



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

# **Caracterización de nuevos supresores de mutaciones en *SSU72***

**Caracterización de novos supresores de mutacións en *SSU72***

**Characterization of new suppressors of *SSU72* mutations**

Trabajo de fin de Máster

Máster en Biología Molecular, Celular y Genética



Marta Alvelo Blanco

En A Coruña 18 de Julio de 2020

**Directora:** M<sup>a</sup> Ángeles Freire Picos

**M<sup>a</sup> ANGELES FREIRE PICOS, PROFESORA TITULAR DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR  
DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA EN LA UNIVERSIDADE DA CORUÑA**

**INFORMA**

**QUE EL PRESENTE TRABAJO FIN DE MASTER PRESENTADO POR LA ALUMNA MARTA ALVELO  
BLANCO TITULADO:**

**Caracterización de nuevos supresores de mutaciones en *SSU72***

**Caracterización de novos supresores de mutacións en *SSU72***

**Characterization of new suppressors of *SSU72* mutations**

**Ha sido realizado bajo mi dirección y autorizo su presentación para que pueda ser juzgado  
por el tribunal correspondiente.**

**Y para que conste firmo la presente en A Coruña a 18 de Julio de 2020**

**FREIREPICOS**  
**MARIA**  
**ANGELES-**  
**32760558W**

Firmado digitalmente por FREIREPICOS  
MARIA ANGELES-32760558W  
Fecha de reconocimiento: 2020.07.18  
16:48:46+02:00  
ID de usuario: MARIA ANGELES  
URL: FREIREPICOS.ca=FREIREPICOS  
MARIA ANGELES-32760558W  
Fecha: 2020.07.18 16:29:44 +02:00

**Fdo M<sup>a</sup> Angeles Freire Picos**

## ÍNDICE

### ÍNDICE DE ABREVIATURAS

### RESUMEN

INTRODUCCIÓN.....	1
1. La fosfatasa Ssu72 y sus funciones en la célula.....	1
2. Papel de las mutaciones supresoras en la identificación de factores implicados en mecanismos celulares.....	3
3. Análisis de supresión, mutantes <i>SSU72</i> obtenidos y sus respectivos candidatos a supresores.....	3
OBJETIVOS.....	6
MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
1. Líneas celulares.....	7
2. Los plásmidos utilizados.....	7
3. Medios de cultivo.....	9
4. Transformación de bacterias.....	11
5. Transformación de levaduras.....	12
6. Purificación de DNA plasmídico.....	13
7. Digestión de DNA plasmídico.....	13
8. Electroforesis en gel de agarosa.....	13
9. Análisis de secuenciación y búsqueda en bases de datos.....	14
10. Ensayo X-gal <i>overlay</i> .....	14
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	15
1. Amplificación de DNA plasmídico por transformación bacteriana y extracción de DNA amplificado.....	15
2. Análisis de restricción y electroforesis.....	15
3. Análisis de secuenciación y búsqueda en bases de datos.....	17
4. Ensayo X-gal <i>overlay</i> .....	21
CONCLUSIONES.....	23
BIBLIOGRAFÍA.....	25

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

**BLASTn:** Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide

**bp:** Pares de bases

**CPF:** Complejo Procesador del Extremo 3' del mRNA

**CTD:** Extremo Carboxilo Terminal

**DNA:** Ácido Desoxiribonucleico

**LBA:** Luria Bertani con Ampicilina

**mRNA:** RNA Mensajero

**PEG:** Polietilenglicol

**RNA pol II:** RNA Polimerasa II

**RNA:** Ácido Ribonucleico

**SAI:** *Servizo de Apoio á Investigación*

**SDS:** Dodecil Sulfato Sódico

**Ser5-P:** Serina 5 fosforilada

**Ser7-P:** Serina 7 fosforilada

**SGD:** *Saccharomyces* Genome Database

**SnoRNA:** Pequeños RNA Nucleolares

**SnRNA:** Pequeños RNA Nucleares

**SSU72:** *suppressor of sua7-1 mutant*

**TAE:** Tris, Acetato y EDTA

**TF:** Factor Transcripcional

**ts:** Fenotipo de Sensibilidad a la Temperatura

**UAS:** *Upstream Activation Sequence*

**UV:** Ultravioleta

**X-gal:** 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosido

**YNB:** *Yeast Nitrogen Base*

**YPD:** *Yeast, Peptone, Dextrose*

## RESUMEN

Ssu72 es una fosfatasa esencial para la viabilidad celular en levaduras y se encuentra muy conservada en eucariotas. Sus funciones más conocidas son la regulación de la transcripción basal y el procesamiento 3' del RNA. En este trabajo se analizaron las secuencias de varios clones de una genoteca de *Saccharomyces cerevisiae* que suprimían el defecto fenotípico de células de levadura mutantes en *SSU72*. De esta forma, se identificaron dos plásmidos con potenciales genes supresores entre los que se encuentran *SAP30* y *GAL4*, abriendo la posibilidad de nuevos papeles de Ssu72 en la célula, relacionados con la acetilación de histonas y la desrepresión del activador Gal4 mediada por Gal3.

