

UNIVERSIDAD DE A CORUÑA

ÁREA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**ESTUDIO DEL EFECTO DEL MUTANTE DEL
COMPLEJO DEL PORO NUCLEAR $\Delta seh1$
EN LA ACTIVACIÓN TRANSCRIPCIONAL
DE GENES DE LEVADURAS.**

Máster en Biología molecular, celular y genética

TANIA ÁLVAREZ FELGAR

JULIO, 2014

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

TANIA ÁLVAREZ FELGAR

Director: María Ángeles Freire Picos

ESTUDIO DEL EFECTO DEL MUTANTE DEL COMPLEJO DEL PORO NUCLEAR $\Delta seh1$ EN LA ACTIVACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE GENES DE LEVADURAS.

Estudo do efecto do mutante do Complexo do Poro Nuclear $\Delta seh1$ na activación transcripcional de xenes de fermentos.

Effect analysis of the Nuclear Pore Complex mutant $\Delta seh1$ in the transcriptional activation of yeast genes.

A Coruña, 18 de julio de 2014

Fdo.: M^a Ángeles Freire Picos

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1. Estructura y organización del Complejo del Poro Nuclear	1
2. Transporte a través del Complejo del Poro Nuclear	3
3. Implicaciones del Complejo del Poro Nuclear en la expresión génica	4
3.1 Papel del NPC en activación transcripcional	5
3.2 El complejo Nup84 en la activación transcripcional	5

OBJETIVOS	8
------------------	----------

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico	9
2. Medios de cultivo	9
3. Obtención de ácidos nucleicos	11
4. Medida de la concentración de ácidos nucleicos	12
5. Métodos de modificación de ácidos nucleicos	12
6. Métodos de transformación	13
7. Ensayos cuantitativos de la actividad β -galactosidasa	14
8. Técnicas de electroforesis	14
9. Obtención de sondas	15
9. Técnicas de marcaje e hibridación de ácidos nucleicos	15

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Estudio de la expresión del gen reportero <i>INO1</i>	17
2. Análisis de los niveles de mRNA de <i>INO1</i> en el mutante Δ <i>seh1</i>	18

ÍNDICE

3. Análisis de la expresión del gen regulado transcripcionalmente <i>TRP1</i> y estudio de los fenotipos asociados a crecimiento en el mutante Δ <i>seh1</i>	19
3.1 Análisis de expresión del gen <i>TRP1</i> en el mutante Δ <i>seh1</i>	
3.2 Nuevos fenotipos asociados a la delección del gen <i>SEH1</i>	
CONCLUSIONES	23
BIBLIOGRAFÍA	24

INTRODUCCIÓN

Una de las características más relevantes de las células eucariotas es la separación espacial entre el núcleo y el citoplasma mediante una barrera física, la membrana nuclear (NE, nuclear envelope). Esta compartimentalización supone un mecanismo de control fundamental, permite coordinar estrictamente numerosos procesos celulares clave, pero también representa un obstáculo para la comunicación entre el núcleo y el citoplasma. Esta comunicación es posible gracias a los Complejos del Poro Nuclear (NPCs) que atraviesan la envuelta nuclear conectando el interior del núcleo con el citoplasma, permitiendo el intercambio de macromoléculas entre ambos compartimentos (revisado por Aitchison and Rout, 2012).

Además de su función como mecanismo fundamental de transporte, los NPCs desempeñan otras funciones esenciales actuando como sitio de anclaje para diferentes factores implicados directamente en el control de la expresión génica. Por lo tanto, se puede considerar el transporte a través del NPC un punto clave en la expresión génica en eucariotas (Ahmed and Brickner, 2007; Hetzer and Wentz, 2009). Por ello es esencial una regulación estricta del transporte nucleocitoplasmático que permita la homeostasis celular. En consecuencia, alteraciones en los componentes del NPC o en el proceso de transporte tienen un fuerte impacto en el crecimiento y la supervivencia celular (revisado por D'Angelo and Hetzer, 2008).

1. Estructura y organización del Complejo del Poro Nuclear

Los NPCs son grandes complejos proteicos con una arquitectura común en todos los eucariotas estudiados desde levaduras hasta mamíferos (Brohawn *et al.*, 2009; Adams and Wentz, 2013; figura 1).

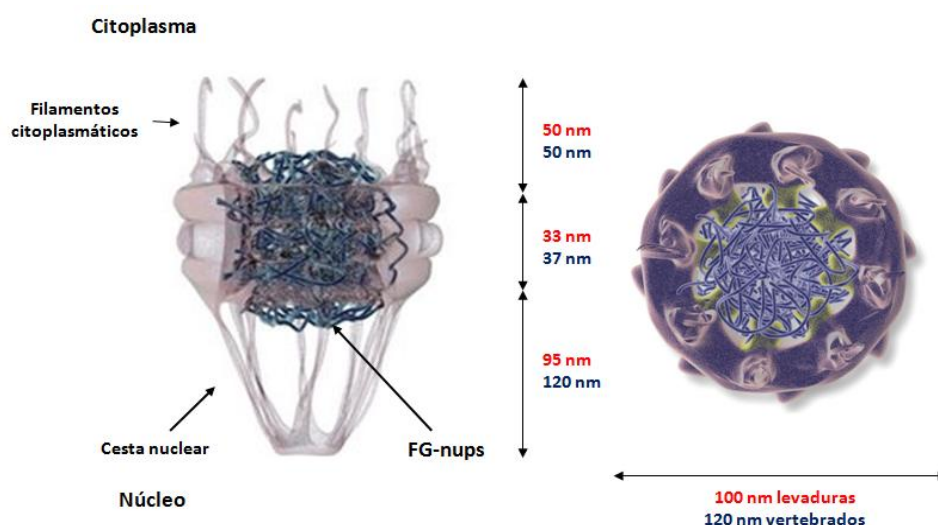


Figura 1. Estructura del Complejo del Poro Nuclear. Modificado de Samir Patel, 2005.

Estos complejos están formados por 30 proteínas diferentes denominadas nucleoporinas (nups). Múltiples copias de estas proteínas forman la estructura central del NPC (Rout *et al.*, 2000; Arib and Akhtar, 2011). Estas nucleoporinas se pueden clasificar en 3 grupos diferentes atendiendo a su estructura (Rout *et al.* 2000; Devos *et al.*, 2006; figura 2): Nups transmembrana, FG-Nucleoporinas y Nups del armazón central (*Core scaffold Nups*).

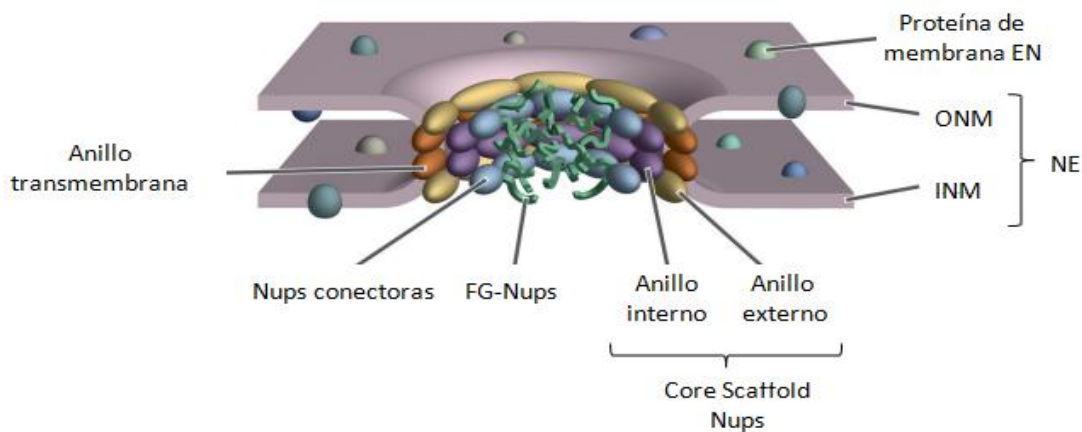


Figura 2. Organización estructural de los anillos que componen el NPC y de las nucleoporinas que lo forman. ONM: Membrana nuclear externa; INM: membrana nuclear interna; NE: membrana nuclear (modificada de Fernandez-Martínez and Rout, 2009).

