

**CONEXIÓN ENTRE RECOMBINACIÓN Y
BIOGÉNESIS DEL RNA: Thp1 Y OTRAS
PROTEÍNAS FUNCIONALMENTE
RELACIONADAS**

Mercedes Gallardo Ortega
Tesis Doctoral
Universidad de Sevilla
2003

TD
117



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA
BIBLIOTECA

TD 117
117

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para que mi Tesis Doctoral CONEXIÓN ENTRE RECOMBINACIÓN Y BIOGÉNESIS DE RNA: TnpA y OTRAS PROTEÍNAS FUNCIONALMENTE RELACIONADAS sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

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

Firmado:

Mercedes Gallardo Ortega

Sevilla, a 6 de MARZO de 2003

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARÍA GENERAL

Comisión de Examen de Tesis Doctoral
al T.º 063 Anexo 213 del libro
Contratos de

Sevilla,

14 ENE. 2003

El Jefe del Negociado de Tesis.



R. 21961.

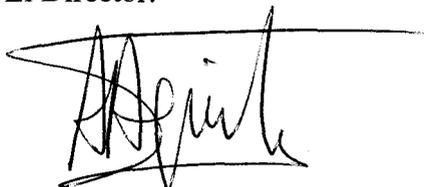
**CONEXIÓN ENTRE RECOMBINACIÓN Y
BIOGÉNESIS DEL RNA: Thp1 Y OTRAS
PROTEÍNAS FUNCIONALMENTE
RELACIONADAS**

Trabajo realizado en el Departamento de Genética, Facultad de Biología.
Universidad de Sevilla, para optar al grado de Doctor en Biología por la
Licenciada Mercedes Gallardo Ortega



Sevilla, Enero del 2003

El Director:



Dr. Andrés Aguilera López

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. MECANISMOS DE RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA	1
I.2. TRANSCRIPCIÓN POR LA RNAPII	3
I.2.1. Iniciación de la transcripción	3
I.2.2. Regulación de la elongación mediada por la RNAPII	5
I.2.3. Acoplamiento de la transcripción a otros procesos metabólicos del RNA	6
- Procesamiento del extremo 5' del mRNA	6
- Maduración de intrones	8
- Poliadenilación	8
- Transporte de mRNA	9
I.2.4. Acoplamiento de la transcripción a distintos procesos metabólicos del DNA	9
I.3. RELACIÓN ENTRE RECOMBINACIÓN Y TRANSCRIPCIÓN	10
I.4. RECOMBINACIÓN EN MUTANTES DEL COMPLEJO THO	11
I.5. OBJETIVOS	12
II. RESULTADOS.	
CAPITULO I: BÚSQUEDA DE GENES IMPLICADOS EN RECOMBINACIÓN	
II.1.1. Mutantes nulos con fenotipo de hiperrecombinación	13
II.1.2. El mutante hiperrecombinante <i> yol072wΔ </i> está afectado en la transcripción dependiente de RNAPII	16
II.1.3. Asociación entre el defecto en durante transcripción y el fenotipo de hiperrecombinación en el mutante <i> yol072wΔ </i>	20
II.1.4. La mutación <i> hrs1Δ </i> , en un componente del Mediador de la holoenzima RNAPII, suprime la hiperrecombinación de <i> thp1Δ </i>	24
II.1.5. Localización subcelular de las proteínas Tho2 y Thp1 fusionadas a la GFP	24
II.1.6. La transcripción de <i> HPR1 </i> y <i> THO2 </i> no está afectada en el mutante <i> thp1Δ </i> y viceversa	25
II.1.7. El mutante <i> thp1Δ </i> acumula mRNA en el núcleo	26
II.1.8. Thp1 une RNA <i> in vitro </i>	27
CAPÍTULO II: BÚSQUEDA DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON Thp1	
II.2.1. La sobreexpresión de <i> NAB2 </i> suprime el defecto de expresión génica de <i> thp1Δ </i>	28
II.2.2. La sobreexpresión de <i> NAB2 </i> suprime la acumulación intranuclear de mRNA en <i> thp1Δ </i>	29
II.2.3. <i> nab2-1 </i> tiene defectos en la transcripción de <i> lacZ </i>	30
II.2.4. Un nuevo complejo de levaduras: Thp1-Sac3	31
II.2.5. El mutante <i> sac3Δ </i> está afectado en el transporte de mRNA	33
CAPÍTULO III: RELACIONES FUNCIONALES ENTRE LOS COMPLEJOS THO, Thp1-Sac3 Y Paf1-Cdc73	36
II.3.1. Mutantes del complejo Paf1-Cdc73 presentan defectos de	

transcripción	35
II.3.2. Estudio del contenido de DNA	37
II.3.3. Análisis del transcriptoma en una cepa silvestre, <i>tho2Δ</i> y <i>thp1Δ</i>	39
III. DISCUSIÓN	
III.1. Identificación de genes implicados en recombinación	42
III.2. El mutante <i>thp1Δ</i> está afectado en la transcripción mediada por la RNAPII	43
III.3. El fenotipo de hiperrecombinación observado en <i>thp1Δ</i> está asociado a un defecto en la elongación de la transcripción	44
III.4. Thp1 actúa en el mismo proceso biológico que el complejo THO	45
III.5. THO, Thp1-Sac3 y Paf1-Cdc73 son complejos independientes aunque relacionados funcionalmente	46
III.6. El complejo Thp1-Sac3 se comporta como una unidad funcional	47
III.7. Mutaciones en <i>THP1</i> , <i>SAC3</i> y <i>NAB2</i> provocan un defecto en el transporte de mRNA	49
IV. CONCLUSIONES	51
V. MATERIALES Y MÉTODOS	
V.1. MEDIOS DE CULTIVOS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO	52
V.1.1. Medios de cultivo para levaduras	52
V.1.2. Medios de cultivo para bacterias	52
V.1.3. Condiciones de crecimiento	53
V.2. ANTIBIÓTICOS, DROGAS, ENZIMAS, INHIBIDORES Y MARCADORES DE TAMAÑO	53
V.3. ESTIRPES	54
V.3.1. <i>Escherichia coli</i>	54
V.3.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54
V.4. PLÁSMIDOS	57
V.5. GENOTECAS	59
V.6. ANALISIS GENÉTICO EN LEVADURA	59
V.7. REEMPLAZAMIENTO GÉNICO EN LEVADURAS	59
V.8. SISTEMAS GENÉTICOS DE RECOMBINACIÓN	60
V.8.1. Sistemas plamídicos	60
V.8.2. Sistema cromosómico	60
V.9. DETERMINACIÓN DE LAS FRECUENCIAS DE RECOMBINACIÓN	60
V.10. TRANSFORMACIONES	61
V.10.1. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> DH5α	61
V.10.1.1. Método del TB	61
V.10.1.2. Método del TSS	61
V.10.2. Transformación de bacterias	61
V.10.3. Transformación de levaduras	61
V.11. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS	62
V.11.1. Preparación de DNA plasmídico de <i>E. Coli</i>	62
V.11.1.1. Protocolo de lisis alcalina	62
V.11.1.2. Protocolo de gradiente de CsCl	62
V.11.2. Preparación de DNA de levaduras	62
V.11.3. Preparación rápida de DNA cromosómico	63

V.11.4. Preparación de DNA “carrier”	63
V.11.5. Preparación de RNA de levaduras	63
V.12. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	64
V.13. ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLÉICOS	64
V.13.1. Geles de agarosa	64
V.13.1.1. Geles para DNA	64
V.13.1.2. Geles para RNA	65
V.13.2. Geles nativos de poliacrilamida	65
V.14. ELECTROFORESIS DE CROMOSOMAS DE LEVADURA	65
V.15. TRANSFERENCIA DE ÁCIDOS NUCLÉICOS A MEMBRANAS	65
V.15.1. Transferencia de DNA	65
V.15.1.1. Membranas neutras	66
V.15.1.2. Membranas cargadas positivamente	66
V.15.2. Transferencia de RNA	66
V.16. HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS	66
V.16.1. Hibridación de DNA con sonda radiactiva a 42°C (Southern)	66
V.16.2. Hibridación de RNA con sonda radiactiva a 42°C (Northern)	66
V.16.3. Hibridación de DNA ó RNA con sonda radiactiva a 65°C	67
V.16.4. Rehibridación de filtros	67
V.16.5. Cuantificación de bandas	67
V.17. MARCAJE DE SONDAS	67
V.17.1. Marcaje de sondas de DNA por “random primer”	67
V.17.2. Marcaje de sondas de RNA	68
V.17.3. Marcaje de oligos con digoxigenina	68
V.18. ENSAYO DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS	68
V.18.1. β -galactosidasa	68
V.18.1.1. En cultivo	68
V.18.1.2. En placa	69
V.18.2. Ensayo de actividad fosfatasa ácida	69
V.19. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	69
V.19.1. Inducción de proteínas y preparación de extractos de proteínas en <i>E. Coli</i>	69
V.19.2. Purificación de la proteína (His) ₆ HA-Thp1 a partir de <i>E.coli</i>	69
V.19.3. Purificación de proteínas de levaduras: método TAP	70
V.19.4. Precipitación de proteínas	70
V.19.5. Geles desnaturizantes de proteínas (SDS-poliacrilamida)	71
V.19.6. Métodos de detección de proteínas	71
V.19.6.1. Tinción con azul de Coomassie	71
V.19.6.2. Tinción con nitrato de plata	71
V.19.7. Secuenciación de proteínas	71
V.19.8. Análisis de western	71
V.19.8.1. Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa	72
V.19.8.2. Immunodetección con anticuerpos conjugados a fosfatasa alcalina	72
V.19.8.3. Immunodetección con anticuerpos conjugados a peroxidasa y quimioluminiscencia	72

V.20. ENSAYOS DE RETARDO EN GEL	73
V.21. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS PROTEÍNAS FUSIONADAS A GFP	73
V.22. TRANSPORTE DE mRNA	73
V.23. CUANTIFICACIÓN DE ADN POR CITOMETRÍA DE FLUJO	74
VI. BIBLIOGRAFÍA	75

INTRODUCCIÓN

La recombinación constituye el proceso biológico según el cual dos segmentos de DNA interaccionan físicamente entre sí y dan lugar a un cambio en el ligamiento o en la información de al menos uno de ellos. Utilizada en la elaboración de mapas genéticos y en bioingeniería, la recombinación homóloga del DNA constituye la base de múltiples procesos celulares. El cambio de sexo en *Saccharomyces cerevisiae* (Klar *et al.*, 1984) o la producción de inmunoglobulinas en eucariotas superiores (Schwedler *et al.*, 1990) constituyen dos ejemplos de ello. En eucariotas, la recombinación durante la meiosis asegura una correcta división reduccional del núcleo y contribuye a la diversidad genética de las especies mediante la generación de nuevas combinaciones alélicas. Durante la mitosis, la importancia de la recombinación viene determinada fundamentalmente por su papel en la reparación de roturas del DNA. Sin embargo, la recombinación puede representar una fuente de inestabilidad genómica. Por ello, para la célula es importante mantener un estricto control sobre los mecanismos de recombinación que mantenga la integridad de su genoma. Al secuenciar el genoma de *S. cerevisiae* se puso de manifiesto una cantidad significativa de regiones cromosómicas duplicadas y tramos de secuencias repetidas que eran substratos potenciales para la recombinación (Seoighe and Wolfe, 1998; Wolfe and Shields, 1997). Así pues, la recombinación entre secuencias repetidas de DNA, ubicuas en los genomas eucarióticos, puede dar lugar a reorganizaciones con consecuencias deletéreas para la célula. En humanos, existen diversas enfermedades, como el síndrome del "X-frágil" (Fu *et al.*, 1991), la corea de Huntington, el síndrome de Werner (Fukuchi *et al.*, 1989), la Ataxia telangiectasia (Meyn, 1993) y algunos tipos de tumores (Ionov *et al.*, 1993; Thibodeau *et al.*, 1993) que se asocian a una inestabilidad de regiones repetidas de ADN.

I.1. MECANISMOS DE RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA

Existen distintos mecanismos de recombinación entre regiones repetidas de DNA dependiendo del tipo de secuencias de las que se trate. Las secuencias cortas (<10 pb) repetidas "en tandem" multitud de veces (DNA satélite), están sujetas a reordenaciones provocadas fundamentalmente por errores de la maquinaria de replicación. En cambio, las repeticiones largas (>100 pb) y las regiones homólogas de los genomas constituyen el substrato para una maquinaria específica de recombinación homóloga.

Estudios genéticos y moleculares en fagos, bacterias y hongos han sido esenciales para tratar de comprender los mecanismos de recombinación homóloga. El modelo de reparación de cortes de doble cadena (DSBR) de Szostak *et al.* (1983) es el más aceptado actualmente. Este modelo se inicia con un corte de doble cadena (DSB). Tras la degradación de los extremos 5' a ambos lados del corte, los extremos 3' de cadena sencilla invaden a la pareja de DNA de doble cadena homólogo y sirven como cebadores para una síntesis de DNA nueva que rellena el hueco. La reacción de intercambio de cadena entre la molécula de DNA de cadena sencilla invasora y la de DNA de doble cadena invadida provoca la formación de estructuras cruciformes o de Holliday (Figura 1). Existe otro modelo de recombinación denominado reasociación de cadena dependiente de síntesis (SDSA) según el cual, después de una síntesis de DNA que ha usado como cebadores los extremos 3' invasores, la reacción de invasión es invertida (McGill *et al.*, 1989; Hastings, 1988). Como consecuencia, no se forman estructuras de Holliday estables. Además, la recombinación puede estar asociada a la replicación mediante el proceso conocido como BIR (del inglés *break-induced replication*), en el que el extremo invasor 3' permite que una polimerasa inicie la síntesis de DNA (Pâques and Haber, 1999).

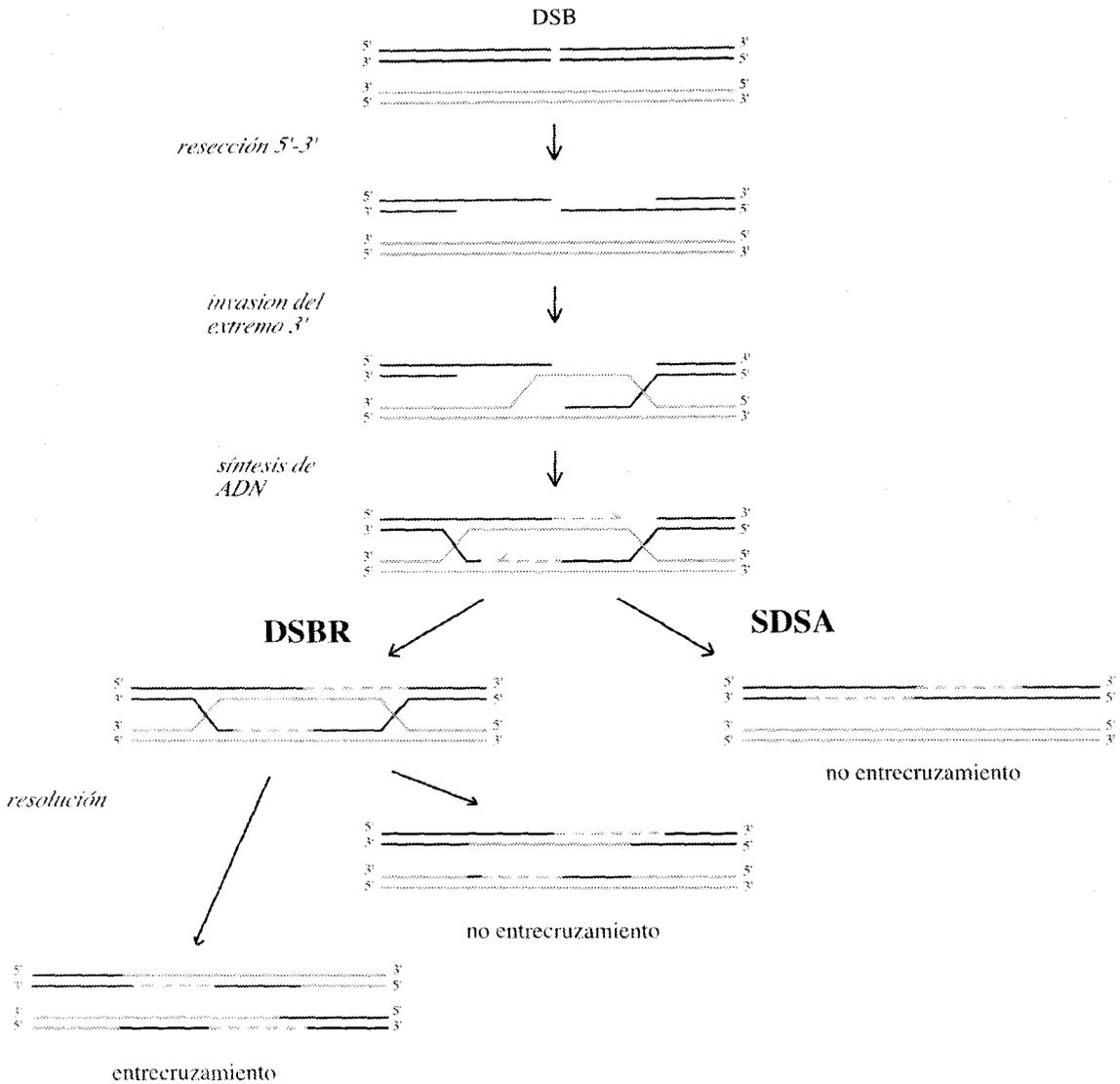


Figura 1. Modelos de DSBR (Szostak et al., 1983) y SDSA (Hastings 1988; McGill et al. 1989). Después de un DSB, la resección de los extremos 5' genera dos cadenas sencillas terminadas en 3' que invaden a una molécula de DNA homóloga y ceban la reacción de síntesis de DNA . Como consecuencia, se forman dos estructuras de Holliday. En el modelo de DSBR, la conversión génica asociada con un intercambio de los marcadores flanqueantes dependiendo de la forma en que se resuelvan las estructuras. En le modelo de SDSA, las nuevas cadenas de DNA sintetizadas son desplazadas del molde y emparejadas una con la otra por lo que la conversión génica no se asocia con el entrecruzamiento.

Además de la recombinación entre cromosomas homólogos (recombinación alélica), también se da recombinación entre secuencias repetidas localizadas en regiones no homólogas, ya sea en el mismo o en distintos cromosomas (recombinación ectópica). Según su localización la recombinación entre las secuencias repetidas tendrá distintas consecuencias sobre el producto final (Petes *et al.*, 1991). El intercambio recíproco entre secuencias repetidas localizadas en cromosomas distintos produce translocaciones del DNA. Cuando las repeticiones están en orientación invertida en el mismo cromosoma el producto de la recombinación entre ellas es la inversión de la región entre ambas (Figura 2). Sin embargo, si están en orientación directa, el producto es una delección de una de las secuencias repetidas y de la región intermedia. En este último caso, la recombinación puede ser intracromatídica o

entre cromátidas hermanas (Petes *et al.*, 1991). Además, las deleciones pueden generarse por otros mecanismos no conservativos como la invasión de un extremo (Belmaaza and Chartrand, 1994; Prado and Aguilera, 1995) o reasociación de cadenas (SSA) (Lin *et al.*, 1984; Ozenbergen and Roeder, 1991; Fishman-Lobell and Haber, 1992; Fishman-Lobell *et al.*, 1992).

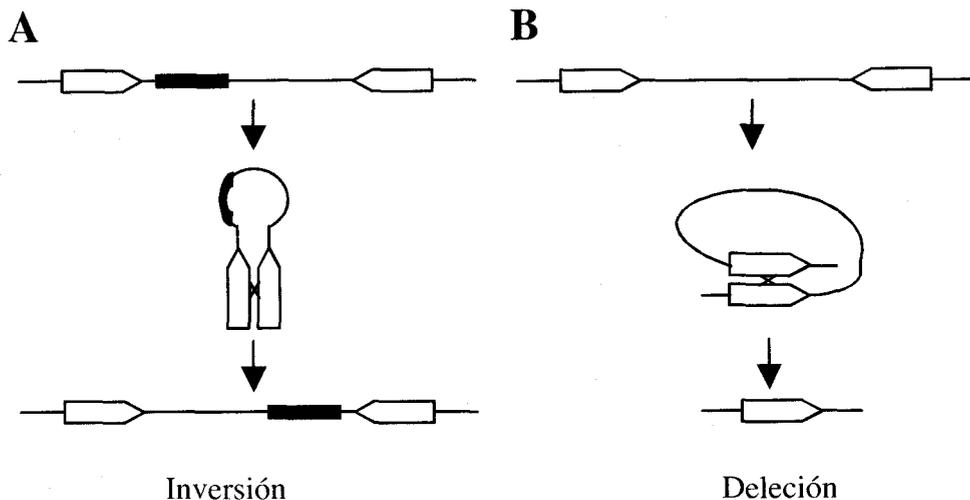


Figura 2. Diagrama que muestra como un suceso de recombinação recíproca entre dos secuencias repetidas en la misma molécula de DNA puede dar lugar a una inversión de las repeticiones (A) o una deleción de una de las repeticiones y la secuencia entre éstas (B) según las repeticiones estén orientadas de una forma invertida o directa respectivamente. El sentido de las flechas indica la orientación de las repeticiones. El suceso de recombinação está representado por un aspa. En A una caja negra permite visualizar la inversión.

I.2. TRANSCRIPCIÓN POR LA RNAPII

Distintos estudios realizados en eucariotas demuestran que la transcripción mediada por la RNAPII conlleva distintos pasos o etapas: reconocimiento del promotor, formación del complejo de pre-iniciación, iniciación, salida del promotor, elongación, terminación y reiniciación (Orphanides *et al.*, 1996).

I.2.1. Iniciación de la transcripción

La RNAPII es una enzima compuesta por una docena de polipéptidos distintos (Woychik and Young, 1990; Young, 1991). Los polipéptidos componentes de la RNAPII así como la mayoría de los factores generales de transcripción, están conservados desde levaduras a humanos. La subunidad mayor de la RNAPII tiene un dominio carboxi-terminal denominado CTD (del inglés *carboxi-terminal domain*), que es esencial y juega un papel importante en la regulación de la transcripción y en la relación entre la transcripción y otros procesos nucleares. Consiste en una serie de repeticiones de un heptapéptido conservado a lo largo de la evolución (Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser) (Corden, 1990). El número de repeticiones varía según la complejidad del organismo, siendo de 26-27 en levaduras y de 52 en mamíferos. Dos de las serinas del heptapéptido están sujetas a fosforilaciones reversibles durante el ciclo de la transcripción (Dahmus, 1996), de manera que la fosforilación completa del dominio provoca un cambio en la carga iónica del mismo. La RNAPII con un CTD hipofosforilado (RNAP IIA, PM: 210kDa) se encuentra preferentemente en el complejo de preiniciación presente en los promotores (PIC), mientras que una RNAPII hiperfosforilada

(RNAP IIO, PM: 240kDa) se asocia con los complejos elongantes. Es decir, cuando el CTD está fosforilado la polimerasa es procesiva (Allison and Ingles, 1989; Scafe *et al.*, 1990; Peterson *et al.*, 1991). Una vez fosforilado el CTD, la doble hélice se abre gracias a una función helicasa, constituyéndose lo que se conoce como “complejo abierto” de la transcripción.

La iniciación de la transcripción por la RNAPII requiere el reclutamiento en los promotores de un complejo protéico constituido por la propia RNAPII, complejos coactivadores y por 5 factores polipeptídicos denominados *factores generales de la transcripción* (GTFs): TFIIB, TFIIE, TFIIF, TFIIH y TFIID, este último formado por la proteína TBP (proteína de unión al elemento TATA de los promotores) y los factores TAFs (del inglés *TBP-associated factor*) (Orphanides *et al.*, 1996). El ensamblaje del complejo de preiniciación (PIC) requiere la unión de la proteína TBP a la secuencia TATA, seguido del reclutamiento concertado del factor TFIIB y la RNAPII junto con los factores TFIIF, TFIIE y TFIIH (Reinberg *et al.*, 1998). Aunque los factores generales son suficientes para el inicio de la transcripción por la RNAPII, la estimulación transcripcional en respuesta a distintas señales específicas de promotores requiere factores adicionales. Esta regulación la ejercen una gran variedad de proteínas que pueden actuar como activadores o represores. Muchos de estos factores han sido identificados como coactivadores transcripcionales. La interacción entre las proteínas reguladoras y la RNAPII está mediada por el complejo “mediador” que constituye un elemento integrador de todas las señales reguladoras que actúan sobre la RNAPII, necesario para la transcripción de, esencialmente, todos los genes (Koleste and Young, 1994; Holstege *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1994; Myers and Kornberg, 2000). La RNAPII junto con algunos de los GTFs y el “mediador” constituye lo que se conoce como holoenzima de la RNAPII. El “mediador” se descubrió inicialmente en levaduras como una fracción cruda que eliminaba la inhibición de la transcripción en un extracto nuclear (Kelleher *et al.*, 1990). Posteriormente se descubrió que esta misma fracción era necesaria para reconstituir la respuesta a activadores en un sistema *in vitro* (Kim *et al.*, 1994). Por otro lado, se habían identificado genéticamente una serie de factores que interaccionaban con el dominio CTD de la RNAPII. Estos factores que interaccionan con el CTD constituyen el complejo SRB (del inglés *suppressor of RNAPII (B)*) (Koleske and Young, 1994) y están codificados por los genes *SRB*, aislados a partir de mutantes de *S. cerevisiae* supresores de deleciones parciales del CTD de la RNAPII (Myers and Young, 1998). Distintos estudios genéticos y moleculares han permitido definir al “mediador” como un gran complejo protéico constituido por aproximadamente 20 polipéptidos entre los que están los factores *Srb*, las proteínas *Med* y otros polipéptidos, identificados genéticamente a partir de estudios independientes, como *Gal11*, *Sin4*, *Rgr1*, *Nut1*, *Nut2*, *Hrs1* y *Rox3* (Kim *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1995; Carlson, 1997; Gustafsson *et al.*, 1997; Myers and Kornberg, 2000). Varios experimentos bioquímicos sugieren la existencia de distintos subcomplejos en el “mediador”. Existen dos subcomplejos funcionalmente distintos: el “subcomplejo *Srb4*” (contiene las subunidades *Srb*) y el “subcomplejo *Rgr1*” (contiene las subunidades *Med* y el resto de polipéptidos). Recientemente se ha demostrado que, aunque el “mediador” se aísla asociado a la RNAPII, no requiere tal interacción para funcionar como un coactivador tanto *in vitro* como *in vivo* (Bhoite *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2001). El “mediador” presenta una significativa conservación a lo largo de la evolución (Malik and Roeder, 2000; Rachez and Freedman, 2001). De hecho, ha sido identificado en levaduras y en mamíferos, aunque existen diferencias en cuanto a la composición de sus subunidades (Hampsey and Reinberg, 1999).

I.2.2. Regulación de la elongación mediada por la RNAPII

La regulación de la transcripción por la RNAPII se da también en la fase de elongación (Kane, 1994). De hecho, el tránsito desde iniciación a elongación de la transcripción está altamente regulado, principalmente mediante fosforilaciones del dominio CTD de la RNAPII, como se ha descrito anteriormente. La elongación de la transcripción puede sufrir “pausas”, es decir paradas transitorias de la RNAPII que no conllevan la liberación del transcrito. Algunos activadores transcripcionales funcionan, al menos en parte, aumentando la eficiencia de la elongación de la RNAPII a través de los sitios de pausa (Yankulov *et al.*, 1994). Estos sitios de pausa a menudo se dan en la zona proximal de algunos promotores. Este fenómeno forma parte de la activación de dichos promotores, en la que se sintetiza un pequeño transcrito antes de que se produzca la pausa de la polimerasa (Bentley, 1995). La regulación de la transcripción por este mecanismo se observó por primera vez en el gen *hsp70* de *Drosophila* (Lis and Wu, 1993). La re-activación de la transcripción en el gen *hsp70* humano a partir de un sitio de pausa requiere la acción del complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF así como del activador HSF1 (Brown *et al.*, 1996; Brown and Kingston, 1997).

Las pausas o bloqueos de la RNA polimerasa pueden deberse a la presencia de determinadas secuencias, a la disminución de la concentración intracelular de nucleótidos, a errores en la incorporación de ribonucleótidos, a la formación de estructuras secundarias del RNA o a la presencia de proteínas en el DNA, entre ellas las que determinan la estructura cromatínica (Bentley, 1995). Existen factores de transcripción cuya función consiste en permitir a la RNAPII evitar dichas pausas. Entre estos factores está TFIIS, que permite avanzar a la polimerasa a través de sitios de pausa mediante un mecanismo que conlleva el corte del último nucleótido incorporado en el transcrito naciente. Mediante esta acción se le permite a la RNAPII pasar de nuevo por el sitio de pausa (Uptain *et al.*, 1997). El gen *PPR2*, que codifica el factor TFIIS en *S. cerevisiae*, está conservado en especies tan divergentes como arqueobacterias, levaduras y humanos (Reines *et al.*, 1996). Los mutantes *ppr2* son sensibles a agentes como el 6-azauracilo, el cual reduce la concentración intracelular de GTF, provocando un defecto en la elongación de la transcripción creando, posiblemente, paradas de la RNAPII y por lo tanto aumentando la necesidad de factores que estimulen la elongación (Exinger and Lacroute, 1992, Uptain *et al.*, 1997). Otros factores implicados en elongación son TFIIF, el complejo “elongador” y el complejo Spt4-Spt5 (Hartzog *et al.*, 1998; Wada *et al.*, 1998; Otero *et al.*, 1999; Wittschieben *et al.*, 1999; Pokholok *et al.*, 2002; Rondón *et al.*, 2003). La función de estos factores, a diferencia de TFIIS, no consiste en la liberación a la RNAPII de un sitio de pausa. Es posible que actúen aumentando la procesividad de la polimerasa y, por tanto, disminuyendo la probabilidad de una parada de la transcripción en sitios críticos de pausa (Reines *et al.*, 1996). Por ejemplo, se ha sugerido que TFIIF interacciona directamente con la RNAPII y suprime la parada transitoria de la enzima aumentando la tasa de adición de nucleótidos (Price *et al.*, 1989; Uptain *et al.*, 1997; Conaway *et al.*, 2000). Spt4 y Spt5, junto con Spt6, se identificaron como factores que regulaban el inicio de la transcripción, a través de un efecto en la estructura de la cromatina. Posteriormente se ha demostrado que Spt4-Spt5 y su homólogo humano DSIF, participan en las primeras fases de elongación (Winston, 1992; Hartzog *et al.*, 1998; Wada *et al.*, 1998). El “mediador” no se ha encontrado formando parte de la forma elongante de la RNAPII, a diferencia del complejo Paf1-Cdc73 que parece ser reclutado en el promotor junto con la polimerasa, a la que acompaña durante la elongación de la transcripción (Svejstrup *et al.*, 1997; Pokholok *et al.*, 2002). El “elongador” es un complejo multiprotéico purificado junto a la RNAPII hiperfosforilada y se propuso como candidato a sustituir al mediador durante la

elongación (Otero *et al.*, 1999).

Una barrera importante para el avance de la transcripción lo puede constituir la organización cromatínica del DNA. La RNAPII requiere factores adicionales que permitan la elongación de la transcripción a través del DNA organizado en nucleosomas. En levadura, se han identificado diferentes complejos con capacidad de remodelar la estructura de la cromatina durante la transcripción: SWI/SNF, RSC y Spt16/Pob3 (Brown *et al.*, 1996; Brown and Kingston, 1997; Orphanides *et al.*, 1998). Otros complejos con actividad de remodelación de la cromatina son NURF, ACF (Tsukiyama and Wu, 1995; Mizuguchi *et al.*, 1997; Ito *et al.*, 1997) y CHRAC (Varga-Weisz *et al.*, 1997; Cairns, 1998) purificados a partir de extractos de *Drosophila*, y el complejo SWI/SNF en humanos (Kwon *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1996).

1.2.3. Acoplamiento de la transcripción a otros procesos metabólicos del RNA

La síntesis de mRNAs en una célula eucariótica requiere un gran número de factores para cada uno de los pasos necesarios hasta la formación de la molécula de mRNA madura. Estas modificaciones en la molécula mRNA no madura (pre-mRNA) sirven, entre otras cosas, para proteger el transcrito de los sistemas de degradación. Estos factores incluyen los hnRNPs (del inglés *heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*) y snRNPs (del inglés *small nuclear ribonucleoproteins*). Los principales pasos del procesamiento del mRNA son el procesamiento del extremo 5', la maduración de intrones y la poliadenilación o incorporación de una cola de poli(A) en el extremo 3' (Figura 3). Estas reacciones están estrechamente asociadas entre sí y con el complejo elongante de la RNAPII mediante su dominio CTD. De hecho el CTD estimula estos procesos, mediante su interacción con las distintas maquinarias implicadas en el procesamiento del mRNA (Fong and Bentley, 2001).

a. Procesamiento del extremo 5' del mRNA

La caperuza presente en el extremo 5' de todos los mRNAs eucarióticos se forma justo después del inicio de la transcripción, cuando la cadena naciente del RNA tiene ~25-30 nucleótidos (Coppola *et al.*, 1983; Jove and Manley, 1984). Parece probable que esta reacción marque la transición entre iniciación y elongación de la transcripción. Una RNA trifosfatasa (Cet1) elimina el γ -fosfato del primer nucleótido del pre-mRNA. La proteína Ceg1 transfiere, al extremo difosfato que resulta, una molécula de GMP. Después una metiltransferasa le añade un grupo metilo en la posición N7 formando la caperuza m⁷G(5')ppp(5')N. Además de la participación de estas enzimas, se sabe que en esta reacción el CTD juega un papel directo (Cho *et al.*, 1997). Estudios genéticos han revelado que la quinasa Kin28, quinasa que fosforila el dominio CTD, recluta a las enzimas responsables del procesamiento del 5' del mRNA en la RNAPII (Rodríguez *et al.*, 2000). Otro dato que pone de manifiesto la relación existente entre la transcripción y el procesamiento del 5' del mRNA es el descubrimiento, en humanos, de una interacción física entre una proteína implicada en la elongación de la transcripción hSPT5 y enzimas de procesamiento del 5' del mRNA (Wen and Shatkin, 1999). Esta asociación entre procesamiento del 5' del mRNA y elongación de la transcripción podría ser un "checkpoint" para asegurar que la RNAPII sólo continúa transcribiendo aquellos transcritos que han sido correctamente procesados en su extremo 5'.

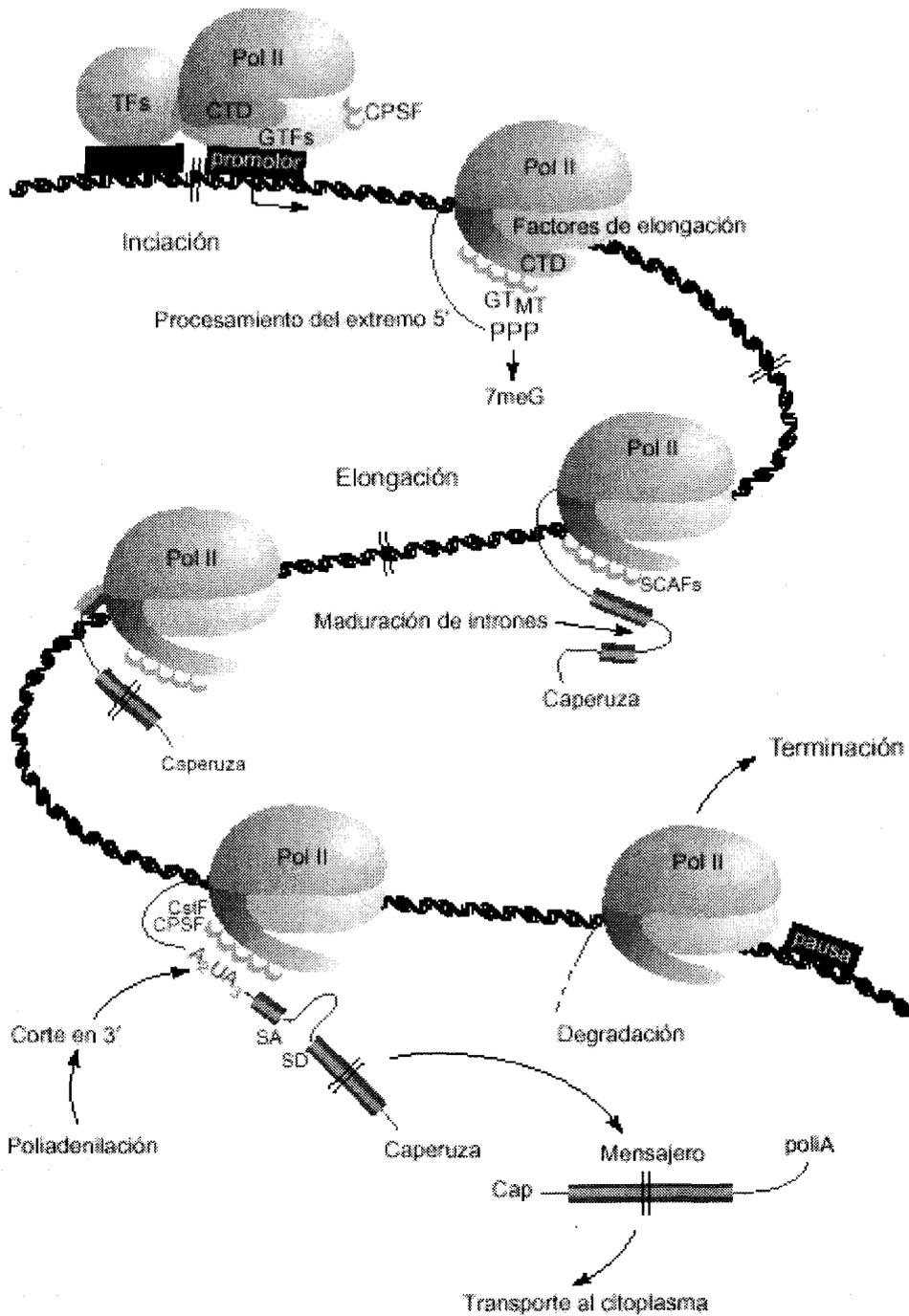


Figura 3. Acoplamiento de la transcripción por la RNAPII con el procesamiento del mRNA. Durante el inicio de la transcripción se asocia a la holoenzima de la RNAPII el factor CPSF (del inglés *cleavage polyadenylation stimulatory factor*) (naranja). Durante la elongación, donde el dominio CTD está hiperfosforilado (morado), muchos de los GTFs son reemplazados por factores de elongación (verde). En esta etapa también se asocian al CTD las enzimas implicadas en el procesamiento del extremo 5' (GT y MT), así como los factores SCAFs (del inglés *SR-like CTD-associated factors*) para promover el reclutamiento del madurosoma (naranja). Posteriormente, el factor CsF (del inglés *CTD-associated cleavage-stimulation factor*) y CPSF median el corte y la poliadenilación en el extremo 3', liberándose de esta manera el mRNA del complejo de transcripción. Finalmente tiene lugar la terminación de la transcripción.

b. Maduración de intrones

La maduración de intrones de los mRNA ocurre en un gran complejo macromolecular denominado madurosoma, compuesto por pequeñas partículas nucleares ribonucleoprotéicas (snRNPs) y proteínas de la familia de proteínas SR ricas en arginina y serina (*serine/arginine-rich*) (Moore and Sharp, 1993; Kramer, 1996; Manley and Tacke, 1996). La polimerización por la RNAPII es relativamente lenta (~1000-2000 bases por minuto) comparada con la RNA polimerasa del fago T7 (~15000 bases por minuto). Esta elongación ralentizada puede ser necesaria para permitir un procesamiento cotranscripcional. De hecho se ha descrito que, *in vitro*, la eliminación de los intrones es más eficiente cuando se acopla a la RNAPII que a la polimerasa del fago T7 (Ghosh and García-Blanco, 2000). Aunque la maduración de intrones puede ocurrir cotranscripcionalmente, esta asociación no es obligatoria ya que *in vitro* se pueden eliminar los intrones de una molécula de RNA ya transcrita (Beyer and Osheim, 1988; Bauren and Wieslander, 1994; Zhang *et al.*, 1994). Distintos estudios han demostrado la existencia de interacciones funcionales y bioquímicas entre el CTD y algunas proteínas de la maquinaria de la maduración de intrones (Chabot *et al.*, 1995; Yuryev *et al.*, 1996, Kim *et al.*, 1997, Corden and Patturajan, 1997). Estudios de microscopía sugieren que el CTD dirige a los factores implicados en la maduración de intrones hacia los sitios de transcripción (Misteli and Spector, 1999). Pero la RNAPII no sólo controla la distribución espacial de los factores implicados en el procesamiento de los pre-mRNA sino que además actúa directamente con dichos factores mejorando la eficiencia de tal procesamiento (Hirose *et al.*, 1999). Aunque sólo el ~3% de los genes de la levadura contienen intrones, el total de los transcritos que los contiene es de ~30% (Ares *et al.*, 1999; Lopez and Seraphin, 1999). Esto es debido a que los intrones están en genes de expresión muy elevada, como en aquellos que codifican las proteínas ribosómicas. Aunque aún se desconocen las razones, los autores sugieren que la existencia del intrón facilita la síntesis de mRNA, indicando este hecho, una vez más, una relación entre la maduración de intrones y transcripción.

c. Poliadenilación

La poliadenilación del mRNA ocurre en dos pasos: corte endonucleolítico del pre-mRNA y adición de un poli(A) en el extremo 3'. Algunos de los factores implicados en este proceso se asocian con la RNAPII en los promotores y permanecen asociados a ella durante la elongación de la transcripción. El CTD de la RNAPII participa directamente en la formación y/o función de un complejo estable y catalíticamente activo mediante interacciones directas con factores de poliadenilación (Hirose and Manley, 1998). Aunque aún se desconocen exactamente los mecanismos moleculares, se ha descrito que este proceso está funcionalmente relacionado con la terminación de la transcripción ya que es necesario reconocer la señal de poli(A) para que tenga lugar dicha terminación (Dantonel *et al.*, 1997; Osheim *et al.*, 1999). Este requerimiento asegura que la terminación ocurra después de que el extremo 3' del gen se haya transcrito. Existe un modelo que sugiere que la terminación se dispara por un cambio en la interacción existente entre distintos factores de poliadenilación y la RNAPII, tras el paso de ésta por la señal de poli(A), pasando a un estado menos procesivo (McCracken *et al.*, 1997). Un grupo de proteínas estrechamente asociadas a las moléculas de RNA poliadeniladas son las denominadas NAB (del inglés *nuclear polyadenylated RNA-binding proteins*). La ausencia de éstas, y otras proteínas implicadas en este procesamiento, provoca una acumulación de transcritos en el núcleo, en algunos casos en el sitio de transcripción (Eckner *et al.*, 1991; Yerson *et al.*, 1993; Long *et al.*, 1995; Huang and Carmichael, 1996; Brodsky and Silver, 2000; Hilleren *et al.*, 2001; Jensen *et al.*, 2001). A

diferencia de lo que ocurre en el procesamiento del extremo 5', se necesita un correcto extremo 3' poliadenilado para el transporte de dicho mRNA al citoplasma (Dower and Rosbash, 2002).

d. Transporte de mRNA

El DNA de las células eucariotas está contenido en el núcleo, un compartimento que separa espacialmente la síntesis de DNA y RNA de la síntesis de proteínas en el citoplasma. El núcleo está delimitado por la membrana nuclear que asegura un estricto y selectivo control molecular del intercambio entre el núcleo y el resto de la célula, no sólo para proteger y transmitir correctamente la información genética, sino también para coordinar las funciones nucleares y citoplasmáticas. El transporte de moléculas a través de la membrana ocurre a través del poro nuclear (NPC, del inglés *nuclear pore complex*), un complejo multiprotéico constituido por nucleoporinas (~50 MDa, en levaduras) y conservado a lo largo de la evolución. Se ha descrito que distintas mutaciones en genes que codifican nucleoporinas provocan un bloqueo en el transporte de mRNA (Fabre and Hurt, 1997). El transporte de mRNA nuclear podría constituir un punto de verificación (checkpoint) esencial en la regulación de la expresión génica. En el núcleo, distintas hnRNPs y otras proteínas de unión a RNA empaquetan los mensajeros en partículas ribonucleoprotéicas (RNPs). Muchos de estos factores son reclutados por el mRNA durante la transcripción (Lei *et al.*, 2001). Algunas de estas proteínas permanecen en el núcleo mientras que otras acompañan a la RNP hasta el citoplasma donde se disocian para volver al núcleo para comenzar una nueva ronda de transporte (Piñol-Roma and Dreyfuss, 1992). Algunos ejemplos de hnRNPs son Npl3 (*nuclear protein localization*), Hrp1 (*hnRNP-like protein 1*), Pab1 (*poly(A)-binding protein*), Pub1 (*poly(U)-binding protein*) y Nab2 (*nuclear polyadenylated RNA binding protein 2*) (Wilson *et al.*, 1994, Anderson *et al.*, 1993). El reconocimiento de los mRNP que van a ser transportados está mediado por distintos factores. Uno de los más relevantes es Mex67, que junto con Mtr2, es esencial para dicho transporte (Kadowaki *et al.*, 1994; Santos-Rosa *et al.*, 1998). Se identificó como un sintético letal con una mutación en la nucleoporina NUP85 (Segref *et al.*, 1997). Mex67 se une al mRNA y a su vez contacta con distintos componentes del poro nuclear mediante Mtr2 (Katahira *et al.*, 1999; Bachi *et al.*, 2000; Strässer *et al.*, 2000). Sin embargo, en un mutante *mex67* el RNA poliadenilado no se acumula en el poro nuclear, sugiriendo una inhibición del transporte del mRNA en algún paso intermedio entre el sitio de transcripción y la envoltura nuclear (Segref *et al.*, 1997). Se sabe que Yra1, otra proteína implicada en transporte de mRNA, interacciona directamente con Mex67, reforzando la interacción de ésta con el mRNA y actuando de puente entre la formación del mRNP y la maquinaria de translocación (Strässer *et al.*, 2000; Conti and Izaurralde, 2001; Reed and Magni, 2001). Una vez en el citoplasma, se ha propuesto que las mRNPs se disgregan gracias a la actividad ATPasa de helicasas de RNA como la de Dbp5. De esta manera, Dbp5 contribuye a la liberación del mRNA en el citoplasma y al reciclaje de las distintas hnRNP al núcleo (Bangs *et al.*, 1998; Kosova *et al.*, 2000).

