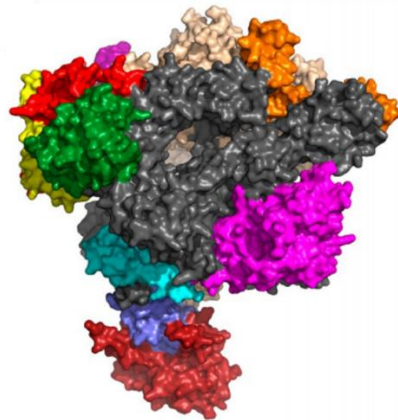


# Estudio de factores implicados en la terminación de la transcripción de los snRNAs en *Saccharomyces cerevisiae*

---

## Study of factors implicated in snRNAs transcription termination in *Saccharomyces cerevisiae*

18TFG307- Grado en Biología



ÁLVARO ARÉVALO BERMEJO

2017/2018



Instituto de Biología  
Funcional y Genómica



VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA





# Índice

<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>2</b>
1. <b>RNA polimerasas</b>	2
1.1 <b>RNA polimerasa II</b>	3
<b>2. Hipótesis y Objetivos</b>	<b>9</b>
<b>3. Materiales y Métodos</b>	<b>10</b>
1. <b>Cepas utilizadas de <i>S. cerevisiae</i></b>	<b>10</b>
2. <b>Medios de cultivo para <i>S. cerevisiae</i></b>	<b>10</b>
3. <b>Condiciones de cultivo</b>	<b>11</b>
4. <b>Técnicas genéticas</b>	<b>11</b>
4.1 <b>Transformación de <i>S. cerevisiae</i></b>	11
5. <b>Plásmidos</b>	<b>11</b>
6. <b>Ensayo de crecimiento celular mediante diluciones seriadas</b>	<b>11</b>
7. <b>Métodos de Manipulación y Análisis de Proteínas</b>	<b>12</b>
7.1 <b>Obtención de extractos proteicos y cuantificación</b>	12
7.2 <b>Co-inmunoprecipitación de proteínas (Co-IP)</b>	12
7.3 <b>Análisis por <i>Western Blot</i></b>	13
7.4 <b>Anticuerpos</b>	14
8. <b>Métodos de Manipulación y Análisis de RNA</b>	<b>14</b>
8.1 <b>Aislamiento de RNA total de levadura y cuantificación</b>	14
8.2 <b>Electroforesis de RNA</b>	15
<b>4. Resultados y Discusión</b>	<b>16</b>
4.1 <b>Antecedentes</b>	<b>16</b>
4.2 <b>Resultados y discusión</b>	<b>19</b>
1. <b>El dominio CT interacciona genéticamente con <i>RPB4/7</i>.</b>	19
2. <b>Rpb4 interacciona con Nrd1.</b>	22
3. <b>¿La sobreexpresión de <i>RPB4/7</i> es capaz de corregir los defectos en terminación del mutante <i>nrd1-V468stop</i>?</b>	26
<b>5. Conclusiones</b>	<b>28</b>
<b>6. Bibliografía</b>	<b>29</b>



## ***Abstract***

In *Saccharomyces cerevisiae*, and in all living organisms, RNA polymerases (RNAP) are the enzymes responsible of transcription process. Specifically, RNA polymerase II (RNAPII) transcribes all proteins coding genes and small non-coding RNAs genes, such as some small nuclear RNAs (snRNAs) and small nucleolar RNAs (snoRNAs). The transcription process is highly regulated in all its stages: initiation, elongation and termination. The termination can be carried out through two routes: the cleavage and polyadenylation pathway or the Nrd1-Nab3-Sen1 (NNS) pathway. The termination of the snRNAs is carried out by the NNS route. In this pathway, the transcription factor Nrd1 is key in the interaction with the RNA. Nrd1 has a C-terminal domain (CT), of unknown function, and it seems that it could mediate the interaction with two of the subunits of RNAPII, Rpb4 and Rpb7, which form a dissociable heterodimer. In this work we have focused on determining if *NRD1* genetically and functionally interacts with *RPB4/7* and we have generated the required tools to evaluate if both factors, Nrd1 and the heterodimer Rpb4/7, play a role in the termination of snRNAs.

**KEY WORDS:** RNAPII, Nrd1, Rpb4/7, snRNAs, *S. cerevisiae*.



# Resumen

En *Saccharomyces cerevisiae*, y en todos los seres vivos, las RNA polimerasas (RNAP) son las enzimas encargadas de llevar a cabo la transcripción. En concreto, la RNA polimerasa II (RNAPII) transcribe todos los genes codificantes de proteínas y genes de RNAs pequeños no codificantes, como algunos *small nuclear RNAs* (snRNAs) y los *small nucleolar RNAs* (snoRNAs). El proceso de transcripción está altamente regulado en todas sus etapas: iniciación, elongación y terminación. La terminación se puede llevar a cabo a través de dos vías: la vía de escisión y poliadenilación o la vía Nrd1-Nab3-Sen1 (NNS). La terminación de los snRNAs se lleva a cabo por la vía NNS. En esta vía, el factor de transcripción Nrd1 es la clave para la interacción con el RNA. Nrd1 tiene un dominio C-terminal (CT), de función desconocida por el momento, y que parece ser que podría mediar la interacción con dos de las subunidades de la RNAPII, Rpb4 y Rpb7, que forman un heterodímero disociable. En este trabajo nos hemos centrado en determinar si *NRD1* interacciona genéticamente con *RPB4/7*, si interacciona físicamente y hemos preparado las herramientas necesarias para evaluar si ambos factores, Nrd1 y el heterodímero Rpb4/7, juegan conjuntamente un papel en la terminación de los snRNAs.

**PALABRAS CLAVE:** RNAPII, Nrd1, Rpb4/7, snRNAs, *S. cerevisiae*.

# 1. Introducción

El conjunto completo de instrucciones genéticas de un organismo es el genoma. El DNA expresa su información transfiriéndola primero a una molécula de RNA en un proceso denominado **transcripción**. El conjunto de todas las moléculas de RNA transcritas de un genoma se conoce como **transcriptoma**. La molécula de RNA transfiere después la información genética a una proteína en un proceso denominado traducción. Por tanto, el proteoma es el conjunto de todas las proteínas codificadas por un genoma [1].

Podemos identificar tres vías importantes de flujo de información en la célula: en la replicación, la información pasa de una molécula de DNA a otras; en la transcripción, la información pasa del DNA al RNA; en la traducción, la información pasa del RNA a la proteína. Este concepto de flujo de información se conoce como **dogma central de la biología**. Por tanto, la información genética pasa del DNA a la proteína en un flujo de información unidireccional [1].

## 1. RNA polimerasas

Las RNA polimerasas (RNAPs) son enzimas nucleotidiltransferasas que sintetizan RNA a partir de DNA, es decir, son las responsables de llevar a cabo el proceso de transcripción. Las RNAPs están entre las enzimas celulares más importantes en todos los seres vivos. Están presentes desde los dominios Bacteria y Archaea al dominio Eukarya. Aunque en Bacteria y Archaea hay solo una RNAP, en Eukarya aparecen hasta tres RNAPs en animales (I, II y III) y cinco en plantas (IV y V) [2, 3]. Las RNAPs de los distintos dominios están muy conservadas evolutivamente y tienen una estructura y propiedades comunes. La organización estructural más básica conservada está representada por la polimerasa de Bacteria, que contiene 5 subunidades ( $\alpha$ ,  $\alpha'$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$ ,  $\omega$ ), mientras que la polimerasa de Archaea y la RNAPII de Eukarya contienen 12 subunidades (Rpb1-12) [2-4]. En procariotas y arqueas, una única RNAP lleva a cabo la transcripción, mientras que en eucariotas son varias las RNAPs implicadas. La RNA polimerasa I (RNAPI) transcribe un único gen, *35 S. cerevisiae* que da lugar a RNAs ribosomales 5.8S, 18S, 28S. La RNA polimerasa III (RNAPIII) transcribe genes cortos, como los que codifican los RNAs de transferencia (tRNAs) y el RNA ribosomal 5S, y la RNA polimerasa II (RNAPII) transcribe todos los genes codificantes de proteínas y genes de RNAs pequeños no codificantes, como algunos snRNAs (del inglés, *small nuclear RNAs*) y los snoRNAs (del inglés, *small nucleolar RNAs*) [5]. Además, la RNAPII también participa en la transcripción de otros RNAs no codificantes de funciones poco conocidas como por ejemplo, los transcritos crípticos



inestables (*cryptic unstable transcripts* o CUTs), numerosos SUTs (*stable unannotated transcripts*) y los XUTs (*Xrn1-sensitive unstable transcripts*) [6].

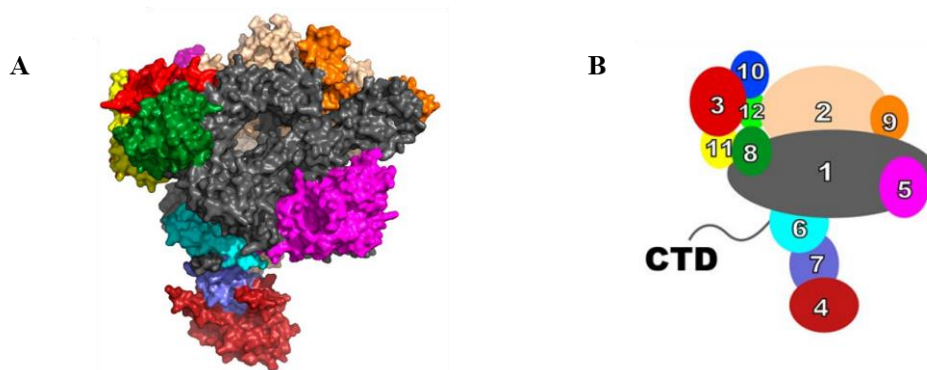
## 1.1 RNA polimerasa II

### 1.1.1 Estructura y “código del CTD”

La RNAPII está formada por 12 subunidades, desde Rpb1 hasta Rpb12, que en *Saccharomyces cerevisiae* se disocian en el **núcleo** (o “*core*”) de 10 subunidades y el módulo heterodimérico denominado “**tallo**” (o “*stalk*”) formado por las subunidades Rpb4 y Rpb7 (Figura 1). Este heterodímero está altamente conservado, desde levaduras hasta humanos [4]. Se trata de un dominio que sobresale del núcleo de la RNAPII, localizado cerca del canal de salida del RNA naciente y del dominio carboxilo terminal (CTD) de la subunidad Rpb1. Aunque se requiere Rpb4 para la interacción estable de Rpb7 con el núcleo de la polimerasa, la mayoría de los contactos entre Rpb4/7 y el núcleo de la polimerasa tienen lugar entre Rpb7 y las subunidades Rpb1 y Rpb6. Además, Rpb7 contacta directamente con el RNA naciente. Por tanto, esta capacidad y la localización de Rpb4/7 próxima al canal de salida del RNA, determina que el heterodímero juegue un papel importante en la biogénesis de los RNAs [4]. Por último, Rpb4/7 también participa en la modulación de la fosforilación de Rpb1-CTD, un proceso clave en la transcripción [7].

La subunidad mayor de RNAPII (Rpb1) contiene un **dominio carboxilo terminal (CTD)** muy conservado evolutivamente (Figura 1B) [8-10]. El dominio CTD está formado por repeticiones en tándem de una secuencia del heptapéptido consenso Tyr1-Ser2-Pro3-Thr4-Ser5-Pro6-Ser7 (YSPTSPS) presente en animales, plantas, levaduras y en la mayoría de los protistas. Además, el número de repeticiones está correlacionado con la complejidad del genoma de estos organismos. A mayor complejidad, mayor número de repeticiones del heptapéptido consenso [8-10].

