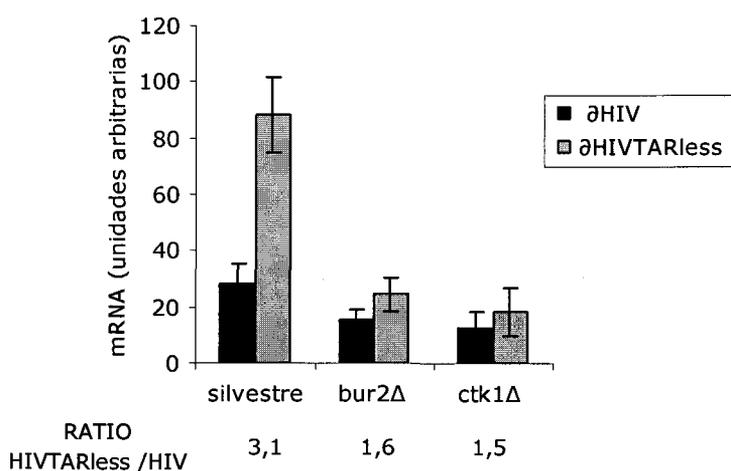


Figura 12. Análisis de la transcripción de ρ HIV y ρ HIVTARless en los mutantes *bur2 Δ* y *ctk1 Δ* y en el silvestre isogénico BY4741. Se representa la media de la cuantificación de RNA de las fusiones HIV-PHO5 y HIVTARless-PHO5 de 3 experimentos de northern correspondiente a de. Otros detalles como en la figura 9.

Por este motivo decidimos estudiar el patrón de expresión de las unidades transcripcionales δ HIV y δ HIVTARless en los mutantes *ctk1 Δ* y *bur2 Δ* (el mutante *bur1 Δ* no es viable). En la Fig. 12 se puede ver que la acumulación de

mRNA disminuye sensiblemente en ambos mutantes con respecto al silvestre isogénico. Este resultado es coherente con el papel central que posee en la transcripción la fosforilación del CTD y otros factores involucrados en la elongación como Spt5, sustrato de la fosforilación de Ctk1. La relación entre la expresión de δ HIVTARless y δ HIV en *bur2* Δ y *ctk1* Δ es la mitad con respecto al silvestre pero en este caso el sistema que mas depende de las presencia de Bur2 o Ctk1 es el que presenta mayor expresión en el silvestre: δ HIV, de hecho, disminuye su expresión a la mitad en ambos mutantes mientras que δ HIVTARless hasta un 25%. Esta mayor dependencia de δ HIVTARless con respecto a las dos ciclin-quinasas relacionadas con la elongación de la transcripción sugiere la existencia de diferencias funcionales entre los complejos transcripcionales de δ HIV y δ HIVTARless.

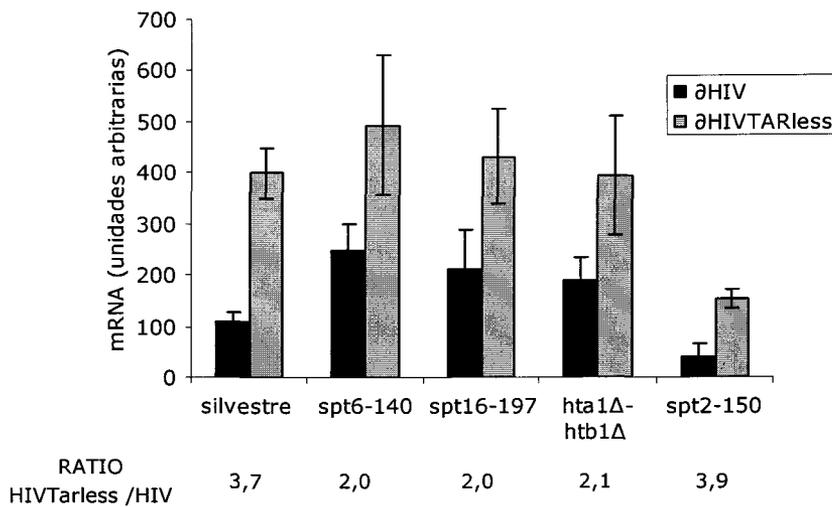
3.3.2 Efecto de mutaciones en genes SPT relacionados con la estructura de cromatina sobre la transcripción de HIV en la levadura.

El estudio del mutante *spt4* Δ en relación a la transcripción de las unidades transcripcionales investigadas en este trabajo (apartado 3.2) evidenció el efecto negativo que la proteína Spt4 ejerce sobre la transcripción de δ HIV. Consideramos oportuno ampliar ese estudio a otros mutantes del grupo SPT relacionados con la estructura de la cromatina para averiguar si el efecto observado estuviese relacionado con este aspecto. Escogimos mutantes de factores que, estuviesen implicados en la regulación de la elongación transcripcional a través de la remodelación de cromatina, como Spt6 (Hartzog et al., 1998) y Spt16, subunidad del complejo FACT (Belotserkovskaya and Reinberg, 2004). El mutante *hta1* Δ -*htb1* Δ presenta una disminución de la dosis de H2A-H2B por la eliminación de una de los dos copias de los genes que codifican estas histonas (Hirschhorn et al., 1992). El fenotipo Spt⁻ es uno de los efectos producidos por esta mutación (Sherwood and Osley, 1991). Más recientemente, se ha puesto de manifiesto una conexión entre modificaciones

post-traduccionales de las histonas H2A-H2B y complejos involucrados en la regulación de la elongación como COMPASS (Gerber and Shilatifard, 2003; Wood et al., 2005) y Paf (Xiao et al., 2005b).

SPT2 se aisló en uno de los escrutinio de genes que suprimen en fenotipo transcripcional debido a la inserción de Ty o elemento δ en *HIS3* (Winston et

A



B

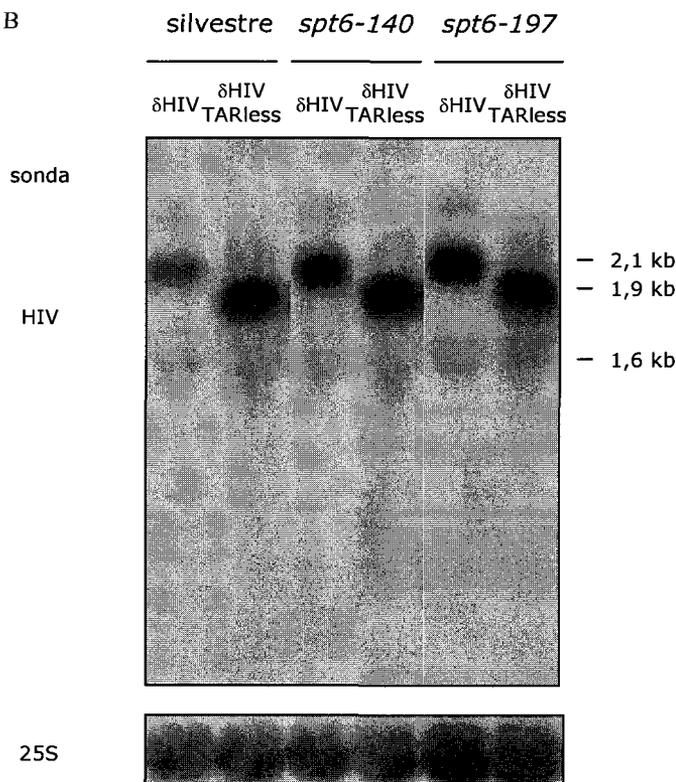


Figura 13. Análisis de la transcripción de δ HIV y δ HIVTARless en los mutantes *spt6-140*, *spt16-197*, *hta1-htb1 Δ* y *spt2-150* y en el silvestre isogénico FY120. (A) Se representa la media de la cuantificación de RNA de las fusiones HIV-PHO5 y HIVTARless-PHO5 de 3 experimentos de northern. Otros detalles como en la figura 9. (B) Se muestra un ejemplo de hibridación del RNA extraído de los transformantes de FY120, FY137 (*spt6-140*) y FY348 (*spt16-197*) con las sondas HIV y 25S marcadas con α - 32 P. El aumento de la expresión de HIV no está acoplado a la activación de sitios crípticos de iniciación de la transcripción.

al., 1984). Datos genéticos juntos a estudios bioquímicos (Novoseler et al., 2005) apuntan a un papel activo de Spt2 en el mantenimiento de la compactación de la cromatina en la zona promotora de algunos genes.

El análisis de la expresión de las unidades transcripcionales δ HIV y δ HIVTARless en estos mutantes revela que en ausencia de aquellos factores Spt que están implicados en la elongación transcripcional se obtiene un patrón de expresión del todo similar al de *spt4* Δ . En la Fig. 13B se observa que la expresión de δ HIVTARless no varía con respecto al silvestre en los mutantes *spt6-140*, *spt16-197* y *hta1* Δ -*htb1* Δ mientras que en el caso de δ HIV la acumulación de mRNA se duplica. En la Fig. 13A se presenta un ejemplo de hibridación de RNA extraído de los transformantes de *spt6-140*, *spt16-197* y del silvestre isogénico FY120. Alelos mutantes de *SPT6* y *SPT16* producen un aumento de la expresión de varios genes que está relacionado con la apariciones de transcritos secundarios por activación de sitios críticos de iniciación (Kaplan et al., 2003). El aumento de la acumulación de mRNA de la HIV-PHO5 no está acoplado a este fenómeno.

Por lo que concierne a Spt2, el patrón de expresión es completamente distinto. Observamos, de hecho, una disminución de la expresión tanto en δ HIV como en δ HIVTARless. La mutación *spt2-150* afecta proporcionalmente la expresión de ambos sistemas como es reflejado en el cociente δ HIVTARless/ δ HIV de la Fig.13B es muy similar al del silvestre.

Concluimos que las proteínas Spt6, Spt16 y las histonas H2A y H2B juegan un papel negativo en la expresión de δ HIV, pero no así en la expresión de δ HIVTARless. Este hecho apoya que las diferencias funcionales entre las dos unidades transcripcionales están localizadas en la fase de elongación de la transcripción. Por el contrario, la ausencia de Spt2, cuya función se ejerce en el promotor, afecta por igual a ambas unidades transcripcionales.

3.3.3 El complejo SAGA y Rpd1: efecto de la acetilación de histonas en la transcripción de HIV.

SAGA es un complejo multiproteico que lleva a cabo varias funciones que tienen como principal objetivo la regulación de la iniciación transcripcional a través de dos mecanismos fundamentales: la remodelación de cromatina en la zona promotora y el reclutamiento de factores generales de la transcripción en el complejo de pre-iniciación (Wu et al., 2004).

Gcn5 es la acetiltransferasa de histonas que produce la reorganización de la cromatina en el promotor.

Spt3 y Spt8 juegan un papel en las interacciones que SAGA desarrolla con importantes factores transcripcionales como TBP (Warfield et al., 2004). Es posible que algunas subunidades de SAGA actúen en fases posteriores a la iniciación. *spt3Δ* y *spt8Δ* presentan sensibilidad a drogas, como el ácido micofenólico, que disminuyen la disponibilidad de ribonucleótidos (Wery et al., 2004). Este fenotipo es común a otros mutantes afectados en factores que tienen un claro papel en elongación, entre ellos TFIIS, Spt4 y Spt16 (Lindstrom and Hartzog, 2001).

Rpd3 es la subunidad catalítica de los complejos con actividad desacetilasa de histonas RPD3 (L) y RPD3 (S). Ambos complejos son reguladores negativos de la transcripción. El complejo RPD3 (L) actúa en la zona promotora contribuyendo al silenciamiento de ciertos *loci* como los telómeros (Silverstein and Ekwall, 2005). RPD3 (S) mantiene la compactación de la cromatina en la región 3' transcrita evitando que se produzca iniciación de la transcripción de sitios desde promotores críptico (Carrozza et al., 2005)

La expresión de δ HIV y δ HIVTARless disminuye de forma paralela en los mutantes *gcn5Δ* y *spt3Δ* con respecto al silvestre (Fig. 14). El patrón observado es muy similar al del mutante *spt2Δ* (apartado 3.3.2): el hecho que ambas unidades transcripcionales se vean afectadas en la misma proporción indica que la ausencia de las proteínas afecta a un elemento común. Teniendo en cuenta la conocida implicación de estas proteínas en el ensamblaje del

complejo de preiniciación, consideramos que este elemento común es el promotor δ .

En el caso de *spt8* Δ observamos un patrón de expresión en el que se ven afectadas tanto la acumulación de mRNA que se alcanza en el mutante con respecto al silvestre, como la relación entre los valores de mRNA de δ HIVTARless y δ HIV (Fig. 14). En ausencia de Spt8 el cociente de expresión δ HIVTARless/ δ HIV disminuye sensiblemente, sugiriendo la posibilidad que este factor desarrolle un papel distinto a Gcn5 y Spt3 estas unidades transcripcionales.

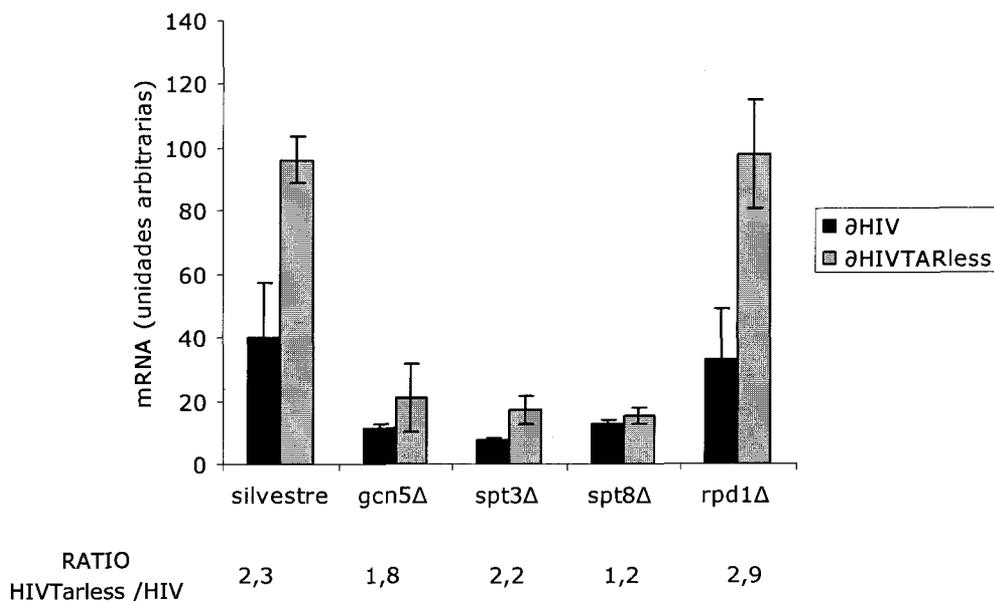


Figura 14. Análisis de la transcripción de δ HIV y δ HIVTARless en los mutantes *gcn5* Δ , *spt3* Δ , *spt8* Δ , *rpd1* Δ y en el silvestre isogénico BY4741. Se representa la media de la cuantificación de RNA de las fusiones HIV-PHO5 y HIVTARless-PHO5 de 3 experimentos de northern correspondiente a de. Otros detalles como en la figura 9.

El efecto de *spt8* Δ es similar al observado en *ctk1* Δ y *bur2* Δ ; lo que de nuevo apoya diferencias funcionales entre δ HIV y δ HIVTARless durante la transcripción.

La proteína Rpd3, por el contrario, no parece estar implicada en la transcripción de δ HIV y δ HIVTARless ya que no se observa ninguna variación significativa en el mutante *rpd3* Δ (Fig. 14). Este hecho descarta los fenómenos

de silenciamiento como explicación de la diferencia de expresión entre δ HIV y δ HIVTARless. Por otra parte, es improbable que la pérdida de la actividad desacetilasa de *rpc3 Δ* sobre la cromatina de la región 3' transcrita afecte la expresión de δ HIV y δ HIVTARless, siendo estas unidades transcripcionales idénticas en su extremo 3'.

3.3.4 Dst1

A la luz de los recientes datos que vinculan a TFIIIS con la regulación transcripcional de genes de *Drosophila* a nivel de la elongación (Adelman et al., 2005), decidimos estudiar el papel de este factor en la transcripción del HIV en la levadura.

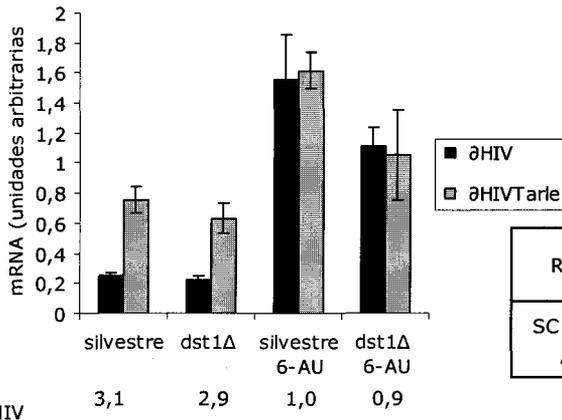
TFIIIS es un factor transcripcional altamente conservado entre eucariotas cuya función es estimular la actividad catalítica intrínseca de la RNAPolIII en situaciones de bloqueo para producir un corte endonucleolítico en el mRNA naciente, que le permita continuarla transcripción.

Observamos que el mutante *dst1 Δ* no produjo ninguna variación significativa en el patrón de expresión de δ HIV y δ HIVTARless con respecto al silvestre. Como se puede observar en la Fig. 15Aa, los valores absolutos de acumulación de mRNA y la relación entre los niveles de expresión de δ HIV son muy similares.

Nos preguntamos si en presencia de drogas que disminuyen la concentración intracelular de nucleótidos como el 6-azauracilo (6-AU) hubiésemos podido observar variación en este patrón de expresión, ya que el factor TFIIIS es especialmente necesario para la transcripción en presencia de esta clase de drogas. Por ello medimos la acumulación de mRNA tras cultivar 60 minutos en presencia de 6-AU 100 μ g/ml. En esas condiciones los mRNA de δ HIV y δ HIVTARless alcanzaban los mismos valores, con un aumento de la acumulación de mRNA de 5-6 veces por lo que concierne a δ HIV y de aproximadamente 2 veces para δ HIVTARless (Fig.15Ab). Un resultado similar se obtuvo en el mutante *dst1 Δ* tratado con 6-AU, si bien en

este caso los niveles de mRNA alcanzados fueron menores. (Fig.15b) El hecho que en la cepa silvestre se produjera un incremento tan evidente de ambos mRNA nos indicaba que el 6-AU estaba produciendo una alteración del patrón de expresión habitual de δ HIV y δ HIVTARless que anulaba las diferencias

A a



RATIO
HIVTarless /HIV

3,1 2,9 1,0 0,9

A b

	silvestre		<i>dst1Δ</i>	
RATIO	HIV	HIV Tarless	HIV	HIV Tarless
SC +6-AU / SC	6,2	2,1	5,1	1,7

B

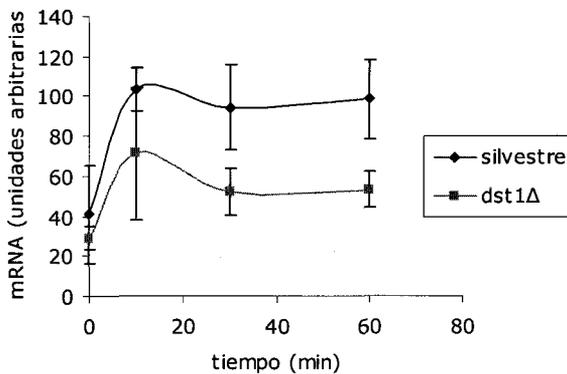


Figura 15. Análisis de la transcripción de $p\delta$ HIV y $p\delta$ HIVTARless en el mutante *dst1Δ* y en el silvestre isogénico BY4741. (A) (a) Se representa la media de la cuantificación de RNA de 2 experimentos de northern de HIV-PHO5 y HIVTARless-PHO5. Otros detalles como en la figura 9. (b) Se enseña el cociente ente el valor medio de acumulación de RNA en presencia de 6-AU frente al valor obtenido sin la droga para cada unidad transcripcional en *dst1Δ* y en el silvestre BY4741. (B) Cinética de expresión de los Ty1 en presencia de 6-AU. Se representa la media de la cuantificación normalizada de 2 experimentos de northern de Ty1. El RNA se aisló de transformantes de $p\delta$ HIV y $p\delta$ HIVTARless en el mutante *dst1Δ* y en el silvestre isogénico BY4741 cultivados como detallado en el apartado 6.7. Usamos las sondas Ty y 25S marcadas con α - 32 P. Los niveles de mRNA, en unidades arbitrarias (U.A.) se obtuvieron en un Fuji FLA 3000 y fueron normalizados con respecto a la cantidad de rRNA en cada muestra.

entre ambas unidades transcripcionales.

Para averiguar si la droga ejercía algún efecto sobre el promotor δ que pudiese justificar el incremento detectado de la actividad transcripcional, llevamos a cabo un análisis de la expresión de los retrotransposones endógenos de la familia Ty1 en presencia de 6-AU 100 μ g/ml. En la Fig.15B se

muestra las cinéticas de acumulación de mRNA tras añadir 6-AU. Como se puede observar, en ausencia de la droga (tiempo 0) los niveles de acumulación de mensajero en el silvestre y en el mutante son muy similares, pero al añadir 6-AU se produce una activación de la expresión de los Ty1 que se traduce en un aumento de 3 veces en la cepa silvestre y de 2 veces en la cepa *dst1 δ* en la acumulación de mRNA tras 60 minutos de exposición a la droga. Concluimos que el 6-AU produce un aumento generalizado en la expresión de los Ty1 a través de un mecanismo que depende solo parcialmente de TFIIIS y que probablemente involucra la regulación de la actividad de su promotor (δ). Si ese fuera el caso, el hecho que no se detectan diferencias entre la expresión de δ HIV y δ HIVTARless en presencia de 6-AU, indicaría que el efecto negativo de la región 5' de HIV se da solo en condiciones de promotor no activado.

3.3.5 Efecto de mutaciones en los genes del complejo *lsw1* sobre la transcripción de HIV en la levadura.

El complejo *lsw1* es un complejo remodelador de cromatina con actividad ATPasa que regula distintos aspectos de la expresión de un amplio número de genes eucarióticos, como el silenciamiento, la represión y el correcto desarrollo de las modificaciones que dan lugar al mRNA maduro sobre todo por lo que concierne al procesamiento del extremo 5' y la terminación de la transcripción (Mellor and Morillon, 2004). La subunidad catalítica del complejo es la proteína *lsw1* que se encuentra unida a factores accesorios como *loc3* en el complejo *lsw1a* o a *loc2* y *loc4* en el complejo *lsw1b* (Vary et al., 2003).

Mutaciones en *ISW1* afectan todos los estadios de la transcripción en los que el complejo actúa, mientras que el análisis de mutaciones en *IOC2*, *IOC3* o *IOC4* permite una disección funcional de los papeles que las distintas formas de complejos *lsw1* llevan a cabo durante la transcripción.

El análisis de expresión de δ HIV y δ HIVTARless en los mutantes de estos genes revela un patrón transcripcional similar en *isw1 Δ* e *ioc2 Δ* , por una parte, y en *ioc3 Δ* e *ioc4 Δ* , por otra. En *isw1 Δ* e *ioc2 Δ* , se observa un aumento de la

acumulación de mRNA de aproximadamente dos veces; el cociente entre los valores relativos a la transcripción de los dos sistemas, aunque disminuye, se mantiene en el mismo entorno del valor calculado para la cepa silvestre. Esto significa que la falta de las proteínas *Isw1* ó *loc2* produce un aumento paralelo de acumulación de mRNA en ambas unidades la transcripcionales y que el efecto principal del complejo *Isw1* en la regulación de la transcripción de δ HIV y δ HIVTARless es el que la subunidad catalítica desarrolla con el auxilio de *loc2*. Morillon y sus colaboradores (2003) demostraron que *ioc2 Δ presenta una alteración del patrón de fosforilación de la Ser5 del CTD, relacionado con una menor presencia de kin28 en el promotor, y un desplazamiento anómalo de la RNA polII desde la zona 5'a la 3' de un gen inducible como *MET16*. En el caso*

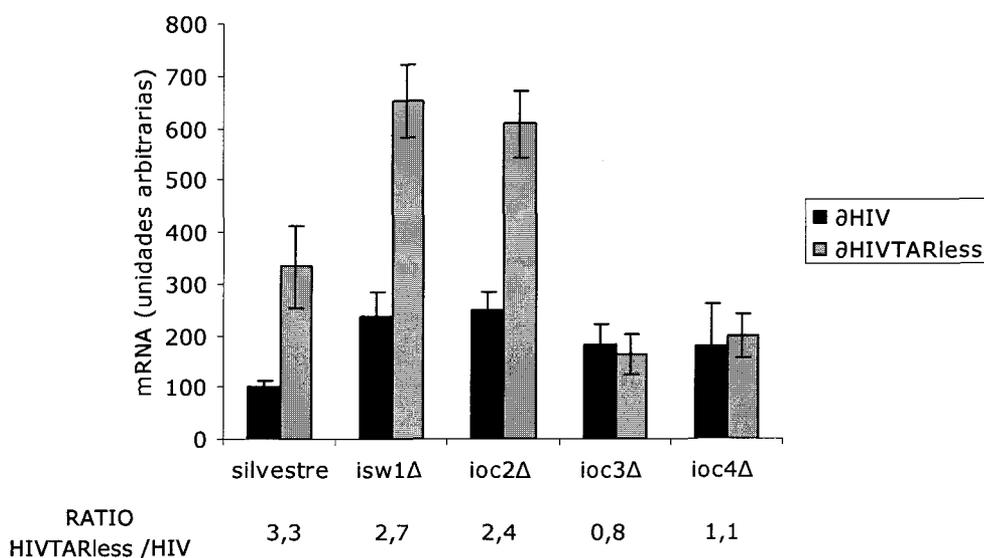


Figura 16. Análisis de la transcripción de δ HIV y δ HIVTARless en los mutantes *isw1 Δ , *ioc2 Δ , *ioc3 Δ , *ioc4 Δ y en el silvestre isogénico BY4741. Se representa la media de la cuantificación de RNA de las fusiones HIV-PHO5 y HIVTARless-PHO5 de 3 experimentos de northern correspondiente a de. Otros detalles como en la figura 9.****

de δ HIV y δ HIVTARless, es razonable que el papel de *loc2* se ejerza también en la región promotora, pero parece ser de naturaleza inhibitoria.

En *ioc3 Δ y *ioc4 Δ vemos un efecto diferente entre las dos unidades transcripcionales: en δ HIV los valores de acumulación de mRNA son el doble**

con respecto al silvestre y se mantienen parecidos a los alcanzados en *isw1Δ* y *ioc2Δ*, mientras que en δ HIVTARless estos valores disminuyen asemejándose a los de δ HIV como se refleja en el cociente δ HIVTARless/ δ HIV que pasa de 3,3 calculado en el silvestre a una cifra próxima a 1 en *ioc3Δ* y *ioc4Δ*.

loc3 unido a *lsw1* tiene un papel negativo sobre la iniciación de la transcripción, y está implicado en el silenciamiento y en la represión de genes inducibles en condiciones de no activación (Mellor and Morillon, 2004; Morillon et al., 2003). En su ausencia el patrón de distribución de la RNAPolIII es similar en el caso del gen *MET16* a lo observado en una cepa silvestre en condiciones de activación del promotor, y se mantiene en condiciones de inducción (Morillon et al., 2003)

ioc4Δ presenta defectos de fosforilación de la Ser2 del CTD, en el patrón de metilación de la Lys4 y 36 de las histonas H3 y de reclutamiento de factores involucrados en la terminación como Rna15. Es probable que aunque produzcan el mismo efecto, *loc3* y *loc4* regulen según mecanismos distintos la transcripción de nuestros sistemas. En todo caso, los efectos de *ioc3Δ* y *ioc4Δ* indican de nuevo una vinculación de la estructura de la cromatina con el efecto negativo de la región 5' de HIV sobre la transcripción.

3.4 Efecto de mutaciones de algunas subunidades del complejo Paf1 sobre la transcripción de HIV en la levadura.

Paf1 es un complejo que se asocia al promotor y a la región codificante de los genes activamente transcritos. Mutantes afectados en una de las 5 subunidades que constituyen el complejo (Paf1, Leo1, Cdc73, Ctr9 y Rtf1) presentan fenotipos relacionados a defectos en elongación como el fenotipo Spt y la sensibilidad a 6-AU (Squazzo et al., 2002). El complejo Paf1 interactúa

físicamente con la RNAPolIII (Mueller et al., 2004), con Spt5 (Squazzo et al., 2002) y con FACT (Squazzo et al., 2002).

Chd1 es una ATPasa implicada en la remodelación de cromatina (Tran et al., 2000), y en la elongación de la transcripción (Simic et al., 2003), que interactúa físicamente con el complejo Paf1 a través de Rtf1, con Spt4-Spt5 y con Spt16-Pob3.