I.2.4. Acoplamiento de la transcripción a distintos procesos metabólicos del DNA

Aunque tradicionalmente se ha estudiado la transcripción del DNA como un proceso independiente del resto de fenómenos que se dan en el núcleo de las células eucarióticas, existen evidencias de un acoplamiento de la transcripción con otros procesos metabólicos del DNA. El ejemplo más paradigmático es el acoplamiento de la transcripción con la reparación a través del factor general de transcripción TFIIF en eucariotas. Como se ha descrito anteriormente, la fosforilación del CTD de la RNA polimerasa II es esencial para la

iniciación de la transcripción y para la disociación del complejo elongante del resto del complejo protéico ensamblado en el promotor (Douziech *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2000). Además de la actividad quinasa contiene proteínas con actividad helicasa implicadas en la reparación por escisión (NER, del inglés *nucleotide excision repair*) acoplada a la transcripción (Aboussekhra and Wood, 1994; Cleaver, 1994; Drapkin *et al.*, 1994; Svejstrup *et al.*, 1996; Hoeijmakers *et al.*, 1996). Este mecanismo de reparación implica la eliminación de daños en el DNA por escisión de un oligonucleótido que contiene la/s base/s dañada/s y nueva síntesis de DNA.

Otro fenómeno que sugiere una asociación entre la transcripción y la reparación, es la relación entre la actividad transcripcional y la tasa de mutación. En levaduras se han detectado altos niveles de mutación en genes que son activamente transcritos (Datta and Jinks-Robertson, 1995). En mamíferos, el mecanismo de hipermutación implicado en la producción de las inmunoglobulinas está asociado a la transcripción de sus genes (Goyenechea *et al.*, 1997).

I.3. RELACIÓN ENTRE RECOMBINACIÓN Y TRANSCRIPCIÓN

La primera evidencia de una relación de la transcripción con la recombinación se obtuvo en *S. cerevisiae* con el aislamiento de *HOT1*, una secuencia reguladora de la transcripción por la RNA polimerasa I, como un activador de la recombinación en la región del rDNA (Keil and Roeder, 1984; Voelkel-Meiman *et al.*, 1987). *HOT1* es capaz de inducir recombinación de una forma directamente relacionada con su capacidad de promover la transcripción (Stewart and Roeder, 1989). También se ha observado inducción de recombinación por transcripción dependiente de la RNAPII. Así, en *S. cerevisiae* la activación de la transcripción produce un aumento en la frecuencia de deleciones entre repeticiones de *GAL10* (Thomas and Rothstein, 1989) o entre elementos Ty (Nevo-Caspi and Kupiec, 1994). En el proceso de cambio de sexo sólo tiene capacidad de iniciar la recombinación el *locus* que se expresa (Klar *et al.*, 1981). En *Schizosaccharomyces pombe*, la transcripción a partir del promotor *ADHI* induce la recombinación de las secuencias transcritas (Grimm *et al.*, 1991). En células de mamíferos, la activación de la transcripción estimula la recombinación entre secuencias repetidas de DNA, aunque en los sistemas estudiados sólo ocurre si se produce un corte de doble cadena en las repeticiones antes de inducir la transcripción (Nickoloff and Reynolds, 1990; Nickoloff, 1992). En células de mamíferos, se da una mayor frecuencia de recombinación entre los segmentos transcripcionalmente activos de los genes de las inmunoglobulinas (Blackwell *et al.*, 1986; Leung and Maizels, 1992; Lauster *et al.*, 1993; Oltz *et al.*, 1993). Por último, también se ha observado relación entre la recombinación y la transcripción en virus y bacterias. En *E. coli* las deleciones mediadas por *IS102* requieren la transcripción de la región en la que se inserta la secuencia de inserción (Bernardi and Bernardi, 1988) y la formación de deleciones en plásmidos se induce por transcripción (Vilette *et al.*, 1995). La transcripción de determinados genes de algunos fagos de *E. coli* estimula la transducción tanto especializada como generalizada (Dul and Drexler, 1988). Resultados similares se han obtenido con poliomavirus (Bourgeaux-Ramoisy *et al.*, 1995).

La recombinación inducida por transcripción puede ser una consecuencia del efecto que esta última tiene sobre la estructura del DNA. La apertura de la doble hélice y los cambios en el grado de superenrollamiento o en la estructura de la cromatina que están asociados al proceso de transcripción pueden conducir a una mayor accesibilidad de la

maquinaria de recombinación al DNA, generar estructuras hipersensibles a nucleasas endógenas o facilitar la reacción de intercambio de cadenas. Existen estudios que demuestran que esta clase de fenómenos inducen recombinación. En *S. cerevisiae*, se ha comprobado que los sitios donde se producen los cortes de doble cadena que inician la recombinación meiótica coinciden con las regiones promotoras de los genes (Nicolas *et al.*, 1989; Baudat and Nicolas, 1997) y que la recombinación se inicia preferentemente en los sitios de unión de factores de transcripción (White *et al.*, 1991). Este fenómeno se ha observado también en células de mamíferos (Shenkar *et al.*, 1991). Un ejemplo de ello es RBP2N, una proteína de unión a sitios iniciadores de la recombinación meiótica en humanos, que funciona como un represor transcripcional (Dou *et al.*, 1994). Por otro lado, mutaciones en los genes estructurales de las topoisomerasas de DNA, *TOP1*, *TOP2* (Christman *et al.*, 1988) y *TOP3* (Wallis *et al.*, 1989), o en los genes implicados en el mantenimiento de la estructura de la cromatina *SIR2* (Gottlieb and Esposito, 1989), *SPT4* y *SPT6* (Malagón and Aguilera, 1996) producen un fenotipo hiper-recombinante. En este sentido, se ha demostrado que el superenrollamiento negativo que produce el avance de la RNA polimerasa estimula la recombinación específica de sitio por las resolvasas bacterianas *gō* y Tn3 *in vitro* (Dröge, 1993). También se ha observado que la transcripción estimula el intercambio de cadenas catalizado por RecA *in vitro* (Kotani and Kmiec, 1994). Todos estos resultados sugieren que las alteraciones estructurales del DNA que produce el avance de la RNA polimerasa, son responsables, al menos en parte, del efecto de la transcripción sobre la recombinación.

1.4. RECOMBINACIÓN EN MUTANTES DEL COMPLEJO THO

La relación entre los distintos procesos metabólicos del DNA es de gran importancia para entender los mecanismos responsables de la inestabilidad del genoma. El aislamiento de mutantes de recombinación en levaduras ha permitido establecer en muchos casos una relación entre recombinación y procesos como la transcripción.

Entre los genes aislados cuyas mutaciones provocan un aumento de la inestabilidad genómica en *S. cerevisiae* se encuentra los genes *HPR1* y *THO2*. *HPR1* fue identificado en una búsqueda de mutantes de levadura con fenotipo de hiperrecombinación (Aguilera and Klein, 1988) mientras que *THO2* se identificó como un supresor en multicopia de *hpr1Δ* (Piruat and Aguilera, 1998). Posteriormente se ha aislado un complejo proteico, THO, en el que están presentes las proteínas Hpr1 y Tho2, junto con Mft1 y Thp2 (Chávez *et al.*, 2000). La proteína Hpr1 también se ha encontrado asociada con la RNAPII, junto con otras proteínas como Paf1, Cdc73 y Ccr4 (Chang *et al.*, 1999). Mutaciones en cualquiera de los genes que codifican las proteínas del complejo THO confieren los mismos fenotipos de hiperrecombinación asociados a un defecto de transcripción. Los mutantes *hpr1Δ* presentan un aumento de recombinación específico de secuencias repetidas directas (Aguilera and Klein, 1990; Santos-Rosa and Aguilera, 1994), sin ningún efecto aparente sobre la recombinación entre repeticiones invertidas, entre cromosomas homólogos o entre cromátidas hermanas (Aguilera and Klein, 1989; Santos-Rosa and Aguilera, 1994).

Además del fenotipo de recombinación de *hpr1Δ* se observado una incapacidad de las estirpes *hpr1Δ* de transcribir el gen *lacZ* de *E. coli*. En nuestro laboratorio se ha demostrado un efecto del complejo THO en elongación de la transcripción (Chávez and Aguilera, 1997, Piruat and Aguilera, 1998; Chávez *et al.*, 2000).

Para que se dé hiperrecombinación entre repeticiones directas de DNA en los

mutantes *tho* es necesario que se produzca transcripción entre las repeticiones. Cuando impedimos que se transcriba la secuencia ubicada entre ambas repeticiones, mediante un terminador de la transcripción o bien reprimiendo el promotor, desaparece el fenotipo de hiperrecombinación (Chávez and Aguilera, 1997; Prado *et al.*, 1997; Piruat and Aguilera, 1998; Chávez *et al.*, 2000). El fenotipo de hiperrecombinación de *hpr1Δ* depende del tipo de secuencia localizada entre las repeticiones (Prado *et al.*, 1997). El efecto más acusado se ha observado en secuencias de DNA largas y con un alto contenido en G+C (Chávez *et al.*, 2001). Existe una relación directa entre la incapacidad de transcribir determinadas secuencias de DNA y la hiperrecombinación de los mutantes *tho*. Aquellas secuencias que pueden ser transcritas en mutantes *tho* no confieren hiperrecombinación cuando están localizadas entre repeticiones directas. Por el contrario, secuencias como *lacZ*, cuya transcripción está fuertemente afectada en mutantes *tho*, provocan un aumento de hasta 2000 veces en el nivel de deleciones cuando se ubican entre repeticiones directas (Chávez and Aguilera, 1997; Piruat and Aguilera, 1998; Chávez *et al.*, 2000). Estos resultados han llevado a proponer un modelo según el cual los defectos en la elongación de la transcripción que se dan en los mutantes *tho* provocarían daños en el DNA que podrían ser reparados mediante recombinación entre secuencias repetidas adyacentes. En el caso de que estas secuencias repetidas no existieran, sería más difícil reparar esos daños, produciéndose un eventual pérdida de la molécula de DNA dañada. Esto último explicaría la alta tasa de pérdida de cromosomas (Santos-Rosa and Aguilera, 1994) y el aumento en la inestabilidad de plásmidos dependiente de transcripción observados en estirpes *hpr1Δ* (Chávez and Aguilera, 1997).

I.5. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis ha sido profundizar en la relación entre inestabilidad genómica y transcripción. Para ello hemos realizado una búsqueda de genes implicados en recombinación y nos hemos centrado en el estudio de uno de ellos: *THP1*. En segundo lugar hemos seguido dos aproximaciones distintas buscando otras proteínas relacionadas con Thp1 que nos pudieran dar pistas acerca de su función en la célula: un abordaje genético para encontrar supresores en multicopia del defecto en transcripción observado en *thp1Δ* y otro bioquímico para buscar proteínas que interaccionaran físicamente con Thp1. Por último hemos querido estudiar posibles relaciones funcionales existentes entre distintos complejos proteicos implicados en recombinación y/o transcripción.

**RESULTADOS
CAPÍTULO I**

**BÚSQUEDA DE GENES IMPLICADOS
EN RECOMBINACIÓN**

II.1.1. Mutantes nulos con fenotipo de hiperrecombinación

En esta tesis hemos buscado de forma sistemática mutantes afectados en recombinación. Para esta búsqueda nos hemos basado en una serie de sistemas de repeticiones directas e invertidas localizadas en el plásmido centromérico pRS314 (pRS314-L, pRS314-LY y pRS314-SU, respectivamente). Todos los sistemas presentan la misma secuencia repetida (598 pb de la región codificante del gen *LEU2*) tanto en orientación directa como invertida, y difieren únicamente en el tamaño y origen de la secuencia intermedia (Figura 4B). Los sistemas L y LY son sistemas de repeticiones directas separadas por fragmentos de 31 pb (L) y 5.57 kb (LY). La secuencia intermedia es diferente en cada sistema. En el sistema L es un pequeño fragmento del polilinker KS+ y en el sistema LY es el vector pBR322 completo más el gen *URA3*. Las inversiones se han estudiado en el sistema de repeticiones invertidas SU, que presenta las mismas repeticiones de 598 pb que los anteriores separadas por una secuencia de 1.66 kb de levadura más un pequeño fragmento del gen *tet* de pBR322.

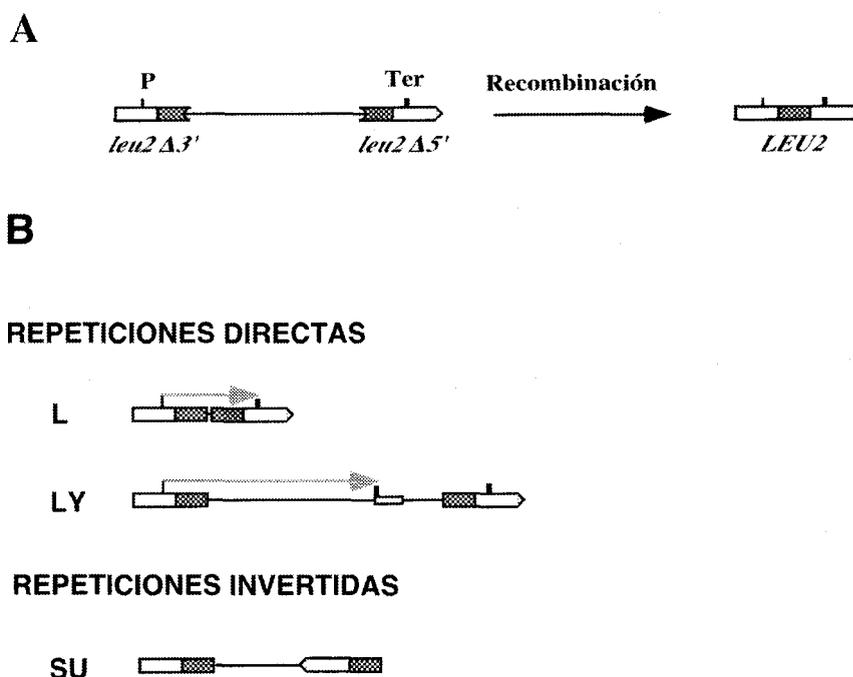


Figura 4. (A) Esquema del suceso de recombinación (delección) que da lugar a una copia silvestre del gen *LEU2* en el sistema de repeticiones usado en este estudio. (B) Sistemas de repeticiones directas (L y LY) e invertidas (SU). Las repeticiones no están dibujadas a escala. El mRNA sintetizado en cada sistema aparece representado por una flecha. Las líneas delgadas representan secuencias de pBR322 y las cajas representan secuencias de levadura. El promotor *LEU2* así como los diferentes terminadores de transcripción están indicados por pequeñas líneas verticales. La repetición interna de 0,6 Kb de *LEU2* aparece sombreada.

Todos los sistemas de recombinación están formados por dos copias truncadas del gen *LEU2*; una de ellas presenta una delección del extremo 3' (*leu2Δ3'*) y la otra una delección del extremo 5' (*leu2Δ5'*). Por recombinación homóloga entre las repeticiones se genera una copia silvestre del gen *LEU2*, lo que permite seleccionar positivamente los recombinantes en SC-L (Figura 4A). En el caso de las repeticiones directas el suceso de recombinación va acompañado de la pérdida de la secuencia intermedia y una de las repeticiones, mientras que en el caso de recombinación entre secuencias invertidas se produce una inversión de la secuencia intermedia, sin pérdida de material genético.

Resultados

Con estos sistemas descritos anteriormente hemos estudiado la frecuencia de recombinación de un total de 610 mutantes, cada uno de los cuales con una delección de un gen no esencial. Al comienzo de este trabajo no se conocía la identidad de la mayoría de estos genes, de manera que con este estudio de inestabilidad genómica, junto con otros estudios paralelos realizados en otros laboratorios dentro del proyecto EUROFAN, pretendíamos aportar alguna información acerca de ellos con el fin conocer sus funciones. De entre todos ellos hemos obtenido 10 candidatos con un mayor o menor fenotipo de hiperrecombinación dependiendo del sistema utilizado. Hemos considerado un mutante como hiperrecombinante cuando presentaba una frecuencia de recombinación al menos 3.5 veces superior a la frecuencia de recombinación de la cepa silvestre.

Si atendemos en primer lugar a aquellos mutantes que confieren altas frecuencias de recombinación independientemente del sistema usado, es decir en los tres sistemas de repeticiones, encontramos a *med2Δ*, *lsg1Δ*, *cwc23Δ* y *ynl310cΔ* (Figura 5).

	L	LY	SU	FUNCIÓN
WT	7.0	13.0	1.9	
<i>med2Δ</i>	70.0 (x10)	130.0 (x10)	22.8 (x12)	Componente del Mediador
<i>rpl13AΔ</i>	42.0 (x6)	11.7 (x0.9)	2.3 (x1.2)	Proteína ribosómica de la subunidad 60S
<i>lsg1Δ</i>	42.0 (x6.1)	286.0 (x22)	11.4 (x6)	Función desconocida
<i>cwc23Δ</i>	42.0 (x6)	93.6 (x7.2)	6.9 (x3.6)	Función desconocida; se asocia a Cef1, Prp43, Prp45, Prp8 (proteínas implicadas en el procesamiento de mRNA)
<i>tos3Δ</i>	16.8 (x2.4)	62.4 (x4.8)	1.3 (x0.7)	Función desconocida; interacciona con Cof1 (citoesqueleto) y Nup84 (poro nuclear)
<i>apc9Δ</i>	2.8 (x0.4)	18.2 (x1.4)	10.8 (x5.7)	Subunidad del complejo APC (Anaphase-Promoting Complex)
<i>ynl310cΔ</i>	469.0 (x67)	143.0 (x11)	148.2 (x78)	Función desconocida
<i>yol072wΔ</i>	22.0 (x3)	1775.0 (x137)	34.0 (x18)	Función desconocida
<i>trf4Δ</i>	18.2 (x2.6)	113.1 (x8.7)	1.9 (x1)	DNA polimerasa κ (replicación, reparación cortes de doble cadena)
<i>yor322cΔ</i>	53.9 (x7.7)	92.3 (x7.1)	3.8 (x2)	Función desconocida

Figura 5. Frecuencias de recombinación ($\times 10^5$) de los mutantes WNOS032 (*med2Δ*), FLPZ022-08B(AL) (*rpl13AΔ*), FLRA006-01B(A) (*lsg1Δ*), FCRN024-08B(AL) (*cwc23Δ*), FBS1008-02A(A) (*tos3Δ*), FPPR003-03D(AL) (*apc9Δ*), FPAA001-09B(AL) (*ynl310cΔ*), WFBE046 (*yol072wΔ*), WFBE030 (*trf4Δ*) y FSRM023-03C(A) (*yor322cΔ*) y la correspondiente cepa silvestre isogénica (FY o W303-1A) transformadas con los plásmidos centroméricos pRS314-L, pRS314-LY y pRS314-SU que contienen los correspondientes sistemas de repeticiones directas e invertidas (ver Figura 4). Los datos representan la mediana de 3-4 tests de fluctuación, cada uno realizado con seis colonias independientes.

A lo largo de esta tesis se ha ido conociendo la identidad de muchos de estos genes, entre ellos la mayoría de los 10 seleccionados. Med2 es un componente del complejo Mediador implicado en la activación de la transcripción (Asturias *et al.*, 1999; Malik and Roedor, 2000; Sakurai and Fukasawa, 2000). La delección de este gen produce un incremento en recombinación de 10 veces en el sistema L, 10 veces en el LY y 12 en el SU. De la proteína Lsg1 no se conoce su función. El mutante nulo no crece a 15°C y tiene problemas de conjugación y esporulación (Lillo *et al.*, 2000). Aunque la delección de este gen produce un incremento en la frecuencia de recombinación en todos los sistemas de repeticiones utilizados, es más significativa la subida de 22 veces en el sistema LY. La función de la proteína Cwc23 también se desconoce, aunque se ha encontrado asociada a proteínas implicadas en el procesamiento de mRNA (Cef1, Prp43, Prp45, Prp8). El mutante *cwc23Δ* presenta las mayores frecuencias de recombinación en los sistemas de repeticiones directas L (x6) y LY (x7.2). *YNL310c* codifica una proteína de función desconocida. Se trata de una proteína de 205 aa con una similitud del 45% a una proteína de *S. pombe* (SPAC24H6.02c). En todos los sistemas de repeticiones utilizados, L, LY y SU, el mutante *ynl310cΔ* presenta altos incrementos en las frecuencias de recombinación (x67, x11 y x78, respectivamente) con respecto al silvestre.

En segundo lugar podemos agrupar a aquellos mutantes que presentan una elevada frecuencia de recombinación sólo en los sistemas de repeticiones directas, ya sea el sistema L (sin secuencia intermedia), LY (con una secuencia intermedia de 5.57 kb) o ambos. Estos son *rpl13AΔ*, *tos3Δ*, *trf4Δ* y *yor322cΔ*. El mutante *rpl13AΔ* es hiperrecombinante sólo en el sistema de repeticiones directas L. Rpl13A es una proteína ribosómica que forma parte de la subunidad 60S del ribosoma. Este mutante no presenta defectos en crecimiento, conjugación, esporulación ni germinación (López *et al.*, 1998; Planta and Mager, 1998; Nicoloso *et al.*, 1996). El mutante *tos3Δ* también incrementa la frecuencia de recombinación sólo en uno de los sistemas de repeticiones directas, el LY (x4.8). Tos3 es una proteína de función desconocida. Se sabe, por estudios de doble híbrido, que interacciona con una proteína del citoesqueleto (Cof1) y del poro nuclear (Nup84). La delección nula *trf4Δ*, al igual que *tos3Δ*, provoca también un incremento en la frecuencia de recombinación sólo en el sistema LY (x8.7). *TRF4*, que codifica una DNA polimerasa κ, acopla la replicación del DNA con la cohesión de cromátidas hermanas (Wang *et al.*, 2000, 2002; Hanna *et al.*, 2001; Carson and Christman, 2001). Además también tiene un papel en la reparación de cortes de doble cadena. De la proteína codificada por *YOR322c* tampoco se conoce su función. El mutante nulo *yor322cΔ* es termosensible presenta a 37°C, fenotipo revertido por la adición de sorbitol 1M, y es incapaz de crecer con 10mM de cafeína (Pearson *et al.*, 1998).

La delección de *APC9*, gen que codifica una proteína que forma parte del complejo APC (Anaphase-Promoting Complex) (Irniger and Nasmyth, 1997; Zachariae *et al.*, 1998; Zachariae and Nasmyth, 1999), es el único de los 10 candidatos que provoca un incremento en la frecuencia de recombinación sólo en el sistema de repeticiones invertidas SU (x5.7).

Por último nos queda el mutante *yol072wΔ*, que presenta altas frecuencias de recombinación en aquellos sistemas que tienen una región intermedia flanqueada por las repeticiones, es decir, los sistemas LY y SU. El hecho de que no sea hiperrecombinante en el sistema L, que a diferencia del LY apenas tiene secuencia intermedia, podría indicarnos una asociación entre recombinación y transcripción, como se ha observado

anteriormente en mutantes tipo del complejo THO. La proteína codificada por *YOL072w* es de función desconocida.

Una vez estudiada la frecuencia de recombinación usando los sistemas de repeticiones plasmídicos L, LY y SU, en los 610 mutantes, quisimos ver el comportamiento de estos 10 mutantes seleccionados como hiperrecombinantes en el sistema de repeticiones directas cromosómico *leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k*. Como se muestra en la Figura 6, sólo *cwc23Δ*, *ynl310cΔ*, *yol072wΔ* y *trf4Δ* muestran frecuencias de recombinación superiores a la del silvestre (x4.7, x327, x2091, x4, respectivamente). *med2Δ* es el único de los mutantes que tiene frecuencias de recombinación inferiores a las del silvestre.

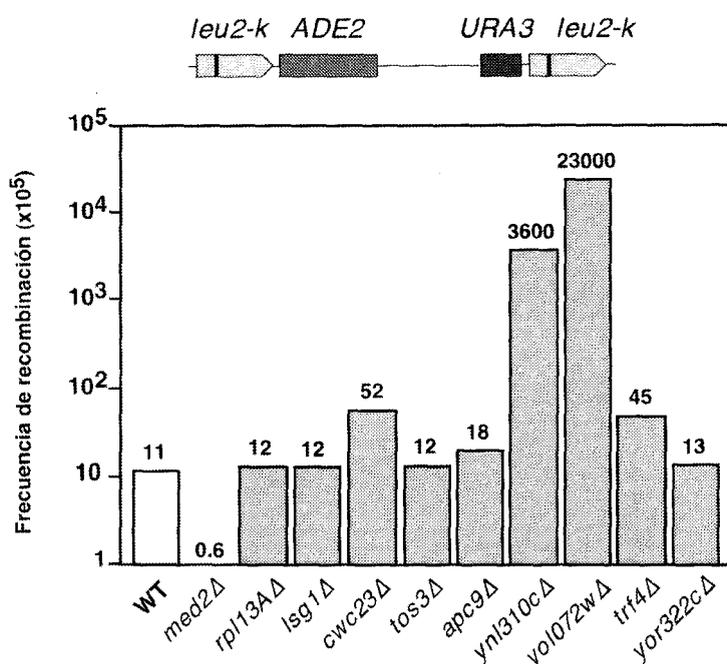


Figura 6. Frecuencias de recombinación de las estirpes silvestre (MGY6-1A), *med2Δ*(MGY1-2D), *rpl13AΔ* (WFDL-1D), *lsg1Δ* (AFGL-7D), *cwc23Δ*(WFGL-1C), *tos3Δ*(AFGL-2D), *apc9Δ* (WFLR-2B), *ynl310cΔ* (WFNL-5B), *yol072wΔ* (MGY3-2D), *trf4Δ* (AWT4-1C) y *yor322cΔ* (AFOR-1A). La recombinación se ha estudiado con el sistema de repeticiones directas cromosómico *leu2k::ADE2-URA3::leu2k*. Los recombinantes se seleccionaron como colonias Ura⁺ capaces de crecer en SC+FOA. Otros detalles como en la Figura 5.

II.1.2. El mutante hiperrecombinante *yol072wΔ* está afectado en la transcripción dependiente de RNAPII

Una de las características más relevantes de los mutantes *hpr1Δ* y *tho2Δ* es su incapacidad de transcribir distintas secuencias de DNA, entre ellas la secuencia bacteriana *lacZ*. Para intentar determinar si algunos de estos mutantes estaban afectados en transcripción analizamos la capacidad de éstos de expresar las secuencias *lacZ* y *PHO5* (de bacterias y de levaduras, respectivamente) fusionadas al promotor regulable *GAL1*. Hemos estudiado los mutantes que significativamente mostraron una mayor frecuencia de recombinación en el sistema LY, y no en el L, ya que este dato nos podría estar indicando un posible defecto de estos mutantes al transcribir la secuencia de 5.57kb presente entre las repeticiones directas. Estos son *yol072wΔ* y *trf4Δ* (Figura 5).

Por otro lado también hemos incluido el mutante *med2Δ* por su distinto comportamiento en recombinación dependiendo del sistema de recombinación utilizado (Figura 5 y 6). Como se muestra en la Figura 7, la actividad β -galactosidasa medida con la fusión *GAL1-lacZ* en *yol072wΔ*, en condiciones de inducción (2% galactosa) alcanza un 14% de los niveles del silvestre. Los mutantes *med2Δ* y *trf4Δ* no presentan un defecto en la expresión de esta fusión *GAL1-lacZ*. El defecto observado en *yol072wΔ* no se debe a la incapacidad del mutante de iniciar la transcripción desde el promotor *GAL1* sino que refleja una incapacidad del mismo de expresar el gen *lacZ*. Esto lo comprobamos con la fusión *GAL1-PHO5*. Cuando medimos la actividad fosfatasa con esta fusión observamos que *yol072wΔ* alcanza un 67% de actividad con respecto a los niveles del silvestre. Al igual que ocurre con la fusión *GAL1-lacZ*, los mutantes *med2Δ* y *trf4Δ* tampoco muestran un defecto en la expresión de *PHO5*. En condiciones de represión (2% glucosa, GLU) apenas detectamos actividad.

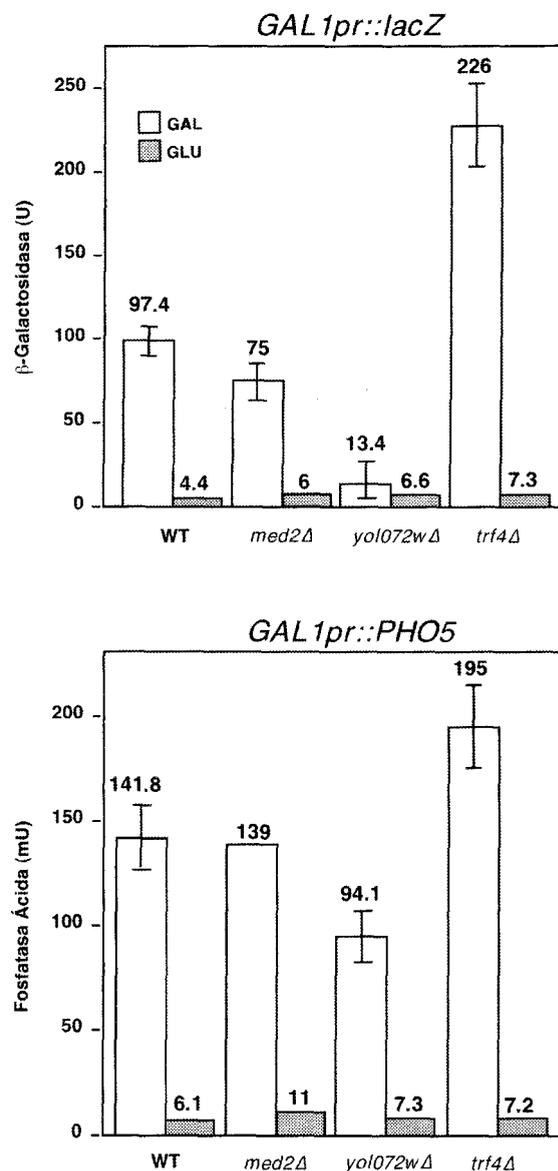


Figura 7. Análisis de expresión de *lacZ* y *PHO5* situados bajo el control del promotor *GAL1* en las estirpes silvestre (W303-1A), *med2Δ* (WNOS032), *yol072wΔ* (WFBE046) y *trf4Δ* (WFBE030). Todas las cepas se transformaron con los plásmidos p416-GAL1-*lacZ* y pSch202 que contienen las fusiones *GAL1-lacZ* y *GAL1-PHO5*, respectivamente. Las actividades β -galactosidasa y fosfatasa ácida se determinaron

Resultados

por duplicado con dos transformantes independientes crecidos en 2% glucosa (GLU) o 2% galactosa (GAL). Se muestran la media y la desviación típica de dos ensayos diferentes.

Los datos anteriores nos indican que de todos los mutantes estudiados sólo el mutante *yol072wΔ* presenta un fenotipo de hiperrecombinación y un defecto en transcripción. Para concluir que los resultados derivados de las actividades enzimáticas reflejan problemas transcripcionales, estudiamos las cinéticas de activación de los genes *lacZ* y *PHO5* mediante análisis de Northern. La Figura 8 muestra que en el mutante *yol072wΔ*, tras la inducción con galactosa, no se acumula el transcrito completo de *lacZ*, mientras que el transcrito de *PHO5* se acumula un 50% de los niveles del silvestre. Estos resultados indican que la incapacidad del mutante de *yol072wΔ* de expresar *GAL1-lacZ* se debe a un defecto en la transcripción de *lacZ* y no a un problema en la activación del promotor *GAL1*. Para confirmar que *yol072wΔ* está afectado en la elongación de la transcripción, estudiamos si era capaz de transcribir una fusión *GAL1-PHO5-lacZ*. Como se puede observar en la Figura 8, en el mutante *yol072wΔ* no se detecta el transcrito completo de *PHO5-lacZ* tras 3 h de inducción. Por lo tanto, la ausencia de acumulación de los transcritos *lacZ* y *PHO5* en *yol072wΔ* se debe a una incapacidad de la RNA polII de transcribir *lacZ*, independientemente de la distancia al promotor desde el que se está transcribiendo.

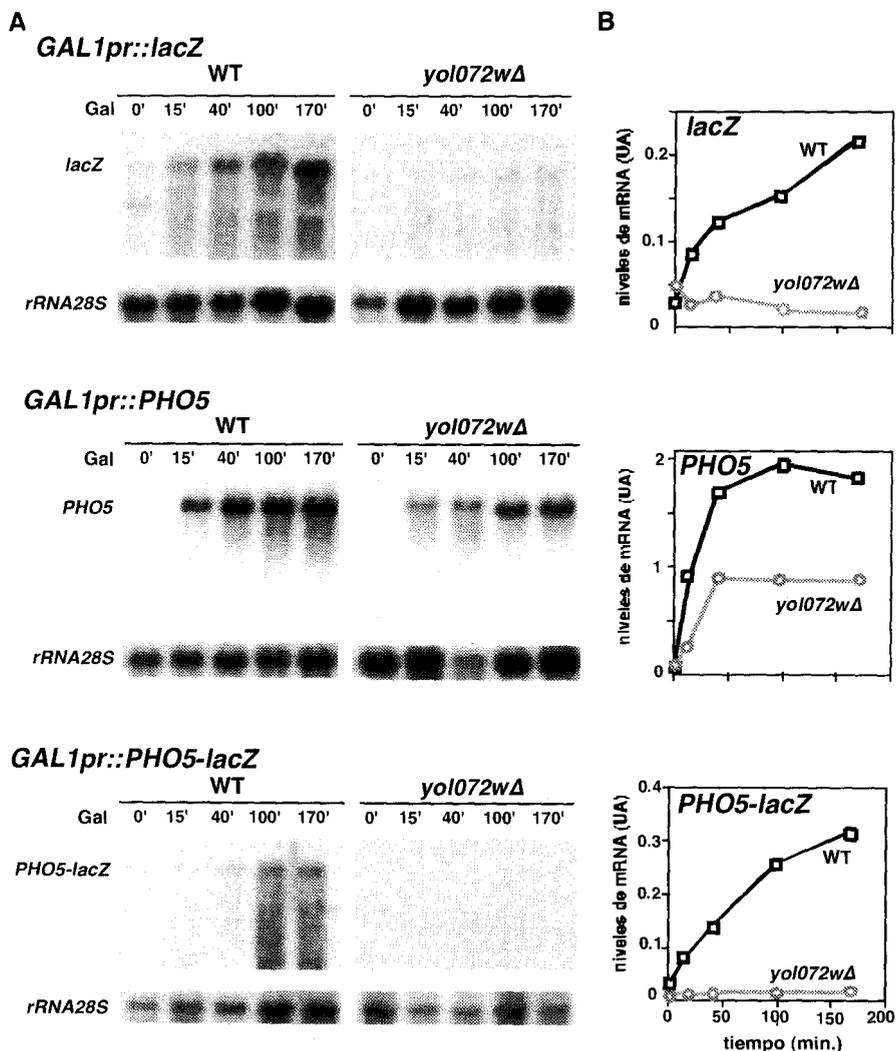


Figura 8. Análisis de transcripción de *GAL1-lacZ*, *GAL1-PHO5* y *GAL1-PHO5-lacZ* en las estirpes silvestres y *yol072wΔ*. (A) Análisis de Northern de los mRNAs de *lacZ*, *PHO5* y *PHO5-lacZ* transcritos

a partir del promotor *GAL1* en las cepas W303-1A (WT) y WFBE046 (*yol072wΔ*) transformadas con los plásmidos centroméricos p416-*GAL1-lacZ*, pSCh202 y pSCh212, respectivamente. Las muestras se tomaron a diferentes tiempos después de añadir al cultivo (SG/L en fase exponencial) galactosa a una concentración final del 2%. Las sondas de DNA usadas fueron el fragmento *Bam*HI-*Hpa*I del extremo 5' de 0.5-kb de *lacZ*, un fragmento interno *Eco*RI-*Pst*I de *PHO5* y un fragmento interno de 589 pb del gen rRNA 28S obtenida por PCR. (B) Cuantificación de las cinéticas de activación de los mRNAs analizados. Todos los niveles de mRNA se dan en unidades arbitrarias (UA) con respecto a los niveles de rRNA.