Ssu72 é unha fosfatasa esencial para a viabilidade celular de levaduras e se encontra moi conservada en eucariotas. As súas funcións máis coñecidas son a regulación da transcripción basal e o procesamento 3' do RNA. Neste traballo analizáronse as secuencias de varios clóns dunha xenoteca de *Saccharomyces cerevisiae* que suprimían o defeto fenotípico das células de levadura mutantes en *SSU72*. Desta forma, identificáronse dous plásmidos con potenciais xenes supresores entre os que se encontran *SAP30* e *GAL4*, abrindo a posibilidade de novos papeis de Ssu72 na célula, relacionados con a acetilación de histonas e a desrepresión do activador Gal4 mediada por Gal3.

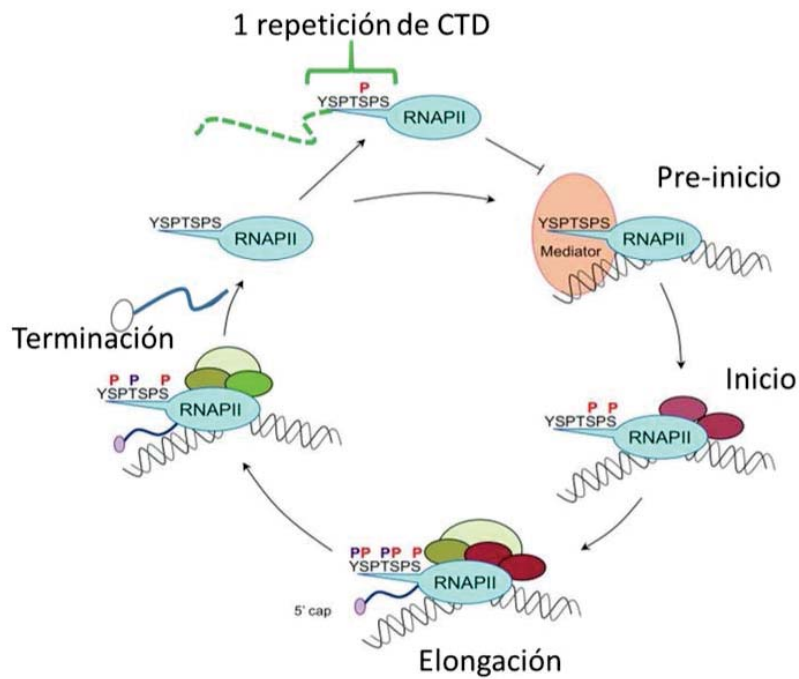
Ssu72 is an essential phosphatase for cell viability of yeast and it happens to be very conserved in eucariotic organisms. It's most known functions are the regulation of basal transcription and the 3' end processing of RNA. In the present work we analyze some clones from a *Saccharomyces cerevisiae* library that have the capacity of delete fenotipyc defects caused in cells by mutations in the *SSU72* gene. We indentified two plasmids with potential suppressor genes, among them, *SAP30* and *GAL4*, wich opens the possibility of new Ssu72 roles in the cell, related to the histone acetilation and the release of the activator Gal4 by Gal3 protein.

## INTRODUCCIÓN

### 1. La fosfatasa Ssu72 y sus funciones en la célula

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la proteína Ssu72 es una fosfatasa de 206 aminoácidos que desempeña papeles esenciales para la viabilidad celular, se descubrió como un factor involucrado en la transcripción (Krishnamurthy et al., 2004; Sun and Hampsey, 1996; Ganem et al., 2003; Rosado-Lugo and Hampsey, 2014) y está muy conservada en eucariotas (St-Pierre et al., 2005; Rodríguez-Torres et al., 2013).