Como se puede muestra en la figura 2, la arquitectura de los complejos del poro nuclear forma un cilindro con simetría octogonal constituido por dos anillos externos (nuclear y citoplasmático), dos anillos internos y dos anillos de membrana dispuestos en torno a un canal central de 40 nm de diámetro. Los dos anillos internos se unen mediante 8 radios al canal central y a los anillos de membrana, entre estos dos grupos de anillos se encuentran las nups conectoras. En la superficie interna de los radios se encuentran las FG-nucleoporinas. Desde el núcleo del NPC se proyectan al citoplasma 8 filamentos proteicos cortos y, de forma similar, se extienden 8 filamentos al núcleo de unos 50 nm de longitud formando la denominada cesta o jaula nuclear y unidos en su extremo distal a un anillo terminal (Alber *et al.*, 2007; Aitchison and Rout, 2012; Fernández-Martínez and Rout, 2009; figura 1).

A su vez, las nucleoporinas que forman los NPCs están organizadas en 5 sub-complejos diferentes (Brohawn *et al.*, 2009) entre los que se encuentra el sub-complejo Nup84 o complejo Y. Este sub-complejo está formado por 7 subunidades proteicas, entre ellas Seh1 de la que hablaremos posteriormente y en el que centraremos este estudio. El complejo Y se distribuye

simétricamente en ambas caras del NPC formando los anillos externos. Esta disposición en el NPC posibilita la interacción de sus componentes con la maquinaria transcripcional y con factores implicados en el transporte de mRNA (figura 3).

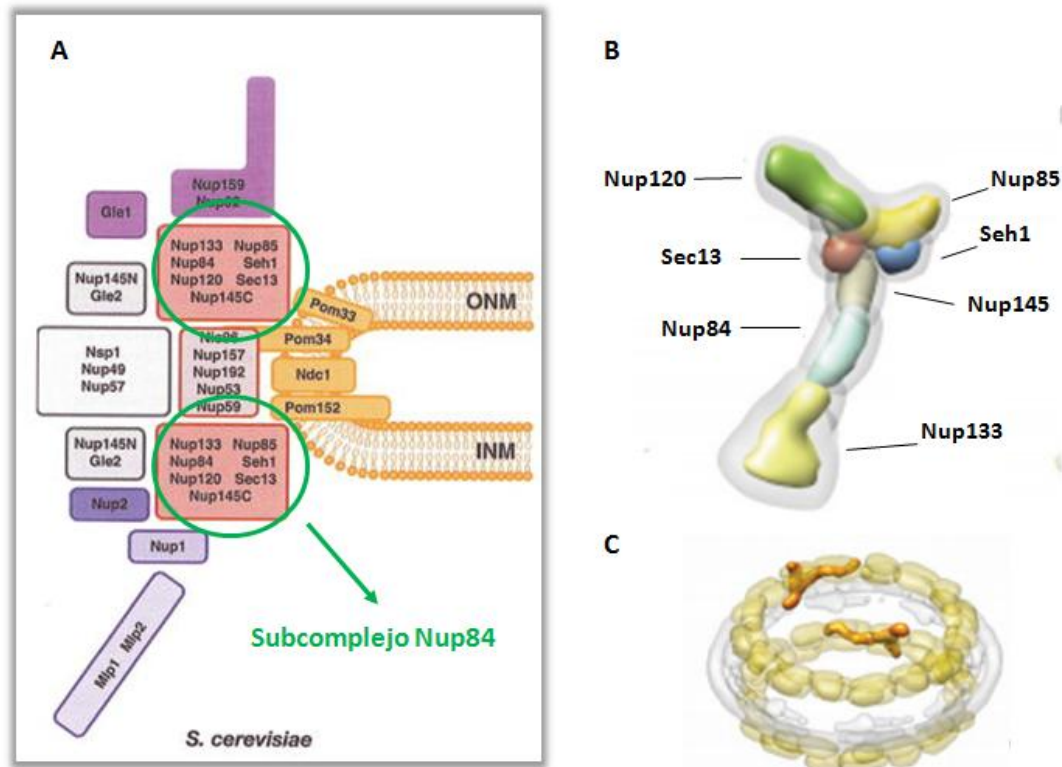


Figura 3. Organización del NPC. A) Diferentes subcomplejos que componen el NPC. B y C) Estructura y distribución del subcomplejo Nup84 en los anillos externos. Modificado de Fernández-Martínez et al., (2012).

2. Transporte a través del Complejo del Poro Nuclear

Como transportadores los NPCs llevan a cabo dos procesos: difusión simple y difusión facilitada (transporte mediado). Este transporte está limitado por el tamaño: agua, iones, metabolitos y proteínas globulares de un tamaño inferior a 60 kDa difunden pasivamente, mientras que mRNPs y proteínas de un tamaño superior a 60 kDa son transportados selectivamente mediante transportadores (Singer and Grünwald, 2012; figura 4).

El transporte a través de los NPCs incluye la exportación de macromoléculas del núcleo al citoplasma y el importe de todas las proteínas nucleares traducidas en el citoplasma hacia el

núcleo, además del reciclado de factores de transporte.

La exportación del mRNA al citoplasma a través del poro nuclear es un paso clave en la vía de expresión génica y constituye una de las vías más elaborada de transporte nuclear. Dentro del conjunto de proteínas implicadas en este mecanismo, además de los componentes del NPC, se encuentran receptores de exportación, proteínas adaptadoras de unión al mRNA ó RNA helicasas (Björk and Wieslander, 2011).

Para que un mRNA sea exportado al citoplasma, primero tiene que ser procesado, plegado y ensamblado en mRNPs. Estos procesos ocurren co-transcripcionalmente y la maquinaria implicada en los mismos está interrelacionada (Aitchison and Rout, 2012).

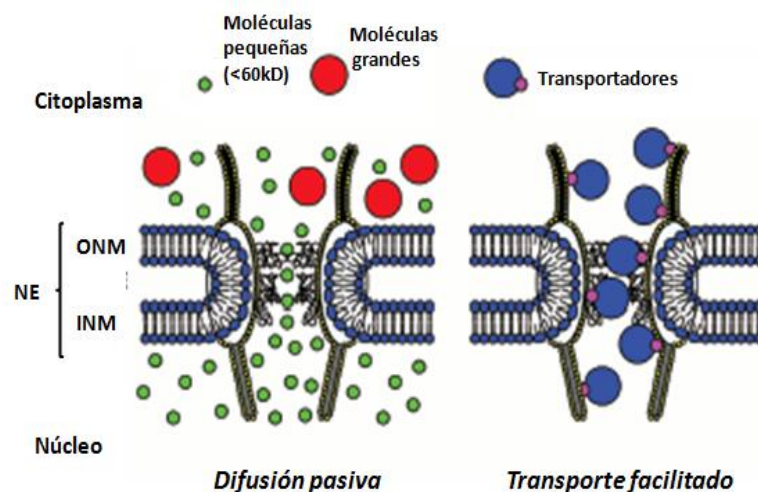


Figura 4. Transporte a través del NPC de moléculas pequeñas mediante difusión facilitada y de macromoléculas mediante transportadores. NE: envuelta nuclear; ONM: membrana externa; INM: membrana interna. Modificado de Sorokin et al., (2007).