Como se ha mostrado anteriormente en las cinéticas de activación mediante análisis de Northern, en el mutante *yol072wΔ* la acumulación del transcrito de *PHO5* se reduce a la mitad que en el silvestre (Figura 8). Quisimos comprobar si este defecto también se observa en genes endógenos. Para ello analizamos el nivel de expresión de los genes *GAL1* y *ACT1*. La Figura 9 muestra que mientras la activación de *GAL1* alcanza sólo un 26% de los niveles del silvestre, *ACT1* llega al 80%. Estos resultados indican que en *yol072wΔ* está afectada la transcripción de genes episómicos y cromosómicos. Sin embargo, el mayor defecto se da en la transcripción del gen *lacZ*. Por lo tanto, aunque no podemos excluir la posibilidad de que en el mutante *thp1Δ* la iniciación de la transcripción esté afectada, el principal defecto se observa a nivel de la elongación de la transcripción.

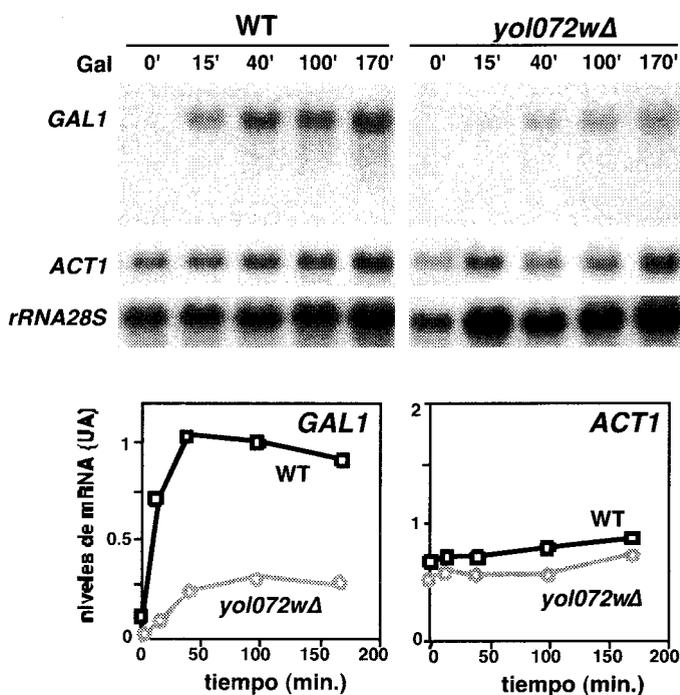


Figura 9. Análisis de transcripción de los genes endógenos *ACT1* y *GAL1*. Las sondas de DNA usadas fueron el fragmento interno *Pvu*II-*Ava*I de 0.75-kb de *GAL1* y un fragmento interno *Cl*aI-*Cl*aI de 0.55-kb de *ACT1*. Para otros detalles ver Figura 8.

II.1.3. Asociación entre el defecto en durante transcripción y el fenotipo de hiperrecombinación en el mutante *yol072wΔ*

A continuación quisimos saber si los fenotipos de transcripción y recombinación observados en *yol072wΔ* estaban asociados. Para ello estudiamos el efecto de la mutación *yol072wΔ* en recombinación usando sistemas de repeticiones directas de *leu2* entre las que se han clonado las secuencias de *lacZ* y *PHO5*, inmediatamente después de la primera repetición de *leu2* (*leu2Δ3'*). Para este experimento usamos dos series de

sistemas de repeticiones que difieren en el promotor desde el que se inicia la transcripción, la de los sistemas *L-lacZ* y *L-PHO5* en los que la transcripción se inicia desde el promotor *LEU2* y la de los sistemas *GL-lacZ* y *GL-PHO5* en los cuales el promotor *LEU2* se ha reemplazado por el promotor regulable *GALI*. Si el fuerte fenotipo de hiperrecombinación observado en el mutante *yol072wΔ* está asociado a un defecto durante la transcripción, podríamos predecir un severo fenotipo de hiperrecombinación usando el sistema *L-lacZ* y un ligero fenotipo con el sistema *L-PHO5*. Además este fenotipo debería eliminarse reprimiendo la transcripción en los sistemas *GL-lacZ* y *GL-PHO5*.

Como se muestra en la Figura 10A, en un mutante *yol072wΔ* no se observa el transcrito correspondiente a *lacZ* cuando usamos el sistema *L-lacZ* en el que se inicia la transcripción desde el promotor *LEU2*. La cuantificación de este Northern muestra que el transcrito que se produce no llega ni al 1% de los valores del silvestre, consistente con los datos anteriormente mostrados acerca de la incapacidad de *yol072wΔ* de transcribir *lacZ*. De hecho, este resultado demuestra que tal defecto es independiente del promotor desde el que se inicia la transcripción. Tal y como esperábamos, la frecuencia de recombinación estudiada en el sistema *L-lacZ* es 930 veces superior a la del silvestre. La transcripción a través del sistema *L-PHO5* está ligeramente afectada (44% de los niveles del silvestre), consistente con los resultados obtenidos con la construcción *GALI-PHO5*. El incremento en la frecuencia de recombinación correspondiente a este sistema *L-PHO5* es 23 veces superior a la del silvestre. Por lo tanto, existe una correlación entre el defecto de *yol072wΔ* en la transcripción de *lacZ* y *PHO5* y la hiperrecombinación. Cuanto más severo es el defecto de transcripción, mayor es el fenotipo de hiperrecombinación.

La confirmación de esta asociación entre defecto en la transcripción e hiperrecombinación se obtiene tras el estudio de los sistemas *GL-lacZ* y *GL-PHO5* en condiciones de represión (2% glucosa), de manera que la transcripción de todo el sistema de repeticiones está reprimida (Figura 10A). En este caso lo que observamos es una fuerte caída en las frecuencias de recombinación y una ausencia total del fenotipo de hiperrecombinación en el sistema *GL-PHO5*. Aunque en teoría esperábamos no obtener un fenotipo de hiperrecombinación con el sistema *GL-lacZ*, es importante destacar la existencia de un transcrito interno de *lacZ* (señalado con un asterisco en la Figura 10A). Este mRNA es transcrito desde una secuencia interna de *lacZ* y aparece en todos los análisis de Northern que hemos realizado con este gen (Chávez and Aguilera, 1997; Piruat and Aguilera, 1998). Como puede verse en la Figura 10A, este transcrito aparece en el silvestre y desaparece en *yol072wΔ* en condiciones de represión (2% glucosa). Por lo tanto, creemos que el suave fenotipo de hiperrecombinación (30 veces superior al silvestre) que observamos en *yol072wΔ* en estas condiciones se debe a la transcripción de este fragmento de *lacZ*. Por otro lado no podemos descartar que este transcrito de *lacZ* se trate de un producto estable de degradación. En cualquier caso, nuestros resultados muestran que el fenotipo de hiperrecombinación que observamos en *yol072wΔ* está asociado a un defecto durante la transcripción.

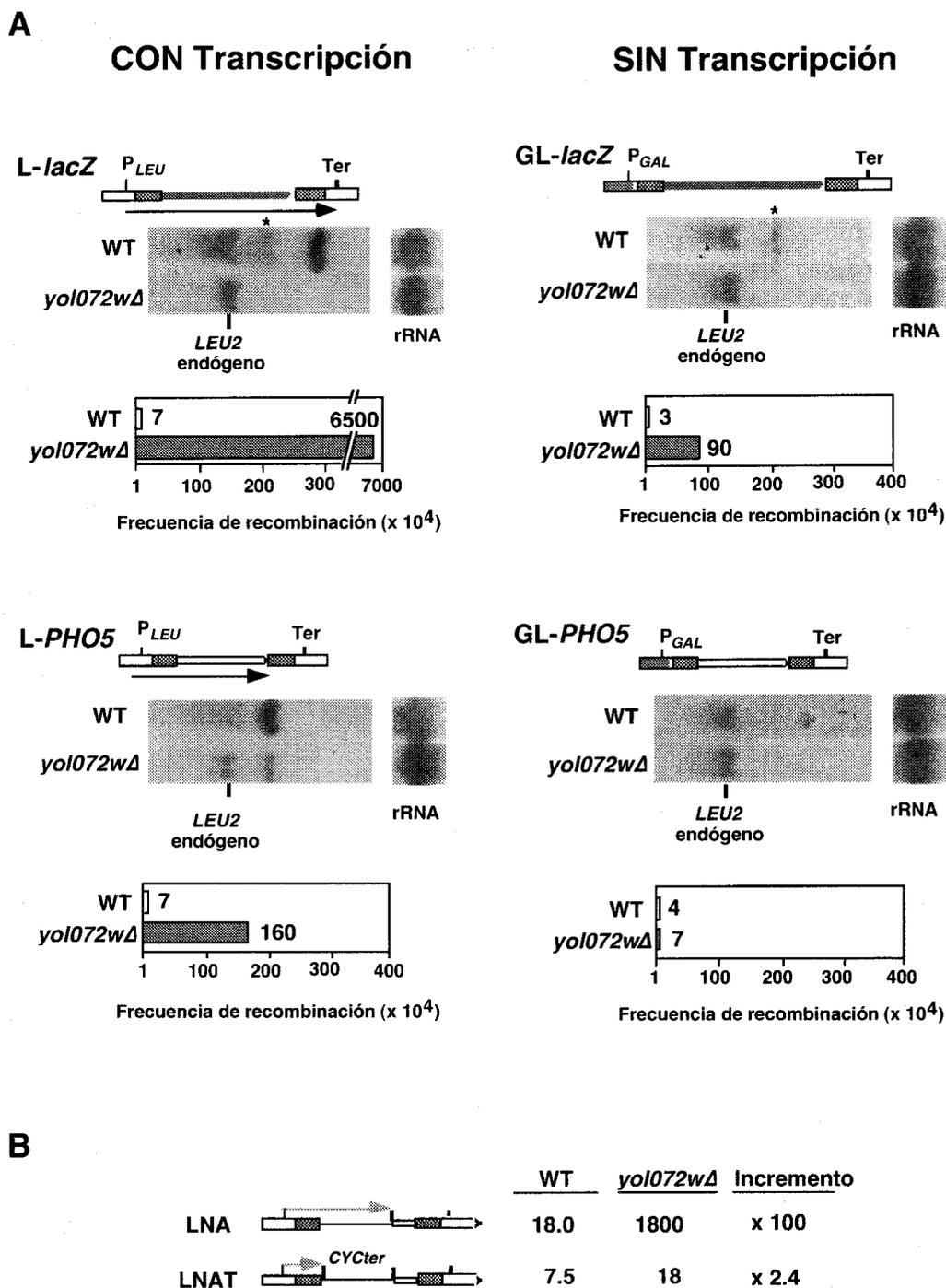


Figura 10. Análisis de transcripción y recombinación en sistemas de repeticiones directas en las estirpes silvestres y *yoi072wΔ*. (A) Frecuencias de recombinación y niveles de mRNA de las estirpes W303-1A (WT) y WFBE046 (*yoi072wΔ*) transformadas con los plásmidos centroméricos pSch204, pSch206, p414GllacZ y pSG206 que contienen los sistemas de repeticiones directas L-lacZ, L-PHO5 en los que la transcripción está bajo el promotor *LEU2* (P_{LEU}), y GL-lacZ y GL-PHO5 en los que la transcripción está bajo el promotor *GAL1* (P_{GAL}). Los transcritos procedentes del promotor *LEU2* están indicados por flechas cuyo extremo 3' coincide su correspondiente banda en cada Northern blot. El RNA total se aisló de un cultivo exponencial de SC-trp con un 2% de glucosa en todos los casos. Como sonda de DNA se usó la repetición de *LEU2* *Cla*I-*Cla*I de 485-pb. Los recombinantes se seleccionaron en SC-leu con 2% de glucosa para los sistemas L-lacZ y L-PHO5 y en SC-leu con 2% de galactosa para GL-lacZ y GL-PHO5.

(B). Frecuencias de recombinación de estirpes silvestre (W303-1A) y *yol072wΔ* (WFBE046) en los sistemas de repeticiones directas pRS314-LNA y pRS314-LNAT. Otros detalles como en Figura 2.

Para concluir que el fenotipo de hiperrecombinación que observamos en el mutante *yol072wΔ* requiere que haya o haya habido elongación de la transcripción a través de la secuencia intermedia usamos los sistemas de repeticiones LNA y LNAT (Figura 10B). El sistema LNA está basado en las mismas repeticiones de *leu2* de 0.6 kb presentes en los sistemas L y LY, pero con un fragmento intermedio de 2.2 kb que incluye secuencias bacterianas del vector pBR322 y el gen *URA3* de levadura. Al igual que ocurre con los sistemas que derivan del sistema L (Prado *et al.*, 1997), la transcripción se inicia desde el promotor *LEU2*, situado fuera de las repeticiones. El sistema LNAT es idéntico al LNA pero con el terminador transcripcional de *CYC1* situado justo después de la primera repetición de *leu2*, impidiendo que se transcriba la secuencia intermedia flanqueada por las repeticiones. En la Figura 10B se observa un incremento de 100 veces en la frecuencia de recombinación en el mutante *yol072wΔ* cuando usamos el sistema LNA. En cambio, con el sistema LNAT no hay ningún incremento significativo. Estos resultados claramente indican que la hiperrecombinación solamente se observa cuando se transcribe la región flanqueada por las repeticiones.

Como se ha mostrado en las Figuras 5 y 6, los mutantes *med2Δ* y *trf4Δ* presentan un fenotipo de hiperrecombinación. Sin embargo, no tienen un defecto en la transcripción similar al del mutante *yol072wΔ* (Figura 7). De hecho, cuando usamos los sistemas L-*lacZ*, L-*PHO5*, GL-*lacZ* y GL-*PHO5* observamos que, independientemente que haya (L-*lacZ*, L-*PHO5*) o no (GL-*lacZ*, GL-*PHO5*) de transcripción, estos mutantes presentan frecuencias de recombinación superiores a las del silvestre (Figura 11). De manera que sea cual sea el origen de la hiperrecombinación en *med2Δ* y *trf4Δ*, podemos concluir que no se debe a un defecto en transcripción como ocurre en *yol072wΔ*.

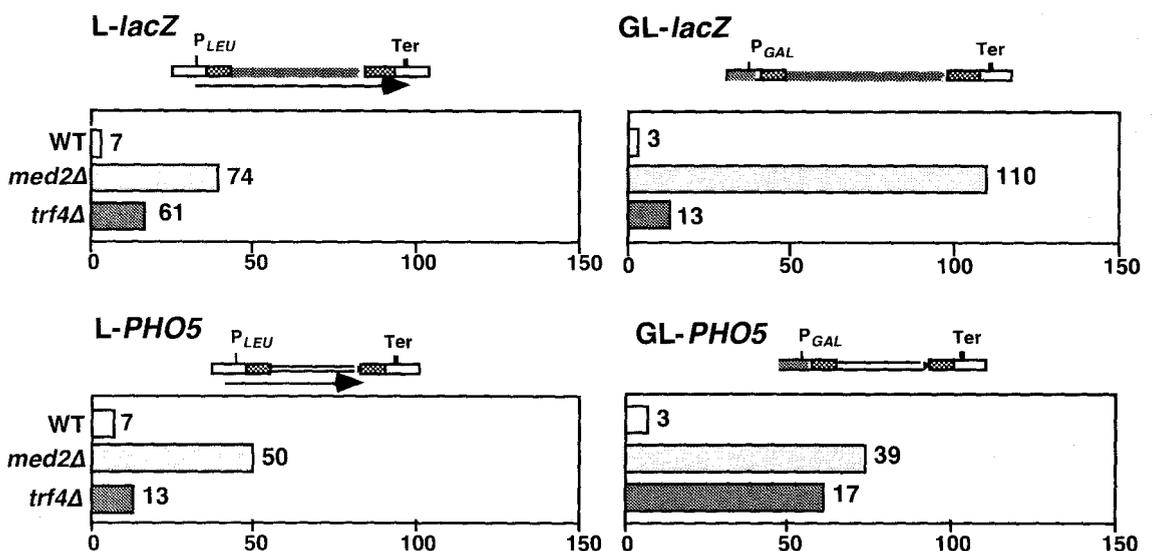


Figura 11. Frecuencias de recombinación de las estirpes silvestres (W303-1A) y los mutantes *med2Δ* (WNOS032) y *trf4Δ* (WFBE030) con los sistemas de recombinación L-*lacZ*, L-*PHO5*, GL-*lacZ* y GL-*PHO5*. Para otros detalles ver Figura 7.

En todos los sistemas de repeticiones directas estudiados, el suceso de recombinación se inicia en las repeticiones o en la secuencia intermedia flanqueada por tales repeticiones. Ya que tanto los promotores (*LEU2* y *GAL1*) como el terminador (*LEU2*) se encuentran fuera del sistema, el suceso de recombinación asociado a transcripción no puede iniciarse dentro de estas secuencias (Prado and Aguilera, 1995). La recombinación que hemos observado en *yol072wΔ* tiene que iniciarse en regiones que se transcriben. Por lo tanto, nuestros análisis de recombinación no sólo muestran que el fenotipo de hiperrecombinación está asociado a un defecto durante la transcripción, sino que éste debe estar relacionado con la elongación de la transcripción.

El mutante *yol072wΔ* crece mal a 30°C y es termosensible a 37°C, dos fenotipos observados en los mutantes anteriormente descritos *hpr1Δ* y *tho2Δ* . Dada la fuerte similitud entre la delección en este gen (*YOL072w*) y *hpr1Δ* y *tho2Δ* decidimos llamar a este gen *THP1* (*Tho2/Hpr1* phenotype). Thp1 es una proteína conservada en eucariotas. Se encuentran proteínas con una similitud significativa en *Schizosaccharomyces pombe* (SPBC1105.07c), *Caenorhabditis elegans* (C27F2.7), *Drosophila melanogaster* (CG7351) y *Homo sapiens* (AK000888) (Figura 9). El grado de similitud (~25%) sugiere que algunas de estas proteínas pueden ser ortólogos estructurales con la misma función celular.

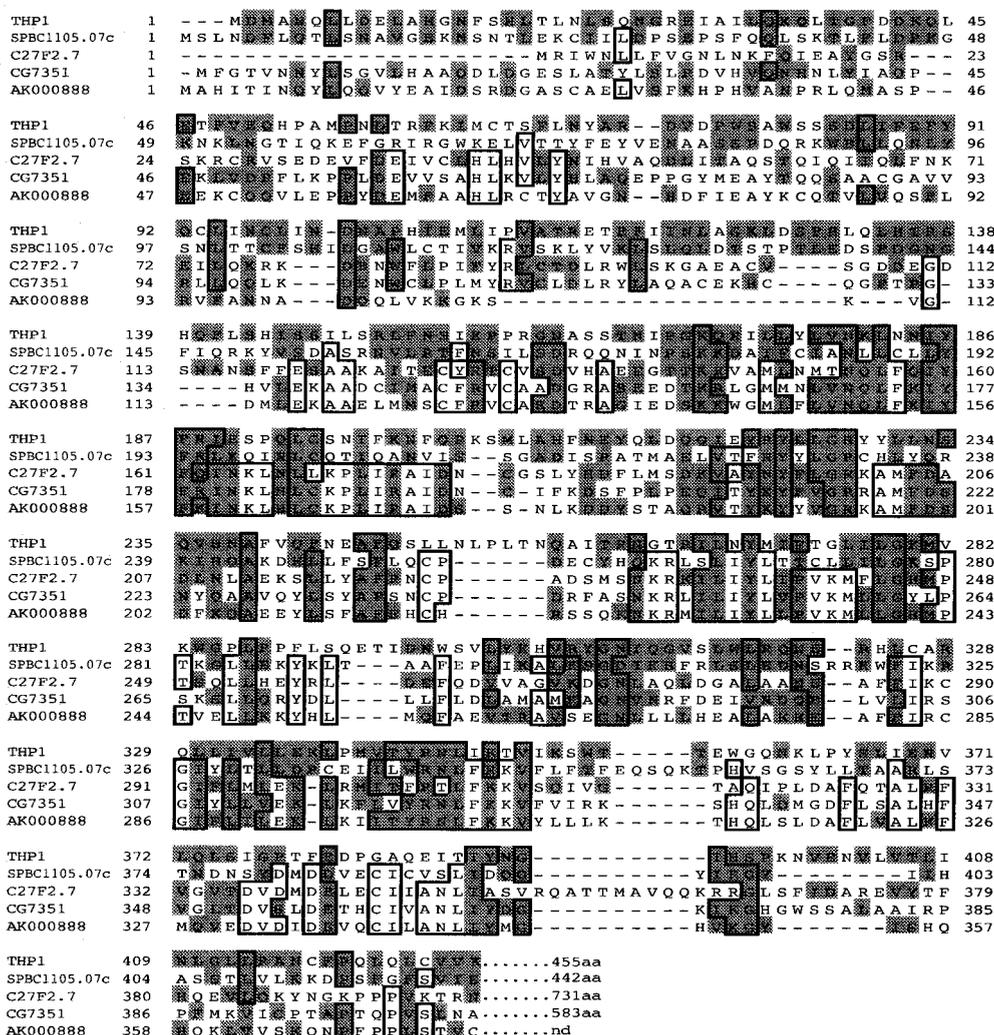


Figura 12. Homología entre la proteína Thp1 de *S. cerevisiae* y sus homólogos de *Sch. Pombe* (SPBC1105.17c), *C. elegans* (C27F2.7), *D. melanogaster* (CG7351) and *H. sapiens* (AK00088) de

acuerdo con el algoritmo Kyte-Doolittle. Los residuos conservados se muestran en verde y los idénticos en cajas. El extremo carboxi-terminal no se muestra dada su escasa conservación.

II.1.4. La mutación *hrs1Δ*, en un componente del Mediador de la holoenzima RNAPII, suprime la hiperrecombinación de *thp1Δ*

Si la mutación *thp1Δ* produce los mismos fenotipos de transcripción y recombinación que *hpr1Δ* y *tho2Δ* podríamos esperar que supresores de éstos también supriman a *thp1Δ*. Por lo tanto miramos si la hiperrecombinación observada en el sistema cromosómico de repeticiones *leu2k::ADE2-URA3::leu2k* requiere de un componente funcional del mediador que regula la transcripción dependiente de la holoenzima RNAPII, Hrs1 (Mayers *et al.* 1998), como antes se había observado en *hpr1Δ* y *tho2Δ* (Piruat *et al.*, 1997; Piruat and Aguilera, 1998). Como se puede ver en la Figura 10, *hrs1Δ* elimina la elevada frecuencia de recombinantes Ura^r en el mutante *thp1Δ*. Aunque aún no entendemos la naturaleza molecular de esta supresión, el resultado sugiere que la hiperrecombinación en mutante *thp1Δ* tiene las mismas características que en *hpr1Δ*. El doble mutante *thp1Δ hpr1Δ* muestra el mismo fenotipo de hiperrecombinación que cada uno de los mutantes simples, consistente con la idea de que la hiperrecombinación en *thp1Δ* y en *hpr1Δ* ocurre por la misma vía (Figura 13).

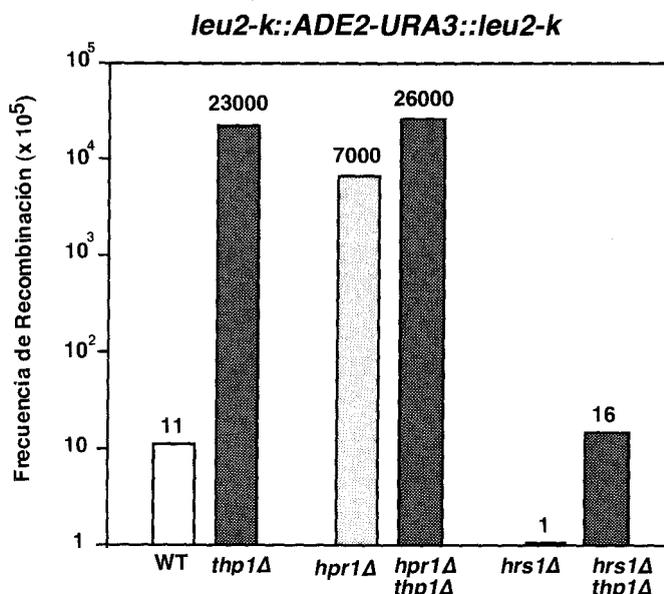


Figura 13. Frecuencias de recombinación de distintas combinaciones del mutante *thp1Δ* con *hpr1Δ* y *hrs1Δ*. La recombinación se estudió con el sistema cromosómico de repeticiones directas *leu2k::ADE2-URA3::leu2k*. Las estirpes usadas fueron MGY6-1A (WT), AYW3-3C (*hpr1Δ*), MGY3-2D (*thp1Δ*), MGY3-3B (*hpr1Δthp1Δ*), SSAB-2C (*hrs1Δ*) y MGY2-1C (*hrs1Δthp1Δ*). Para otros detalles ver Figura 5.

II.1.5. Localización subcelular de las proteínas Tho2 y Thp1 fusionadas a la GFP

Construimos fusiones GFP-Tho2 y GFP-Thp1 bajo el control del promotor regulable *MET25*. Ambas proteínas así fusionadas son funcionales, como se pudo comprobar complementando los fenotipos de termosensibilidad e hiperrecombinación causados por las respectivas deleciones. La fusión GFP-Tho2 aparece claramente localizada en el núcleo. GFP-Thp1 se encuentra concentrada en el núcleo, aunque también se puede detectar algo de fluorescencia en el citoplasma (Figura 14). Los

niveles de detección de GFP-Thp1 son mucho más bajos que los correspondientes a GFP-Tho2. Esto podría implicar que la emisión de la fluorescencia de la GFP no es suficiente cuando está fusionada a Thp1.

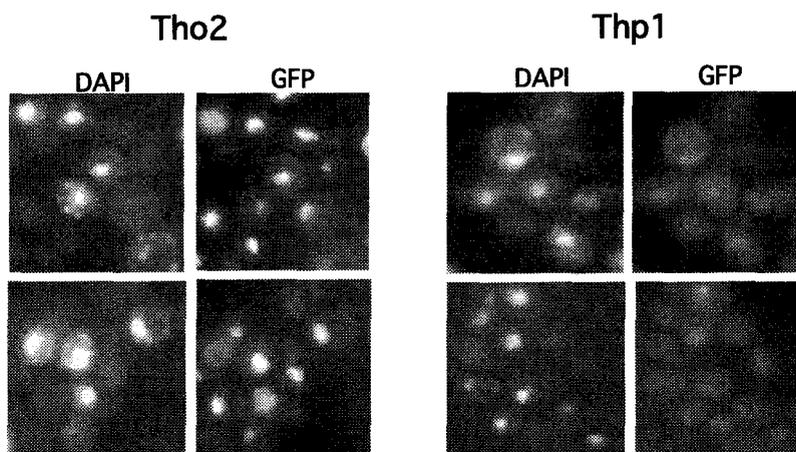


Figura 14. Localización subcelular de las proteínas Tho2 y Thp1 usando las fusiones GFP-Tho2 y GFP-Thp1. El mutante *tho2Δ*(WRK5-1C) se transformó con el plásmido pUG34-T2 que codifica la fusión GFP-Tho2 y el mutante *thp1Δ* (MGY6-4D) con el plásmido pUG34-T3 que contiene la fusión GFP-Thp1. La GFP y la tinción con DAPI (10μg/ml) se visualizaron por microscopia de fluorescencia en un microscopio Olympus AHBT3.

II.1.6. La transcripción de *HPR1* y *THO2* no está afectada en el mutante *thp1Δ* y viceversa

Decidimos estudiar si los mismos fenotipos observados en *thp1Δ*, *hpr1Δ* y *tho2Δ* podrían deberse a un efecto de cada una de las mutaciones en la expresión de los otros dos genes. Como puede verse en la Figura 15, cultivos en fase exponencial de estirpes silvestres, *hpr1Δ*, *tho2Δ* y *thp1Δ* no muestran diferencias biológicamente significativas en los niveles de mRNA.

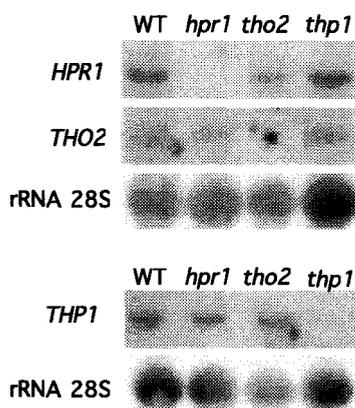


Figura 15. Análisis de transcripción de los genes *HPR1*, *THO2* y *THP1* en diferentes fondos mutantes. El RNA total de extrajo de cultivos en fase exponencial en YEPD de una cepa silvestre (W303-1A) y de los mutantes *hpr1Δ* (SChY58a), *tho2Δ* (RK2-6C) y *thp1Δ* (WFBE046). Como sondas de DNA se usaron los ORFs completos de *HPR1* (2.4kb), *THO2* (4.8kb) y *THP1* (1.4kb) obtenidos por restricción o por PCR.

Resultados

En *thp1Δ*, los porcentajes de mRNA de *HPR1* y *THO2* son 62 y 59%, respectivamente, con respecto a los valores del silvestre. Tampoco hay cambios significativos en los niveles de expresión de *HPR1* y *THP1* en el mutante *tho2Δ* (43 y 110% respectivamente), ni de *THO2* y *THP1* en *hpr1Δ* (54 y 71% respectivamente). Por lo tanto concluimos que la termosensibilidad y los fenotipos en transcripción y recombinación de *thp1Δ* no son debidos a una reducción en los niveles de RNA de *HPR1* y *THO2* y viceversa.

II.1.7. El mutante *thp1Δ* acumula mRNA en el núcleo

Dada la similitud de fenotipos entre *thp1Δ*, mutantes de transporte de mRNA y los mutantes del complejo THO, afectados también en el transporte de mRNA (Jimeno *et al.*, 2002; Strässer *et al.*, 2002) decidimos estudiar si la proteína Thp1 era a su vez requerida para el correcto funcionamiento del transporte de mRNA desde el núcleo al citoplasma. La acumulación de RNA poliadenilado (poli(A)⁺ RNA) se detectó mediante una hibridación *in situ* con un oligo-dT marcado con digoxigenina y un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a fluoresceína. Ya a temperatura permisiva, 30°C, puede detectarse en el mutante *thp1Δ* alguna acumulación de poli(A)⁺RNA en el núcleo. Después de 4 h a temperatura restrictiva, 37°C, se observa aún más mRNA acumulado. (Figura 16A). Consistente con esta idea, observamos que el doble mutante *thp1Δ mex67-5* también es inviable (Figura 16B), un fenotipo previamente observado en los mutantes del complejo THO (Jimeno *et al.*, 2002).

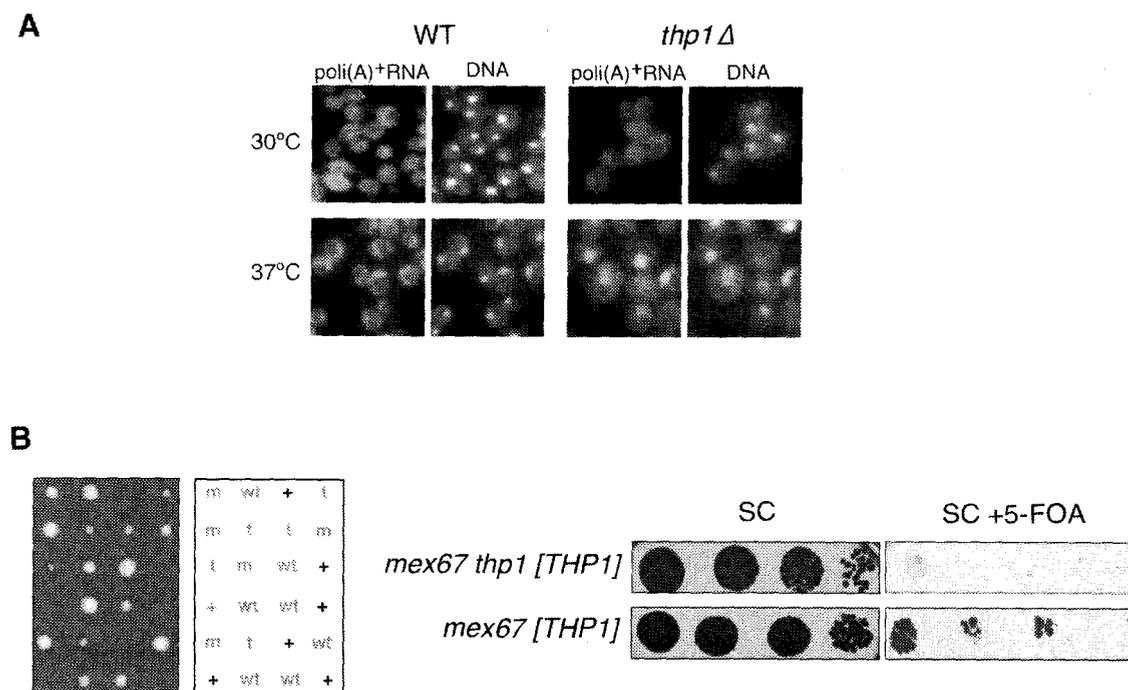


Figura 16. (A). Análisis del transporte de mRNA en cepas silvestres (W303-1A) y *thp1Δ* (WFBE046). La localización subcelular del mRNA poliadenilado (poli(A)⁺) se analizó mediante una hibridación *in situ* usando un oligo(dT) marcado con digoxigenina. Las muestras se tomaron de un cultivo exponencial a 30°C o tras 4 horas a 37°C en YEPD. El DNA nuclear se tiñó con DAPI 10 μg/mL. **(B).** Análisis de tétradas del heterocigoto *THP1 mex67-5/thp1Δ MEX67*. El doble mutante *mex67-5 thp1Δ* fue incapaz de germinar. A diferencia del mutante simple *mex67-5* (WMC1-1A), el doble mutante *mex67-5 thp1Δ*(WMT3-1D) transformado con el plásmido pRS416THP1 que contiene una copia silvestre de *THP1* fue incapaz de formar colonias en medio SC+500 μg/mL de FOA.

II.1.8. Thp1 une RNA *in vitro*

El mutante nulo *thp1* Δ muestra los mismos fenotipos de transcripción y recombinación que los mutantes del complejo THO y los factores de transporte de mRNA Sub2, Yra1 y Mex67-Mtr2. Ya que estos factores son capaces de unir RNA (Anderson *et al.*, 1993; Jimeno *et al.*, 2002; Santos-Rosa *et al.*, 1998; Segref *et al.*, 1997; Strasser and Hurt, 2001) quisimos saber si Thp1 también se asociaba a RNA o DNA *in vitro*. Para ello purificamos la proteína Thp1 fusionada a una cola de 6 histidinas (His₆-Thp1) desde *E. coli*. En la Figura 17B se observa como Thp1 se une a RNA. Para este ensayo de retardo en gel usamos una molécula de RNA de 90 nt. Como control negativo usamos una purificación realizada en *E. coli* transformada con el plásmido vacío pT7-7-His(6). La unión a RNA es directamente proporcional a la cantidad de Thp1 usada. En los ensayos de competición (Figura 17C) se observa que una sonda fría de RNA compite fuertemente con la sonda de RNA marcada radiactivamente, la sonda de DNA de cadena doble (dsDNA) compite en menor grado mientras que la sonda de DNA de cadena simple (ssDNA) apenas compite. En los ensayos de unión a una sonda de 200 pb de DNA de cadena doble (Figura 17D), se observa que Thp1 se une a dsDNA pero que esta interacción es mucho más suave que la observada para el RNA. Este resultado, junto con los análisis funcionales realizados en *thp1* Δ , sugiere que la proteína Thp1 está implicada en el metabolismo de RNA. La unión a dsDNA podría indicarnos que, además, Thp1 está presente durante la transcripción como se ha observado mediante análisis de CHIP con Yra1, Hpr1 y Tho2, componentes del complejo THO (Lei *et al.*, 2001, Strässer *et al.*, 2002).

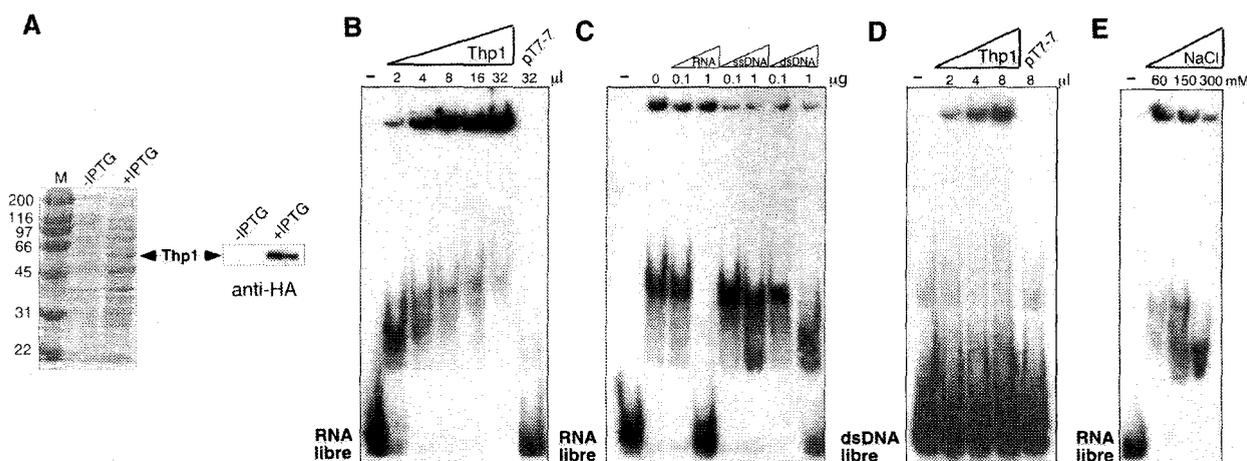


Figura 17. Ensayos *in vitro* de retardo en gel con la proteína Thp1-(His)₆ purificada de *E. coli*. (A). Inducción de la expresión de la proteína Thp1-(His)₆ con IPTG 0.5mM en un cultivo de *E. coli*. Tras la purificación en una columna de afinidad, la presencia de la proteína se detecta con anticuerpos anti-HA. (B). Ensayo de unión a una sonda de RNA de 90 pb marcada con ³²P obtenida del polilinker del plásmido pBuescript-SK y cantidades crecientes de la proteína Thp1 purificada de *E. coli*. Como control negativo se usó una purificación de un cultivo sobreexpresando sólo la cola de histidinas (pT7-7(His)₆). (C). Ensayo de competición de la unión de Thp1 a RNA. Para el experimento se usaron 6 μ l de proteína purificada. Como competidor frío se usaron cantidades crecientes del RNA de 90 pb usado como sonda, un fragmento de 60 nucleótidos de DNA de cadena simple (ssDNA) y otro de 200 pb de DNA de cadena doble (dsDNA). (D). Ensayo de unión a DNA. Como sonda se usó un fragmento de DNA de cadena doble, de 200 pb obtenido por PCR, marcado en su extremo 5' con ³²P. (E). Unión de la proteína Thp1 a RNA. Como sonda se usó la misma que en (B), 6 μ l de proteína purificada y cantidades crecientes de NaCl.

RESULTADOS
CAPÍTULO II

BÚSQUEDA DE PROTEÍNAS
RELACIONADAS CON Thp1

II.2.1. La sobreexpresión de *NAB2* suprime el defecto de expresión génica de *thp1Δ*

Para obtener nuevas pistas acerca del papel funcional de Thp1, buscamos genes que pudieran tener una función similar a la de Thp1. Para ello usamos un ensayo genético que permite el análisis de la expresión génica basado en el plásmido pCM184-LAUR. Este sistema contiene una fusión traduccional de 4.15-kb de los genes *lacZ* y *URA3* bajo control del promotor de tetraciclina (P_{tet}) (Figura 18A, Jimeno *et al.*, 2002). Como esperábamos, el mutante *thp1Δ*, transformado con el sistema LAUR, es incapaz de formar colonias en medio SC-ura (Figura 18B) y muestra bajos niveles de actividad β -galactosidasa.