La enzima RNA polimerasa II (RNA pol II) se encarga de transcribir genes codificantes, así como pequeños RNA nucleolares (snoRNA) y pequeños RNA nucleares (snRNA), asociada a factores generales de transcripción y un complejo de proteínas reguladoras que interactúan con los elementos reguladores gen-específicos (Woychik and Hampsey 2002; Ganem et al., 2003). Sin embargo, también es necesario que la subunidad mayor de la RNA polimerasa II (Rpb1) se encuentre en estado hipofosforilado para que sea reclutada al promotor del gen. Una vez en el promotor, el dominio carboxilo terminal (CTD) de la subunidad Rpb1, sufre fosforilaciones que permiten el inicio del proceso de transcripción. El extremo CTD de Rpb1 está constituida por varias repeticiones de la secuencia consenso  $Y^1S^2P^3T^4S^5P^6S^7$  (los números indican la posición que ocupan en la repetición). El número de repeticiones de la secuencia varía según la especie, las levaduras poseen 26 repeticiones y los humanos 52 repeticiones. Se sabe que Ssu72 desfosforila las serinas 5 y 7 (ser5-P y ser7-P, respectivamente) de CTD (Meinhart et al., 2005; Luo et al., 2013) y que interactúa con los factores generales de la transcripción TFIID, TFIIB y TFIIH (Rosado-Lugo and Hampsey, 2014). Su acción sobre la ser7-P y en mayor medida, de la treonina y tirosina fosforiladas, tardaron en descubrirse, por lo que se conocen como residuos huérfanos. Actualmente, se sabe que su papel es necesario para la adición del 5'-cap del mRNA, así como el procesamiento del extremo 3' y la remodelación de la cromatina (revisado por Yurko and Manley, 2018). En la figura 1 que se presenta a continuación, se muestra el ciclo de modificaciones que sufre la CTD de la subunidad mayor de la RNA pol II durante un ciclo transcripcional.



**Figura 1:** Ciclo de modificaciones de la CTD de la subunidad Rpb1 de la enzima RNA pol II. Se muestran las fosforilaciones y desfosforilaciones que conllevan a la activación o inactivación de las diferentes fases del proceso de transcripción. (Imagen modificada de Heidemann and Eik, 2012).

Además, Ssu72 forma parte del complejo procesador del extremo 3' del RNA mensajero (CPF) (Nedea et al., 2003; Rosado-Lugo and Hampsey, 2014) y es una de las proteínas de este complejo responsable por la formación de bucles de DNA (*DNA-loops*) entre la región promotora y la región terminadora de los genes, lo que promueve el reciclado de la polimerasa de vuelta al promotor (Ansari and Hampsey, 2005). En todo este ciclo transcripcional, Ssu72 es crucial para la elongación y para variar los estados de fosforilación de la serina 5 hasta llegar a la forma hipofosforilada de CTD, necesaria para el reinicio del proceso.

Ssu72 también se encuentra involucrada en la mitosis, debido a su relación con las cohesinas. Las cohesinas son complejos proteicos que se encargan de mantener la unión de las cromátidas hermanas de los cromosomas de la fase S del ciclo celular hasta la mitosis o meiosis, donde se eliminan para hacer posible la separación y segregación de dichas cromátidas. Se ha demostrado que la mutación de la fosfatasa Ssu72 ocasiona la separación prematura de los brazos de cromátidas hermanas y, por el contrario, la sobreexpresión de Ssu72, provoca un aumento de dificultad para llevar a cabo la separación. Estos resultados indican, que Ssu72 es una proteína que regula la cohesión entre las cromátidas hermanas de los cromosomas durante la mitosis (Kim et al., 2010).

## **2. Papel de las mutaciones supresoras en la identificación de factores implicados en mecanismos celulares**

Las mutaciones supresoras son aquellas que suprimen los defectos fenotípicos provocados en un organismo a causa de la presencia de otra mutación. Así, los organismos que posean la mutación original, junto con la mutación supresora, contarán con un fenotipo similar al salvaje. La inducción y caracterización de mutaciones supresoras es una herramienta molecular y genética, que permite identificar genes que se encuentren funcionalmente relacionados a un gen de interés (Michels, 2002).

Un claro ejemplo de la eficacia de este sistema a nivel transcripcional, son los genes de levadura *SUA7* (TFIIB) y *SUA8* (Rpb1) se identificaron como supresores de un triplete de paro prematuro en el promotor del gen *CYC1* (Pinto et al., 1992; Berroteran et al., 1994). El propio *SSU72* suprimía defectos en *SUA7* y de ahí, su nombre (*Suppressor of Sua7-1 mutant*) (Sun and Hampsey, 1996).