3. Implicaciones del Complejo del Poro Nuclear en la expresión génica

En la última década se han incrementado las evidencias de la interacción entre los factores implicados en transcripción y la maquinaria implicada en el transporte de mRNA del núcleo al citoplasma a través del NPC. Diversos estudios proponen la implicación de componentes del NPC en regulación transcripcional y en la organización de la cromatina. Se cree que la correcta organización espacial del genoma en el núcleo juega un papel crítico en la regulación de la expresión génica. La posición de un gen en el núcleo puede variar correlacionándose con su estado

funcional.

3.1. Papel del NPC en activación transcripcional

En un principio se relacionó la proximidad a la periferia nuclear con el silenciamiento transcripcional (Feuerbach *et al.*, 2002). Sin embargo, estudios posteriores (Casolari *et al.*, 2004; Brickner and Walter, 2004) sugieren que la periferia nuclear puede ser clave para la activación transcripcional. Van de Vosse *et al.* (2013) propusieron que la heterocromatina transcripcionalmente silenciada se asocia preferentemente con la membrana nuclear interna mientras que los genes activos aparecen asociados con el NPC.

Así por ejemplo, los genes *GAL* de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, son genes inducibles que en presencia de galactosa y en ausencia de glucosa. Al ser reprimidos por la presencia de glucosa se localizan en la zona central del interior nuclear mientras que cuando son inducidos se localizan en la periferia nuclear y se asocian con nucleoporinas (Van de Vosse *et al.*, 2011). Además se han identificado uniones entre el NPC y componentes de la maquinaria de transcripción, particularmente con el complejo SAGA (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2004). Este complejo junto con el factor de exportación Sac3 y la nucleoporina Nup1 son necesarios para la localización de los genes *GAL* en la periferia nuclear (Cabal *et al.*, 2006; Drubin *et al.*, 2006). Los genes como *INO1*, activado cuando las células crecen en un medio de cultivo sin inositol, también se localizan en la periferia nuclear bajo condiciones de activación e interaccionan con componentes del NPC como la nucleoporina Nup2 (Steglich *et al.*, 2013; Light *et al.*, 2010).

3.2. El complejo Nup84 en la activación transcripcional

Menon y colaboradores (2005) encontraron evidencias de papel que juega el sub-complejo Nup84 en activación transcripcional ya que la fusión de los componentes de este sub-complejo con un dominio de unión al DNA daba lugar a activación transcripcional.

Recientemente se ha probado la interacción de la RNA polimerasa II con el componente Seh1 del NPC y la co-localización de ambos en regiones del DNA ribosómico presente en el nucleolo. Esto sugiere que las interacciones con el NPC afectan a los procesos en los que está implicada la RNA polimerasa II (Freire-Picos *et al.*, 2013).

En estudios anteriores de nuestro laboratorio se comprobó que el mutante $\Delta seh1$ afecta drásticamente a la expresión del gen *CYC1* especialmente en medio de cultivo cuya fuente de carbono es el glicerol (figura 5). Además, los datos cualitativos de β -galactosidasa sugieren una

menor activación transcripcional mediada por Ino2 en el mutante $\Delta seh1$ independientemente de la fuente de carbono (figura 6A) (Alvarez-Felgar2013). Este efecto en realidad podría deberse a defectos en la en la expresión del regulador Ino2, pero también en el transporte núcleo citoplasma del mRNA del reportero, u otros aspectos postranscripcionales (figura 6B).

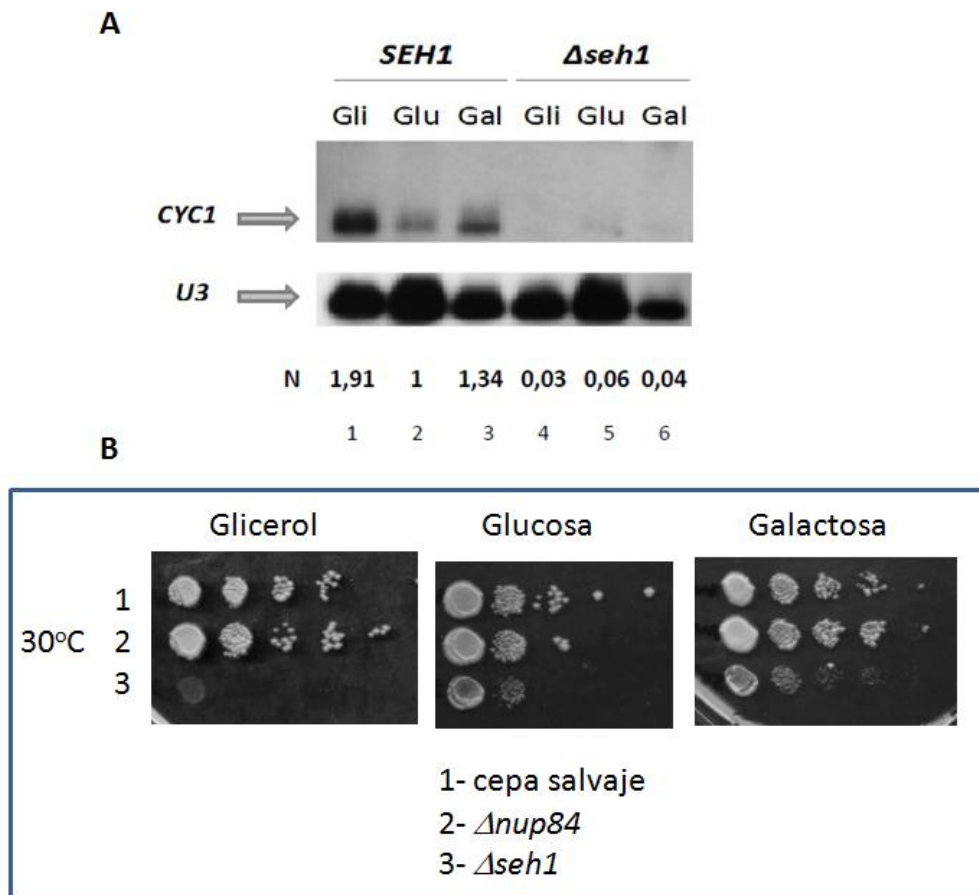


Figura 5. La delección de *SEH1* afecta a la expresión del gen *CYC1*. A) niveles de mRNA de *CYC1* analizados por Northern en presencia de diferentes fuentes de carbono: glucosa (Glu), galactosa (Gal) y glicerol (Gli). N: datos normalizados. B) Crecimiento de las cepas silvestre y mutantes $\Delta nup84$ y $\Delta seh1$ en medios de cultivo con las fuentes de carbono indicadas.

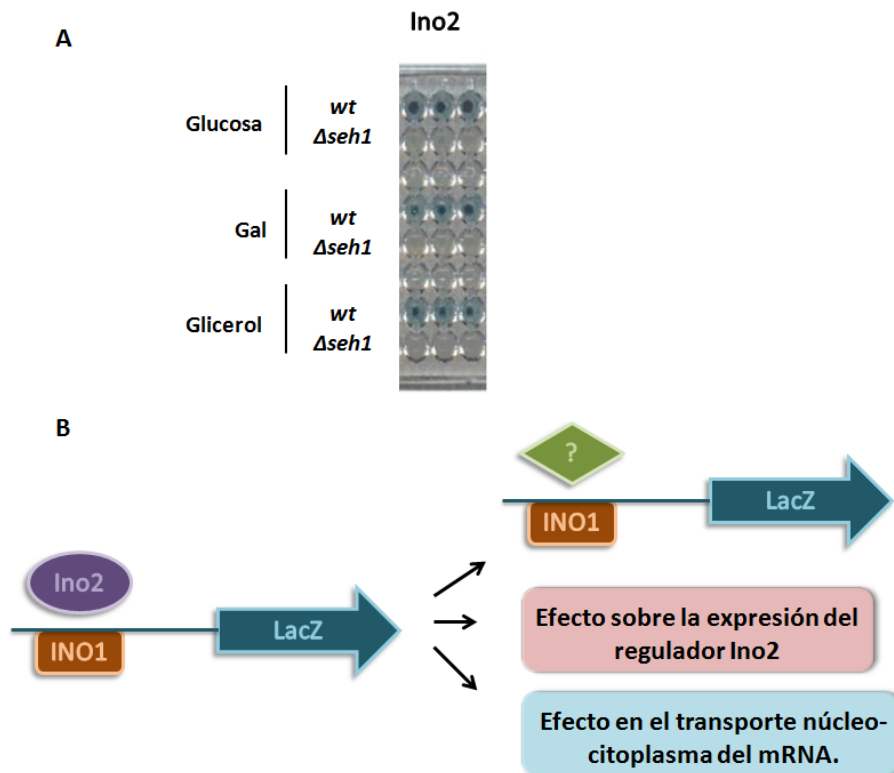


Figura 6. Ensayo cualitativo de actividad β -galactosidasa del gen reportero *INO1*. A) Ensayo con *X-Gal* en placa *multititer* de las cepas *wt* y $\Delta seh1$ transformadas con el reportero tras 30 minutos de incubación a 37°C. B) Esquema de las posibilidades que explicarían el defecto en la transcripción del gen reportero *INO1* en el mutante $\Delta seh1$.