El CTD está sujeto a modificaciones post-traduccionales de notable importancia en la regulación de la expresión génica. Entre las modificaciones más importantes y más estudiadas están las fosforilaciones en Ser2 y Ser5. Sin embargo, puede haber otras fosforilaciones, glicosilaciones o metilaciones en los diferentes residuos del heptapéptido consenso. Esta multitud de posibles modificaciones del CTD, especialmente las fosforilaciones en los residuos de serina, genera una amplia variedad de combinaciones que se conocen como “**código del CTD**” [8-10]. Dicho código es clave en la regulación de la expresión génica en general y de la transcripción en particular, regulando cada una de las fases de la misma. Además, la fosforilación del CTD coordina la transcripción con otros procesos nucleares [8-10].



**Figura 1. Estructura de la RNAPII.** A) Representación en superficie de la RNAPII. B) Esquema de bolas que muestra las 12 subunidades de la RNAPII y el dominio CTD. Tomado de [11].

### 1.1.2 Ciclo de transcripción por la RNAPII

La transcripción por la RNAPII es muy compleja e implica la participación de factores de transcripción, co-reguladores, activadores y represores, que aseguran una transcripción exitosa [12]. La transcripción por la RNAPII está regulada a varios niveles, tanto en el ensamblaje de la RNAPII en la cromatina como en cada una de las etapas de la transcripción: pre-iniciación, iniciación, elongación y terminación [12, 13].

#### ▪ Pre-iniciación e iniciación

La RNAPII se une al promotor gracias a la formación del complejo de preiniciación (PIC) e inicia así una nueva ronda de transcripción. Las proteínas que forman el PIC reconocen las secuencias promotoras, reclutando y posicionando la RNAPII en el promotor. También son necesarias para la formación de la burbuja de transcripción y la selección del sitio de inicio de la transcripción (TSS). La formación del PIC comienza con el reclutamiento del factor TFIID a los promotores, a través de la caja TATA, uniéndose al DNA y produciendo una serie de cambios que facilitan la unión de otros factores generales de transcripción (GTFs) y de la RNAPII, posteriormente [12-14].

Una vez unida la RNAPII al promotor, con ayuda del factor TFIIB, escanea la cadena de DNA en busca del TSS correcto para comenzar la transcripción. Tras haber sintetizado 20-100 bases, se disocia de los componentes del PIC y esto da lugar al “desalojo del promotor”. Además, la liberación del factor TFIIB produce el colapso de la burbuja de transcripción, favoreciéndose así la salida de la RNAPII del promotor [12-14].

- **Elongación**

Durante esta etapa, la RNAPII va transcribiendo a lo largo de la secuencia del gen. La polimerasa lee las regiones codificantes del DNA y sintetiza el RNA naciente. A lo largo de la elongación se suceden los primeros eventos de procesamiento del transcrito, como el reclutamiento de la maquinaria del *capping*, que añade una caperuza de 7-metilguanosina en el extremo 5' del RNA naciente, y el reclutamiento del *spliceosoma*, encargado de la eliminación de intrones o *splicing* [15].

- **Terminación**

Después de la biogénesis completa del transcrito, la RNAPII y el RNA naciente se disocian del DNA marcando el final del ciclo de transcripción [15]. La terminación de la transcripción es un proceso que marca el final de la elongación del transcrito. Está regulado por proteínas que interactúan con la polimerasa, el RNA naciente y la cromatina. Fallos en la terminación de la transcripción pueden producir la acumulación de transcritos aberrantes e interferir en la transcripción de otros genes aguas abajo, y por lo tanto provoca graves defectos y altera la viabilidad celular [16, 17].

La terminación de la transcripción en eucariotas se puede llevar a cabo a través de dos vías diferentes, en función de la naturaleza del transcrito [16, 17]. Por un lado, la **vía de escisión y poliadenilación**, procesa el mRNA mediante la escisión del transcrito en el extremo 3'-UTR y añade una cola de poli(A). Por otro lado, la **vía Nrd1-Nab3-Sen1 (NNS)** lleva a cabo la terminación de los RNAs pequeños no codificantes (snRNAs y snoRNAs) y en este caso, no se añade la cola de poli(A) a otros productos de la transcripción de la RNAPII, como CUTs, SUTs y XUTs [16, 17].

Este trabajo se centra en la terminación transcripcional de los RNAs pequeños no codificantes.

### **1.1.3 Terminación transcripcional de los RNAs pequeños no codificantes por la vía NNS**

- **Factores transcripcionales implicados en la vía NNS**

La vía Nrd1-Nab3-Sen1 (NNS) requiere la participación de tres proteínas de unión a RNA: **Nrd1**, **Nab3** y **Sen1** [17].

### ➤ Nab3

Nab3 (*nuclear polyadenilated RNA-binding protein*) es una proteína nuclear de unión al RNA poliadenilado. Tiene un dominio de reconocimiento de RNA (RRM, *RNA recognition motif*) por el que se une a éste, y que es esencial para la viabilidad celular. Flanqueando el dominio RRM hay dos dominios de baja complejidad, como una región rica en aspartato/ácido glutámico en el extremo amino-terminal y una región rica en glutamina/prolina en el extremo C-terminal (Figura 2A). Además, Nab3 se une al RNA en una secuencia específica UCUUG [17].

Nab3 se asocia con Nrd1 formando un heterodímero estable. Este heterodímero permite el reclutamiento de la helicasa Sen1, mediado por Nab3 [17].

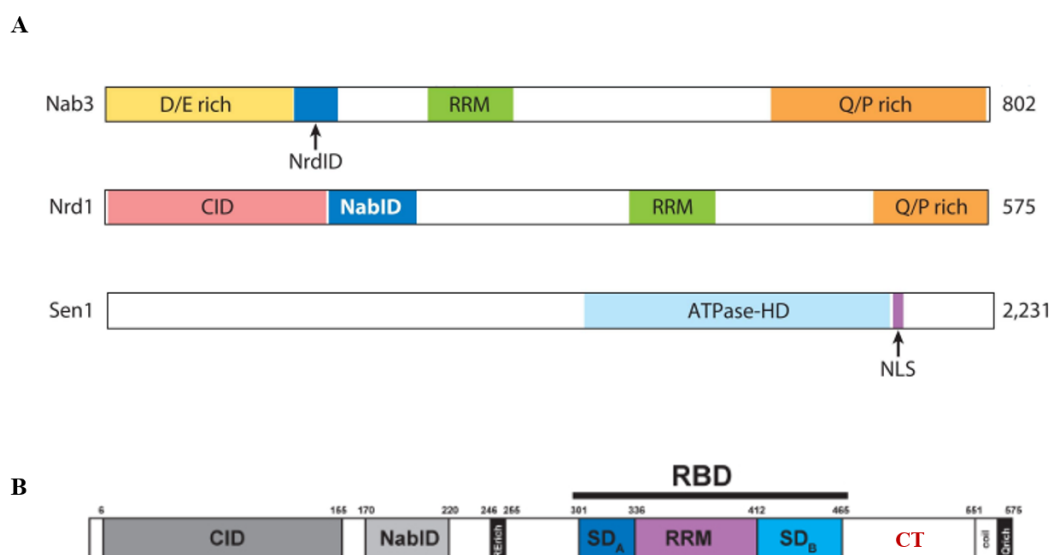
### ➤ Nrd1

Nrd1 (*nuclear pre-mRNA downregulation protein*) es un factor de transcripción que también contiene un dominio **RRM** que le permite unirse al RNA en una secuencia consenso GUAA/G. Además, Nrd1 contiene un dominio de interacción con el CTD de Rpb1 en su extremo N-terminal (**CID**, *CTD interaction domain*). De hecho, interacciona específicamente con el residuo fosforilado Ser5 (Ser5P). Junto al CID, aparece un dominio de interacción con el factor Nab3 (**NabID**), mediante el cual puede formar heterodímeros Nrd1-Nab3, importante para la terminación [17]. Recientemente se ha demostrado que, flanqueando el dominio RRM, aparece un dominio **SD** ("*split domain*") dividido en dos, **SD<sub>A</sub>** a la izquierda de RRM y **SD<sub>B</sub>** a la derecha. Dicho dominio es esencial para la viabilidad celular [18] y junto con el dominio RRM forman uno más grande denominado **RBD** (*RNA binding domain*) (Figura 2A y 2B) [18].

Como se ha dicho anteriormente, Nrd1 se une al RNA en una secuencia GUAA/G. Sin embargo, se ha demostrado que Nrd1 tiene cuatro veces más afinidad por GUAA que por GUAG en su unión al RNA. Esto se debe a que Nrd1 se puede unir a transcritos que contengan las secuencias GUAA, CGUAAA y UUAGUAAUCC. Estas tres secuencias están presentes en los transcritos procesados por la vía NNS. Por lo tanto, el dominio RBD es el protagonista en la unión de Nrd1 al RNA, gracias a los dominios estructurales que lo forman [18]. Además, Nrd1 aparentemente posee un **dominio carboxilo-terminal (CT)** (Figura 2B), desde el aminoácido 465 al 575, de función desconocida hasta el momento. Este dominio C-terminal (CT) es muy importante para el crecimiento celular [18].

## ➤ Sen1

Sen1 es una helicasa nuclear de ácidos nucleicos de la Superfamilia I y de escasa abundancia en comparación con Nab3 y Nrd1 (Figura 2A) [17]. La helicasa Sen1 promueve la escisión del transcrito de la RNAPII [17].



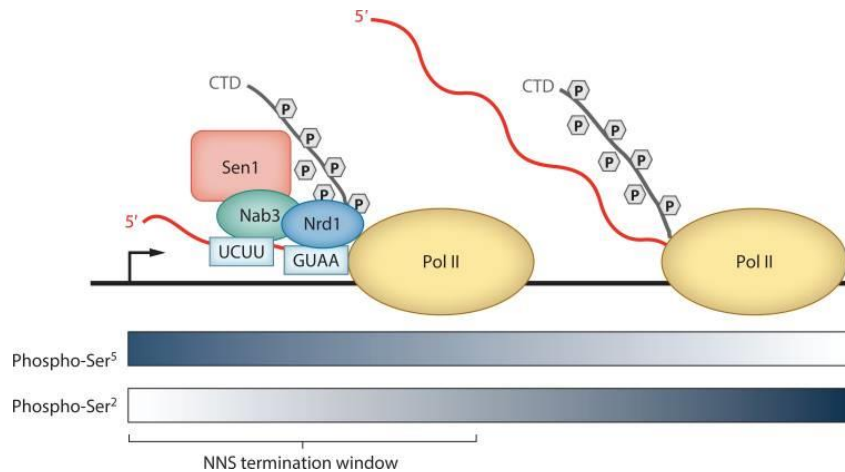
**Figura 2.** A) Dominios estructurales principales de Nab3, Nrd1 y Sen1. La longitud de las proteínas está indicada en número de aminoácidos (derecha). Los tamaños de los dominios de cada una están a escala en función del tamaño. Tomada de [17]. B) Representación esquemática de los dominios de Nrd1 y su posición indicada en aminoácidos. Tomada de [18].

### ▪ Ensamblaje del complejo Nrd1-Nab3-Sen1 (NNS)

A medida que avanza el proceso de transcripción de los snRNAs, Nrd1 y Nab3 reconocen secuencias nucleotídicas en el RNA naciente y se van asociando. Nrd1 se asocia principalmente a residuos fosforilados de Ser5 del CTD de la RNAPII y a la secuencia GUAA del RNA naciente (Figura 3). Por otra parte, Nab3 reconoce la secuencia UCUU y a medida que avanza el proceso de terminación, se van asociando y formando **heterodímeros Nrd1-Nab3** (Figura 3). La formación del heterodímero permite el reclutamiento de la helicasa Sen1, mediado por Nab3, que promueve la escisión del RNA pequeño no codificante de la RNAPII [17].