## **3. Análisis de supresión, mutantes *SSU72* obtenidos y sus respectivos candidatos a supresores**

Con el fin de identificar nuevos factores o procesos en los que *Ssu72* podría estar implicada se realizaron análisis de supresión a partir de nuevas cepas mutantes del gen *SSU72* de levadura *S. cerevisiae* que, además, poseían un fenotipo de sensibilidad a la temperatura (*ts<sup>-</sup>*) por su defecto para el crecimiento a 37 °C. Estas cepas se transformaron con una genoteca de *S. cerevisiae* en alto número de copias, así, se observó que algunos clones de esta genoteca suprimían el fenotipo de las cepas mutantes, actuando, por lo tanto, como genes supresores (Freire-Picos and Hampsey, datos no publicados). Algunos de los mutantes de *SSU72* obtenidos para el análisis de supresión son descritos en la tabla 1.

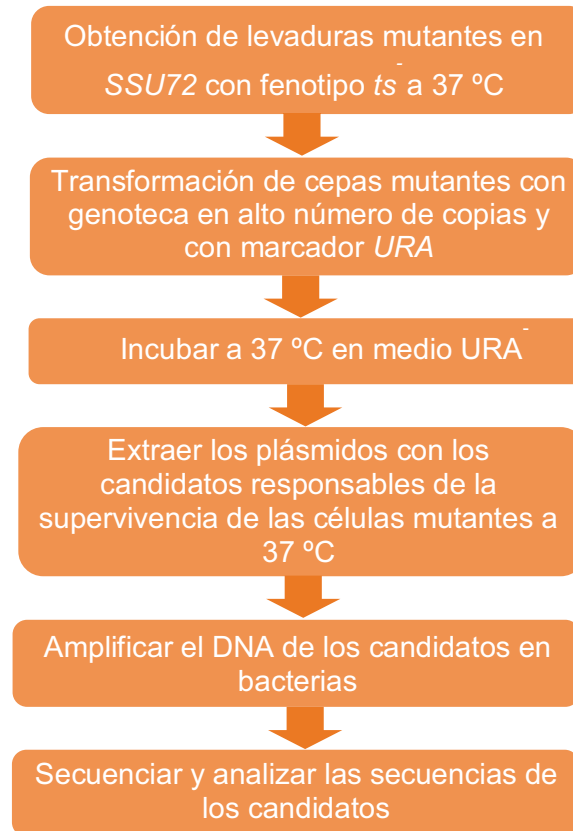


**Tabla 1:** Algunos de los mutantes de *SSU72* obtenidos para el análisis de supresión y sus respectivas mutaciones (Freire-Picos y Hampsey datos no publicados).

MUTANTES <i>SSU72</i>	MUTACIONES
<b>5B5</b>	G154->C, y S200->P
<b>11D1</b>	N6->H, y N65->S
<b>17C5</b>	Stop aa205
<b>18D2</b>	Stop Trp101
<b>3F3</b>	N56->D
<b>17D6</b>	L50->Glc, y E149->Asp

En estudios previos con estos mutantes y siguiendo el procedimiento que se indica en la figura 2, se encontraron varios posibles candidatos a supresores; como era de esperar, muchos de ellos contenían el gen *SSU72* suprimiendo los defectos de su propia mutación. Esto se comprobó a través de un análisis de restricción, así, los candidatos que poseían el mismo patrón de corte que *SSU72* fueron descartados. Un candidato de uno de los mutantes descritos en la tabla 1, fue caracterizado con mayor profundidad en nuestro laboratorio (Mejuto, 2016). El clon 18D2-5 resultó ser un supresor en alto número de copias del mutante 18D2 de *SSU72*. Tras su secuenciación y posterior análisis en bases de datos, se identificó el gen supresor, que se trataba de *SKT5*. Este gen codifica para una proteína reguladora de la quitina sintasa III durante la gemación. Se sabe que el factor Gcl7, es necesario para llevar a cabo las síntesis del septum de quitina durante la gemación y, por otro lado, al igual que *Ssu72*, Gcl7 también actúa como fosfatasa en el procesamiento de RNA, por lo que *Ssu72* podría llevar a cabo un papel de regulador en el proceso de gemación (Mejuto, 2017; Lorenzo, 2019).

De los citados estudios previos, quedaron pendientes de secuenciación o aislamiento, entre estos, los candidatos 5B5-71, 18D2-14 y 18D2-16 y 18D2-69 (Mejuto, 2016). Los candidatos se nombraron indicando la mutación (Por ejemplo, 5B5), seguida del número del candidato a supresor analizado, en este caso para 5B5-71 el candidato es el número 71.