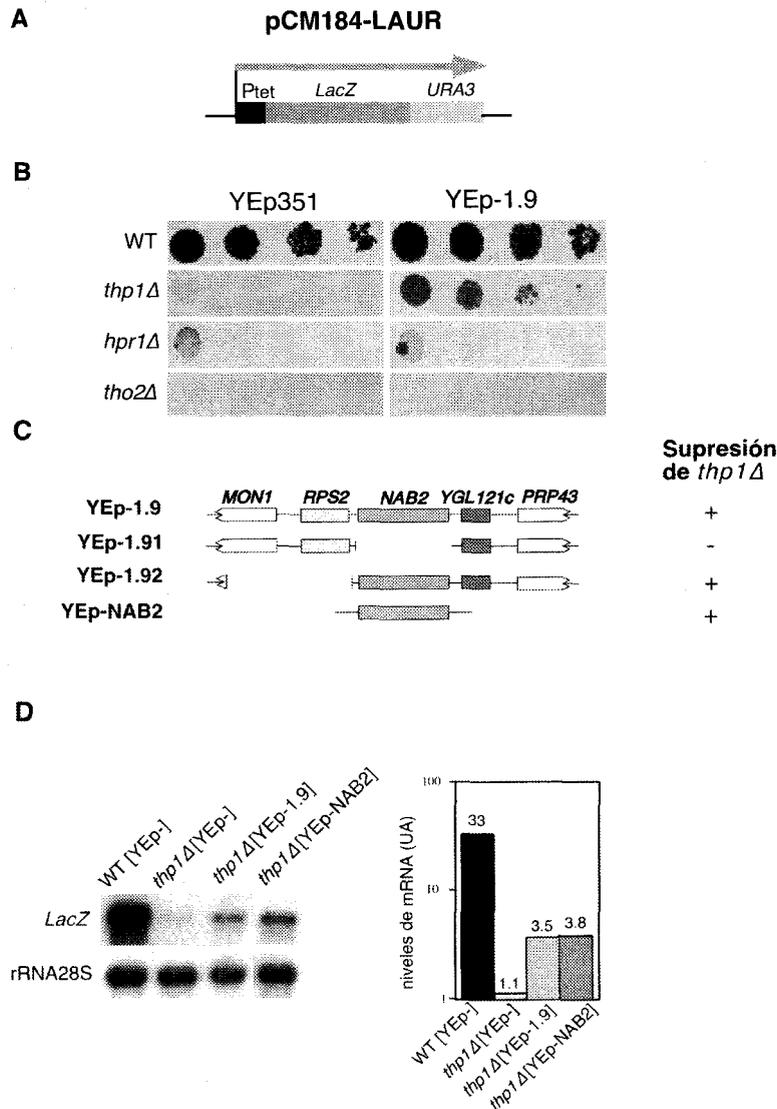
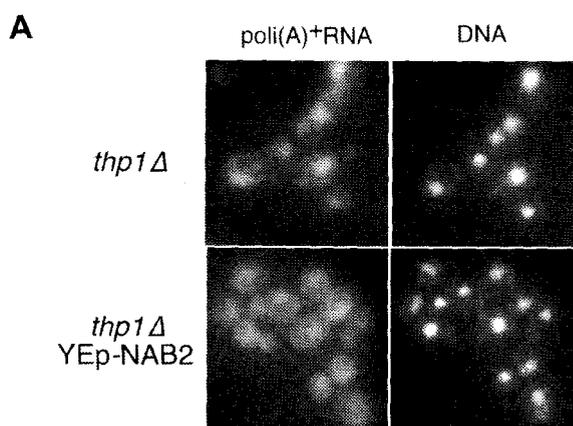


Figura 18. Supresión del defecto en transcripción de *thp1Δ* por la sobreexpresión de *NAB2*. (A). Esquema de la fusión $P_{tet}::lacZ-URA3$ presente en el plásmido pCM184-LAUR. (B). Esquema del clon original obtenido en la búsqueda de supresores (YEpl-1.9) y de las distintas versiones construidas *a posteriori* (YEpl-1.91, YEpl-1.92, YEpl-NAB2). (C). Análisis fenotípico del las cepas silvestre (W303-1A), *thp1Δ* (WFBE046), *hpr1Δ* (U678-1C) y *tho2Δ* (RK2-6C) transformadas con los plásmidos pCM184-LAUR y YEpl351 o YEpl-1.9. Se muestra la capacidad de cada estirpe de formar colonias en SC-ura después de 6 días a 30°C. (D). Análisis de Northern de la expresión de la construcción $P_{tet}::lacZ-URA3$. El RNA total se aisló de un cultivo en fase exponencial de células transformadas con pCM184-LAUR. Todos los niveles de mRNA se dan en unidades arbitrarias (UA) con respecto a los niveles de rRNA.

De un total de 80.000 transformantes con la genoteca en multicopia MW90 (Waldherr *et al.*, 1993) sembrados en SC-ura, seleccionamos uno que fue capaz de crecer en ausencia de uracilo. Tras el posterior aislamiento, análisis de restricción y secuenciación del plásmido (YE_p-1.9) presente en dicho transformante, comprobamos que contenía un inserto de 6.5-kb. Este fragmento incluye 3 ORF completos: *RPS2*, *NAB2* y *YGL121c*. Posteriores análisis de complementación con distintas versiones en las que se delecionaron distintos fragmentos indicaron que la capacidad de suprimir el defecto de expresión génica de *thp1Δ* recae en *NAB2* y no en los otros 2 ORFs (Figura 18C). La clonación de *NAB2* en YE_p351 confirmó que la sobreexpresión de *NAB2*, y no de los otros dos genes adyacentes, suprime la incapacidad de *thp1Δ* de expresar la fusión *lacZ-URA3*, tal y como se ha determinado por crecimiento en SC-ura y por análisis de Northern (Figura 18B y 18C). Esta supresión es específica de *thp1Δ* y no de otros mutantes con un fenotipo similar al de *thp1Δ* como son *hpr1Δ* y *tho2Δ* (Figura 18B). La cuantificación de los niveles de mRNA muestra que esta supresión del defecto en transcripción de *thp1Δ* es parcial. La sobreexpresión de *NAB2* hace que el mutante *thp1Δ* exprese la fusión *lacZ-URA* un 11.6% con respecto a los niveles de silvestre.

II.2.2. La sobreexpresión de NAB2 suprime la acumulación intranuclear de mRNA en *thp1Δ*

Nab2 es una proteína nuclear asociada al RNA poliadenilado (poli(A)⁺ RNA) (Anderson *et al.* 1993) y requerida para el transporte del mRNA nuclear (Green *et al.*, 2002, Hector *et al.*, 2002). Ya que hemos visto que el defecto de transcripción en *thp1Δ* se asocia con un defecto en el transporte de mRNA y un fenotipo de hiperrecombinación, quisimos comprobar si la sobreexpresión de *NAB2* también suprimía estos dos fenotipos. En la Figura 19A se observa que el mutante *thp1Δ* transformado con *NAB2* en multicopia presenta una menor acumulación nuclear de mRNA poli(A)⁺ que transformado con el plásmido vacío. Esta supresión no es total ya que aún puede observarse alguna acumulación después de las 4 h a 37°C.



B

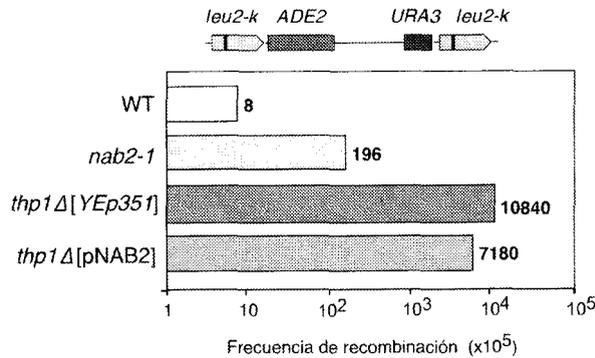


Figura 19. (A). Análisis del transporte del mRNA en células *thp1Δ* (WFBE046) transformadas con el plásmido multicopia YEp351 (plásmido vacío) y YEp351-NAB2 (contiene NAB2). Las muestras se tomaron de cultivos en SC-leu en fase exponencial tras 4 h a 37°C. Para otros detalles ver la Figura 16. **(B).** Frecuencia de recombinação de las estirpes silvestre (NAL-3B), *nab2-1* (NAL-5B) y *thp1Δ* (MGY6-4D) transformadas con el vector YEp351 y el plásmido YEp351-NAB2. La recombinação se estudió con el sistema cromosómico de repeticiones directas *leu2k::ADE2-URA3::leu2k*. Para otros detalles ver Figura 5.

Debido a que *NAB2* es un gen esencial, usamos el mutante puntual *nab2-1*. Esta mutación es rezumante a 30°C, y como ya ha sido previamente mostrado, a esta temperatura, acumula mRNA en el núcleo (Green *et al.*, 2002). Los análisis de recombinação con el sistema cromosómico de repeticiones directas *leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k* revelan un incremento en la frecuencia de recombinação en el mutante *nab2-1* de 25 veces con respecto al silvestre (Figura 19B). Por último, los análisis de recombinação con este mismo sistema de repeticiones directas muestran que la sobreexpresión de *NAB2* disminuye la hiperrecombinação del mutante *thp1Δ* 1,5 veces.

Todos estos resultados indican que la sobreexpresión de *NAB2* suprime, parcialmente, los defectos de transcripción y transporte de mRNA de *thp1Δ* y, en menor grado, el fenotipo de hiperrecombinação.

II.2.3. *nab2-1* tiene defectos en la transcripción de *lacZ*

Los resultados de la supresión por sobreexpresión de *NAB2* de distintos fenotipos de *thp1Δ*, sugieren que Nab2 podría estar relacionada funcionalmente con *thp1Δ*. Ya hemos visto que, aunque en menor grado, el mutante *nab2-1* tiene un fenotipo de hiperrecombinação (Figura 19B). Este ligero incremento en la frecuencia de recombinação podría deberse a que la mutación que hemos usado es rezumante. Por lo tanto quisimos estudiar si el mutante *nab2* también presentaba fenotipos de transcripción similares a los de *thp1Δ*. Como se muestra en la Figura 20A el mutante *nab2-1* sólo alcanza un 20% de actividad β -galactosidasa, con respecto al silvestre. Las cinéticas de transcripción de las fusiones *GAL1pr::lacZ* y *GAL1pr::PHO5* revelan que, en el mutante, el transcrito de *lacZ* se acumula a una tasa mucho más lenta que en el silvestre (Figura 20B), mientras que en el caso del *PHO5* apenas se ve diferencia. Como ocurre para *thp1Δ*, esto indica que es la transcripción a través de *lacZ* y no la activación del promotor *GAL1* lo que está provocando este defecto de transcripción en el mutante *nab2-1*.

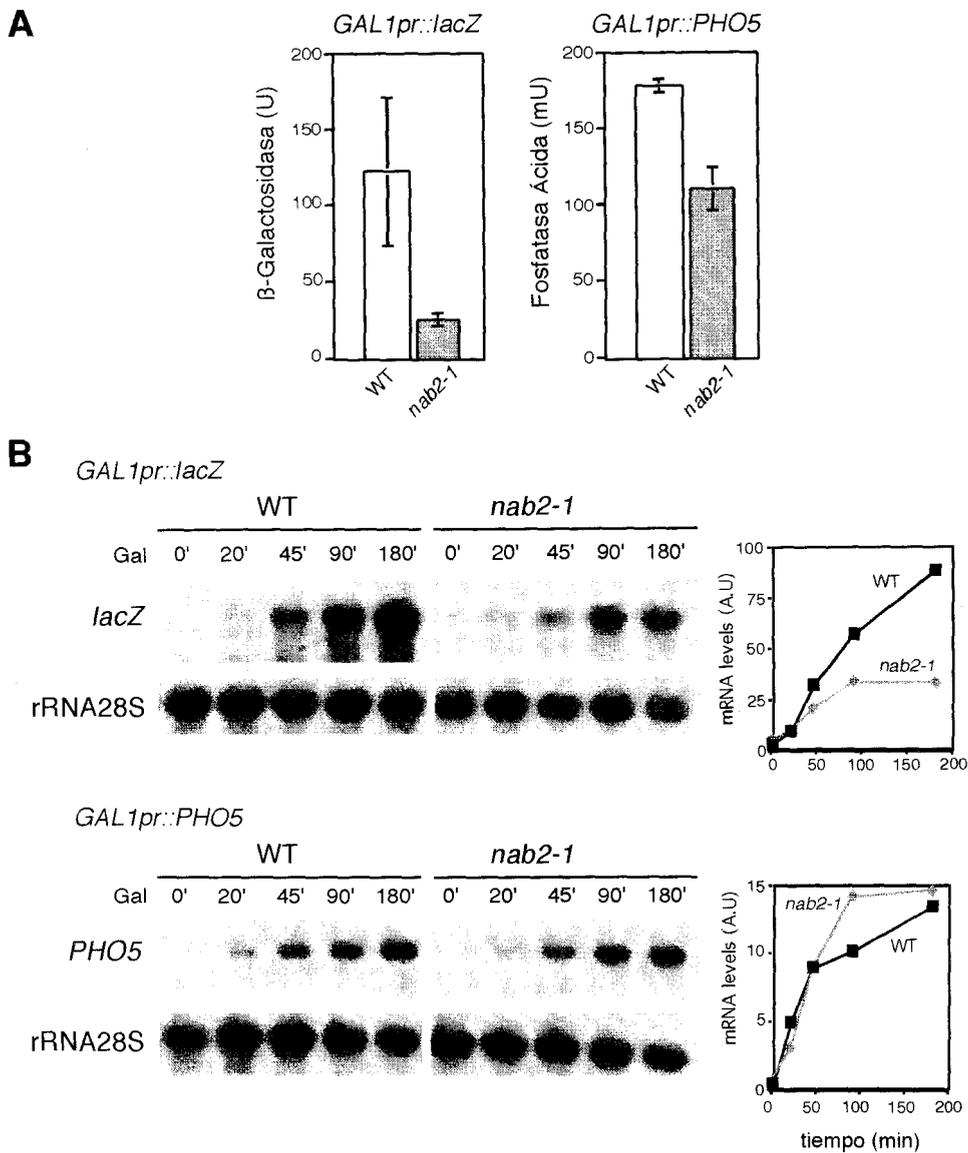


Figura 20. Análisis de expresión de los sistemas *GAL1pr::lacZ* y *GAL1pr::PHO5* en las estirpes silvestres (NAL-3A) y *nab2-1* (NAL-11B). (A). Actividades β -galactosidasa y fosfatasa ácida usando los sistemas p416-GAL1-lacZ y pSch202. Cada valor representa la media de 2-3 transformantes independientes. Sólo se dan los datos en condiciones de activación (2% galactosa). En condiciones de represión los niveles no fueron detectables. (B). Análisis de Northern de los genes *lacZ* y *PHO5* transcritos desde el promotor *GAL1*. Para otros detalles ver Figura 8.

II.2.4. Un nuevo complejo de levaduras: Thp1-Sac3

Un segundo abordaje que hemos seguido para buscar proteínas relacionadas con Thp1 ha sido una aproximación bioquímica, para tratar de encontrar proteínas que interactúen con Thp1. Hemos construido una estirpe de levadura que contiene una fusión *THP1-TAP* en el extremo carboxi-terminal integrada en el locus *THP1* del cromosoma. Para purificar proteínas de levadura que se unieran a Thp1 usamos un método de purificación por afinidad en tandem (TAP) que implica dos pasos sucesivos de purificación. El análisis de la fracción eluida mediante geles de SDS-poliacrilamida teñidos con plata revela la existencia de 3 polipéptidos con pesos moleculares aparentes de ~140, ~100, ~50 kDa y algunas otras bandas minoritarias (Figura 21A). Determinamos la identidad de cada proteína mediante dos técnicas independientes:

“peptide mass fingerprinting” mediante MALDI-re TOF y una búsqueda en la base de datos Sequence-Tag/PepFrag usando datos de secuencias de aminoácidos obtenidos por espectrometría de masas en tandem ESI. (Erdjument-Bromage *et al.* 1998). Este análisis nos reveló que p140 corresponde a Sac3, p100 corresponde a un fragmento amino-terminal de Sac3 y p50 a Thp1. Las otras bandas inferiores corresponden a Cdc31 (proteína con capacidad de unirse al sitio de unión de la calmodulina) y a fragmentos de Rpl14A, Rpl35A, Rps17A y Med8. Por lo tanto concluimos que Thp1 y Sac3 forman un complejo estable en levaduras.

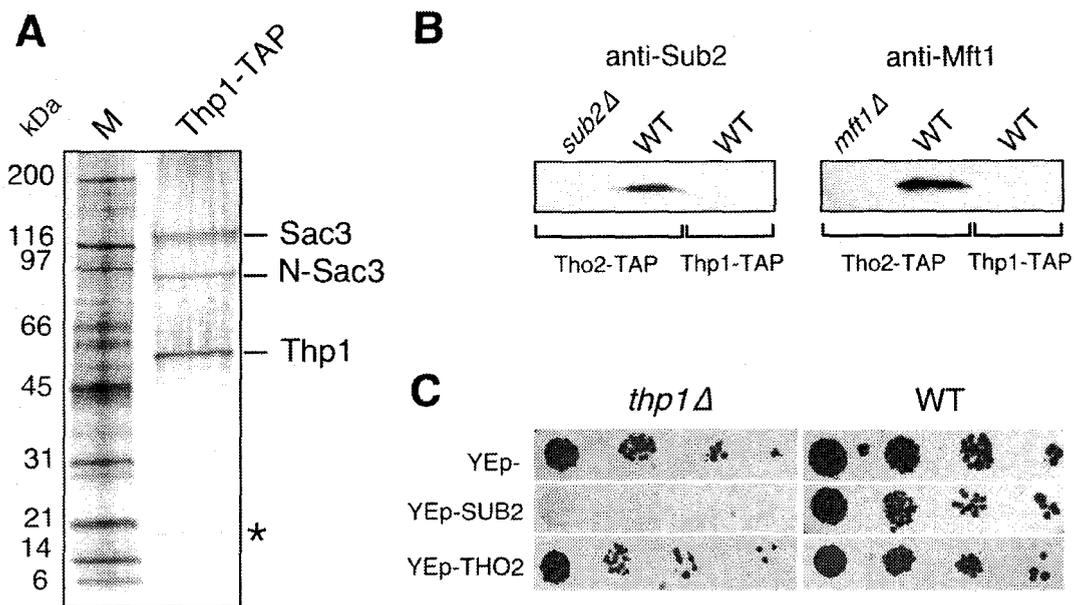


Figura 21. Purificación y análisis del complejo Thp1-Sac3. (A). Gel de SDS-poliacrilamida teñido con plata donde se muestra el complejo purificado de levaduras usando una fusión Thp1-TAP integrada en una estirpe *pep4Δ* (LSY267). Con un asterisco se indica una banda secundaria correspondiente a Cdc31, que pertenece a una superfamilia de proteínas con capacidad de unirse al sitio de unión a calmodulina del TAP. (B). Análisis de Western de los complejos purificados Thp1-TAP y Tho2-TAP, éste último purificado en estirpes silvestres, *sub2Δ* y/o *mft1Δ*, usando anticuerpos anti-Sub2 y anti-Mft1. En el complejo Thp1-Sac3 no se detectó ni Sub2 ni Mft1. (C). Efecto de la sobreexpresión de *SUB2* y *THO2* en la viabilidad del mutante *thp1Δ*. Las estirpes silvestre (W303-1A) y *thp1Δ* (WFBE046) se transformaron con el plásmido pRS416THP1 basado en *URA3* y que contiene una copia silvestre de *THP1* y con el plásmido YEP351, basado en *LEU2* y que contiene o bien una copia silvestre de *SUB2* o bien de *THO2*. Se hicieron diluciones seriadas (x10) de los transformantes y se sembraron en SC-leu+500 µg/ml de FOA.

Sac3 es una proteína nuclear implicada en el transporte de proteínas (Jones *et al.*, 2000). En paralelo a este estudio se ha visto que Sac3 copurifica en cantidades subestequiométricas con Sub2-TAP (Strasser *et al.*, 2002). Dada la posibilidad de que el complejo Thp1-Sac3 pudiera interactuar con el complejo THO asociado a Sub2, nos preguntamos si mediante un Western blot podríamos detectar pequeñas cantidades de THO y Sub2, no detectables con una tinción con plata. En la Figura 21B se muestra que al purificar Thp1-TAP no arrastramos ni Mft1, componente del complejo THO, ni Sub2. Esto nos está indicando que la mayoría del complejo Thp1-Sac3 se encuentra en la célula independientemente de THO y de Sub2. Sin embargo, la sobreexpresión de

SUB2, y no la de *THO2*, es letal en un mutante *thp1Δ*, lo que nos sugiere una relación funcional entre Sub2 y Thp1 (Figura 21C).

II.2.5. El mutante *sac3Δ* está afectado en el transporte de mRNA

Nos preguntamos a continuación si el mutante *sac3Δ* estaría afectado en transporte de mRNA al igual que *thp1Δ*. La acumulación de RNA poliadenilado (poli(A)⁺ RNA) se detectó mediante una hibridación *in situ* con un oligo-dT marcado con digoxigenina y un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a fluoresceína. Como en el mutante *thp1Δ*, a 30°C se observa acumulación nuclear de poli(A)⁺RNA. Tras 4 h a temperatura restrictiva, 37°C, esta acumulación se intensifica (Figura 22).

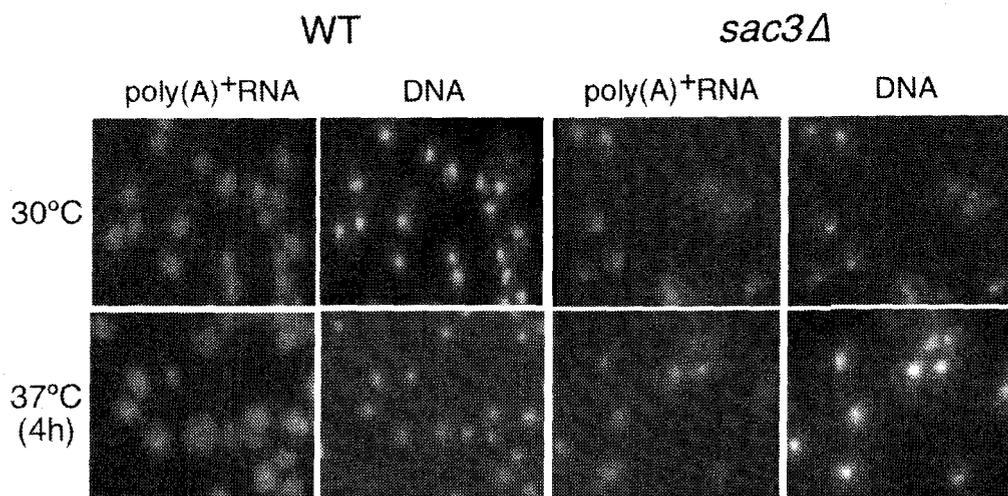


Figura 22. Análisis del transporte de mRNA en cepas silvestres (BY4741) y *sac3Δ* (Y03517). La localización subcelular del RNA poliadenilado (poli(A)⁺) se analizó mediante una hibridación *in situ* usando un oligo(dT) marcado con digoxigenina. Para otros detalles ver Figura 13.

Para saber si el complejo Thp1-Sac3 actúa como una unidad funcional estudiamos los fenotipos de transcripción y recombinación en *sac3Δ* y observamos que, al igual que *thp1Δ*, está afectado en la expresión de *lacZ* y no de *PHO5* (Gallardo *et al.*, 2003). Por otro lado determinamos la frecuencia de recombinación usando el sistema cromosómico de repeticiones directas *leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k*. La frecuencia de recombinación obtenida en *sac3Δ* es 2145 veces superior a la del silvestre, muy similar a la de *thp1Δ*. Para determinar si este fenotipo de hiperrecombinación está asociado a un defecto en transcripción, medimos la frecuencia de recombinación de *sac3Δ* en los sistemas plasmídicos L y LYΔNS. Este último sistema es similar al LY pero sin el gen *URA3*. Lo que se observa es un incremento en la frecuencia de recombinación de 10 veces sólo en el sistema LYΔNS (Gallardo *et al.*, 2003). Todos estos datos apuntan a que el complejo Thp1-Sac3 actúa como una unidad funcional.

RESULTADOS
CAPÍTULO III

RELACIONES FUNCIONALES ENTRE LOS
COMPLEJOS THO, Thp1-Sac3 Y Paf1-Cdc73

A raíz de las interacciones físicas y genéticas observadas entre Paf1 y Hpr1 (Chang *et al.*, 1999) quisimos ver si a nivel funcional los complejos THO, Thp1-Sac3 y Paf1-Cdc73 estaban relacionados. Anteriormente se ha descrito que las proteínas Cdc73 y Paf1 están implicadas en el mantenimiento de la integridad de la pared celular y en recombinación entre repeticiones directas. En nuestro estudio hemos hecho distintas aproximaciones: un estudio fenotípico usando diferentes medios y condiciones de crecimiento, un estudio de interacciones genéticas y un estudio de recombinación entre repeticiones directas. Los mutantes que elegimos para hacer este estudio fueron *hpr1Δ* (complejo THO), *thp1Δ* (complejo Thp1-Sac3), *paf1Δ* y *cdc73Δ* (complejo Paf1-Cdc73) y *pkc1^{ts}* (por su papel esencial en el mantenimiento de la integridad de la pared celular). Cuando atendemos al análisis de sensibilidad a distintos agentes que directa o indirectamente afectan a la pared celular (temperatura elevada, cafeína, higromicina B y blanco de calcofluor) podemos concluir que *hpr1Δ* y *thp1Δ* presentan siempre fenotipos similares (Figura 23). En cambio, no encontramos una homogeneidad de fenotipos entre *cdc73Δ* y *paf1Δ*, ni entre éstos y el resto de los mutantes analizados.

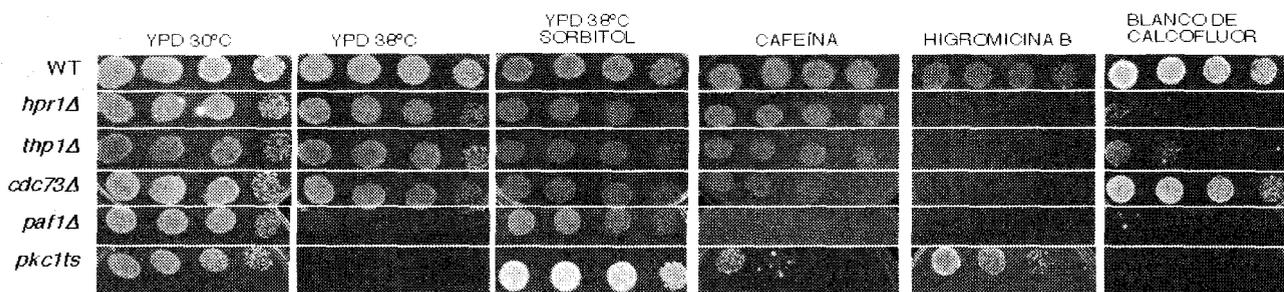


Figura 23. Estudio fenotípico de una estirpe silvestre y distintos mutantes hiperrecombinantes en diferentes medios y condiciones de crecimiento (*hpr1Δ*, Y04072; *thp1Δ*, Y01764; *cdc73Δ*, Y05326; *paf1Δ*, Y05727). El fondo genético de todas las cepas usadas es BY4147 salvo para el mutante *pkc1^{ts}* (371-5C-4C-1D) y su silvestre isogénico (PS593). Se muestran diluciones seriadas (x10) de colonias independientes sembradas en placas de YEPD con los suplementos indicados tras 3-5 días a 30°C o 38°C. Las fotos de las estirpes mutantes se tomaron 2 días después del correspondiente silvestre. Las concentraciones de los distintos suplementos fueron: 1M sorbitol, 6mM cafeína, 50µg/ml higromicina B y 20 µg/ml blanco de calcofluor.

En cuanto a las interacciones genéticas, a diferencia de la letalidad observada en el doble *paf1Δ hpr1Δ*, el doble mutante *paf1Δ thp1Δ* es viable, aunque las colonias son más pequeñas. El doble mutante *paf1Δ mex67-5* también es viable (Figura 24), a diferencia de los dos mutantes *hpr1Δ* y *thp1Δ* (Jimeno *et al.*, 2002; Figura 16).

	<i>mex67-5</i>	<i>paf1Δ</i>	<i>thp1Δ</i>
<i>hpr1Δ</i>	letal	letal	viable
<i>thp1Δ</i>	letal	viable (colonias pequeñas)	
<i>paf1Δ</i>	viable		

Figura 24. Estudios de viabilidad de dobles mutantes de *mex67-5* (WMC1-1A), *paf1Δ*(Y05727), *hpr1Δ* (Y04072) y *thp1Δ* (Y01764).

Cuando usamos el sistema cromosómico de repeticiones directas *leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k* observamos que los mutantes *paf1Δ* y *cdc73Δ* presentan un incremento en la frecuencia de recombinación de 5,4 veces con respecto a los niveles del silvestre (Figura 25A) no comparables a los observados en los mutantes *hpr1Δ* y *thp1Δ* (x636, x2091 respectivamente; Figura 13). Por otro lado, cuando estudiamos la recombinación en *paf1Δ* y *cdc73Δ* con los sistemas plasmídicos basados en las repeticiones de *leu2* (L, LY, L-*lacZ* y L-*PHO5*) observamos que, independientemente de la región intermedia ubicada entre las repeticiones, no muestran un fenotipo de hiperrecombinación (Figura 25B).

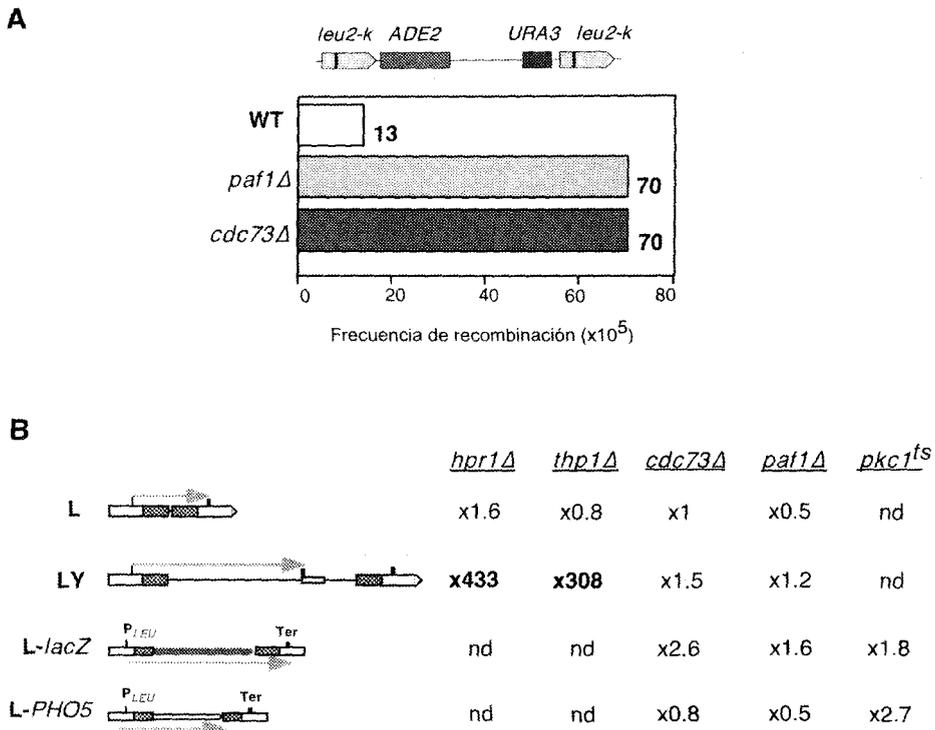


Figura 25. (A). Frecuencia de recombinación de los mutantes *cdc73Δ*(WMCA-2D) y *paf1Δ* (WMPW-1A) y su correspondiente silvestre (WMPW-1C)La recombinación se estudió con el sistema cromosómico de repeticiones directas *leu2k::ADE2-URA3::leu2k*. Para otros detalles ver Figura 5. **(B).** Incremento en las frecuencias de recombinación con respecto al silvestre de los mutantes *hpr1Δ*(Y04072), *thp1Δ* (Y01764), *cdc73Δ* (Y05326), *paf1Δ* (Y05727) y *pkc1^{ts}* (371-5C-4C-1D) transformadas con los plásmidos centroméricos pRS314-L, pRS314-LY, pSch204 y pSch206 que contienen los correspondientes sistemas de repeticiones directas, L-*lacZ* y L-*PHO5* respectivamente. Los datos representan la mediana de 3-4 tests de fluctuación, cada uno realizado con seis colonias independientes. Para otros detalles ver Figuras 4 y 10.

Todos estos datos nos indican que, a nivel funcional, los complejos THO/Thp1-Sac3 y Paf1-Cdc73 son complejos independientes. De todas formas, no podemos excluir que en algún proceso biológico se necesite la actuación conjunta de todos ellos.

II.3.1. Mutantes del complejo Paf1-Cdc73 presentan defectos de transcripción

Una posible explicación de la ausencia del fenotipo de hiperrecombinación de los mutantes *paf1Δ* y *cdc73Δ* en los sistemas L-*lacZ* y L-*PHO5* podría ser que estos mutantes no mostraran ningún defecto durante la transcripción de dichas secuencias. Así que, como primera aproximación, quisimos medir las actividades β-galactosidasa y

fosfatasa ácida usando las fusiones anteriormente descritas *GAL1pr::lacZ* y *GAL1pr::PHO5*. Como se muestra en la Figura 26A, *paf1Δ* y *cdc73Δ* están afectados en la expresión del gen *lacZ*, aunque no sufren una caída tan severa como la que se observa en los mutantes *hpr1Δ* y *thp1Δ*. En cuanto a la expresión de *PHO5* no se observó una reducción significativa de la actividad fosfatasa con respecto al silvestre (Figura 26A).

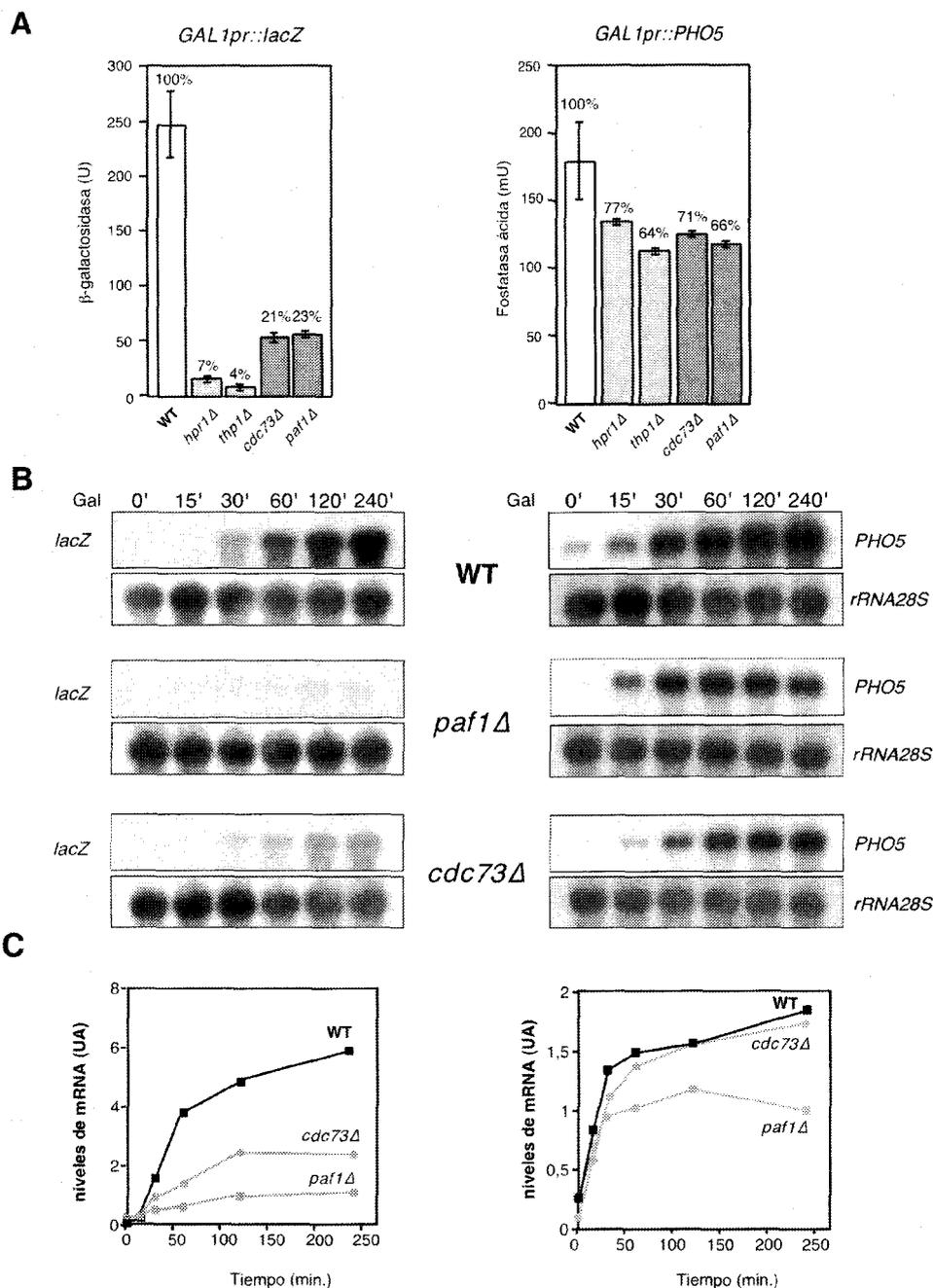


Figura 26. Análisis de expresión de los sistemas *GAL1pr::lacZ* y *GAL1pr::PHO5* en las estirpes silvestres (BY4147), *hpr1Δ* (Y04072), *thp1Δ* (Y01764), *cdc73Δ* (Y05326), *paf1Δ* (Y05727), *rtf1Δ* (Y04611) y *leol1Δ* (Y02379). (A). Actividades β-galactosidasa y fosfatasa ácida usando los sistemas p416-GAL1-*lacZ* y pSch202. Cada valor representa la media de 2-3 transformantes independientes. Sólo se dan los datos en condiciones de activación de la transcripción (2% galactosa). En condiciones de represión los valores no fueron detectables. (B). Análisis de Northern de los genes *lacZ* y *PHO5* transcritos desde el promotor *GAL1*. (C). Cuantificación de las cinéticas de inducción de los mRNAs analizados. Todos los niveles de mRNA se dan en unidades arbitrarias (UA) con respecto a los niveles de rRNA. Para otros detalles ver Figura 8.

Este resultado se confirmó mediante un Northern en el que se midió la cinética de acumulación del mRNA correspondiente a *lacZ* y *PHO5*. Al igual que ocurre con las actividades bioquímicas, en los dos mutantes analizados, la transcripción de *lacZ* está más afectada que la de *PHO5*, siendo *paf1Δ* el que presenta el defecto más fuerte (Figuras 26B y 26C). Estos resultados sugieren que el complejo Paf1-Cdc73 está funcionalmente relacionado con la transcripción, posiblemente con la elongación.

II.3.2. Estudio del contenido de DNA

Hpr1 y Tho2 forman parte del complejo THO junto con Mft1 y Thp2. Mutaciones en cualquiera de los genes que codifican estas proteínas, confieren los mismos fenotipos de inestabilidad genómica asociada a transcripción, aunque la severidad de esta inestabilidad varía según el mutante (Chávez *et al.*, 2000). Como se muestra en la Figura 27, un hecho destacable del mutante *tho2Δ* es que sus células son muy grandes y un porcentaje de ellas aparecen con múltiples gemas. Por otro lado se ha descrito que el mutante *paf1Δ* tiene una morfología celular alterada (células alargadas) (Shi *et al.*, 1996).

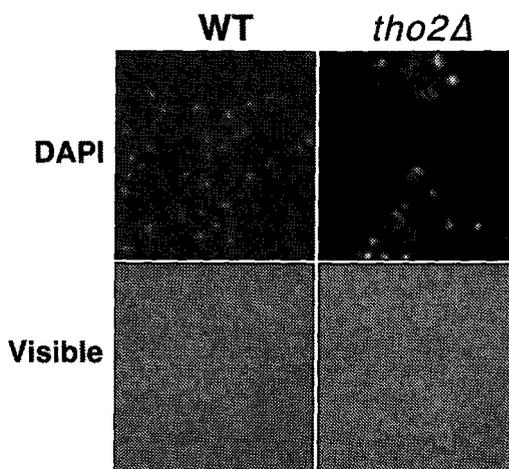


Figura 27. Estudio de la morfología celular de una estirpe silvestre (W303-1A) y *tho2Δ* (RK2-6C). Las muestras se tomaron de un cultivo en exponencial a 30°C en YEPD. El DNA nuclear se tiñó con DAPI 10 µg/ml. Las muestras se visualizaron en un microscopio Olympus AHBT3.