Como ya hemos adelantado, la RNAPII puede estar fosforilada en dos residuos del CTD: Ser2 (Ser2P) y Ser5 (Ser5P). Al inicio de la transcripción predomina la forma Ser5P, y a medida que se avanza en la elongación la RNAPII va a ser fosforilada en los residuos Ser2P (Figura 3) [17]. La transición de la forma Ser5P a la Ser2P ocurre cuando se ha sintetizado un transcrito de varios nucleótidos de

longitud. En el caso de los transcritos cortos (snRNAs), actúa de señal para que comience la terminación mediada por la vía NNS. Por tanto, las fosforilaciones en Ser2 y Ser5 son las modificaciones más importantes que sirven de señal al CID de Nrd1 para llevar a cabo la terminación por la vía NNS [17].



**Figura 3. Asociación del complejo Nrd1-Nab3-Sen1 (NNS) con el RNA naciente y la RNAPII.** Se representan las secuencias del RNA de unión de Nrd1 y Nab3 y además, la interacción entre RNAPII y Sen1. En la parte inferior de la figura, están representados los cambios en la fosforilación en Ser2 y Ser5 a medida que avanza la transcripción [17].

Dado que la fosforilación del CTD es importante para la terminación de los snRNAs, sobre todo la fosforilación en el residuo Ser5P [17], y que el heterodímero Rpb4/7 es importante para modular dicha fosforilación [7], la pregunta que nos hicimos es si Nrd1 se asocia a la RNAPII a través de Rpb4/7 para realizar su función en la terminación de los snRNAs. Además, esta pregunta surgió raíz de una serie de resultados recientemente publicados [18], que junto con resultados previos obtenidos en el laboratorio de la Dra. Calvo, nos permitieron plantear los objetivos del presente trabajo y que se describen a continuación.

## 2. Hipótesis y Objetivos

Resultados preliminares obtenidos mediante experimentos de NMR (del inglés, *nuclear magnetic resonance*), sugerían que el dominio CT de Nrd1, de función desconocida, podría interactuar con el heterodímero Rpb4/7, y que dicho dominio podría ser importante para la terminación de los snRNAs. Por tanto, la hipótesis planteada para la realización de este trabajo fue que **el heterodímero Rpb4/7 podría interactuar con Nrd1, probablemente a través de su dominio CT, para modular la terminación de los snRNAs**. Para comprobar esta hipótesis, se plantearon tres objetivos:

- 1.- Determinar si existe una interacción genética entre el dominio CT de *NRD1* y *RPB4/7*.
- 2.- Determinar si Nrd1 interactúa con Rpb4, y en caso positivo si el heterodímero Rpb4/7 es requerido para la interacción de Nrd1 con la RNAPII.
- 3.- Investigar si la sobreexpresión de *RPB4/7* es capaz de corregir los defectos en terminación de un mutante que carece del dominio CT de Nrd1.

## 3. Materiales y Métodos

### 1. Cepas utilizadas de *S. cerevisiae*

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en este trabajo aparecen en la Tabla 1.

CEPA	MATING TYPE	GENOTIPO	
OCSC0101	a	<i>wt</i>	<i>ade2-1, his3-11, 15, leu2-3, 112, trp1-1, ura3-1</i>
OCSC2065	a	<i>rpb4Δ</i>	<i>ade2-1, his3-11, 15, leu2-3, 112, trp1-1, ura3-1, RPB4::KAN</i>
OCSC2552	a	<i>wt</i>	<i>his3Δ1, leu2ΔO, met15ΔO, ura3ΔO, Nrd1-TAP::HIS3</i>
OCSC2680	a	<i>rpb4Δ</i>	<i>his3Δ1, leu2ΔO, met15ΔO, ura3ΔO, Nrd1-TAP::HIS3, rpb4::KAN clon1</i>
OCSC2681	a	<i>rpb4Δ</i>	<i>his3Δ1, leu2ΔO, met15ΔO, ura3ΔO, Nrd1-TAP::HIS3, rpb4::KAN clon2</i>
OCSC2609	a	<i>wt</i>	<i>ade2-1, his3-11, 15, leu2-3, 112, trp1-1, ura3-1</i>
OCSC2711	a	<i>wt+ pCM190</i>	<i>ade2-1, his3-11, 15, leu2-3, 112, trp1-1, ura3-1, [pCM190]</i>
OCSC2712	a	<i>wt+ pCM190-RPB4</i>	<i>ade2-1, his3-11, 15, leu2-3, 112, trp1-1, ura3-1, [pCM190-RPB4]</i>
OCSC2713	a	<i>nrd1-V468stop+ pCM190</i>	<i>ade2-1, his3-11, 15, leu2-3, 112, trp1-1, ura3-1, [pCM190]</i>
OCSC2714	a	<i>nrd1-V468stop+ pCM190-RPB4</i>	<i>ade2-1, his3-11, 15, leu2-3, 112, trp1-1, ura3-1, [pCM190-RPB4]</i>
OCSC2721	a	<i>wt+ pGEN/ pCM190</i>	<i>ade2-1, his3-11, 15, leu2-3, 112, trp1-1, ura3-1, [pGEN/ pCM190]</i>
OCSC2722	a	<i>wt+ pGEN-RPB7/ pCM190-RPB4</i>	<i>ade2-1, his3-11, 15, leu2-3, 112, trp1-1, ura3-1, [pGEN-RPB7/ pCM190-RPB4]</i>
OCSC2723	a	<i>nrd1-V468stop+ pGEN/ pCM190</i>	<i>ade2-1, his3-11, 15, leu2-3, 112, trp1-1, ura3-1, [pGEN/ pCM190]</i>
OCSC2724	a	<i>nrd1-V468stop+ pGEN-RPB7/ pCM190-RPB4</i>	<i>ade2-1, his3-11, 15, leu2-3, 112, trp1-1, ura3-1, [pGEN-RPB7/ pCM190-RPB4]</i>

Tabla 1. Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo. Se detalla el genotipo de cada una.

### 2. Medios de cultivo para *S. cerevisiae*

Los medios de cultivo empleados para *S. cerevisiae* fueron medios ricos y mínimos selectivos (SC), tanto en forma líquida como sólida. El medio rico empleado fue YEPD cuya composición es 1% de extracto de levadura, 2% de peptona bacteriológica y 2% de glucosa. Si es en forma sólida se le añade 2% de agar bacteriológico.

En cuanto a los medios mínimos selectivos (SC), se utilizaron dos: -His -Leu -Ura -Trp y -His -Leu -Ura. Ambos se utilizaron tanto en forma líquida como sólida. El medio -His -Leu -Ura -Trp se compone de 0.67% de bases nitrogenadas para levaduras (YNB, *yeast nitrogen base*), 2% de glucosa y 0.2% de *dropout mix* selectivo. El *dropout mix* selectivo es un conjunto de suplementos nutricionales, aminoácidos, vitaminas y algunas bases nitrogenadas, cuya composición puede variar en función de la auxotrofia que se desea seleccionar en cada cepa. De esta manera, para su preparación se añaden todos los componentes excepto aquel/aquellos de selección de la/las auxotrofia/s. En este caso, todos excepto histidina, leucina, uracilo y triptófano. Además, en medios sólidos se añade NaOH 5M para ajustar el pH a 5.5. En estado sólido lleva además agar bacteriológico 2%. Con respecto al medio selectivo -His -Leu -Ura, la composición es la misma que el anterior pero se le añade además triptófano 40mM, tanto en su estado líquido como sólido.



### 3. Condiciones de cultivo

Las condiciones empleadas para el cultivo en medio sólido fueron 28, 34 y 37°C. Los cultivos en medio líquido se incubaron en todos los casos a 28°C en agitación constante a 200 r.p.m. En medios líquidos, el crecimiento se controló midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 600nm en el espectrofotómetro, trabajando siempre con cultivos en fase exponencial.

### 4. Técnicas genéticas

#### 4.1 Transformación de *S. cerevisiae*

La transformación de células de levadura se realizó siguiendo el procedimiento del acetato de litio, descrito en [19]. Las células de *S. cerevisiae* objeto de transformación fueron crecidas en medio líquido YEPD a una temperatura de 28°C y en agitación constante a 200 r.p.m., como se ha indicado anteriormente. Los cultivos crecieron hasta una densidad óptica de entre 0.5-1.0, midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 600nm. Se utilizaron 5mL de cultivo por transformación y 100ng de DNA. La selección de las colonias transformantes se realizó en los medios selectivos (SC) citados anteriormente y apropiados para los plásmidos utilizados en la transformación.

### 5. Plásmidos

En la Tabla 2 aparecen los plásmidos empleados en transformación.

PLÁSMIDO	DESCRIPCIÓN	FUENTE
pGEN	Vector de clonación episomal con el marcador <i>TRP1</i> .	[20]
pGEN- <i>RPB7</i>	Vector de clonación episomal con el marcador <i>TRP1</i> que contiene el gen <i>RPB7</i> .	[21]
pCM190	Vector de clonación episomal con marcador <i>URA3</i> .	[22]
pCM190- <i>RPB4</i>	Vector de clonación episomal con marcador <i>URA3</i> que contiene el gen <i>RPB4</i> .	[23]

Tabla 2. Plásmidos empleados para las transformaciones de *S. cerevisiae* en este trabajo.

### 6. Ensayo de crecimiento celular mediante diluciones seriadas

Este ensayo sirve para analizar el crecimiento celular y consiste en la realización de diluciones seriadas, con un factor de dilución 1:10, en una placa multipocillo partiendo de una suspensión inicial con células de una determinada cepa de *S. cerevisiae*. Para ello, se depositan sobre medio sólido gotas de 1-2µL de las diluciones seriadas de las cepas objeto de estudio, equidistantes entre sí y de forma regular. Después se incuban a distintas temperaturas (28, 34, 37°C).

## **7. Métodos de Manipulación y Análisis de Proteínas**

### **7.1 Obtención de extractos proteicos y cuantificación**

Los cultivos celulares a partir de los cuales se realiza la extracción de proteínas se recogen en torno a una densidad óptica de 0.8 a 600nm. Se recogen las células mediante centrifugación y el precipitado celular es lavado primero con agua estéril fría y después con tampón de lisis frío (HEPES-KOH 20mM pH 7.6, acetato potásico 200mM, glicerol 10% (v/v) y EDTA 1mM). La lisis celular se realiza en tampón de lisis con inhibidores de proteasas (cóctel de inhibidores de proteasas Sigma-Aldrich en una dilución 1:10), PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 10mM, e inhibidores de fosfatasas (NaF 10mM y ortovanadato sódico 20mM). La lisis celular se lleva a cabo usando perlas de vidrio de 45µm y un sistema Fast-Prep (Bio-Rad), que rompe las células en cinco choques a una velocidad de 4.5K durante 20 segundos con intervalos de descanso en hielo. Por último, se separan mediante centrifugación el precipitado y el sobrenadante, donde se encuentran las proteínas. Todo el proceso se lleva a cabo en frío (4°C).

Además de este método, se empleó el sistema Freezer/Mill 6770 (Spex Sample Prep) para la rotura celular mediante lisis mecánica. Igual que en el caso anterior, la rotura celular se realiza en tampón de lisis con inhibidores de proteasas y fosfatasas. En este caso se realizan cuatro choques de un minuto a 15CPS con periodos de enfriamiento de un minuto. La ventaja de este método es que los extractos proteicos se mantienen congelados durante el proceso de rotura mecánica, evitando su calentamiento y reduciendo al máximo el problema de la degradación de las proteínas.

Una vez obtenido el extracto de proteínas, se lleva a cabo la cuantificación de la concentración total midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 280nm utilizando el equipo de espectrofotometría NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Para ello se realizan diluciones 1:5 del extracto proteico.