La transcripción de δ HIV y δ HIVTARless se ve sensiblemente afectada en el mutante *paf1* Δ : la acumulación de mRNA disminuye y se anulan las diferencias de expresión entre las dos unidades transcripcionales (Fig.17)

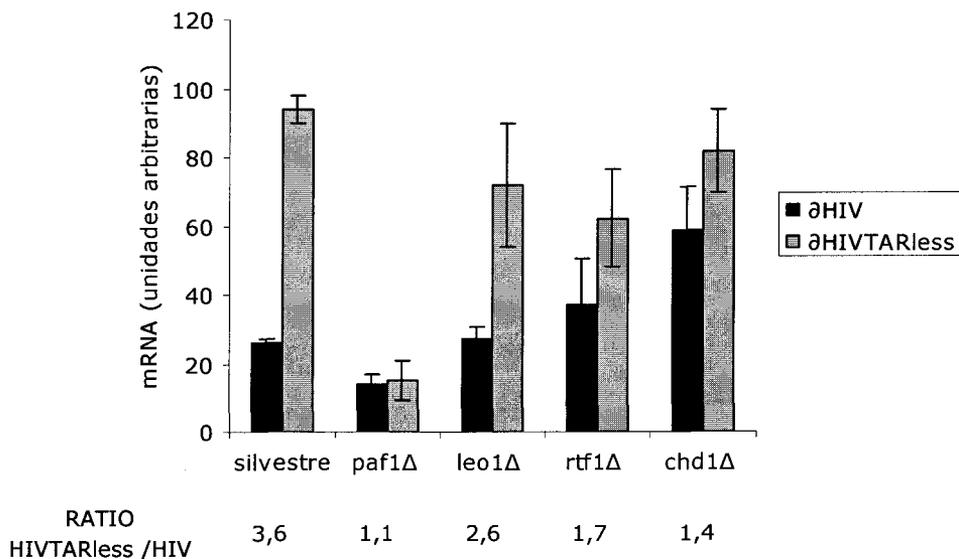


Figura 17. Análisis de la transcripción de δ HIV y δ HIVTARless en los mutantes *paf1* Δ , *leo1* Δ , *rtf1* Δ , *chd1* Δ y en el silvestre isogénico BY4741. Se representa la media de la cuantificación de RNA de las fusiones HIV-PHO5 y HIVTARless-PHO5 de 3 experimentos de northern correspondiente a de. Otros detalles como en la figura 9.

El papel de Leo1 no está todavía esclarecido pero no parece ser involucrado directamente en la regulación del entorno cromatínico de los genes transcritos. Por el contrario, la eliminación de la proteína Leo1 no produce un fenotipo sensiblemente distinto de lo observado en la cepa silvestre isogénica (Fig.17). En el mutante *rtf1* Δ observamos un ligero aumento de la acumulación de mRNA de δ HIV y una disminución del mRNA de δ HIVTARless, lo que provoca que el cociente entre estos valores sea la mitad de lo calculado para

el silvestre. Rtf1 es una subunidad de la que depende la presencia del complejo Paf1 en la región codificante de los genes transcritos y la unión del complejo a la RNAPolIII, pero no es esencial para la integridad del complejo ni para su función (Mueller et al., 2004). Leo1 tampoco es una subunidad esencial para la estructura y la función del complejo Paf1. Por el contrario, Paf1 es la subunidad central del mismo. No es de extrañar por tanto que sea el mutante *paf1* Δ el que presente una alteración mayor de la expresión de δ HIV y δ HIVTARless.

Por último, la ausencia de Chd1 aumenta considerablemente la acumulación del mRNA de δ HIV mientras que la expresión de δ HIVTARless no se ve significativamente afectada. Chd1 es por tanto otro factor que contribuye al papel negativo que la región 5' que incluye el dominio TAR ejerce sobre la transcripción de HIV.

3.5 Análisis *in vivo* del posicionamiento de cromatina en la secuencia de HIV clonada en δ HIV y δ HIVTARless.

El estudio de la transcripción con el vector δ HIVTARmut (apartado 3.2.1.2) indicaban que las diferencias en el patrón de expresión observadas en los sistemas no dependían de la estructura secundaria del dominio TAR

Los datos obtenidos del análisis genético realizado con los plásmidos δ HIV y δ HIVTARless demuestran que la transcripción del extremo 5' es dependiente de algunos factores transcripcionales claramente involucrados en la remodelación de la cromatina en la región transcrita de genes eucarióticos como Spt6, Spt16 o Chd1 y se ve influida por la dosis de histonas H2A y H2B.

Nos preguntamos si las diferencias en el patrón de expresión de δ HIV y δ HIVTARless se debían a una distinta organización de la cromatina en los fragmentos del HIV presentes δ HIV y δ HIVTARless.

Para ello llevamos a cabo un mapeo de nucleosomas por digestión parcial con nucleasa microccal (MNasa) y determinamos la distribución de los nucleosomas por marcaje indirecto de extremos (indirect end-labeling).

La MNasa corta preferentemente las regiones de DNA no unidas a proteínas; en una muestra de cromatina estas zonas suelen ser las que se sitúan entre dos nucleosomas. El DNA envuelto alrededor de un nucleosoma es relativamente resistente a la digestión por MNasa (Kornberg and Lorch, 1992); al ser su tamaño aproximadamente 145 pb, en una hibridación southern realizada con el DNA proveniente de cromatina digerida parcialmente con MNasa se observa la aparición de bandas de este tamaño o múltiplos de ello generadas por la digestión de las regiones internucleosómicas. Si además digerimos el DNA con una enzima de restricción e hibridamos con una sonda adyacente a un sitio de corte para esta enzima, podemos detectar la presencia de nucleosomas localizados establemente sobre esa región del genoma (posicionamiento translacional). La MNasa presenta cierta afinidad por algunas secuencias de DNA, por ello para determinar que el patrón de digestión indique realmente la presencia de nucleosomas posicionados en la región de interés hay que comparar el resultado de la digestión de la cromatina con el resultado de la digestión del mismo fragmento de DNA previamente tratado para eliminar cualquier proteína unida a ello (DNA desnudo).

En la Fig.18 se presenta el resultado de los experimentos realizados con muestras de cromatina y DNA desnudo de células transformadas con los plásmidos p δ HIV y p δ HIVTARless, hibridadas con las sondas MN-*DraI* y MN-*EcoRI* respectivamente.

Como se puede observar el posicionamiento de cromatina es bastante similar en el extremo 3' del fragmento de HIV presente en estas unidades transcripcionales, donde se detecta el posicionamiento de un nucleosoma en el marco de lectura abierto de gag entre los nucleótidos 150 y 300 aproximadamente, contados a partir del extremo 3' del fragmento de HIV.

Por el contrario, hacia el extremo 5' se detectan importantes diferencias en la estructura de la cromatina de las dos unidades transcripcionales. En el caso de δ HIVTARless, la aparición de dos regiones entorno a los nucleótidos 440 y 300 y de un zona intermedia protegida indica el posicionamiento de un nucleosoma en esta región. Entre el nucleótido 440 y el nucleótido 520, que corresponde aproximadamente con el extremo 5' del fragmento de HIV

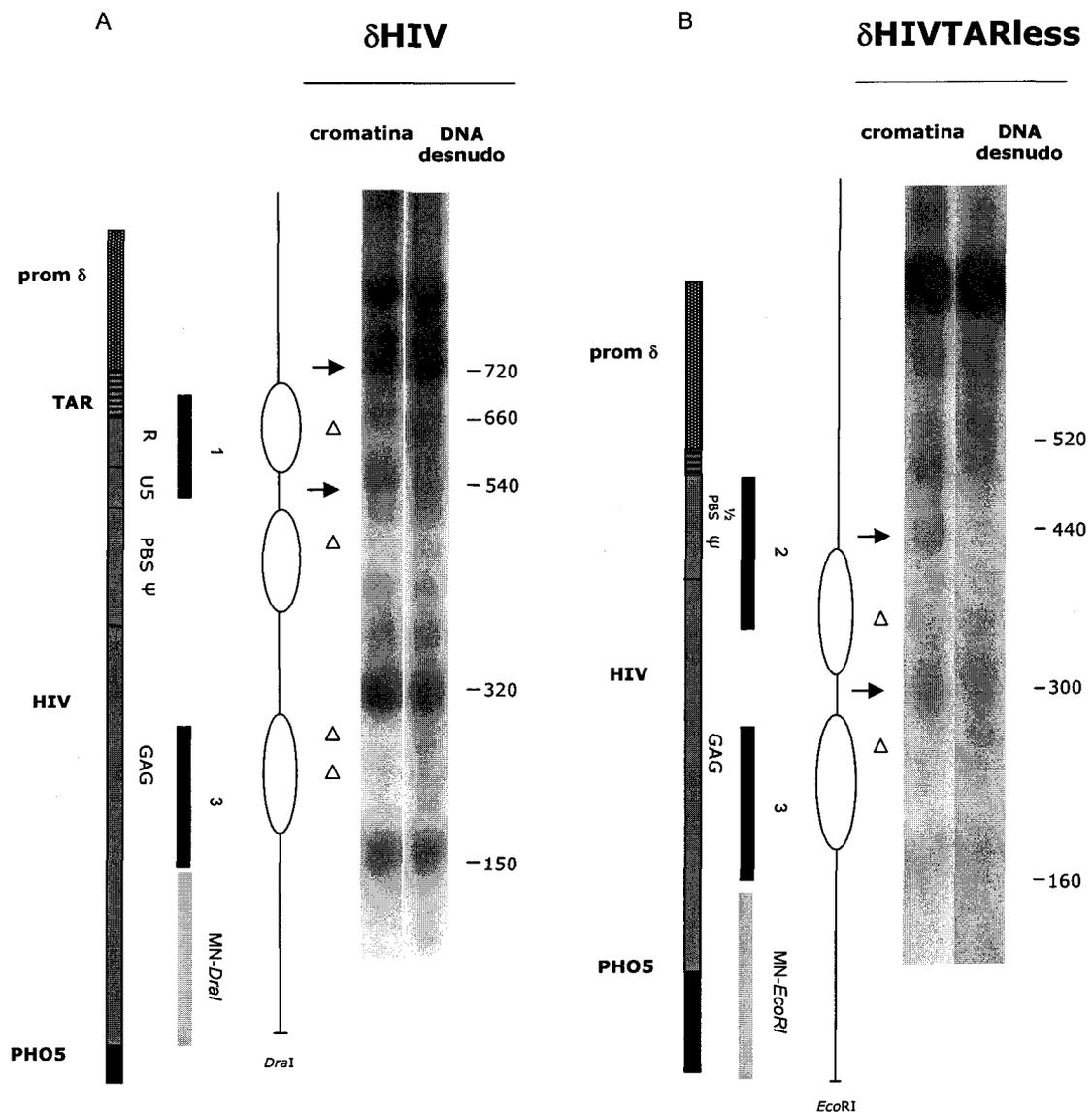


Figura 18. Mapeo del posicionamiento translacional de nucleosomas con nucleasa micrococcal por "indirect end-labeling" sobre el fragmento de HIV presente en $p\delta$ HIV y $p\delta$ HIVTARless. Resultado de la hibridación con las sondas (en celeste) MN-DraI (A) y MN-EcoRI (B) de la cromatina y del DNA desnudo digeridos parcialmente con MNasa y posteriormente con DraI o EcoRI. El DNA digerido en presencia de cromatina y el DNA desnudo digeridos con MNasa y posteriormente con DraI o EcoRI. El DNA digerido en presencia de cromatina y el DNA desnudo digeridos con MNasa y posteriormente con DraI o EcoRI. El DNA digerido en presencia de cromatina y el DNA desnudo digeridos con MNasa y posteriormente con DraI o EcoRI. El DNA digerido en presencia de cromatina y el DNA desnudo digeridos con MNasa y posteriormente con DraI o EcoRI. En función de los sitios de hipersensibilidad (→) y de protección (Δ) se ha establecido el posicionamiento de los nucleosomas, representados con ovalos al lado de la autorradiografía. El esquema de las fusiones transcripcionales en escala permite localizar las regiones protegidas por los nucleosomas en la secuencia de HIV en $p\delta$ HIV y $p\delta$ HIVTARless. En negro se dibujan las sondas usadas para el mapeo de nucleosomas por sensibilidad a MNasa, que se describe en la Figura ... El tamaño de los fragmentos se ha calculado tomando como referencia el extremo 3' del fragmento de HIV clonado en δ HIV y δ HIVTARless.

clonado en este plásmido, hay una zona en la que no se detectan diferencias en el patrón de digestión entre la cromatina y el DNA desnudo, lo que indica que esta región se encuentra desprotegida. Esto revela que en las primeras 80 pb del extremo 5' del HIV de la unidad transcripcional δ HIVTARless no posiciona ningún nucleosoma.

En el fragmento de HIV presente en δ HIV se detectan protecciones e hipersensibilidades a la MNasa que son incompatibles con el posicionamiento de tres nucleosomas. Como anteriormente se ha comentado, en la región 3' se localiza un nucleosoma posicionado en la misma región del δ HIVTARless. En la región intermedia del fragmento de HIV presente en δ HIV no se detecta un patrón de cortes de la MNasa similar al que presenta δ HIVTARless. La presencia de un nucleosoma posicionado en esta región de δ HIV es muy dudosa. En todo caso, la región protegida entorno al nucleótido 490 descarta la presencia de un nucleosoma localizado como en la región correspondiente de δ HIVTARless.

En la zona 5' del fragmento de HIV presente en δ HIV sí detectamos un nucleosoma posicionado, indicado por la aparición de dos zonas de hipersensibilidad a la altura de los nucleótidos 720 y 540, y de una zona protegida alrededor del nucleótido 660. Entre los nucleótidos 720 y 660 está comprendido el dominio TAR, que se corresponde con el inicio del extremo 5' del fragmento de HIV clonado en δ HIV. Por ello podemos afirmar que el extremo 5' de la región transcrita de δ HIV se encuentra protegido por un nucleosoma posicionado.

Para confirmar estos datos y obtener mayor información sobre la organización de la cromatina en el extremo 5' de nuestros sistemas realizamos un estudio de la cromatina por digestión parcial con MNasa e hibridación con sondas específicas para los extremos 5' de δ HIV y δ HIVTARless y para la región 3' común. En este caso, se trataron con MNasa a varias concentraciones los esferoplastos de células transformadas con p δ HIV y p δ HIVTARless, se purificó al DNA y se llevó a cabo una hibridación Southern

con las distintas sondas, sin digerir previamente con una enzima de restricción. Si la sonda correspondiese a una región ocupada por un nucleosoma posicionado, se detectaría la aparición de bandas de un tamaño discreto generadas por los cortes en las regiones internucleosómicas; por el contrario, si la sonda correspondiese a una secuencia internucleosómica no se detectaría una escalera de bandas con un tamaño discreto, si no un patrón menos definido debido a la digestión parcial y aleatoria de la MNasa en las regiones desprotegidas, y se detectarían fragmentos de tamaño inferior a un nucleosoma.

En la Fig. 19 se representa el posicionamiento de la cromatina según los datos obtenidos por marcaje indirecto de extremos (Fig. 18) y las sondas que se han utilizado en este experimento. En el caso de p δ HIV diseñamos la sonda 1 para que coincidiese con el extremo 5' del HIV clonado en este plásmido y, según los resultados anteriormente comentados, con el nucleosoma presumiblemente posicionado allí; la sonda 3 se correspondía con la zona 3' y con el nucleosoma cuyo posicionamiento establecimos anteriormente. La hibridación con la sonda 1 dio lugar al patrón esperado: como se observa en la Fig, 19B aparecen bandas de un tamaño discreto compatible con la longitud del DNA enrollado alrededor de un nucleosoma. Un patrón muy similar se observó tras la hibridación con la sonda 3 (Fig. 19B).

La sonda 2 fue diseñada para que hibridara con la zona 5' del fragmento de HIV presente en δ HIVTARless. La hibridación con esta sonda ha puesto de manifiesto un patrón distinto de lo observado con las sondas 1 y 3 en la figura

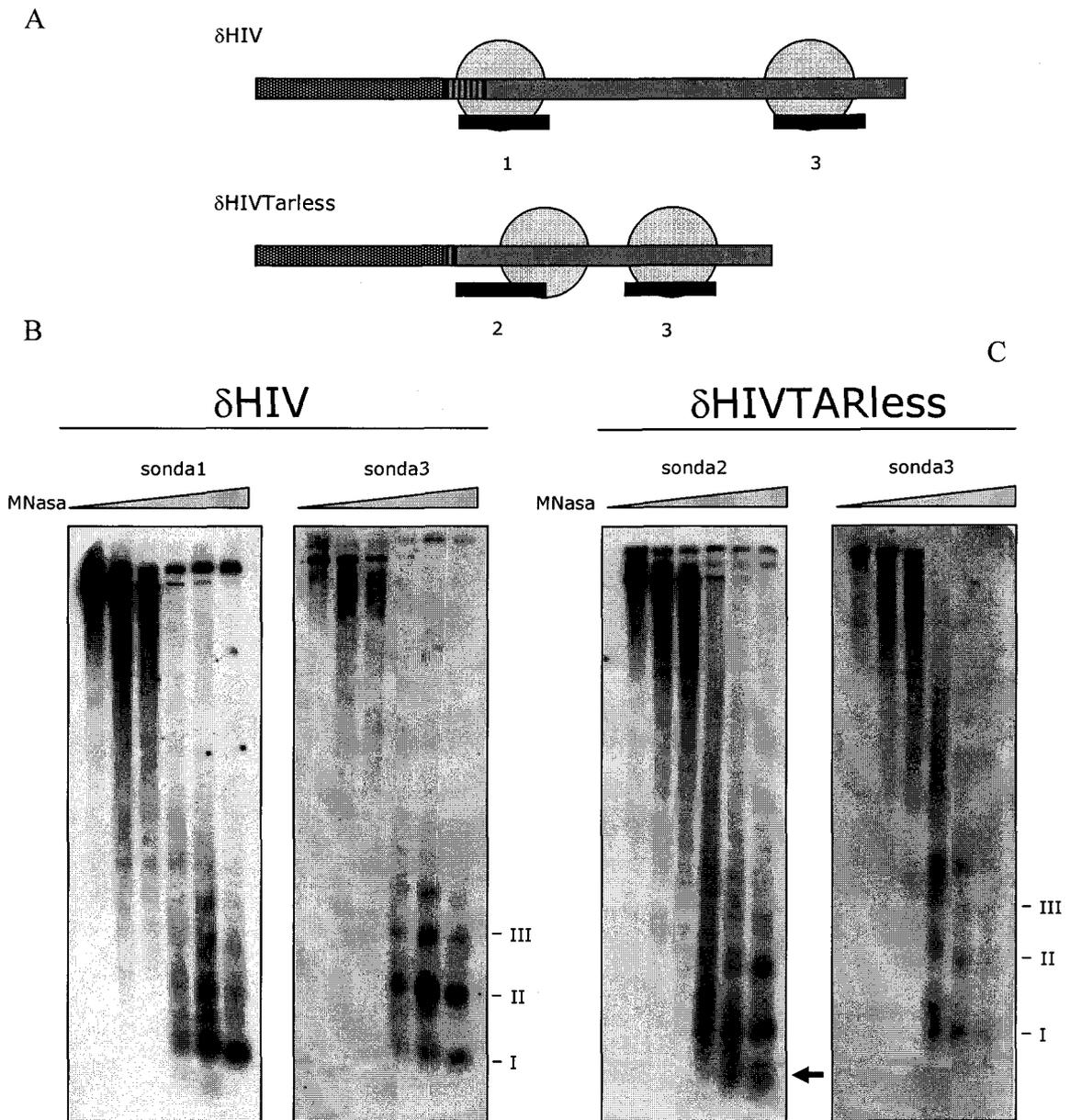


Figura 19. Mapeo de nucleosomas por digestión parcial con MNasa de HIV en p δ HIV y p δ HIVTARless. (A) Esquema en escala del posicionamiento de nucleosomas (círculos grises) en el fragmento de HIV clonado en p δ HIV y p δ HIVTARless según los resultados del mapeo de nucleosomas por "indirect end labeling". En negro se representan las sondas usadas. (B) Resultado de la hibridación del DNA digerido con MNasa (6.24.1) con las sondas 1 y 3. El DNA se extrajo de un transformante de Y13232 con p δ HIV. (C) Resultado de la hibridación del DNA digerido con MNasa (6.24.1) con las sondas 2 y 3. El DNA se extrajo de un transformante de Y13232 con p δ HIVTARless. Los números romanos indican las posiciones de mono- (I), di- (II) y trinucleosomas (III). La flecha indica la hibridación con fragmentos de DNA de tamaño subnucleosómico.

anterior. En la Fig. 19C se puede observar que la hibridación de las muestras de δ HIVTARless con esta sonda produce un patrón de bandas diferente al observado anteriormente: por una parte aparecen bandas de tamaño discreto compatible con la longitud del DNA alrededor de un nucleosoma, pero, adicionalmente, encontramos una señal más difusa generada por moléculas de DNA de tamaño inferior a las 100pb.

Este patrón es compatible con el posicionamiento asignado al nucleosoma del extremo 5' de HIV en δ HIVTARless. De hecho establecimos que quedaba desprotegida una zona de aproximadamente 100bp en la zona 5' del fragmento de HIV presente en p δ HIVTARless. La sonda 2 solapa en parte con esta zona en parte con el DNA unido al nucleosoma, por ello era de esperar que la hibridación con esta sonda diera lugar a un patrón intermedio en el que se pudiesen apreciar tanto bandas definidas como una señal difusa. Por su parte, la hibridación del mismo filtro con la sonda 3, que según nuestras predicciones, coincidía con el nucleosoma posicionado en el extremo 3' del fragmento de HIV presente en p δ HIV y p δ HIVTARless, da lugar a un patrón de bandas definido, sin la presencia de la señal difusa de moléculas de tamaño pequeño.

Concluimos que, a diferencia de la región 5' de HIV que incluye a TAR, la zona 5' del fragmento de HIV presente en δ HIVTARless no está protegida por la presencia de un nucleosoma posicionado.

4 Discusión

En esta trabajo hemos reconstruido parcialmente el sistema transcripcional del HIV-1 en *S. cerevisiae* y hemos comprobado su funcionalidad en la levadura. Se ha llevado a cabo un estudio genético de este sistema que, junto a un estudio de la estructura de cromatina *in vivo*, muestra una relación entre la organización de la cromatina y la regulación de la transcripción de HIV-1 en *S. cerevisiae*.

4.1 Respuesta de GAL1-HIV a Tat y P-TEFb.

Hemos construido vectores de expresión de algunos para los elementos que constituyen el sistema de regulación transcripcional del HIV-1: el dominio de RNA TAR, la proteína vírica Tat y los factores celulares hCycT1 y hCdk9. Hemos demostrado que Tat, hCyc T1 y hCdk9 se expresan de forma correcta en la levadura a partir de los plásmidos p414GPD-Tat, p415GPD-CycT1 y p413GPD-Cdk9-FLAG y que es posible utilizar estas construcciones para reconstituir parte del sistema de transcripción del HIV-1 en *S. cerevisiae*.

Diseñamos un vector para expresar parte del genoma del HIV-1 fusionado al gen de levadura *PHO5* con el objetivo de obtener una proteína híbrida que nos permitiera seguir la actividad transcripcional del HIV-1 a través de un simple ensayo enzimático. En la literatura es frecuente el uso de vectores híbridos entre el HIV y un gen informador, en células humanas suelen ser CAT o LUC, que permiten medir la actividad transcripcional con métodos enzimáticos sencillos, en *S. cerevisiae* muchos sistemas de análisis de expresión se basan en el uso de *lacZ* como gen informador. Sin embargo este gen presenta una estructura de la cromatina muy laxa e irregular en la levadura (Chavez et al., 2001). En este estudio hemos preferido utilizar *PHO5*, un gen endógeno de la levadura, que presenta un posicionamiento de nucleosomas regular y definido. Pensamos que este patrón de posicionamiento de nucleosomas fuera más adecuado para evitar perturbar la organización de la cromatina en la zona del HIV-1 clonada, que también posee nucleosomas establemente posicionados (Pumfery et al., 2003). Aunque no

conseguimos detectar actividades fosfatasa a partir de esta construcción, decidimos seguir usando la fusión HIV-PHO5 en todos los plásmidos diseñados para expresar el fragmento de HIV de interés por varias razones: en primer lugar queríamos generar una unidad transcripcional de un tamaño superior al tamaño medio de los genes de levadura (Cherry et al., 1997) para amortiguar el efecto que, sobre la longitud de la región transcrita, pudieran tener las deleciones del extremo 5'. En un estudio diferente hemos puesto de manifiesto que la longitud de la región transcrita aumenta los defectos en la elongación transcripcional (Morillo-Huesca et al., 2006). Al mismo tiempo era aconsejable evitar la introducción de sitios de splicing que pudiesen dificultar la medida de la acumulación de mRNA. El virus del HIV-1 presenta 5 sitios donadores y 9 sitios aceptores y genera por lo menos 40 tipos de moléculas de mRNA por procesamiento alternativo (Schwartz et al., 1990); (Purcell and Martin, 1993). El primer sitio donador está 289 pb aguas abajo del inicio de la transcripción del HIV-1 (Schwartz et al., 1990), en una zona que, por su proximidad con el extremo 5' de la región transcrita del virus, nos interesaba incluir en nuestras construcciones. Decidimos por ello clonar un fragmento del HIV-1 de aproximadamente 700pb donde posicionan los primeros 3 nucleosomas de la zona transcrita en células humanas (Verdin et al., 1993) y prescindir del resto del genomio viral para evitar la introducción de sitios de procesamiento alternativo u otras secuencias reguladoras cuyo efectos sobre la expresión del HIV en la levadura desconocemos.

Para la reconstrucción de sistema transcripcional del HIV-1 en la levadura decidimos utilizar el promotor de *GAL1*, que, como hemos comentado anteriormente, permite alcanzar un nivel de expresión muy alto. Un estudio anterior había demostrado que la LTR viral no es un promotor funcional en la levadura (Daviet et al., 1998). El mapeo del extremo 5' del mRNA generado por la transcripción de la unidad transcripcional *GAL1-HIV* ha puesto en evidencia que la transcripción se inicia en el sitio descrito del promotor para *GAL1* (Johnston, 1984) y que es probable que inicie otro transcrito en el primer nucleótido del HIV-1 presente en esta construcción. En ambos casos, los RNA

incluyen la zona 5' del HIV donde se sitúa el dominio de RNA TAR, elemento regulador en *cis* fundamental para la transactivación mediada por Tat. Numerosos estudios han permitido caracterizar exhaustivamente la importancia que tiene la secuencia, la estructura secundaria, la orientación y la distancia al LTR viral del dominio TAR en las interacciones que se establecen entre el RNA, Tat y hCycT1 y en la eficiencia de la activación de la transcripción (Berkhout and Jeang, 1989; Harrich et al., 1995; Hauber and Cullen, 1988; Kulinski et al., 2003; Peterlin et al., 1986; Selby et al., 1989; Verhoef et al., 1997). Queremos destacar que el mapeo de la región 5' ha proporcionado una prueba, aunque indirecta, de la conservación de la estructura secundaria del mRNA TAR en la levadura, como se describe en el apartado 3.1.2. La retrotranscriptasa puede encontrar dificultades al retrotranscribir moldes con una estructura secundaria estable y bloquearse generando fragmentos de cDNA inferiores al tamaño del mRNA molde (School);). En el mapeo llevado a cabo en este estudio aparecen moléculas de este tipo que se corresponden con los puntos más críticos de la estructura secundaria de TAR: en el primer y último nucleótido del tallo, en correspondencia de la distorsión causada por la protuberancia del tallo donde se une Tat al RNA, y en el ápice del tallo donde está el sitio de unión de hCycT1 a TAR.

Hemos comprobado que los plásmidos pGAL1-HIV, p414GPD-Tat, p415GPD-CycT1 y p413GPD-Cdk9-FLAG expresaban de forma correcta en la levadura los factores reguladores en *cis* y en *trans* que juegan un importante papel en la transcripción del genoma viral. Hemos reconstituido parcialmente el sistema transcripcional del HIV-1 en *S. cerevisiae* a partir de estos plásmidos y hemos observado que la presencia de los factores *in trans* influye sobre la expresión del HIV1 en *S. cerevisiae*. Los resultados demuestran un efecto positivo de la proteína Tat y el complejo P-TEFb sobre la transcripción de pGAL1-HIV. Como era de esperar los valores más altos de acumulación de mRNA se alcanzan cuando se expresan Tat, hCycT1 y Cdk9, mientras que en presencia de Cdk9 y Tat, pero en ausencia de hCycT1, los niveles de mRNA

acumulados son muy parecidos al control. Esto sugiere que la ciclina T1 humana conserva en la levadura su papel clave en el reconocimiento altamente específico de Tat sobre el dominio TAR. Varios estudios demuestran que en células humanas la formación del complejo Tat-P-TEFb-TAR, que desencadena la activación del sistema transcripcional del HIV, depende específicamente de hCycT1. hCycT2a y hCycT2b, dos isoformas de hCycT1 que difieren en la longitud de su extremo carboxiterminal, no reconocen Tat y su sobreexpresión provoca un efecto dominante negativo en la activación de la transcripción sostenida por hCycT1 (Napolitano et al., 1999). La proteína homóloga de ratón, mCycT1, que difiere de la humana en un sólo residuo aminoacídico (Y261), no es capaz de reconocer el dominio TAR y de activar la transcripción del HIV en presencia de Tat (Bieniasz et al., 1998) (Fujinaga et al., 1999).