Estos estudios ponen de manifiesto el papel crítico que juega el NPC en regulación de la expresión génica, así como la interacción del componente Seh1 del sub-complejo Nup84 con la maquinaria transcripcional y sugieren que la delección de *SEH1* podría tener un efecto sobre el mecanismo de activación transcripcional.

OBJETIVOS

A lo largo de esta introducción se ha mostrado la relevancia del Complejo del Poro Nuclear y del componente Seh1 en la regulación de la expresión génica.

Partiendo de nuestros datos preliminares que indicaban un efecto del mutante $\Delta seh1$ en activación transcripcional nos propusimos los siguientes objetivos.

1. Efectuar un estudio cuantitativo de la activación del gen *INO1* en medios sin inositol.
2. Analizar la expresión del activador transcripcional de *INO1*, el factor Ino2, en el mutante $\Delta seh1$.
3. Estudiar la expresión del gen regulado *TRP1* y las consecuencias asociadas a crecimiento, en los mutantes del “complejo Y” del NPC $\Delta seh1$ y $\Delta nup84$.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico

1.1. Líneas celulares de levaduras

Línea	Genotipo	Fuente
BY4741	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	EUROSCARF
a-GHI	<i>MATα trp1-289 leu2-3 leu2-112 gal1 Δ 152</i>	Zitomer (1991)
<i>Δnup84</i>	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 NUP84:: KANMX4</i>	Álvarez Felgar, T (2013)
<i>Δseh1</i>	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 SEH1:: KANMX4</i>	M. Freire (2013)

Tabla 1. Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este estudio.

Para su uso habitual, las cepas de levaduras se conservaron a 4°C y se resembraron periódicamente en placas YPD al 2% de dextrosa.

1.2. Plásmidos

pJH359 (Jhon, 2001): plásmido informador para el estudio de activación transcripcional del gen *INO1*.

YCPlac22 (Gietz and Sugino, 1988): plásmido empleado para obtener la sonda de *TRP1* mediante digestión enzimática.

2. Medios de cultivo

A continuación se describen los medios utilizados en cultivos de bacterias y levaduras. Para la preparación de medios sólidos se adicionó 1,5 % de Bacto-Agar al correspondiente medio líquido. Todos los medios fueron esterilizados en autoclave.

2.1. Medios de cultivo para levaduras

YPD

Se trata de un medio rico general de crecimiento para levaduras.

Para preparar un medio YPD selectivo añadimos el antibiótico, en este caso Geneticina en una proporción 150µl/100ml, cuando el medio de cultivo tenga una temperatura próxima a 60°C.

Medio YPD

Bacto peptona	2%
Extracto de levaduras (Yeast extract)	1%
Dextrosa	2%

Se preparó YP en el que se sustituyó la dextrosa por galactosa y glicerol a la misma concentración, 2%.

CM (Complete Medio)

Se trata de un medio sintético preparado con variantes en función de la selección que se quiere realizar.

Se esterilizan por separado el YNB (Yeast Nitrogen Base) y los demás componentes del medio. Tras la esterilización, se combinan ambos, quedando el YNB a una concentración final de 0,67%.

Medio CM sin YNB

Mezcla de aminoácidos 200x	5 mL
Histidina, Leucina, Uracilo, Adenina y Tirosina	40 mg/L
Triptófano	30 mg/L
Dextrosa	2%

Mezcla de aminoácidos 200x:

Arginina	2 g/L
Isoleucina	2 g/L
Lisina	8 g/L
Metionina	2g/L
Treonina	2g/L
Fenil-alanina	12 g/L

YNB:

Vitaminas 300x	50 mL/L
Sales traza 150x	100 mL/L
Fosfato de potasio	15 g/L
Sulfato de magnesio	7,5 g/L
Cloruro sódico	1,5 g/L
Cloruro cálcico	1,5 g/L
Sulfato amónico	75 g/L

300x:

Sales traza:

Biotina	0,6 mg/L	Ácido bórico	75 mg/L
Pantotenato cálcico	120 mg/L	Sulfato cúprico	6 mg/L
Ácido fólico	0,6mg/L	Molibdato sódico	15 mg/L
Inositol	600 mg/L	Cloruro férrico	30 mg/L
Niacina	120 mg/L	Ioduro potásico	30 mg/L
p-Aminobenzoico	60 mg/L	Sulfato de Zinc	60 mg/L
Piridoxina	120 mg/L		
Riboflavina	60 mg/L		
Tiamina	120 mg/L		

Para la selección de transformantes de levaduras se emplearon medios CM sin uracilo.

Para los experimentos β -galactosidasa se empleó medio CM sin uracilo con vitaminas 300x sin inositol y para los estudios del gen *TRP1* se empleó CM sin triptófano.

3. Obtención de ácidos nucleicos

3.1. Obtención de RNA total de levaduras

La extracción de RNA total se realizó según el método descrito por Schmitt *et al.* (1990).

Se partió de cultivos de levaduras de 100 mL, crecidos en distintas condiciones hasta alcanzar una A_{260} entre 0,6 y 1. Una vez alcanzada la absorbancia deseada, los cultivos se centrifugaron en tubos de 250 ml (previamente esterilizados) en una centrifuga Beckman durante 5 minutos a 5000rpm. Tras la centrifugación se decantaron los sobrenadantes, se resuspendió el pellet celular en agua bidestilada estéril y se transfirió a eppendorfs que fueron centrifugados a 13000rpm durante 1 minuto. El pellet se lavó de nuevo en 1 ml de agua estéril y finalmente se dividió en varias alícuotas que se conservaron a -80°C hasta el momento de la extracción.

Tras una descongelación progresiva las células se resuspendieron en 400 μl de buffer AE (Acetato sódico 50mM y EDTA 10mM, pH 5,2) y se añadieron 40 μl de SDS al 10%. Tras mezclar por agitación se añadió un volumen igual de fenol-cloroformo (equilibrado con Buffer AE) y se mezcló de nuevo. Tras una incubación de 4 minutos en

bloque a 65°C los tubos con las muestras se enfriaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Se centrifugaron durante 5 minutos a 13000rpm para separar las fases y se transfirió la fase acuosa a nuevos tubos con los que se realizó una nueva extracción con fenol-cloroformo. Finalmente, se precipitó el RNA con acetato sódico 0,3M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto en campana.

La precipitación se potenció durante 10 minutos a -80°C y posteriormente las muestras se centrifugaron a 13000rpm durante 10 minutos. Se realizaron 2 lavados con etanol al 70%, se secó el pellet y se resuspendió en 15-25µl de agua tratada.