**Figura 2:** Esquema sobre el procedimiento de un análisis de supresión aplicado a mutantes de *SSU72*.

Además de los candidatos a nuevos supresores en alto número de copias, disponemos de supresores en bajo número de copias previamente analizados en nuestro grupo por G. Stampfel como parte de su estancia de Erasmus (datos no publicados). En este caso, se buscaron supresores del fenotipo *ts*<sup>-</sup> de la cepa YMF72 de *S. cerevisiae*, que, como característica principal, expresa el gen *KISSU72* de la levadura *Kluyveromyces lactis* en vez de *SSU72* (Rodríguez-Torres et al., 2013). A efectos del presente trabajo, consideramos a *KISSU72* como un mutante que ofrece un fenotipo de sensibilidad a la temperatura. Entre los candidatos a supresores seleccionamos los clones 12-1 y 13-1, que se encuentran en una genoteca alojada en el vector YCp50 (Rose et al., 1987).

Teniendo en cuenta que contamos con más mutantes y sus correspondientes candidatos a supresores, que todavía no habían sido estudiados, decidimos identificar nuevos factores implicados en las múltiples funciones de *Ssu72*. Así, para llevar a cabo este proyecto, utilizamos los supresores 5B5-71, 18D2-14, 18D2-16 y 18D2-69 (ya comentados), además de los candidatos 12-1 y 13-1 como posibles supresores del fenotipo *ts*<sup>-</sup> de *KISSU72* expresado en *S.cerevisiae*.

## **OBJETIVOS**

Partiendo de una colección de supresores parcialmente caracterizada, nuestro principal objetivo fue:

Identificar nuevos genes supresores en alto número de copias de mutaciones en *SSU72* y, por lo tanto, conocer nuevos factores implicados en las múltiples funciones de celulares *Ssu72*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Líneas celulares

- **Bacterias**

Para realizar transformaciones de bacterias se utilizó la línea celular JM109 de *Escherichia coli* (Taylor et al., 1993), cuyo genotipo se describe a continuación.

**JM109** .....endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 ( $r_k^-$ ,  $m_k^+$ ), relA1, supE44,  $\Delta(\text{lac-proAB})$ , [ $F'$  traD36, proAB, laqI<sup>q</sup>Z $\Delta$ M15].

- **Levaduras**

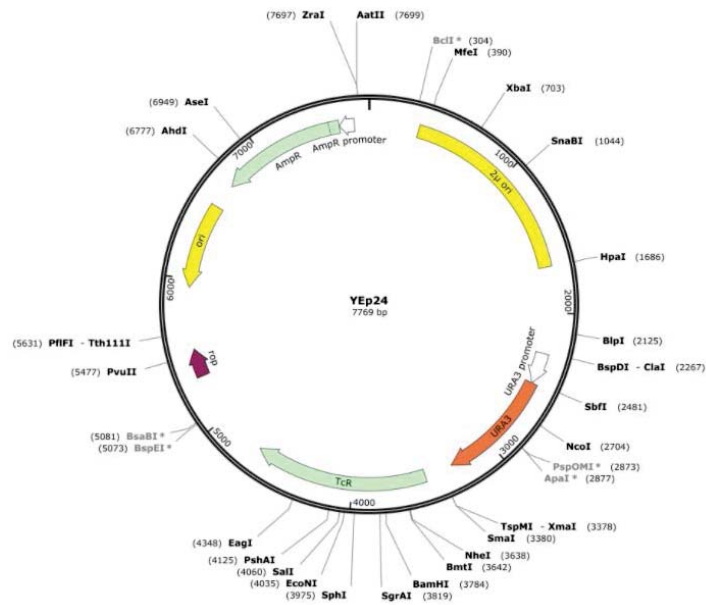
Para la transformación de levaduras se utilizaron las cepas YZS89A y YZS89C de *Saccharomyces cerevisiae* (Krishnamurthy et al., 2004; Rodríguez-Torres et al., 2013), cuyo genotipo viene descrito a continuación.