Esta morfología se asocia frecuentemente con defectos en el ciclo celular. Por ello quisimos estudiar el contenido de DNA en estos mutantes mediante citometría de flujo (FACS), como un indicador de un hipotético defecto en el ciclo celular. Los mutantes estudiados abarcan los 3 complejos protéicos descritos anteriormente: el complejo THO (*tho2Δ*, *hpr1Δ*, *mft1Δ*, *thp2Δ*), el complejo Thp1-Sac3 (*thp1Δ*) y el complejo Paf1-Cdc73 (*paf1Δ*, *cdc73Δ*). El estudio se realizó con cultivos asincrónicos. Como se muestra en la Figura 28A los mutantes *tho2Δ* y *hpr1Δ* presentan un elevado contenido en DNA. El mutante rezumante *hpr1Δ::HIS3* (*hpr1Δ**) presenta, en general, fenotipos más suaves que el mutante nulo *hpr1Δ*. Cuando atendemos a su contenido en DNA observamos que la mayoría de las células están en fase G2, al contrario de lo que ocurre en la cepa silvestre donde vemos que mayoritariamente las células están en G1. Algo similar ocurre en *thp1Δ*. Este dato nos está sugiriendo un defecto a lo largo del ciclo celular. En los mutantes *mft1Δ* y *thp2Δ* este defecto en contenido de DNA, si lo hubiera, es insignificante cuando lo comparamos con el observado en *hpr1Δ* y *tho2Δ*.

Por último, los mutantes del complejo Paf1-Cdc73 estudiados, presentan un contenido en DNA ligeramente superior al silvestre, aunque tampoco es comparable al observado en *tho2Δ* y *hpr1Δ*.

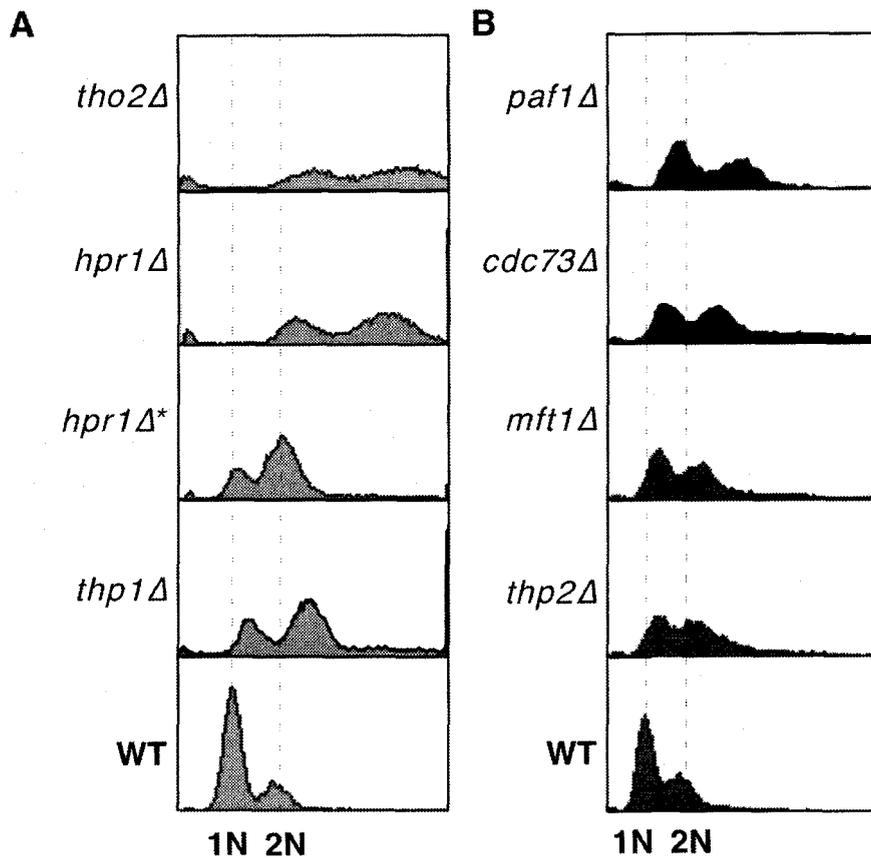


Figura 28. (A). Estudio del contenido de DNA por citometría de flujo en una estirpe silvestre (W303-1A o BY4147) y los mutantes *thp1Δ* (WFBE046), *hpr1Δ** (U768-4C), *hpr1Δ* (SChY58a) y *tho2Δ* (RK2-6C). (B). Estudio del contenido de DNA por citometría de flujo en una estirpe silvestre (BY4147) y los mutantes *thp2Δ* (Y02861), *mft1Δ* (Y00508), *cdc73Δ* (Y05326) y *paf1Δ* (Y05727). 1N: contenido simple de DNA; 2N: contenido doble de DNA.

Este alto contenido en DNA observado por citometría de flujo en los mutantes *tho2Δ* y *hpr1Δ* podría también indicarnos la existencia de reorganizaciones cromosómicas, como translocaciones, duplicaciones o amplificaciones. Para comprobar esta posibilidad realizamos electroforesis de campo pulsado (CHEF). En la Figura 29 se observa que en el diploide homocigoto para la mutación *tho2Δ* aparecen bandas nuevas que no están presentes en el silvestre. Esta alteración en el patrón de cromosomas se observó en 30 cultivos de un total de 43 diploides analizados. La identidad de estas bandas aún está por determinar. Teniendo en cuenta el resultado de la citometría de flujo (Figura 28A), en el diploide homocigoto para la delección *thp1Δ* no esperaríamos ninguna alteración en el patrón de cromosomas. Y de hecho, ese es el resultado que obtenemos, en *thp1Δ* no aparecen diferencias en el patrón de bandas cuando lo comparamos con el patrón de un diploide silvestre (Figura 29).

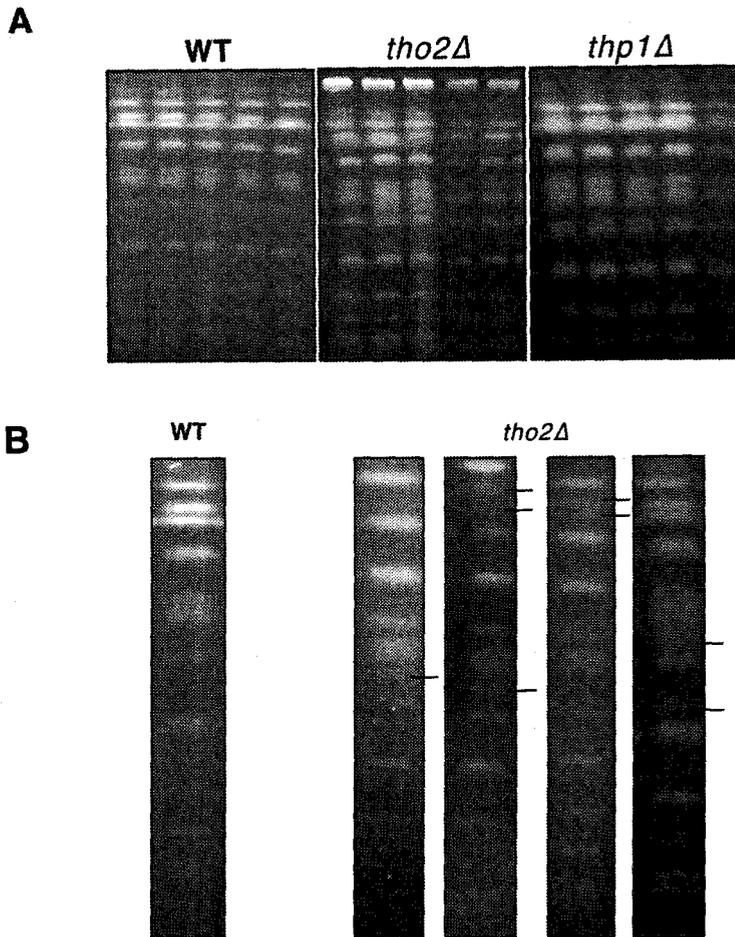


Figura 26. (A). Electroforesis de cromosomas en campo pulsante (CHEF) en las estirpes diploides silvestre (W303-1A/1B), *tho2Δ* (RK2-6C/6D) y *thp1Δ* (WFBEO46/47). (B). Diploides *tho2Δ* con el patrón de bandeo cromosómico alterado. El porcentaje de diploides *tho2Δ* que presentan un fenotipo alterado es de 30/43 cultivos analizados.

II.3.3. Análisis del transcriptoma en una cepa silvestre, *tho2Δ* y *thp1Δ*

Aunque los mutantes *tho2Δ* y *thp1Δ* presentan los mismos fenotipos de inestabilidad genómica asociada a un defecto durante la elongación de la transcripción (Piruat and Aguilera, 1998; Gallardo and Aguilera, 2001) no presentan el mismo perfil de contenido en DNA ni reorganizaciones cromosómicas (Figura 28 y 29). También sabemos que tienen distinta sensibilidad a UV (González-Barrera, S.). Para intentar explicar estas diferencias, nos planteamos la posibilidad de estudiar el patrón de expresión de todos los genes de *S. c.* en ambos fondos mutantes mediante análisis de “microarray”. Los resultados de expresión con el “microarray” reflejan que ambos mutantes, *tho2Δ* y *thp1Δ*, tienen un mismo patrón de expresión. No existen diferencias significativas en el patrón de expresión de los ~6000 genes entre *Thp1* y *Tho2* que puedan explicar fácilmente las diferencias fenotípicas. No obstante, cabe destacar un grupo de genes cuya expresión está alterada respecto al silvestre. En la Tabla 1 se resumen los más relevantes. Entre ellos aparecen genes que codifican proteínas implicadas en distintos procesos biológicos como la reparación (*PCNA* y *RFC5*), el procesamiento del mRNA (*PRP6*), el metabolismo de aminoácidos (*ARO11*), etc.

Tabla 1. ORFs cuya concentración varía entre la estirpe silvestre (W303-1A) y los mutantes *tho2Δ* (RK2-6C) y *thp1Δ* (WFBE046).

Nombre	<i>tho2Δ</i>	<i>thp1Δ</i>	Función/Proceso biológico
<i>RFC5</i>	x10	x11	Factor de replicación
<i>PCNA</i>	x48	x52	Factor de replicación
<i>PRP6</i>	x31	x31	Splicing RNA
<i>NUP170</i>	x33	x32	Nucleoporina
<i>SSH4</i>	x6	x4	Supersor de <i>SHR3</i> (permeasa)
<i>MBA1</i>	x20	x21	Cadena respiratoria
<i>APD1</i>	x18	x15	Desconocida
<i>COR1</i>	x27	x21	Cadena respiratoria
<i>ARO10</i>	x16	x17	Metabolismo de aminoácidos
<i>YBR022w</i>	x17	x17	Desconocida
<i>YBL046w</i>	x12	x6	Desconocida
<i>3088_at</i>	x3	x764	Desconocida
<i>2149_at</i>	x2	x2923	Desconocida
<i>3157_at</i>	x9	x21	Desconocida
<i>PHO11</i>	x0,02	x0,09	Metabolismo de fosfatos
<i>SPL2</i>	x0,04	x0,09	Inhibidor de quinasa/Ciclo celular
<i>PHM6</i>	x0,02	x0,09	Metabolismo de fosfatos
<i>HSP30</i>	x0,04	x0,11	Plegamiento de proteínas
<i>YFR054c</i>	x0,33	x0,05	Desconocida
<i>UBA3</i>	x0,21	x0,37	Ubiquitinización
<i>HO</i>	x0,06	x0,15	Endonucleasa HO
<i>RIF2</i>	x0,21	x0,46	Mantenimiento del telómero
<i>TEL1</i>	x1,3	x0,007	Mantenimiento del telómero
<i>YDR007w</i>	x1,1	x0,06	Metabolismo de aminoácidos

Se indica la intensidad relativa del RNA acumulado en los mutantes con respecto al silvestre. prot.: proteínas; R.E.: retículo endoplasmático.

Un dato llamativo que encontramos es la aparición de una familia de genes que, de manera significativa, disminuye su expresión en ambos mutantes: los snoRNAs (RNAs nucleolares de pequeño tamaño). Este hecho lo observamos en 20 genes, de un total de 180. Solamente uno de ellos aumenta su expresión: *SNR41*. Aunque parece probable que se sintetizan en el nucleoplasma, su destino final es el nucleolo. La mayoría de los snoRNAs participan en la modificación y procesamiento de los pre-ribosomal RNAs (pre-rRNA). En levaduras la mayoría de snoRNAs se transcriben como unidades independientes, principalmente por la RNAPII, aunque también existen algunos snoRNAs intrónicos o formando parte de unidades policistrónicas. En nuestro estudio aparece la misma cantidad de snoRNAs monocistrónicos que policistrónicos, y solamente un único caso de snoRNA intrónico. En la Tabla 2 se listan éstos y otros tipos de RNAs cuyas intensidades relativas disminuyen en este estudio. Todos estos datos son consistentes con un posible papel de las proteínas Tho2 y Thp1 en la biogénesis del RNA (mRNA, snoRNA, tRNA, etc), aunque aún queda por determinar si estos defectos son directos o indirectos.

Tabla 2. Tipos de RNA cuya concentración varía entre la estirpe silvestre (W303-1A) y los mutantes *tho2Δ* (RK2-6C) y *thp1Δ* (WFBE046).

DNA	Nombre	<i>tho2Δ</i>	<i>thp1Δ</i>	Función/Proceso biológico
Mono.	<i>SNR11</i>	x0,36	x0,40	Formación de pseudouridina [25S rRNA]
Mono.	<i>SRN13</i>	x0,23	x0,15	2'-O-Metilación [25S rRNA]
Mono.	<i>SNR36</i>	x0,18	x0,18	Formación de pseudouridina [18S rRNA]
Mono.	<i>SNR37</i>	x0,41	x0,38	Formación de pseudouridina [25S rRNA]
Mono.	<i>SNR39b</i>	x0,17	x0,33	2'-O-Metilación [25S rRNA]
Intrón.	<i>SNR38</i>	x1,03	x0,29	2'-O-Metilación [25S rRNA]
Poli.	<i>SNR41</i>	x2,66	x2,09	2'-O-Metilación [18S rRNA]
Mono.	<i>SNR45</i>	x0,27	x0,09	Modificación rRNA (nucleolar)
Poli.	<i>SNR51</i>	x0,40	x0,32	2'-O-Metilación [18S, 25S rRNA]
Poli.	<i>SNR55</i>	x0,32	x0,26	2'-O-Metilación [18S rRNA]
Mono.	<i>SNR56</i>	x0,19	x0,12	2'-O-Metilación [18S rRNA]
Poli.	<i>SNR57</i>	x0,20	x0,27	2'-O-Metilación [18S rRNA]
Poli.	<i>SNR67</i>	x0,79	x0,32	2'-O-Metilación [25S rRNA]
Mono.	<i>SNR68</i>	x0,36	x0,27	2'-O-Metilación [25S rRNA]
Mono.	<i>SNR69</i>	x0,37	x0,27	2'-O-Metilación [25S rRNA]
Poli.	<i>SNR74</i>	x0,26	x0,23	2'-O-Metilación [18S rRNA]
Poli.	<i>SNR75</i>	x0,20	x0,21	2'-O-Metilación [25S rRNA]
Poli.	<i>SNR76</i>	x0,15	x0,20	2'-O-Metilación [25S rRNA]
Poli.	<i>SNR77</i>	x0,45	x0,29	2'-O-Metilación [18S rRNA]
Poli.	<i>SNR128</i>	x0,08	x0,02	Corte del pre-rRNA/2'-O-Metilación [18S rRNA]
Mono.	<i>SNR189</i>	x0,16	x0,13	Formación de pseudouridina [18S, 25S rRNA]
	<i>tQ(UUG)E2</i>	x0,30	x0,13	tRNA GlnUUG (traducción)
	<i>tR(ACG)J</i>	x0,32	x0,29	tRNA ArgACG (traducción)
	<i>tP(AGG)N</i>	x1,41	x0,05	tRNA ProAAG (traducción)
	<i>tP(AGG)C</i>	x1,38	x0,15	tRNA ProAAG (traducción)
	<i>RDN37-1</i>	x0,24	x0,14	35S pre-rRNA
	<i>TLC1</i>	x0,41	x0,46	Componente de la telomerasa
	<i>SCR1</i>	x2,03	x1,33	Conduce a las prot. al R.E. (cit.)

DNA: organización cromosómica del gen (monosómico, policistrónico o intrónico). Para otros detalles ver Tabla 1.

DISCUSIÓN

En esta tesis hemos identificado un nuevo gen, *THP1*, cuya delección confiere un fuerte incremento en la frecuencia de recombinación entre repeticiones directas (>2000 veces sobre los niveles del silvestre). Además *thp1Δ* produce un defecto en la transcripción de genes de levadura y, en particular, de secuencias de DNA como la correspondiente al gen bacteriano *lacZ*. Estos fenotipos de hiperrecombinación y defecto en la transcripción observados en el mutante *thp1Δ* son idénticos a los descritos en los mutantes del complejo THO. Como ocurre en ellos, la hiperrecombinación en *thp1Δ* es totalmente dependiente de la elongación de la transcripción. Si se impide la transcripción del sistema de recombinación, no detectamos tal hiperrecombinación. Proponemos que *THP1* afecta a la elongación de la transcripción y a la incidencia de recombinación mitótica por el mismo proceso biológico controlado por THO, constituyendo una evidencia más de la existencia de recombinación asociada a la elongación de la transcripción.

Por otro lado, mostramos que el complejo proteico Thp1-Sac3 está funcionalmente relacionado con Nab2, proteína de unión a mRNA, y que actúa en la interfase entre transcripción y metabolismo de mRNP. Además hemos observado una conexión entre las funciones anteriormente descritas de las proteínas Sac3 y Nab2 (transporte de proteínas o mRNA) y transcripción. Usando una estirpe que contiene la fusión *THP1-TAP*, hemos purificado un complejo proteico constituido por Thp1 y Sac3. En una búsqueda de supresores en multicopia del defecto de expresión génica en *thp1Δ* hemos identificado a *NAB2*. Mostramos por análisis genéticos y moleculares que Thp1-Sac3 y Nab2 están relacionados funcionalmente y que actúan en el mismo proceso biológico que TREX y Mex67-Mtr2, conectando la transcripción y el metabolismo de mRNP mediante un proceso que afecta a la estabilidad genómica.

III.1. Identificación de genes implicados en recombinación

En esta tesis hemos identificado una serie de genes que, de una manera u otra, están implicados en el mantenimiento de la estabilidad genómica, detectada por un fenotipo de recombinación entre repeticiones. Un grupo de ellos presenta un fenotipo de hiperrecombinación en todos los sistemas de recombinación, independientemente de la orientación de las repeticiones y de la existencia o no de secuencias intermedias flaqueadas por dichas repeticiones. Estos son *MED2*, *CWC23*, *LSG1* y *YNL310c*. Sabemos que Med2 es una proteína que forma parte del “mediador”, complejo que está implicado mediante su interacción con el dominio CTD de la RNAPII, en la regulación de la transcripción. En cuanto a Cwc23 distintos estudios bioquímicos han descrito que interacciona con proteínas implicadas en el metabolismo del mRNA, principalmente en la eliminación de intrones. Aunque aún no se ha identificado la función de Cwc23, se sabe que algunas proteínas Cwc participan en el proceso de eliminación de intrones interaccionando con distintos snRNAs o bien estabilizando las uniones RNA-RNA y RNA-proteína que tienen lugar durante dicho proceso (Ohi *et al.*, 2002). Nada se sabe de las proteínas codificadas por los genes *YNL310c* y *LSG1*. El único dato que tenemos de *YNL310c* es un hipotético dedo de zinc que encontramos cuando analizamos su secuencia, dominio presente en proteínas que se unen a ácidos nucleicos como factores de transcripción eucarióticos. Con la información que tenemos de estas proteínas, el único punto en común que hemos encontrado, además de su papel en la estabilidad genómica, es su implicación en el metabolismo del mRNA.

Conviene señalar que el fenotipo de hiperrecombinación de estos mutantes no es general sino dependiente de sistema. Cuando usamos el sistema cromosómico *leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k*, observamos que sólo *ynl310cΔ* y *cwc23Δ* presentan elevadas frecuencias de recombinación (Figura 3).

Un segundo grupo de mutantes son los que sólo presentan un fenotipo de hiperrecombinación en los sistemas de repeticiones directas (L, LY). Estos son *rpl13AΔ*, *tos3Δ*, *trf4Δ* y *yor322cΔ*. Muy poco se sabe acerca de la función de Rpl13A, aparte de su papel estructural en la subunidad 60S de los ribosomas (Planta and Mager, 1998). Este gen pertenece a una familia de genes de la levadura *S. cerevisiae* que contiene un intrón. De hecho, de los 137 genes que codifican proteínas ribosómicas, 99 de ellos contienen un intrón. De Tos3, proteína de función desconocida, se sabe por experimentos bioquímicos que interacciona con la proteína del citoesqueleto Cof1 y por estudios de doble híbrido que interacciona con Nup84 (poro nuclear). Hay que destacar que Nup84 forma parte de un complejo implicado en el transporte de mRNA. De hecho, este complejo, vía Nup85, interacciona con el heterodímero Mex67-Mtr2, que como ya se ha comentado, su ausencia provoca los mismos fenotipos de inestabilidad genómica asociada a transcripción que los mutantes de los complejos THO y Thp1-Sac3 (Siniosoglou *et al.*, 2000; Jimeno *et al.*, 2002). Trf4 es una proteína que está funcionalmente relacionada con la topoisomerasa I, al igual que ocurre con Hpr1. Se ha descrito que Trf4, junto con Trf5, es una polimerasa de DNA (polimerasa κ) que acopla la replicación del DNA con el establecimiento de la cohesión entre cromátidas hermanas. Trf4 es además esencial en distintos procesos metabólicos del DNA como son la segregación de cromosomas y la reparación (Walowsky *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2000; 2002). Del mutante *yor322cΔ* sólo se han descrito distintos fenotipos de sensibilidad a cafeína y defectos de crecimiento a 37°C (Pearson *et al.*, 1997). En este grupo de mutantes nos es difícil encontrar algún punto en común que explique el fenotipo de hiperrecombinación entre repeticiones directas. Además, no se observa hiperrecombinación en el sistema cromosómico *leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k*, salvo en el mutante *trf4Δ* (4 veces sobre los niveles del silvestre; Figura 3).

Por último, hemos encontrado una mutación, en el gen *APC9*, que provoca un fenotipo de hiperrecombinación sólo en el sistema de repeticiones invertidas SU (Figura 2). La proteína Apc9 forma parte del complejo APC, el cual tiene un papel esencial durante el ciclo celular, en concreto en la entrada en anafase y la salida de mitosis (Lamb *et al.*, 1994; Zachariae *et al.*, 1998). De momento nos es difícil explicar esta asociación entre ambos fenómenos, recombinación y ciclo celular, que nos ayude a entender porqué en este mutante sólo observamos un fenotipo de hiperrecombinación en el sistema de repeticiones invertidas (SU) y no en los de repeticiones directas (L, LY).

III.2. El mutante *thp1Δ* está afectado en la transcripción mediada por la RNAPII

En nuestro escrutinio hemos encontrado una proteína, Thp1, cuya ausencia confiere un fenotipo de hiperrecombinación dependiente de transcripción. Thp1 tiene, aparentemente, homólogos estructurales en *S. pombe*, *C. elegans*, *D. melanogaster* y *H. sapiens*. Esto hace pensar que Thp1 puede tener un papel importante en la biología de una célula eucariótica. Como hemos descritos, una de las características más significativas de *thp1Δ* es su defecto en transcripción. Tal defecto no es de activación del promotor. Mientras que el promotor *GALI* puede ser activado en el mutante *thp1Δ*, determinado por el análisis del mRNA de la fusión *GALI-PHO5* o del gen endógeno

GAL1, la transcripción de *lacZ* fusionado a *GAL1* disminuye significativamente (Figuras 5-7). Así que, el principal defecto transcripcional observado en *thp1Δ* se manifiesta como una incapacidad de la RNAPII de transcribir secuencias como *lacZ*. En el mutante *thp1Δ* la transcripción de los genes de levadura analizados en este estudio (*GAL1*, *PHO5*, *LEU2*, *ACT1*) está afectada en mayor o menor grado. No podemos descartar la posibilidad de que *thp1Δ* esté también afectado en la iniciación de la transcripción. Sin embargo, nuestros resultados claramente indican que el principal defecto transcripcional en *thp1Δ* se da en un paso posterior a la iniciación. Cuando insertamos la secuencia *lacZ* en el extremo 3' de *PHO5*, no observamos la acumulación correspondiente al transcrito completo, lo que implica que el intento de la RNAPII de transcribir *lacZ*, después de haber transcrito *PHO5* (1.5 kb), reduce enormemente la cinética de acumulación del mRNA de *PHO5* (Figura 5). Obtenemos los mismos resultados cuando insertamos *lacZ* justo detrás de la copia truncada *leu2Δ3'* usada en los sistemas de repeticiones directas (Figura 7). De manera que la caída en la acumulación de mRNA en *thp1Δ* es independiente del promotor usado, ya sea constitutivo o regulado, o de la distancia del promotor a la región de DNA donde se produce el defecto durante la elongación de la transcripción. Por lo tanto, *thp1Δ* provoca un defecto durante la elongación de determinados genes, presentando el defecto más fuerte con la secuencia *lacZ*, al igual que ocurre en los mutantes del complejo THO (Chávez and Aguilera, 1997; Piruat and Aguilera, 1998; Chávez *et al.*, 2001). Curiosamente, la proteína Thp1 contiene un dominio PINT, presente también en la proteína Rpn3, un componente de la partícula reguladora del proteosoma 19S implicada recientemente en la elongación de la transcripción (González *et al.*, 2002).

III.3. El fenotipo de hiperrecombinación observado en *thp1Δ* está asociado a un defecto en la elongación de la transcripción

Hemos mostrado que la ausencia de *THP1* estimula la recombinación en sistemas de repeticiones en las que la secuencia intermedia flanqueada por dichas repeticiones de *leu2* (*lacZ* o pBR322) genera un problema durante la transcripción de la misma (Figura 7). Si en estos sistemas de repeticiones impedimos la transcripción, no activando el promotor (sistemas *GLlacZ* y *GLPHO5* en glucosa, Figura 7) o insertando un terminador prematuro justo detrás de la primera repetición de *leu2* (sistema LNAT, Figura 7) desaparece el fenotipo de hiperrecombinación. Del mismo modo, si los sistemas de recombinación no contienen secuencia intermedia (sistema L, Figuras 1-2) tampoco observamos hiperrecombinación. Estos resultados indican que, en *thp1Δ*, la hiperrecombinación tiene lugar sólo en aquellos sistemas de repeticiones en los que la RNAPII tiene que atravesar regiones de DNA responsables de un defecto durante la elongación de la transcripción.

Es importante enfatizar el significado de estos resultados en el contexto de su dependencia de la elongación de la transcripción. Sabemos que la recombinación entre repeticiones directas tiene que iniciarse en las repeticiones o en la región intermedia (Prado and Aguilera, 1995), mientras que la transcripción se inicia únicamente fuera de los sistemas de recombinación usados en este estudio. Si, como hemos mostrado aquí, la hiperrecombinación es completamente dependiente de la transcripción, tal dependencia no puede ser explicada a través de la iniciación de la transcripción, ya que un defecto en la iniciación de la transcripción produciría un substrato recombinogénico fuera del sistema de recombinación y esto no generaría un suceso de recombinación (Prado and Aguilera, 1995). Ya que la recombinación puede iniciarse sólo en las repeticiones o en

la región intermedia, secuencias por las que transcurre la elongación de la transcripción en los sistemas estudiados, el defecto transcripcional que genera el sustrato de recombinación tiene que estar asociado con la elongación. Cuando la secuencia *PHO5* situada entre las repeticiones de *leu2* se transcribe desde el promotor externo *LEU2*, el 1.6% de las células del mutante *thp1Δ* pierde la secuencia *PHO5* (0.07% en la cepa silvestre; Figura 7). Este dato confirma la existencia de un defecto durante la elongación de *PHO5*, detectado como una caída en la acumulación del mensajero correspondiente y por el fenotipo de hiperrecombinación en *thp1Δ*. Este resultado es idéntico al observado previamente en *tho2Δ* (Piruat and Aguilera, 1998). Por lo tanto, independientemente de una posible implicación de *THP1* en la iniciación de la transcripción, únicamente el defecto durante la elongación de la transcripción es el responsable del fenotipo de hiperrecombinación. Este resultado excluye la posibilidad de que la hiperrecombinación sea debida a un hipotético efecto de *thp1Δ* en la expresión de factores implicados en la producción de sustratos recombinogénicos.

III.4. Thp1 actúa en el mismo proceso biológico que el complejo THO

Nuestros análisis genéticos del mutante *thp1Δ* ponen de manifiesto que su defecto durante la elongación de la transcripción, provoca la formación de sustratos recombinogénicos de una manera similar a lo que ocurre en los mutantes del complejo THO. La conexión existente entre la elongación de la transcripción con la recombinación mitótica y la inestabilidad genómica se podrían explicar de varias formas: (1) una colisión de la horquilla de replicación con una RNAPII elongante (Vilette *et al.*, 1995; Prado *et al.*, 1997; McGlynn and Lloyd, 2000), (2) la acumulación de DNA superenrollado negativamente “aguas arriba” de la RNAPII elongante (Christman *et al.*, 1988; Thomas and Rothstein, 1989), (3) formación de un lazo R (R-loop) o (4) formación de una cromatina relajada alrededor de la polimerasa haciendo al DNA más sensible al ataque de nucleasas o agentes químicos (Chávez and Aguilera, 1997, Prado *et al.*, 1997).

Nuestros resultados indican que el complejo THO y Thp1 actúan en el mismo proceso biológico, conectando la transcripción con la incidencia de recombinación mitótica. De hecho, la hiperrecombinación observada en el sistema cromosómico de repeticiones directas *leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k* es suprimida por la misma mutación *hrs1Δ* en los tres mutantes *hpr1Δ*, *tho2Δ* y *thp1Δ* (Figura 10, Piruat *et al.*, 1997). Hemos excluido la posibilidad de que la similitud de fenotipos entre los tres mutantes se deba a una incapacidad de *thp1Δ* de transcribir tanto *HPR1* o *THO2* y viceversa (Figura 12). Además, también hemos descartado la posibilidad de que formen parte de un mismo complejo. Por un lado, se ha purificado un complejo protéico THO en el que no está presente Thp1 y por otro lado hemos purificado el complejo Thp1-Sac3, en el que, aparentemente, no está presente ningún componente del complejo THO (Chávez *et al.*, 2000; Figura 18). Ambos complejos son nucleares. Fusiones a la GFP nos han revelado que Tho2 se localiza en el núcleo, al igual que el resto de las proteínas del complejo THO (Chang *et al.*, 1999; Chávez *et al.*, 2000). Thp1 parece localizarse también en el núcleo, aunque no podemos descartar además una localización citoplásmica o incluso también en la envoltura nuclear como han sugerido otros estudios (Figura 11; Fischer *et al.*, 2002). Sac3, proteína que se asocia de manera estable y estequiométricamente a Thp1, se identificó en primer lugar como un supresor de una mutación de actina (Novick *et al.*, 1989) y más tarde se observó que estaba implicada en la progresión del

ciclo celular (Bauer and Kölling, 1996). Se ha descrito que Sac3 se localiza en el poro nuclear y se ha sugerido que también tiene un papel en el transporte de proteínas (Jones et al., 2000).

III.5. THO, Thp1-Sac3 y Paf1-Cdc73 son complejos independientes aunque relacionados funcionalmente

Mediante una purificación por afinidad de una forma transcripcionalmente activa de la RNAPII se han identificado una serie de proteínas unidas al CTD: Paf1, Cdc73, Hpr1, Ccr4 y al menos otras 10 subunidades (Shi *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 1999). A partir de estos datos se propuso la existencia de una forma de holoenzima necesaria para la transcripción de una serie de genes de levadura que actúan en la ruta de traducción de señales controlada por la proteína-quinasa C (Chang *et al.*, 1999). Sería importante saber si Thp1 es uno de estos factores aún no identificados que acompañan a la holoenzima. Sin embargo, existen diferencias significativas entre los fenotipos de los mutantes *tho* o *thp1Δ* y los de *paf1Δ*, *cdc73Δ* o *ccr4Δ*. Así el mutante *ccr4Δ* no es hiperrecombinante, *paf1Δ* y *cdc73Δ* son hiperrecombinantes pero con niveles mucho más suaves que *hpr1Δ*, *tho2Δ* y *thp1Δ*, y además hemos visto que tal fenotipo de hiperrecombinación es independiente de transcripción. El defecto transcripcional observado en mutantes del complejo Paf1-Cdc73 no basta por sí solo para dar lugar a los fenotipos de hiperrecombinación que observamos en los mutantes *hpr1Δ* y *thp1Δ*. El defecto en la transcripción de la secuencia *lacZ* podría ser a nivel de elongación ya que recientemente se ha visto que el complejo Paf1-Cdc73 se encuentra asociado a las ORFs durante la elongación de la transcripción junto con la RNAPII (Pokholok *et al.*, 2002). Además se han encontrado interacciones físicas y funcionales del complejo Paf1-Cdc73 con factores de elongación como Spt4-Spt5, Spt16-Pob3 y TFIIS (Pokholok *et al.*, 2002; Squazzo *et al.*, 2002), datos que apoyan aún más esta implicación del complejo Paf1-Cdc73 en la elongación de la transcripción. Por otro lado, mientras que combinaciones de las mutaciones *tho2Δ*, *hpr1Δ* y *thp1Δ* son viables y muestran los mismos fenotipos que los mutantes simples, como se espera para proteínas que actúan en la misma ruta biológica, los dobles mutantes *paf1Δ hpr1Δ* y *ccr4Δ hpr1Δ* son sintético letales (Chang *et al.*, 1999).

El estudio del contenido de DNA en mutantes de los tres complejos (THO, Thp1-Sac3 y Paf1-Cdc73) también nos marca otra diferencia. Los resultados obtenidos nos podrían estar sugiriendo que mutantes como *tho2Δ*, *hpr1Δ* y *thp1Δ* presentan defectos en el ciclo celular, mientras que no observamos tal defecto en los mutantes *paf1Δ* y *cdc73Δ* (Figura 25; Chang *et al.*, 1999). En un cultivo asincrónico la mayoría de las células están en fase G1 (1C). El perfil de FACS en el mutante rezumante *hpr1Δ::HIS3* y *thp1Δ* podría indicar una parada o un retraso de la fase G2 ya que, en ambos casos, la mayoría de las células tienen un contenido doble de DNA (2C), típico de dicha fase. En los mutantes nulos *hpr1Δ* y *tho2Δ* observamos que no aparece un pico correspondiente a 1C y que además el contenido en DNA es más continuo, es decir, existen células con 2C, 2.5C, 3C, 4C, etc. La ausencia de un pico 1C podría sugerir una aneuploidía. Por otro lado puede que las células 1C no sobrevivan por haber sufrido reorganizaciones cromosómicas con consecuencias letales para ellas. Estas observaciones son coherentes con el dato obtenido en el análisis de cromosomas (CHEF) realizado en el mutante *tho2Δ* que nos muestra la presencia de cromosomas "extras".

Por último, el análisis del “microarray” realizado en los mutantes *tho2Δ* y *thp1Δ* aporta otra evidencia de la conexión funcional existente entre los complejos THO y Thp1-Sac3, al no encontrar diferencias significativas entre ellos. El principal dato a tener en cuenta es la aparición de los snoRNA, moléculas cuya intensidad relativa varía en ambos mutantes. Los snoRNA son moléculas estables de RNA que se sintetizan en el núcleo y permanecen en él, constituyendo un ejemplo de moléculas que circulan intranuclearmente. En la célula existen formando parte de complejos RNP (snoRNPs). La biogénesis de los snoRNPs consiste en la síntesis de snoRNA y los componentes proteicos, el ensamblaje de los snoRNPs y la localización en el nucleolo. Estas moléculas se subdividen, funcional y estructuralmente, en dos grupos según que motivo lleven: C/D o H/ACA. Los snoRNA que se ven afectados en los fondos mutantes *tho2Δ* y *thp1Δ*, al igual que aquellos que están afectados, no comparten ninguna similitud conocida en cuanto a estructura o función. La función de las modificaciones llevadas a cabo por los snoRNAs no se conoce en detalle, pero probablemente ayudan en el plegamiento y ensamblaje de los rRNA, mediando las interacciones RNA-proteína o RNA-RNA. Cada modificación se realiza en una posición determinada en la molécula precursora. Estas posiciones son especificadas por un tipo de estos RNAs que hacen de guía, apareándose con la molécula precursora de rRNA y atrayendo de esta manera a distintas enzimas que modifican el RNA, mediante metilación de la ribosa o “pseudouridinización” de la base (U). Otros snoRNAs promueven el corte de la molécula precursora, probablemente causando cambios conformacionales. Últimamente se les están encontrando nuevas funciones, algunas de ellas extranucleolares (Filipowicz and Pogacic). Así, existen evidencias recientes que implican a los snoRNA en el procesamiento de los snRNA y mRNA (Terns and Terns, 2002; Kiss, 2002). Se ha sugerido que, en levaduras, el procesamiento de los pre-snoRNAs está acoplado al proceso de maduración de los intrones. En este procesamiento participan varias nucleasas, algunas de las cuales también participan en el procesamiento de rRNA, snRNA y pre-mRNA. Por otro lado se ha descrito que distintas proteínas relacionadas con los snoRNAs están implicadas en otros procesos como remodelación de la cromatina, transcripción, recombinación, traducción de señales y ciclo celular, probablemente, mediante interacciones de éstas con componentes de las maquinarias implicadas en estos procesos (King *et al.*, 2001).

Es difícil concluir algo acerca de estos resultados obtenidos en el “microarray” ya que el estudio se ha realizado en mutantes nulos, por lo que sería necesario repetir este experimento con mutantes puntuales. De manera que no podemos descartar que se trate de un fenotipo indirecto. Otra posible interpretación de estos resultados es que en *tho2Δ* y *thp1Δ* los snoRNAs son más inestables, debido a problemas en el procesamiento de los extremos 3' y 5' como ocurre en algunos mutantes del exosoma (van Hoof *et al.*, 2000). Este hecho podría repercutir en la síntesis de ribosomas ya que su maduración se vería afectada. Se ha descrito que mutantes de levadura deficientes en el ensamblaje o función de los ribosomas son sensibles a la higromicina B, interfiriendo en la interacción RNA-proteína. En este punto conviene recordar que los mutantes *tho2Δ* y *thp1Δ* son sensibles a este antibiótico.

III.6. El complejo Thp1-Sac3 se comporta como una unidad funcional

Nuestros resultados indican que el complejo Thp1-Sac3 se comporta como una unidad funcional, lo que se sugiere por los idénticos fenotipos observados en los mutantes *thp1Δ* y *sac3Δ*: defecto en la transcripción de la secuencia *lacZ*,

hiperrecombinación dependiente de transcripción y defecto en el transporte de mRNA (Figuras 5, 7, 13, 19; Gallardo *et al.*, 2003).

Existen algunas evidencias que sugieren un papel del complejo Thp1-Sac3 en el transporte de mRNA. Por un lado, Thp1-Sac3 interacciona genéticamente con factores implicados en el transporte de mRNA como Mex67, determinado por la letalidad de los dobles mutantes *thp1Δ mex67-5* y *sac3Δ mex67-5* (Figura 13, Gallardo *et al.*, 2003) e Yra1 (Fischer *et al.*, 2002). Por otro lado, la delección de *THP1* o *SAC3* provoca un fuerte defecto en el transporte de mRNA. Y por último, se ha descrito que Sac3 interacciona físicamente con Mex67-Mtr2 (mediante el extremo amino) y con el poro nuclear (mediante el extremo carboxilo) (Fischer *et al.*, 2002). Estos fenotipos de inestabilidad genómica asociada a la transcripción y al transporte de mRNA son idénticos a los observados en los mutantes del complejo TREX y los genes de transporte Mex67 y Mtr2 (Figuras 13, 19; Jimeno *et al.*, 2002). Nuestros resultados, por lo tanto, ponen de manifiesto que el complejo Thp1-Sac3 participa en el mismo proceso que TREX y Mex67-Mtr2.