4. Medida de la concentración de ácidos nucleicos

Se tomaron 5µL de la preparación de DNA o 4µL de RNA total, y se llevaron a volumen de 1 ml con agua estéril. Las mediciones se efectuaron en un espectrofotómetro CARY 3E UV (Varian) utilizando cubetas de cuarzo de 1 ml. Se midió la absorbancia de las muestras a A_{260} y A_{280} nm. La concentración real se calculó sabiendo que A_{260} es equivalente a una concentración de 50mg/ml de DNA o de 40mg/ml de RNA. La relación A_{260}/A_{280} nos indica la calidad de la muestra. Para una preparación de DNA debe ser de aproximadamente 1,8 y de 2 para el RNA (Sambrook *et al.*, 1989).

5. Técnicas de modificación de ácidos nucleicos

5.1. Digestión con endonucleasas

El DNA plasmídico fue digerido con endonucleasas de restricción. Se utilizó el tampón y la temperatura recomendados por la casa comercial.

De forma general, las digestiones transcurrieron por espacio de 2-3 horas a 37°C.

5.2. Utilización de polimerasas

El fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa I de *E. coli* se empleó para el marcaje isotópico de sondas por el método denominado *random primed* o “cebado” al azar con el *Kit Labeling mix* (Promega).

Para realizar reacciones de PCR de comprobación de candidatos y para sintetizar las diferentes sondas utilizadas se utilizó la enzima NZYtaq DNA polymerase (NZYTech).

5.3. Reacciones de PCR (Polymerase Chain Reaction)

La amplificación del DNA por PCR se realizó en un termociclador incubando el DNA molde con 20 pmoles de cada uno de los cebadores (oligonucleotidos), en presencia de dNTPs, la polimerasa y el buffer suministrado por la casa comercial, todo ello en un volumen de reacción final de 50µL. La temperatura de anillamiento se ajustó en función de la Tm (temperatura de melting) de los oligos utilizados.

El programa empleado para las reacciones de PCR fue el siguiente:

Paso inicial a 95°C durante 3 minutos.

25-35 ciclos : 95°C 1 minuto (desnaturalización)

45-55°C 1 minuto (anillamiento)

72°C 1 minuto (extensión)

75°C 5 minutos

Los oligonucleótidos utilizados en este estudio son los presentes en la tabla 2:

Oligonucleótido	Secuencia 5´-3´	Tm
U3F	CGACGTA CTTCAGTATGTAA	45,5 °C
U3R	ATTTGTACCCACCCATAGAG	50,7 °C
INO1F	TATTGCTCCAATCACCTCCGT	
INO1R	ATGCAATGGAGACCGGTTTA	

Tabla 2. Tabla resumen de los oligonucleotidos utilizados en las reacciones de PCR.

6. Métodos de transformación

6.1. Transformación de levaduras

Se empleó el método "One step" para transformación de levaduras en fase

estacionaria descrito por Chen y colaboradores (1992). Al buffer se le añadió DTT 1mM en el momento de realizar la transformación y se preparó la siguiente mezcla de reacción:

Células
100µl de buffer (0,2 M LiAc, 40% PEG 4000)
7µl de DNA plasmídico
5µl de DNA de salmón

Se realizó una incubación de 30 minutos a 45°C en bloque y las transformaciones se sembraron en placas con medio selectivo.

7. Ensayos cuantitativos de actividad β-galactosidasa

Los ensayos para determinar la actividad específica (AE) β-galactosidasa se realizaron según Rose y Bostein (1983). La actividad específica se expresa en nmoles x minuto x mg de proteína. La AE se calculó según la siguiente fórmula:

$$\frac{A_{420} \times 1,7}{0,0045 \times \text{concentración de proteína} \times \text{volumen del extracto ensayado} \times \text{tiempo}}$$

Donde:

A_{420} es la densidad óptica del producto final de la reacción, el O-nitrofenol a 420 nm.

El factor 1,7 corrige el volumen de la reacción.

El factor 0,0045 es la densidad óptica de 1nmol/mL de O-nitrofenol.

La concentración de proteína en mg/mL.

El volumen del extracto ensayado en mL.

El tiempo en minutos.

El cálculo de la concentración de proteínas del extracto se realizó según el método de Bradford (1976).

8. Técnicas de electroforesis

8.1. Geles de agarosa-formaldehído desnaturalizantes para Northern blot.

Se utilizaron para la separación de RNAs a una concentración de agarosa de 1,5% en el tampón 1X MOPS (4-morfolin ácido propanosulfónico). Una vez disuelta la

agarosa se dejó enfriar hasta unos 65°C y se le añadió formaldehído al 6% antes de verterlo.

Las muestras se prepararon con 20-30 µg de RNA (dependiendo del experimento) con 20 µl de buffer de muestra, incubándolas durante 5 minutos a 65°C. Estas muestras se enfriaron inmediatamente en hielo y se les añadió 1,5 µl de azul de carga antes de cargarlas en el gel.

Las electroforesis se realizaron en una cubeta refrigerada, entre 100-120 Voltios durante 3 ó 4 horas.

Tampón 20XMOPS: 0,4M MOPS, 0,1 M acetato sódico, 20 mM EDTA pH 7. Preparado con agua tratada con DEPC (Dietil Pirocarbonato) y guardado a 4°C en oscuridad.

Buffer de muestra: 24 % formamida desionizada, 10% 20XMOPS, 8,9 % formaldehído, 57,1% agua tratada con DEPC.

Agua tratada con DPEC: se preparó añadiendo 1ml de dietil pirocarbonato a 1 litro de agua dejándolo en reposo durante 12 h. Transcurrido este tiempo el agua se esterilizó en el autoclave quedando lista para usar.

9. Obtención de sondas

Se utilizaron los oligonucleótidos de la tabla 2 para la amplificación de PCR de las diferentes sondas utilizadas en este estudio. Como molde se empleo DNA genómico de la cepa *a-GHI* de *S.cerevisiae* (tabla 1).

10. Técnicas de marcaje e hibridación de ácidos nucleicos

10.1. Preparación de sondas marcadas

Marcaje mediante cebadores aleatorios (random primed).

Utilizamos el *Kit Prime a Gene Labelling System* (Promega). Se emplearon de 1 a 2 µg de DNA para cada sonda. Tras una desnaturalización de 5 minutos a 100°C, se añadieron 7µl de la mezcla de marcaje que provee el kit (dNTPs y hexanucleótidos), 30 mCi de isótopo α -ATP-P³² y 1 µl de *Klenow* para un volumen final de 25 µl. La mezcla se incubó durante 1 hora a 37°C.

La sonda marcada se separó de los dNTPs y del isótopo no incorporado

mediante cromatografía en columnas de *Sephadex-G50* hidratado con tampón STE (Tris HCl 10 mM pH 8, NaCl 100 mM, EDTA 1mM). Se aplicó la mezcla de reacción a la parte superior de la columna y se añadieron 350 µl de tampón STE, desechando el volumen saliente. A continuación se añadieron otros 350 µL de tampón y se recogió el volumen eluído en un tubo *ependorf*. Se repitió este último paso siete veces y la radioactividad incorporada en las diferentes fracciones eluídas se midió en un contador de centelleo de partículas b (*Wallac System 1410^{MT} Liquid scintillation counter* de Pharmacia), correspondiendo el primer pico de aumento de radioactividad a las fracciones de muestra que contenían la sonda marcada.

10.2. Northern blot

Después de la electroforesis en geles de formaldehído, se transfirió el RNA a membranas de nylon cargadas positivamente (Boehringer Mannheim) mediante el sistema *VacuGene* de Pharmacia a 50-60 mBa durante 1 hora, utilizando como tampón de transferencia 10X SSC, preparado con 20xSSC y agua tratada. El RNA se fijó por exposición a la luz UV durante 3 minutos.

Estas membranas se prehibridaron en botellas con 50 ml de solución de hibridación (Na_2HPO_4 0,5 M pH 7,2, SDS 7%, EDTA 1mM), durante 20-30 minutos y a la misma temperatura a la que se realizaría la hibridación. Trascurrido ese tiempo, se añadió 10-15 ml de solución de hibridación que contiene la sonda previamente desnaturalizada a 100°C. Las hibridaciones se realizaron durante toda la noche a 60°C.