**YZS89A** .....MAT $\alpha$ ssu72::LEU2 [pDP62: TRP1 SSU72]

**YZS89C** .....MAT $\alpha$  ssu72::LEU2 [pM18D2: TRP1 ssu72-18D2 ]

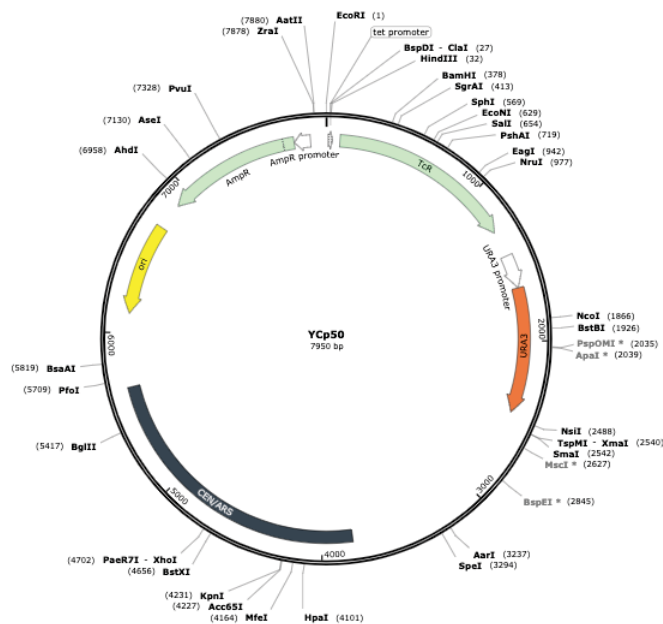
### 2. Los plásmidos utilizados

- Los clones de la genoteca utilizada (Carlson et al., 1984) se encontraban alojados en el plásmido YEp24. Se trata de un plásmido episomal de levadura que posee la capacidad de ser replicado en *E. coli*. Normalmente, se utiliza como herramienta para ensayos de expresión en *S. cerevisiae*. Este plásmido contiene el gen marcador *URA3*, para la selección de levaduras y el gen *AmpR* de resistencia a ampicilina, para la selección de bacterias. Los clones se colocaron en el lugar de corte de la endonucleasa *Bam*HI.



**Figura 3:** Representación gráfica del plásmido YEp24. Se muestran los diferentes lugares de corte de enzimas de restricción, los genes marcadores y el origen de replicación de este vector de clonación. Captura de pantalla obtenida en la página web [https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=yeast\\_plasmids&plasmid=YEp24&format=png](https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=yeast_plasmids&plasmid=YEp24&format=png).

- Los candidatos a supresores 12-1 y 13-1 proceden de una genoteca construida en el vector YCp50 (Rose et al., 1987). Este vector es similar a YEp24 pero contiene la secuencia centromérica, lo que mantiene un bajo número de copias.



**Figura 4:** Representación gráfica del plásmido YCp50. Se muestran los diferentes lugares de corte de enzimas de restricción, los genes marcadores y el origen de replicación de este vector de clonación. Captura de pantalla obtenida en la página web [https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=yeast\\_plasmids&plasmid=YCp50](https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=yeast_plasmids&plasmid=YCp50).

- pM471 es un plásmido que contiene el gen *SSU72* de *S. cerevisiae* alojado en el plásmido YEp24 (Sun and Hampsey, 1996).
- pN629 es un plásmido que contiene el gen reportero *lacZ* fusionado en la secuencia promotora de los genes *GAL1/10*.
- pM18D2 contiene la mutación con el mismo nombre del gen *SSU72*, cuyo fenotipo confiere sensibilidad a la temperatura *ts<sup>-</sup>*. Esta secuencia se encuentra alojada en el plásmido YEp24 (M. Freire, datos no publicados).

### 3. Medios de cultivo

- **Medio para bacterias**

El medio LBA (Luria-Bertani con ampicilina) permite seleccionar y cultivar bacterias que contengan un gen de resistencia a ampicilina. En este caso, las bacterias se transformaron con el plásmido YEp24 que contiene el gen marcador *AmpR*, como se comentó anteriormente. Para preparar este medio se utilizó un matraz de 1000 ml. La composición del medio LBA para preparar un volumen de 500 ml es descrito a continuación.

<b>Bactotripton</b>	5 g
<b>NaCl</b>	2,5 g
<b>Extracto de levadura</b>	2,5 g
<b>Glucosa</b>	0,5 g
<b>Agar 1,5%</b>	7,5 g
<b>Agua estéril bidestilada</b>	500 ml
<b>Ampicilina</b>	250 µl

Es importante mencionar que, antes de la adición de ampicilina, el medio fue esterilizado en un autoclave, durante 20 minutos a 121 °C y posteriormente enfriado a una temperatura de 60 °C.