### **7.2 Co-inmunoprecipitación de proteínas (Co-IP)**

Los ensayos de co-inmunoprecipitación se llevaron a cabo con una cantidad de proteína variable entre 2.5-10mg. En primer lugar, se llevó a cabo un periodo de incubación de la proteína con 30µL de IgG-sepharosa (inmunoglobulina G-sepharosa) o 5µL de anti-Rpb3 durante dos horas en agitación y en frío (4°C) en un volumen final de 300µL en tampón de lisis con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Después del periodo de incubación, en el caso de que la co-inmunoprecipitación se realice con IgG, se realizan tres lavados de 3 minutos con tampón de lisis en agitación y en frío (4°C). Para ello, se centrifuga a 5000 r.p.m. durante un minuto y se deshecha el sobrenadante con las proteínas que no se han unido. Después se le añade 20µL de tampón de carga Laemli 2X y se calientan a 65°C durante

20 minutos, previamente a la electroforesis. En el caso de la incubación con anti-Rpb3, después del primer periodo de incubación le sigue un segundo con 30 $\mu$ L de proteína A-sepharosa (Amersham) en las mismas condiciones que el anterior. Al finalizar este segundo periodo de incubación, se procede de la misma manera que se ha explicado anteriormente.

### **7.3 Análisis por *Western Blot***

El análisis de proteínas por *Western Blot* se realizó mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes. Previamente, como se ha dicho más arriba, las muestras se calientan a 65°C durante 20 minutos en dilución en tampón de lisis y tampón de carga Laemli 2X.

Las electroforesis de las proteínas se realizaron en un geles de poliacrilamida desnaturizantes (SDS-PAGE) de diferentes porcentajes (6, 10, 12 o 6/12%), en función del tamaño de las proteínas objeto de estudio. Estos geles contienen acrilamida al 30%, Tris 1.5 M pH 8.8, SDS 10%, APS (persulfato de amonio) 10% y TEMED (tetrametiletilendiamina). La electroforesis de proteínas se realizó a voltaje constante entre 100-130V en tampón de carrera compuesto por Tris-base 25mM, glicina 250mM y SDS 0.1% (p/v). Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Millipore) mediante electrotransferencia húmeda a 200mA, durante 2-3 horas en frío. El tampón de transferencia empleado contiene Tris-base 50mM, glicina 380mM y metanol 10% (v/v). Una vez finalizada la transferencia a la membrana, ésta se bloquea con una solución de bloqueo compuesta por leche desnatada en polvo 5% (p/v) en PBS (tampón fosfato salino), durante 20-30 minutos a temperatura ambiente en agitación. El tampón PBS contiene NaCl 137mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM, KCl 2.7mM pH 7.4.

A continuación, se incuba la membrana con el anticuerpo primario correspondiente en dilución en una solución con leche desnatada en polvo 1% (p/v) y Tween-20 0.05% (v/v) en PBS. El tiempo de incubación con el anticuerpo primario varió, desde 2 horas a temperatura ambiente a toda una noche a 4°C en agitación. Después se realizan tres lavados de 5 minutos con PBS 1X a temperatura ambiente en agitación. Tras la incubación con el anticuerpo primario, se realiza una segunda incubación con el anticuerpo secundario durante 30 minutos a temperatura ambiente en agitación. El anticuerpo secundario se utiliza diluido en la misma solución que el primario. Como en el caso anterior, se realizan tres lavados de 5 minutos con PBS 1X.

Por último, las proteínas transferidas a la membrana se detectan mediante quimioluminiscencia. Para ello, se emplearon los sistemas Westar  $\eta$ C 2.0 Chemiluminescent substrate for Western Blotting (Cyanagen) y Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo scientific), siguiendo las

instrucciones del fabricante. Además, se emplearon películas de autorradiografía (Agfa) para detectar la quimioluminiscencia y así poder visualizar las proteínas correspondientes. Para revelar las películas se emplea el sistema M35 X-OMAT Processor (Kodak).

## 7.4 Anticuerpos

Los anticuerpos primarios y secundarios empleados aparecen en la Tabla 3.

ANTICUERPOS PRIMARIOS		ANTICUERPOS SECUNDARIOS	
ANTICUERPO	ESPECIFICIDAD	ESPECIFICIDAD	CONJUGACIÓN
anti-TAP	Proteína Nrd1 etiquetada con el epítipo TAP	Conejo	Peroxidasa
anti-Pgk1	3-Fosfoglicerato quinasa (Pgk1)	Ratón	Peroxidasa
anti-Rpb1	Dominio C-terminal de la subunidad Rpb1 de la RNAPII (CTD)	Ratón/Conejo	Peroxidasa
anti-Rpb3	Subunidad Rpb3 de la RNAPII	Ratón	Peroxidasa
anti-Rpb4	Subunidad Rpb4 de RNAPII	Ratón	Peroxidasa
anti-Ser5P	Ser5 del CTD de Rpb1 fosforilada	Ratón	Peroxidasa

**Tabla 3. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados.** Se detalla la especificidad de cada uno y además, la enzima que llevan conjugada los anticuerpos secundarios.

## 8. Métodos de Manipulación y Análisis de RNA

### 8.1 Aislamiento de RNA total de levadura y cuantificación

La extracción de RNA total de *S. cerevisiae* se realizó siguiendo el protocolo descrito en [24]. La extracción se llevó a cabo a partir de cultivos a una densidad óptica de 1.0 a 600nm. Las células se recogieron por centrifugación y lavando con agua estéril. Todo el proceso de recogida tiene lugar en frío (4°C). En este punto, las células pueden ser congeladas en hielo seco para continuar posteriormente. A continuación, se le añade al precipitado celular 300µL de tampón AE (NaAc 50mM, EDTA 10mM pH 5.2) y 30µL de SDS 10%. Posteriormente, a esta mezcla se le añade 396µL de fenol ácido saturado, previamente calentado a 65°C. Después, se somete a la muestra, durante 5 minutos, a intervalos de 20 segundos de agitación en el vórtex y de calentamiento a 65°C, alternativamente. Acto seguido, se enfría en hielo seco y se centrifuga a temperatura ambiente durante 5 minutos a 13200 r.p.m. Se recupera el sobrenadante y se deshecha el precipitado. Se repite de nuevo el proceso con fenol ácido saturado y seguidamente, se realiza una nueva extracción con 396µL de fenol ácido:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Se mezcla bien en el vórtex y se centrifuga a temperatura ambiente durante 5 minutos a 13200 r.p.m. Se recupera el sobrenadante y posteriormente, se deja precipitando el RNA durante una noche con 760µL de etanol 100% y 30µL de NaAc 3M pH

5.2 en frío (-20°C). Al día siguiente, se centrifuga la mezcla durante 30 minutos a 4°C a 13200 r.p.m. y se retira el sobrenadante. Después se lava con 1mL de etanol 70% (v/v) y se centrifuga durante 10 minutos a 13200 r.p.m. a 4°C y se deshecha el sobrenadante. Finalmente, el precipitado se seca en el sistema Speed Vac Concentrator y se resuspende en 50µL de agua. Todo el proceso de extracción se realiza en condiciones completamente estériles y todas las soluciones acuosas se preparan con agua DEPC 0.1%. Este reactivo inhibe las RNAasas y evita la degradación de los RNAs.

Una vez obtenidos los RNAs, su concentración en cada muestra se determina midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260nm utilizando el equipo de espectrofotometría NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Además, se determina la relación 260/280 y 260/230 para comprobar la pureza de la muestra.

## **8.2 Electroforesis de RNA**

La calidad de los RNAs obtenidos se comprobó por electroforesis en gel de agarosa al 1.8% teñidos con bromuro de etidio (BrEt). Estos geles contienen tampón TAE 1X (Tris-acetato 40mM, EDTA 1mM), 1.8% de agarosa (p/v) y bromuro de etidio (100µg/mL). A las muestras se les añadió tampón de carga 6X (azul de bromofenol 0.25% (p/v), xilencianol 0.25% (p/v), glicerol 30% (v/v)) y se calentaron durante 30 minutos a 37°C. La electroforesis se realizó a voltaje constante (90-110V) en tampón TAE 1X. Se prestó especial cuidado al lavado de la cubeta de electroforesis, que se trató previamente con SDS 10% y agua estéril.

La visualización del RNA se llevó a cabo mediante iluminación con luz UV utilizando el equipo Gel Doc XR (Bio-Rad). Como se ha dicho anteriormente, el gel de agarosa contiene bromuro de etidio. Este compuesto se intercala entre las bases nitrogenadas del RNA y al ser excitado con luz UV emite luz.

Además, la calidad y la concentración de los RNAs purificados se determinaron en el Servicio de Genómica del Centro de Investigación del Cáncer (CIC) en un bioanalizador.

## 4. Resultados y Discusión

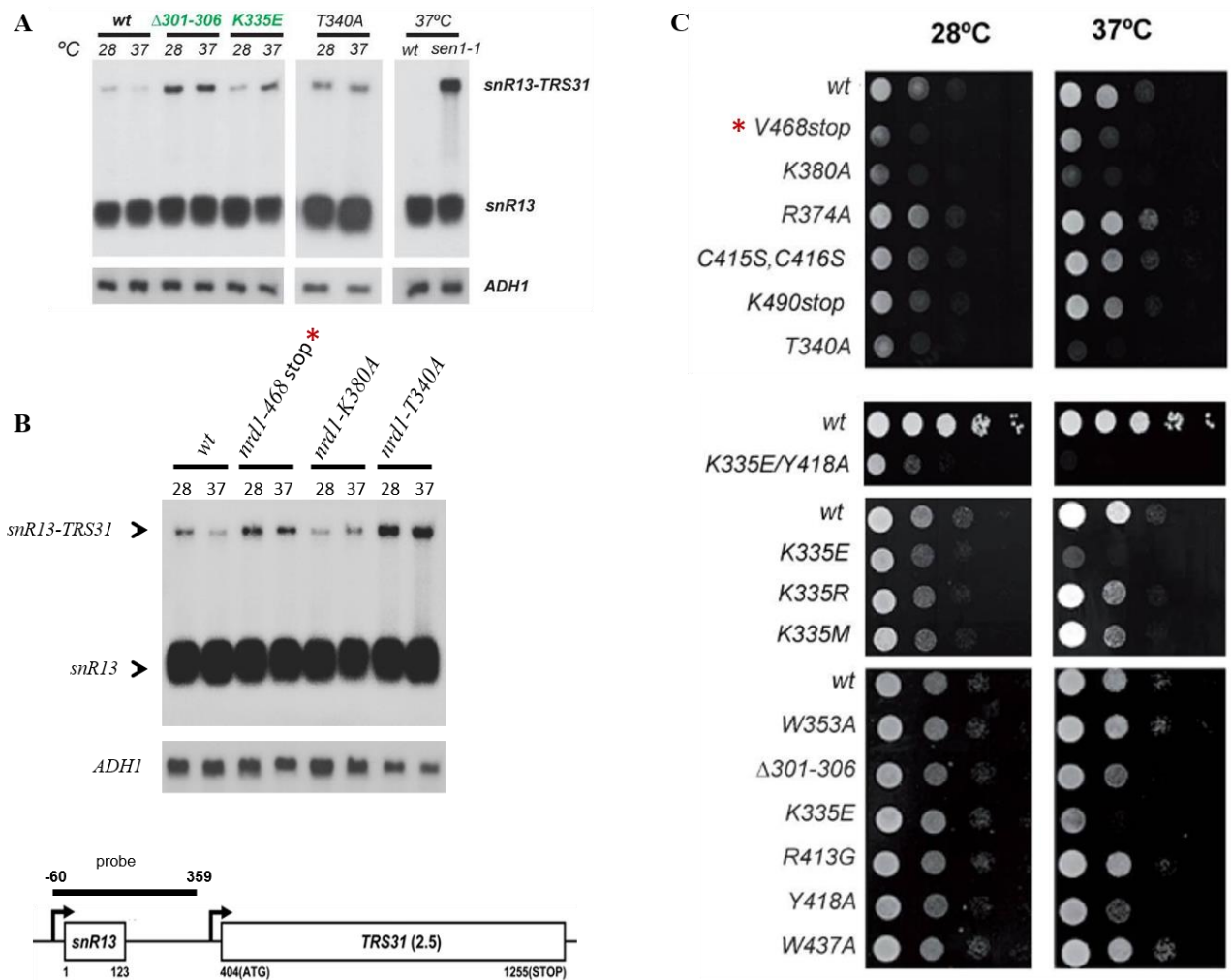
### 4.1 Antecedentes

Como se ha adelantado en la Introducción, Nrd1 tiene un tamaño de 575 aminoácidos y está formado por varios dominios (Figura 2B). Entre ellos, está un dominio RRM de unión a RNA, un dominio de interacción con el CTD de Rpb1 (CID) y junto a él aparece un dominio de interacción con el factor Nab3 (NabID). En un trabajo reciente, se ha demostrado que existe un dominio SD flanqueando el RRM, dividido en dos  $SD_A$  y  $SD_B$ . Los dominios SD y RRM juntos forman uno más grande denominado RBD. Se investigó si el dominio SD afectaba a la supervivencia celular y se observó que su delección total o parcial ( $\Delta SD_A = \Delta 301-336$  o  $\Delta SD_B = \Delta 412-463$ ) en cepas de *S. cerevisiae* resultaba en letalidad celular. Todas las cepas que portaban la eliminación total o parcial del SD eran inviables. Por tanto, se concluyó que el SD es un dominio esencial para la viabilidad celular y además, se observó que es clave para el reconocimiento específico de las regiones terminadoras del RNA [18]. Por otra parte, se obtuvieron mutantes en estos dominios que presentaban defectos en el crecimiento, con los que se determinó que también presentaban defectos en la terminación a las temperaturas de 28 y 37°C. Para ello, se analizó la terminación de la transcripción del transcrito *SNR13* en dichos mutantes mediante *Northern blot* (Figura 4A), y se usó como control positivo de defectos en terminación el mutante *sen1-1* crecido a 37°C.