Se efectuaron incubaciones con solución de lavado (2X SSC, 0,1 % SDS) a la temperatura de hibridación. Posteriormente, se efectuó la autorradiografía entre 12 horas y varios días dependiendo de la señal obtenida en la membrana. La normalización de la señal de los transcritos se calculó dividiendo los valores de la densidad de la banda estudiada entre el correspondiente valor de señal de U3 en esa muestra (primera normalización) y una vez normalizados se escogió un valor como la unidad y los demás valores se hacen relativos a ésta señal (segunda normalización).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Estudio de la expresión del gen reportero *INO1*.

Dados los resultados obtenidos en ensayos cualitativos β -galactosidasa para la expresión del gen *INO1* en los que se podía apreciar un defecto en activación transcripcional en la cepa $\Delta seh1$, nos planteamos realizar ensayos cuantitativos de actividad β -galactosidasa a fin de confirmar este resultado.

Para ello, se prepararon medios de cultivo con y sin inositol. En esta última condición se produce la activación del gen *INO1* por medio del regulador Ino2. En la tabla 3 se recogen las características del gen reportero empleado para el estudio.

Activador	UAS*	TATA*	Informador	Gen marcador	Plásmido	Referencia
Ino2	<i>INO1</i>	<i>CYC1</i>	<i>lacZ</i>	<i>URA3</i>	pJH359 (<i>INO1-LacZ</i>)	Jhon, 2001

Tabla 3. Plásmido informador para el estudio de activación transcripcional por Ino2 *in vivo*.

Como se puede apreciar en la figura 7 en presencia de inositol la actividad β -galactosidasa se corresponde con niveles basales (no activación) y por lo tanto menor expresión del gen *INO1*. En el mutante $\Delta seh1$ se da menor expresión, en valores medios tres veces inferiores respecto a la cepa silvestre. Sin embargo; en ausencia de inositol (condición de activación), tanto en la cepa silvestre como en el mutante $\Delta seh1$ se produce un incremento de actividad β -galactosidasa. Este resultado refleja que en ambos casos se produce activación transcripcional.

Por lo tanto, las diferencias observadas en los niveles de expresión del gen *INO1* en la cepa silvestre y en el mutante $\Delta seh1$ sugieren que la delección de *SEH1* afecta a los niveles de expresión de este gen pero no a la capacidad de Ino2 de ejercer su papel activador cuando falta inositol en el medio.

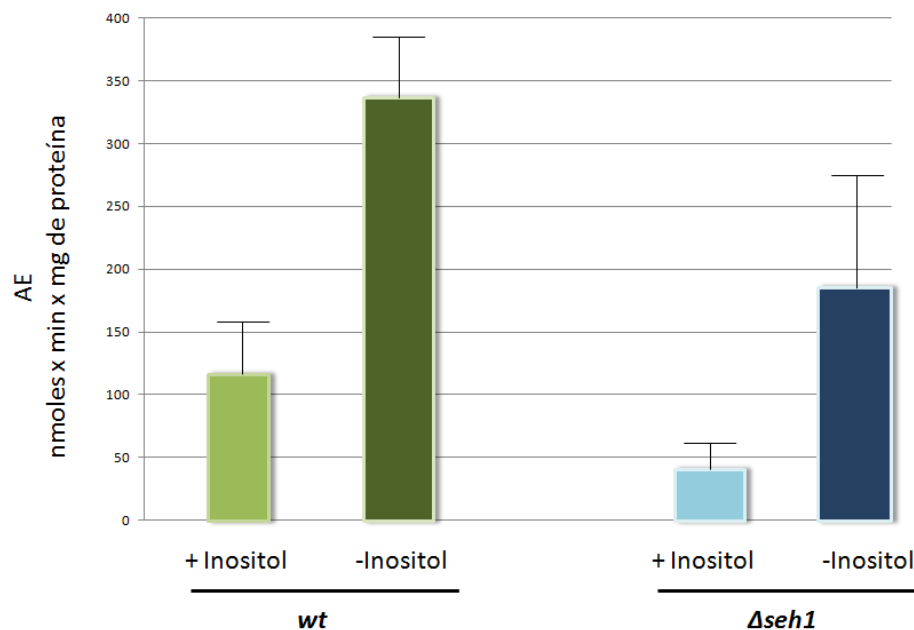


Figura 7. Estudio de activación transcripcional mediada por el promotor de *INO1* en el mutante $\Delta seh1$ del NPC. –Inositol, + Inositol: presencia ó ausencia de inositol en el medio de cultivo. Las barras representan la media de ocho experimentos. AE: actividad específica β -galactosidasa. Se incluyen las líneas de error estandar.

2. Análisis de los niveles de mRNA de *INO1* en el mutante $\Delta seh1$.

Se analizó la expresión de *INO1* en las mismas condiciones de crecimiento en las que previamente (Alvarez Felgar, 2013) habíamos comprobado efectos transcripcionales de *SEH1*. Como podemos apreciar en la figura 8, al comparar la expresión de *INO1* en el mutante respecto a la cepa silvestre se aprecia una menor expresión que también reflejan los datos de la señal normalizada.

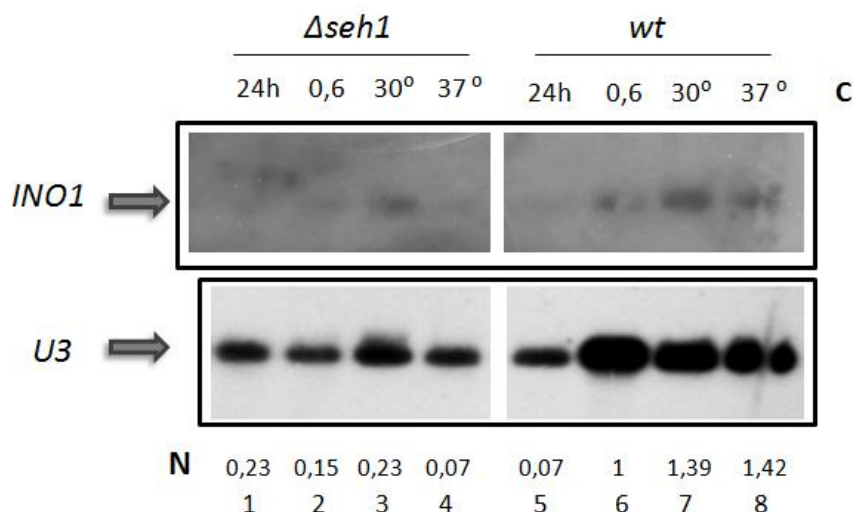


Figura 8. Expresión de *INO1* analizada por *Northern blot* en la cepa silvestre (carriles 1-4) y mutante *Δseh1* (carriles 5-8). Sondas *INO1* y control de carga *U3*. N: datos normalizados. C (condiciones de cultivo analizadas): 24 horas de crecimiento, absorbancia a 600 nm de 0,6; y dos temperaturas (30 y 37 °C).

Si bien en este caso no se han analizado los niveles de mRNA en medio sin inositol (condiciones en las que habría activación del gen *INO1*), la disminución en los niveles de mRNA concuerda con la menor expresión del gen reportero *INO1* en condiciones basales (figura 7). Por tanto, la delección de *SEH1* causa la disminución de los niveles de transcripción de *INO1* pero no afecta a la activación de *INO1* por el factor Ino2.

3. Análisis de la expresión del gen regulado transcripcionalmente *TRP1* y estudio de los fenotipos asociados a crecimiento en el mutante *Δseh1*

3.1. Análisis de expresión del gen *TRP1* en el mutante *Δseh1*.

A fin de obtener nuevas evidencias de los efectos de la delección de *SEH1*, y dado que *TRP1* es un gen regulable y de uso común en nuestro grupo, analizamos la expresión de éste gen en las mismas condiciones de crecimiento que en la figura anterior (figura 8).