En cualquier caso, nuestros resultados sugieren que TREX y Thp1-Sac3 son complejos diferentes, ya que hemos sido incapaces de detectar, mediante Western, una interacción física entre Thp1-Sac3 y Sub2/Mft1 (Figura 18). Sin embargo, hemos observado que la sobre-expresión de Sub2 provoca la letalidad de *thp1Δ*, indicando que Sub2 y Thp1-Sac3 podrían interaccionar funcionalmente. De hecho, se ha descrito que Sac3 copurifica, en pequeñas cantidades, con Sub2. Otras evidencias que apoyan esta posible interacción funcional son la similitud de fenotipos de transcripción y recombinación observados en los mutantes *thp1*, *sac3* y *sub2*, y la conexión física y funcional existente Sub2 y Yra1/Mex67 (Fan *et al.*, 2001; Strässer *et al.*, 2002; Jimeno *et al.*, 2002).

A diferencia de lo que ocurre con distintos factores de transporte de mRNA, la función de los complejos Thp1-Sac3 y THO no es esencial a 30°C. Llega a ser indispensable a 37°C o cuando se le suma la deficiencia de un factor implicado en el transporte de mRNA como se ha mostrado por los estudios de letalidad sintética de los dobles mutantes *hpr1/tho2/thp1/sac3 mex67-5*. La observación de que los mutantes *tho* y *thp1/sac3* no transportan mRNA poliadenilado a 37°C (Schneiter *et al.*, 1999, Strässer *et al.*, 2002; Figuras 13 y 19) podría indicar una implicación de estas proteínas en el metabolismo de mRNA. Sin embargo, aún no está claro si tal relación es directa, ya que estos mutantes no crecen a 37°C. Incluso si Thp1-Sac3 y el complejo THO son esenciales para el metabolismo del mRNA a una temperatura elevada, no se ha mostrado que este fenotipo esté asociado a los fenotipos de hiperrecombinación y transcripción que se observan a 30°C, temperatura a la que el transporte de mRNA no está afectado (Schneiter *et al.*, 1999; Strässer *et al.*, 2002; Figuras 13 y 19). Dado que el metabolismo de mRNA, incluyendo el procesamiento del extremo 5', la terminación de la transcripción, la incorporación de una cola de poli(A)⁺ y la eliminación de intrones, está estrechamente relacionado con la elongación de la transcripción (Bentley, 1999; Minvielle-Sebastia and Keller, 1999; Hirose and Manley, 2000), es probable que un defecto en la elongación de la transcripción también tenga consecuencias en distintos pasos del metabolismo del RNA, como el transporte de mRNA. Recientemente se ha descrito que el complejo THO, afectado en la elongación de la transcripción, se asocia a los ORFs que se están transcribiendo, junto con los factores de transporte Sub2 y Yra1 (Strässer *et al.*, 2002; Zenklusen *et al.*, 2002). Otros trabajos han reportado que Npl3,

otra proteína esencial para el transporte de mRNA, interacciona genéticamente con TBP, que Yra1 y Npl3 se une a la cromatina de una manera dependiente de transcripción (Lei *et al.*, 2001), que el ortólogo humano de Yra1, ALY, afecta la activación de la transcripción (Bruhn *et al.*, 1997) y que un bloqueo en el transporte de mRNA provoca la acumulación de poli(A)⁺ en el sitio de transcripción (Jensen *et al.*, 2001).

III.7. Mutaciones en *THP1*, *SAC3* y *NAB2* provocan un defecto en el transporte de mRNA

Durante el transporte de mRNA, la mayoría de las moléculas de mRNA se asocian a ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares, hnRNPs, y de esta manera son transportadas al citoplasma a través del complejo del poro nuclear (NPC). Nab2 es una proteína tipo hnRNP que se asocia *in vivo*, de manera específica, al RNA poliadenilado (Anderson *et al.*, 1993). Se ha descrito que está implicada en el control de la longitud de la cola de poli(A)⁺ y en el transporte de mRNA (Green *et al.*, 2002; Hector *et al.*, 2002). En este estudio hemos observado que la sobreexpresión de *NAB2* suprime los defectos de transcripción y transporte de mRNA de *thp1Δ* (Figuras 15-16) y que *nab2-1*, al igual que *thp1Δ* y *sac3Δ*, confiere un defecto en la transcripción de *lacZ* y un fenotipo de hiperrecombinación (Figura 16-17). Estos datos sugieren que Nab2 tiene un papel en el mismo proceso biológico en el que participa Thp1-Sac3, probablemente, en algún paso intermedio entre la transcripción y el transporte de mRNA.

Aunque aún no se conocen en detalle los mecanismos moleculares que controlan el transporte del mRNA, es probable que las proteínas unidas al mRNA sirvan de adaptadores para los factores de transporte. Acto seguido, la unión de las hnRNPs a distintos receptores media la llegada de estas partículas al NPC (Cole, 2000; Linder and Stutz, 2001; Ryan and Wentz, 2000; Strässer and Hurt, 1999; Zenklusen and Stutz, 2001). En la mayoría de los casos, las proteínas que contienen la secuencia NES son proteínas de unión a RNA que actúan como adaptadores. Curiosamente, Thp1, al igual que Mex67, contiene al menos una secuencia NES rica en leucina (LNYMIPTGLIL). Este dato, junto con todas las observaciones previas (Figuras 13, 18, 19), podría indicarnos que el defecto en el transporte de mRNA asociado a la ausencia de Thp1-Sac3 podría deberse a la incapacidad de la maquinaria de transporte de usar este complejo como un adaptador molecular para conducir el complejo mRNA-hnRNP al poro nuclear. El hecho de que Nab2 pueda suprimir el defecto de Thp1-Sac3 sugiere que un exceso de Nab2 puede sustituir la ausencia de Thp1-Sac3 mediante una vía alternativa para el transporte de mRNA.

La relación funcional del complejo Thp1-Sac3 con la expresión génica y el metabolismo de mRNA está de acuerdo con nuestras observaciones de que la proteína His(6)-HA-Thp1 purificada de *E. coli* se asocia con el RNA *in vitro* (Figura 14). Además, la capacidad de Thp1 de unir dsDNA podría sugerir también una interacción de este complejo, al menos en algún momento, con el mRNA naciente durante la transcripción. Estos factores pueden actuar secuencialmente en el mRNA naciente (Figura 27). Algunos de ellos pueden ser parcialmente intercambiables o actuar de manera cooperativa. No sabemos si Thp1-Sac3 interacciona con el mRNA durante la transcripción o después, pero es posible que la función de Thp1-Sac3 sea relevante en los últimos pasos, durante el transporte de mRNA. Llegado este punto, sería interesante comprobar si el complejo Thp1-Sac3, tal y como ocurre con THO, se asocia físicamente

CONCLUSIONES

1. En esta tesis hemos identificado un nuevo gen, *THP1*, cuya delección confiere un fuerte incremento en la frecuencia de recombinación entre repeticiones directas (>2000 veces sobre los niveles del silvestre).
2. La ausencia de Thp1 produce un defecto en la transcripción de genes de levadura y, en particular, de secuencias de DNA como la correspondiente al gen bacteriano *lacZ*.
3. Estos fenotipos de hiperrecombinación y defecto en la transcripción observados en el mutante *thp1Δ* son idénticos a los descritos en los mutantes del complejo THO. Como ocurre en ellos, la hiperrecombinación en *thp1Δ* es dependiente de la elongación de la transcripción. Si se impide la transcripción del sistema de recombinación, no detectamos tal fenotipo de hiperrecombinación.
4. Thp1-Sac3, THO y Paf1-Cdc73 son complejos independientes aunque están relacionados funcionalmente.
5. El complejo proteico Thp1-Sac3 se comporta como una unidad funcional lo que se sugiere por los idénticos fenotipos observados en los mutantes *thp1Δ* y *sac3Δ*: defecto en la transcripción de la secuencia *lacZ*, hiperrecombinación dependiente de transcripción y defecto en el transporte de mRNA
6. Thp1-Sac3 y Nab2 están relacionados funcionalmente y que actúan en el mismo proceso biológico que TREX y Mex67-Mtr2, conectando la transcripción y el metabolismo de mRNP mediante un proceso que afecta a la estabilidad genómica.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

1.1. Medios de cultivo para levaduras:

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

Medio rico YEPGal: Idéntico al medio YEPD pero con 2% de galactosa en lugar de glucosa como fuente de carbono.

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 y lisina y con las bases nitrogenadas adenina y uracilo a las concentraciones finales descritas por Sherman *et al.* (1986). Se especifican aquellos casos en los que uno o más de estos requerimientos se ha omitido del medio. Por ejemplo; SC-leu indica *medio completo sin leucina*.

Medio completo SGal: Idéntico al medio SC pero con 2% de galactosa en lugar de glucosa como fuente de carbono. La galactosa se filtró y se añadió al resto de los componentes una vez autoclavados.

Medio completo SG/L: Idéntico al medio SC pero con 3% de glicerol y 2% de lactato sódico en lugar de glucosa como fuente de carbono. El glicerol se filtra y se añade al resto de los componentes una vez autoclavados.

Medio SC+Can: Medio SC suplementado con 60 mg/l de L-sulfato de canavanina (Can) añadida al medio una vez autoclavado.

Medio SC+FOA: Medio SC suplementado con 500 mg/l de ácido 5-fluoro-orótico (FOA), con el uracilo a la mitad de la concentración habitual, es decir, a 10 mg/l, y 0.1% de L-prolina en lugar de sulfato amónico como fuente de nitrógeno.

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 la mitad de la concentración.

1.2. Medios de cultivo para bacterias:

Medio LB: 0.5% de extracto de levaduras; 1% de bacto-triptona; 1% de NaCl.

Medio LB+Amp: Consiste en el medio LB suplementado con 70 mg/L de ampicilina sódica (Amp).

Medio SOB: 0.5% de extracto de levadura; 2% de bacto-triptona; 0.005% de NaCl; KCl 2.5 mM; MgSO₄ 10 mM; MgCl₂ 10 mM. El MgSO₄ y el MgCl₂ se añaden al medio justo antes de usarlo.

Los medios sólidos se prepararon añadiendo 2% de agar a los medios descritos antes

de autoclavarlos.

1.3. Condiciones de crecimiento.

Las estirpes de levadura se incubaron a una temperatura de 30°C, excepto en aquellos casos en los que se indique. Las estirpes de bacterias se incubaron a una temperatura de 37°C, excepto en aquellos casos en los que se indique. En el caso de los cultivos líquidos estos se incubaron con agitación constante horizontal u orbital. Para hacer que las estirpes diploides de levadura esporularan, estas se incubaron a temperatura ambiente durante 3-4 días.

2. ANTIBIÓTICOS, DROGAS, ENZIMAS, INHIBIDORES Y MARCADORES DE TAMAÑO.

- Ácido 5-fluoroorótico, FOA (USB): análogo tóxico del uracilo que sólo permite el crecimiento de los mutantes *ura3* (Boeke et al. 1984).
- Albúmina de suero bovino, BSA (New England): proteína que se obtiene de suero bovino. Se emplea como estabilizador y agente tamponador.
- Ampicilina, amp (Sigma): antibiótico β -lactámico que inhibe la división celular de *E. coli* impidiendo la síntesis de pared celular. Se usa para seleccionar bacterias que lleven un plásmido.
- 6-Azaauracilo, 6AU (Sigma): produce un descenso de los niveles de UTP y GTP causando una reducción en la eficiencia de la elongación de la transcripción.
- Aprotinina (USB): polipéptido básico de pulmón bovino con actividad inhibitoria de proteasas polivalentes.
- BCIP/NBT (Stratagene): sustratos colorimétricos de la fosfatasa alcalina. La actividad fosfatasa se detecta como un precipitado azul-púrpura, resultado de desfosforilación y posterior oxidación de BCIP a índigo, acoplada a la reacción de NBT a diformazon.
- Blanco de calcofuor: droga que interfiere en el ensamblaje de la pared celular uniéndose a las cadenas de quitina (Elorza et al. 1983).
- Benzamidina (Sigma): inhibidor por competición de proteinasas de serina tipo tripsina, incluyendo trombina y plasmina.
- Cafeína (Sigma): sustancia alcaloide (metilxantina) que inhibe la síntesis de la pared celular.
- DNasa I libre de RNAsas: endonucleasa específica de DNA bicatenario utilizada para degradar el DNA preservando la integridad del RNA.
- Fosfatasa alcalina (Roche): glicoproteína dimérica capaz de eliminar los grupos fosfatos de los extremos 5' del DNA bicatenario impidiendo así 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 kanamicina (*kan*).
- Higromicina B (Roche): antibiótico aminoglicosídico que inhibe la síntesis de proteínas en procariontes y eucariotes.
- IgG Sepharose 6 Fast Flow (Pharmacia Biotech): inmunoglobulina G humana conjugada covalentemente a una matriz de sefarosa con afinidad a la proteína A.
- Inhibidor de ribonucleasas (RNAguard / Amersham): Inhibidor no competitivo que actúa uniéndose de forma no covalente a RNAsas de tipo-A.
- 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 and Henningsen, 1970).

- Leupeptina (Sigma): inhibidor de proteasas de serina y cisteína. Inhibe la acción de plasmina, tripsina, papaína y catepsina B.
- Ligasa de DNA del fago T4 (Roche): cataliza la unión covalente de extremos lineales de DNA bicatenario (Weiss *et al.*, 1968).
- Marcador de tamaños de DNA (1 Kb Plus DNA ladder/ Gibco-BRL): mezcla de fragmentos bicatenarios de DNA cuyos tamaños son: 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1.65, 1.0, 0.85, 0.65, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 y 0.1 kb. La banda de 1650 pb se generó de pUC y las bandas menores de 1000 pb de DNA de λ .
- Pepstatina (USB): inhibidor de proteasas. Actúa formando un complejo con las carboxilproteasas quimiosina bobina, catepsina D, pepsina, proteasa B y renina.
- PMSF (Sigma): (phenylmethanesulfonyl fluoride) inhibidor de proteasas de serinas (tripsina y quimiotripsina) y de cisternas.
- Polimerasa termoestable de DNA (Expand High Fidelity PCR System/Roche): Mezcla de las polimerasas Taq (*Thermus aquaticus*) y Pwo (*Pyrococcus woesei*) usadas en las reacciones encadenadas de polimerización de DNA o PCRs. Temperatura óptima de elongación, 68°C.
- Polimerasa termoestable de DNA (Biotools DNA polimerasa/Biotools): Polimerasa Tth (de *Thermus thermophilus*) usadas en las reacciones encadenadas de polimerización de DNA o PCRs. Temperatura óptima de elongación, 72°C.
- Polimerasa de RNA del fago T7: Polimerasa de RNA capaz de reconocer únicamente el promotor del fago T7.
- Proteinasa K: endoproteinasa inespecífica capaz de degradar proteínas hasta el nivel de aminoácidos.
- Quimiostatina (SIGMA): inhibidor específico de α , β , γ y δ quimiotripsina.
- Restrictasas (Amersham, Roche y New England): endonucleasas de DNA con dianas específicas de secuencia.
- RNasa (Roche): mezcla de nucleasas de RNA aisladas del páncrea de vacas.
- Transferasa terminal (ROCHE): enzima capaz de sintetizar colas de un mismo dNTP utilizando el extremo 3' de DNA mono- o bicatenario.
- TEV proteasa (Invitrogen): proteasa recombinante específica de sitio purificada de *E.coli*. Es capaz de cortar entre los aminoácidos Gln y Gly que se encuentren en la secuencia Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly(1-4).
- X-gal (SIGMA): (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactósido) Sustrato de la β -galactosidasa que origina un precipitado de color azul en presencia de esta enzima.
- Zymoliasa 20T y 100T (USB): mezcla de enzimas de *Arthrobacter luteus* con capacidad de digerir la pared celular de *S. cerevisiae*.

3. ESTIRPES

3.1. *Escherichia coli*

- **DH5 α** : *F-endA1 gyrA96 hsdR17 Δ lacU169(ϕ 80lacZ Δ M15) recA1 relA1 supE44 thi-1* (Hanahan, 1983).
- **BL21(DE3)**: *F-ompT hsdS (r_B m_B⁻) lysE*. Contiene el gen que codifica para la RNA polimerasa del fago T7 bajo control del promotor *lacUV5* integrado en el cromosoma (Studier and Moffatt, 1986)

Salvo que se indique lo contrario, los experimentos en *E. coli* se realizaron con DH5 α .

3.2. *Saccharomyces cerevisiae*

Las cepas de esta tesis se construyeron por métodos genéticos de cruzamiento o de reemplazamiento génico. Los reemplazamientos génicos se realizaron por el método SFH (Short Flanking Homology Method). Se comprobaron por PCR usando oligos externos a la zona reemplazada y por Southern Blot.

Las estirpes de levadura utilizadas se muestran en la tabla 1.

TABLA 1. Estirpes de levadura

Estirpe	Genotipo	Fuente
W303-1A	<i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i>	(1)
W303-1B	<i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i>	(1)
U768-4C	<i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 hpr1Δ3::HIS3</i>	(1)
AYW3-1B	<i>MATα ade2 can1-100 his3 trp1 ura3 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k</i>	(2)
AYW3-3C	<i>MATα ade2 can1-100 his3 ura3 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k hpr1Δ3::HIS3</i>	(3)
SSAB-2C	<i>MATα ade2 his3 ura3 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k hrs1Δ::LEU2</i>	(2)
F4	<i>MATa thr4</i>	(4)
F15	<i>MATa thr1 arg4</i>	(4)
WRK5-1C	<i>MATα ade2 can1-100 his3 trp1 ura3 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k tho2Δ::LEU2</i>	(5)
RK2-6C	<i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 tho2Δ::KAN</i>	(5)
RK2-6D	<i>MATα ade2-1 can1-100 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 tho2Δ::KAN</i>	(5)
SChY58a	<i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 hpr1Δ::KAN</i>	(6)
WNOS032	<i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 med2Δ::KAN</i>	
WFBE046	<i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 thp1Δ::KAN</i>	(7)
WFBE030	<i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 trf4Δ::KAN</i>	
MGY2-1C	<i>MATa ade2 his3 trp1 ura3 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k hrs1Δ::LEU2 thp1Δ::KAN</i>	(7)
MGY3-2D	<i>MATα ade2 can1-100 his3 trp1 ura3 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k thp1Δ::KAN</i>	(7)
MGY3-3B	<i>MATα ade2 can1-100 his3 trp1 ura3 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k hpr1D::HIS3 thp1Δ::KAN</i>	(7)
MGY6-1A	<i>MATα ade2 can1-100 his3 trp1 ura3 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k thp1Δ::KAN</i>	(7)
MGY6-1D	<i>MATa ade2 can1-100 his3 ura3 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k tho2D::KAN thp1Δ::KAN</i>	(7)
MGY6-4A	<i>MATa ade2 can1-100 his3 ura3 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k tho2Δ::KAN thp1Δ::KAN</i>	(7)
MGY6-4D	<i>MATα ade2 can1-100 his3 trp1 ura3 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k thp1Δ::KAN</i>	(7)
ACY429	<i>MATα his3 leu2 trp1 ura3 nab2Δ::HIS3 pAC636</i>	(9)
NAL-2B	<i>MATa ade2 his3 trp1 ura3 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k</i>	(8)
NAL-3A	<i>MATα ade2 his3 leu2 trp1 ura3</i>	(8)

NAL-3B	<i>MATa ade2 his3 trp1 ura3 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k</i>	(8)
NAL-5B	<i>MATα ade2 his3 trp1 ura3 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k nab2Δ::HIS3 pAC1038</i>	(8)
NAL-11B	<i>MATa his3 leu2 trp1 ura3 nab2Δ::HIS3 pAC1038</i>	(8)
NAL-30A	<i>MATa ade2 his3 trp1 ura3 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k nab2Δ::HIS3 pAC1038</i>	(8)
WMCI-1A	<i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i>	(11)
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	(10)
BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	(10)
YLR418c	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 cdc73Δ::KAN</i>	(10)
YBR279w	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 paf1Δ::KAN</i>	(10)
YDR138w	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 hpr1Δ::KAN</i>	(10)
YOL072w	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 thp1Δ::KAN</i>	(10)
WMCD-5A	<i>MATa ade2 his3 leu2 lys2 trp1 ura3 cdc73ΔKAN</i>	(8)
WMCD-1B	<i>MATα ade2 his3 leu2 lys2 trp1 ura3</i>	(8)
WMCD-1A	<i>MATa ade2 his3 leu2 lys2 trp1 ura3 cdc73ΔKAN mex67-5</i>	(8)
WMCD-5B	<i>MATa ade2 his3 leu2 lys2 trp1 ura3 cdc73ΔKAN mex67-5</i>	(8)
WMP-3B	<i>MATa ade2 his3 leu2 lys2 trp1 ura3</i>	(8)
WMP-3C	<i>MATα ade2 his3 leu2 lys2 trp1 ura3 paf1ΔKAN</i>	(8)
WMCA-1C	<i>MATα ade2 his3 lys2 trp1 ura3 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k</i>	(8)
WMCA-2D	<i>MATα ade2 his3 lys2 trp1 ura3 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k cdc73Δ::KAN</i>	(8)
WMCA-6A	<i>MATα ade2 his3 trp1 ura3 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k cdc73Δ::KAN</i>	(8)
WMCA-8A	<i>MATα ade2 his3 trp1 ura3 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k cdc73Δ::KAN</i>	(8)
WMCD-3D	<i>MATa ade2 his3 lys2 trp1 ura3 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k cdc73Δ::KAN</i>	(8)
WMPW-1A	<i>MATα ade2 his3 trp1 ura3 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k paf1Δ::KAN</i>	(8)
WMPW-1C	<i>MATα ade2 his3 trp1 ura3 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k</i>	(8)
WMPW-3C	<i>MATα ade2 his3 trp1 ura3 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k paf1Δ::KAN</i>	(8)
WMPW-5C	<i>MATa ade2 his3 trp1 ura3 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k paf1Δ::KAN</i>	(8)
WMPW-5D	<i>MATa ade2 his3 trp1 ura3 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k paf1Δ::KAN</i>	(8)
PS593	<i>MATa leu2 trp1 ura3</i>	(12)
371-5C-4C-1D	<i>MATa leu2 trp1 ura3 pkc1^h</i>	(12)

(1) R. Rothstein; (2) Santos-Rosa et al., 1996; (3) Santos-Rosa y Aguilera, 1995; (4) G. Fink; (5) Piruat y Aguilera, 1998; (6) Chavez et al., 2001; (7) Gallardo y Aguilera, 2001; (8) Esta tesis; (9) Green *et al.*, 2002; (10) EUROSCARF; (11) Jimeno *et al.*, 2002; (12) Neiman *et al.*, 1997

4. PLÁSMIDOS

YEp13: plásmido multicopia con el gen *LEU2* como marcador (Botstein *et al.*, 1979).

pYA301: Plásmido pBR322 con el gen *ACT1* (Galtwitz y Sures, 1980).

YEp351: Vector episómico basado en pUC18 que contiene el gen *LEU2* (Hill *et al.*, 1986).

pFA6akanMX4: Vector de *E.coli* portador de un módulo kanMX que contiene el ORF del gen kan^r del transposón Tn903 fusionado con el promotor y el terminador del gen *TEF* de *Ashbya gossypii*. El casete kanMX confiere resistencia a kanamicina en *E.coli* y a G418 en *S.cerevisiae*.

pBSK⁺: Vector de *E.coli* derivado de pUC19 (Broach *et al.*, 1979).

pRS306: Vector integrativo que contiene el gen *URA3* (Sikorski y Hieter, 1989).

pRS314, pRS315 y pRS316: Vectores centroméricos que contienen los genes *TRP1*, *LEU2* y *URA3* respectivamente (Sikorski y Hieter, 1989).

pRS314L, LY y SU: pRS314 con los sistemas L, LY y SU. Cada sistema contiene los alelos *leu2Δ3'* y *leu2Δ5'* repetidos en orientación directa (L, LY) o inversa (SU). El alelo *leu2Δ3'* es un fragmento *ClaI-SalI* de 1,4 kb del gen *LEU2* y el alelo *leu2Δ5'* es un fragmento *EcoRV-BglII* de 1,9 kb del gen *LEU2* proveniente del YEp13. La región de homología entre ambas repeticiones es de 600 pb. Los sistemas L y LY se diferencian por el fragmento de DNA comprendido entre las repeticiones: mientras que el sistema L no tiene nada, el LY tiene un fragmento de 5,5 kb (Prado y Aguilera, 1995).

pRS314-LYΔNS: Plásmido pRS314-LY con el fragmento *SphI-NsiI* de 1.92 kb delecionado.

pRS313L, LY y SU: pRS313 con los sistemas L, LY y SU.

pRS316L, LY y SU: pRS316 con los sistemas L, LY y SU.

pRS314-LNA: pRS314-L con el fragmento *BamHI*-SmaI** de 2,16kb de YIp5 insertado en *NruI*, dejando la diana *SmaI* distal a la repetición *leu2Δ3'*.

pRS314-LNAT: pRS314-LNA con el terminador transcripcional *CYCI* de 0,3 kb de pBS-CYCT (Prado *et al.*, 1996) insertado en la diana *HindIII* localizada entre las repeticiones.

pBKGAL1: Plásmido pBluescriptII-SK(-) (Stratagene) que contiene el fragmento *EcoRI* de 2.023 Kb de la región 5' del gen *GALI* (F. Prado).

p314LB: Plásmido YCp basado en *TRP1*, que lleva dos repeticiones directas "en tandem" de 600 pb del gen *LEU2* (Prado y Aguilera, 1995).

p314GLB: p314LB en el que la región *SacI-ClaI* de 1.22 kb correspondiente al promotor y a la zona 5' del gen *LEU2* ha sido sustituida por el fragmento *SacI-ClaI* de p414GLEU2 que contiene el promotor del gen *GALI* y la zona 5' del gen *LEU2* (S. González-Barrera).

p314GLlacZ: p314GLB con el fragmento *Bam*HI de 3.0 kb de pPZ que contiene el gen *lacZ* subclonado en *Bgl*II, entre las repeticiones de *LEU2* (S. González-Barrera).

pSCh204: pRS314 con la construcción *L-lacZ* que lleva el gen *LacZ* de 3 kb de *E. coli* entre las repeticiones directas de *LEU2* (Chávez y Aguilera, 1997).

pSCh206: pRS314 con la construcción *L-PHO5* que lleva un fragmento de 1,5 kb del gen *PHO5* de *S. cerevisiae* entre las repeticiones directas de *LEU2* (Chávez y Aguilera, 1997).

p416GAL1lacZ: pRS416 con el gen *lacZ* de *E. coli* bajo el control del promotor del gen *GAL1* (Mumberg *et al.*, 1994).

pSCh202: p416GAL1lacZ con la región codificante del gen *PHO5* en lugar de *lacZ*, fusionada al promotor de *GAL1* (Chávez y Aguilera, 1997).

pSG206: pSCh206 en el que la región *SacI-ClaI* del promotor del gen *LEU2* de 1,22 kb ha sido reemplazada por el fragmento *SacI-ClaI* de 0,62 kb del p414GLEU2 que contiene el promotor *GAL1*.

pSCh212: pSCh202 con el gen *lacZ* fusionado al gen *PHO5* (Chávez y Aguilera, 1997).

pSUP38: YEp351 con el fragmento genómico *Sau3A* de 7.3 kb que contiene el gen *THO2* insertado en la diana *SalI* (Piruat and Aguilera, 1998).

YEp351-SUB2: YEp351 con el fragmento genómico *Sau3A* de 8 kb que contiene el gen *SUB2* insertado en la diana *SalI* (Jimeno *et al.*, 2002).

pSUP4: YEp351 con el fragmento genómico *Sau3A* de 7.5 kb que contiene el gen *THO1* insertado en la diana *SalI* (Piruat and Aguilera, 1998).

pSUP402: YEp351 con el fragmento *PstI-XbaI* de 2.2 kb de pSUP4 insertado en *PstI-XbaI* (Piruat and Aguilera, 1998).

pSUP1.9: YEp351 con el fragmento genómico *Sau3A* de 6.2 kb que contiene el gen *NAB2* insertado en la diana *SalI*.

YEp351-NAB2: YEp351 con la región codificante de *NAB2* (2.4 kb) amplificada por PCR con los oligos NAB2A (*SmaI*) y NAB2B (*SmaI*) clonada en la diana *SmaI* del polilinker.

pUG34: Plásmido centromérico basado en *HIS3* que contiene el gen de la proteína fluorescente verde (*yEGFP*) bajo el promotor de *MET25* y un sitio de clonación múltiple en el extremo amino-terminal de la GFP (J. Hegemann, Dusseldorf, Alemania).

pUG34-T3: pUG34 con la región codificante del gen *THP1* (1.4 kb) amplificado por PCR con los oligos THO3-3'(*XhoI*) y THO3-5'a(*EcoRI*) clonada en las dianas *XhoI-EcoRI* del polilinker.

pUG34-T2: pUG34 con la región codificante del gen *THO2* (4.8 kb) amplificado por PCR con los oligos TH2H3'(*XhoI*) y TH2H5'(*XhoI*) clonada en la diana *XhoI* del polilinker.

pBS1539: Plásmido de expresión en *E. coli* que contiene el casete Proteína A-CBP necesario para la purificación por afinidad (TAP). Basado en pBS1479 (Rigaut *et al.*, 1999) que contiene el marcador URA3 de *Kluyveromyces lactis* en lugar de TRP1.

pT7-7(His)₆: Plásmido de expresión en *E. coli* basado en pT7-7 (Tabor y Richardson, 1985). Contiene el promotor inducible de la polimerasa de RNA del fago T7, una secuencia que codifica 6 residuos de histidinas en fase con el codón de iniciación de la transcripción y una región de clonación múltiple (MCS) (Santos-Rosa *et al.*, 1996).

pT7-HA-THP1: Plásmido pT7-7(His)₆ con el fragmento HA-Thp1 de 1.4 kb cortado con las enzimas *NheI*- *ClaI* y clonado en las mismas dianas del polilinker. En primer lugar se amplificó por PCR el gen *THP1* con los oligos 5THP1-HA y 3THP1-HA que llevaban las dianas de restricción *NheI* y *ClaI* respectivamente. De esta manera se obtuvo la secuencia del epítipo HA fusionado en al extremo 5' de *THP1*. Este fragmento *NheI-ClaI* que contiene la fusión HA-Thp1 se clonó en el vector pT7-7 que lleva 6 histidinas (pT7-7-(His)₆).

pYCG_YOL072w: pRS416 con la región codificante de THP1 (Iwanejko *et al.*, 1999).

pCM184-LAUR: Plásmido con la fusión *LacZ*-URA3 obtenida de pNKY59 (Alani *et al.*, 1987) por PCR y clonada en el polilinker de pCM184 bajo el promotor Tet.

pAC636: Plásmido centromérico basado en URA3 con la región codificante de *NAB2* (Green *et al.*, 2002).

pAC1038: Plásmido centromérico basado en LEU2 con la mutación puntual *nab2-1* (Green *et al.*, 2002).

*romizado

5. GENOTECAS

MW90: YE_p351 con fragmentos *Sau3A* de DNA genómico de *S. cerevisiae* clonados en *SalI* (Waldherr *et al.*, 1993). Previamente a la ligación se rellenaron parcialmente con klenow las dianas *SalI* y *Sau3A* usando dCTP+dTTP con el vector y dATP+dGTP con los insertos.

6. ANALISIS GENÉTICO EN LEVADURA

Las estirpes parentales se cruzaron mezclando biomasa de ambas en YEPD sólido e incubando a 30°C. Los diploides se aislaron mediante selección o micromanipulando los cigotos y se hicieron esporular en medio SPO. Las ascas se diseccionaron tras un tratamiento con zimoliasa 20T a 2 mg/ml en agua durante 2 min a temperatura ambiente y se micromanipularon con un micromanipulador SINGER MSM system series 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 estirpes de sexos α y α (F4 y F15 respectivamente).

7. REEMPLAZAMIENTO GÉNICO EN LEVADURAS

La estirpe original se transformó con DNA lineal con zonas terminales de homología al gen a reemplazar (Orr-Weaver *et al.*, 1981; Rothstein, 1991) y se seleccionó el fenotipo

deseado. En el caso de usar el método de SFH (Short Flanking Homology) se procedió según Wach *et al.* (1994). A partir del plásmido pFA6akanMX4 se amplificó mediante PCR el casete kanMX4, que confiere resistencia a G418, flanqueado por dos secuencias terminales de 40 pb homólogas al gen que se desea reemplazar (ver Figura 33). Este fragmento se usó para transformar levaduras seleccionando en YPAD+G418.

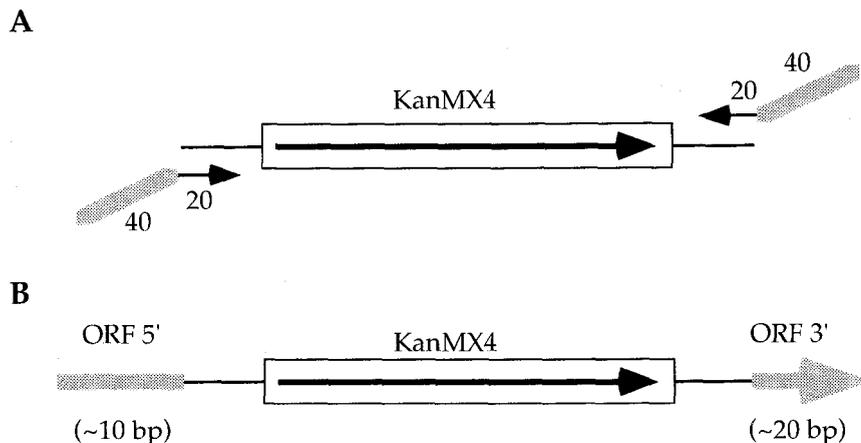


Figura 28 . Esquema del reemplazamiento génico por SFH

(A) Molde portador del casete kanMX4 usado en la PCR y oligonucleótidos híbridos de 60 nt (los 20 nt 3' son homólogos al vector y los 40 nt 5' son homólogos al gen a reemplazar). (B) Producto del reemplazamiento. Las flechas del casete y del ORF representan el sentido de la transcripción. Los números entre paréntesis son los pares de bases no eliminados del ORF original. Las líneas negras representan DNA del vector y las líneas grises DNA del gen de levaduras.

8. SISTEMAS GENÉTICOS DE RECOMBINACIÓN

8.1. Sistemas plamídicos

Los sistemas L, LY, SU, LYΔNS, LNA, LNAT, *LlacZ* y LPHO5 se describen con los plásmidos portadores de los mismos. (Ver apartado 4: PLÁSMIDOS).

8.2. Sistema cromosómico: sistema *leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k*

Localizado en el cromosoma III (Aguilera y Klein, 1989a). Consiste en una repetición directa del fragmento *Sall-XhoI* de 2.16 kb del gen *LEU2* que contiene el alelo mutante *leu2-k*. Este alelo es una deleción de 7 pb que elimina la diana de restricción de la enzima *KpnI*. Entre las repeticiones hay un fragmento de 11 kb que contiene los marcadores *ADE2* y *URA3*. Este sistema permite estudiar deleciones (Ura-).

9. DETERMINACIÓN DE LAS FRECUENCIAS DE RECOMBINACIÓN

Se determinaron a partir de 6 colonias independientes aisladas en YEPD o en los medios mínimos oportunos (Aguilera y Klein, 1988). Se estimó la proporción de recombinantes sembrando las diluciones oportunas en los medios adecuados para seleccionar los recombinantes y para calcular el número de células viables totales. La frecuencia de recombinación se calculó como la mediana de las proporciones de recombinantes en las 6 colonias analizadas.

10. TRANSFORMACIONES

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

10.1.1. Método del TB.

Se realizó siguiendo el método descrito por 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 $D.O._{600nm} = 0.5$. Tras enfriar las células durante 10 min en hielo, se recogieron por centrifugación a 4000 r.p.m. (2500 g) a 4°C 10 min. Se resuspendió el sedimento en 20 ml de TB. Se añadió $MnCl_2$ hasta 55 mM (esterilizado por filtración) a 0°C, se añadieron otros 60 ml de TB frío y se incubó 10 min en hielo. Se recogieron las células por centrifugación y se resuspendieron en 20 ml de TB a 0°C. Se añadió 1,5 ml de DMSO (dimetilsulfóxido) y se mantuvieron 10 min más en hielo. Se hicieron alícuotas, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

TB: 10 mM Pipes (ácido libre); 15 mM $CaCl_2$; 250 mM KCl; llevado a pH 6.7 con KOH

10.1.2. Método del TSS.

Se realizó siguiendo el método descrito por Cheng *et al.*, 1989, con pequeñas variaciones. Un cultivo saturado de la estirpe receptora se diluyó 100 veces en medio LB y se incubó a 37°C con agitación hasta fase exponencial temprana. Se repartieron alícuotas de 1 ml en tubos eppendorf. Se enfriaron en hielo y se centrifugaron 30 s en una microcentrífuga. Se retiró el sobrenadante y se añadieron 75 μ l de LB frío. Se incubó en hielo 5 min. Se añadieron 75 μ l de medio 2xTSS frío y se incubó en hielo otros 5 min. Las células competentes así realizadas perdían su eficiencia al ser congeladas por lo que era conveniente transformarlas recién hechas.

2xTSS: 0,8% triptona; 0,5% extracto levadura; 85,5 mM NaCl; 25mM polietilenglicol 8000; 10% DMSO, 100mM $MgSO_4$; pH 6.2-6.8

10.2. 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 min. A continuación se sometieron las células a un choque térmico de 42°C durante 35 s, tras lo cual se añadió 1 ml de LB y se incubaron durante 45 min a 37°C antes de recogerlas por centrifugación y sembrarlas en LB+Amp 80 μ g/ml.

10.3. Transformación de levaduras

Se realizó siguiendo el método descrito por Ito *et al.* (1983) y modificado por Schiestl y Gietz (1989). Las células competentes se obtuvieron a partir de cultivos de *S. cerevisiae* incubados en YEPD hasta una densidad $D.O._{600nm} = 0.4-0.6$. Las células se recogieron por centrifugación y se lavaron con H_2O y con LiAc-TE 1X (preparada en el momento). Finalmente se resuspendieron en un vol de LiAc-TE 1X hasta una concentración final de 2×10^9 células/ml. Para transformar se mezclaron 50 μ l de células, 50-1000 ng de DNA transformante, 5 μ l de DNA de espermatozoos de salmón a 10 mg/ml y 300 μ l de PEG 40% (preparado en el momento). Tras incubación durante 30 min a 30°C con agitación, se sometieron las células a un choque térmico de 42°C durante 20 min y se sembraron en el medio oportuno.

LiAc-TE 1X: a partir de TE 10X (0.1 M Tris-HCl, 0.01 M EDTA pH7.5) y 1 M LiAc (10X) pH7.5
PEG 40%: 50% PEG-4000, TE 10X y LiAc 10X.

11. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

11.1. Preparación de DNA plasmídico de *E. coli*

11.1.1. Protocolo de lisis alcalina

Se realizó siguiendo en el método descrito por Bolivar y Backman (1979). De 1.5 ml de cultivo, se recogieron las células por centrifugación y se resuspendieron en 100 μ l de solución I. Tras 5 min a temperatura ambiente se añadieron 200 μ L de solución II, se mezcló invirtiendo el tubo varias veces y se incubó durante 5 min en hielo. Seguidamente se añadieron 150 μ l de solución III. De nuevo se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 min. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación y el sobrenadante se fenolizó con 50 μ l de fenol y 400 μ l de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). El DNA presente en la fase acuosa se precipitó con NaCl 0.3 M y 0.9 ml de etanol 96%, se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 50 ml de TE 1X.

Solución I: 50 mM Glucosa; 25 mM Tris-Cl pH8.0; 10 mM EDTA pH8.0

Solución II: 0.2 M NaOH; 1% SDS

Solución III: 3 M KAc; 11.5% ácido acético glacial

11.1.2. Protocolo de gradiente de CsCl

Se preparó DNA a gran escala por centrifugación del DNA en gradiente de CsCl siguiendo el protocolo descrito por Clewell y Helinski (1970). Se partió de un cultivo de 400 ml, del cual se recogieron las células por centrifugación. Las células se lavaron con 20 ml de Tris-HCl 10 mM EDTA 1 mM pH7.4 y se resuspendieron en 2 ml de Solución A. Seguidamente, se añadieron 0.2 ml de lisozima 10 mg/ml y 0.2 ml de ribonucleasa 1 mg/ml, y se incubaron 5 min en hielo, tras los cuales se añadieron 0.4 ml de EDTA 0.5 M pH8.0 y se incubaron de nuevo en hielo durante 10 min. Pasado este periodo se añadieron 4 ml de Solución de rotura y se incubaron en hielo durante 15 min. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación y el DNA plasmídico se purificó del sobrenadante por centrifugación en gradiente de CsCl. Para obtener el gradiente de CsCl se disolvieron en 4.1 ml del sobrenadante, 4 g de CsCl, 0.2 ml de EDTA 50 mM pH8.0 y 0.2 ml de bromuro de etidio (EtBr) 10 mg/ml. Esta solución se centrifugó para eliminar posibles restos celulares y se pasó a tubos Quick-Seal de 5.1 ml (BECKMAN) para rotor VTi65 (BECKMAN) y se centrifugaron a 50000 r.p.m. durante 12-16 h a 20°C en una ultracentrífuga BECKMAN modelo Optima L-70. La banda correspondiente en el gradiente al DNA plasmídico se recuperó con una jeringa. El EtBr se extrajo de la solución varias veces mezclándola con 1 vol de alcohol isoamílico. El DNA se precipitó con 0.1 vol de NaAc 3 M y 2 vol de etanol 96%, se lavó con etanol 70% y se resuspendió en TE.