Además de los dominios mencionados, Nrd1 posee un dominio carboxilo-terminal (CT) altamente conservado, desde el aminoácido 465 al 575, de función aparentemente desconocida hasta el momento. Se ha observado que este dominio CT es muy importante para el crecimiento celular [18], y se especuló que su función podría estar implicada en la terminación de la transcripción de los snRNAs. Con esta idea, se construyeron nuevos mutantes de Nrd1 para investigar la relevancia funcional de este dominio en la terminación de los snoRNAs.

Para ello, se introdujeron codones *stop* en varias posiciones después del RBD (Figura 4B y 4C). Algunas de estas mutaciones no causaron defectos en el crecimiento celular (Figura 4C). Esto llevó a pensar que el dominio CT no era esencial para la función de Nrd1 y por tanto, para la viabilidad celular [18]. Sin embargo, la **mutación V468stop**, en la que se sustituyó el aminoácido V468 por un codón de parada (*nrd1-V468stop*) y que genera una proteína Nrd1 sin el dominio CT, provocaba defectos significativos en el crecimiento a todas las temperaturas estudiadas [18]. Por tanto, se pensó que esta mutación podría alterar alguna función del dominio RBD de Nrd1 no relacionada en la interacción con el RNA, pero quizás sí con la terminación [18]. Mediante *Northern blot*, se analizó el defecto de terminación del transcrito *SNR13* en el mutante *nrd1-V468stop* y se utilizaron como

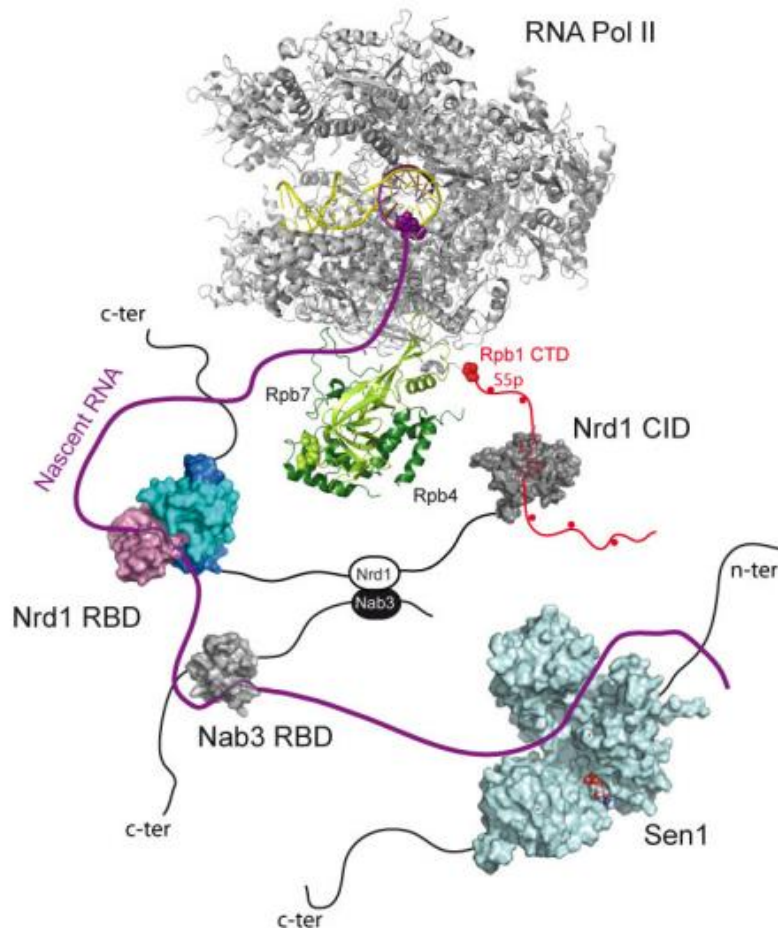
controles negativo y positivo de defecto en terminación dos mutantes del dominio SD, *nrd1-K380A* y *nrd1-T340A*, respectivamente. Como se observa en la Figura 4B, el mutante *nrd1-V468stop* presenta un claro defecto en la terminación del transcrito. En este trabajo, decidimos profundizar en el estudio de este mutante, como parte del objetivo 1, investigando si existe una interacción genética entre el dominio CT de *NRD1* y *RPB4/7*.



**Figura 4. Análisis funcional del dominio RBD de Nrd1.** A) Análisis por *Northern blot* de los genes *SNR13* y *ADH1* en las cepas silvestre (*wt*) y mutantes del dominio SD. Además, la cepa *sen1-1* se usó como control positivo para los defectos en terminación. Este mutante presenta defectos en terminación muy acusados solamente a 37°C. El RNA total fue purificado de los cultivos crecidos a las temperaturas de 28 y 37°C. Figura tomada de [18]. B) Análisis por *Northern blot* donde se analiza la terminación del transcrito *SNR13* en las cepas silvestres (*wt*). Se analizaron los niveles del transcrito *ADH1* como control de carga. Abajo aparece una representación esquemática del gen *SNR13*. C) Análisis del crecimiento de varios mutantes de *nrd1*, tanto en los dominios SD y RRM como CT, en el que se incluye el mutante *nrd1-V468stop*. Dicho mutante presenta claramente un defecto en crecimiento a 28 y 37°C. Se realizaron diluciones seriadas (1:10) del *wt* y los mutantes de *nrd1* sobre medios selectivos (SC), que se incubaron durante 2-3 días a las temperaturas indicadas. Figura tomada de [18].



Nrd1 interacciona con el RNA naciente y con la RNAPII a través de los residuos fosforilados de Ser5 (Ser5P) del heptapéptido consenso del dominio CTD de la subunidad Rpb1 de la RNAPII (Figura 5). Nrd1 interacciona también con Nab3 formando un heterodímero en la formación del complejo NNS (Figura 5). La formación de este heterodímero permite el reclutamiento de la helicasa Sen1 al complejo NNS, mediado por Nab3 [17, 18]. Por otro lado, parece ser que el RNA naciente hace contacto con Rpb7 [25], y que Nrd1 en *Schizosaccharomyces pombe* interacciona físicamente con Rpb7 a través de su dominio CT [26]. Así pues, el fenotipo sensible a la temperatura que muestra el mutante *nrd1-V468stop* podría deberse a la interrupción total o parcial de la interacción de Nrd1 con la RNAPII. Según el modelo propuesto recientemente [18], la interacción Rpb7-Nrd1 podría permitir que el dominio RBD se posicione hacia el canal de salida del RNA naciente, permitiendo así un reconocimiento temprano de las secuencias GUAA/G, lo cual puede desencadenar la terminación de la transcripción.



**Figura 5. Modelo estructural del complejo NNS y de la RNAPII en la terminación de la transcripción por la vía NNS propuesto por Franco-Echevarría *et al.* [18].** El DNA aparece coloreado en amarillo y el RNA naciente en morado. Las subunidades Rpb4 y Rpb7 aparecen coloreadas en dos tonos de verde diferentes. También aparecen representados los factores de transcripción de la vía NNS Nrd1, Nab3 y Sen1. El Rpb1-CTD fosforilado en Ser5 (S5P) se muestra como una línea roja y algunos de sus residuos aparecen conectados al CID de Nrd1. El orden de Nrd1, Nab3 y Sen1 mostrado no se corresponde con el que es en la realidad en el complejo NNS. Tomada de [18].



Así pues, basándonos en datos publicados previamente: 1) Nrd1 interacciona con Rpb7 [26]; 2) Nrd1 se asocia con la RNAPII fosforilada, cuyos estados de fosforilación son regulados por Rpb4/7 [7]); y datos preliminares obtenidos en el laboratorio de la Dra. Olga Calvo en los que se demuestra que el mutante *nrd1-V468stop* presenta defectos en la terminación del *SNR13* (Figura 4B), comenzamos a realizar las investigaciones sobre los objetivos planteados para comprobar nuestra hipótesis de partida. El objetivo principal de este trabajo ha sido averiguar la relación funcional entre Nrd1 y Rpb4/7 durante la terminación de los snRNAs.

## 4.2 Resultados y discusión

### 1. El dominio CT interacciona genéticamente con *RPB4/7*.

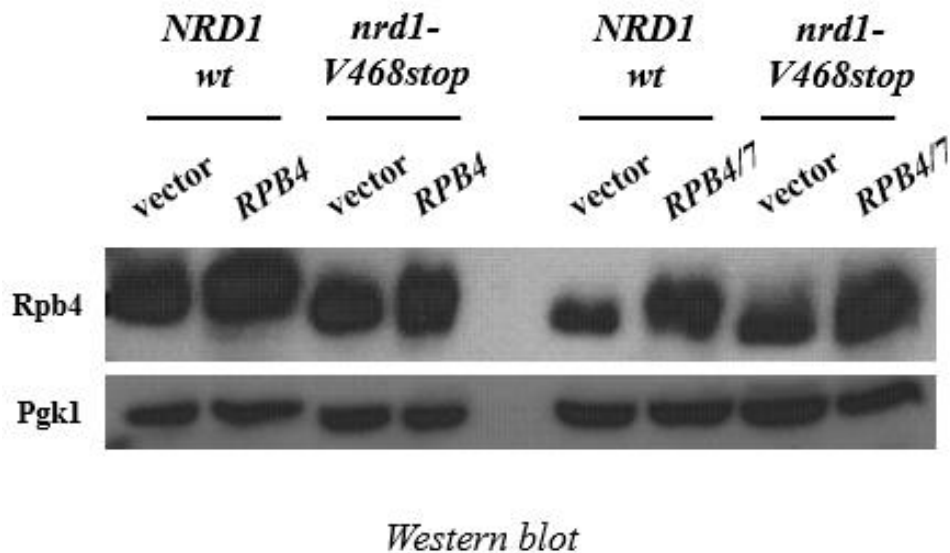
Para estudiar si *NRD1* y *RPB4/7* interaccionan genéticamente, se decidió estudiar el efecto de la sobreexpresión, bien de *RPB4* sólo o del heterodímero completo *RPB4/7* en la cepa mutante *nrd1-V468stop*. Para ello, se llevaron a cabo las siguientes transformaciones:

- 1) Se transformó el mutante *nrd1-V468stop*, por un lado con un plásmido que sobreexpresa *RPB4* (pCM190-*RPB4*) y por otro lado con el mismo plásmido pero vacío (pCM190). Ambos plásmidos llevan como marcador el gen *URA3* para su selección.
- 2) Se transformó el mutante *nrd1-V468stop*, por un lado con dos plásmidos, uno sobreexpresando *RPB4* (pCM190-*RPB4*) y otro *RPB7* (pGEN-*RPB7*), y por otro lado, los plásmidos vacíos (pCM190 y pGEN) con los marcadores *URA3* y *TRP1* para su selección, respectivamente.