Por otra parte, en ausencia de Cdk9, pero en presencia de Tat y hCycT1, se observan niveles de acumulación de mRNA cercanos al sistema completo. Este resultado podría sugerir que otra quinasa de levadura es reclutada por Tat y hCycT1 y realiza la función desarrollada por la quinasa humana. Varios estudios apuntan a que Bur2 (Yao et al., 2000) o Ctk1 (Sternier et al., 1995) son los homólogos putativos de Cdk9 en *S. cerevisiae*. Los complejos Bur1/Bur2 y CTDK1 están implicados en el control de la elongación transcripcional (Keogh et al., 2003) o en el del patrón de fosforilación del CTD (Ahn et al., 2004). No existen pruebas en la literatura de que hCdk9 pueda complementar mutantes de *BUR1* o de *CTK1*, sin embargo, estos resultados inducen a comprobar esta posibilidad. Alternativamente, sería posible que el reconocimiento de TAR por parte de hCycT1 y Tat estabilizara la estructura secundaria de TAR frente a la horquilla alternativa de carácter inhibitorio que, según Palangat *et al.* (1998), se genera en el mRNA cuando la RNAPolIII queda pausada. Los datos experimentales obtenidos con GAL1-HIV sugieren que en esta unidad transcripcional no se produce una pausa estable ya que los niveles de expresión de pGAL1-HIV y pGAL1-HIVTARless son similares, a diferencia de lo observado con p δ HIV y p δ HIVTARless. Es posible que la estructura

secundaria de TAR, que según los autores (Palangat et al., 1998) favorece la procesividad de la enzima, se genere en la mayoría de los transcritos y que la unión de hCycT1 y Tat, que no necesita de Cdk9 para establecerse (Garber et al., 1998), contribuya a la estabilidad de la estructura de TAR y a su efecto positivo sobre la RNAPolIII.

4.2 δ HIV y δ HIVTARless permiten el estudio de la transcripción basal de HIV-1 en *S. cerevisiae*.

4.2.1 El extremo 5' transcrito del HIV ejerce un efecto negativo sobre la expresión del virus en la levadura de forma dependiente del estado de activación del promotor

Una vez demostrado que es posible reconstruir una forma funcional del sistema transcripcional del HIV en *S. cerevisiae* mediante la expresión de los factores Tat, hCycT1 y Cdk9 y que en la levadura este sistema presenta mayor dependencia de hCycT1 que de Cdk9, decidimos investigar el papel del dominio TAR en la expresión de GAL1-HIV.

Cuando eliminamos el extremo 5' de HIV observamos que, si bien el elemento es necesario para que los factores celulares y el factor viral produzcan el efecto positivo sobre la transcripción del HIV-1, no produce ningún efecto sobre la acumulación de mRNA en ausencia de estos factores. Este resultado contrastaba con algunas evidencias experimentales obtenidas en células animales, que serán discutidas más adelante en este capítulo, y que indicaban que el extremo 5' de la región transcrita de HIV ejerce un efecto negativo sobre la transcripción basal del virus.

Con el objetivo de evidenciar un posible efecto del dominio TAR sobre la elongación transcripcional del HIV en la levadura diseñamos las construcciones p δ HIV y p δ HIVTARless, aportando algunas modificaciones a las unidades transcripcionales GAL1-HIV y GAL1-HIVTARless, y observamos la aparición de un fenotipo transcripcional dependiente del extremo 5' de la zona transcrita del genoma viral. En concreto, observamos que el extremo 5',

que codifica el dominio TAR de HIV causa una disminución de 2 a 3 veces en la acumulación de mRNA con respecto a la unidad transcripcional δ HIVTARless en la que habíamos eliminado parte del tallo de TAR, la restante región R, U5 y parte de la región GLS. Esta delección impide la formación de la estructura TAR en el mRNA. Las modificaciones introducidas en p δ HIV y p δ HIVTARless, aunque desconocemos la contribución real de cada una de ellas al cambio del patrón transcripcional, han permitido detectar un elemento regulador negativo *in cis* localizado en el fragmento eliminado en p δ HIVTARless.

Entre las posibilidades que barajamos para explicar los diferentes comportamientos de estas unidades transcripcionales nos inclinamos por la distinta naturaleza del promotor. La RNAPolIII reclutada por la LTR del HIV-1 presenta escasa procesividad al salir del promotor y es activada en la fase temprana de la elongación. El gen *GAL1* presenta una regulación de la transcripción muy distinta que se desarrolla a nivel de la iniciación y que produce el ensamblaje de una RNAPolIII extremadamente procesiva. El promotor δ , por lo contrario, es un promotor mas débil que *GAL1* (Morillon et al., 2002). En la bibliografía se describen observaciones que sugieren que una escasa procesividad de la RNAPolIII favorece la propensión a sufrir pausas. Kireeva *et al.*, (2005) han demostrado que *in vitro* la presencia de un nucleosoma aumenta la estabilidad de la pausa de la RNAPolIII y que este efecto se potencia a bajas concentraciones de nucleótidos. Kristjuhan y Svejstrup (Kristjuhan and Svejstrup, 2004) plantean la existencia de dos formas de transcribir a través de un molde cromatinizado en función de la procesividad de la maquinaria transcripcional: partiendo de la observación de que la transcripción a partir del promotor *GAL1*, a diferencia de genes que se expresan a un nivel más bajo (Kristjuhan, 2001), no es dependiente de la acetilación de histonas, especulan que la densidad de la RNAPolIII en genes fuertemente expresados es tan elevada (Iyer and Struhl, 1996) que no permite el reposicionamiento de cromatina en el molde. Genes que se expresan a un

nivel bajo necesitan factores accesorios para remodelar la cromatina que, en este caso, supone un obstáculo mucho más fuerte para el paso de la RNApolIII. Es interesante subrayar que las diferencias de acumulación de mensajero observadas entre δ HIV y δ HIVTARless en la cepa silvestre BY4741 desaparecen en presencia de 6-AU. La diana molecular del 6-AU es la enzima inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa (IMPDH), que participa en la síntesis de nucleótidos de guanina (Shaw y Reines, 2000). El efecto más evidente es una disminución de la disponibilidad de nucleótidos que causa defectos en la elongación de la transcripción. Paradójicamente, la droga causa un aumento general de la acumulación de mensajeros de δ HIV y δ HIVTARless, de intensidad algo inferior en el mutante *dst1* Δ . El hecho de que la droga cause un aumento de la expresión de los retrotransposones Ty1 de la misma intensidad, nos indica que el efecto del 6-AU sobre δ HIV y δ HIVTARless debe estar mediado por la activación del promotor δ . Nos planteamos la existencia de una correlación entre la activación del promotor δ y el hecho que el patrón de expresión de δ HIV y δ HIVTARless se asemejase al observado con el promotor *GAL1* en condiciones de activación. En la bibliografía no se describen efectos de la disminución de la disponibilidad de ribonucleótidos sobre la transcripción de Ty1, sin embargo sabemos que estos elementos se activan en distintas situaciones de estrés celular como el hambre de nitrógeno (Morillon et al., 2002) o la exposición a mutágenos como MMS y 4NQO (Staleva Staleva and Venkov, 2001). Estos estímulos se reflejan en el aumento de acumulación de mRNA debido a la inducción del promotor por acción de activadores específicos como Tec1 y Ste12 (Morillon et al., 2002). El resultado obtenido en el análisis de la expresión de nuestras construcciones en presencia de 6-AU parece sugerir que el efecto negativo producido por el extremo 5' de la región transcrita de HIV sobre su expresión en la levadura es dependiente del estado de activación del promotor y se hace patente únicamente en un estado transcripcional no activado o basal.

Por otra parte, en pGAL1-HIV y pGAL1-HIVTARless el primer nucleótido del fragmento del HIV-1 insertado en estas construcciones no coincide con el inicio de la transcripción. En la LTR del virus el inicio de la transcripción coincide con el inicio del dominio TAR y se ha demostrado que la inserción de un fragmento de algunas decenas de pares de bases entre la caja TATA y TAR altera la transactivación mediada por Tat (Peterlin et al., 1986). Por este motivo, en la construcción p δ HIV clonamos fragmento de HIV de forma que el inicio de la transcripción del promotor δ coincidiera con el inicio del dominio TAR. No podemos descartar que estas diferencias influyan en el distinto comportamiento de GAL1-HIV y δ HIV.

Para terminar, hay que destacar que aunque no se han llevado a cabo ensayos de estabilidad de mRNA, parece improbable que las diferencias en los niveles estacionarios de mRNA de δ HIV y δ HIVTARless sean debidas a este parámetro. De hecho, las principales secuencias reguladoras de las rutas de degradación mensajero en dirección 3'-5' y 5'-3' (revisado por (Wilusz and Wilusz, 2004),(Bentley, 2002)), es decir la región 3' UTR, la región 5' UTR y los primeros 25 nucleótidos transcritos, son comunes a las dos unidades transcripcionales. Los datos obtenidos con pGAL1-HIV y pGAL1-HIVTARless parecen excluir esta hipótesis, ya que en estas construcciones, análogas a p δ HIV y p δ HIVTARless en lo que concierne la secuencia transcrita, no observamos diferencias en la acumulación de mRNA. En el conjunto estos resultados apuntan a la existencia de distintas dinámicas transcripcionales en GAL1-HIV y δ HIV.

4.2.2 La RNAPolIII está pausada en el extremo 5' de δ HIV

Los datos de inmunoprecipitación de cromatina han puesto de manifiesto una correlación entre el patrón de acumulación de mRNA y la distribución de la RNAPolIII. De hecho observamos que en el extremo 5' de la unidad transcripcional δ HIV la densidad de la RNAPolIII es doble que en el resto del fragmento de HIV clonado en la misma unidad transcripcional y que en todo el

fragmento de HIV de la unidad transcripcional p δ HIVTARless.. La hipótesis más sencilla para explicar este comportamiento de forma coherente con los resultados obtenidos en el análisis de la expresión de δ HIV y δ HIVTARless es que la RNAPolIII esté acumulada en el inicio de la región transcrita de HIV como consecuencia de algún fenómeno determinado por su secuencia. El hecho que en *dst1* Δ el patrón de expresión de δ HIV y δ HIVTARless sea igual que en el silvestre apoya la hipótesis de que la RNAPolIII acumulada en el extremo 5' de δ HIV esté pausada pero no arrestada. En una situación de arresto, la RNAPolIII retrocede sobre el molde de DNA y el mRNA naciente se desacopla del sitio catalítico (Kettenberger et al., 2004). En estas condiciones TFIIIS (Dst1) se convierte en un factor esencial para que la maquinaria transcripcional retome la síntesis del mensajero (Adelman et al., 2005). Por ello, de darse una situación de arresto, la ausencia de TFIIIS debería disminuir la expresión de δ HIV, mientras observamos que en *dst1* Δ los niveles de mRNA de δ HIV y δ HIVTARless no se ven afectados.

4.2.3 Dos mecanismos distintos producen la pausa de la RNAPolIII: contribución de la estructura del mRNA TAR y papel de Spt4 en la expresión de δ HIV y δ HIVTARless.

Las pausas de las RNA polimerasas durante la transcripción es un fenómeno universal observado tanto en procariontes como en eucariotes (Adelman et al., 2005; Krumm et al., 1992) (Borukhov et al., 2005), (Gnatt, 2002). Este proceso depende de la estabilidad del complejo de elongación compuesto, en sus mínimos términos, por el molde de DNA, la RNA polimerasa y la molécula naciente de RNA. Según un modelo matemático desarrollado por Bai *et al.* (Bai et al., 2004) las características intrínsecas de la secuencia transcrita constituyen el parámetro principal a la hora de determinar este valor. Bajas concentraciones de ribonucleótidos aumentan la frecuencia con la que ocurre la pausa (Kireeva et al., 2005). Estudios *in vivo* (Toulme et al., 2005) e *in vitro* (Artsimovich y Landick, 2000) en *Escherichia coli* han

definido dos tipos de mecanismos que contribuyen al establecimiento de la pausa: uno dependiente de la formación de una horquilla en la molécula de RNA naciente y otro debido a la propensión de la RNAPolIII a retroceder a lo largo del molde de DNA cuando disminuye la estabilidad del complejo de transcripción.

El dominio de RNA TAR se caracteriza por una estructura secundaria muy estable y la pausa de la RNAPolIII durante la transcripción del HIV-1 en células humanas ocurre en posición 3' con respecto a este dominio (Parada et al., 1995). Un estudio *in vitro* ha caracterizado el tipo de estructura secundaria del mRNA que se genera en las situaciones de pausa y que aumenta su duración (Palangat et al., 1998). Toulmé y sus colaboradores (Toulme et al., 2005) han observado que la presencia de una horquilla en la molécula de RNA naciente impide la retrocesión de la enzima sobre el molde de DNA y al mismo tiempo disminuye la capacidad de la RNAPolIII de avanzar sobre el molde. Esto es debido probablemente a interacciones que se establecen entre la horquilla y la RNAPolIII que estabilizan el complejo de transcripción. Los autores han demostrado que este mecanismo depende de la estructura secundaria del RNA.

La disminución de la acumulación de mRNA de δ HIV con respecto a δ HIVTARless y la acumulación de RNAPolIII en el extremo 5' de la región transcrita de δ HIV pueden estar originadas por una pausa de la RNAPolIII favorecida por interacciones entre ésta y la estructura de RNA en el extremo 5', como sugiere el resultado del estudio de la expresión de δ HIVTARmut. Hemos mutado el brazo 3' del tallo de TAR con el objetivo de aumentar la estabilidad de la horquilla alternativa que se genera durante la pausa de la enzima en esta región (Palangat et al., 1998) y eliminar la formación de una horquilla completa de la misma longitud de TAR que produciría un desplazamiento de la RNAPolIII de 18 nucleótidos hacia el extremo 3' del DNA de HIV-1 en una zona donde no se ha detectado la pausa (Palangat et al., 1998). Hemos observado que la expresión de la unidad transcripcional que

llevaba el TAR mutado (δ HIVTARmut) disminuye un 50% con respecto a la construcción que lleva el TAR silvestre. Este resultado sugiere que el mecanismo de pausa dependiente de RNA demostrado, en el caso del HIV-1 por un estudio *in vitro* (Palangat et al., 1998), produce también una disminución de la expresión en la levadura. Para confirmar esta hipótesis es necesario profundizar en la relación entre estructura del mRNA y transcripción, estudiando distintos tipos de mutaciones del dominio TAR y sus efectos sobre la expresión del virus y la distribución de la RNAPolIII a lo largo del genomio viral.

Cabe destacar que en el mutante *spt4* Δ los valores de acumulación de mRNA de δ HIVTARmut aumentan de forma proporcional al incremento observado con δ HIV, indicando que la inhibición de la transcripción de HIV ocurre también por un mecanismo dependiente de Spt4 que no se ve afectado por la modificación de la estructura secundaria de TAR.

4.3 Análisis genético de HIV-1 en mutantes de *S. cerevisiae*

Hemos llevado a cabo un análisis genético con varios factores transcripcionales en el intento de aclarar la naturaleza del efecto negativo producido por el extremo 5' de la región transcrita de la LTR del HIV-1 sobre la expresión del genomio viral en la levadura y hemos observado cuatro tipos de comportamiento en función de la mutación ensayada. En la tabla 3 hemos agrupado los genes según los patrones de expresión de δ HIV y δ HIVTARless observado en las respectivas cepas mutantes

Tabla 3. Resumen del análisis genético

GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4
Patrón silvestre	Variaciones proporcionales de δ HIV y δ HIVTARless	δ HIV y δ HIVTARless se igualan en niveles bajos	δ HIV aumenta, δ HIVTARless no varía
<i>RPD3</i>	<i>SPT2</i>	<i>SPT8</i>	<i>SPT4</i>

<i>DST1</i>	<i>ISW1</i>	<i>PAF1</i>	<i>SPT6</i>
<i>LEO1</i>	<i>IOC2</i>	<i>RTF1</i>	<i>SPT16</i>
	<i>GCN5</i>	<i>CTK1</i>	<i>H2A-H2B</i>
	<i>SPT3</i>	<i>BUR2</i>	<i>CHD1</i>
		<i>IOC3</i>	
		<i>IOC4</i>	

4.3.1 Grupo1: factores que no influyen en la expresión de δ HIV y δ HIVTARless

En el primer grupo hemos incluido los genes que no alteran los patrones de expresión de las unidades transcripcionales δ HIV y δ HIVTARless con respecto al silvestre. Deducimos por ello que la transcripción del HIV-1 en la levadura no es dependiente de los factores codificados por estos genes.

Entre los genes que no afectan la expresión de δ HIV y δ HIVTARless está Rpd3, la subunidad catalítica de los complejos de desacetilación de histonas RPD3 (L) y RPD3 (S) (Lieb and Clarke, 2005). La inhibición de la desacetilación por drogas como TSA estimula la actividad basal del LTR (Verdin et al., 1993), (el Kharroubi et al., 1998) indicando que la cromatina posicionada en el genomio viral de células quiescentes debe de estar desacetilada. Tat, entre sus funciones, tiene la de aumentar el grado de acetilación de los nucleosomas que acompaña a la remodelación de la cromatina en el extremo 5' transcrito. Nuestros resultados descartan que las diferencias de expresión entre δ HIV y δ HIVTARless dependan de estos mecanismos.

TFIIS es un factor que cumple un papel central cuando la pausa de la RNAPolIII se transforma en un arresto. En esta condición la RNAPolIII desliza sobre el molde de DNA en dirección 5' causando el desacoplamiento del mRNA naciente del sitio catalítico de la enzima (Kettenberger et al., 2004). TFIIS estimula la actividad endonucleolítica de la RNAPolIII produciendo el

corte del fragmento de mRNA que es necesario eliminar para que la enzima pueda reanudar la síntesis del mensajero (Izban and Luse, 1991). La función de este factor es necesaria para restablecer la transcripción *in vitro* de RNA polimerasas arrestadas ante un nucleosoma (Kireeva et al., 2005). En el caso de HIV, TFIIS también es necesario para suprimir la inhibición que sufre la RNAPolIII en la región TAR en el sistema *in vitro* descrito por Palangat *et al.* (1998). En otros sistemas cuya expresión está regulada a nivel de la elongación, como el gen *hsp70* de *Drosophila*, la RNAPolIII se encuentra acumulada aguas abajo del promotor y la activación de la transcripción tras la inducción por choque térmico depende de TFIIS (Adelman et al., 2005). Los autores concluyen que la RNAPolIII sufre un bloqueo en la fase temprana de la elongación que no solo afecta la actividad del complejo de elongación ya ensamblado sobre el DNA sino también la formación de nuevos complejos de preiniciación en el promotor. Como hemos comentado anteriormente, la expresión de δ HIV y δ HIVTARless no se ve afectada por la ausencia de este factor sugiriendo que la RNAPolIII acumulada en el extremo 5' de p δ HIV no sufre un bloqueo. La función de TFIIS *in vivo* se hace patente cuando la transcripción está afectada por falta de nucleótidos (Mason and Struhl, 2005), condición en la que una pausa de la RNAPolIII se transforma con más frecuencia en un arresto. Varios parámetros favorecen esa transición: la duración de la pausa, la disponibilidad de nucleótidos y la organización cromatínica (Kireeva et al., 2005). La presencia de nucleosomas no parece determinar el sitio de pausa, pero sí aumenta su intensidad favoreciendo el arresto de la RNAPolIII (Kireeva et al., 2005). El mecanismo por el que una pausa se transforma en un bloqueo estable de la RNAPolIII consiste en el deslizamiento de la enzima sobre el molde de DNA, lo que provoca el desacoplamiento del extremo 3' del mRNA del sitio catalítico de la RNAPolIII. Kireeva y sus colaboradores (2005) han demostrado que en un sistema *in vitro* el desplazamiento de la enzima llega a ser muy pronunciado cuando un nucleosoma se encuentra posicionado aguas abajo de la región de pausa. La RNAPolIII pausada presenta una tendencia intrínseca a deslizarse hacia atrás

sobre el molde de DNA debido a su estructura y a la escasa estabilidad que caracteriza el complejo transcripcional pausado. Los autores especulan que en estas condiciones un nucleosoma posicionado en 3' ejerce, por su afinidad al DNA, una fuerza que, sumada a la propensión de la RNAPolIII a retroceder sobre el molde, desplaza la enzima varias pares de bases hacia el extremo 5' del DNA y desacopla el mRNA naciente del sitio catalítico. La enzima depende de factores accesorios, como TFIIS, para reanudar la síntesis de mRNA su procesividad.

Era nuestra intención estudiar el efecto de esta droga sobre la expresión de δ HIV y δ HIVTARless en el mutante *dst1* Δ en presencia de 6-AU, para comprobar si la acumulación de RNAPolIII que atribuimos a una pausa se hubiese convertido en un arresto. Sin embargo, la activación de la expresión del promotor δ en presencia de 6-AU, según hemos detectado, impide estudiar la dependencia de la transcripción de δ HIV respecto de TFIIS en una condición, la escasez de nucleótidos, que la podría haber hecho más patente.

Otra mutación que no produce efecto sobre la expresión de δ HIV δ HIVTARless es *leo1* Δ . Leo1 es una subunidad del complejo PAF1, por ello discutiremos los resultados de este mutante conjuntamente a los de *paf1* Δ y *rff1* Δ .

4.3.2 Grupo2: factores que alteran la intensidad de la expresión de δ HIV y δ HIVTARless

El segundo grupo de genes se caracteriza por el hecho que su mutación varía la expresión de δ HIV y δ HIVTARless de forma proporcional con respecto al silvestre isogénico. Esto significa que el valor de la acumulación de los mRNA de δ HIV y δ HIVTARless puede ser mayor o menor con respecto al silvestre pero el cociente entre ellos no se ve afectado. Este patrón podría coincidir con mutaciones que afectan a la iniciación de la transcripción y al funcionamiento general del promotor δ . En este grupo de hecho encontramos factores que preferentemente han sido relacionados con esta fase de la

transcripción y, en la mayoría de los casos, con la regulación de la expresión de los retrotransposones. Alternativamente podrían afectar procesos que influyen sobre la acumulación de mRNA, pero que ocurran de forma similar en δ HIV y δ HIVTARless: elongación transcripcional de la región transcrita distal, modificaciones del mRNA, estabilidad de esto.

La eliminación de Gcn5 y Spt3 causa una disminución de la expresión de δ HIV y δ HIVTARless de forma paralela. Ambas proteínas son subunidades de SAGA, un complejo de acetilación de histonas que actúa a nivel del promotor y promueve la activación de la transcripción. El patrón observado concuerda con lo esperado para factores involucrados en la regulación de la iniciación cuya función además es necesaria para la expresión de los Ty1 (Pollard and Peterson, 1997) (Morillon et al., 2002). Sin embargo, *spt8* Δ , que carece de otra subunidad de SAGA, presenta un patrón transcripcional distinto a los anteriores genes y parecido a aquellos mutantes que carecen de factores implicados en la regulación de la elongación temprana como Ctk1, Bur2, Paf1, Rtf1 e loc4 (grupo 4). Spt8, de hecho, presenta algunas peculiaridades que lo diferencian de los demás componentes de SAGA y que apunta a un posible papel de esta proteína en un proceso distinto de los que llevan a cabo otras subunidades del complejo. Spt8 interactúa física y genéticamente con TFIIIS (Wery et al., 2004). Único entre todos los genes no esenciales que codifican subunidades de SAGA, *spt8* Δ se comporta de la misma forma que *dst1* Δ en un fondo *rpb9* Δ y, en ausencia de la subunidad Rpb4 de la RNAPolIII, la transcripción depende de la actividad de TFIIIS y de su interacción con Spt8 (Wery et al., 2004). En nuestro laboratorio se ha puesto a punto el ensayo GLAM (GeneLength-dependent Accumulation of mRNA) para analizar el efecto de mutaciones sobre la dependencia de la transcripción *in vivo* respecto de la longitud de la región transcrita (Morillo-Huesca et al., 2006). El GLAM es un ensayo que se basa sobre la cuantificación de la actividad transcripcional sobre distintas construcciones que comparten el promotor, el terminador, y el gen informador que codifica el extremo 5' del transcrito, pero difieren en la longitud de la región 3' no traducida. Este sistema permite poner en evidencia

defectos dependientes de la longitud del transcrito. Por el contrario, las unidades transcripcionales δ HIV y δ HIVTARless presentan una longitud muy parecida y sólo difieren en un pequeño fragmento en el extremo 5' que representa en 10% de la longitud total. Por ello pensamos que estas construcciones son un instrumento adecuado para evidenciar defectos transcripcionales que ocurren en la transición entre la salida del promotor y la elongación temprana. Los ensayos de GLAM han evidenciado un comportamiento muy similar de los mutantes *gcn5* Δ y *spt3* Δ que presentan un defecto en la transcripción de unidades largas (Morillo-Huesca et al., 2006), lo que les otorga un papel a lo largo de toda la unidad transcripcional. El mutante *spt8* Δ , sin embargo, presenta un comportamiento más próximo al silvestre en los ensayos GLAM (Quintero, Rodríguez-Gil, Chávez, en preparación).

A la luz de estos resultados es muy sugerente que *spt8* Δ genere un patrón de expresión de δ HIV y δ HIVTARless más parecido a mutantes de factores implicados en la elongación temprana como *paf1* Δ , *ctk1* Δ y *bur2* Δ . Tomados en conjunto estos resultados muestran a SAGA implicado en la elongación temprana a través de Spt8 y en fases posteriores a través de Gcn5 y Spt3.

Otro mutante que afecta en igual medida la expresión de δ HIV y δ HIVTARless es *spt2-150*. *SPT2* es un gen cuya función en la iniciación de la transcripción ha sido inferida por su papel en la supresión de la inserción de Ty o del elemento δ en el promotor del gen *HIS4* (Winston et al., 1984), así como en la supresión de los defectos de iniciación observada en mutantes del complejo Swi/Snf (Sternberg et al., 1987) o SAGA (Perez-Martin and Johnson, 1998; Pollard and Peterson, 1997). Recientemente se ha descrito que *SPT2* interactúa genéticamente con el complejo PAF1, que se localiza preferentemente en la zona transcrita de varios genes y que su eliminación permite la transcripción a partir de sitios de iniciación crípticos en el gen *FLO8* (Nourani et al., 2006). El conjunto de estas observaciones apunta a un papel de Spt2 durante la elongación de la transcripción, en concreto en el mantenimiento de la cromatina de la región transcrita, lo que requiere una

revisión del modelo anteriormente aceptado. En todo caso, nuestros resultados excluyen que Spt2 juegue un papel en la modulación de la transcripción ejercida por el extremo 5' de la región transcrita de HIV. Los patrones de expresión de δ HIV y δ HIVTARless en *spt2-150*, lo asemejan a factores transcripcionales implicados en la iniciación o en la elongación a todo lo largo de la región transcrita, pero no específicamente en la elongación temprana. Nuestros resultados alejan a Spt2 de los factores de elongación con los que ha sido relacionado, como Paf1 y Spt6 (Nourani et al., 2006).

Los mutantes *lsw1 Δ* e *loc2 Δ* también pertenecen a este grupo en el que se ven afectada por igual la expresión de δ HIV y δ HIVTARless, aunque en este caso la acumulación de mRNA aumenta en ausencia de estos factores.

Isw1 es la subunidad común a los complejos remodeladores de cromatina ISW1a e ISW1b (revisado por (Mellor and Morillon, 2004)). Isw1 controla distintas etapas de la transcripción en función de las subunidades a las que se une. ISW1a, constituido por *lsw1* e *loc3*, regula negativamente la iniciación actuando sobre la estructura de la cromatina en el promotor (Morillon et al., 2003). ISW1b, integrado por *lsw1*, *loc2* e *loc4*, regula y acopla la elongación a la maduración del mRNA y a la terminación de la transcripción (Morillon et al., 2003). Isw1 junto a Isw2, ejerce un efecto inhibitorio sobre los Ty1. Estas proteínas actúan favoreciendo una organización de la cromatina en las regiones promotoras, lo que produce la represión de varios genes, entre ellos los Ty1 (Kent et al., 2001) (Morillon et al., 2003); (Xella et al., 2006)). En el mutante, el gen que codifica la tercera subunidad de ISW1b, observamos que los niveles de acumulación mRNA de δ HIV y δ HIVTARless se igualan. La presencia del gen *IOC2* e *IOC4* en grupos diferentes es aparentemente sorprendente ya que nos esperaríamos el mismo comportamiento para genes que codifican subunidades del mismo complejo (ISW1b). Sin embargo, un estudio ha puesto en evidencia diferencias entre la función de estos dos factores (Morillon et al., 2003), *loc2* posee un efecto negativo sobre la transcripción, aumentando la propensión de la RNAPolIII pausada en el extremo 5' transcrito a disociarse del molde de DNA, mientras *loc4*, junto a

Spt4, ejercería un papel opuesto. Morillon *et al.* (Morillon *et al.*, 2003) proponen un modelo en el que *loc4* y Spt4 ejercen un papel positivo sobre la transcripción opuesto a la tendencia de *loc2* a aumentar la estabilidad de la pausa en 5'. La suma de estos efectos permite una distribución de la RNAPolIII compatible al correcto desarrollo de los procesos que ocurren de forma cotranscripcional. A pesar de que *loc4* y Spt4 actúen conjuntamente en una fase de la transcripción, los patrones de expresión de estos mutantes son distintos. Esto podría ser debido a que *ioc4Δ* presenta una fuerte disminución del grado de fosforilación de la Ser2 del CTD y del reclutamiento de factores dedicados a la terminación de la transcripción, defectos que no presenta *spt4Δ* (Morillon *et al.*, 2003).

ioc3Δ presenta un patrón muy parecido a *ioc4Δ*, aunque se ha demostrado que pertenecen a dos complejos distintos que comparten su subunidad catalítica, *lsw1* (Vary *et al.*, 2003). En *ioc3Δ* la acumulación de mRNA de δ HIV aumenta casi el doble con respecto al silvestre mientras en δ HIVTARless este valor es inferior con respecto al silvestre. ISWIa (*lsw1-loc3*) contribuye a la represión de la transcripción de genes inducibles en condiciones de no activación. (Mellor and Morillon, 2004). Se ha observado, de hecho, que en *ioc3Δ* la distribución de la RNAPolIII a lo largo del gen *MET16* en presencia de metionina (estado no activado) sigue el mismo patrón observado en la inducción del gen. (Morillon *et al.*, 2003). Los datos pertenecientes al papel del gen *IOC3* en la bibliografía son escasos y no nos permiten explicar de forma sencilla el patrón de expresión de δ HIV y δ HIVTARless en *ioc3Δ*, aunque es probable que sea debido a un mecanismo de acción distinto del de *IOC4*.