- **Medios para levaduras**

El medio YPD (*Yeast, Peptone, Dextrose*) es un medio rico para el crecimiento de levaduras. Suele ser utilizado para cultivar cepas de levaduras antes de ser transformadas. Las levaduras pueden ser cultivadas en YPD tanto en placa, como en medio líquido con agitación, siendo incubadas siempre a 30°C. Los componentes del medio para preparar un volumen de 500 ml se describen a continuación.

<b>Extracto de Levadura</b> .....	20 mg/L
<b>Peptona</b> .....	10 mg/L
<b>Dextrosa</b> .....	20 mg/L
<b>Agua estéril bidestilada</b> .....	500 ml

Una vez añadidos todos los ingredientes el medio fue esterilizado en autoclave, durante 20 minutos a 121°C.

El medio CM-URA es un medio sintético que carece de uracilo y, por lo tanto, permite seleccionar y cultivar levaduras que contengan todos los genes necesarios para la síntesis de uracilo. En este caso, las levaduras (*ura3<sup>-</sup>*) se transformaron con el plásmido YEp24 que contiene el gen marcador *URA3*, como se comentó anteriormente. Para preparar este medio se utilizó un matraz de 1000 ml. La composición del medio CM-URA para preparar un volumen de 500 ml es descrito a continuación.

<b>Aminoácidos</b> .....	5 ml
▪ <b>Arginina</b> .....	2 g/L
▪ <b>Isoleucina</b> .....	2 g/L
▪ <b>Lisina</b> .....	8 g/L
▪ <b>Metionina</b> .....	2 g/L
▪ <b>Treonina</b> .....	2 g/L
▪ <b>Fenilalanina</b> .....	12 g/L
<b>Histidina, Leucina, Adenina y Tirosina</b> .....	40 mg/L
<b>Triptófano</b> .....	30 mg/L
<b>Dextrosa</b> .....	2%
<b>Agua estéril bidestilada</b> .....	950 ml

Una vez realizada la esterilización en el autoclave durante 20 minutos a 121 °C, se incluyó el YNB (*Yeast Nitrogen Base*).

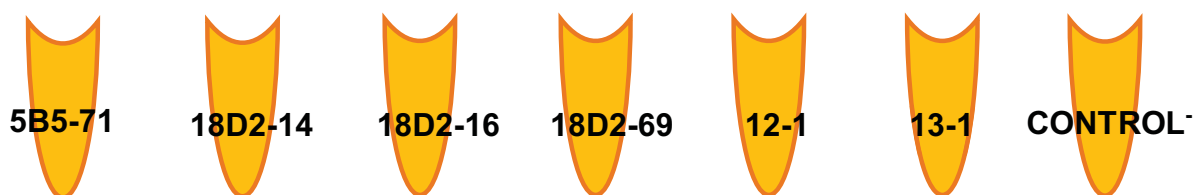
<b>YNB</b> .....	0, 67%
▪ <b>Vitaminas</b> .....	50 ml
▪ <b>Sales traza*</b> .....	100 ml
▪ <b>Fosfato de potasio</b> .....	15 ml
▪ <b>Sulfato de magnesio</b> .....	7,5 g/L
▪ <b>Cloruro sódico</b> .....	1,5 g/L
▪ <b>Cloruro cálcico</b> .....	1,5 g/L
▪ <b>Sulfato amónico</b> .....	75 g/L

\*Las sales traza incluidas en el YNB vienen descritas a continuación.

<b>Ácido bórico</b> .....	75 mg/L
<b>Sulfato cúprico</b> .....	6 mg/L
<b>Ioduro potásico</b> .....	15 mg/L
<b>Cloruro férrico</b> .....	30 mg/L
<b>Molibdato sódico</b> .....	30 mg/L
<b>Sulfato de zinc</b> .....	60 mg/L

#### 4. Transformación de bacterias

A fin de aumentar la cantidad de DNA plasmídico disponible, procedimos a transformar células competentes de la cepa JM109 de *E. coli*, con los plásmidos que alojaban los candidatos a supresores. Estas células competentes se descongelaron en hielo y con ellas se prepararon seis tubos *Eppendorf* (uno para cada candidato), en los que se añadieron 50 µl de células y 7 µl de plásmido, también se preparó un tubo *Eppendorf* para el control negativo, en el cuál, sólo las células fueron añadidas.



**Figura 5:** representación gráfica de los tubos *Eppendorf* preparados para el choque térmico con cada uno de los plásmidos de los candidatos utilizados en este trabajo y las células competentes JM109.