Una vez transformadas las cepas, los transformantes correspondientes se crecieron para obtener extractos celulares totales y comprobar mediante análisis de *Western blot* que efectivamente *RPB4* se está sobreexpresando. Solamente se llevó a cabo el análisis de Rpb4 puesto que disponemos de anticuerpos comerciales que reconocen dicha proteína. No pudimos hacer lo mismo en el caso de Rpb7, ya que no hay anticuerpos disponibles.

Entonces, procedimos a comprobar mediante ensayos de *Western blot* si dichas cepas sobreexpresaban *RPB4*. Para ello, analizamos los niveles de Rpb4 utilizando extractos celulares totales de la cepa silvestre (*wt*) y el mutante *nrd1-V468stop*, transformadas con los distintos plásmidos. Se cargaron 100µg de proteína total y se utilizó el anticuerpo anti-Rpb4 para detectar la sobreexpresión de la proteína Rpb4. Como se puede observar en la Figura 6, las cepas transformadas con el plásmido que contiene *RPB4* sobreexpresan Rpb4 a un nivel mayor que las cepas transformadas

con el vector vacío. De igual manera sucede en las cepas transformadas con los plásmidos que contienen *RPB4* y *RPB7* (Figura 6).

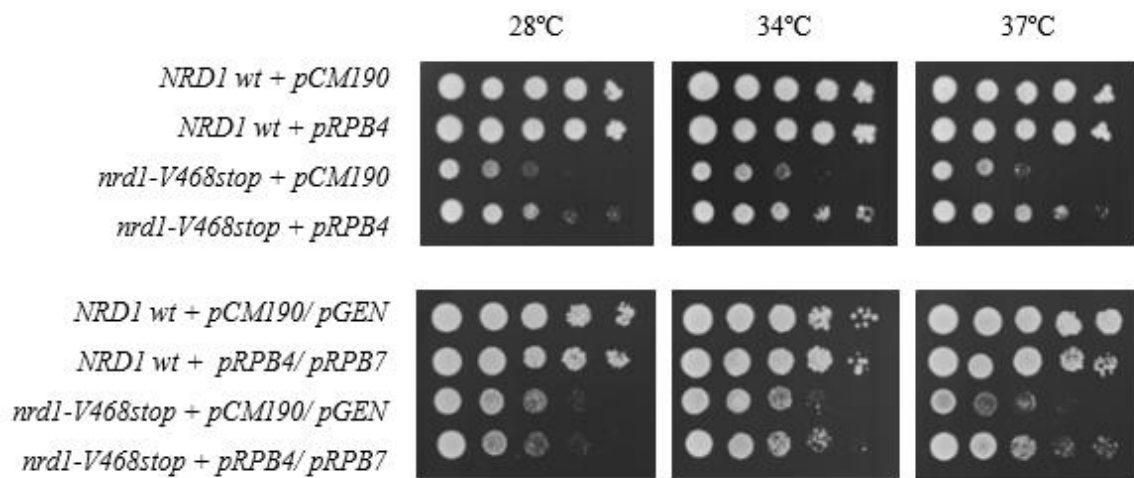


**Figura 6. Análisis de la sobreexpresión de *RPB4*.** Análisis por *Western blot* de la sobreexpresión de *RPB4* en extractos celulares totales de la cepa silvestre (*wt*) y el mutante *nrd1-V468stop*, transformadas con un plásmido vacío (vector) y con un plásmido que contiene *RPB4*. Se cargaron 100µg de proteína. Los niveles de la proteína Pgk1 se emplearon como control de carga.

A continuación, se analizó mediante crecimiento en placa si la sobreexpresión de *RPB4* sólo o de *RPB4/7* tenía algún efecto sobre el crecimiento del mutante *nrd1-V468stop*. Para ello, se realizaron ensayos de crecimiento celular mediante diluciones seriadas. Como puede observarse en la Figura 7A, la sobreexpresión de *RPB4* no tiene ningún efecto sobre la cepa silvestre (*wt*), mientras que es capaz de corregir significativamente los defectos en crecimiento del mutante *nrd1-V468stop* a todas las temperaturas testadas. Resultados similares se obtuvieron al sobreexpresar el heterodímero completo (Figura 7B).

Como se ha comentado con anterioridad, la subunidad Rpb7 interacciona con el RNA nascente y con el núcleo de la RNAPII por mediación de Rpb4 [25]. Además, en *S. pombe* Nrd1 interacciona con Rpb7 a través de su dominio CT [26]. Esta interacción permitiría que Nrd1 contacte con la RNAPII a través de Rpb7 y con el RNA nascente durante la terminación de la transcripción, probablemente permitiendo así la terminación de los snRNAs [18, 26]. Por otra parte, Nrd1 contacta con los residuos fosforilados de Ser5 (Ser5P) de la subunidad Rpb1 de la RNAPII a través de su dominio CID y con el RNA nascente a través del dominio RBD.

El mutante *nrd1-V468stop* carece de dominio CT y, si al igual que en el caso de *S. pombe*, en *S. cerevisiae* este dominio es necesario para la interacción con Rpb7, es posible que en este mutante la interacción Nrd1-Rpb7 sea defectuosa. De hecho, es posible que debido a la ausencia del dominio CT en el mutante *nrd1-V468stop*, Nrd1 no se pueda unir correctamente a Rpb7 y por ende, a la RNAPII. Por lo tanto, su función en la terminación de los snRNAs se verá afectada. Así pues, este podría ser el motivo por el que el mutante *nrd1-V468stop* presenta defectos en crecimiento a todas las temperaturas estudiadas, dada la esencialidad de la terminación de la transcripción de los snRNAs.



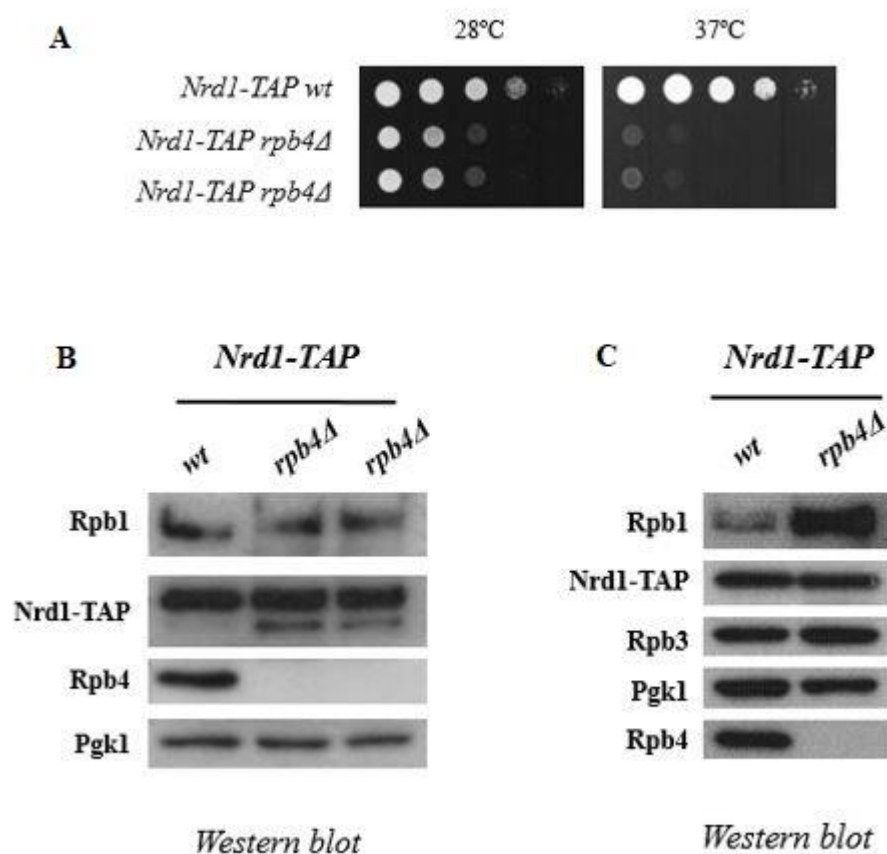
**Figura 7. Análisis de la sobreexpresión de *RPB4/7*.** Ensayo de crecimiento celular mediante diluciones seriadas (1:10) en medio SC de la cepa silvestre (*wt*) y el mutante *nrd1-V468stop*, transformadas con los plásmidos que sobreexpresan *RPB4* (A) y *RPB4/7* (B). Los cultivos crecieron durante 2-3 días a las temperaturas indicadas.

Como se ha observado, la sobreexpresión de *RPB4* (Figura 7A) y la co-expresión de *RPB4/7* (Figura 7B) corrigen los defectos en crecimiento a todas las temperaturas estudiadas. Esto pone de manifiesto que existe una clara interacción genética entre *NRD1* y *RPB4/7*, y es posible que exista una relación funcional entre *RPB4/7* y *NRD1* en la terminación de la transcripción de los snRNAs.

## 2. Rpb4 interacciona con Nrd1.

El siguiente paso fue determinar si Nrd1 interacciona con Rpb4, y en caso positivo si el heterodímero Rpb4/7 es requerido para la interacción de Nrd1 con la RNAPII. Para ello se planificaron experimentos de co-immunoprecipitación, en primer lugar inmunoprecipitando Nrd1 y en segundo lugar, inmunoprecipitando Rpb3. Para ello se utilizaron las siguientes cepas: una cepa silvestre (*wt*) y una cepa en la que se ha eliminado el gen *RPB4* (*rpb4Δ*), en las que Nrd1 se ha etiquetado con el epítipo TAP para poder ser detectado (Materiales y Métodos, Tabla 1).

Antes de realizar los ensayos de co-immunoprecipitación, primero se procedió a comprobar las cepas Nrd1-TAP *wt* y Nrd1-TAP *rpb4Δ* mediante ensayos de crecimiento celular y *Western blot* (Figura 8). Para ello, se seleccionaron dos clones *rpb4Δ*, que se habían generado previamente en el laboratorio.



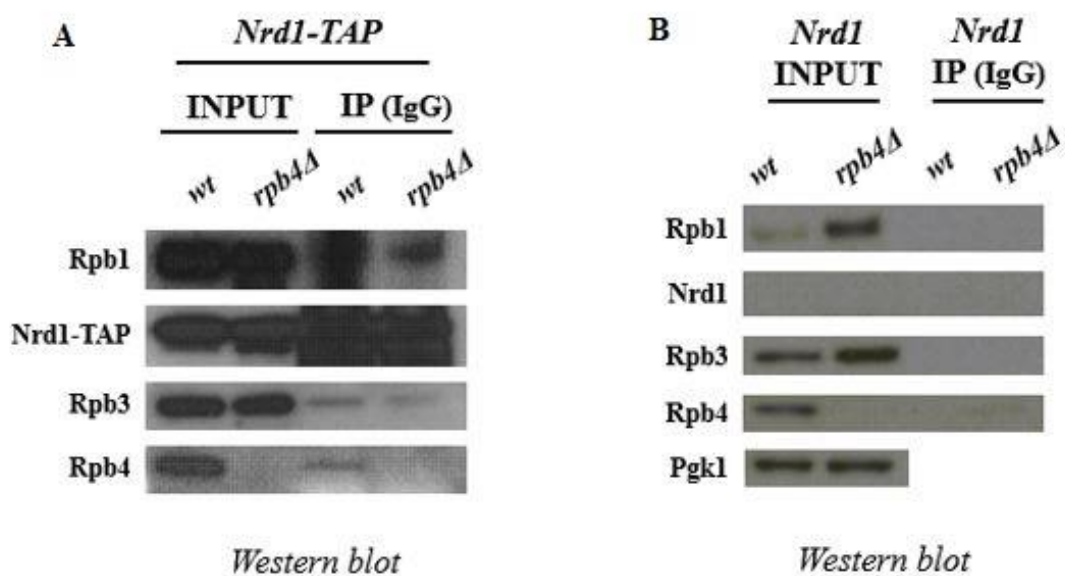
**Figura 8. Comprobación de las cepas Nrd1-TAP *wt* y *rpb4Δ*.** A) Ensayos de crecimiento celular mediante diluciones seriadas (1:10) en medio rico YEPD. Los cultivos crecieron durante 2-3 días a las temperaturas indicadas. B) y C) *Western blots* de los extractos celulares totales de las cepas Nrd1-TAP *wt* y *rpb4Δ*. Se cargaron 200μg de proteína. Los anticuerpos empleados fueron anti-Rpb1, anti-TAP, anti-Rpb3, anti-Rpb4 y anti-Pgk1. Los niveles de la proteína citosólica Pgk1 se emplearon como control de carga.