En todo caso, el hecho de que las mutaciones *ioc3Δ* e *ioc4Δ* afectan de forma más intensa a la expresión de δ HIV y δ HIVTARless que a δ HIV, sugiere que los complejos ISWI no intervienen en la remodelación del nucleosoma posicionado en el extremo 5' de la región transcrita de HIV durante la transcripción basal.

4.3.3 Grupo 3: factores que anula la diferencia de expresión entre δ HIV y δ HIVTARless

En el tercer grupo encontramos genes cuyas mutaciones producen variaciones en el patrón de expresión de δ HIVTARless o de ambas unidades transcripcionales de forma que los valores de acumulación de mRNA se igualan y el cociente entre ellos se acerca a 1. Hay que destacar que las mutaciones en este grupo afectan en mayor medida a la expresión de la unidad transcripcional δ HIVTARless.

Entre ellos encontramos dos subunidades de los complejos Bur1-Bur2 y CTDK1 que llevan a cabo en la levadura funciones similares a las de P-TEFb. En los experimentos realizados con GAL1-HIV observamos que Cdk9 y especialmente hCycT1 junto a Tat aumentan la expresión de HIV-1 en la levadura. La ausencia de sus homólogos en la levadura produce una disminución de la expresión tanto de δ HIV como de δ HIVTARless. Este patrón probablemente es debido a un defecto de la elongación de la transcripción generalizado que actúa en un nivel superior al efecto negativo ejercido por el extremo 5' de la región transcrita de HIV. Un patrón de expresión muy similar se ha observado en el mutante *paf1* Δ , otro gen implicado en la elongación de la transcripción que presenta un fenotipo de crecimiento muy severo.

Hemos ensayado otros mutantes del complejo Paf1 obteniendo resultados distintos. Rtf1, subunidad que según varios datos genéticos (Costa and Arndt, 2000) (Squazzo et al., 2002), lleva a cabo funciones distintas a Paf1 en el complejo, presenta un patrón de expresión intermedio entre el de *paf1* Δ y el de los mutantes del grupo 4, donde también encontramos genes, como *CHD1*, *SPT6* y *SPT4* con los que RTF1 interactúa genéticamente (Squazzo et al., 2002) (Costa and Arndt, 2000).

Leo1 es otra subunidad del complejo Paf1 cuya función está todavía por aclarar. A diferencia de otras de las subunidades del complejo, su eliminación no produce un fenotipo evidente en la célula pero suprime parte de los efectos del mutante *paf1* Δ (Betz et al., 2002; Mueller and Jaehning, 2002). La

expresión de las unidades transcripcionales δ HIV y δ HIVTARless no se ve afectada en el mutante *leo1* Δ .

spt8 Δ , como previamente hemos comentado, presenta un patrón transcripcional también parecido a los anteriores mutantes. A diferencia de ellos, Spt8 es una subunidad de un complejo involucrado en la regulación de la iniciación (SAGA), aunque algunos estudios han descrito interacciones físicas y genéticas de subunidades de SAGA con factores de elongación (Prather et al., 2005b) (Pray-Grant et al., 2005) (Wery et al., 2004), que amplían las funciones tradicionalmente asignadas a este complejo.

Los resultados obtenidos con estos mutantes son en cierta medida coherentes con trabajos que han demostrado la existencia de una relación entre el complejo Bur1-Bur2, el complejo Paf1 y la metilación de histonas. (Daniel et al., 2004; Wood et al., 2003; Wood et al., 2005; Xiao et al., 2005a). La metilación de histonas por el complejo COMPASS es una modificación que presenta la cromatina de genes activamente transcritos (Morillon et al., 2005) y está subordinada a la monoubiquitinación de las histonas H2B por el complejo Rad6-Bre1 (Dover 2002). Bur1-Bur2 fosforilan Rad6 y esta modificación activa la subunidad catalítica Bre 1 (Wood et al., 2005). El complejo Paf1 es necesario para el reclutamiento de COMPASS y de Rad6-Bre1 (Wood et al., 2003) a la zona transcrita mediando la unión del complejo de monoubiquitinación a la RNAPolIII, lo que a su vez depende de la hiperfosforilación del CTD. (Xiao et al., 2005a)

Bur2 y Paf1, de forma directa, y Ctk1, de forma indirecta, a través de la fosforilación del CTD, regulan la ubiquitinación de H2B y la subsiguiente metilación de la histona H4, modificaciones que están asociadas a la cromatina de genes activamente transcritos (Zhang et al., 2005). Es de interés destacar que la ausencia de estos factores afecta en mayor medida a la expresión de δ HIVTARless, sugiriendo que en δ HIV opera un mecanismo negativo que prevalece sobre la actividad de estos factores. Como se ha discutido antes, ese mecanismo negativo parece estar mediado por las estructuras de RNA del dominio TAR. No conocemos sin embargo la existencia de relaciones

funcionales directas entre las estructuras de RNA que inhiben al RNAPolIII y los factores que dirigen la hiperfosforilación del CTD o la ubiquitinización-metilación de la cromatina durante la elongación temprana. Otra componente del efecto negativo que el extremo 5' de la región transcrita de HIV ejerce sobre la transcripción parece deberse a la existencia de un nucleosoma posicionado sobre dicha región, como se discutirá más adelante. El posicionamiento translacional de un nucleosoma podría antagonizar directamente la actividad de los complejo Rad6-Bre1 y COMPASS sobre la cromatina. La bibliografía existente no recoge datos a este respecto. Alternativamente, el nucleosoma posicionado podría impedir la salida de la RNAPolIII de la pausa favorecida por la estructura del extremo 5' transcrito del RNA, impidiendo ello la hiperfosforilación del CTD y las subsiguientes modificaciones de cromatina desencadenadas por el complejo Paf1. Por último, cabe posibilidad de que el nucleosoma posicionado no impida la fosforilación del CTD y las modificaciones covalentes propias de la cromatina transcrita, pero que sí impida el avance de la RNAPolIII en ausencia de factores específicos de remodelación.

4.3.4 Grupo 4: factores que influyen negativamente en la expresión de δ HIV

En el cuarto grupo está constituido por mutantes cuyo único efecto es un aumento de los niveles de expresión de δ HIV. Por ello, deducimos que el efecto negativo sobre la transcripción del HIV-1 generado por el extremo 5' a partir de TAR depende de los genes afectados en estos mutantes. Se ha demostrado para todos ellos su implicación en el control de la organización de la cromatina en la zona transcrita, excluyendo Spt4, para el que existen una serie de datos que apoyan este papel. El efecto negativo del extremo de la región 5' transcrita del HIV requiere de la presencia de Spt4, ya que un mutante *spt4* Δ no afecta a la expresión de δ HIV^{TARless} pero aumenta los niveles de δ HIV.

Spt4 es una de las dos subunidades que en células humanas constituyen DSIF. Este complejo ejerce un efecto negativo sobre la transcripción de HIV-1, también, mediado por NELF y contrarrestado por la acción de P-TEFb y Tat (Wada et al., 1998a), (Kim and Sharp, 2001), (Renner et al., 2001). La pausa inducida por Spt4/Spt5 en las primeras fases de la elongación está relacionada con el procesamiento del extremo 5' del pre-mRNA, Spt5 interactúa con la maquinaria de capping (Pei et al., 2003) y Tat favorece el procesamiento del mRNA (Chiu et al., 2002). El estudio del sistema transcripcional del virus se convertido en un instrumento muy valioso para el estudio del efecto negativo sobre la transcripción que ejerce DSIF, sin embargo, en los últimos años, se ha demostrado que este complejo también actúa como un factor positivo sobre la elongación *in vitro* (Rondon et al., 2003) y en el mantenimiento de la tasa de elongación de la RNAPolIII (Mason and Struhl, 2005). La dualidad de la función de este factor podría ser compatible con la ausencia de homólogos de NELF en la levadura. El mecanismo de acción de NELF en el establecimiento de la pausa mediada por DSIF, no es una prerrogativa de la regulación de la transcripción de HIV-1 (Wu et al., 2005), (Wu et al., 2003), (Narita et al., 2003) y se extiende a otros genes eucarióticos. La pausa de la RNAPolIII *in vivo* en el extremo 5' de genes transcritos no está completamente demostrada en la levadura aunque hay pruebas que indican que el silenciamiento génico puede llevarse a cabo en *S. cerevisiae* por un mecanismo independiente de la iniciación de la transcripción y compatible con la presencia de RNAPolIII pausadas en el extremo 5' del gen (Sekinger and Gross, 2001). En células humanas DSIF actúa como un factor negativo y se convierte en un factor positivo de forma dependiente de la fosforilación de Spt5 por parte de PTEF-b en un dominio homólogo al CTD de la RNAPolIII (Yamada et al., 2006). Nuestros resultados sugieren que, al menos en determinados entornos transcripcionales, el complejo Spt4-Spt5 actúe como factor negativo.

SPT5 interactúa genéticamente con *SPT6* y *SPT16* (Lindstrom and Hartzog, 2001), y las proteínas codificadas por estos genes colocalizan en el cromosoma politénico de *Drosophila* (Saunders et al., 2003). Los autores han

demostrado que las tres proteínas se reclutan rápidamente al gen *hsp70* de *Drosophila* tras la activación (Andrulis et al., 2000). Este gen se caracteriza por la presencia de una cromatina establemente posicionada en el extremo 5' y por la presencia de una RNAPolIII acumulada en esa zona (Adelman et al., 2005). Estos factores están relacionados tanto por su función (Bortvin and Winston, 1996; Orphanides et al., 1998) como por su localización y por su regulación temporal (Saunders et al., 2003), con la remodelación de la cromatina y la activación de la transcripción de este gen. Dos funciones han sido atribuidas a Spt6 y FACT (Spt16 y Pob3) en la elongación de la transcripción. En genes inducibles, Spt6 y Spt16 eliminarían el obstáculo que supone la presencia de cromatina establemente posicionada al paso de la RNAPolIII; se piensa que el reposicionamiento de la cromatina sobre el DNA durante la elongación pueda ser llevado a cabo asimismo por Spt6 y FACT (Orphanides et al., 1998), 1998(Formosa et al., 2002) y por Chd1 (Robinson and Schultz, 2003). El reposicionamiento de los nucleosomas constituiría un impedimento al paso de la maquinaria transcripcional en los siguientes ciclos de transcripción. En genes inducibles el elevado grado de expresión que caracteriza este tipo de genes y que se refleja en una elevada densidad de RNAPolIII en la zona transcrita (Kristjuhan and Svejstrup, 2004) dificultaría de por sí el reposicionamiento de nucleosomas. Sin embargo en genes que se expresan de forma constitutiva a un nivel más bajo, la densidad de la maquinaria transcripcional sí permitiría de forma efectiva el reensamblaje de histonas en la región codificante del gen Kaplan *et al.* (Kaplan et al., 2003) han demostrado que varios alelos mutantes de *SPT6* y *SPT16* causan la pérdida de cromatina establemente posicionada en la región transcrita de genes constitutivos de forma dependiente de la transcripción. El efecto observado en la transcripción de δ HIV y δ HIVTARless por las mutaciones de *SPT6* y *SPT16* es compatible con este modelo y sugiere que el extremo 5' íntegro presente en la construcción p δ HIV favorece una estructura cromatínica más estable con respecto al extremo 5' de δ HIVTARless. Kaplan *et al.* (2003) también demostraron que en ciertos genes, las mutaciones *spt6* y *spt16* causan la

activación de sitios de iniciación crípticos como consecuencia de la falta de reposicionamiento de la cromatina durante la transcripción. En nuestro caso no hemos detectado nuevos transcritos en estos mutantes ni en δ HIV ni en δ HIVTARless.

Otro mutante que presenta niveles aumentados de δ HIV es *chd1* Δ . Chd1 es un factor remodelador de histonas (Robinson and Schultz, 2003; Xella et al., 2006) dependiente de ATP (Tran et al., 2000) que interactúa con varios factores de elongación, como Rtf1, Spt5, y Pob3 y que se une a cromatina en la región codificante de genes activamente transcritos (Simic et al., 2003). Actualmente se atribuye a Chd1 un papel en la regulación de la elongación. Robinson et al. (Robinson and Schultz, 2003) han demostrado un defecto dependiente de Chd1 en las interacciones entre DNA e histonas *in vitro*. Xella et al. (2006) han observado en *chd1* Δ una alteración del posicionamiento de cromatina *in vivo* en la región transcrita del gen *ADH2*. En este escenario es coherente que *chd1* Δ presente el mismo patrón de expresión de δ HIV y δ HIVTARless que los alelos mutantes de *SPT6* y *SPT16*.

La eliminación del locus *HTA1-HTB1* y la consiguiente disminución de la dosis de histonas H2A-H2B, también origina niveles mayores de expresión de δ HIV. Spt6 interactúa con las histonas H3 y H4 (Bortvin, 1996), FACT con el dímero H2A-H2B (Orphanides et al., 1998; Orphanides et al., 1999) (Formosa et al., 2002) y Chd1 con la histona H3 dimetilada en la Lys-4 consecuencia de la acción de COMPASS (Pray-Grant et al., 2005). La disminución de la dosis de histonas produciría una desestabilización de la cromatina, lo que reduciría el efecto inhibitorio del nucleosoma sobre la transcripción (Kireeva et al., 2002). Es de esperar por tanto que la disminución de la dosis de histonas mimetiza la falta de reposicionamiento de nucleosomas esperada en mutantes de complejos de remodelación de cromatina que actúan durante la elongación. En *hta1* Δ -*htb1* Δ se produce de hecho un patrón de expresión de δ HIV y δ HIVTARless muy parecido al observado en *spt4* Δ , *spt6* 140, *spt16*-197 y *chd1* Δ . Este resultado sugiere que la expresión de δ HIV se modula durante la

elongación temprana la transcripción a través de un mecanismo dependiente de la presencia estable de nucleosomas en la zona 5' de la región transcrita.

4.4 Contribución del posicionamiento de nucleosomas a la regulación de la elongación transcripcional temprana de HIV.

El mapeo de nucleosomas en δ HIV y δ HIVTARless ha puesto de manifiesto una diferencia sustancial entre la organización de la cromatina del extremo 5' de las regiones transcritas de las unidades transcripcionales. En concreto hemos observado que en p δ HIV el extremo 5' está protegido por un nucleosoma establemente posicionado mientras en p δ HIVTARless el primer nucleosoma posicionado en la zona codificante se encuentra aproximadamente 80 pb desplazado hacia el extremo 3'. En la figura se representa de forma esquemática la organización de la cromatina en δ HIV y δ HIVTARless, según los resultados de este estudio, comparándola con la organización de la cromatina de la misma región del genoma de HIV-1 integrado en células humanas (Verdin et al., 1993).

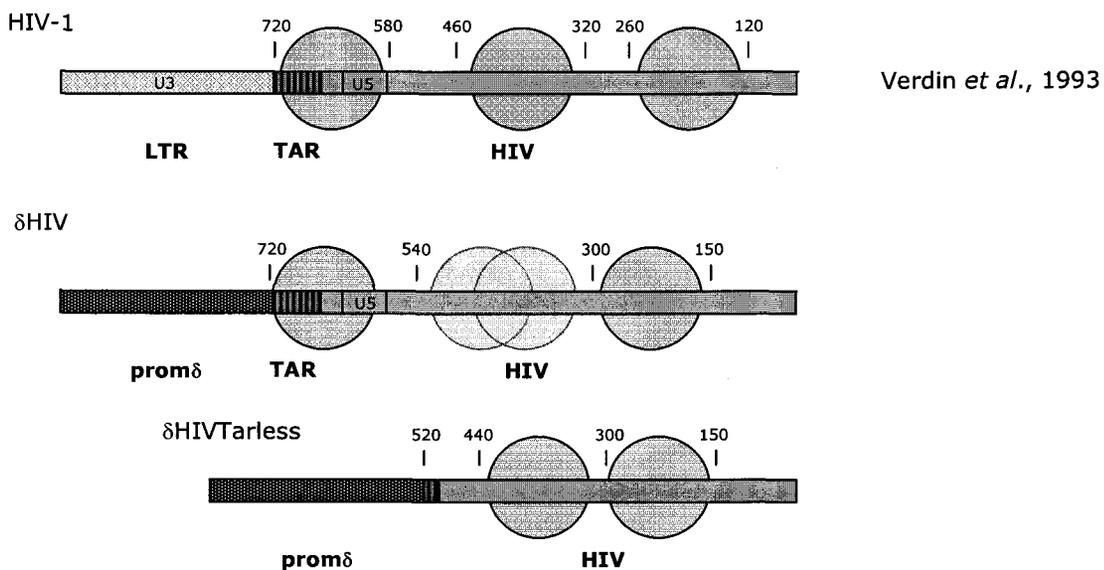


Figura 20. Organización de la cromatina en HIV-1, δ HIV y δ HIVTARless. Esquema del posicionamiento de nucleosomas (círculos grises) en el genoma de HIV-1 integrado en células humanas (Verdin et al., 1993) y en el fragmento de HIV clonado en p δ HIV y p δ HIVTARless según los resultados del mapeo de nucleosomas por "indirect end labeling". La posición de los nucleosomas se indica en pb tomando como referencia el extremo 3' del fragmento de HIV clonado en δ HIV y δ HIVTARless.

Como se puede observar, la región TAR, que coincide con el inicio de la transcripción, y la mayoría de la región U5 de la LTR viral están protegidas por un nucleosoma establemente posicionado tanto en el extremo 5' del genomio del HIV-1, como en δ HIV. La región intermedia no presenta una similitud evidente, ya que el posicionamiento de un nucleosoma en esta zona de la unidad transcripcional δ HIV es bastante dudosa. El siguiente nucleosoma posiciona en zonas que solapan en amplia medida en las dos secuencias.

La activación del promotor de HIV-1 inducida por TPA, produce una reorganización drástica de la cromatina en el extremo 5' del virus integrado que se refleja en la aparición de una zona de hipersensibilidad a la MNasa y a la DNAasa I (Verdin et al., 1993). Queremos destacar que p δ HIVTARless presenta un patrón de posicionamiento de cromatina muy parecido al del virus en condiciones de activación de la transcripción que se caracteriza por tener el extremo 5' desprotegido. Varios estímulos pueden generar un aumento de la transcripción de HIV-1, aunque el nivel final alcanzado sea de distinta magnitud: entre ellos recordamos la hiperacetilación de histonas inducida por drogas como TSA, la integración del virus en un entorno cromatínico más laxo (Jordan et al., 2001) y sobre todo la transactivación de la expresión mediada por Tat. Diversos estudios han demostrado que, en respuesta a estos estímulos y de forma independiente de la transcripción (Verdin et al., 1993), tiene lugar la remodelación del nucleosoma en 5' y se produce un aumento de la expresión del virus (el Kharroubi and Martin, 1996; el Kharroubi et al., 1998). Estos trabajos indican que el aumento de la accesibilidad a nucleasas de la zona 5' del HIV correlaciona fuertemente con la activación de la transcripción del HIV-1.

El papel de TAR en la transactivación mediada por Tat, el tipo de interacciones que involucran el dominio de RNA con la proteína viral y el complejo P-TEFb, y los requisitos para que el dominio TAR sostenga la activación de la transcripción mediada por Tat están exhaustivamente caracterizados. El papel de la región 5' en la transcripción basal está menos estudiado y los datos disponibles son escasos y en algunos casos

contradictorios. Un estudio llevado a cabo en células COS en condiciones de transfecciones transitorias demostró que la casi total eliminación de TAR no producía un aumento de la transcripción basal y como era de esperar suprimía la activación de la transcripción en presencia de Tat (Hauber and Cullen, 1988). Selby *et al* (Selby et al., 1989) demostraron que en la misma línea celular la expresión de HIV-1 en ausencia de Tat aumentaba de 3 a 5 veces cuando se eliminaba una región de TAR que incluía el sitio de unión de Tat al RNA o el tallo entero de TAR. Berkhout y Jeang (Berkhout and Jeang, 1991) describieron una mutación que afectaba la estructura secundaria del tallo en la parte inferior y que impedía la replicación del virus integrado en células T humanas. En transfecciones transitorias con un plásmido que llevaba el TAR mutante bajo la LTR viral observaron que la transactivación por Tat alcanzaba los valores silvestres (Klaver and Berkhout, 1994). Aunque no se pueda descartar la hipótesis de que TAR desarrolle un papel distinto al de regulador de la transcripción, los autores (Klaver and Berkhout, 1994) plantean la posibilidad que estas discrepancias sean debidas a los diferentes requisitos necesarios para la transcripción de un molde de DNA sin cromatina con respecto a un molde donde posicionan establemente nucleosomas. La transcripción del genomio del HIV-1 ocurre tras su integración en el genomio de la célula huésped y esto conlleva que la maquinaria transcripcional que se encarga de la síntesis del mRNA viral debe ser funcional en el contexto de la cromatina. En los últimos años se ha dejado de considerar a la cromatina como un mero obstáculo al paso de la maquinaria transcripcional: varios estudios han puesto de manifiesto el papel regulador de la cromatina en la expresión génica ya que del posicionamiento de nucleosomas en un molde de DNA dependen parámetros como la distancia entre elementos reguladores *in cis* o su accesibilidad a factores transcripcionales (de Laat and Grosveld, 2003). Parece de gran interés disponer de sistemas *in vivo* que permitan el estudio de la regulación de la transcripción en presencia de los principales factores que en ella intervienen, entre ellos, la cromatina. En la bibliografía son escasos los trabajos en los que se ha analizado la transcripción del HIV-1 en

presencia de cromatina pero en todos ellos se ha demostrado la existencia de una correlación entre la organización de la cromatina y la actividad transcripcional del virus. Verdin *et al.* (1993)(Verdin et al., 1993) determinaron la organización de la cromatina en el extremo 5' del genoma del HIV-1 integrado en el genoma de células humanas y observaron que el nucleosoma posicionado en la región del inicio de la transcripción se remodela al tratar las células con TPA. Esta droga aumenta la disponibilidad en el núcleo de NF- κ B, un factor transcripcional que se une a la LTR viral promoviendo la iniciación de la transcripción. La remodelación de este nucleosoma no depende de la actividad transcripcional si no que parece ser un requisito para que ésta se desarrolle. el Kharroubi y Martin (el Kharroubi and Martin, 1996) observaron que mutaciones en el límite 3' de este nucleosoma, en una zona comprendida entre la región U5 y la gag leader sequence (GLS) causaban una disminución de la actividad basal de la LTR viral y la disminución de la accesibilidad a nucleasas de una amplia zona de DNA, compatible con el posicionamiento estable de dos nucleosomas. Por otro lado, la eliminación de 60 nucleótidos en esa zona, que también eliminamos nosotros en la construcción p δ HIVTARless, causaba alteraciones de la actividad transcripcional basal de magnitud muy variable según el clón considerado. Este efecto es debido probablemente al entorno cromatínico del sitio de integración (Jordan et al., 2001). el Kharroubi y Martin (1996) observaron que la accesibilidad de nucleasas a la zona 5' de los clones analizados era proporcional a la actividad transcripcional y que la inducción de la transcripción del clon con menor actividad basal se reflejaba en un aumento de la accesibilidad de nucleasas a la zona R y U5 de la LTR viral. Uno de los efectos observados en la activación de la transcripción del HIV-1 mediada por Tat es la remodelación del nucleosoma posicionado sobre la región R-U5, aunque la alteración de este nucleosoma por efecto de inhibidores de desacetilasas como TSA, o por aumento de la disponibilidad de NF- κ B, como PMA o PBA, no permite el nivel de expresión alcanzados por acción de Tat (el Kharroubi et al., 1998). El estudio que hemos llevado a cabo con las unidades transcripcionales δ HIV y δ HIVTARless ha confirmado que

también en la levadura esta región afecta a la transcripción basal del HIV-1. El efecto diferencial que ha sido posible observar gracias a estas construcciones no se producía expresando el HIV-1 con la construcciones pGAL1-HIV y pGAL1-HIVTARless, lo que sugiere que la activación del promotor *GAL1* anula el efecto negativo del nucleosoma posicionado en el extremo 5' de la región transcrita. De manera análoga, la activación del promotor δ por 6-AU también elimina diferencias de expresión entre δ HIV y δ HIVTARless.

Con δ HIV y δ HIVTARless hemos demostrado la existencia del mismo tipo de correlación entre los niveles de expresión de las dos unidades transcripcionales y la accesibilidad de nucleasas a los extremos 5'. El estudio del posicionamiento de nucleosomas en δ HIV y δ HIVTARless sugiere fuertemente que el enriquecimiento de RNApolIII que se detecta en el extremo 5' transcrito de δ HIV sea favorecido por la presencia de un nucleosoma posicionado en esta región. La presencia de un nucleosoma establemente posicionado en el 5' transcrito es una característica muy común en los genes eucarióticos (Yuan et al., 2005) así como la tendencia de la RNApolIII a sufrir una pausa en esta zona, lo que parece estar vinculado con el correcto procesamiento del extremo 5' del mRNA (revisado por (Bentley, 2005). Es muy sugerente la correlación que existe entre la localización del sitio de pausa en el extremo 5', la capacidad de los nucleosomas de aumentar la intensidad de la pausa (Kireeva et al., 2005) y la organización de la cromatina en esta zona.

El conjunto de los resultados obtenidos en el análisis genético y el análisis molecular de las unidades transcripcionales δ HIV y δ HIVTARless ha permitido identificar algunos factores que influyen en su transcripción y definir un posible modelo funcional que hemos intentado resumir en la Fig. 20.

Proponemos que, en un estado de transcripción basal, el extremo 5' transcrito del HIV-1 ejerce un efecto negativo sobre la RNApolIII que se refleja en un incremento de su densidad en dicha zona y en un nivel de acumulación de mRNA inferior respecto a la unidad transcripcional δ HIVTARless, en la que hemos eliminado el extremo 5' de la región transcrita de HIV.

Este efecto negativo es debido en parte a la estructura del extremo 5' de RNA transcrito, pero el análisis de la organización de la cromatina ha revelado que en δ HIV el extremo 5' transcrito está protegido por un nucleosoma establemente posicionado que creemos que contribuye a reforzar el efecto negativo que esta región ejerce sobre la actividad de la RNAPolIII. Los factores pertenecientes al grupo 4, como Spt4, Spt6, Spt16, Chd1, o una dosis normal de histonas H2A-H2B ejercen un papel positivo en la estabilidad de la cromatina en la zona transcrita y en procesos relacionados (Kaplan et al., 2003). Su eliminación produce un aumento específico de la acumulación de mRNA de δ HIV, de forma coherente con el papel negativo que atribuimos a la organización de la cromatina en el extremo 5' de esta unidad transcripcional.

Los factores pertenecientes al grupo 3, como Paf1, Ctk1, Bur2 y Spt8 afectan en mayor medida a la transcripción de δ HIVTARless, indicando que el efecto positivo que ejercen sobre la transcripción se ve inhibido por algún elemento que actúa en la zona 5' transcrita de δ HIV. Es probable que la misma organización de la cromatina en esta región o antagonice el efecto positivo sobre la elongación de la transcripción que detectamos en δ HIVTARless y que se ha demostrado para Ctk1, Paf1 y Bur2 en otros numerosos estudios (Jona et al., 2001; Keogh et al., 2003; Simic et al., 2003; Squazzo et al., 2002; Yao et al., 2000).

En un estado de activación del promotor δ , como el que hemos observado en presencia de 6-AU, el efecto inhibitorio sobre la transcripción del extremo 5' transcrito de HIV desaparece y el patrón de expresión de δ HIV y δ HIVTARless en estado de activación se aproxima al observado en mutantes de los genes del grupo 4. Esto parece indicar que la propensión de la RNAPolIII a sufrir pausas en el extremo 5' de la región transcrita de HIV depende del estado de activación del promotor y de los factores implicados en la estructuración de la cromatina en la región transcrita. La presencia de un nucleosoma establemente posicionado en el extremo 5' de la región transcrita contribuye a

mantener bajos los niveles de transcripción basal, sin que suponga un obstáculo para la activación de la transcripción.