Solución A: 25% sacarosa; 50 mM EDTA pH8.0; 50 mM Tris-HCl pH8.0

Solución de rotura: 0.3% TritónX-100; 50 mM Tris-HCl pH7.4; 50 mM EDTA pH8.0

11.2. Preparación de DNA total de levaduras

Se siguió el protocolo descrito por Sherman *et al.* (1986). Se partió de 5 ml de cultivo

en fase estacionaria temprana. Se recogieron las células por centrifugación, se lavaron con H₂O y se resuspendieron en 0.32 ml de Solución de Sorbitol. Después se añadieron 3.2 μ l de β -mercaptoetanol (dilución 1/10) y 10 μ l de zimoliasa 20-T 15 mg/ml. Tras incubar 60 min a 37°C, la mezcla se centrifugó 20 s y el precipitado se resuspendió en 0.37 ml de Solución Cocktail a la cual se añadieron 16 μ l de SDS 10% y 1 μ l de dietil-pirocarbonato (DEPC). Tras incubar 30 min a 65°C los restos de membranas celulares se precipitaron añadiendo 85 μ l de solución III de miniprep (ver arriba) e incubando durante al menos 1 h en hielo. El DNA se trató con ribonucleasa y, tras fenolización, se precipitó con NaCl 0.3 M y 2.5 vol de etanol 96%, se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 50 μ l de TE.

Solución de Sorbitol: 0.9 M sorbitol; 0.1 M EDTA pH8.0

Solución Cocktail: 20 mM EDTA pH8.0; 50 mM Tris-HCl pH8.0

11.3. Preparación rápida de DNA cromosómico

Se siguió una variante del protocolo descrito por Hoffman y Winston (1987). Se partió de 10 ml de cultivo en fase estacionaria temprana. Se recogieron las células por centrifugación, se lavaron con H₂O y se resuspendieron en 0.2 ml de tampón de lisis. Después se añadieron 0.3 g de bolitas de vidrio (200 μ l en vol) y 200 μ l de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). Se agitó a máxima velocidad durante 3 min. Se añadieron 200 μ l de TE, se mezcló, se centrifugó 5 min y el sobrenadante se precipitó con 2.5 vol de etanol 96% y se resuspendió en 400 μ l de TE. Se eliminó el RNA con un tratamiento de 5 min a 37°C con 30 μ l de RNasa A 1mg/ml. Se precipitó con 0.1 vol de NaAc 3 M y etanol 96%. Se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 100 μ l de TE.

Tampón de lisis: 2% tritón X-100; 1%SDS; 100 mM NaCl; 10 mM TrisHCl pH 8.0; 1 mM EDTA pH 8.0

11.4. Preparación de DNA "carrier"

Se resuspendió el DNA de esperma de salmón o de trucha en TE pH 8 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 vol de NaAc 3 M pH 5.2 y 2.5 vol 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 min y se enfrió en hielo. Se congelaron en pequeñas alícuotas. El tamaño medio de los fragmentos debería estar en torno a 7 kb para que la eficiencia de transformación de la levadura sea óptima.

11.5. Preparación de RNA de levaduras

Se siguió el método de extracción con fenol ácido descrito por Köhrer y Dombey (1991). A partir de 10 ml de cultivo en fase exponencial ($D.O_{660nm} = 0.5-0.7$) se recogieron las células por centrifugación y se lavaron con H₂O. Posteriormente se resuspendieron en 0.4 ml de tampón TES y 0.4 ml de fenol ácido (saturado con H₂O), tras lo cual se agitaron fuertemente en agitador excéntrico durante al menos 10 s. La mezcla se incubó durante 45 min a 65°C con agitación ocasional. Trás la incubación, se dejó 5 min 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 vol de NaAc 3 M pH5.3 y 2 vol de etanol 96%, se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 50 μ l de H₂O. 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 H₂O y las soluciones acuosas utilizadas fueron previamente tratadas con DEPC al 0.1% y autoclavadas.

Tampón TES: 10 mM Tris-HCl pH7.5; 10 mM EDTA pH8.0; SDS 0.5%

12. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Este método permite la amplificación exponencial de fragmentos de DNA usando 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, 1 μ l de mezcla de dNTPs (10 mM cada uno), 1 μ l de mezcla de cebadores 50 μ M cada uno, 1 μ l de DNA molde y 1U de polimerasa. Se agitó brevemente y se incubó en un termociclador ProGene (Techne Ltd., Cambridge, United Kingdom). La reacción tipo consta de 1 ciclo de 2 min a 94 °C/ 35 ciclos (a) 30 s a 94 °C, (b) 30 s a la temperatura de apareamiento y (c) a 72 °C (producto < 1.5 kb) o 68 °C (producto \geq 1.5 kb) tantos min como kb tenga el producto/ 1 ciclo adicional como (c). En caso de haber usado como molde células de levaduras, el tiempo de elongación se multiplicó por dos.

Tabla 2. Cebadores de PCR usados en esta tesis^{1,2}

Nombre	Secuencia	Origen
rDNAup	TTGGAGAGGGCAACTTTGG	(1)
rDNAlow	CAGGATCGGTTCGATTGTGC	(1)
THO3.1	CGGATTCATTGATGGCG	(4)
THO3.2	AACCACCTACGACCGCAC	(4)
THO3-3'	GATATCATCGATCTCGAGTCACCAAAGAACGTGAG	(2)
THO3-5'a	ACTAGTATCGATGAATTCATGGACATGGCCAACCAG	(2)
NAB2A	GCATGCGGATCCCCCGGGCGAGACGTTTAT	(4)
NAB2B	TCTAGAATCGATCCCCGGGTGATTGAAACCC	(4)
TH2H3'	GAGCGGCTCGAGTTACCTCTGGTACCTACTGACG	(3)
TH2H5'	TACGCTCGAGATGGCAGAACAGACGCTACTTTCC	(3)
3THO3-HA	GATATCATCGATCTCGAGTCACCAAAGAACGTGAG	(4)
5THO3-HA	GGATCCTCTAGAGCTAGCTATCCCTATGACGTTCCCTCTCACGTTTTGTGGTCCA TGGAAAAGAGAAG	(4)
TAP1	GTTAATGAACGAATCACCAAGATGTTTCTGCCCATTCTCACGTTTTGTGGTCCA TGGAAAAGAGAAG	(4)
TAP2	CAGCATAATGTCGCTCCTTCTCTTCTATTTCTATATATATCTACGACTCACTAT AGGG	(4)

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

2. Origen: (1) Chávez y Aguilera, 1997; (2) Gallardo y Aguilera, 2001; (3) A.G.Rondón; (4) Esta tesis

13. ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

13.1. Geles de agarosa

La electroforesis de ácidos nucleicos se realizó en geles de agarosa según lo descrito en Sambrook *et al.* (1989).

13.1.1. Geles 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 1.5% en función del tamaño de los fragmentos a analizar, con tampón TAE 1X y EtBr 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. El DNA se sometió a un campo eléctrico constante de 5 V/cm de longitud del gel. Previamente, a las muestras de DNA se les añadió tampón de carga 1X.

Tampón TAE 1X: preparado a partir de TAE 50X: 2 M Tris-acetato; 0.05 M EDTA pH8.0

Tampón de carga 1X: tampón de carga 5X: 0.25% azul de bromofenol; 30% glicerol

13.1.2. Geles para RNA

El RNA de levaduras se separó en geles de agarosa al 1% en tampón MOPS 1X y formaldehído 0.664 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 10 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 min a 65°C y se les añadieron 2 μl de tampón de carga-formaldehído 10X.

Tampón MOPS 1X: tampón MOPS 10X: 0.4 M MOPS pH7.0; 0.1 M NaAc; 0.1M EDTA

Tampón de carga-formaldehído 10X: 1 mM EDTA pH8.0; 0.25% azul de bromofenol; 50% glicerol

13.2. Geles nativos de poli acrilamida.

Se preparó un gel al 3 o 5 % de acrilamida: bisacrilamida (29:1) en TBE 1X. Una vez polimerizado se cargaron las muestras y se las sometió a un campo eléctrico de 15mA durante 60 - 75 min a 4°C. Transcurrido ese tiempo se desmontó y se secó sometiéndolo a vacío y a 80°C durante 1 h

TBE 10X: 890mM Tris base; 890mM ácido bórico; 20 mM EDTA pH 8.0

14. ELECTROFORESIS DE CROMOSOMAS DE LEVADURA.

Los cromosomas de *S.cerevisiae* se separaron por electroforesis en campo pulsado utilizando el sistema CHEFF-DRII de BIO-RAD, según el método de Carle y Olson (1985), con las modificaciones de Chu *et. al.* (1986). Las muestras se prepararon a partir de células cultivadas en YPED hasta fase estacionaria. Los cultivos se centrifugaron y las células se resuspendieron en tampón CPES, se mezclaron con una solución de 1.2% agarosa bajo punto de fusión en CPE y se gelificaron en bloques de 1x2x0.1cm. Estos bloques se incubaron en CPE durante 4h a 30°C y posteriormente durante 12h a 50°C con una solución de 1mg/ml de proteinasa K en tampón TESP. Finalmente, los bloques se lavaron 6 veces con tampón TE pH 8 a 50°C. Las electroforesis se efectuaron en geles de agarosa al 1% en tampón 0.5xTBE, a 10°C y 200 V durante 28h y 20 min. En las 16 primeras horas el campo cambió cada 60 s y en las 12 h 20 min restantes, cada 90 s.

CPE: 40mM ácido cítrico pH6, 120mM fosfato sódico pH6, 20mM EDTA pH8.

CPES: 0.2 mg/ml de Zimoliasa 20T en tampón CPE osmoestabilizado con 1.2M Sorbitol.

TESP: 10mM Tris-HCl pH8, 450mM EDTA pH8, 1% SDS.

15. TRANSFERENCIA DE ÁCIDOS NUCLEÍCICOS A MEMBRANAS

15.1. Transferencia de DNA

Tras la electroforesis, el gel de agarosa se incubó en una solución de HCl 0.25 M durante 10-15 min. Después se lavó con H₂O y se le sometió a un tratamiento de acuerdo al tipo de membranas a las que se fuera a transferir el DNA.

15.1.1. Membranas neutras. El gel se incubó en solución de desnaturalización durante 30 min, se lavó con H₂O y se incubó durante dos periodos de 15 min en solución de neutralización. La transferencia del DNA se efectuó por capilaridad en tampón SSC 20X durante 12-16 h (Southern, 1975) a una membrana de nailon HybondN (Amersham International). Una vez transferido, se lavó la membrana con SSC 2X. El DNA se fijó covalentemente irradiando con luz ultravioleta (70000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$) por ambas caras.

Solución de desnaturalización: 1.5 M NaCl; 0.5 M NaOH

Solución de neutralización: 1.5 M NaCl; 0.5 M Tris-HCl pH7.2; 1 mM EDTA

SSC 20X: 3 M NaCl; 0.4 M Na-citrato; ajustado a pH7.0 con NaOH

15.1.2. Membranas cargadas positivamente. El gel se incubó en NaOH 0.4 M durante 30 min. La transferencia y fijación del DNA se efectuó por capilaridad en solución de NaOH 0.4 M, durante 12-16 h a una membrana de nailon cargada positivamente HybondN+ (Amersham International). Una vez transferido el DNA, se lavó la membrana con SSC 2X.

15.2. Transferencia de RNA

Tras la electroforesis, el gel de agarosa se incubó en H₂O a 65°C durante 2 intervalos de 5 min para eliminar el formaldehído. A continuación se incubó en una solución desnaturalizante durante 20 min y en solución neutralizante durante otros 20 min. Finalmente se incubó en SSC 20X durante 30 min. Este tratamiento se realizó a temperatura ambiente y con agitación. La transferencia del RNA se efectuó por capilaridad en tampón SSC 20X durante 12-16 h. Una vez transferido, se lavó la membrana con SSC 2X. El RNA se fijó covalentemente irradiando con luz ultravioleta (70000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$) sobre ambas caras. Para comprobar la eficiencia de la transferencia se tiñó la membrana con solución de azul de metileno durante 2-3 min a temperatura ambiente. Para desteñir la membrana se trató con SSPE 0.2X-SDS 1%. Las membranas se guardaron entre papel Whatman a temperatura ambiente hasta su uso.

Solución desnaturalizante: 50mM NaOH, 10 mM NaCl

Solución neutralizante: 10 mM Tris-HCl pH7.5

Solución de Azul de metileno: 0.3 M NaOAc pH5.5; 0.02% azul de metileno

SSPE 0.2X: SSPE 20X: 3 M NaCl; 0.2 M NaH₂PO₄; 20 mM EDTA

16. HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEÍCICOS

16.1. Hibridación de DNA con sonda radiactiva a 42°C (Southern)

Las membranas se prehibridaron durante 1-4h a 42°C con agitación constante en solución de hibridación de DNA. La hibridación se realizó durante 12-16 h a 42°C añadiendo a la solución anterior la sonda marcada con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP previamente desnaturalizada por calor. Trás la hibridación se lavó el filtro dos veces durante 5 min con SSC 2X-SDS 0.5% a temperatura ambiente, dos veces durante 5 min con SSC 2X-SDS 0.1% a temperatura ambiente, una vez durante 30 min con SSC 2X-SDS 0.1% a 50°C y una última vez durante 30

min con SSC 0.2X-SDS 0.1% a 65 °C. Finalmente, se envolvieron los filtros en papel celofán y se expusieron a películas de autorradiografía.

Solución de hibridación de DNA: 25 mM NaPO₄ pH6.5; 50% formamida desionizada; SSC 6X; reactivo Denhardt's 5X; SDS 0.5%; DNA de esperma de salmón 100µg/ml previamente desnaturalizado Denhardt 100X: 0.02 g/ml Ficoll 400; 0.02 g/ml polivinilpirrolidona; 0.02 g/ml BSA

16.2. Hibridación de RNA con sonda radiactiva a 42°C (Northern)

Las membranas se pre-hibridaron durante 1-4 h a 42°C en agitación constante en solución de hibridación de RNA. La hibridación se realizó durante 12-16 h a 42°C añadiendo a la solución anterior la sonda marcada con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP previamente desnaturalizada por calor. Tras la hibridación se lavó el filtro 2x5 min con SSC 2X-SDS 0.5% a temperatura ambiente, 2x5 min con SSC 2X-SDS 0.1% a temperatura ambiente, 30 min a 50°C con la misma solución y una última vez durante 30 min con SSC 0.2X-SDS 0.1% a 65°C. Finalmente, se envolvieron los filtros en papel celofán y se expusieron a películas de autorradiografía.

Solución de hibridación de RNA: formamida desionizada 50%; SSPE 5X; reactivo Denhardt's 1X; 0.1% SDS; DNA de esperma de salmón 100µg/ml previamente desnaturalizado

16.3. Hibridación de DNA ó RNA con sonda radiactiva a 65°C

Las membranas se prehibridaron durante 1-4 h a 65°C en agitación constante en solución de hibridación (NaPO₄ 0.5M pH7; SDS 7%). La hibridación se realizó durante 12-16 h a 65°C añadiendo a la solución anterior la sonda marcada con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP previamente desnaturalizada por calor. Tras la hibridación se lavó el filtro una vez durante 5 min con solución de lavado (SSPE 0.1X; EDTA 5mM; SDS 0.5%) 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.

16.4. Rehibridación de filtros

La rehibridación de membranas con nuevas sondas se llevó a cabo tras eliminar la sonda previamente hibridada mediante dos tratamientos sucesivos con SSC 0.1X-SDS 0.1% hirviendo o bien mediante dos lavados durante 10 min con solución de deshibridación.

Solución de deshibridación: 0.1M NaOH; 0.1% SDS; 10mM TrisHCl pH8; 1mM EDTA

16.5. Cuantificación de bandas

La cantidad de sonda marcada unida al RNA se cuantificó en un analizador de radiación β FUJIX FLA3000. La cantidad de RNA se normalizó respecto al RNAr 28S con una sonda de 589 pb obtenida por PCR usando los cebadores publicados (Chávez and Aguilera, 1997).

17. MARCAJE DE SONDAS

17.1. Marcaje de sondas de DNA por “random primer”

Las sondas de DNA se marcaron con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP según el protocolo básico para sondas radiactivas. La reacción de marcaje se realizó con 0.2-2 μg del fragmento de DNA previamente desnaturalizado al cual se le añadió 1 mM de hexanucleótidos no marcados, 5 μl de una mezcla de dATP, dGTP, dTTP 0.5 mM y 20 μCi de $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP y 2 unidades de DNA polimerasa Klenow. La reacción se incubó a 37°C durante 1-2 hs en un vol final de 50 μl . Los nucleótidos no incorporados en la reacción se eliminaron pasando el total del vol a través de una columna de Sephadex G50-TE 3 min a 3000 r.p.m.

Sephadex G50-TE: 5 g de Sephadex G50 en 75 ml de TE

17.2. Marcaje de sondas de RNA

Las sondas de RNA se obtuvieron mediante transcripción *in vitro* desde el promotor del fago T7 del vector pBluescript. Para ello se digirieron 2 μg de plásmido purificado, con una enzima cuya diana se encontrara a la distancia deseada. La digestión se corrió en un gel de agarosa. Se aisló la banda con el kit GFX™ (Amersham) y se utilizó como molde. La transcripción se llevó a cabo en 40 μl finales de tampón de transcripción 1x; 10 mM DTT; 0,5 mM ATP, UTP y GTP; 5 μM CTP; 15 μCi de $\alpha^{32}\text{P}$ -CTP; 1,5 μl RNAGuard y 16 U de RNA polimerasa del fago T7. La reacción se incubó a 37°C durante 1 h Después se le añadió 5-10 U de DNasa I libre de RNasas y se incubó otros 15 min a 37°C. Se paró añadiendo 0,5 μl de EDTA 0,5 M. Los nucleótidos no incorporados en la reacción se eliminaron pasando el total del vol a través de una columna de Sephadex G50-TE.

Tampón de transcripción 10X: 400 mM Tris-HCl pH 7,5; 240 mM MgCl_2 ; 20 mM espemidina; 0,1% Tritón X-100);

17.2. Marcaje de oligos con digoxigenina

Se siguió el protocolo descrito en Amberg *et al.* (1992) con pequeñas modificaciones. Un oligonucleótico de 16 residuos de deoxitimidina (dT)₁₆, sintetizado por INVITROGEN, se marcó en su extremo 3' con digoxigenina-11-dUTP (ROCHE). La reacción llevada a cabo por una transferasa terminal contiene 0.5 nmoles de (dT)₁₆, 25 nmoles de digoxigenina, 150 unidades de transferasa terminal y 1 μmol de dTTP. Se dejó 15 min a 37°C y luego se precipitó para llevarlo a un vol final de 0.5ml de agua.

18. ENSAYO DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

18.1. Ensayo de actividad β -galactosidasa

18.1.1. En cultivo

Se realizó siguiendo el protocolo para células permeabilizadas descrito por Guarente (1983). Las células, una vez cultivadas en las condiciones oportunas, se lavaron con H_2O y se resuspendieron en 1 ml de tampón Z obteniéndose una suspensión con una D.O.600: D. El ensayo se realizó añadiendo un volumen v (ml) de la suspensión celular a un volumen final de 1 ml de tampón Z. Las células se permeabilizaron con 25 μl de SDS 0.1% y 50 μl de cloroformo y vorteadando durante 10-15 s. Tras una incubación de 5 min a 30°C, se añadieron 0.2 ml de una solución de 4 mg/ml de o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) en tampón Z. Después de un tiempo t (min), determinado por el momento en que la solución adquirió un color amarillo, a 30°C, la reacción se paró añadiendo 0.5 ml de Na_2CO_3 1M. Los restos

celulares se eliminaron por centrifugación y se determinó la D.O._{420nm} del sobrenadante. Las unidades (U) de actividad β-galactosidasa se definen según la fórmula: $U = \frac{D.O.420nm}{1000} \times v \times t$.

Tampón Z: 60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 50 mM β-mercaptoetanol

18.1.2. En placa.

Se crecieron los zig-zags en el medio necesario para la expresión del promotor hasta obtener colonias aisladas de aproximadamente 2 mm de diámetro. Se preparó el agar de cobertera y se vertió sobre la placa 10 ml de agar de cobertera. Se esperó un tiempo hasta que las colonias que poseían actividad β-galactosidasa se volvieron azules permaneciendo blancas las que carecían del enzima. Este tiempo variaba según el fondo genético de la estirpe. Las diferencias se apreciaban mejor si se guardaban las placas a 4°C.

Agar de cobertera: 1% agarosa, 0,25 M tampón fosfato sódico precalentado a 60°C, 0.1% SDS y 0.4 mg/ml X-gal

18.2. Ensayo de actividad fosfatasa ácida

Se realizó siguiendo el método descrito por Hagenauer-Tsapis y Hinnen (1984). Las células, una vez cultivadas en las condiciones oportunas y recogidas, se lavaron con H₂O y se resuspendieron en 1 ml de tampón acetato 50 mM pH4, obteniéndose una suspensión con una D.O.₆₀₀: **D**. El ensayo se realizó añadiendo un vol **v** (ml) de la suspensión celular a un vol final de 0.45 ml de tampón acetato. Seguidamente se añadieron 50 μl de una solución de 5 mg/ml de p-nitrofenilfosfato a en tampón acetato. Después de 10 min a 37°C se paró la reacción añadiendo 0.12 ml de ácido tricloroacético al 25% y 0.6 ml de Na₂CO₃ en saturación. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación y se determinó la D.O._{405nm} del sobrenadante. Las unidades (U) de actividad fosfatasa ácida se definieron según la fórmula: $U = \frac{\mu\text{moles de p-nitrofenol}}{10 \times D \times v}$.

19. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.

19.1. Inducción de proteínas y preparación de extractos de proteínas en *E. coli*.

Para inducir la expresión de la proteína de fusión (His)₆Thp1, las células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas con el plásmido pT7-HA-THP1, según el método de TSS, se cultivaron en LB+Amp hasta una D.O._{600nm}=0.8-0.9. Se añadió IPTG a la concentración final de 0.5mM y se incubó durante 4h más a 37°C con agitación. Los extractos de proteínas de *E. coli* se obtuvieron según el procedimiento descrito por Laemmli (1970). Las células recogidas por centrifugación, se resuspendieron en tampón de muestras de Laemmli (1x). Las muestras se hirvieron durante 5-10 min antes de cargarse en los geles de SDS-poliacrilamida.

Tampón Laemmli: 0.0625M Tris HCl pH 6.8; 10% glicerol, 2% SDS; 5% 2-mercaptoetanol, 0.05% (p/v) Azul de bromofenol.

19.2. Purificación de la proteína (His)₆HATHP1 a partir de *E.coli*.

La proteína (His)₆HA-Thp1 se purificó en condiciones nativas utilizando la resina Ni-NTA (QIAGEN) según las instrucciones del fabricante. Se preparó un extracto a partir de un litro de

BL21 transformada con el plásmido de expresión después de 4 h de inducción. Para ello se recogieron las células por centrifugación y se lavaron con el tampón de lisis. Las células se rompieron mecánicamente en un mortero tras congelarlas con nitrógeno líquido. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación. Se tomaron muestras del sobrenadante y del precipitado para su posterior análisis. Se equilibró la resina en el tampón de lisis y se añadió con el extracto clarificado. La mezcla se incubó en agitación suave a 4°C toda la noche. La proteína que no se unió a la resina se eliminó por gravedad cargando la mezcla en un soporte de BIORAD. Se recogió una muestra de la fracción eluida. La columna se lavó dos veces con un vol igual al de extracto del tampón de lavado. Se tomó una muestra de cada lavado. A continuación se eluyeron las proteínas unidas a la resina pasando por la columna el tampón de elución. Se hicieron cinco eluciones de un vol igual al de la matriz. De cada elución se tomó una muestra. Todas las muestras recogidas a lo largo de la purificación se corrieron en un gel de SDS-poliacrilamida. Las eluciones se almacenaron a -80°C.

Tampón de lisis: 50mM NaH₂PO₄; 300mM NaCl; 10mM imidazol; pH8

Tampón de lavado: 50mM NaH₂PO₄; 300mM NaCl; 20mM imidazol; pH8

Tampón de elución: 50mM NaH₂PO₄; 300mM NaCl; 250mM imidazol; pH8

19.3. Purificación de proteínas desde levaduras: método TAP

Este método se usó para purificar complejos protéicos de levadura. Se basa en el protocolo descrito por Rigaut *et al.* (1999). Para ello reemplazamos la copia silvestre de *THP1* por la fusión *THP1-TAP* obtenida por PCR usando los oligos TAP1 and TAP2. La purificación del complejo se hizo a partir de un cultivo en medio rico de 12 l. Este se recogió a D.O._{600nm}=2. Las células se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 min y luego se lavaron dos veces con agua fría. Los precipitados se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C. Para romper las células éstas se resuspendieron en un vol de tampón A (tampón de lisis) a temperatura ambiente. A partir de este punto todo se hizo a 4°C para evitar la degradación de las proteínas. Las células se rompieron con bolitas de vidrio (SIGMA) en un homogenizador (B.BRAUN MELSUNGEN AG) mediante tres pulsos de 15 s con intervalos de 10 s. Los lisados fueron ultracentrifugados a 100.000g durante una h a 4°C. El sobrenadante se incubó toda la noche a 4°C con IgG conjugada a sefarosa previamente equilibrada en el mismo tampón de lisis. Al día siguiente se empaquetó la columna en un soporte de BIORAD y se lavó con tampón A y tampón de corte. Luego se incubó en 1 ml de tampón de corte con 100U de enzima de restricción TEV (INVITROGEN) durante 4 hs a 16°C y 3 hs más a 4°C. Las proteínas eluidas se incubaron en tampón B con calmodulina conjugada a una matriz de durante toda la noche a 4°C. Las proteínas se eluyeron con tampón de elución y se precipitaron con TCA. Las muestras así concentradas se corrieron en un gel de SDS-poliacrilamida de gradiente (4-20%) y se tiñó con plata para su visualización.

Tampón A (tampón de lisis): 50mM Tris-HCl pH7.5, 100mM NaCl, 1.5mM MgCl₂, 0.15% NP40, 0.5M PMSF, 2mM benzamidina, 1μM leupeptina, 2μM pepstatina A, 4μM quimiostatina, 2.6μM aprotinina.

Tampón de corte: 10mM Tris-Cl pH8, 150mM NaCl, 0.1% NP40, 0.5mM EDTA, 1mM DTT.

Tampón B: 10mM β-mercaptoetanol, 10mM Tris-Cl pH8, 150mM NaCl, 1mM Mg-acetato, 1mM imidazol, 2mM CaCl₂, 0.1% NP40.

Tampón de elución: 10mM β-mercaptoetanol, 10mM Tris-Cl pH8, 150mM NaCl, 1mM Mg-acetato, 1mM imidazol, 5mM EGTA, 0.1% NP40.

19.4. Precipitación de proteínas.

Para precipitar proteínas se añadió 1/4 del vol final de TCA (ácido tricloroacético) al 100% y se dejó 1 h a 4°C. Luego se centrifugó 30 min a 13.000 rpm en frío y se hicieron dos

lavados de 5 min: primero se lavó con acetona y 0.05N HCl y luego sólo con acetona. Se dejó secar el pellet y se resuspendió en tampón de carga de proteínas.

19.5. Geles desnaturalizantes de proteínas (SDS-poliacrilamida).

Para la electroforesis de proteínas se utilizó el método de geles de SDS desarrollado por Laemmli (1970). La separación de proteínas se realiza en un sistema discontinuo con un gel de apilamiento y un gel de separación. Los geles se prepararon a partir de un stock al 30% de acrilamida:bisacrilamida (29:1) al porcentaje adecuado según el tamaño de la proteína a estudiar. Las muestras diluidas al 1:1 en tampón de carga Laemmli 2x se hirvieron 3 min para desnaturalizar las proteínas y se cargaron. Los geles se corrieron a un voltaje constante de 200 voltios hasta que el frente alcanzó el borde del gel. Como marcador de tamaño se utilizó el marcador de amplio rango para geles de SDS- poliactilamida suministrado por BIORAD. El sistema de cubeta empleado fue Mini-PROTEAN 3 Cell de BIORAD.

Gel de apilamiento: 125mM Tris-HCl pH6,8; 0.1% SDS; 0.1% APS (persulfato amónico) y 0.1% TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilenediamina) para polimerizar.

Gel de separación: 375 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1 % SDS; 0.1% APS y 0.1% TEMED para polimerizar.

Tampón de corrida: 25mM Tris pH8,3; 194 mM glicina; 0,1% SDS

19.6. Métodos de detección de proteínas.

19.6.1 .Tinción con azul de Coomassie.

Inmediatamente después de la electroforesis los geles se bañaron durante 30 min en una solución de Azul de Coomassie (Coomassie brilliant blue) al 0,25%; 50% metanol; 10% ácido acético glacial. Los geles se destiñen lavándolos 2 veces 30 min con la solución A (50% metanol; 10% ácido acético glacial) y 1 h en solución B (30 % metanol; 7,5 % ácido acético glacial). Antes de secarlos se deshidratan en 10% ácido acético glacial durante 30 min.

19.6.2. Tinción con nitrato de plata.

Los geles se fijaron en una solución de 50% metanol, 12% ácido acético glacial y 0,074% de formaldehído durante 1-12 hs. Se lavaron con etanol al 50% durante 30 min y se pasaron a una solución de 0,2 g/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ durante un minuto. Se lavaron tres veces con agua destilada (20 s cada lavado) y se dejaron impregnarse en 2g/L AgNO_3 ; 0,1% formaldehído durante 45-120 min (dependiendo del grosor del gel y de la cantidad de proteínas) en oscuridad. Se lavaron dos veces con agua destilada y se reveló con 60 g/L Na_2CO_3 ; 4 mg/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,074 % formaldehído hasta que las bandas de las proteínas aparecen nítidas. El revelado se paró colocando el gel en ácido acético al 1% durante 30 min. Los geles se lavaron y se secaron a 80°C en condiciones de vacío. Es importante usar agua milliQ en todas las soluciones y lavados.

19.7. Secuenciación de proteínas.

Para la secuenciación de proteínas se corrieron en un gel de SDS-poliacrilamida. Es muy importante que todo el material a usar esté limpio y los guantes sin polvo de talco. El gel se tiñó con Azul de Coomassie y se recortó la banda ajustándose al tamaño de ésta. La muestra metida en un eppendorf se secó usando un "speed-vac" y en esas condiciones se mandó para su secuenciación.

19.8. Análisis western.

El método, originalmente descrito por Towbin (1979), permite caracterizar los antígenos correspondientes a un anticuerpo y determinar la presencia y cantidad relativa de éstos. Los extractos protéicos se resolvieron por electroforesis y se transfirieron a filtros de nitrocelulosa. La membrana se incubó con el anticuerpo y, tras eliminar los anticuerpos no unidos, éstos se detectaron sobre el filtro. Se usaron varios sistemas de detección de anticuerpos: anticuerpos conjugados a fosfatasa alcalina y a peroxidasa.

19.8.1. Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa.

La transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa (Inmobilon-P, MILLIPORE) se realizó en un aparato de transferencia semi-seca (BIORAD). Tras la electroforesis se equilibró el gel en el tampón de transferencia durante 15 min a temperatura ambiente. La membrana se activó sumergiéndola en 100% metanol unos 15 s, se lavó dos veces en agua milliQ y se equilibró en el tampón de transferencia. 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 Watmann (Extra Thick, BIORAD) cortados al tamaño del gel. La transferencia se realizó colocando el conjunto entre el cátodo y el ánodo. Se aplicó una corriente de 20V durante 25 min. Al desmontar el sistema, si la transferencia fué efectiva el marcador preteñido se veía en la membrana. La membrana se tiñó con colorante Ponceau S, para ver las proteínas transferidas.

Tampón de transferencia (10x): 0,25M Tris base; 1,92M Glicina; pH 8,3

Solución Ponceau S: 0.5% Ponceau S en 1% de ácido acético.

19.8.2. Immunodetección con anticuerpos conjugados a fosfatasa alcalina.

Las membranas se incubaron con solución de bloqueo toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente se hicieron los siguientes lavados: 2x5 min con TBSC y 1 lavado de 5 min con TBSC. Una vez bloqueadas y lavadas, las membranas se incubaron con el anticuerpo específico purificado y a la dilución apropiada (determinada previamente) en TBSC durante 30 min a temperatura ambiente. De nuevo se lavaron como se indica anteriormente. A continuación las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina diluido en TBSC (dilución aconsejada por el fabricante) durante 1 h a temperatura ambiente. Tras los lavados se revelaron añadiendo la solución cromogénica hasta que las bandas se hacen claramente visibles. La reacción es progresiva lo que facilita el control de la misma ajustando el tiempo de desarrollo. Se paró lavando con solución de parado y la membrana se guardó en oscuridad.

Solución de bloqueo: TBSC, 1% w/v albúmina de suero bovino (BSA).

TBSC: 20mM Tris-HCl pH 7.5, 120mM NaCl, 1mM CaCl₂

TBSC: TBSC, 0.05% (v/v) Tween 20

Solución cromogénica: se prepara inmediatamente antes de su uso añadiendo 66 µL de solución NBT y 33 µL de solución BCIP a 10 ml de tampón de fosfatasa alcalina.

Solución NBT: Se disuelven 50 mg NBT (Nitro-blue tetrazolium, Sigma) en 1ml de dimetilformamida al 70%. Se guarda a -20°C.

Solución BCIP: Se disuelven 50 mg de BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, Sigma) en 1 ml de dimetilformamida al 100%. Se guarda a -20°C.

Tampón de fosfatasa alcalina: 100mM Tris-HCl pH 9.5, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂, 1mM CaCl₂.

Solución de parado: 20mM Tris-HCl; 1mM CaCl₂.

19.8.3. Immunodetección con anticuerpos conjugados a peroxidasa y quimioluminiscencia.

Una vez bloqueadas las membranas se incubaron, con una dilución apropiada de primer anticuerpo en la solución de bloqueo, 1 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C en agitación suave. Se recogió el primer anticuerpo y se lavó la membrana cuatro veces (5 min cada una) con el tampón de lavado para eliminar el anticuerpo que no se hubiese unido. Luego se incubó con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa durante 1h a temperatura ambiente. De nuevo se lavó cuatro veces (5 min cada vez) con el tampón de lavado. Para detectar la señal del anticuerpo mediante quimioluminiscencia catalizada por peroxidasa, se mezclaron adecuadamente los sustratos de la reacción (reactivos A y B) de ECL Western blotting reagents, preparando un vol final de 0.125 ml/cm² de membrana. Se añadió esta mezcla sobre la membrana y se incubó durante 2 min. Inmediatamente se expuso a una película radiográfica. El tiempo se exposición varió según las muestras.

Solución de bloqueo: 5% leche desnatada en polvo; 0,1 % Tween 20 en PBS (140mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,8mM KH₂PO₄ pH 7,3).

Tampón de lavado: 0.1% Tween 20 en PBS

20. ENSAYOS DE RETARDO EN GEL.

Los ensayos de retardo en gel se realizaron según lo descrito por Santos-Rosa *et al.*, (1998). La proteína Thp1 purificada de *E. coli* se dializó en el tampón de unión. Distintas cantidades de proteína ya dializada se incubaron a 30°C durante 30 min en un vol final de 20 µl, con 2 µl de sonda de RNA (90 nt) marcada mediante transcripción "run-off", o de DNA (200nt) sintetizada por PCR y marcada por fosforilación de los extremos. Cada mezcla además lleva 0.2U/ml de inhibidor de ribonucleasas. Para los ensayos de competición se utilizaron las mismas sondas de RNA y DNA frías (sin nucleótidos marcados radiactivamente) y un oligonucleótido de 60 nt sintetizado por ROCHE como sonda de DNA de cadena sencilla. Las muestras se cargaron en un gel nativo de bisacrilamida:acrilamida (1:29) al 3%. Para controlar el progreso de la electroforesis se cargaron 5 µl de tampón de carga en un pocillo vacío. El gel se corrió a 15 mV durante 60 o 75 min hasta que el azul de bromofenol distaba aproximadamente 15 cm de los pocillos y luego se secó a 80°C en condiciones de vacío. Se expuso para obtener los radiogramas como se ha descrito anteriormente y se cuantificó con el FUJIX FLA3000.

Tampón de unión: 20mM HEPES-HCl pH 7.5; 7,5mM MgCl₂; 60mM NaCl; 0,05 mg/ml BSA; 10% glicerol; 1mM DTT.

21. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS PROTEÍNAS FUSIONADAS A GFP.

Se inocularon varios transformantes en 5 ml de SC-histidina con metionina al 1%. Se recogió el cultivo en fase exponencial y se lavó con agua. Se resuspendieron las células en 50µL de glicerol y se tiñeron los núcleos con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) a una concentración final de 1µg/ml. La visualización se hizo en un microscopio Olympus AHB3.

22. TRANSPORTE DE mRNA.

Se siguió el protocolo descrito por Amberg *et al.* (1992) con pequeñas modificaciones. Se inocularon las células en 5 ml de medio rico y se dejaron toda la noche creciendo a 30°C. A la mañana siguiente se diluyeron en el mismo medio y se esperó hasta que alcanzaron una D.O._{600nm} = 0.8. Entonces se dividió el cultivo en dos: uno se dejó a la misma temperatura y el otro se pasó a 37°C. A las 4 h se fijó el cultivo con formaldehído al

10% y se incubó una h más. Se lavaron las células dos veces en tampón KPO_4 0.1M pH6.5 centrifugándolas a bajas rpm para mantenerlas lo más intactas posible. Luego se lavaron una vez con tampón de lavado. El precipitado se resuspendió en 0.5 ml de tampón de lavado. Se guardaron a 4°C durante toda la noche. A continuación se le añadieron 30 μl de zimoliasa 100T 10mg/ml y se dejaron a 30°C un tiempo variable (30-45 min). Para saber cuando estaban listas se miraron al microscopio óptico. Se lavaron una vez con tampón de lavado, se resuspendieron en 0.2 μl del mismo tampón y se dejaron en hielo. Por otro lado se preparó el portaobjetos cubierto de teflón añadiéndole polilisina 0.1% durante 10 min en un ambiente húmedo. Se lavaron 4-5 veces con agua y se pusieron 20 μl de células en un pocillo. Se incubaron a temperatura ambiente y a los 10 min se eliminaron por aspiración las células que no se habían adherido al portaobjetos. Se introdujo el portaobjetos en metanol a -80°C durante 6 min y acto seguido en acetona a -80°C durante 30 s. Para que se secase sin que condensara el líquido sobre las muestras se colocó sobre la tapa inclinada de un baño caliente. Luego las células se equilibraron durante 2 min a 23°C con trietanolamina 0.1M pH 8 preparado justo antes de usar y se bloquearon con tampón de bloqueo durante 10 min a la misma temperatura. A continuación se incubaron las células durante 5 min en 2xSSC y en tampón de prehibridación durante 1 h a 37° en un ambiente húmedo. La hibridación se realizó en el mismo tampón con 500 pg de un oligo(dT)₁₆ (ROCHE) marcado con digoxigenina durante 12-14 hs a 37°C en un ambiente húmedo. A continuación se hicieron una serie de lavados: 2xSSC 1 h a 23°C; 1xSSC 1 h a 23°C; 0.5xSSC 30 min a 37°C; 0.5xSSC 30 min a 23°C. Se equilibraron las células en ABW1 durante 5 min a 23°C y se bloquearon en ABW1+FCS (suero fetal vacuno) al 5% inactivado con calor +Tritón X-100 0.3% durante 1 h a 23°C. Luego se le añadió el anticuerpo fluorescente anti-digoxigenina Fab (Roche) diluido 1:4 en ABW1+FCS y se dejó a 23°C durante 4 hs. El anticuerpo se eliminó con dos lavados (10 y 30 min) con ABW1 a 23°C y otros dos con ABW2 a la misma temperatura. Los núcleos se tiñeron con DAPI (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in ABW2) durante 5 min. Antes de colocar el cubreobjetos se lavó dos veces con ABW2 y se le añadió una gota de glicerol 90%+ p-fenilenediamina 1mg/ml PBS. Las muestras se guardaron a -20°C y en oscuridad.