En la Figura 8A, se analiza el crecimiento celular mediante diluciones seriadas de las cepas *wt* y *rpb4Δ*. Como puede observarse, las cepas *rpb4Δ* muestran graves defectos en crecimiento tanto a 28°C como a 37°C a causa de la delección de *RPB4*, corroborada por *Western blot* (Figura 8B), y de acuerdo con trabajos previos publicados (Allepuz-Fuster *et al.* 2014). Por otro lado, se observa como ambas cepas, *wt* y *rpb4Δ*, expresan a niveles similares la proteína Nrd1-TAP, reconocida por el anticuerpo anti-TAP. En la Figura 8C, se muestra un ensayo de *Western blot* donde se presentan todas las proteínas que se van a analizar en los ensayos de Co-IP, estas son: las subunidades del núcleo de la RNAPII Rpb1 y 3, el factor Nrd1 etiquetado con el epítipo TAP, la subunidad Rpb4 del heterodímero y por último Pgk1, cuyos niveles se analizarán como control de la carga en todos los ensayos de *Western blot*. Además, se realizaron alícuotas de los extractos celulares totales analizados en la Figura 8C, que se usaron posteriormente en los ensayos de Co-IP, por lo que el control de carga es el mismo en tales ensayos.

A continuación, se procedió a estudiar la interacción entre Nrd1 y la RNAPII mediante ensayos de co-inmunoprecipitación (Co-IP) y *Western blot*. En los ensayos de Co-IP en los que se inmunoprecipitó Nrd1 se empleó la resina IgG-sepharosa (inmunoglobulina G-sepharosa), capaz de unirse al epítipo TAP que expresa Nrd1. Una vez unida la proteína Nrd1-TAP a la resina IgG a través del epítipo, se inmunoprecipita el complejo unido a Nrd1. Tras varios lavados, se eluye el complejo y a continuación, se analiza el mismo mediante ensayos de *Western blot* (como se ha explicado en Materiales y Métodos). Los resultados de ambos ensayos, Co-IP y *Western blot*, se muestran en la Figura 9A. Por un lado, se analizan extractos celulares totales o INPUTs de las cepas Nrd1-TAP (*wt* y *rpb4Δ*) y por otro, los complejos inmunoprecipitados (IPs).

En estos ensayos de Co-IP se quiere analizar si el heterodímero Rpb4/7 es determinante en la interacción de Nrd1 con la RNAPII. Como se observa en la Figura 9A, la inmunoprecipitación de Nrd1-TAP ha sido muy eficiente en ambas cepas (*wt* y *rpb4Δ*). Además, en la cepa silvestre (*wt*), al inmunoprecipitar Nrd1 a través de la unión de su epítipo TAP con IgG-sepharosa, también lo hacen Rpb1 y Rpb3, subunidades no dissociables de la RNAPII y que forman el núcleo de la polimerasa, aunque la cantidad de polimerasa asociada no es muy significativa comparada con los niveles totales de la misma (Figura 9A). Sin embargo, a pesar de que dichos niveles son bajos, en la cepa mutante *rpb4Δ* al inmunoprecipitar Nrd1-TAP se observa que la asociación de Rpb1 y Rpb3 son aún menores, si los comparamos con los niveles detectados en la cepa *wt*. Para comprobar que la señal detectada no fuera una unión inespecífica a la resina IgG-sepharosa, realizamos el mismo tipo de experimento, pero en este caso con cepas *wt* y *rpb4Δ* en las que Nrd1 no se encuentra etiquetada con el epítipo TAP. Como se observa en la Figura 9B, en este caso no se detectan ninguna de las subunidades de la

RNAPII analizadas en los carriles correspondientes a la inmunoprecipitación (IP). Por lo tanto, la co-inmunoprecipitación del complejo RNAPII se debe a que está interaccionando con Nrd1-TAP. Un dato importante que se extrae de este experimento, es que Rpb4 también interacciona con Nrd1. Como ya se ha dicho en la Introducción, Rpb4 junto con Rpb7 forman un heterodímero fácilmente dissociable y a veces difícil de detectar en experimentos de inmunoprecipitación, cuando se inmunoprecipitan factores asociados al complejo RNAPII. Por lo tanto, parece ser que Rpb4 podría ser importante para mantener niveles adecuados de Nrd1 asociado a la RNAPII, y podría serlo durante la transcripción y la terminación de los snRNAs. Además, se sabe que en ausencia de Rpb4, los niveles de Rpb7 asociados a la RNAPII se reducen significativamente (Allepuz-Fuster *et al.* 2014), en consecuencia, es posible que esta reducción conlleve una peor asociación de Nrd1, como se ha discutido anteriormente.

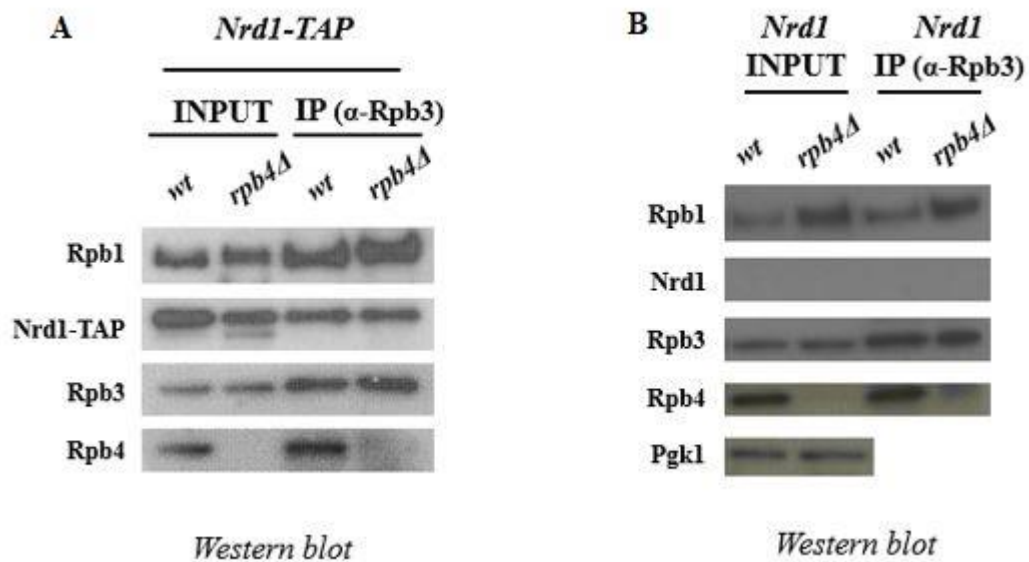


**Figura 9. Análisis de la interacción entre Nrd1 y RNAPII inmunoprecipitando Nrd1-TAP.** *Western blot* de los INPUTs (200µg de proteína total) y de los inmunoprecipitados (IPs) obtenidos a partir de 10mg de proteína total inmunoprecipitada con IgG-sepharosa. En **A**) se inmunoprecipitaron extractos proteicos de las cepas *Nrd1-TAP wt* y *rpb4Δ*, mientras que en **B**) se inmunoprecipitaron extractos proteicos de las cepas *Nrd1 wt* y *rpb4Δ*, que sirven como controles negativos de cualquier tipo de interacción inespecífica de **A**). Los anticuerpos empleados fueron anti-Rpb1, anti-TAP, anti-Rpb3, anti-Rpb4 y anti-Pgk1. Los niveles de la proteína citosólica Pgk1 se emplearon como control de carga.

Después de analizar la interacción entre Nrd1 y la RNAPII inmunoprecipitando Nrd1-TAP, a continuación seguimos la estrategia opuesta: inmunoprecipitar la RNAPII para determinar si inmunoprecipita el factor Nrd1-TAP asociado a ella. De esta manera, corroboraríamos si la subunidad

Rpb4, y el heterodímero Rpb4/7 en su conjunto, son fundamentales en la interacción de Nrd1 con la polimerasa.

Este análisis se llevó a cabo mediante ensayos de Co-IP y *Western blot*. Los ensayos de Co-IP se realizaron en este caso empleando el anticuerpo anti-Rpb3 y proteína A-sepharosa, como se ha indicado en Materiales y Métodos. Los resultados de estos ensayos se muestran en la Figura 10A, donde aparece el análisis, mediante *Western blot*, de los INPUTs y de los inmunoprecipitados (IPs). En este experimento también se incluyeron las cepas *wt* y *rpb4Δ* que no tienen Nrd1 etiquetada con el epítipo TAP, para descartar uniones inespecíficas (Figura 10B).



**Figura 10. Análisis de la interacción entre Nrd1 y RNAPII inmunoprecipitando Rpb3.** *Western blot* de los INPUTs (200μg de proteína total) y de los inmunoprecipitados (IPs) obtenidos a partir de 10mg de proteína total inmunoprecipitada con α-Rpb3 y proteína A-sepharosa. En **A**) se inmunoprecipitaron extractos proteicos de las cepas *Nrd1-TAP wt* y *rpb4Δ*, mientras que en **B**) se inmunoprecipitaron extractos proteicos de las cepas *Nrd1 wt* y *rpb4Δ*, que sirven como controles negativos de cualquier tipo de interacción inespecífica de **A**). Los anticuerpos empleados fueron anti-Rpb1, anti-TAP, anti-Rpb3, anti-Rpb4 y anti-Pgk1. Los niveles de la proteína citosólica Pgk1 se emplearon como control de carga.

En los ensayos de Co-IP inmunoprecipitando Rpb3, como era esperable co-inmunoprecipitan tanto Rpb1 como Rpb4, todas subunidades del complejo de la RNAPII (Figura 10A). Además, observamos que Nrd1 también se encuentra asociado al complejo. En este caso la asociación de Nrd1 con el complejo RNAPII se observa claramente. Sin embargo, no se observa que Nrd1 se asocie peor en ausencia de Rpb4. Las diferencias observadas en los resultados obtenidos para una Co-IP y otra, quizás puedan ser explicadas por la abundancia de los complejos objeto de estudio.

La principal conclusión que se extrae de los ensayos de Co-IP, es que Nrd1 se asocia a la RNAPII mediante la interacción con Rpb4, pero que esta subunidad no es esencial para la interacción con la polimerasa; aunque no podemos descartar que pueda ser requerida para mantener el complejo estable y/o funcional.

### **3. ¿La sobreexpresión de *RPB4/7* es capaz de corregir los defectos en terminación del mutante *nrd1-V468stop*?**

El tercer objetivo de este trabajo era determinar si aumentando sólo los niveles de Rpb4 y/o de Rpb4/7 a la vez en el mutante *nrd1-V468stop*, seríamos capaces de revertir los defectos en terminación de dicho mutante. Este objetivo se planteó basándonos en el hecho de que la sobreexpresión de *RPB4* corrige los defectos en crecimiento que presenta el mutante *nrd1-V468stop*.