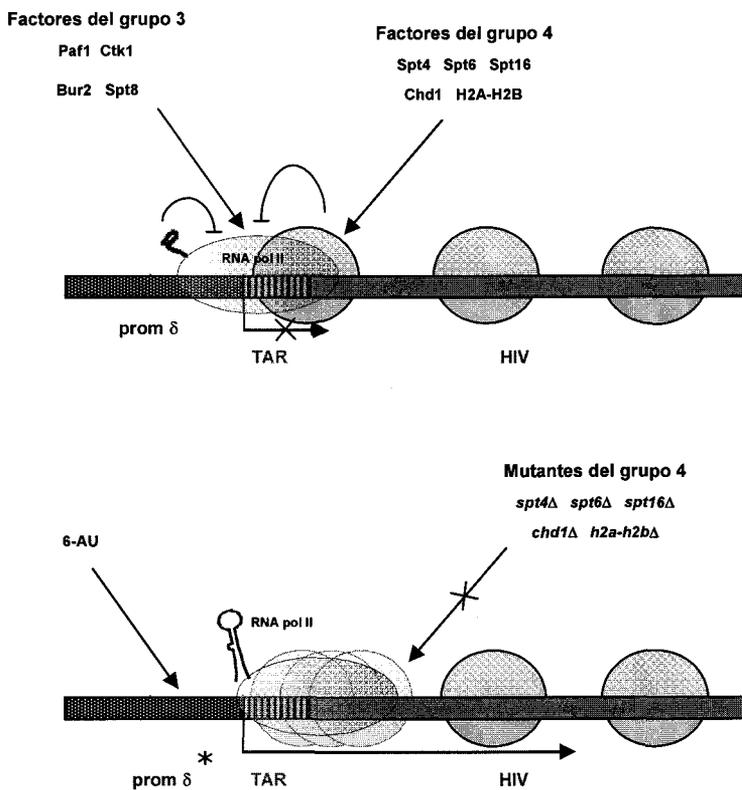


Figura 21. Modelo hipotético de la regulación de la transcripción del extremo 5' transcrito de δ HIV: (A) En un estado de transcripción basal, la RNAPolII (óvalo gris) se acumula en el extremo 5' transcrito de δ HIV donde posiciona establemente un nucleosoma (círculos celestes). La estructura del RNA contribuye a la pausa de la RNAPolII (flecha de bloqueo). Los factores del grupo 4 mantienen la estabilidad del nucleosoma (flecha) y producen un efecto negativo sobre la transcripción de δ HIV. Los factores del grupo 3 ejercen un efecto positivo sobre la transcripción (flecha) que es inhibido por la estructura de la cromatina en el extremo 5' transcrito (flecha de bloqueo). (B) La ausencia de los factores del grupo 4 afecta la estabilidad de la cromatina (círculos celestes sobrepuestos) y la expresión de δ HIV aumenta. En un estado de activación del promotor δ (asterisco) por 6-AU, la maquinaria transcripcional no es sensible al efecto negativo sobre la transcripción del extremo 5' de δ HIV. La expresión de δ HIV aumenta de forma similar a lo observado en mutantes del grupo 4.

5 Conclusiones

1. El estudio de las unidades transcripcionales híbridas GAL1-HIV y GAL1-HIVTARless, en presencia de los factores Tat y P-TEFb expresados de forma heteróloga en *Saccharomyces cerevisiae*, indica que la levadura ofrece un entorno celular adecuado para la reconstrucción del sistema de regulación transcripcional de HIV-1.
2. El estudio de las unidades transcripcionales híbridas δ HIV y δ HIVTARless ha puesto en evidencia un efecto negativo del extremo 5' de la región transcrita del HIV sobre la expresión del virus en la levadura.
3. Spt4, subunidad del complejo DSIF, juega un papel inhibitorio sobre la elongación transcripcional del HIV que parece ser independiente de la estructura del extremo 5' de su mRNA.
4. El análisis genético y molecular de las unidades transcripcionales δ HIV y δ HIVTARless realizado en la levadura indica que el nucleosoma posicionado en el extremo 5' de la región transcrita ejerce un papel negativo sobre la elongación transcripcional temprana, que conlleva la acumulación de la RNA polimerasa II en esa región.

6 Materiales y métodos



6.1 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

6.1.1 Medios de cultivo para levadura.

- Medio rico YEPD: 1% de extracto de levadura; 2% de bacto-peptona; 2% de glucosa; suplementado con 20 mg/l de adenina.

- Medio mínimo SD: 0,17% de bases nitrogenadas (YNB) sin aminoácidos ni sulfato amónico; 0,5% de sulfato amónico; 2% de glucosa.

- Medio completo SC: medio SD suplementado con los aminoácidos leucina, triptófano, histidina, metionina y lisina y con las bases nitrogenadas adenina y uracilo a las concentraciones finales descritas por Sherman *et al.* (Sherman *et al.*, 1986). Se especifican aquellos casos en los que uno o más de estos requerimientos se han omitido del medio. Por ejemplo; SC-ura indica medio completo sin uracilo.

- Medio completo SG: Idéntico al medio SC pero con 2% de galactosa en lugar de glucosa como fuente de carbono.

- Medio completo SG/L: Idéntico al medio SC pero con 3% de glicerol y 2% lactato sódico. El glicerol se autoclavó aparte y se añadió al resto de los componentes una vez autoclavados.

.- Medio de esporulación SPO: 1% de acetato potásico; 0,1% de extracto de levadura; 0,005% de glucosa. Se suplementó con los requerimientos descritos para el SC pero a un cuarto de su concentración habitual.

Los medios sólidos se prepararon añadiendo un 2% de agar antes de ser autoclavados.

Los medios sólidos se prepararon añadiendo un 2% de agar antes de ser autoclavados.

6.1.2 Medios de cultivo para bacterias

-Medio rico LB: 0,5% de extracto de levadura; 1% de bacto-triptona; 1% de NaCl.

-Medio rico LB+Amp: LB suplementado con 80 ó 100 µg/l de ampicilina sódica añadida tras ser autoclavado.

- Medio rico SOB: 0,5% de extracto de levadura; 2% de bacto-triptona; 0,005% de NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgSO₄; 10 mM MgCl₂. El Mg₂SO₄ y el MgCl₂ se añadieron al medio justo antes de usarlo y autoclavados por separado.

Los medios sólidos se prepararon añadiendo un 2% de agar antes de ser autoclavados.

6.1.3 Condiciones de crecimiento

Las cepas de levadura se incubaron a 30°C, excepto en los casos especificados. Las cepas de bacterias se incubaron a 37°C en todos los casos. Los cultivos líquidos se incubaron con agitación constante horizontal u orbital.

6.2 Antibióticos, drogas, enzimas, vectores e inhibidores

-**Albúmina de suero bovino (BSA)** (New England): proteína que se obtiene de suero bovino. Se emplea como estabilizador y tampón.

-**Ampicilina**, (Sigma): antibiótico β-lactámico que inhibe la división celular de *E. coli* impidiendo la síntesis de pared celular. Se usa para seleccionar células que lleven los plásmidos con cassette de resistencia a Ampicilina.

-**Anticuerpo anti c-Myc (9E10):sc-40** (Santa Cruz Biotechnology): anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce el epítipo comprendido entre los aminoácidos 408-439 de c-Myc humano.

-**Anticuerpo M2 anti-FLAG** (Sigma): anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce el epítipo FLAG en proteínas de fusión.

-**Anticuerpo anti- IgG (H+L) de ratón** (BioRad): anticuerpo monoclonal de cabra anti IgG de ratón conyugado con peroxidasa de rábano.

-**Anticuerpo anti-IgG de cabra** (Santa Cruz): anticuerpo monoclonal de conejo anti-IgG de cabra.

-**Anticuerpo anti-IgG de conejo sc-2030** (Santa Cruz): anticuerpo monoclonal de cabra anti-IgG de conejo conyugado con peroxidasa de rábano.

-**Anticuerpo anti-hCycT1 sc-8126** (Santa Cruz): anticuerpo monoclonal de cabra que reconoce el dominio N-terminal de hCycT1.

-**6-Azauracilo** (Sigma): inhibidor de la inosina 5'-monofosfato dehidrogenasa (IMPDH). La enzima participa en la ruta de síntesis de nucleótidos de guanina.

-**Benzamidina** (Sigma): inhibidor por competición de serin-proteasas del tipo de la tripsina.

-**Complete** (Roche): mezcla de inhibidores de proteasas

-**DEPC** (Sigma) (dietil-dicarbonato): inactivador de la RNAasa A.

-**DNAsa I libre de RNasas** (Roche): endonucleasa específica de DNA bicatenario utilizada para degradar el DNA preservando la integridad del RNA.

-**Dynabeads[®] Pan Mouse IgG** (Dynal Biotech): perlas magnéticas de poliestireno unidas a anticuerpos humanos anti-IgG de ratón.

-**Fosfatasa alcalina** (Roche): glicoproteína dimérica capaz de eliminar los grupos fosfatos de los extremos 5' del DNA bicatenario impidiendo la religación.

-**G418**, Geneticina[®] (USB): antibiótico aminoglicosídico para las levaduras que posiblemente afecta a la subunidad 80S de los ribosomas e inhibe la síntesis de proteínas (Jiménez and Davies 1980). Se usa para seleccionar y mantener células eucarióticas que lleven el gen de *E. coli* de resistencia a neomicina (*neo*) o kanamicina (*kan*).

-**HotMaster[™] Taq polymerase** (Eppendorf): Polimerasa Taq (de *Thermus aquaticus*) Eppendorf cuya actividad es inhibida a una temperatura inferior a 55°C por el inhibidor Hot master[™].

-**IPTG** (Roche): (isopropil- β -D-tiogalactósido) compuesto químico que se usa para inducir la expresión de proteínas bajo el control del promotor *lac*.

-**Klenow** (Roche): fragmento mayor de la DNA polimerasa I de *E. coli* con actividad polimerasa 5'-3' y exonucleasa 3'-5' (Klenow y Henningsen 1970).

-**Ligasa de DNA del fago T4** (Roche): cataliza la unión covalente de extremos lineales de DNA bicatenario (Weiss *et al.* 1968).

-**MNasa** (nucleasa microccal) (Sigma): nucleasa de DNA de *Staphylococcus aureus*.

-**pGEM-T easy vector** (Promega): sistema que permite clonar directamente el producto de PCR sin usar enzimas de restricción.

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

-**Polimerasa termoestable de DNA** (Expand™ High Fidelity PCR System/Roche): Mezcla de las polimerasas Taq (de *Thermus aquaticus*) y Pwo (de *Pyrococcus woesei*) usadas en las reacciones encadenadas de polimerización de DNA o PCRs. Temperatura óptima de elongación, 68 °C.

-**Polimerasa termoestable de DNA** (MBI Taq polimerasa): Polimerasa Taq (de *Thermus aquaticus*) usadas en las reacciones encadenadas de polimerización de DNA o PCRs. Temperatura óptima de elongación, 72 °C.

-**Proteinasa K** (Roche): endoproteinasa inespecífica capaz de degradar proteínas hasta el nivel de aminoácidos.

-**Restricciones** (Amersham, Roche y New England): endonucleasas de DNA con dianas específicas de secuencia.

-**RNasa A** (Sigma): mezcla de nucleasas de RNA aisladas de páncreas bovino.

-**SuperScript™ II Reverse Transcriptase** (Invitrogen) versión de M-MLV RT con actividad RNAasa H reducida y mayor termoestabilidad.

- **T4 polinucleótido kinasa (PNK)** (USB): enzima que cataliza la transferencia de un grupo fosfato desde ATP al grupo hidroxílico en el extremo 5' de un polinucleótido (DNA o RNA).

-**T7 sequencing kit** (USB): kit de secuenciación que incluye la polimerasa de RNA del fago T7, distintas mezclas de dNTPs y tampones.

-**X-gal** (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido/USB). Sustrato de la β-galactosidasa que origina un precipitado azul en presencia de la enzima. Se disuelve en N-N- dimetil formamida a 20 mg/ml.

-**Zymoliasa 20T** (USB): mezcla de enzimas de *Arthrobacter luteus* con capacidad de digerir la pared celular de *S. cerevisiae*.

-**Zymoliasa 100T (USB)**: mezcla de enzimas de *Arthrobacter luteus* con capacidad de digerir la pared celular de *S. cerevisiae*. La zymoliasa 100T presenta mayor actividad β -1,3-glucanasa y mayor pureza con respecto a la zymoliasa 20T.

6.3 Cepas

6.3.1 Cepas de *Escherichia coli*

-DH5 α : F- endA1 gyrA96 hsdR17 Δ lacU169(f80lacZ Δ M15) recA1 relA1 supE44 thi-1 (Hanahan, 1983).

6.3.2 Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

La cepa MVcoat-b se construyó por cruzamiento entre L40-coat III y Y17202.

Algunas de las estirpes de levadura usadas en esta tesis se muestran en la tabla 4.

Cepa	Genotipo	Referencia
W303-1A	MATa, ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1	R. Rothstein
BY4741	Mata his3 Δ 1, leu2 Δ 0, met15 Δ 0, ura3 Δ 0	EUROSCARF
BY4742	Mata his3 Δ 1, leu2 Δ 0, lys2 Δ 0, ura3 Δ 0	EUROSCARF
Y17202	BY4742 YDR007::kanMX (trp1 Δ)	EUROSCARF
Y13232	BY4742 YBRO93c::kanMX (pho5 Δ)	EUROSCARF
FY120	MATa ura3, leu2 Δ 1, his4-912 δ , lys2-128 δ	(Hartzog et al., 1998)
FY137	MATa ura3, his4-912 δ , lys2-128 δ spt6-140	(Hartzog et al., 1998)
FY348	MATa ura3, leu2 Δ 1, his4-912 δ , lys2-128 δ spt16-197	(Malone et al., 1991) <i>et.al.</i> (1991)

FY710	MATa ura3, leu2Δ1, his4-912δ, lys2-128δ hta1-htb1::LEU1	(Clark-Adams et al., 1988)-
FY232	MATa ura3, ade2, his4-912δ, lys2-128δ spt2-150	(Winston et al., 1984)
L-40COAT	MATa, ade2-1, his3Δ200, leu2-3,112, trp1-Δ1, LYS2::(lexAop) ₄ -HIS3, ura3::(lexAop) ₈ -lacZ, lexA-MS2coat (TRP1)	Fraldi et al., (2001)
III		
MVcoat-b	MATa, his3Δ200, leu2-3,112, trp1-Δ1, lys2Δ0, ura3::(lexAop) ₈ -lacZ, lexA-MS2coat (TRP1)	Esta tesis
ARG3	BY4741 YDR007::kanMX (trp1Δ) RPB1myc18::klTRP1	Laboratorio de S.Chávez
F15	MATα thr1 arg4	
F4	MATa thr4	

Las restante estirpes mutantes usadas en el análisis genético, que no se encuentran detalladas en la tabla 4, derivan de la estirpe BY4741 (tabla 4) y proceden de la colección EUROSCARF (http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/col_index.html)

6.3.3 Análisis genético en levaduras

Las cepas parentales se cruzaron mezclándolas en YEPD sólido e incubando a 30 °C. Los diploides se aislaron mediante selección o micromanipulando los cigotos. Se hicieron esporular en medio SPO durante tres días a 30 °C. Las ascas se diseccionaron tras un tratamiento con zimoliasa 20T a 2 mg/ml en agua durante 2 minutos y medio a temperatura ambiente. Se micromanipularon las ascas en YEPD con un micromanipulador SINGER MSM system 200. Las esporas se incubaron en YEPD a 30 °C y su fenotipo se determinó mediante réplicas a los medios selectivos adecuados. El

sexo se determinó analizando la capacidad de las esporas de formar diploides con otras cepas F4 y F15 de sexos α y α , respectivamente.

6.4 Plásmidos

Los plásmidos usados se muestran en la Tabla 5

Plásmidos	Descripción	Referencia
p413GPD-CDK9-FLAG	p413GPD (Mumberg et al., 1995) con la ORF de CDK9 fusionada en el extremo N-terminal con el epítipo FLAG. La fusión procede de pFLAG-CMV2 CDK9 (laboratorio de RICE). El fragmento conteniente FLAG-CDK9, comprendido entre <i>Bam</i> HI- <i>Bg</i> II, se clonó en la diana <i>Bam</i> HI del sitio de clonación múltiple de p413GPD.	Ésta tesis
p414GPD-Tat	p414GPD (Mumberg et al., 1995) con la ORF de Tat procedente de pSV-Tat (We1, 1998). El fragmento conteniente Tat, comprendido entre <i>Bg</i> II- <i>Sal</i> I, se clonó en las dianas <i>Bam</i> HI y <i>Sal</i> I del sitio de clonación múltiple de p414GPD.	Ésta tesis
p415GPD-CycT1	p415GPD (Mumberg et al., 1995) con la ORF de procedente de pCMV-CycT1 (laboratorio de K. Jones). El fragmento conteniente hCycT1, comprendido entre <i>Xba</i> I- <i>Bam</i> HI, se clonó en las dianas <i>Spe</i> I y <i>Bam</i> HI del sitio de clonación múltiple de p415GPD.	Ésta tesis
pSCh202	p416GAL1 (Mumberg et al., 1994) con la región codificante del gen <i>PHO5</i> fusionada al promotor de <i>GAL1</i>	Chávez and Aguilera (1997)
pGAL1-HIV1	Plásmido centromérico con el gen <i>URA3</i> como marcador que lleva la fusión HIV-PHO5	Ésta tesis

bajo promotor de *GAL1*. Este plásmido se obtuvo en tres pasos: 1) se clonó en las dianas *EcoRI-HindIII* de p416Cyc1 (Mumberg et al., 1995) el fragmento *EcoRI-HindIII* que llevaba el ORF de *PHO5* obtenido de pSch202. El plásmido obtenido se llamó p416Cyc1-PHO5;

2) se clonó en fase en la diana *SmaI* de p416Cyc1-PHO5 el fragmento *PvuII-PvuII* obtenido del plásmido pNL4-3 (laboratorio de F. Luque) que contiene la secuencia completa de HIV-1 NL4-3. Este fragmento coincide con la región comprendida entre los nucleótidos 433 y 1145 de HIV-1 NL4-3. El plásmido obtenido se llamó p416Cyc1 HIV-PHO5;

3) se clonó la fusión HIV-PHO5 obtenida de p416Cyc1 HIV-PHO5 con las enzimas *BamHI* y *XhoI* en las dianas *BamHI* y *SalI* de pSch202.

pGAL1-
HIV1TARless

Plásmido centromérico con el gen *URA3* como marcador que lleva la fusión HIV1TARless-PHO5 bajo promotor de *GAL1*. Se obtuvo eliminando el fragmento *HindIII-HindIII* de pGAL1-HIV1. El fragmento de HIV-1 NL4-3 presente en esta construcción está comprendido entre los nucleótidos 531 y 1145.

Ésta tesis

p δ HIV-TARless

Plásmido centromérico con el gen *URA3* como marcador que lleva la fusión HIV1TARless-PHO5 bajo promotor δ de Ty1. Se amplificó por PCR el promotor δ con los cebadores TAR BglII up y TAR BglII low a partir de DNA genómico de W303-1A y se clonó en

Ésta tesis

pGEM-T easy vector (Promega). Se usaron la diana *SacI* del sitio de clonación múltiple de pGEM-T y la diana *BglII* del cebador TAR *BglIII low* para sustituir en *SacI-BglII* (nucleótido 679 de HIV-1 NL4-3) de pGAL1-HIV1 el promotor GAL1 por el promotor δ . El fragmento de HIV-1 NL4-3 presente en esta construcción se ha generado por ligación de las dianas *BglII* situadas en 473 y 679 de HIV-1 NL4-3 y está constituido por la región entre los nucleótidos 454-473 (parte de la secuencia del cebador TAR *BglIII low*) y 679-1145 (parte de HIV clonado en pGAL1-HIV1).

p δ HIV

Plásmido centromérico con el gen *URA3* como marcador que lleva la fusión HIV1-PHO5 bajo promotor δ de Ty1. Se obtuvo clonando el fragmento *BglII-BglII* obtenido de pGAL1-HIV1 en la diana *BglII* de p δ HIV1TARless. El fragmento de HIV-1 NL4-3 presente en esta construcción está comprendido entre los nucleótidos 454 y 1145 de HIV-1 NL4-3.

Ésta tesis

p δ HIV-TARmut

Plásmido centromérico con el gen *URA3* como marcador que lleva la fusión HIV1TARmut-PHO5 bajo promotor δ de Ty1. Se clonó el producto de la PCR, obtenido con los cebadores Falso Tar up y Falso Tar low y con pGAL1-HIV1 como molde, en la diana *BglII* de p δ HIV-TARless.

Ésta tesis

pACTII-CycT1

Plásmido centromérico que lleva el gen *LEU2* como marcador y la hCycT1 fusionada al

Fraldi *et al.* (2001)

dominio de activación del gen *GAL4* bajo el promotor de ADH.

pIIIA-TAR-MS2 Plásmido centromérico con el gen *URA3* como marcador que lleva fusionado el dominio TAR con la secuencia que codifica un RNA del fago MS2 que se une a la proteína de cubierta de MS2. Fraldi *et. al.* (2001)

6.5 Transformaciones

6.5.1 Preparación de células competentes de *E. coli* DH5 α

6.5.1.1 Método del TB.

Se realizó siguiendo el método descrito por Hanahan (Hanahan, 1983) y modificado por Inoue *et al.* (1990). Las células competentes se obtuvieron a partir de cultivos de *E. coli* en medio SOB a 22 °C hasta DO₆₀₀ de 0,5. Tras enfriar las células durante 10 minutos. en hielo, se recogieron por centrifugación a 4000 rpm a 4 °C 10 minutos. Se resuspendió el sedimento en 20 ml de TB (10 mM Pipes (ácido libre); 15 mM CaCl₂; 250 mM KCl; llevado a pH 6,7 con KOH). Se añadió MnCl₂ hasta 55 mM (esterilizado por filtración) a 4 °C, se añadieron otros 60 ml de TB frío y se incubó 10 minutos en hielo. Se recogieron las células por centrifugación y se resuspendieron en 20 ml de TB a 4 °C. Se añadió 1,5 ml de DMSO (dimetilsulfóxido) y se mantuvieron 10 minutos. más en hielo. Se hicieron alícuotas, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C.

6.5.2 Transformación de bacterias

Para transformar se mezclaron 100 μ l de células competentes con 50-100 ng de DNA y se incubaron en hielo durante 30 minutos. A continuación se sometieron las células a un choque térmico de 42 °C durante 60-90 s, tras lo cual se añadió 1 ml de LB y se incubaron durante 30-45 minutos. a 37 °C. Se recogieron por centrifugación y se sembraron en LB+Amp.

6.5.3 Transformación de levaduras

Se realizó siguiendo el método descrito por Ito *et al.* (Ito *et al.*, 1983) y modificado por Gietz *et al.* (Gietz *et al.*, 1995). Las células competentes se obtuvieron a partir de cultivos de *S. cerevisiae* incubados en YEPD hasta una densidad DO_{660} de 0,4-0,6. Las células se recogieron por centrifugación y se lavaron con H_2O y con 100 mM LiAc. Se resuspendieron en 1/100 del volumen inicial ($2 \cdot 10^9$ células/ml). Para cada transformación se mezclaron 50 μ l de células, 240 μ l de PEG4000 al 50%, 36 μ l de LiAc 100 mM, 25 μ l de DNA desnaturalizado de esperma de salmón (preparado como se detalla en el apartado 13.3) a 2 mg/ml y 50 μ l del plásmido mas agua (0.1-10 μ g). Tras incubación durante 30 minutos a 30 °C con agitación, se sometieron las células a un choque térmico de 42°C durante 20 minutos. Se lavaron con H_2O tras lo cual se sembraron en el medio oportuno si se seleccionaba una auxotrofia o se incubaron 2 h en YEPAD a 30°C en agitación antes de sembrar si se seleccionaba resistencia a G418.

6.6 Análisis de expresión génica a partir del promotor de *GAL1*

Se recogieron cultivos de células en fase exponencial crecidos en medio SC sin los requerimientos que permiten seleccionar los plásmidos portadores de los sistemas de expresión dirigida. Se lavaron con agua destilada estéril y SG/L selectivo para el plásmido y se diluyeron a una DO_{600} 0,3-0,5 según su tiempo de generación. Tras 14-16 h de incubación se añadió al medio 2% de galactosa (condiciones de activación). A partir de ese momento se tomaron muestras a los tiempos indicados para los estudios de cinéticas de expresión por northern o tras 2 h de inducción se recogieron las células para análisis enzimáticos.

6.7 Análisis de expresión génica a partir del promotor δ .

Se recogieron cultivos de células en fase exponencial crecidos en medio SC –Ura que permite seleccionar los plásmidos p δ HIV y p δ HIVTARless. Se lavaron con agua destilada estéril, y se procesaron como detallado en el apartado 0 para extraer RNA.

El tratamiento con 6-AU se llevó a cabo añadiendo a un cultivo en fase exponencial la droga a una concentración final de 100 μ g/ml. A partir de ese momento se tomaron muestras a los tiempos indicados para los estudios de cinéticas de expresión por northern o tras 1 h cuando no indicado.

6.8 Ensayo de actividades enzimáticas

6.8.1 Ensayo de β -galactosidasa en caja

Se cultivaron las células en cajas a 30 °C durante 2-4 días. Se preparó agar de cobertera mezclando un volumen de agarosa 1% fundida con igual volumen de tampón fosfato sódico 0,5 M precalentado a 60 °C, y SDS y X-gal a una concentración final de 0,1 % y 0,4 mg respectivamente. Se vertió sobre la placa 12 ml de la mezcla .A los 30 minutos las células con actividad β -galactosidasa se vuelven azules permaneciendo blancas las que carecen de dicha actividad.

6.8.2 Ensayo de actividad fosfatasa ácida

Se realizó siguiendo el método descrito por Haguenaer-Tsapis y Hinnen (Haguenaer-Tsapis and Hinnen, 1984). Las células, cultivadas en las condiciones oportunas, se lavaron con H₂O y se resuspendieron en 1 ml de tampón acetato 50 mM pH 4, obteniéndose una suspensión con una DO₆₀₀: D. El ensayo se realizó añadiendo un volumen v (ml) de la suspensión celular a un volumen final de 0,45 ml de tampón acetato. Seguidamente se añadieron 50 μ l de una solución de 5 mg/ml de p-nitrofenilfosfato en tampón Acetato 50 mM. Después de 10 minutos. a 37°C se paró la reacción añadiendo 0,12 ml de

ácido tricloroacético al 25% y 0,6 ml de Na_2CO_3 en saturación. Se determinó la DO_{405} . Las miliunidades (mU) de actividad fosfatasa ácida se definieron según la fórmula: $\text{mU} = \text{DO}_{405} \cdot 0,066 / t \cdot v \cdot D$.

6.9 Extracción de ácidos nucleicos

6.9.1 Preparación de DNA plasmídico de *E. coli* a pequeña escala por lisis alcalina (miniprep)

Se realizó siguiendo en el método descrito por Bolivar y Backman (Bolivar and Backman, 1979). De 1,5 ml de cultivo, se recogieron las células por centrifugación y se resuspendieron en 100 μl de solución I (50 mM glucosa; 25 mM Tris-Cl pH 8,0; 10 mM EDTA pH 8,0). Tras 5 minutos a temperatura ambiente se añadieron 200 μl de solución II (0,2 M NaOH; 1% SDS), se mezclaron invirtiendo el tubo varias veces y se puso durante 5 minutos en hielo. Seguidamente se añadieron 150 μl de solución III (3 M KAc; 11,5% ácido acético glacial). De nuevo se mezcló por inversión y se puso en hielo durante 5 minutos. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación y el sobrenadante se mezcló con 500 μl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). El DNA presente en la fase acuosa se precipitó con 0,9 ml de etanol 96%, se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 50 μl de TE (10 mM Tris-Cl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0).

6.9.2 Preparación de DNA "carrier"

El DNA de esperma de salmón (Sigma) se resuspendió en TE pH 8,0 a 10 mg/ml para lo cual se dejó toda la noche a 4 °C. Se sonicó con dos pulsos de 9 s a 100 W. Se extrajo una vez con fenol, una segunda vez con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y por último con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Se precipitó con 0,1 volúmenes de NaAc 3 M pH 5,2 y 2,5 volúmenes etanol 96%. Se resuspendió en TE tras secar al vacío de forma que quedó a una concentración final de 10 mg/ml. Finalmente, se desnaturalizó hirviéndolo 20 minutos y enfriándolo en hielo. Se congelaron

en pequeñas alícuotas. El tamaño medio de los fragmentos era de unas 7 kb con objeto de que la eficiencia de transformación de la levadura fuera la óptima.

6.9.3 Preparación de RNA de levaduras

Se siguió el método de extracción con fenol ácido descrito por (Kohrer and Domdey, 1991). A partir de 10 ml de cultivo en fase exponencial (DO_{660} de 0,5-0,7) se recogieron las células por centrifugación y se lavaron con H_2O . Posteriormente se resuspendieron en 0,4 ml de tampón TES (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM EDTA pH 8,0; 0.5% SDS) y 0,4 ml de fenol ácido (saturado con H_2O), tras lo cual se agitaron fuertemente en un vortex durante al menos 10 s. La mezcla se incubó durante 45 minutos. a 65 °C con agitación ocasional. Tras la incubación, se dejó 5 minutos. en hielo, se centrifugó y la fase acuosa fue transferida a otro tubo. Después se realizó una nueva extracción con fenol ácido y otra con cloroformo. El RNA se precipitó con 0,1 volúmenes de NaAc 3M pH 5,3 y 2 volúmenes de etanol 96%, se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 50 μ l de H_2O . La concentración del RNA se determinó mediante espectrofotometría, o por tinción con EtBr en geles de agarosa. Todo el proceso se llevó a cabo en hielo o a bajas temperaturas y el material plástico utilizado se manipuló siempre con guantes. El H_2O y las soluciones acuosas utilizadas fueron previamente tratadas con DEPC al 0,1% y autoclavadas.

6.10 Electroforesis de ácidos nucleicos

6.10.1 Geles de agarosa para DNA

Los fragmentos de DNA se separaron según su tamaño por electroforesis en geles de agarosa a una concentración variable entre 0,6% y 3% en función del tamaño de los fragmentos a analizar. Los geles se prepararon con tampón TAE 1x (Tris-acetato 40m, EDTA pH8 1mM) y EtBr 5 μ l/ml. El DNA se sometió a un campo eléctrico constante de 5V/cm de longitud del gel. Previamente a las muestras de DNA se le añadió tampón de carga 5x (2,5 ng/ml de azul de

bromofenol, 2,5 ng/ml de azul de metileno, glicerol 30%, Tris-acetato 40m, EDTA pH8 1mM)

6.10.2 Geles de agarosa para RNA

El RNA obtenido de levaduras se separó en geles de agarosa al 1% en tampón MOPS (tampón MOPS 10x: 0,4 M MOPS pH 7,0; 0,1 M NaAc; 0,1 M EDTA) y formaldehído 0,66 M. El RNA se sometió a un campo eléctrico constante de 5 V/cm de gel, con recircularización constante del tampón. Previamente, las muestras de RNA se prepararon mezclando 3 µl de RNA (unos 8 µg), 1,25 µl de tampón MOPS 10x, 2,25 µl formaldehído 12,3 M y 6,25 µl de formamida. Después se calentaron 15 minutos. a 65 °C y se les añadieron 2 µl de tampón de carga-formaldehído 10x (1 mM EDTA pH 8,0; 0,25% azul de bromofenol; 50% glicerol).