Tampón de lavado: 0.1M KPO_4 pH6.5; 1.2M Sorbitol

Tampón de bloqueo: 0.1M trietanolamina pH8; 0.25% ácido anhídrido

Tampón de prehibridación: 50% formamida; 10% dextrano sulfato; 4xSSC; 0.02% polivinilpirrolidona; 0.02% BSA; 0.02% Ficoll-400; 125 mg/ml tRNA; 500 mg/ml DNA de esperma de salmón sonicado y desnaturalizado

ABW1: 0.1M Tris pH 9; 0.15M NaCl

ABW2: 0.1M Tris pH 9.5 ; 0.1M NaCl ; 50mM MgCl_2

23. CUANTIFICACIÓN DE DNA POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

Se tomó 1 ml de un cultivo en fase exponencial de crecimiento ($\text{D.O.}_{660\text{nm}}=0.6$), se centrifugaron las células, se lavaron con agua y se resuspendieron en 1 ml de etanol 70%, incubándose a -20°C durante 30 min. Se tomaron 20 μl de esta muestra y se resuspendieron en 1 ml de citrato sódico 50mM, se centrifugó y el precipitado se resuspendió en 0.5 ml del mismo tampón con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de RNAasa. Después de incubar durante 2 h a 37°C se añadió a la muestra 0.5 ml de citrato sódico 50mM con 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de yoduro de propidio y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. A continuación se sonicaron las células brevemente para desagregarlas y se midió el contenido en DNA utilizando para ello un equipo FACScan. El contenido en DNA se determinó midiendo la fluorescencia emitida por el yoduro de propidio intercalado en el mismo al ser excitado por el láser del citómetro de flujo.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, A. & Klein, H. L. Genetic control of intrachromosomal recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Isolation and genetic characterization of hyper-recombination mutations. *Genetics* **119**, 779-90 (1988).
- Aguilera, A. & Klein, H. L. Genetic and molecular analysis of recombination events in *Saccharomyces cerevisiae* occurring in the presence of the hyper-recombination mutation *hpr1*. *Genetics* **122**, 503-17 (1989).
- Aguilera, A. & Klein, H. L. HPR1, a novel yeast gene that prevents intrachromosomal excision recombination, shows carboxy-terminal homology to the *Saccharomyces cerevisiae* TOP1 gene. *Mol Cell Biol* **10**, 1439-51. (1990).
- Aguilera, A. the connection between transcription and genomic instability. *The EMBO Journal* **21**, 1-7 (2002).
- Aitchison, J. D., Blobel, G. & Rout, M. P. Kap104p: a karyopherin involved in the nuclear transport of messenger RNA binding proteins. *Science* **274**, 624-7 (1996).
- Alani, E. & Kleckner, N. A new type of fusion analysis applicable to many organisms: protein fusions to the URA3 gene of yeast. *Genetics* **117**, 5-12. (1987).
- Allison, L. A. & Ingles, C. J. Mutations in RNA polymerase II enhance or suppress mutations in GAL4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2794-8 (1989).
- Anderson, J. T., Wilson, S. M., Datar, K. V. & Swanson, M. S. NAB2: a yeast nuclear polyadenylated RNA-binding protein essential for cell viability. *Mol Cell Biol* **13**, 2730-41 (1993).
- Ares, M., Jr., Grate, L. & Pauling, M. H. A handful of intron-containing genes produces the lion's share of yeast mRNA. *Rna* **5**, 1138-9 (1999).
- Asturias, F. J., Jiang, Y. W., Myers, L. C., Gustafsson, C. M. & Kornberg, R. D. Conserved structures of mediator and RNA polymerase II holoenzyme. *Science* **283**, 985-7 (1999).
- Bachi, A. et al. The C-terminal domain of TAP interacts with the nuclear pore complex and promotes export of specific CTE-bearing RNA substrates. *Rna* **6**, 136-58 (2000).
- Balciunas, D., Galman, C., Ronne, H. & Bjorklund, S. The Med1 subunit of the yeast mediator complex is involved in both transcriptional activation and repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 376-81 (1999).
- Bangs, P. et al. Functional analysis of Tpr: identification of nuclear pore complex association and nuclear localization domains and a role in mRNA export. *J Cell Biol* **143**, 1801-12 (1998).
- Baudat, F. & Nicolas, A. Clustering of meiotic double-strand breaks on yeast chromosome

III. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5213-8 (1997).

Bauer, A. & Kolling, R. Characterization of the SAC3 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **12**, 965-75 (1996).

Bauer, A. & Kolling, R. The SAC3 gene encodes a nuclear protein required for normal progression of mitosis. *J Cell Sci* **109** (Pt 6), 1575-83 (1996).

Bauren, G. & Wieslander, L. Splicing of Balbiani ring 1 gene pre-mRNA occurs simultaneously with transcription. *Cell* **76**, 183-92 (1994).

Belmaaza, A. & Chartrand, P. One-sided invasion events in homologous recombination at double-strand breaks. *Mutat Res* **314**, 199-208 (1994).

Bentley, D. L. Regulation of transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Curr Opin Genet Dev* **5**, 210-6 (1995).

Bentley, D. Coupling RNA polymerase II transcription with pre-mRNA processing. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 347-51. (1999).

Bernardi, F. & Bernardi, A. Transcription of the target is required for IS102 mediated deletions. *Mol Gen Genet* **212**, 265-70 (1988).

Beyer, A. L. & Osheim, Y. N. Splice site selection, rate of splicing, and alternative splicing on nascent transcripts. *Genes Dev* **2**, 754-65. (1988).

Bhoite, L. T., Yu, Y. & Stillman, D. J. The Swi5 activator recruits the Mediator complex to the HO promoter without RNA polymerase II. *Genes Dev* **15**, 2457-69 (2001).

Blackwell, T. K. et al. Recombination between immunoglobulin variable region gene segments is enhanced by transcription. *Nature* **324**, 585-9 (1986).

Bourgaux-Ramoisy, D., Gendron, D. & Bourgaux, P. A hotspot for promoter-dependent recombination in polyomavirus DNA. *J Mol Biol* **248**, 220-4 (1995).

Brodsky, A. S. & Silver, P. A. Pre-mRNA processing factors are required for nuclear export. *Rna* **6**, 1737-49 (2000).

Brown, S. A., Imbalzano, A. N. & Kingston, R. E. Activator-dependent regulation of transcriptional pausing on nucleosomal templates. *Genes Dev* **10**, 1479-90 (1996).

Brown, S. A. & Kingston, R. E. Disruption of downstream chromatin directed by a transcriptional activator. *Genes Dev* **11**, 3116-21 (1997).

Bruhn, L., Munnerlyn, A. & Grosschedl, R. ALY, a context-dependent coactivator of LEF-1 and AML-1, is required for TCRalpha enhancer function. *Genes Dev* **11**, 640-53 (1997).

- Cairns, B. R. Chromatin remodeling machines: similar motors, ulterior motives. *Trends Biochem Sci* **23**, 20-5 (1998).
- Carlson, M. Genetics of transcriptional regulation in yeast: connections to the RNA polymerase II CTD. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 1-23 (1997).
- Carson, D. R. & Christman, M. F. Evidence that replication fork components catalyze establishment of cohesion between sister chromatids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 8270-5 (2001).
- Chabot, B., Bisotto, S. & Vincent, M. The nuclear matrix phosphoprotein p255 associates with splicing complexes as part of the [U4/U6.U5] tri-snRNP particle. *Nucleic Acids Res* **23**, 3206-13 (1995).
- Chaconas, G. & van de Sande, J. H. 5'-32P labeling of RNA and DNA restriction fragments. *Methods Enzymol* **65**, 75-85 (1980).
- Chang, M. et al. A complex containing RNA polymerase II, Paf1p, Cdc73p, Hpr1p, and Ccr4p plays a role in protein kinase C signaling. *Mol Cell Biol* **19**, 1056-67. (1999).
- Chavez, S. & Aguilera, A. The yeast HPR1 gene has a functional role in transcriptional elongation that uncovers a novel source of genome instability. *Genes Dev* **11**, 3459-70. (1997).
- Chavez, S. et al. A protein complex containing Tho2, Hpr1, Mft1 and a novel protein, Thp2, connects transcription elongation with mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **19**, 5824-34. (2000).
- Chavez, S., Garcia-Rubio, M., Prado, F. & Aguilera, A. Hpr1 is preferentially required for transcription of either long or G+C-rich DNA sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **21**, 7054-64 (2001).
- Cho, E. J., Takagi, T., Moore, C. R. & Buratowski, S. mRNA capping enzyme is recruited to the transcription complex by phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev* **11**, 3319-26. (1997).
- Christman, M. F., Dietrich, F. S. & Fink, G. R. Mitotic recombination in the rDNA of *S. cerevisiae* is suppressed by the combined action of DNA topoisomerases I and II. *Cell* **55**, 413-25 (1988).
- Cole, C. N. mRNA export: the long and winding road. *Nat Cell Biol* **2**, E55-8 (2000).
- Conaway, J. W., Shilatifard, A., Dvir, A. & Conaway, R. C. Control of elongation by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* **25**, 375-80 (2000).
- Conti, E. & Izaurralde, E. Nucleocytoplasmic transport enters the atomic age. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 310-9 (2001).

- Coppola, J. A., Field, A. S. & Luse, D. S. Promoter-proximal pausing by RNA polymerase II in vitro: transcripts shorter than 20 nucleotides are not capped. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 1251-5 (1983).
- Corden, J. L. Tails of RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* **15**, 383-7 (1990).
- Corden, J. L. & Patturajan, M. A CTD function linking transcription to splicing. *Trends Biochem Sci* **22**, 413-6 (1997).
- Cramer, P. et al. Coordination between transcription and pre-mRNA processing. *FEBS Lett* **498**, 179-82. (2001).
- Cullen, B. R. Connections between the processing and nuclear export of mRNA: evidence for an export license? *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4-6. (2000).
- Custodio, N. et al. Inefficient processing impairs release of RNA from the site of transcription. *Embo J* **18**, 2855-66. (1999).
- Dahmus, M. E. Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *J Biol Chem* **271**, 19009-12 (1996).
- Dantonel, J. C., Murthy, K. G., Manley, J. L. & Tora, L. Transcription factor TFIID recruits factor CPSF for formation of 3' end of mRNA. *Nature* **389**, 399-402. (1997).
- Dou, S. et al. The recombination signal sequence-binding protein RBP-2N functions as a transcriptional repressor. *Mol Cell Biol* **14**, 3310-9 (1994).
- Dower, K. & Rosbash, M. T7 RNA polymerase-directed transcripts are processed in yeast and link 3' end formation to mRNA nuclear export. *Rna* **8**, 686-97 (2002).
- Dreyfuss, G., Matunis, M. J., Pinol-Roma, S. & Burd, C. G. hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem* **62**, 289-321 (1993).
- Droge, P. Transcription-driven site-specific DNA recombination in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2759-63 (1993).
- Dul, J. L. & Drexler, H. Transcription stimulates recombination. I. Specialized transduction of Escherichia coli by lambda trp phages. *Virology* **162**, 466-70 (1988).
- Dul, J. L. & Drexler, H. Transcription stimulates recombination. II. Generalized transduction of Escherichia coli by phages T1 and T4. *Virology* **162**, 471-7 (1988).
- Eckner, R., Ellmeier, W. & Birnstiel, M. L. Mature mRNA 3' end formation stimulates RNA export from the nucleus. *Embo J* **10**, 3513-22 (1991).
- Exinger, F. & Lacroute, F. 6-Azauracil inhibition of GTP biosynthesis in Saccharomyces

cerevisiae. *Curr Genet* **22**, 9-11 (1992).

Fabre, E. & Hurt, E. Yeast genetics to dissect the nuclear pore complex and nucleocytoplasmic trafficking. *Annu Rev Genet* **31**, 277-313 (1997).

Fan, H. Y., Merker, R. J. & Klein, H. L. High-copy-number expression of Sub2p, a member of the RNA helicase superfamily, suppresses hpr1-mediated genomic instability. *Mol Cell Biol* **21**, 5459-70. (2001).

Ferrezuelo, F., Steiner, B., Aldea, M. & Futcher, B. Biogenesis of yeast telomerase depends on the importin mtr10. *Mol Cell Biol* **22**, 6046-55 (2002).

Filipowicz, W. & Pogacic, V. Biogenesis of small nucleolar ribonucleoproteins. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 319-27 (2002).

Fischer, T. et al. The mRNA export machinery requires the novel Sac3p-Thp1p complex to dock at the nucleoplasmic entrance of the nuclear pores. *Embo J* **21**, 5843-52 (2002).

Fishman-Lobell, J. & Haber, J. E. Removal of nonhomologous DNA ends in double-strand break recombination: the role of the yeast ultraviolet repair gene RAD1. *Science* **258**, 480-4 (1992).

Fishman-Lobell, J., Rudin, N. & Haber, J. E. Two alternative pathways of double-strand break repair that are kinetically separable and independently modulated. *Mol Cell Biol* **12**, 1292-303 (1992).

Fong, N. & Bentley, D. L. Capping, splicing, and 3' processing are independently stimulated by RNA polymerase II: different functions for different segments of the CTD. *Genes Dev* **15**, 1783-95. (2001).

Fu, Y. H. et al. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* **67**, 1047-58 (1991).

Fukuchi, K., Martin, G. M. & Monnat, R. J., Jr. Mutator phenotype of Werner syndrome is characterized by extensive deletions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5893-7 (1989).

Gallardo, M. & Aguilera, A. A new hyperrecombination mutation identifies a novel yeast gene, THP1, connecting transcription elongation with mitotic recombination. *Genetics* **157**, 79-89 (2001).

Gari, E., Piedrafita, L., Aldea, M. & Herrero, E. A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 837-48. (1997).

Ghosh, S. & Garcia-Blanco, M. A. Coupled in vitro synthesis and splicing of RNA polymerase II transcripts. *Rna* **6**, 1325-34 (2000).

- Gonzalez, F., Delahodde, A., Kodadek, T. & Johnston, S. A. Recruitment of a 19S proteasome subcomplex to an activated promoter. *Science* **296**, 548-50 (2002).
- Gottlieb, S. & Esposito, R. E. A new role for a yeast transcriptional silencer gene, SIR2, in regulation of recombination in ribosomal DNA. *Cell* **56**, 771-6 (1989).
- Green, D. M. et al. Nab2p is required for poly(A) RNA export in *Saccharomyces cerevisiae* and is regulated by arginine methylation via Hmt1p. *J Biol Chem* **277**, 7752-60 (2002).
- Grimm, C., Schaer, P., Munz, P. & Kohli, J. The strong ADH1 promoter stimulates mitotic and meiotic recombination at the ADE6 gene of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* **11**, 289-98 (1991).
- Grossberger, R. et al. Characterization of the DOC1/APC10 subunit of the yeast and the human anaphase-promoting complex. *J Biol Chem* **274**, 14500-7 (1999).
- Gustafsson, C. M. et al. Identification of Rox3 as a component of mediator and RNA polymerase II holoenzyme. *J Biol Chem* **272**, 48-50 (1997).
- Hampsey, M. & Reinberg, D. RNA polymerase II as a control panel for multiple coactivator complexes. *Curr Opin Genet Dev* **9**, 132-9 (1999).
- Hanna, J. S., Kroll, E. S., Lundblad, V. & Spencer, F. A. *Saccharomyces cerevisiae* CTF18 and CTF4 are required for sister chromatid cohesion. *Mol Cell Biol* **21**, 3144-58 (2001).
- Hartzog, G. A., Wada, T., Handa, H. & Winston, F. Evidence that Spt4, Spt5, and Spt6 control transcription elongation by RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **12**, 357-69 (1998).
- Hastings, P. J. Recombination in the eukaryotic nucleus. *Bioessays* **9**, 61-4 (1988).
- Hector, R. E. et al. Dual requirement for yeast hnRNP Nab2p in mRNA poly(A) tail length control and nuclear export. *Embo J* **21**, 1800-10 (2002).
- Hilleren, P., McCarthy, T., Rosbash, M., Parker, R. & Jensen, T. H. Quality control of mRNA 3'-end processing is linked to the nuclear exosome. *Nature* **413**, 538-42 (2001).
- Hirose, Y. & Manley, J. L. RNA polymerase II is an essential mRNA polyadenylation factor. *Nature* **395**, 93-6 (1998).
- Hirose, Y., Tacke, R. & Manley, J. L. Phosphorylated RNA polymerase II stimulates pre-mRNA splicing. *Genes Dev* **13**, 1234-9 (1999).
- Hirose, Y. & Manley, J. L. RNA polymerase II and the integration of nuclear events. *Genes Dev* **14**, 1415-29. (2000).
- Ho, Y. et al. Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by

- mass spectrometry. *Nature* **415**, 180-3. (2002).
- Holstege, F. C. et al. Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell* **95**, 717-28 (1998).
- Huang, Y. & Carmichael, G. C. Role of polyadenylation in nucleocytoplasmic transport of mRNA. *Mol Cell Biol* **16**, 1534-42 (1996).
- Ionov, Y., Peinado, M. A., Malkhosyan, S., Shibata, D. & Perucho, M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* **363**, 558-61 (1993).
- Irniger, S. & Nasmyth, K. The anaphase-promoting complex is required in G1 arrested yeast cells to inhibit B-type cyclin accumulation and to prevent uncontrolled entry into S-phase. *J Cell Sci* **110** (Pt 13), 1523-31 (1997).
- Ito, T., Bulger, M., Pazin, M. J., Kobayashi, R. & Kadonaga, J. T. ACF, an ISWI-containing and ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor. *Cell* **90**, 145-55 (1997).
- Jensen, T. H., Boulay, J., Rosbash, M. & Libri, D. The DECD box putative ATPase Sub2p is an early mRNA export factor. *Curr Biol* **11**, 1711-5. (2001).
- Jensen, T. H., Patricio, K., McCarthy, T. & Rosbash, M. A block to mRNA nuclear export in *S. cerevisiae* leads to hyperadenylation of transcripts that accumulate at the site of transcription. *Mol Cell* **7**, 887-98 (2001).
- Jimeno, S., Rondon, A. G., Luna, R. & Aguilera, A. The yeast THO complex and mRNA export factors link RNA metabolism with transcription and genome instability. *Embo J* **21**, 3526-35 (2002).
- Jones, A. L. et al. SAC3 may link nuclear protein export to cell cycle progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3224-9 (2000).
- Kadowaki, T. et al. Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mRNA transport-defective (mtr) mutants. *J Cell Biol* **126**, 649-59 (1994).
- Katahira, J. et al. The Mex67p-mediated nuclear mRNA export pathway is conserved from yeast to human. *Embo J* **18**, 2593-609. (1999).
- Keil, R. L. & Roeder, G. S. Cis-acting, recombination-stimulating activity in a fragment of the ribosomal DNA of *S. cerevisiae*. *Cell* **39**, 377-86 (1984).
- Kelleher, R. J., 3rd, Flanagan, P. M. & Kornberg, R. D. A novel mediator between activator proteins and the RNA polymerase II transcription apparatus. *Cell* **61**, 1209-15 (1990).

- Kim, D. H. et al. Exon/intron organization, chromosome localization, alternative splicing, and transcription units of the human apolipoprotein E receptor 2 gene. *J Biol Chem* **272**, 8498-504 (1997).
- Kim, Y. J., Bjorklund, S., Li, Y., Sayre, M. H. & Kornberg, R. D. A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell* **77**, 599-608 (1994).
- King, T. H., Decatur, W. A., Bertrand, E., Maxwell, E. S. & Fournier, M. J. A well-connected and conserved nucleoplasmic helicase is required for production of box C/D and H/ACA snoRNAs and localization of snoRNP proteins. *Mol Cell Biol* **21**, 7731-46 (2001).
- Kiss, T. Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. *Cell* **109**, 145-8 (2002).
- Kistler, A. L. & Guthrie, C. Deletion of MUD2, the yeast homolog of U2AF65, can bypass the requirement for sub2, an essential spliceosomal ATPase. *Genes Dev* **15**, 42-9. (2001).
- Klar, A. J., Strathern, J. N. & Hicks, J. B. A position-effect control for gene transposition: state of expression of yeast mating-type genes affects their ability to switch. *Cell* **25**, 517-24 (1981).
- Klar, A. J. & Strathern, J. N. Resolution of recombination intermediates generated during yeast mating type switching. *Nature* **310**, 744-8 (1984).
- Koleske, A. J. & Young, R. A. An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators. *Nature* **368**, 466-9 (1994).
- Kosova, B. et al. Mlp2p, a component of nuclear pore attached intranuclear filaments, associates with nic96p. *J Biol Chem* **275**, 343-50 (2000).
- Kotani, H. & Kmiec, E. B. Transcription activates RecA-promoted homologous pairing of nucleosomal DNA. *Mol Cell Biol* **14**, 1949-55 (1994).
- Kramer, A. The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. *Annu Rev Biochem* **65**, 367-409 (1996).
- Kwon, H., Imbalzano, A. N., Khavari, P. A., Kingston, R. E. & Green, M. R. Nucleosome disruption and enhancement of activator binding by a human SW1/SNF complex. *Nature* **370**, 477-81 (1994).
- Lamb, J. R., Michaud, W. A., Sikorski, R. S. & Hieter, P. A. Cdc16p, Cdc23p and Cdc27p form a complex essential for mitosis. *Embo J* **13**, 4321-8 (1994).
- Lauster, R. et al. Promoter, enhancer and silencer elements regulate rearrangement of an immunoglobulin transgene. *Embo J* **12**, 4615-23 (1993).

- Lee, D. C. & Aitchison, J. D. Kap104p-mediated nuclear import. Nuclear localization signals in mRNA-binding proteins and the role of Ran and Rna. *J Biol Chem* **274**, 29031-7 (1999).
- Lee, T. I. & Young, R. A. Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu Rev Genet* **34**, 77-137 (2000).
- Lei, E. P., Krebber, H. & Silver, P. A. Messenger RNAs are recruited for nuclear export during transcription. *Genes Dev* **15**, 1771-82. (2001).
- Leung, H. & Maizels, N. Transcriptional regulatory elements stimulate recombination in extrachromosomal substrates carrying immunoglobulin switch-region sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 4154-8 (1992).
- Li, Y. et al. Yeast global transcriptional regulators Sin4 and Rgr1 are components of mediator complex/RNA polymerase II holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10864-8 (1995).
- Libri, D., Graziani, N., Saguez, C. & Boulay, J. Multiple roles for the yeast SUB2/yUAP56 gene in splicing. *Genes Dev* **15**, 36-41. (2001).
- Lillo, J. A. et al. Disruption and phenotypic analysis of six open reading frames from the left arm of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome VII. *Yeast* **16**, 365-75 (2000).
- Lin, F. L., Sperle, K. & Sternberg, N. Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cells: role for DNA ends in the recombination process. *Mol Cell Biol* **4**, 1020-34 (1984).
- Linder, P. & Stutz, F. mRNA export: travelling with DEAD box proteins. *Curr Biol* **11**, R961-3 (2001).
- Lis, J. & Wu, C. Protein traffic on the heat shock promoter: parking, stalling, and trucking along. *Cell* **74**, 1-4 (1993).
- Long, M., de Souza, S. J. & Gilbert, W. Evolution of the intron-exon structure of eukaryotic genes. *Curr Opin Genet Dev* **5**, 774-8 (1995).
- Lopez, M. C., Sanchez, M., Ferminan, E. & Dominguez, A. Disruption of six *Saccharomyces cerevisiae* genes from chromosome IV and basic phenotypic analysis of deletion mutants. *Yeast* **14**, 1199-208 (1998).
- Lopez, P. J. & Seraphin, B. Genomic-scale quantitative analysis of yeast pre-mRNA splicing: implications for splice-site recognition. *Rna* **5**, 1135-7 (1999).
- Malagon, F. & Aguilera, A. Differential intrachromosomal hyper-recombination phenotype

of spt4 and spt6 mutants of *S. cerevisiae*. *Curr Genet* **30**, 101-6 (1996).

Malik, S. & Roeder, R. G. Transcriptional regulation through Mediator-like coactivators in yeast and metazoan cells. *Trends Biochem Sci* **25**, 277-83 (2000).

McCracken, S. et al. 5'-Capping enzymes are targeted to pre-mRNA by binding to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Genes Dev* **11**, 3306-18. (1997).

McCracken, S. et al. The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature* **385**, 357-61. (1997).

McGill, C., Shafer, B. & Strathern, J. Coconversion of flanking sequences with homothallic switching. *Cell* **57**, 459-67 (1989).

McGlynn, P. & Lloyd, R. G. Modulation of RNA polymerase by (p)ppGpp reveals a RecG-dependent mechanism for replication fork progression. *Cell* **101**, 35-45 (2000).

Meyn, M. S. High spontaneous intrachromosomal recombination rates in ataxia-telangiectasia. *Science* **260**, 1327-30 (1993).

Minvielle-Sebastia, L. & Keller, W. mRNA polyadenylation and its coupling to other RNA processing reactions and to transcription. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 352-7. (1999).

Misteli, T. & Spector, D. L. RNA polymerase II targets pre-mRNA splicing factors to transcription sites in vivo. *Mol Cell* **3**, 697-705 (1999).

Mizuguchi, G., Tsukiyama, T., Wisniewski, J. & Wu, C. Role of nucleosome remodeling factor NURF in transcriptional activation of chromatin. *Mol Cell* **1**, 141-50 (1997).

Moore, M. J. & Sharp, P. A. Evidence for two active sites in the spliceosome provided by stereochemistry of pre-mRNA splicing. *Nature* **365**, 364-8 (1993).

Myers, L. C. et al. The Med proteins of yeast and their function through the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev* **12**, 45-54 (1998).

Myers, L. C. & Kornberg, R. D. Mediator of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem* **69**, 729-49 (2000).

Nevo-Caspi, Y. & Kupiec, M. Transcriptional induction of Ty recombination in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12711-5 (1994).

Nickoloff, J. A. Transcription enhances intrachromosomal homologous recombination in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **12**, 5311-8 (1992).

Nickoloff, J. A. & Reynolds, R. J. Transcription stimulates homologous recombination in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **10**, 4837-45 (1990).

Nicolas, A., Treco, D., Schultes, N. P. & Szostak, J. W. An initiation site for meiotic gene conversion in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **338**, 35-9 (1989).

Nicoloso, M., Qu, L. H., Michot, B. & Bachellerie, J. P. Intron-encoded, antisense small nucleolar RNAs: the characterization of nine novel species points to their direct role as guides for the 2'-O-ribose methylation of rRNAs. *J Mol Biol* **260**, 178-95 (1996).

Novick, P., Osmond, B. C. & Botstein, D. Suppressors of yeast actin mutations. *Genetics* **121**, 659-74 (1989).

Ohi, M. D. et al. Proteomics analysis reveals stable multiprotein complexes in both fission and budding yeasts containing Myb-related Cdc5p/Cef1p, novel pre-mRNA splicing factors, and snRNAs. *Mol Cell Biol* **22**, 2011-24 (2002).

Oltz, E. M. et al. A V(D)J recombinase-inducible B-cell line: role of transcriptional enhancer elements in directing V(D)J recombination. *Mol Cell Biol* **13**, 6223-30 (1993).

Orphanides, G., Lagrange, T. & Reinberg, D. The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev* **10**, 2657-83 (1996).

Orphanides, G., LeRoy, G., Chang, C. H., Luse, D. S. & Reinberg, D. FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes. *Cell* **92**, 105-16 (1998).

Osheim, Y. N., Proudfoot, N. J. & Beyer, A. L. EM visualization of transcription by RNA polymerase II: downstream termination requires a poly(A) signal but not transcript cleavage. *Mol Cell* **3**, 379-87 (1999).

Otero, G. et al. Elongator, a multisubunit component of a novel RNA polymerase II holoenzyme for transcriptional elongation. *Mol Cell* **3**, 109-18 (1999).

Ozenberger, B. A. & Roeder, G. S. A unique pathway of double-strand break repair operates in tandemly repeated genes. *Mol Cell Biol* **11**, 1222-31 (1991).

Paques, F. & Haber, J. E. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 349-404 (1999).

Park, J. M., Werner, J., Kim, J. M., Lis, J. T. & Kim, Y. J. Mediator, not holoenzyme, is directly recruited to the heat shock promoter by HSF upon heat shock. *Mol Cell* **8**, 9-19 (2001).

Pearson, B. M., Hernando, Y. & Schweizer, M. Construction of PCR-ligated long flanking homology cassettes for use in the functional analysis of six unknown open reading frames from the left and right arms of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XV. *Yeast* **14**, 391-9 (1998).

- Peterson, C. L., Kruger, W. & Herskowitz, I. A functional interaction between the C-terminal domain of RNA polymerase II and the negative regulator SIN1. *Cell* **64**, 1135-43 (1991).
- Pinol-Roma, S. & Dreyfuss, G. Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm. *Nature* **355**, 730-2 (1992).
- Piruat, J. I. & Aguilera, A. A novel yeast gene, THO2, is involved in RNA pol II transcription and provides new evidence for transcriptional elongation-associated recombination. *Embo J* **17**, 4859-72. (1998).
- Piruat, J. I., Chavez, S. & Aguilera, A. The yeast HRS1 gene is involved in positive and negative regulation of transcription and shows genetic characteristics similar to SIN4 and GAL11. *Genetics* **147**, 1585-94 (1997).
- Planta, R. J. & Mager, W. H. The list of cytoplasmic ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 471-7 (1998).
- Pokholok, D. K., Hannett, N. M. & Young, R. A. Exchange of RNA polymerase II initiation and elongation factors during gene expression in vivo. *Mol Cell* **9**, 799-809 (2002).
- Prado, F. & Aguilera, A. Role of reciprocal exchange, one-ended invasion crossover and single-strand annealing on inverted and direct repeat recombination in yeast: different requirements for the RAD1, RAD10, and RAD52 genes. *Genetics* **139**, 109-23 (1995).
- Prado, F., Piruat, J. I. & Aguilera, A. Recombination between DNA repeats in yeast hpr1 delta cells is linked to transcription elongation. *Embo J* **16**, 2826-35. (1997).
- Price, D. H., Sluder, A. E. & Greenleaf, A. L. Dynamic interaction between a *Drosophila* transcription factor and RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* **9**, 1465-75 (1989).
- Proudfoot, N. Connecting transcription to messenger RNA processing. *Trends Biochem Sci* **25**, 290-3. (2000).
- Rasmussen, E. B. & Lis, J. T. In vivo transcriptional pausing and cap formation on three *Drosophila* heat shock genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7923-7. (1993).
- Reed, R. & Magni, K. A new view of mRNA export: separating the wheat from the chaff. *Nat Cell Biol* **3**, E201-4 (2001).
- Reinberg, D. et al. The RNA polymerase II general transcription factors: past, present, and future. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **63**, 83-103 (1998).
- Reines, D., Conaway, J. W. & Conaway, R. C. The RNA polymerase II general elongation factors. *Trends Biochem Sci* **21**, 351-5 (1996).

- Rodriguez, C. R. et al. Kin28, the TFIIH-associated carboxy-terminal domain kinase, facilitates the recruitment of mRNA processing machinery to RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* **20**, 104-12 (2000).
- Ryan, K. J. & Wentz, S. R. The nuclear pore complex: a protein machine bridging the nucleus and cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 361-71 (2000).
- Sakurai, H. & Fukasawa, T. Functional connections between mediator components and general transcription factors of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**, 37251-6 (2000).
- Santos-Rosa, H. & Aguilera, A. Increase in incidence of chromosome instability and non-conservative recombination between repeats in *Saccharomyces cerevisiae* hpr1 delta strains. *Mol Gen Genet* **245**, 224-36 (1994).
- Santos-Rosa, H. et al. Nuclear mRNA export requires complex formation between Mex67p and Mtr2p at the nuclear pores. *Mol Cell Biol* **18**, 6826-38. (1998).
- Scafe, C. et al. RNA polymerase II C-terminal repeat influences response to transcriptional enhancer signals. *Nature* **347**, 491-4 (1990).
- Schneiter, R. et al. The *Saccharomyces cerevisiae* hyperrecombination mutant hpr1Delta is synthetically lethal with two conditional alleles of the acetyl coenzyme A carboxylase gene and causes a defect in nuclear export of polyadenylated RNA. *Mol Cell Biol* **19**, 3415-22. (1999).
- Segref, A. et al. Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly(A)+ RNA and nuclear pores. *Embo J* **16**, 3256-71. (1997).
- Seoighe, C. & Wolfe, K. H. Extent of genomic rearrangement after genome duplication in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4447-52 (1998).
- Shenkar, R., Shen, M. H. & Arnheim, N. DNase I-hypersensitive sites and transcription factor-binding motifs within the mouse E beta meiotic recombination hot spot. *Mol Cell Biol* **11**, 1813-9 (1991).
- Shi, X. et al. Paf1p, an RNA polymerase II-associated factor in *Saccharomyces cerevisiae*, may have both positive and negative roles in transcription. *Mol Cell Biol* **16**, 669-76 (1996).
- Siniosoglou, S. et al. Structure and assembly of the Nup84p complex. *J Cell Biol* **149**, 41-54 (2000).
- Siomi, M. C. et al. Functional conservation of the transportin nuclear import pathway in divergent organisms. *Mol Cell Biol* **18**, 4141-8 (1998).

- Smith, K. N., Iwanejko, L., Loeillet, S., Fabre, F. & Nicolas, A. Disruption and functional analysis of seven ORFs on chromosome IV: YDL057w, YDL012c, YDL010w, YDL009c, YDL008w (APC11), YDL005c (MED2) and YDL003w (MCD1). *Yeast* **15**, 1255-67 (1999).
- Squazzo, S. L. et al. The Paf1 complex physically and functionally associates with transcription elongation factors in vivo. *Embo J* **21**, 1764-74 (2002).
- Steinmetz, E. J. Pre-mRNA processing and the CTD of RNA polymerase II: the tail that wags the dog? *Cell* **89**, 491-4. (1997).
- Stewart, S. E. & Roeder, G. S. Transcription by RNA polymerase I stimulates mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **9**, 3464-72 (1989).
- Strasser, K. & Hurt, E. Nuclear RNA export in yeast. *FEBS Lett* **452**, 77-81 (1999).
- Strasser, K., Bassler, J. & Hurt, E. Binding of the Mex67p/Mtr2p heterodimer to FXFG, GLFG, and FG repeat nucleoporins is essential for nuclear mRNA export. *J Cell Biol* **150**, 695-706 (2000).
- Strasser, K. & Hurt, E. Yra1p, a conserved nuclear RNA-binding protein, interacts directly with Mex67p and is required for mRNA export. *Embo J* **19**, 410-20. (2000).
- Strasser, K. & Hurt, E. Splicing factor Sub2p is required for nuclear mRNA export through its interaction with Yra1p. *Nature* **413**, 648-52. (2001).
- Strasser, K. et al. TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature* **417**, 304-8 (2002).
- Stutz, F. et al. REF, an evolutionary conserved family of hnRNP-like proteins, interacts with TAP/Mex67p and participates in mRNA nuclear export. *Rna* **6**, 638-50. (2000).
- Svejstrup, J. Q. et al. Evidence for a mediator cycle at the initiation of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 6075-8 (1997).
- Szostak, J. W., Orr-Weaver, T. L., Rothstein, R. J. & Stahl, F. W. The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* **33**, 25-35 (1983).
- Terns, M. P. & Terns, R. M. Small nucleolar RNAs: versatile trans-acting molecules of ancient evolutionary origin. *Gene Expr* **10**, 17-39 (2002).
- Thibodeau, S. N., Bren, G. & Schaid, D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* **260**, 816-9 (1993).
- Thomas, B. J. & Rothstein, R. The genetic control of direct-repeat recombination in

- Saccharomyces: the effect of rad52 and rad1 on mitotic recombination at GAL10, a transcriptionally regulated gene. *Genetics* **123**, 725-38 (1989).
- Truant, R., Fridell, R. A., Benson, R. E., Bogerd, H. & Cullen, B. R. Identification and functional characterization of a novel nuclear localization signal present in the yeast Nab2 poly(A)+ RNA binding protein. *Mol Cell Biol* **18**, 1449-58 (1998).
- Tsukiyama, T. & Wu, C. Purification and properties of an ATP-dependent nucleosome remodeling factor. *Cell* **83**, 1011-20 (1995).
- Uptain, S. M., Kane, C. M. & Chamberlin, M. J. Basic mechanisms of transcript elongation and its regulation. *Annu Rev Biochem* **66**, 117-72 (1997).
- van Hoof, A., Lennertz, P. & Parker, R. Yeast exosome mutants accumulate 3'-extended polyadenylated forms of U4 small nuclear RNA and small nucleolar RNAs. *Mol Cell Biol* **20**, 441-52 (2000).
- Varga-Weisz, P. D. et al. Chromatin-remodelling factor CHRAC contains the ATPases ISWI and topoisomerase II. *Nature* **388**, 598-602 (1997).
- Vilette, D., Ehrlich, S. D. & Michel, B. Transcription-induced deletions in Escherichia coli plasmids. *Mol Microbiol* **17**, 493-504 (1995).
- Voelkel-Meiman, K., Keil, R. L. & Roeder, G. S. Recombination-stimulating sequences in yeast ribosomal DNA correspond to sequences regulating transcription by RNA polymerase I. *Cell* **48**, 1071-9 (1987).
- Wada, T. et al. DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs. *Genes Dev* **12**, 343-56 (1998).
- Waldherr, M. et al. A multitude of suppressors of group II intron-splicing defects in yeast. *Curr Genet* **24**, 301-6 (1993).
- Wallis, J. W., Chrebet, G., Brodsky, G., Rolfe, M. & Rothstein, R. A hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase. *Cell* **58**, 409-19 (1989).
- Walowsky, C. et al. The topoisomerase-related function gene TRF4 affects cellular sensitivity to the antitumor agent camptothecin. *J Biol Chem* **274**, 7302-8 (1999).
- Wang, W. et al. Purification and biochemical heterogeneity of the mammalian SWI-SNF complex. *Embo J* **15**, 5370-82 (1996).
- Wang, Z., Castano, I. B., De Las Penas, A., Adams, C. & Christman, M. F. Pol kappa: A DNA polymerase required for sister chromatid cohesion. *Science* **289**, 774-9 (2000).

- Wang, Z. et al. Structure/function analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* Trf4/Pol sigma DNA polymerase. *Genetics* **160**, 381-91 (2002).
- Wen, Y. & Shatkin, A. J. Transcription elongation factor hSPT5 stimulates mRNA capping. *Genes Dev* **13**, 1774-9 (1999).
- White, M. A., Wierdl, M., Detloff, P. & Petes, T. D. DNA-binding protein RAP1 stimulates meiotic recombination at the HIS4 locus in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9755-9 (1991).
- Wilson, S. M., Datar, K. V., Paddy, M. R., Swedlow, J. R. & Swanson, M. S. Characterization of nuclear polyadenylated RNA-binding proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **127**, 1173-84 (1994).
- Winston, F. & Carlson, M. Yeast SNF/SWI transcriptional activators and the SPT/SIN chromatin connection. *Trends Genet* **8**, 387-91 (1992).
- Wittschieben, B. O. et al. A novel histone acetyltransferase is an integral subunit of elongating RNA polymerase II holoenzyme. *Mol Cell* **4**, 123-8 (1999).
- Wolfe, K. H. & Shields, D. C. Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* **387**, 708-13 (1997).
- Woychik, N. A. & Young, R. A. RNA polymerase II: subunit structure and function. *Trends Biochem Sci* **15**, 347-51 (1990).
- Yankulov, K., Blau, J., Purton, T., Roberts, S. & Bentley, D. L. Transcriptional elongation by RNA polymerase II is stimulated by transactivators. *Cell* **77**, 749-59 (1994).
- Young, R. A. RNA polymerase II. *Annu Rev Biochem* **60**, 689-715 (1991).
- Yuryev, A. et al. The C-terminal domain of the largest subunit of RNA polymerase II interacts with a novel set of serine/arginine-rich proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6975-80 (1996).
- Zachariae, W. et al. Mass spectrometric analysis of the anaphase-promoting complex from yeast: identification of a subunit related to cullins. *Science* **279**, 1216-9 (1998).
- Zenklusen, D. & Stutz, F. Nuclear export of mRNA. *FEBS Lett* **498**, 150-6. (2001).
- Zenklusen, D., Vinciguerra, P., Strahm, Y. & Stutz, F. The yeast hnRNP-Like proteins Yra1p and Yra2p participate in mRNA export through interaction with Mex67p. *Mol Cell Biol* **21**, 4219-32. (2001).
- Zhang, X. M., Tonnelle, C., Lefranc, M. P. & Huck, S. T cell receptor gamma cDNA in

human fetal liver and thymus: variable regions of gamma chains are restricted to V gamma I or V9, due to the absence of splicing of the V10 and V11 leader intron. *Eur J Immunol* **24**, 571-8 (1994).