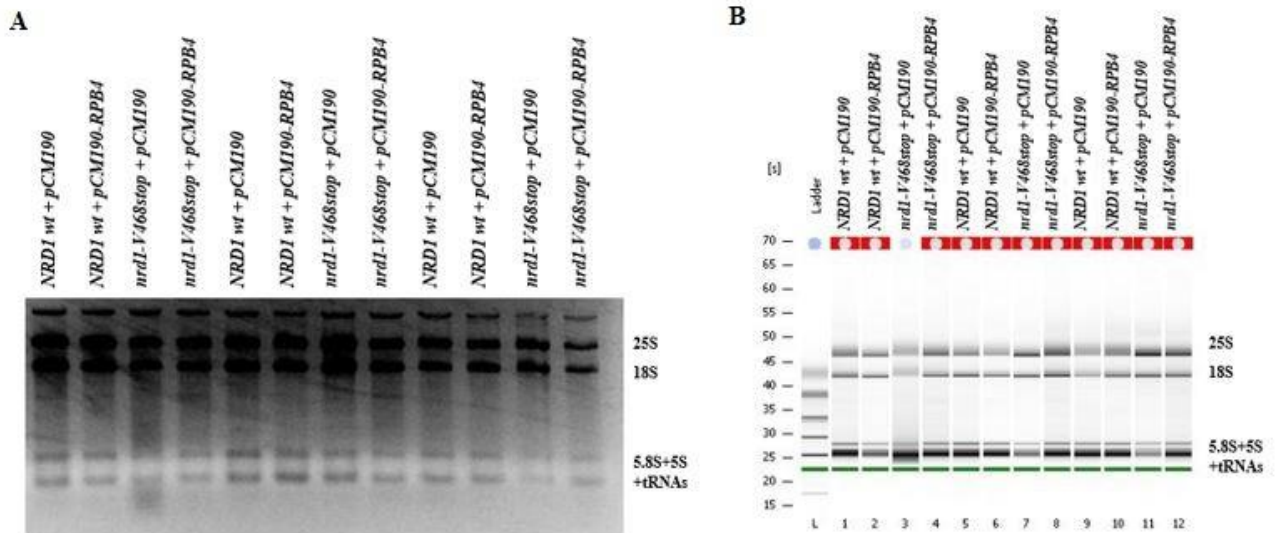
Para llevar a cabo este objetivo, en primer lugar se purificó el RNA total de las cepas correspondientes siguiendo el protocolo descrito en [24], como se ha detallado en Materiales y Métodos. En este caso, las cepas silvestre (*wt*) y mutante *nrd1-V468stop* fueron transformadas previamente con un plásmido vacío (pCM190) o con el mismo plásmido expresando *RPB4* en alto número de copias.

Una vez realizada la purificación de los RNAs, la calidad de estos se comprobó, en primer lugar, realizando electroforesis en gel de agarosa al 1.8% teñido con BrEt (Figura 11A). Con el fin de obtener la mayor precisión en cuanto a su calidad y concentración, después todos los RNAs fueron analizados en un bioanalizador en el Servicio de Genómica del Centro de Investigación del Cáncer (CIC) (Figura 11B).

Después de analizar la calidad y concentración de los RNAs, se vio que una muestra de la cepa silvestre (*wt*) y otra del mutante *nrd1-V468stop*, transformadas con el plásmido control, estaban degradadas, por lo que se repitió su extracción. La extracción de RNA se hizo por triplicado para cada una de las cepas con el fin de que mediante un solo experimento de *Northern blot* podamos evaluar el efecto de Rpb4 sobre la terminación del transcrito *SNR13* en el mutante *nrd1-V468stop*. El ensayo de *Northern blot* es una técnica de genética molecular en la que se separan los RNAs totales en un gel de agarosa al 1.2%. Para localizar el RNA objetivo se emplea una sonda radiactiva que hibrida con el transcrito objeto de estudio, previamente transferido a una membrana, y emite una señal, que se puede detectar en una autorradiografía. Este ensayo se realizaría para el análisis de los defectos en terminación, pero ya no forma parte de este trabajo. Esta técnica requería el manejo de radiactividad y debido a que no cuento con la formación requerida y la autorización correspondiente del Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG), no he podido realizar este ensayo. Por tanto, la



perspectiva futura para este trabajo sería la realización de este ensayo y determinar si los defectos en terminación del mutante *nrd1-V468stop* se corrigen al sobreexpresar Rpb4/7 igual que se corrigen los defectos en crecimiento, como se ha visto anteriormente.



**Figura 11.** Análisis de la calidad de los RNAs purificados en gel de agarosa al 1.8% teñido con BrEt (A) y mediante un bioanizador (B) de la cepa silvestre (*wt*) y el mutante *nrd1-V468stop* transformadas con un plásmido vacío (pCM190) o con el mismo plásmido sobreexpresando *RPB4*. Las purificaciones de RNA se realizaron por triplicado.

Como ya se ha comentado, el mutante *nrd1-V468stop* carece de dominio CT por lo que es posible que la interacción entre Nrd1 y Rpb7 se vea comprometida, así como con el RNA naciente [18]. La interacción entre Nrd1 y Rpb7 permite que el dominio RBD se posicione hacia el canal de salida del RNA naciente, permitiendo así un temprano reconocimiento de las secuencias GUAA/G, lo cual permite desencadenar la terminación de la transcripción [18]. Estos defectos en el dominio CT conllevan fallos en la terminación de la transcripción en los snRNAs y con ello en el transcrito *SNR13* [18]. De esta manera, el factor Nrd1 sin dominio CT sería incapaz de terminar la transcripción del gen *SNR13* y por tanto, la transcripción continuaría aguas abajo transcribiéndose un gen bicistrónico, que incluye la secuencia del gen *TRS31* (Figura 4B, abajo). Dicha secuencia, se puede detectar mediante ensayos de *Northern blot*, ya que aparece un transcrito de mayor tamaño.

## 5. Conclusiones

Se ha demostrado que existe una clara relación genética y funcional entre Nrd1 y Rpb4/7, ya que tanto la sobreexpresión de *RPB4* solo, como la co-expresión de *RPB4/7*, rescatan el fenotipo de crecimiento lento y termosensibilidad de la cepa mutante *nrd1-V468stop* a todas las temperaturas estudiadas.

Además, hemos observado que la subunidad Rpb4 interacciona con Nrd1, aunque no podemos descartar que lo haga a través de Rpb7, como en el caso de *S. pombe*.

Sin embargo, Rpb4 no parece ser esencial para la interacción de Nrd1 con el núcleo de la polimerasa, aunque no podemos descartar que facilite la estabilidad del complejo Nrd1-RNAPII y/o la función del mismo.

## 6. Bibliografía

- [1] Pierce, Benjamin A. *Genética: un enfoque conceptual*. 5ª edición. Editorial médica panamericana, 2015. 290-291 y B10-B17.
- [2] Jun, S.H., Reichlen, M.J., Tajiri, M., Murakami, K.S., “Archaeal RNA polymerase and transcription regulation”. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2011. 46: 27-40.
- [3] Werner, F., Grohmann, D., “Evolution of multisubunit RNA polymerases in the three domains of life”. *Nat Rev Microbiol*, 2011. 9: 85-98.
- [4] Grohmann, D., Werner, F. “Cycling through transcription termination with the RNA polymerase F/E (RPB4/7) complex: structure, function and evolution of archaeal RNA polymerase”. *Res Microbiol*, 2011. 162: 10-18.
- [5] Allison, L.A., Moyle, M., Shales, M., Ingles, C.J. “Extensive homology among the largest subunits of eukaryotic and prokaryotic RNA polymerases”. *Cell*, 1985. 42: 599-610.
- [6] Houseley, J., Tollervey, D. “The many pathways of RNA degradation”. *Cell*, 2009. 136: 763-776.
- [7] Allepuz-Fuster, P., Martínez-Fernández, V., Garrido-Godino, A.I., Alonso-Aguado, S., Hanes, S.D., Navarro, F., Calvo, O. “Rpb4/7 facilitates RNA polymerase II CTD dephosphorylation”. *Nucleic Acids Res*, 2014. 42: 13674-13688.
- [8] Calvo, Olga; García, Alicia. “RNA polymerase II phosphorylation and gene expression regulation”. *Intech*, 2012. Capítulo 5.
- [9] Buratowski, S. “The CTD code”. *Nat Struct Biol*, 2003. 10: 679-680.
- [10] Halen, K.M., Churchman, L.S. “The code and beyond: transcription regulation by the RNA polymerase II carboxy-terminal domain”. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017. 18(4): 263-273.
- [11] Garavís, M., Calvo, O. “Sub1/PC4, a multifaceted factor: from transcription to genome stability”. *Springer*, 2017.
- [12] Hahn, S. “Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery”. *Nature structural and molecular biology*, 2004. 11, 394.
- [13] Shandilya, J., Roberts, S.G. “The transcription cycle in eukariotes: from productive initiation to RNA polymerase II recycling”. *Biochimica and biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 2012. 1819: 391-400.
- [14] Sikorski, T.W., Buratowski, S. “The basal initiation machinery: beyond the general transcription factors”. *Curr Opin Cell Biol*, 2009. 21: 344-351.
- [15] Nechaev, S., Adelman, K. “Pol II waiting in the starting gates: regulating the transition from transcription initiation into productive elongation”. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 2011. 1809: 34-35.
- [16] Kuehner, J.N., Pearson, E.L., Moore, C. “Unravelling the means to an end: RNA polymerase II transcription termination”. *Nature Res Mol Cell Biol*, 2011. 12: 283-294.
- [17] Karen, M. A., Reines, D. “Termination of transcription of short noncoding RNAs by RNA polymerase II”. *Annual Review Biochemistry*, 2015. 84: 381-404.

- [18] Franco-Echevarría, Elsa; González-Polo, Noelia; Zorrilla, Silvia; Martínez-Lumbreras, Santiago; Santiveri, Clara; Campos-Olivas, Ramón; Sánchez, Mar; Calvo, Olga; González, Beatriz; Pérez-Cañadillas, José Manuel. “The structure of transcription termination factor Nrd1 reveals an original mode for GUAA recognition”. *Nucleic Acid Research*, 2017. Vol. 45. Nº 17. 10293-10305.
- [19] Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R., Woods, R.A. “Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure”. *Yeast*, 1995. 11(4): 355-360.
- [20] Shpakovski, G.V., Acker, J., Wintzerith, M., Lacroix, J.F., Thuriaux, P., Vigneron, M. “Four subunits that are shared by the three classes of RNA polymerase are functionally interchangeable between *Homo sapiens* and *Saccharomyces cerevisiae*”. *Moll Cell Biol*, 1995. 15(9): 4702-10.
- [21] Zaros, C., Thuriaux, P. “Rpc25, a conserved RNA polymerase III subunit, is critical for transcription initiation”. *Molecular Microbiology*, 2005. 55(1): 104-114.
- [22] Gari, E., Lidia, P., Aldea, M., Herrero, E. “A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*”. *Yeast Functional Analysis Reports*, 1997. Vol.13: 837-848.
- [23] Garrido-Godino, A.L., García-López, M.C., Navarro, F. “Correct assembly of RNA polymerase II depends on the foot domain and is required for multiple steps of transcription in *Saccharomyces cerevisiae*”. *Moll Cell Biol*, 2013. 33(18): 3611-26.
- [24] Schmitt, M.E., Brown, T.A., Trumpower, B.L. “A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*”. *Nucleic Acids Research*, 1990. 18: 3091-3092.
- [25] Chen, C.Y., Chang, C.C., Yen, C.F., Chiu, M.T., Chang, W.H. “Mapping RNA exit channel on transcribing RNA polymerase II by FRET analysis”. *Proc. Natl, Acad. Sci. U.S.A.*, 2009. 106: 127-132.
- [26] Mitsuzawa, H., Kanda, E. Ishihama, A. “Rpb7 subunit of RNA polymerase II interacts with an RNA-binding protein involved in processing of transcripts”. *Nucleic Acids Res*, 2003. 31: 4696-4701.