6.11 Purificación de DNA a partir de geles de agarosa

6.11.1 Método del fenol.

La banda del gel de agarosa con el fragmento de interés se machacó y se mezcló con un volumen de fenol. Se congeló en N₂ líquido, se separó la fase acuosa por centrifugación a máxima velocidad 15 minutos. y se precipitó el DNA con 0,1 volúmenes de NaAc 3 M y 2,5 volúmenes de etanol 96%. Se resuspendió en 10 µl de TE.

6.11.2 Kit de purificación GFX™ (Amersham)

Se siguieron las instrucciones del fabricante. A la banda con el fragmento de DNA se le añadió el tampón proporcionado que contiene un agente caiotrópico que disuelve la agarosa. Se calentó a 60 °C unos minutos hasta que se disolvió la agarosa. La muestra se pasó por una matriz de fibra de vidrio donde el DNA se queda unido. Se lavó con un tampón que contiene etanol para eliminar los contaminantes y se eluyó en 50 µl de TE o agua.

6.12 Marcajes radioactivos de ácidos nucleícos.

6.12.1 Marcaje de sondas de DNA por “random primer”

Las sondas de DNA se marcaron con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ según el protocolo básico para sondas radiactivas. En este caso, a la misma cantidad de DNA, previamente hervida, se le añadió 1 mM de hexanucleótidos no marcados, 5 μl de una mezcla de dATP, dGTP, dTTP 0,5 mM, 20 μCi de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ y 2 U de DNA polimerasa Klenow. La reacción se incubó a 37 °C durante 1 h en un volumen final de 50 μl . Los nucleótidos no incorporados en la reacción se eliminaron pasando el total del volumen a través de una columna GFX™ (Amersham). Se siguieron las instrucciones del fabricante. Se transfirió la mezcla de reacción a una columna y se le añadió el tampón proporcionado que promueve la unión de DNA bicatenario a las fibras de vidrio que constituyen la matriz de la columna. Se centrifugó y se lavó con un tampón que contiene etanol para eliminar los contaminantes. Se eluyó en 50 μl de agua.

6.12.2 Marcaje de sondas por PCR.

Sondas de tamaño inferior a las 200 pb se marcaron por PCR. Para ello, preparamos una mezcla con 0,5 μg de DNA a amplificar, 1 μl de dATP, dTTP, dGTP 10mM, 1 μl de dCTP 0,1mM, 5 μl de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$, 5 μl de cebadores 10mM, 5 μl de tampón polimerasa, 2 μl de MgCl_2 25mM, 1 μl de Taq polimerasa y H_2O MilliQ hasta un volumen final de 50 μl .

La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo como descrito en el apartado 6.18.

Los nucleótidos no incorporados en la reacción se eliminaron pasando el total del volumen a través de una columna GFX™ (Amersham).

6.12.3 Marcaje 5'terminal de un cebador.

Se mezclaron 2,5 μl del cebador a una concentración de 10 μM , 2 μl polinucleótido kinasa de T4 (T4 PNK), 2 μl de tampón 10X de T4 PNK (TrisHCl pH7,6 0,5M, MgCl_2 100mM, 2-mercaptoetanol 100mM), 5 μl de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$,

8,5 μ l de H₂O MilliQ. Se incubó la mezcla a 37°C durante una hora y se fenolizó con fenol:cloroformo:isoamílico (24:24:1). Se precipitó el cebador con NaCl 0,3M y 2,5 volúmenes de etanol 96%, se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 25 μ l de H₂O MilliQ.

Tabla 6. Sondas usadas en esta tesis.

Sonda	Descripción
HIV	Fragmento <i>BglII-EcoRI</i> de 0,55 Kb del plásmido p δ HIV-TARless.
PHO5	Fragmento <i>EcoRV</i> de 0,9 Kk del plásmido pSCH202.
MN- <i>EcoRI</i>	Fragmento obtenido amplificando p δ HIV con los cebadores Pho5 MN-asa up y Pho5 MN-asa low
MN- <i>DraI</i>	Fragmento obtenido amplificando p δ HIV con los cebadores Mn-asa dra up y Mn-asa dra low
Sonda 1	Fragmento obtenido amplificando p δ HIV con los cebadores NucTAR up y NucTAR low
Sonda 2	Fragmento obtenido amplificando p δ HIV con los cebadores TARlessNuc1 y TARlessNuc2
Sonda 3	Fragmento obtenido amplificando p δ HIV con los cebadores HIV up 5 y Nuc3'
Ty	Fragmento de 214 pb correspondiente a la zona central de Ty1-4 (desde 1097137 hasta 1097350 del cromosoma IV de S288C www.yeastgenome.org/index.shtml) obtenido amplificando el genoma de W303-1A con los cebadores Ty1cen up y Ty1cen low.
rRNA 25S	Fragmento interno de 589 pb del rRNA 28S, amplificado con los cebadores rDNAup y rDNA low, a partir del DNA genómico de W303.1A.

6.13 Transferencia de ácidos nucleicos a membranas

6.13.1 Transferencia de dna

Tras la electroforesis el gel de agarosa se incubó en una solución de HCl 0,25 durante 10 minutos. Se lavó con H₂O y se trató con NaOH 0,4M durante 20 minutos. La transferencia del DNA se efectuó por capilaridad con NaOH 0,4M durante 12-16 horas a una membrana de nylon Hybond+ (Amersham). Una vez transferido, se lavó la membrana en SSC 2x (NaCl 0,3M, Na-citrato 0,4M; ajustado a pH7 con con NaOH).

6.13.2 Transferencia de RNA

Tras la electroforesis, el gel de agarosa se lavó varias veces con varios volúmenes de H₂O para eliminar el formaldehído. La transferencia del RNA se efectuó por capilaridad en tampón SSC 20x durante 12-16 h. Una vez transferido el RNA se fijó covalentemente con radiación ultravioleta (70000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$) por ambas caras. Para comprobar la eficiencia de la transferencia se tiñó la membrana con solución de azul de metileno (0,3 M NaAc pH 5,5; 0,02% azul de metileno) durante 2-3 minutos. a temperatura ambiente. La membrana se destiñó con SSPE 0,2x (SSPE 20x: 3 M NaCl; 0,2 M NaH₂PO₄; 20 mM EDTA)-SDS 1%. Las membranas se guardaron entre papel Whatman a temperatura ambiente hasta su uso.

6.14 Hibridación de DNA (Southern)

Las membranas se prehibridaron durante 1-4 horas a 65°C con agitación constante en solución de hibridación de DNA (SSPE 5X, SDS 0,1%, reactivo Denhardt 5x, DNA de esperma de salmón 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ previamente desnaturalizado). La hibridación se realizó durante 48 horas a 65°C añadiendo a la solución anterior la sonda marcada con con [α -³²P]dCTP previamente desnaturalizada por calor. Tras la hibridación se lavó el filtro dos veces con SSC2x-SDS0,1% a Tamb, una vez durante 30 minutos con SSC2x-SDS0,5% a

50°C y una última vez con SSC2x-SDS0,5% durante 30 minutos a65°C Finalmente, se envolvieron los filtros en papel celofán y se expusieron a películas de autorradiografía.

6.15 Hibridación de RNA (northern)

Las membranas se equilibraron durante 1h a 65 °C con agitación constante en solución de hibridación (0,5M NaPO₄ pH 7,0; 7% SDS). La hibridación se realizó durante 12-16 h a 65 °C añadiendo a la solución anterior la sonda marcada con [α -³²P]dCTP previamente desnaturalizada por calor. Tras la hibridación se lavó el filtro una vez durante 5 min con solución de lavado (0,1x SSPE; 5 mM EDTA; 0,5% SDS) a temperatura ambiente y una vez durante 1 h con la misma solución de lavado a 65 °C. Finalmente, se envolvieron los filtros en papel celofán y se expusieron a películas de autorradiografía o a pantallas Fuji BAS.

6.15.1 .Rehibridación de filtros

La rehibridación de membranas con nuevas sondas se llevó a cabo tras eliminar la sonda previamente hibridada con un tratamiento de 5 a 30 minutos. en agitación con SDS 0,1% y SSPE 0,1% hirviendo.

6.16 Cuantificación de filtros

La cantidad de sonda marcada unida a los filtros fue cuantificada en un analizador de radiación β FUJIX FLA3000. En los Northern la cantidad de RNA se normalizó con con respecto al RNAr 28S con una sonda de 589 pb obtenida por PCR usando los cebadores rDNAup y rDNAlow, cuya secuencia se especifica en la tabla 7,(Chavez and Aguilera, 1997).

6.17 Detección de la expresión heteróloga de TAT *in vivo* por sistema de triple híbrido.

Para detectar que la expresión heteróloga de Tat a partir del promotor constitutivo de levadura fuera correcta usamos el sistema de triple híbrido puesto a punto por Fraldi et al., 2001 al que aportamos algunas modificaciones. Se cruzó la cepa de *S. cerevisiae* L40-coatIII con Y17202 para obtener la cepa MVcoat-b que presenta, una copia integrada del gen *lacZ* bajo 4 sitios de unión de LexA, una copia integrada de la secuencia que codifica la proteína de cubierta de MS2 fusionada con el dominio de unión a DNA de LexA y es auxotrofa para leucina, lysina, uracilo e histidina. Transformamos la cepa con los plásmidos pACTII-Cyct1 que lleva hCycT1 fusionada al dominio de activación del gen *GAL4* y con pIIIA-TAR-MS2 lleva el dominio TAR fusionado con la secuencia que codifica un RNA del fago MS2 y con p413GPDTat o con p413 GPD. Cambiamos el marcador del plásmido que lleva el marco de lectura abierto de Tat bajo el promotor GPD de triptófano a histidina ya que la cepa es protótrofa para el triptófano y auxótrofa para la histidina. En presencia de la proteína viral, Tat, TAR y hCycT1 se reconocen y forman un complejo que lleva el sitio de activación de GAL4 en proximidad de las secuencias reguladoras y activa la transcripción de *lacZ*.

Seleccionamos los transformantes en Sc-ura,-his,-leu y llevamos a cabo ensayos de actividad β -galactosidasa en caja para determinar la activación del sistema.

6.18 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Este método permite la amplificación exponencial de fragmentos de DNA con una polimerasa termoestable y un par de oligonucleótidos que sirven como cebadores de la enzima (Saiki et al., 1985). Se mezclaron en frío 42 μ l de agua, 5 μ l de tampón polimerasa, 1 μ l de mezcla de dNTPs (10 mM cada uno), 1 μ l de mezcla de cebadores 0,1 nmoles/ μ l cada uno, 1 μ l de DNA molde (ó 2

µl de lisado celular de levaduras) y 0,4 µl de polimerasa Expand™ High Fidelity o 0,7 µl de polimerasa MBL Taq Polimerasa. Se agitó brevemente con un “vortex” y se incubó en un termociclador ProGene (Techne Ltd.). La reacción tipo constó de 1 ciclo de 2 minutos a 94°C; 35 ciclos de (a) 30 s 94°C, (b) 30 s a la temperatura de emparejamiento y (c) tantos s de elongación como kbs tenga el producto a 72°C (polimerasa Expand™) o 68°C (polimerasa de MBI Taq polimerasa); 1 ciclo adicional de 10 minutos a 72°C (polimerasa Expand™) o a 68°C (polimerasa de MBI Taq polimerasa).

6.18.1 Cebadores de PCR usados en esta tesis

Los nombres y las secuencias de los cebadores de PCR usados en esta tesis se detallan a continuación, en la tabla 7.

Tabla 7. Cebadores usados en esta tesis.

Cebador	Secuencia	Ref
Falso Tar low	AGATCTCCTCTGGCTTTACTTTTCGCTTTCAAGTCCCT GTTTCGGGCGCCACTGCTAG	1
Falso Tar up	AGATCTGAGCCTGGGACGAGAGACCGATTGATCCC TTGGGACTGCTTAAGCCTCAATAAAG	1
FUS1-1F	CATGTGGACCCTTTCAAAC	1
FUS1-1R	TGATGGCTTATATCCTGCTC	1
HIV chip3	GCGACTGGTGAGTACGCCAA	1
HIV chip4	AGCTCCCTGCTTGCCCATAC	1
HIV chip5	AGCTACAACCATCCCTTCAGACAGG	1
HIV chip6	GCTGCTTGCTGTGCCTTTTTCTTAC	1
HIV up 1	GCTTAAGCCTCAATAAAGCTTG	1
HIV low 2	GGCTTTACTTTTCGCTTTCAAG	1
HIV up 5	GAGACATCAGAAGGCTGTAGAC	1
Pho5 MNasa low	ATCTTTTTGGGTACCAATCTTG	1

Pho5 MNasa up	TGTGTGCATCAAAGGATAGATG	1
Mn-asa dra low	AAACATTGGTAATCGAATTC	1
Mn-asa dra up	CAGGATCAGAAGAAGACTTAGATC	1
Nuc 3' Oligo low	GCTTCCTTGGTGTCTTTTAC	1
NUCtar low	TGACTAAAAGGGTCTGAGGGATC	1
NUCtar up	AGATCTGAGCCTGGGAGCTC	1
Pho5 MNase low	ATCTTTTTGGGTACCAATCTTG	1
Pho5 MNase up	TGTGTGCATCAAAGGATAGATG	1
Primer Tar	CAGAGTCACACAACAGACG	1
rDNA low	CAGGATCGGTGATTGTGC	2
rDNA up	TTGGAGAGGGCAACTTTGG	2
Tar BglII low	ATAAGATCTGGTCTAACCAGAGAGACCCTAGGAATC CTCAAATGGAATC	1
Tar BglII up	CGGAGCTCTGTTGGAATAGAAATCAACTATCATCTA CTAACTAGTATTTACATTACTAGTAT	1
Tarless nuc1	GATCTCTCGACGCAGGACTCG	1
Tarless nuc2	CTTAATACCGACGCTCTCGCAC	1
Ty1cen up	TACAGGAGAATCCGAGTGATG	1
Ty1cen low	GCTTATTGTTCAATTGAATCGG	1

1. Los oligonucleótidos se diseñaron usando el programa Oligo 4.01. Se muestran en la orientación 5' (izquierda) a 3' (derecha).

2. Referencia: (1) Esta tesis (2) (Chavez and Aguilera, 1997)

6.19 Geles desnaturizantes de proteínas (SDS-Poliacrilamida)

Para separar las proteínas se utilizó el método de geles de SDS-poliacrilamida desarrollado por Laemmli (Laemmli, 1970). Los geles se prepararon a partir de una solución de acrilamida:bisacrilamida (29:1) 30% al

porcentaje adecuado para separar proteínas del tamaño de las estudiadas. La zona de apilamiento se preparó en el tampón 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1 % SDS y la de separación en 375 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1 % SDS. Para desencadenar la polimerización se añadió persulfato amónico a una concentración final de 0,1% y TEMED. Las muestras diluidas al 1:1 en tampón de carga se hirvieron 3 minutos. para desnaturalizar las proteínas y se cargaron en el gel. Como marcador de tamaño se utilizó el marcador de amplio rango para geles de SDS- poliacrilamida suministrado por BioRad. El sistema de cubeta empleado fue Mini-PROTEAN 3 Cell de BioRad. Los geles se corrieron en el tampón 25 mM Tris pH 8,3; 194 mM glicina; 0,1% SDS; a un voltaje constante de 200 V hasta que el frente alcanzó el final del gel.

6.20 Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa

Las proteínas separadas en un gel de SDS-poliacrilamida se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Inmobilon-P, Millipore) por el método de transferencia húmeda. La membrana se activó sumergiéndola en metanol 100% unos 15 s, se lavó dos veces en agua milliQ y se equilibró en el tampón de transferencia (10x: 0,25 M Tris base; 1,92 M Glicina; pH 8,3). Para la transferencia se utilizó el sistema Mini Trans-blot de BioRad. La membrana activada se colocó sobre el gel al que previamente se le había cortado la fase de apilamiento, y ambos se introdujeron entre dos filtros Whatmann cortados al tamaño del gel y las espumas protectoras de los casetes. El conjunto se colocó en el casete de forma que el gel quedara orientado hacia el polo negativo y la membrana al positivo. El tanque se rellenó con tampón de transferencia frío y se conectó a una fuente de electroforesis. La transferencia se realizó a 4 °C y 400 mA durante 2 h. Al desmontar el sistema, si la transferencia había sido efectiva el marcador preteñido se veía en la membrana. La membrana se tiñió con colorante Ponceau S, para ver las proteínas transferidas.

6.21 Inmunodetección de proteínas en gel (western)

Las membranas con las proteínas se colocaron en un recipiente del tipo de una caja de Petri y se les añadió 50-200ml de solución bloqueante (5% leche desnatada en polvo; 0,1 % Tween 20 en PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl , 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄ pH 7,3). Se incubó de 1 a 16 h a Tamb en agitación suave. Se eliminó el tampón. Se preparó una dilución apropiada de primer anticuerpo en la solución de bloqueo. Se vertió el anticuerpo sobre el filtro y se incubó 1 h a Tamb o toda la noche a 4 °C en agitación suave. Se recogió el primer anticuerpo y se lavó la membrana cuatro veces 5 minutos cada vez con el tampón de lavado (0,1% Tween 20 en PBS) para eliminar uniones inespecíficas del anticuerpo. Se repitió la incubación con una dilución recomendada del segundo anticuerpo durante 1h a temperatura ambiente. Se lavó cuatro veces 5 minutos cada vez con el tampón de lavado y se reveló con el sistema de detección de quimioluminiscencia de Amersham (ECL+plus).

6.22 Extensión de un cebador mediante transcriptasa inversa (primer extension)

Mediante protocolo de extracción de RNA con fenol ácido se extrajo RNA de 10ml de un cultivo en SC-Ura a D.O.₆₀₀ 0,8 de un transformante de W303-1A con el plásmido pGAL1-HIV. Se resuspendieron 25µg de RNA en 11,5 µl de H₂O MilliQ anteriormente tratada con DEPC y autoclavada.

Se mezcló el RNA con 1,5 µl de tampón de hibridación (KCl 150mM, Tris-HCl pH 8 10mM, EDTA pH8 1mM) y con 2ml del cebador Primer Tar (nucleótidos 564-583 de HIV1 NL4-3) marcado en su extremo 5' con ³²P (6.12.3) resuspendido en H₂O a una concentración de 1 µM. Las disoluciones usadas en este protocolo se prepararon con H₂O MilliQ tratada con DEPC y autoclavada para eliminar endonucleasas de RNA y evitar la degradación del RNA

Se incubó la mezcla a 85°C por 10 minutos para eliminar estructuras secundarias del RNA que dificultarían la hibridación del cebador con el molde, y luego se incubó la mezcla a 50°C durante 1 hora para llevar a cabo la hibridación del cebador con el molde.

Se añadió a la mezcla de RNA y cebador una mezcla precalentada a 47°C de 4,5µl de DTT 0,1M proporcionado por el fabricante con SuperScript™ II Reverse Transcriptase; 4,5 µl de dNTPs (cada uno a una concentración de 0,25 mM); 9 µl de tampón First Strand proporcionado por el fabricante con SuperScript™ II Reverse Transcriptase (KCl 375mM, Tris-HCl pH 8,3 250mM y MgCl₂ 15mM) finalmente, se añadió 1 µl de SuperScript™ II Reverse Transcriptase.

Se llevó a cabo la extensión a 47°C durante 1 hora.

Se eliminó el RNA mediante tratamiento con 40 µg de RNAasa A a 37°C y las proteínas mediante tratamiento con 80µl de fenol equilibrado a pH8 y 80µl de cloroformo. Se centrifugó 5 minutos a velocidad máxima, se precipitó el sobrenadante añadiendo 15µl de acetato sódico pH 5,2 3M y 500 µl de etanol 96% a -20°C durante 2 horas. Tras centrifugar 10 minutos a velocidad máxima y lavar con 200µl de etanol 70%, se secó el precipitado y se resuspendió en 5µl de tampón de STOP (95% de formamida, 20mM de EDTA, 0,05% de azul de bromofenol y 0,05% de cianol xileno) diluido 1:1 en H₂O MilliQ.

Se llevó a cabo la secuenciación del plásmido pGAL1-HIV con el mismo cebador utilizado para la extensión con transcriptasa inversa. Para ellos utilizamos en T7 Sequencing Kit (USB) y seguimos las instrucciones del fabricante para llevar a cabo la secuenciación usando como nucleótido marcado radiactivamente ³⁵S-dATP.

Antes de ser usadas las muestras se desnaturalizaron mediante incubación a 80°C durante 5 minutos. La electroforesis se realizó en un gel de poliacrilamida desnaturalizante de 50cm de longitud y 0,4mm de grosor, preparado con el sistema Gel System Sequi-Gen Sequencing gel (BioRad).

La composición del gel es 6% de acrilamida:bisacrilamida (19:1), urea 7M y TBE1X. Tras preparar la mezcla del gel, ésta se filtró y se añadió a los 50ml, 500 μ l de persulfato de amonio 10% y 50 μ l de TEMED (N,N,N',N'tetrametiletilendiamina). Una vez extendido el gel de secuenciación, se dejó polimerizar al menos 1 hora y se hizo una pre-carrera en tampón TBE1x durante una hora a 50W hasta que el gel alcance una temperatura de 45°C-50°C. La muestra y el producto de la secuenciación se desnaturalizaron a 80°C durante 5 minutos y se cargaron en el gel. Se sometieron las muestras a electroforesis 2000V durante el tiempo necesario. El gel se secó en un secador DryGel Sr, Slab Gel Dryer Model SE1160 (Hoeffer Scientific Instrument). La exposición se hizo en películas de rayos X con pantalla amplificadora (Hyperscreen™ de Amersham Biosciences).

6.23 Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina se llevaron a cabo siguiendo el protocolo descrito por Hecht *et.al.* (1999) con algunas modificaciones.

6.23.1 Preparación del cultivo

Para el ChIP sobre la secuencia HIV de δ HIV y δ HIVTARless, se prepararon 50 ml de cultivo en SC-Ura de transformantes de ARG3 con los plásmidos δ HIV y δ HIVTARless, y se recogieron en fase exponencial. Se añadió formaldehído al 1% v/v, para unir el DNA y las proteínas, y se incubó durante 15 minutos a T amb con agitación. A continuación, se añadió glicina a 125mM y se dejó 5 minutos a T amb con agitación para inactivar el formaldehído. Se centrifugó a 1500 g a 4 °C durante 5 minutos. Las células se lavaron cuatro veces con tampón TBS (150mM NaCl; Tris-HCl 20mM; pH 7,5) frío.

6.23.2 Preparación del extracto celular y rotura del DNA.

Las células se resuspendieron en 300 μ l de tampón de lisis (50 mM HEPES/KOH pH 7,5; 140 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% tritón X-100; deoxicolato sódico 0,1%;, benzamidina 1,5 mg/ml, PMSF 1mM) en el momento de su utilización se le añadió una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete-Roche). A continuación se añadió 1 volumen de bolas de vidrio y se agitó durante 12 minutos a 4°C, para romper las células. Se añadieron 300 μ l de tampón de lisis y se eliminaron las bolas por centrifugación. Se procedió a la sonicación, para fragmentar el DNA en trozos de entre 0,2-0,4 kbs. Se utilizó un sonicador Branson Sonifier 250 y cada muestra fue sometida siete veces a las siguientes condiciones de sonicación: output 2, duty constante durante 10 segundos. A continuación se centrifugó durante 5 minutos a 4°C a máxima velocidad, se pasó el sobrenadante a un tubo limpio y se centrifugó durante 15 minutos a 4°C a máxima velocidad. De esta forma se conseguía un volumen aproximado de muestra de 500 μ l. Como control de la cantidad de DNA de la que partimos para la inmunoprecipitación, apartamos 10 μ l de la muestra (input) y el resto se inmunoprecipitó.

6.23.3 Inmunoprecipitación

Se tomaron 50 μ l por muestra de bolas magnéticas unidas a IgG (DynaBeads), se incubaron durante toda la noche en agitación lenta a 4°C con 10 μ l de anticuerpo anti-c-myc (Santra Cruz Biotechnology) y se lavaron 4 veces con PBS(140mM NaCl; 2,5mM KCl, 8,1mM Na₂HPO₄, 1,5mM KH₂PO₄, pH 7,5)/BSA 5mg/ml. Las bolas magnéticas, resuspendidas tras el lavado en PBS/BSA, se incubaron con el lisado durante 90 minutos a 4°C en agitación suave y constante. Tras la incubación se realizaron lavados sucesivos con 1ml de tampón de lisis por dos veces, 1ml de tampón de lisis con 380mM de NaCl por dos veces, 1ml de tampón de lavado (TrisHCL pH8 10 mM;EDTA 1 mM ; LiCl 250 mM; NP40 0,5%; SDS 0,5%, deoxicolato sódico 0,5%) por dos veces y 1ml de tampón TE (Tris-HCL pH 8 50mM;EDTA 10 mM) una vez. A

continuación se eluyeron las proteínas de las bolas magnéticas incubando durante 10 minutos a 65°C con 80µl de TE+1% de SDS. Se tomaron 60 µl del sobrenadante (inmunoprecipitado). Se añadieron al input 40 µl de de TE+1% de SDS y se incubó durante 10 minutos a 65°C como el inmunoprecipitado.

6.23.4 Procesamiento del input y del precipitado.

A los 60µl de muestra se le añaden 90µl de TE con 1% de SDS y se incubaron a 65° C durante toda la noche para separar el DNA de las proteínas. Seguidamente se añadieron 150 µl de TE y 7,5µl de proteinasa K 20 mg/ml y se incubó 90 minutos a 37 °C en agitación. El DNA se purificó con el kit GFX de Amersham. Tanto el input como el precipitado se eluyeron en 50 µl de TE. El DNA se conservó a -20°C. Para la PCR se utilizaron distintas diluciones del input, hasta estar seguro de que la reacción no estaba saturada. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo tal y como se describe en el apartado 20. Los cebadores utilizados fueron el HIV 1 up y HIV 2 low, que amplifican del nucleótido 62 al 220 del fragmento de HIV1 clonado en pδHIV, HIV Chip3 y HIV Chip4 amplifican del nucleótido 282 al 457 y HIV Chip5 y HIV Chip6 que amplifican del nucleótido 523 al 714. Como cebadores intergénicos se utilizaron los cebadores FUS1-1F y FUS1-1R que amplifican del nucleótido 71506 al 71785 del cromosoma III. La secuencia de estos cebadores se detalla en la tabla 6. Estos cebadores amplifican fragmentos de 150-300 pb que se resuelven en geles al 3% agarosa-BrEt.

Los fragmentos amplificados por PCR, tras haber sido separado en los geles fueron cuantificados en un analizador de fluorescencia FUJIX FLA3000. El enriquecimiento de la RNAPolIII en las distintas zonas de las construcciones analizadas se calculó como el cociente entre la intensidad de cada fragmento obtenidos con los cebadores específicos y la de la región intergénica obtenida en la misma PCR para los inmunoprecipitados (IP) normalizadas con respecto a la relación obtenida en el "input" (I).

6.24 Análisis de la estructura de la cromatina.

6.24.1 Digestión parcial con la MNasa.

Se realizó según Bernardi et al (1991) (Bernardi et al., 1991). Las células se obtuvieron a partir de 500ml de cultivos de la estirpe de *S. cerevisiae* Y13232 transformada con δ HIV o δ HIVTARless incubados hasta una D.O.₆₆₀ = 0,9.

6.24.1.1 Obtención de esferoplastos.

Se lavaron las células con H₂O, se estimó su peso y se resuspendieron en 2 ml de solución de preincubación A (EDTA pH8 3mM, 2-mercaptoetanol 0,7M) por g de células. Tras incubar durante 10 minutos a 30°C con agitación, las células se lavaron con 5 volúmenes de sorbitol 1M y se incubaron en 5 volúmenes de sorbitol 1M, 2-mercaptoetanol 5mM, zymoliasa 100T 0,04% durante 30 minutos a 30°C.

6.24.1.2 Digestión con MNasa

Se centrifugaron los esferoplastos a 4°C, se lavaron con 50ml de solución de lavado 1 (sorbitol 1M, Tris-HCl pH8 20mM, EDTA pH8 1mM, NaCl 150mM) preenfriado. Se lavaron con 50ml de solución de lavado 1-PMSF 2mM preenfriado y finalmente se resuspendieron en 2ml/g de solución de lavado 2 (Tris-HCl pH8 20mM, EDTA pH8 1mM, NaCl 150mM, triton X-100 0,2%, PMSF1mM).

Se tomaron alícuotas de 0,3-0,5ml y se diluyeron en 10 volúmenes de tampón de MN-asa (Tris-HCl pH8 15mM, EDTA pH8 0,2mM, EGTA 0,2 mM, NaCl 50mM, CaCl 1,5mM, 2-mercaptoetanol 5mM) y se incubaron con varias concentraciones de MNasa (500, 250, 125, 75, 37,5, 18,5, 9, 4,5, 2,25, 1,12 mU/ml) durante 20 minutos a 37°C. La reacción se paró con 60 μ l de EDTA pH8 0,5M, 40 μ l de Tris-HCl pH8,8 1M, 150 μ l de SDS10% y 1,5mg de proteinasaK en solución.