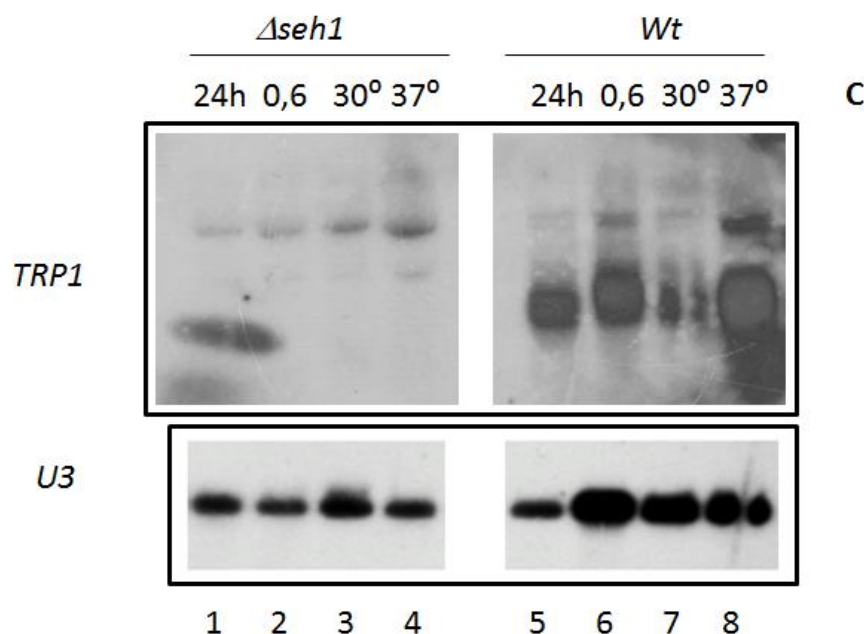


Figura 9. Expresión del gen *TRP1* en el mutante $\Delta seh1$. Análisis mediante Northern blot. 1-4: cepa silvestre. 5-8: mutante $\Delta seh1$. C (condiciones de cultivo analizadas): 24 horas de crecimiento, absorbancia a 600 nm de 0,6 y dos temperaturas (30 y 37 °C). Sondas *TRP1* y control de carga *U3*. N: datos normalizados.

Como se aprecia en la figura 9, con la sonda de *TRP1* aparecen al menos dos bandas de hibridación. En las autorradiografías se pueden observar mejor que la señal inferior en la cepa silvestre es doble banda y por tanto, esa señal inferior se corresponde con dos transcritos.

Cabe destacar que se produce una drástica disminución de la expresión del gen *TRP1* en el mutante $\Delta seh1$ en las cuatro condiciones analizadas. Por lo tanto, la delección de *SEH1* afecta negativamente a la expresión del gen *TRP1*. Este efecto es mucho más evidente que el observado con *INO1* y además afecta sobre todo a la señal inferior.

Este resultado se relaciona con los datos del mutante $\Delta seh1$ con *RNA14* y *KICYC1* (Alvarez-Felgar, 2013) en dónde se comprobaba que la mutación de este factor afecta de modo diferente a los transcritos alternativos de estos genes.

3.2. Nuevos fenotipos asociados a la delección del gen *SEH1*.

Dado que la delección del gen *SEH1* afecta drásticamente a la expresión del gen *TRP1* y éste está regulado por la presencia/ausencia de triptófano en el medio de cultivo, decidimos analizar el crecimiento del mutante $\Delta seh1$ en medios sin triptófano. Para ello sembramos el mutante $\Delta seh1$ y su control silvestre en placas con medio sintético completo y sin triptófano (CM y CM-Trp respectivamente). En la figura se muestran los resultados del crecimiento en diluciones seriadas.

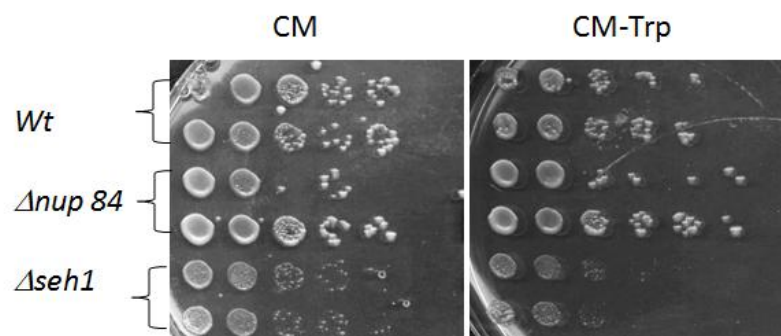


Figura 10. Análisis de crecimiento de los mutantes $\Delta seh1$ y $\Delta nup84$ en medio sin triptófano.

Como se puede apreciar en las filas 5 y 6 el mutante $\Delta seh1$ crece peor en medio sin triptófano que en el medio completo. Estos datos concuerdan con la menor expresión de *TRP1* en el mutante $\Delta seh1$. Sin embargo, el mutante $\Delta nup84$ no presenta ese defecto de crecimiento. Dado que este resultado sugiere que el efecto sobre *TRP1* parece exclusivo de uno de los factores del complejo Y del NPC, decidimos comprobar los niveles de transcripción de *TRP1* en tres de las condiciones que analizamos previamente, esta vez en el mutante $\Delta nup84$ mediante *Northern blot*.

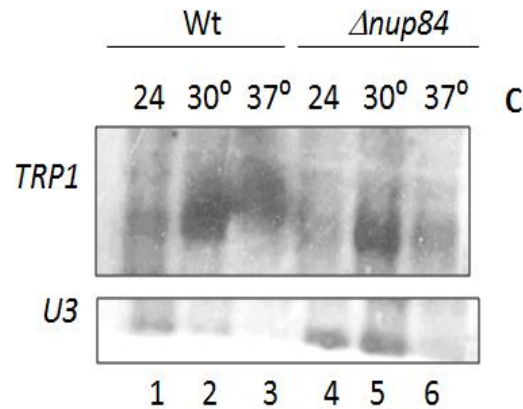


Figura 11. Expresión del gen *TRP1* en el mutante *Δnup84*. Análisis mediante *Northern blot*. 1-3: cepa silvestre (wt). 4-6: mutante *Δnup84*. Sondas *TRP1* y control de carga *U3* C: condiciones de cultivo.

Como se aprecia en la figura 11 al comparar el efecto del mutante *Δnup84* (carriles 4-6) con el control de la cepa silvestre (carriles 1-3), la delección de *NUP84* no tiene el efecto drástico del mutante *Δseh1* sobre *TRP1* puesto que se observa los transcritos en todas las condiciones analizadas. La expresión detectada del gen *TRP1* también concuerda con el mejor crecimiento del mutante *Δnup84* en medio sin triptófano y confirma el efecto específico del mutante *Δseh1* sobre éste gen.

El conjunto de los resultados de expresión del gen *TRP1* en los dos mutantes del NPC sugieren la especialización de los componentes del complejo "Y" de los anillos externos en la expresión de genes concretos.

CONCLUSIONES

1. El análisis de actividad b-galactosidasa con el reportero *INO1* nos permiten afirmar que la delección de *SEH1* afecta a los niveles de expresión del gen *INO1* pero no a la capacidad de Ino2 de ejercer su papel activador cuando falta inositol en el medio de cultivo. La menor expresión de *INO1* en el mutante se ve confirmada por los análisis de *Northern*.

2. La delección de *SEH1* afecta negativamente a la expresión del gen *TRP1*. Este efecto es mucho más evidente que el observado para *INO1* y además afecta sobre todo a la señal inferior. Además, el mutante $\Delta seh1$ presenta un defecto de crecimiento en medio de cultivo sin triptófano, lo cual concuerda con la menor expresión de *TRP1* en este mutante.