6.24.1.3 Extracción de DNA desde los esferoplastos.

Tras incubar 30minutos a 65°C se precipitó el SDS incubando en hielo durante 1 hora con KCl pH5,5 1,25M. Las alícuotas se centrifugaron y se

fenolizó dos veces el sobrenadante, con fenol:cloroformo:isoamílico (24:24:1). El DNA se trató con RNAasa 50 µg/ml y, tras una fenolización se precipitó con NaCl 0,3M y 2,5 volúmenes de etanol 96%, se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 50µl de TE.

Para los controles con DNA desnudo se siguió el mismo protocolo de obtención de esferoplastos y se continuó extrayendo el DNA como detallado en el apartado anterior. Como último paso, se llevó a cabo la digestión con la MNasa con concentraciones 100 veces inferiores de enzima. Finalmente se fenolizó el DNA con fenol:cloroformo:isoamílico (24:24:1), se precipitó con NaCl 0,3M y 2,5 volúmenes de etanol 96%, se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 50µl de TE.

6.24.2 Mapeo de los sitios de resistencia de la MNasa por marcaje indirecto de extremos (indirect end-labeling).

Las muestras de DNA desnudo y cromatina con los grados de digestión adecuados se cortaron con distintas enzima de restricción.

En el caso de los transformantes de pδHIV la enzima usada fue *EcoRI*, y para los transformantes de pδHIVTARless se usó *DraI*.

Las diferentes bandas se resolvieron en un gel de agarosa al1% en TAE, se transfirieron a una membrana de nylon HybondN+ (Amersham) y se hibridaron con las sondas adecuadas marcadas por PCR con [α -³²P]dCTP.

6.24.3 Mapeo de nucleosomas por sensibilidad a MNasa

Se llevó a cabo el tratamiento del DNA con MNasa como descrito en el apartado 6.24.1.

Las muestras de cromatina con los grados de digestión adecuados se corrieron en un gel de agarosa al1% en TAE, se transfirieron a una membrana de nylon HybondN+ (Amersham) y se hibridaron con las sondas adecuadas marcadas por PCR con [α -³²P]dCTP.

7 Bibliografía

- Adelman, K., Marr, M.T., Werner, J., Saunders, A., Ni, Z., Andrulis, E.D. and Lis, J.T. (2005) Efficient release from promoter-proximal stall sites requires transcript cleavage factor TFIIS. *Mol Cell*, **17**, 103-112.
- Ahn, S.H., Kim, M. and Buratowski, S. (2004) Phosphorylation of serine 2 within the RNA polymerase II C-terminal domain couples transcription and 3' end processing. *Mol Cell*, **13**, 67-76.
- Andrulis, E.D., Guzman, E., Doring, P., Werner, J. and Lis, J.T. (2000) High-resolution localization of *Drosophila* Spt5 and Spt6 at heat shock genes in vivo: roles in promoter proximal pausing and transcription elongation. *Genes Dev*, **14**, 2635-2649.
- Auewarakul, P., Wacharapornin, P., Srichatrapimuk, S., Chutipongtanate, S. and Puthavathana, P. (2005) Uncoating of HIV-1 requires cellular activation. *Virology*, **337**, 93-101.
- Bai, L., Shundrovsky, A. and Wang, M.D. (2004) Sequence-dependent kinetic model for transcription elongation by RNA polymerase. *J Mol Biol*, **344**, 335-349.
- Bannwarth, S. and Gagnon, A. (2005) HIV-1 TAR RNA: the target of molecular interactions between the virus and its host. *Curr HIV Res*, **3**, 61-71.
- Belotserkovskaya, R. and Reinberg, D. (2004) Facts about FACT and transcript elongation through chromatin. *Curr Opin Genet Dev*, **14**, 139-146.
- Bentley, D. (2002) The mRNA assembly line: transcription and processing machines in the same factory. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 336-342.
- Bentley, D.L. (2005) Rules of engagement: co-transcriptional recruitment of pre-mRNA processing factors. *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 251-256.
- Berkhout, B. and Jeang, K.T. (1989) trans activation of human immunodeficiency virus type 1 is sequence specific for both the single-stranded bulge and loop of the trans-acting-responsive hairpin: a quantitative analysis. *J Virol*, **63**, 5501-5504.
- Berkhout, B. and Jeang, K.T. (1991) Detailed mutational analysis of TAR RNA: critical spacing between the bulge and loop recognition domains. *Nucleic Acids Res*, **19**, 6169-6176.
- Bernardi, F., Koller, T. and Thoma, F. (1991) The *ade6* gene of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* has the same chromatin structure in the chromosome and in plasmids. *Yeast*, **7**, 547-558.
- Betz, J.L., Chang, M., Washburn, T.M., Porter, S.E., Mueller, C.L. and Jaehning, J.A. (2002) Phenotypic analysis of Paf1/RNA polymerase II complex mutations reveals connections to cell cycle regulation, protein synthesis, and lipid and nucleic acid metabolism. *Mol Genet Genomics*, **268**, 272-285.
- Bieniasz, P.D., Grdina, T.A., Bogerd, H.P. and Cullen, B.R. (1998) Recruitment of a protein complex containing Tat and cyclin T1 to TAR governs the species specificity of HIV-1 Tat. *Embo J*, **17**, 7056-7065.
- Bolivar, F. and Backman, K. (1979) Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors. *Methods Enzymol*, **68**, 245-267.
- Borggreffe, T., Davis, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Kornberg, R.D. (2002) A complex of the Srb8, -9, -10, and -11 transcriptional regulatory proteins from yeast. *J Biol Chem*, **277**, 44202-44207.
- Boris-Lawrie, K., Roberts, T.M. and Hull, S. (2001) Retroviral RNA elements integrate components of post-transcriptional gene expression. *Life Sci*, **69**, 2697-2709.
- Bortvin, A. and Winston, F. (1996) Evidence that Spt6p controls chromatin structure by a direct interaction with histones. *Science*, **272**, 1473-1476.
- Borukhov, S., Lee, J. and Laptenko, O. (2005) Bacterial transcription elongation factors: new insights into molecular mechanism of action. *Mol Microbiol*, **55**, 1315-1324.

- Boube, M., Joulia, L., Cribbs, D.L. and Bourbon, H.M. (2002) Evidence for a mediator of RNA polymerase II transcriptional regulation conserved from yeast to man. *Cell*, **110**, 143-151.
- Bourgeois, C.F., Kim, Y.K., Churcher, M.J., West, M.J. and Karn, J. (2002) Spt5 cooperates with human immunodeficiency virus type 1 Tat by preventing premature RNA release at terminator sequences. *Mol Cell Biol*, **22**, 1079-1093.
- Bres, V., Gomes, N., Pickle, L. and Jones, K.A. (2005) A human splicing factor, SKIP, associates with P-TEFb and enhances transcription elongation by HIV-1 Tat. *Genes Dev*, **19**, 1211-1226.
- Brown, C.E., Howe, L., Sousa, K., Alley, S.C., Carrozza, M.J., Tan, S. and Workman, J.L. (2001) Recruitment of HAT complexes by direct activator interactions with the ATM-related Tra1 subunit. *Science*, **292**, 2333-2337.
- Bukrinskaia, A.G., Vorkunova, G.K. and Burshtein, M.E. (2005) [Assembly and maturation of HIV-1--targets for new anti-HIV compounds]. *Mol Gen Mikrobiol Virusol*, 18-23.
- Byers, S.A., Price, J.P., Cooper, J.J., Li, Q. and Price, D.H. (2005) HEXIM2, a HEXIM1-related protein, regulates positive transcription elongation factor b through association with 7SK. *J Biol Chem*, **280**, 16360-16367.
- Caron, C., Col, E. and Khochbin, S. (2003) The viral control of cellular acetylation signaling. *Bioessays*, **25**, 58-65.
- Carrozza, M.J., Li, B., Florens, L., Suganuma, T., Swanson, S.K., Lee, K.K., Shia, W.J., Anderson, S., Yates, J., Washburn, M.P. and Workman, J.L. (2005) Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription. *Cell*, **123**, 581-592.
- Casse, C., Giannoni, F., Nguyen, V.T., Dubois, M.F. and Bensaude, O. (1999) The transcriptional inhibitors, actinomycin D and alpha-amanitin, activate the HIV-1 promoter and favor phosphorylation of the RNA polymerase II C-terminal domain. *J Biol Chem*, **274**, 16097-16106.
- Caumont, A.B., Jamieson, G.A., Pichuanes, S., Nguyen, A.T., Litvak, S. and Dupont, C. (1996) Expression of functional HIV-1 integrase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* leads to the emergence of a lethal phenotype: potential use for inhibitor screening. *Curr Genet*, **29**, 503-510.
- Chao, S.H., Fujinaga, K., Marion, J.E., Taube, R., Sausville, E.A., Senderowicz, A.M., Peterlin, B.M. and Price, D.H. (2000) Flavopiridol inhibits P-TEFb and blocks HIV-1 replication. *J Biol Chem*, **275**, 28345-28348.
- Chao, S.H. and Price, D.H. (2001) Flavopiridol inactivates P-TEFb and blocks most RNA polymerase II transcription in vivo. *J Biol Chem*, **276**, 31793-31799.
- Chavez, S. and Aguilera, A. (1997) The yeast HPR1 gene has a functional role in transcriptional elongation that uncovers a novel source of genome instability. *Genes Dev*, **11**, 3459-3470.
- Chavez, S., Garcia-Rubio, M., Prado, F. and Aguilera, A. (2001) Hpr1 is preferentially required for transcription of either long or G+C-rich DNA sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **21**, 7054-7064.
- Chen, D., Fong, Y. and Zhou, Q. (1999) Specific interaction of Tat with the human but not rodent P-TEFb complex mediates the species-specific Tat activation of HIV-1 transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 2728-2733.
- Cheng, C. and Sharp, P.A. (2003) RNA polymerase II accumulation in the promoter-proximal region of the dihydrofolate reductase and gamma-actin genes. *Mol Cell Biol*, **23**, 1961-1967.
- Cherry, J.M., Ball, C., Weng, S., Juvik, G., Schmidt, R., Adler, C., Dunn, B., Dwight, S., Riles, L., Mortimer, R.K. and Botstein, D. (1997) Genetic and physical maps of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, **387**, 67-73.

- Chiu, Y.L., Coronel, E., Ho, C.K., Shuman, S. and Rana, T.M. (2001) HIV-1 Tat protein interacts with mammalian capping enzyme and stimulates capping of TAR RNA. *J Biol Chem*, **276**, 12959-12966.
- Chiu, Y.L., Ho, C.K., Saha, N., Schwer, B., Shuman, S. and Rana, T.M. (2002) Tat stimulates cotranscriptional capping of HIV mRNA. *Mol Cell*, **10**, 585-597.
- Cho, E.J., Kobor, M.S., Kim, M., Greenblatt, J. and Buratowski, S. (2001) Opposing effects of Ctk1 kinase and Fcp1 phosphatase at Ser 2 of the RNA polymerase II C-terminal domain. *Genes Dev*, **15**, 3319-3329.
- Clapham, P.R. and McKnight, A. (2001) HIV-1 receptors and cell tropism. *Br Med Bull*, **58**, 43-59.
- Clark-Adams, C.D., Norris, D., Osley, M.A., Fassler, J.S. and Winston, F. (1988) Changes in histone gene dosage alter transcription in yeast. *Genes Dev*, **2**, 150-159.
- Coleman, R.A., Taggart, A.K., Burma, S., Chicca, J.J., 2nd and Pugh, B.F. (1999) TFIIA regulates TBP and TFIID dimers. *Mol Cell*, **4**, 451-457.
- Conaway, J.W. and Conaway, R.C. (1991) Initiation of eukaryotic messenger RNA synthesis. *J Biol Chem*, **266**, 17721-17724.
- Costa, P.J. and Arndt, K.M. (2000) Synthetic lethal interactions suggest a role for the *Saccharomyces cerevisiae* Rtf1 protein in transcription elongation. *Genetics*, **156**, 535-547.
- Coull, J.J., He, G., Melander, C., Rucker, V.C., Dervan, P.B. and Margolis, D.M. (2002) Targeted derepression of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat by pyrrole-imidazole polyamides. *J Virol*, **76**, 12349-12354.
- Cullen, B.R. (2003) Nuclear RNA export. *J Cell Sci*, **116**, 587-597.
- Daniel, J.A., Torok, M.S., Sun, Z.W., Schieltz, D., Allis, C.D., Yates, J.R., 3rd and Grant, P.A. (2004) Deubiquitination of histone H2B by a yeast acetyltransferase complex regulates transcription. *J Biol Chem*, **279**, 1867-1871.
- Daviet, L., Bois, F., Battisti, P.L. and Gagnon, A. (1998) Identification of limiting steps for efficient trans-activation of HIV-1 promoter by Tat in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **273**, 28219-28228.
- de Laat, W. and Grosveld, F. (2003) Spatial organization of gene expression: the active chromatin hub. *Chromosome Res*, **11**, 447-459.
- de Noronha, C.M., Sherman, M.P., Lin, H.W., Cavrois, M.V., Moir, R.D., Goldman, R.D. and Greene, W.C. (2001) Dynamic disruptions in nuclear envelope architecture and integrity induced by HIV-1 Vpr. *Science*, **294**, 1105-1108.
- Dudley, A.M., Gansheroff, L.J. and Winston, F. (1999) Specific components of the SAGA complex are required for Gcn4- and Gcr1-mediated activation of the *his4-912delta* promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **151**, 1365-1378.
- Dutko, J.A., Schafer, A., Kenny, A.E., Cullen, B.R. and Curcio, M.J. (2005) Inhibition of a yeast LTR retrotransposon by human APOBEC3 cytidine deaminases. *Curr Biol*, **15**, 661-666.
- el Kharroubi, A. and Martin, M.A. (1996) cis-acting sequences located downstream of the human immunodeficiency virus type 1 promoter affect its chromatin structure and transcriptional activity. *Mol Cell Biol*, **16**, 2958-2966.
- el Kharroubi, A., Piras, G., Zensen, R. and Martin, M.A. (1998) Transcriptional activation of the integrated chromatin-associated human immunodeficiency virus type 1 promoter. *Mol Cell Biol*, **18**, 2535-2544.
- Endoh, M., Zhu, W., Hasegawa, J., Watanabe, H., Kim, D.K., Aida, M., Inukai, N., Narita, T., Yamada, T., Furuya, A., Sato, H., Yamaguchi, Y., Mandal, S.S.,

- Reinberg, D., Wada, T. and Handa, H. (2004) Human Spt6 stimulates transcription elongation by RNA polymerase II in vitro. *Mol Cell Biol*, **24**, 3324-3336.
- Finzi, D., Blankson, J., Siliciano, J.D., Margolick, J.B., Chadwick, K., Pierson, T., Smith, K., Lisziewicz, J., Lori, F., Flexner, C., Quinn, T.C., Chaisson, R.E., Rosenberg, E., Walker, B., Gange, S., Gallant, J. and Siliciano, R.F. (1999) Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med*, **5**, 512-517.
- Flores, O., Lu, H., Killeen, M., Greenblatt, J., Burton, Z.F. and Reinberg, D. (1991) The small subunit of transcription factor IIF recruits RNA polymerase II into the preinitiation complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 9999-10003.
- Fong, Y.W. and Zhou, Q. (2001) Stimulatory effect of splicing factors on transcriptional elongation. *Nature*, **414**, 929-933.
- Formosa, T., Ruone, S., Adams, M.D., Olsen, A.E., Eriksson, P., Yu, Y., Rhoades, A.R., Kaufman, P.D. and Stillman, D.J. (2002) Defects in SPT16 or POB3 (yFACT) in *Saccharomyces cerevisiae* cause dependence on the Hir/Hpc pathway: polymerase passage may degrade chromatin structure. *Genetics*, **162**, 1557-1571.
- Fraldi, A., Varrone, F., Napolitano, G., Michels, A.A., Majello, B., Bensaude, O. and Lania, L. (2005) Inhibition of Tat activity by the HEXIM1 protein. *Retrovirology*, **2**, 42.
- Freed, E.O. (1998) HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology*, **251**, 1-15.
- Fujinaga, K., Cujec, T.P., Peng, J., Garriga, J., Price, D.H., Grana, X. and Peterlin, B.M. (1998) The ability of positive transcription elongation factor B to transactivate human immunodeficiency virus transcription depends on a functional kinase domain, cyclin T1, and Tat. *J Virol*, **72**, 7154-7159.
- Fujinaga, K., Irwin, D., Huang, Y., Taube, R., Kurosu, T. and Peterlin, B.M. (2004) Dynamics of human immunodeficiency virus transcription: P-TEFb phosphorylates RD and dissociates negative effectors from the transactivation response element. *Mol Cell Biol*, **24**, 787-795.
- Fujinaga, K., Taube, R., Wimmer, J., Cujec, T.P. and Peterlin, B.M. (1999) Interactions between human cyclin T, Tat, and the transactivation response element (TAR) are disrupted by a cysteine to tyrosine substitution found in mouse cyclin T. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 1285-1290.
- Gallay, P., Hope, T., Chin, D. and Trono, D. (1997) HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 9825-9830.
- Gallo, R.C., Sarin, P.S., Gelmann, E.P., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V.S., Mann, D., Sidhu, G.D., Stahl, R.E., Zolla-Pazner, S., Leibowitch, J. and Popovic, M. (1983) Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, **220**, 865-867.
- Garber, M.E., Wei, P., KewalRamani, V.N., Mayall, T.P., Herrmann, C.H., Rice, A.P., Littman, D.R. and Jones, K.A. (1998) The interaction between HIV-1 Tat and human cyclin T1 requires zinc and a critical cysteine residue that is not conserved in the murine CycT1 protein. *Genes Dev*, **12**, 3512-3527.
- Garfinkel, D.J., Hedge, A.M., Youngren, S.D. and Copeland, T.D. (1991) Proteolytic processing of pol-TYB proteins from the yeast retrotransposon Ty1. *J Virol*, **65**, 4573-4581.
- Garriga, J. and Grana, X. (2004) Cellular control of gene expression by T-type cyclin/CDK9 complexes. *Gene*, **337**, 15-23.

- Gerber, M. and Shilatfard, A. (2003) Transcriptional elongation by RNA polymerase II and histone methylation. *J Biol Chem*, **278**, 26303-26306.
- Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R. and Woods, R.A. (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*, **11**, 355-360.
- Gnatt, A. (2002) Elongation by RNA polymerase II: structure-function relationship. *Biochim Biophys Acta*, **1577**, 175-190.
- Grant, P.A., Duggan, L., Cote, J., Roberts, S.M., Brownell, J.E., Candau, R., Ohba, R., Owen-Hughes, T., Allis, C.D., Winston, F., Berger, S.L. and Workman, J.L. (1997) Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev*, **11**, 1640-1650.
- Groschel, B. and Bushman, F. (2005) Cell cycle arrest in G2/M promotes early steps of infection by human immunodeficiency virus. *J Virol*, **79**, 5695-5704.
- Gu, W. and Reines, D. (1995) Variation in the size of nascent RNA cleavage products as a function of transcript length and elongation competence. *J Biol Chem*, **270**, 30441-30447.
- Gu, W., Wind, M. and Reines, D. (1996) Increased accommodation of nascent RNA in a product site on RNA polymerase II during arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 6935-6940.
- Guo, Z. and Stiller, J.W. (2005) Comparative genomics and evolution of proteins associated with RNA polymerase II C-terminal domain. *Mol Biol Evol*, **22**, 2166-2178.
- Haguenauer-Tsapis, R. and Hinnen, A. (1984) A deletion that includes the signal peptidase cleavage site impairs processing, glycosylation, and secretion of cell surface yeast acid phosphatase. *Mol Cell Biol*, **4**, 2668-2675.
- Han, Y., Lassen, K., Monie, D., Sedaghat, A.R., Shimoji, S., Liu, X., Pierson, T.C., Margolick, J.B., Siliciano, R.F. and Siliciano, J.D. (2004) Resting CD4+ T cells from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected individuals carry integrated HIV-1 genomes within actively transcribed host genes. *J Virol*, **78**, 6122-6133.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Harrich, D., Mavankal, G., Mette-Snyder, A. and Gaynor, R.B. (1995) Human immunodeficiency virus type 1 TAR element revertant viruses define RNA structures required for efficient viral gene expression and replication. *J Virol*, **69**, 4906-4913.
- Hartzog, G.A., Speer, J.L. and Lindstrom, D.L. (2002) Transcript elongation on a nucleoprotein template. *Biochim Biophys Acta*, **1577**, 276-286.
- Hartzog, G.A., Wada, T., Handa, H. and Winston, F. (1998) Evidence that Spt4, Spt5, and Spt6 control transcription elongation by RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*, **12**, 357-369.
- Haseltine, W.A. (1991) Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1. *Faseb J*, **5**, 2349-2360.
- Hauber, J. and Cullen, B.R. (1988) Mutational analysis of the trans-activation-responsive region of the human immunodeficiency virus type I long terminal repeat. *J Virol*, **62**, 673-679.
- He, J., Choe, S., Walker, R., Di Marzio, P., Morgan, D.O. and Landau, N.R. (1995) Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity. *J Virol*, **69**, 6705-6711.

- Hirschhorn, J.N., Brown, S.A., Clark, C.D. and Winston, F. (1992) Evidence that SNF2/SWI2 and SNF5 activate transcription in yeast by altering chromatin structure. *Genes Dev*, **6**, 2288-2298.
- Hottiger, M. and Hubscher, U. (1996) Human Immunodeficiency Virus type 1 reverse transcriptase. *Biol Chem Hoppe Seyler*, **377**, 97-120.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol*, **153**, 163-168.
- Iyer, V. and Struhl, K. (1996) Absolute mRNA levels and transcriptional initiation rates in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 5208-5212.
- Izban, M.G. and Luse, D.S. (1991) Transcription on nucleosomal templates by RNA polymerase II in vitro: inhibition of elongation with enhancement of sequence-specific pausing. *Genes Dev*, **5**, 683-696.
- Johnston, M.R., D. (1984) Sequence that regulate the divergent *GAL1-GAL10* promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *mol cell bio*, **4**, 1440-1448.
- Jona, G., Wittschieben, B.O., Svejstrup, J.Q. and Gileadi, O. (2001) Involvement of yeast carboxy-terminal domain kinase I (CTDK-I) in transcription elongation in vivo. *Gene*, **267**, 31-36.
- Jones, J.C., Phatnani, H.P., Haystead, T.A., MacDonald, J.A., Alam, S.M. and Greenleaf, A.L. (2004) C-terminal repeat domain kinase I phosphorylates Ser2 and Ser5 of RNA polymerase II C-terminal domain repeats. *J Biol Chem*, **279**, 24957-24964.
- Jordan, A., Defechereux, P. and Verdin, E. (2001) The site of HIV-1 integration in the human genome determines basal transcriptional activity and response to Tat transactivation. *Embo J*, **20**, 1726-1738.
- Jowett, J.B., Planelles, V., Poon, B., Shah, N.P., Chen, M.L. and Chen, I.S. (1995) The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle. *J Virol*, **69**, 6304-6313.
- Kaplan, C.D., Laprade, L. and Winston, F. (2003) Transcription elongation factors repress transcription initiation from cryptic sites. *Science*, **301**, 1096-1099.
- Karn, J. (1999) Tackling Tat. *J Mol Biol*, **293**, 235-254.
- Katzman, M. and Sudol, M. (1996) Nonspecific alcoholysis, a novel endonuclease activity of human immunodeficiency virus type 1 and other retroviral integrases. *J Virol*, **70**, 2598-2604.
- Kent, N.A., Karabetsov, N., Politis, P.K. and Mellor, J. (2001) In vivo chromatin remodeling by yeast ISWI homologs Isw1p and Isw2p. *Genes Dev*, **15**, 619-626.
- Keogh, M.C., Podolny, V. and Buratowski, S. (2003) Bur1 kinase is required for efficient transcription elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol*, **23**, 7005-7018.
- Kessler, M. and Mathews, M.B. (1992) Premature termination and processing of human immunodeficiency virus type 1-promoted transcripts. *J Virol*, **66**, 4488-4496.
- Kettenberger, H., Armache, K.J. and Cramer, P. (2004) Complete RNA polymerase II elongation complex structure and its interactions with NTP and TFIIIS. *Mol Cell*, **16**, 955-965.
- Kiernan, R.E., Vanhulle, C., Schiltz, L., Adam, E., Xiao, H., Maudoux, F., Calomme, C., Burny, A., Nakatani, Y., Jeang, K.T., Benkirane, M. and Van Lint, C. (1999) HIV-1 tat transcriptional activity is regulated by acetylation. *Embo J*, **18**, 6106-6118.

- Killeen, M., Coulombe, B. and Greenblatt, J. (1992) Recombinant TBP, transcription factor IIB, and RAP30 are sufficient for promoter recognition by mammalian RNA polymerase II. *J Biol Chem*, **267**, 9463-9466.
- Kim, J.B. and Sharp, P.A. (2001) Positive transcription elongation factor B phosphorylates hSPT5 and RNA polymerase II carboxyl-terminal domain independently of cyclin-dependent kinase-activating kinase. *J Biol Chem*, **276**, 12317-12323.
- Kireeva, M.L., Hancock, B., Cremona, G.H., Walter, W., Studitsky, V.M. and Kashlev, M. (2005) Nature of the nucleosomal barrier to RNA polymerase II. *Mol Cell*, **18**, 97-108.
- Kireeva, M.L., Walter, W., Tchernajenko, V., Bondarenko, V., Kashlev, M. and Studitsky, V.M. (2002) Nucleosome remodeling induced by RNA polymerase II: loss of the H2A/H2B dimer during transcription. *Mol Cell*, **9**, 541-552.
- Klaver, B. and Berkhout, B. (1994) Evolution of a disrupted TAR RNA hairpin structure in the HIV-1 virus. *Embo J*, **13**, 2650-2659.
- Kobor, M.S., Archambault, J., Lester, W., Holstege, F.C., Gileadi, O., Jansma, D.B., Jennings, E.G., Kouyoumdjian, F., Davidson, A.R., Young, R.A. and Greenblatt, J. (1999) An unusual eukaryotic protein phosphatase required for transcription by RNA polymerase II and CTD dephosphorylation in *S. cerevisiae*. *Mol Cell*, **4**, 55-62.
- Kohrer, K. and Domdey, H. (1991) Preparation of high molecular weight RNA. *Methods Enzymol*, **194**, 398-405.
- Kong, S.E., Kobor, M.S., Krogan, N.J., Somesh, B.P., Sogaard, T.M., Greenblatt, J.F. and Svejstrup, J.Q. (2005) Interaction of Fcp1 phosphatase with elongating RNA polymerase II holoenzyme, enzymatic mechanism of action, and genetic interaction with elongator. *J Biol Chem*, **280**, 4299-4306.
- Kornberg, R.D. and Lorch, Y. (1992) Chromatin structure and transcription. *Annu Rev Cell Biol*, **8**, 563-587.
- Kristjuhan, A. and Svejstrup, J.Q. (2004) Evidence for distinct mechanisms facilitating transcript elongation through chromatin in vivo. *Embo J*, **23**, 4243-4252.
- Krogan, N.J., Kim, M., Ahn, S.H., Zhong, G., Kobor, M.S., Cagney, G., Emili, A., Shilatifard, A., Buratowski, S. and Greenblatt, J.F. (2002) RNA polymerase II elongation factors of *Saccharomyces cerevisiae*: a targeted proteomics approach. *Mol Cell Biol*, **22**, 6979-6992.
- Krumm, A., Meulia, T., Brunvand, M. and Groudine, M. (1992) The block to transcriptional elongation within the human c-myc gene is determined in the promoter-proximal region. *Genes Dev*, **6**, 2201-2213.
- Kulinski, T., Olejniczak, M., Huthoff, H., Bielecki, L., Pachulska-Wieczorek, K., Das, A.T., Berkhout, B. and Adamiak, R.W. (2003) The apical loop of the HIV-1 TAR RNA hairpin is stabilized by a cross-loop base pair. *J Biol Chem*, **278**, 38892-38901.
- Kwak, Y.T., Guo, J., Prajapati, S., Park, K.J., Surabhi, R.M., Miller, B., Gehrig, P. and Gaynor, R.B. (2003) Methylation of SPT5 regulates its interaction with RNA polymerase II and transcriptional elongation properties. *Mol Cell*, **11**, 1055-1066.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Landick, R. (1997) RNA polymerase slides home: pause and termination site recognition. *Cell*, **88**, 741-744.
- Laribee, R.N., Krogan, N.J., Xiao, T., Shibata, Y., Hughes, T.R., Greenblatt, J.F. and Strahl, B.D. (2005) BUR kinase selectively regulates H3 K4 trimethylation and

H2B ubiquitylation through recruitment of the PAF elongation complex. *Curr Biol*, **15**, 1487-1493.

- Larochele, S., Pandur, J., Fisher, R.P., Salz, H.K. and Suter, B. (1998) Cdk7 is essential for mitosis and for in vivo Cdk-activating kinase activity. *Genes Dev*, **12**, 370-381.
- Lassen, K., Han, Y., Zhou, Y., Siliciano, J. and Siliciano, R.F. (2004) The multifactorial nature of HIV-1 latency. *Trends Mol Med*, **10**, 525-531.
- Le Page, F., Kwoh, E.E., Avrutskaya, A., Gentil, A., Leadon, S.A., Sarasin, A. and Cooper, P.K. (2000) Transcription-coupled repair of 8-oxoguanine: requirement for XPG, TFIIH, and CSB and implications for Cockayne syndrome. *Cell*, **101**, 159-171.
- Lieb, J.D. and Clarke, N.D. (2005) Control of transcription through intragenic patterns of nucleosome composition. *Cell*, **123**, 1187-1190.
- Lindstrom, D.L. and Hartzog, G.A. (2001) Genetic interactions of Spt4-Spt5 and TFIIIS with the RNA polymerase II CTD and CTD modifying enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **159**, 487-497.
- Liu, H.Y., Chiang, Y.C., Pan, J., Chen, J., Salvatore, C., Audino, D.C., Badarinarayana, V., Palaniswamy, V., Anderson, B. and Denis, C.L. (2001) Characterization of CAF4 and CAF16 reveals a functional connection between the CCR4-NOT complex and a subset of SRB proteins of the RNA polymerase II holoenzyme. *J Biol Chem*, **276**, 7541-7548.
- Macreadie, I.G., Castelli, L.A., Hewish, D.R., Kirkpatrick, A., Ward, A.C. and Azad, A.A. (1995) A domain of human immunodeficiency virus type 1 Vpr containing repeated H(S/F)RIG amino acid motifs causes cell growth arrest and structural defects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 2770-2774.
- Malagon, F., Tong, A.H., Shafer, B.K. and Strathern, J.N. (2004) Genetic interactions of DST1 in *Saccharomyces cerevisiae* suggest a role of TFIIIS in the initiation-elongation transition. *Genetics*, **166**, 1215-1227.
- Malone, E.A., Clark, C.D., Chiang, A. and Winston, F. (1991) Mutations in SPT16/CDC68 suppress cis- and trans-acting mutations that affect promoter function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **11**, 5710-5717.
- Mancebo, H.S., Lee, G., Flygare, J., Tomassini, J., Luu, P., Zhu, Y., Peng, J., Blau, C., Hazuda, D., Price, D. and Flores, O. (1997) P-TEFb kinase is required for HIV Tat transcriptional activation in vivo and in vitro. *Genes Dev*, **11**, 2633-2644.
- Marshall, N.F., Dahmus, G.K. and Dahmus, M.E. (1998) Regulation of carboxyl-terminal domain phosphatase by HIV-1 tat protein. *J Biol Chem*, **273**, 31726-31730.
- Martens, J.A. and Winston, F. (2003) Recent advances in understanding chromatin remodeling by Swi/Snf complexes. *Curr Opin Genet Dev*, **13**, 136-142.
- Martinez, E., Palhan, V.B., Tjernberg, A., Lyman, E.S., Gamper, A.M., Kundu, T.K., Chait, B.T. and Roeder, R.G. (2001) Human STAGA complex is a chromatin-acetylating transcription coactivator that interacts with pre-mRNA splicing and DNA damage-binding factors in vivo. *Mol Cell Biol*, **21**, 6782-6795.
- Marzio, G., Tyagi, M., Gutierrez, M.I. and Giacca, M. (1998) HIV-1 tat transactivator recruits p300 and CREB-binding protein histone acetyltransferases to the viral promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 13519-13524.
- Mason, P.B. and Struhl, K. (2005) Distinction and relationship between elongation rate and processivity of RNA polymerase II in vivo. *Mol Cell*, **17**, 831-840.
- Mathews, D.H., Sabina, J., Zuker, M. and Turner, D.H. (1999) Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J Mol Biol*, **288**, 911-940.

- Meinhart, A., Kamenski, T., Hoepfner, S., Baumli, S. and Cramer, P. (2005) A structural perspective of CTD function. *Genes Dev*, **19**, 1401-1415.
- Mellor, J. and Morillon, A. (2004) ISWI complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, **1677**, 100-112.
- Michels, A.A., Fraldi, A., Li, Q., Adamson, T.E., Bonnet, F., Nguyen, V.T., Sedore, S.C., Price, J.P., Price, D.H., Lania, L. and Bensaude, O. (2004) Binding of the 7SK snRNA turns the HEXIM1 protein into a P-TEFb (CDK9/cyclin T) inhibitor. *Embo J*, **23**, 2608-2619.
- Morillo-Huesca, M., Vanti, M. and Chavez, S. (2006) A simple in vivo assay for measuring the efficiency of gene length-dependent processes in yeast mRNA biogenesis. *Febs J*, **273**, 756-769.
- Morillon, A., Benard, L., Springer, M. and Lesage, P. (2002) Differential effects of chromatin and Gcn4 on the 50-fold range of expression among individual yeast Ty1 retrotransposons. *Mol Cell Biol*, **22**, 2078-2088.
- Morillon, A., Karabetsou, N., Nair, A. and Mellor, J. (2005) Dynamic lysine methylation on histone H3 defines the regulatory phase of gene transcription. *Mol Cell*, **18**, 723-734.
- Morillon, A., Karabetsou, N., O'Sullivan, J., Kent, N., Proudfoot, N. and Mellor, J. (2003) Isw1 chromatin remodeling ATPase coordinates transcription elongation and termination by RNA polymerase II. *Cell*, **115**, 425-435.
- Morris, D.P., Michelotti, G.A. and Schwinn, D.A. (2005) Evidence that phosphorylation of the RNA polymerase II carboxyl-terminal repeats is similar in yeast and humans. *J Biol Chem*, **280**, 31368-31377.
- Moteki, S. and Price, D. (2002) Functional coupling of capping and transcription of mRNA. *Mol Cell*, **10**, 599-609.
- Mueller, C.L. and Jaehning, J.A. (2002) Ctr9, Rtf1, and Leo1 are components of the Paf1/RNA polymerase II complex. *Mol Cell Biol*, **22**, 1971-1980.
- Mueller, C.L., Porter, S.E., Hoffman, M.G. and Jaehning, J.A. (2004) The Paf1 complex has functions independent of actively transcribing RNA polymerase II. *Mol Cell*, **14**, 447-456.
- Mumberg, D., Muller, R. and Funk, M. (1994) Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucleic Acids Res*, **22**, 5767-5768.
- Mumberg, D., Muller, R. and Funk, M. (1995) Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene*, **156**, 119-122.
- Murray, S., Udupa, R., Yao, S., Hartzog, G. and Prelich, G. (2001) Phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain by the Bur1 cyclin-dependent kinase. *Mol Cell Biol*, **21**, 4089-4096.
- Napolitano, G., Licciardo, P., Gallo, P., Majello, B., Giordano, A. and Lania, L. (1999) The CDK9-associated cyclins T1 and T2 exert opposite effects on HIV-1 Tat activity. *Aids*, **13**, 1453-1459.
- Narita, T., Yamaguchi, Y., Yano, K., Sugimoto, S., Chanarat, S., Wada, T., Kim, D.K., Hasegawa, J., Omori, M., Inukai, N., Endoh, M., Yamada, T. and Handa, H. (2003) Human transcription elongation factor NELF: identification of novel subunits and reconstitution of the functionally active complex. *Mol Cell Biol*, **23**, 1863-1873.
- Nguyen, V.T., Kiss, T., Michels, A.A. and Bensaude, O. (2001) 7SK small nuclear RNA binds to and inhibits the activity of CDK9/cyclin T complexes. *Nature*, **414**, 322-325.

- Ni, Z., Schwartz, B.E., Werner, J., Suarez, J.R. and Lis, J.T. (2004) Coordination of transcription, RNA processing, and surveillance by P-TEFb kinase on heat shock genes. *Mol Cell*, **13**, 55-65.
- Nourani, A., Robert, F. and Winston, F. (2006) Evidence that Spt2/Sin1, an HMG-like factor, plays roles in transcription elongation, chromatin structure, and genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **26**, 1496-1509.
- Novoseler, M., Hershkovits, G. and Katcoff, D.J. (2005) Functional domains of the yeast chromatin protein Sin1p/Spt2p can bind four-way junction and crossing DNA structures. *J Biol Chem*, **280**, 5169-5177.
- Orphanides, G., LeRoy, G., Chang, C.H., Luse, D.S. and Reinberg, D. (1998) FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes. *Cell*, **92**, 105-116.
- Orphanides, G. and Reinberg, D. (2002) A unified theory of gene expression. *Cell*, **108**, 439-451.
- Orphanides, G., Wu, W.H., Lane, W.S., Hampsey, M. and Reinberg, D. (1999) The chromatin-specific transcription elongation factor FACT comprises human SPT16 and SSRP1 proteins. *Nature*, **400**, 284-288.
- Palangat, M., Meier, T.I., Keene, R.G. and Landick, R. (1998) Transcriptional pausing at +62 of the HIV-1 nascent RNA modulates formation of the TAR RNA structure. *Mol Cell*, **1**, 1033-1042.
- Parada, C.A., Yoon, J.B. and Roeder, R.G. (1995) A novel LBP-1-mediated restriction of HIV-1 transcription at the level of elongation in vitro. *J Biol Chem*, **270**, 2274-2283.
- Parissi, V., Caumont, A., Richard de Soultrait, V., Dupont, C.H., Pichuanes, S. and Litvak, S. (2000) Inactivation of the SNF5 transcription factor gene abolishes the lethal phenotype induced by the expression of HIV-1 integrase in yeast. *Gene*, **247**, 129-136.
- Pazin, M.J., Sheridan, P.L., Cannon, K., Cao, Z., Keck, J.G., Kadonaga, J.T. and Jones, K.A. (1996) NF-kappa B-mediated chromatin reconfiguration and transcriptional activation of the HIV-1 enhancer in vitro. *Genes Dev*, **10**, 37-49.
- Pei, Y., Schwer, B. and Shuman, S. (2003) Interactions between fission yeast Cdk9, its cyclin partner Pch1, and mRNA capping enzyme Pct1 suggest an elongation checkpoint for mRNA quality control. *J Biol Chem*, **278**, 7180-7188.
- Pei, Y. and Shuman, S. (2002) Interactions between fission yeast mRNA capping enzymes and elongation factor Spt5. *J Biol Chem*, **277**, 19639-19648.
- Peng, J., Marshall, N.F. and Price, D.H. (1998a) Identification of a cyclin subunit required for the function of *Drosophila* P-TEFb. *J Biol Chem*, **273**, 13855-13860.
- Peng, J., Zhu, Y., Milton, J.T. and Price, D.H. (1998b) Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb. *Genes Dev*, **12**, 755-762.
- Perez-Martin, J. and Johnson, A.D. (1998) Mutations in chromatin components suppress a defect of Gcn5 protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **18**, 1049-1054.
- Peterlin, B.M., Luciw, P.A., Barr, P.J. and Walker, M.D. (1986) Elevated levels of mRNA can account for the trans-activation of human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 9734-9738.
- Pollard, K.J. and Peterson, C.L. (1997) Role for ADA/GCN5 products in antagonizing chromatin-mediated transcriptional repression. *Mol Cell Biol*, **17**, 6212-6222.
- Popov, S., Rexach, M., Zybarth, G., Reiling, N., Lee, M.A., Ratner, L., Lane, C.M., Moore, M.S., Blobel, G. and Bukrinsky, M. (1998) Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *Embo J*, **17**, 909-917.

- Prather, D., Krogan, N.J., Emili, A., Greenblatt, J.F. and Winston, F. (2005a) Identification and characterization of Elf1, a conserved transcription elongation factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **25**, 10122-10135.
- Prather, D.M., Larschan, E. and Winston, F. (2005b) Evidence that the elongation factor TFIIS plays a role in transcription initiation at GAL1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **25**, 2650-2659.
- Pray-Grant, M.G., Daniel, J.A., Schieltz, D., Yates, J.R., 3rd and Grant, P.A. (2005) Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation. *Nature*, **433**, 434-438.
- Pumfery, A., Deng, L., Maddukuri, A., de la Fuente, C., Li, H., Wade, J.D., Lambert, P., Kumar, A. and Kashanchi, F. (2003) Chromatin remodeling and modification during HIV-1 Tat-activated transcription. *Curr HIV Res*, **1**, 343-362.
- Purcell, D.F. and Martin, M.A. (1993) Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J Virol*, **67**, 6365-6378.
- Raha, T., Cheng, S.W. and Green, M.R. (2005) HIV-1 Tat stimulates transcription complex assembly through recruitment of TBP in the absence of TAFs. *PLoS Biol*, **3**, e44.
- Re, F., Braaten, D., Franke, E.K. and Luban, J. (1995) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr arrests the cell cycle in G2 by inhibiting the activation of p34cdc2-cyclin B. *J Virol*, **69**, 6859-6864.
- Reines, D., Conaway, R.C. and Conaway, J.W. (1999) Mechanism and regulation of transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 342-346.
- Renner, D.B., Yamaguchi, Y., Wada, T., Handa, H. and Price, D.H. (2001) A highly purified RNA polymerase II elongation control system. *J Biol Chem*, **276**, 42601-42609.
- Robinson, K.M. and Schultz, M.C. (2003) Replication-independent assembly of nucleosome arrays in a novel yeast chromatin reconstitution system involves antisilencing factor Asf1p and chromodomain protein Chd1p. *Mol Cell Biol*, **23**, 7937-7946.
- Roeder, R.G. (2005) Transcriptional regulation and the role of diverse coactivators in animal cells. *FEBS Lett*, **579**, 909-915.
- Rondon, A.G., Garcia-Rubio, M., Gonzalez-Barrera, S. and Aguilera, A. (2003) Molecular evidence for a positive role of Spt4 in transcription elongation. *Embo J*, **22**, 612-620.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1354.
- Samuelsen, C.O., Baraznenok, V., Khorosjutina, O., Spahr, H., Kieselbach, T., Holmberg, S. and Gustafsson, C.M. (2003) TRAP230/ARC240 and TRAP240/ARC250 Mediator subunits are functionally conserved through evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 6422-6427.
- Sano, M., Abdellatif, M., Oh, H., Xie, M., Bagella, L., Giordano, A., Michael, L.H., DeMayo, F.J. and Schneider, M.D. (2002) Activation and function of cyclin T-Cdk9 (positive transcription elongation factor-b) in cardiac muscle-cell hypertrophy. *Nat Med*, **8**, 1310-1317.
- Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bernstein, B.E., Karabetsou, N., Morillon, A., Weise, C., Schreiber, S.L., Mellor, J. and Kouzarides, T. (2003) Methylation of histone H3 K4 mediates association of the Isw1p ATPase with chromatin. *Mol Cell*, **12**, 1325-1332.

- Saunders, A., Werner, J., Andrusis, E.D., Nakayama, T., Hirose, S., Reinberg, D. and Lis, J.T. (2003) Tracking FACT and the RNA polymerase II elongation complex through chromatin in vivo. *Science*, **301**, 1094-1096.
- School);, F.M.A.M.G.H.a.H.M.S.R.B.T.M.S.I.R.E.K.M.G.H.a.H.M. (1997) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc.
- Schulte, A., Czudnochowski, N., Barboric, M., Schonichen, A., Blazek, D., Peterlin, B.M. and Geyer, M. (2005) Identification of a cyclin T-binding domain in Hexim1 and biochemical analysis of its binding competition with HIV-1 Tat. *J Biol Chem*, **280**, 24968-24977.
- Schumacher, A.J., Nissley, D.V. and Harris, R.S. (2005) APOBEC3G hypermutates genomic DNA and inhibits Ty1 retrotransposition in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 9854-9859.
- Schwartz, S., Felber, B.K., Benko, D.M., Fenyo, E.M. and Pavlakis, G.N. (1990) Cloning and functional analysis of multiply spliced mRNA species of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, **64**, 2519-2529.
- Sekinger, E.A. and Gross, D.S. (2001) Silenced chromatin is permissive to activator binding and PIC recruitment. *Cell*, **105**, 403-414.
- Selby, M.J., Bain, E.S., Luciw, P.A. and Peterlin, B.M. (1989) Structure, sequence, and position of the stem-loop in tat determine transcriptional elongation by tat through the HIV-1 long terminal repeat. *Genes Dev*, **3**, 547-558.
- Sherman, F., Fink, G.R. and Hicks, J.B. (1986) *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor, New York.
- Sherwood, P.W. and Osley, M.A. (1991) Histone regulatory (hir) mutations suppress delta insertion alleles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **128**, 729-738.
- Shim, E.Y., Walker, A.K., Shi, Y. and Blackwell, T.K. (2002) CDK-9/cyclin T (P-TEFb) is required in two postinitiation pathways for transcription in the *C. elegans* embryo. *Genes Dev*, **16**, 2135-2146.
- Shore, S.M., Byers, S.A., Maury, W. and Price, D.H. (2003) Identification of a novel isoform of Cdk9. *Gene*, **307**, 175-182.
- Silverstein, R.A. and Ekwall, K. (2005) Sin3: a flexible regulator of global gene expression and genome stability. *Curr Genet*, **47**, 1-17.
- Simic, R., Lindstrom, D.L., Tran, H.G., Roinick, K.L., Costa, P.J., Johnson, A.D., Hartzog, G.A. and Arndt, K.M. (2003) Chromatin remodeling protein Chd1 interacts with transcription elongation factors and localizes to transcribed genes. *Embo J*, **22**, 1846-1856.
- Sims, R.J., 3rd, Belotserkovskaya, R. and Reinberg, D. (2004a) Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it. *Genes Dev*, **18**, 2437-2468.
- Sims, R.J., 3rd, Mandal, S.S. and Reinberg, D. (2004b) Recent highlights of RNA-polymerase-II-mediated transcription. *Curr Opin Cell Biol*, **16**, 263-271.
- Southgate, C.D. and Green, M.R. (1995) Delineating minimal protein domains and promoter elements for transcriptional activation by lentivirus Tat proteins. *J Virol*, **69**, 2605-2610.
- Squazzo, S.L., Costa, P.J., Lindstrom, D.L., Kumer, K.E., Simic, R., Jennings, J.L., Link, A.J., Arndt, K.M. and Hartzog, G.A. (2002) The Paf1 complex physically and functionally associates with transcription elongation factors in vivo. *Embo J*, **21**, 1764-1774.
- Staleva Staleva, L. and Venkov, P. (2001) Activation of Ty transposition by mutagens. *Mutat Res*, **474**, 93-103.
- Sternberg, P.W., Stern, M.J., Clark, I. and Herskowitz, I. (1987) Activation of the yeast HO gene by release from multiple negative controls. *Cell*, **48**, 567-577.

- Sterner, D.E., Lee, J.M., Hardin, S.E. and Greenleaf, A.L. (1995) The yeast carboxyl-terminal repeat domain kinase CTDK-I is a divergent cyclin-cyclin-dependent kinase complex. *Mol Cell Biol*, **15**, 5716-5724.
- Struhl, K. (1998) Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev*, **12**, 599-606.
- Subramanian, T. and Chinnadurai, G. (1992) A high-level expression vector for human cells. *Gene*, **120**, 287-289.
- Swanson, M.S. and Winston, F. (1992) SPT4, SPT5 and SPT6 interactions: effects on transcription and viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **132**, 325-336.
- Todeschini, A.L., Morillon, A., Springer, M. and Lesage, P. (2005) Severe adenine starvation activates Ty1 transcription and retrotransposition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **25**, 7459-7472.
- Toulme, F., Mosrin-Huaman, C., Artsimovitch, I. and Rahmouni, A.R. (2005) Transcriptional pausing in vivo: a nascent RNA hairpin restricts lateral movements of RNA polymerase in both forward and reverse directions. *J Mol Biol*, **351**, 39-51.
- Toyama, R., Bende, S.M. and Dhar, R. (1992) Transcriptional activity of the human immunodeficiency virus-1 LTR promoter in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res*, **20**, 2591-2596.
- Tran, H.G., Steger, D.J., Iyer, V.R. and Johnson, A.D. (2000) The chromo domain protein chd1p from budding yeast is an ATP-dependent chromatin-modifying factor. *Embo J*, **19**, 2323-2331.
- Vary, J.C., Jr., Gangaraju, V.K., Qin, J., Landel, C.C., Kooperberg, C., Bartholomew, B. and Tsukiyama, T. (2003) Yeast Isw1p forms two separable complexes in vivo. *Mol Cell Biol*, **23**, 80-91.
- Verdin, E. (1991) DNase I-hypersensitive sites are associated with both long terminal repeats and with the intragenic enhancer of integrated human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, **65**, 6790-6799.
- Verdin, E., Paras, P., Jr. and Van Lint, C. (1993) Chromatin disruption in the promoter of human immunodeficiency virus type 1 during transcriptional activation. *Embo J*, **12**, 3249-3259.
- Verhoef, K., Tijms, M. and Berkhout, B. (1997) Optimal Tat-mediated activation of the HIV-1 LTR promoter requires a full-length TAR RNA hairpin. *Nucleic Acids Res*, **25**, 496-502.
- Wada, T., Takagi, T., Yamaguchi, Y., Ferdous, A., Imai, T., Hirose, S., Sugimoto, S., Yano, K., Hartzog, G.A., Winston, F., Buratowski, S. and Handa, H. (1998a) DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs. *Genes Dev*, **12**, 343-356.
- Wada, T., Takagi, T., Yamaguchi, Y., Watanabe, D. and Handa, H. (1998b) Evidence that P-TEFb alleviates the negative effect of DSIF on RNA polymerase II-dependent transcription in vitro. *Embo J*, **17**, 7395-7403.
- Warfield, L., Ranish, J.A. and Hahn, S. (2004) Positive and negative functions of the SAGA complex mediated through interaction of Spt8 with TBP and the N-terminal domain of TFIIA. *Genes Dev*, **18**, 1022-1034.
- Wen, Y. and Shatkin, A.J. (1999) Transcription elongation factor hSPT5 stimulates mRNA capping. *Genes Dev*, **13**, 1774-1779.
- Wery, M., Shematorova, E., Van Driessche, B., Vandehaute, J., Thuriaux, P. and Van Mullem, V. (2004) Members of the SAGA and Mediator complexes are partners of the transcription elongation factor TFIIS. *Embo J*, **23**, 4232-4242.

- Wilusz, C.J. and Wilusz, J. (2004) Bringing the role of mRNA decay in the control of gene expression into focus. *Trends Genet*, **20**, 491-497.
- Winston, F., Chaleff, D.T., Valent, B. and Fink, G.R. (1984) Mutations affecting Ty-mediated expression of the HIS4 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **107**, 179-197.
- Winston, F., Dollard, C., Malone, E.A., Clare, J., Kapakos, J.G., Farabaugh, P. and Minehart, P.L. (1987) Three genes are required for trans-activation of Ty transcription in yeast. *Genetics*, **115**, 649-656.
- Winston, F. and Sudarsanam, P. (1998) The SAGA of Spt proteins and transcriptional analysis in yeast: past, present, and future. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **63**, 553-561.
- Wittmeyer, J. and Formosa, T. (1997) The *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase alpha catalytic subunit interacts with Cdc68/Spt16 and with Pob3, a protein similar to an HMG1-like protein. *Mol Cell Biol*, **17**, 4178-4190.
- Wood, A., Schneider, J., Dover, J., Johnston, M. and Shilatifard, A. (2003) The Paf1 complex is essential for histone monoubiquitination by the Rad6-Bre1 complex, which signals for histone methylation by COMPASS and Dot1p. *J Biol Chem*, **278**, 34739-34742.
- Wood, A., Schneider, J., Dover, J., Johnston, M. and Shilatifard, A. (2005) The Bur1/Bur2 complex is required for histone H2B monoubiquitination by Rad6/Bre1 and histone methylation by COMPASS. *Mol Cell*, **20**, 589-599.
- Wu, C.H., Lee, C., Fan, R., Smith, M.J., Yamaguchi, Y., Handa, H. and Gilmour, D.S. (2005) Molecular characterization of *Drosophila* NELF. *Nucleic Acids Res*, **33**, 1269-1279.
- Wu, C.H., Yamaguchi, Y., Benjamin, L.R., Horvat-Gordon, M., Washinsky, J., Enerly, E., Larsson, J., Lambertsson, A., Handa, H. and Gilmour, D. (2003) NELF and DSIF cause promoter proximal pausing on the hsp70 promoter in *Drosophila*. *Genes Dev*, **17**, 1402-1414.
- Wu, J., Awrey, D.E., Edwards, A.M., Archambault, J. and Friesen, J.D. (1996) In vitro characterization of mutant yeast RNA polymerase II with reduced binding for elongation factor TFIIS. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 11552-11557.
- Wu, P.Y., Ruhlmann, C., Winston, F. and Schultz, P. (2004) Molecular architecture of the *S. cerevisiae* SAGA complex. *Mol Cell*, **15**, 199-208.
- Wu, Y. (2004) HIV-1 gene expression: lessons from provirus and non-integrated DNA. *Retrovirology*, **1**, 13.
- Xella, B., Goding, C., Agricola, E., Di Mauro, E. and Caserta, M. (2006) The ISWI and CHD1 chromatin remodelling activities influence ADH2 expression and chromatin organization. *Mol Microbiol*, **59**, 1531-1541.
- Xiao, T., Kao, C.F., Krogan, N.J., Sun, Z.W., Greenblatt, J.F., Osley, M.A. and Strahl, B.D. (2005a) Histone H2B ubiquitylation is associated with elongating RNA polymerase II. *Mol Cell Biol*, **25**, 637-651.
- Xiao, Y., Yang, Y.H., Burckin, T.A., Shiue, L., Hartzog, G.A. and Segal, M.R. (2005b) Analysis of a Splice Array Experiment Elucidates Roles of Chromatin Elongation Factor Spt4-5 in Splicing. *PLoS Comput Biol*, **1**, e39.
- Yamada, T., Yamaguchi, Y., Inukai, N., Okamoto, S., Mura, T. and Handa, H. (2006) P-TEFb-mediated phosphorylation of hSpt5 C-terminal repeats is critical for processive transcription elongation. *Mol Cell*, **21**, 227-237.
- Yamaguchi, Y., Inukai, N., Narita, T., Wada, T. and Handa, H. (2002) Evidence that negative elongation factor represses transcription elongation through binding to a DRB sensitivity-inducing factor/RNA polymerase II complex and RNA. *Mol Cell Biol*, **22**, 2918-2927.

- Yamaguchi, Y., Wada, T., Watanabe, D., Takagi, T., Hasegawa, J. and Handa, H. (1999) Structure and function of the human transcription elongation factor DSIF. *J Biol Chem*, **274**, 8085-8092.
- Yang, Z., Zhu, Q., Luo, K. and Zhou, Q. (2001) The 7SK small nuclear RNA inhibits the CDK9/cyclin T1 kinase to control transcription. *Nature*, **414**, 317-322.
- Yao, S., Neiman, A. and Prelich, G. (2000) BUR1 and BUR2 encode a divergent cyclin-dependent kinase-cyclin complex important for transcription in vivo. *Mol Cell Biol*, **20**, 7080-7087.
- Yao, S. and Prelich, G. (2002) Activation of the Bur1-Bur2 cyclin-dependent kinase complex by Cak1. *Mol Cell Biol*, **22**, 6750-6758.
- Yeo, M., Lin, P.S., Dahmus, M.E. and Gill, G.N. (2003) A novel RNA polymerase II C-terminal domain phosphatase that preferentially dephosphorylates serine 5. *J Biol Chem*, **278**, 26078-26085.
- Yik, J.H., Chen, R., Nishimura, R., Jennings, J.L., Link, A.J. and Zhou, Q. (2003) Inhibition of P-TEFb (CDK9/Cyclin T) kinase and RNA polymerase II transcription by the coordinated actions of HEXIM1 and 7SK snRNA. *Mol Cell*, **12**, 971-982.
- Yocum, R.R., Hanley, S., West, R., Jr. and Ptashne, M. (1984) Use of lacZ fusions to delimit regulatory elements of the inducible divergent GAL1-GAL10 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **4**, 1985-1998.
- Yoshizuka, N., Yoshizuka-Chadani, Y., Krishnan, V. and Zeichner, S.L. (2005) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr-dependent cell cycle arrest through a mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Virol*, **79**, 11366-11381.
- Yu, Y., Eriksson, P. and Stillman, D.J. (2000) Architectural transcription factors and the SAGA complex function in parallel pathways to activate transcription. *Mol Cell Biol*, **20**, 2350-2357.
- Yuan, G.C., Liu, Y.J., Dion, M.F., Slack, M.D., Wu, L.F., Altschuler, S.J. and Rando, O.J. (2005) Genome-scale identification of nucleosome positions in *S. cerevisiae*. *Science*, **309**, 626-630.
- Zandomeni, R. and Weinmann, R. (1984) Inhibitory effect of 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole on a protein kinase. *J Biol Chem*, **259**, 14804-14811.
- Zandomeni, R., Zandomeni, M.C., Shugar, D. and Weinmann, R. (1986) Casein kinase type II is involved in the inhibition by 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole of specific RNA polymerase II transcription. *J Biol Chem*, **261**, 3414-3419.
- Zhang, L., Schroeder, S., Fong, N. and Bentley, D.L. (2005) Altered nucleosome occupancy and histone H3K4 methylation in response to 'transcriptional stress'. *Embo J*, **24**, 2379-2390.
- Zhao, Y., Cao, J., O'Gorman, M.R., Yu, M. and Yogev, R. (1996) Effect of human immunodeficiency virus type 1 protein R (vpr) gene expression on basic cellular function of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Virol*, **70**, 5821-5826.
- Zhou, M., Deng, L., Lacoste, V., Park, H.U., Pumfery, A., Kashanchi, F., Brady, J.N. and Kumar, A. (2004) Coordination of transcription factor phosphorylation and histone methylation by the P-TEFb kinase during human immunodeficiency virus type 1 transcription. *J Virol*, **78**, 13522-13533.
- Zimmerman, E.S., Chen, J., Andersen, J.L., Ardon, O., Dehart, J.L., Blackett, J., Choudhary, S.K., Camerini, D., Nghiem, P. and Planelles, V. (2004) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr-mediated G2 arrest requires Rad17 and Hus1 and induces nuclear BRCA1 and gamma-H2AX focus formation. *Mol Cell Biol*, **24**, 9286-9294.