3- En el mutante $\Delta nup84$ no se observan ni defectos de crecimiento en medio sin triptófano ni un efecto drástico sobre la expresión de *TRP1* como se encontró en el mutante $\Delta seh1$.

4-. Nuestros resultados indican un efecto gen-específico del componente Seh1 del NPC sobre *TRP1*. Sugieren la especialización de los componentes del complejo "Y" de los anillos externos del NPC en la expresión de genes concretos.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, R.L. and Wentz, S.R. (2013) Uncovering Nuclear Pore Complexity with Innovation. *Cell* **152**: 1218-1221
- Ahmed, S., and J. H. Brickner, 2007 Regulation and epigenetic control of transcription at the nuclear periphery. *Trends Genet.* **23**: 396–402.
- Aitchison, J.D. And Rout, M.P. (2012) The Yeast Nuclear Pore Complex and Transport Through It. *Genetics* **190**: 855-883
- Alber, F.; Dokudovskaya, S.; Veenhoff, L.M.; Zhang, W.; Kiper, J.; Devos, D.; Supapto, A.; Karni-Schmidt, O.; Williams, R.; Chait, B.T.; Sali, A. and Rout, M.P. (2007) The molecular architecture of the nuclear pore complex. *Nature* **450**: 695-701
- Björk, P. and Wieslander, L. (2011) Nucleocytoplasmic mRNP export is an integral part of mRNP biogenesis. *Chromosoma* **120**: 23-38
- Brickner, J.H. and Walter, P. (2004) Gene Recruitment of the Activated *INO1* Locus to the Nuclear Membrane. *PLoS Biology* **2**: 1843-1853
- Brohawn, S.G and Schwartz, T.U. (2009) Molecular architecture of the Nup84-Nup145C-Sec13 edge element in the nuclear pore complex lattice. *Nat Struct Mol Biol.* **16**. 1173-1177
- Cabal, G.G.; Genovesio, A.; Rodríguez-Navarro, S.; Zimer, C.; Gadal, O.; Lesne, A.; Buc, H.; Feuerbach-Fournier, F.; Olivo-Marin, J.C.; Hurt, E.C. and Nehrbass, U. (2006) SAGA interacting factors confine sub-diffusion of transcribed genes to the nuclear envelope. *Nature* **441**: 770-773
- Casolari, J.M.; Brown, C.R.; Komili, S.; West, J.; Hieronymus, H. and Silver, P.A.(2004) Genome-Wide Localization of the Nuclear Transport Machinery Couples transcriptional Status and Nuclear Organization. *Cell* **117**: 427-439
- Chen, D.C., Yang, B.C. and Kuo, T.T. (1992) One-step transformation of yeast in stationary phase. *Curr Genet.* **21**: 83-84
- D'Angelo, M.A. and Hetzer, M.W. (2009) Structure, dynamics and function of nuclear pore complexes. *Trends Cell Biol* **18**: 456-466
- Devos, D.; Dokudovskaya, S.; Williams, R.; Alber, F.; Eswar, N.; Chait, B.T.; Rout, M.P. and Sali, A. (2006) Simple fold composition and modular architecture of the nuclear pore complex. *PNAS* **103**: 2172-2177
- Drubin, D.A., Garakani, A.M. and Silver, P.A. (2006) Motion as a phenotype: the use of live-cell imaging and machine visual screening to characterize transcription-dependent chromosome dynamics. *BMC Cell Biol* **7**: 19

Bibliografía

- Feuerbach, F.; Galy, V.; Trelles-Sticken, E.; Fromont-Racine, M.; Jacquier, A.; Gilson, E.; Olivo-Marin, J.C.; Scherthan, H. and Nehrbass, U. (2002) Nuclear architecture and spatial positioning help establish transcriptional states of telomeres in yeast. *Nat. Cell Biol.* **4**: 214-221
- Fernández-Martínez, J.; Phillips, J.; Sekedat, M.D; Diaz-Avalos, R.; Velazquez-Muriel, J.; Franke, J.D.; Williams, R.; Stokes, D.L.; Chait, B.T.; Sali, A. and Rout, P.M. (2012) Structure-function mapping of a heptameric module in the nuclear pore complex. *JCB* **196**: 419-434
- Fernández-Martínez, J. and Rout, P.M. (2009) Nuclear Pore Complex Biogenesis. *Curr Opin Cell Biol* **21**: 602-613
- Forsburg, S.L. and Guarente, L. (1989) Identification and characterization of HAP4: a third component of the CCAAT-bound HAP2/HAP3 heteromer. *Genes Dev.* **3**:1166-78
- Freire-Picos, M.A.; Rodríguez Landeira, V. and Mayan M.D. (2013) Stalled RNAP-II molecules bound to non-coding rDNA spacers are required for normal nucleolus architecture. *Yeast* aceptado.
- Giezt, R.D. and Sugino, A. (1988) New yeast-Escherichia coli shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene.* **74**(2):527-34.
- Guarente L. (1983) Yeast promoters and lacZ fusions designed to study expression of cloned genes in yeast. *Methods Enzymol.* **101**:181–191.
- Hetzer, M. W., and S. R. Wente, 2009 Border control at the nucleus: biogenesis and organization of the nuclear membrane and pore complexes. *Dev. Cell* **17**: 606–616
- Light, W. H.; Brickner, D.G.; Brand, V. R. and Brickner, J. H. (2010) Interaction of a DNA Zip Code with the Nuclear Pore Complex Promotes H2A.Z Incorporation and INO1 Transcriptional Memory. *Molecular Cell.* **40**:112-125.
- Menon, B.B.; Sarma, N.J.; Pasula, S., Deminoff, S.J.; Willis, K.A.; Barbara, K.E.; Andrews, B. and Santangelo, G.M. (2005) Reverse recruitment: The Nup84 nuclear pore subcomplex mediates Rap1/Gcr1/Gcr2 transcriptional activation. *PNAS* **102**: 5753
- Olesen, J.; Hahn, S. and Guarente, L. (1987) Yeast HAP2 and HAP3 activators both bind to the CYC1 upstream activation site, UAS2, in an interdependent manner. *Cell* **51**: 953-61
- Pappas, D.L and Hampsey, M. (2000) Functional interaction between Ssu72 and the Rbp2 subunit of RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **20**: 8343-51
- Rodríguez-Navarro, S.; Fisher, T.; Luo, M.J.; ntunez, O.; Brettschneider, S.; Lechner, J.; Perez-Ortiz, J.E.; Reed, R. and Hurt, E. (2004) Sus1, a functional componente of the SAGA histone acetylase complex and the nuclear pore-associated mRNA export machinery. *Cell* **116**: 75-86

Bibliografía

- Rosemblum-Vos, L.S.; Rhodes, L.; Evangelista, C.C.; Boayke, K.A.; Wick, P.; Zitomer, R.S. (1991) The ROX3 gene encodes an essential nuclear protein involved in CYC7 gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **11**: 5639-47
- Singer, R.H. and Grünwald, D. (2012) Multiscale dynamics in nucleocytoplasmic transport. *Curr Opin Cell Biol.* **24**: 100-106
- Van de Vosse, D.W.; Wan, Y.; Wozniak, R.W. and Aitchison, J.D. (2011) Role of the nuclear envelope on genome organization and gene expression. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* **3**: 147-166
- Wenthe, S. R. and Rout, M.P. (2010) The Nuclear Pore Complex and Nuclear Transport. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*
- Zitomer, R.S. and Lowry, C.V. (1992) Regulation of gene expression by oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev.* **56**: 1-11
- Zitomer, R.S.; Lowry, C.V.; Rymond B.C.; Wright, C.F.; Weiss, J.L. and Wallthall, D.A. (1983) Expression of the yeast CYC genes and CYC1/GalK fusion genes on yeast plasmids. *Gene Amplif Anal.* **3**: 175-200