Los tubos preparados se incubaron en hielo durante 10 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, los tubos *Eppendorf* se introdujeron en el bloque termostático a 42°C durante 2 minutos para proceder al choque térmico y posteriormente, se sembraron individualmente en placas LBA. Se utilizaron perlas de vidrio para repartir homogéneamente las células por todas las placas. Por último, las placas sembradas se incubaron en una estufa a 37°C durante toda la noche.

Las colonias obtenidas tras la incubación de al menos 12 horas, se resembraron de nuevo en placas LBA con palillos estériles. A partir de las células crecidas de estas nuevas resiembras se procedió a la extracción de DNA plasmídico.

## 5. Transformación de levaduras

Disponíamos de placas de *Petri* con levaduras de la línea YZS89A y la cepa mutante 18D2 (YZS89C) de *SSU72*. Con un asa de siembra esterilizada, se tomó masa celular de las dos cepas disponibles y se transfirió cada una a un tubo de rosca de 20 ml para su cultivo en medio YPD durante toda la noche (*overnight*) a 30°C y con agitación. Una vez transcurrido el tiempo, se realizó una centrifugación durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante de los tubos. Los *pellet* con las células se lavaron con agua estéril bidestilada y se volvieron a centrifugar. Los sobrenadantes se descartaron de nuevo y las células se resuspendieron con 1 ml de tampón *OneStep*\* y se transfirieron el a tubos *Eppendorf*, siendo nuevamente centrifugadas 30 segundos a 13000 r.p.m. Finalmente, las células se resuspendieron en 300 µl de tampón *OneStep* (Chen et al., 1992).

Para cada transformación se pasaron 50 µl de las células competentes obtenidas, a nuevos tubos *Eppendorf*. A estos tubos se les añadió 2,5 µl de DNA de cadena simple de salmón desnaturizado, 10 µl de plásmido y 100 µl de *One Step*. Tras incubar a 30°C durante 45 minutos, los tubos se introdujeron en el bloque termostático a 42°C durante 10 minutos, después, se centrifugaron y se descartaron los sobrenadantes. Las células transformadas se resuspendieron en 100 µl de agua bidestilada estéril y se vertieron sobre placas de *Petri* con medio selectivo CM-URA.

\* Tampón *One Step* (PEG 40%, acetato de litio 0,2 M y ditiotreitól 100 mM).

## 6. Purificación de DNA plasmídico

La extracción y purificación del DNA plasmídico se realizó a partir de un Kit comercial (*GeneJET* de *Thermoscientific*). Se obtuvieron así, dos minipreps de cada plásmido con los candidatos y el control con *SSU72* (pM471).

## 7. Digestión de DNA plasmídico

Las digestiones del DNA plasmídico se prepararon en tubos *Eppendorf*, cada reacción con un volumen final de 20  $\mu$ l. El contenido de las digestiones se describe a continuación.

DNA plasmídico .....	10 $\mu$ l
Tampón enzima (10X) .....	2 $\mu$ l
Agua bidestilada estéril .....	7 $\mu$ l
Enzima de restricción <i>Cla</i> I (o lo que corresponda).....	1 $\mu$ l

Una vez obtenidos los tubos con los componentes necesarios para la digestión, se colocaron en la incubadora a 37°C durante aproximadamente 1 hora.

## 8. Electroforesis en gel de agarosa

Para poder analizar las digestiones se realizó una electroforesis en gel de agarosa. Este gel se preparó al 0,9% de agarosa. La agarosa se fundió en 100 ml de tampón 1XTAE con la ayuda de un microondas, se vertió en el soporte para geles y se colocó el peine para formar los pocillos.

Para cargar las muestras en los pocillos se utilizó 3  $\mu$ l de *GelGreen* (*Biotium*) de un stock en tampón de carga a una concentración de 5X. Además de las digestiones, también se cargó un marcador de pesos moleculares de una 1Kb en uno de los pocillos del gel.

Las muestras se dejaron correr en el gel durante 1 hora a 60 voltios.

Una vez finalizada la electroforesis, el gel se expuso en un transiluminador de luz UV y se visualizó en el programa bioinformático *Image Lab*.

## 9. Análisis de secuenciación y búsqueda en bases de datos

Una vez obtenidos los resultados de la electroforesis, los clones 5B5-71, 18D2-69 y 12-1 se enviaron a secuenciar al SAI (*Servizo de Apoio á Investigación, UDC*), junto con dos *primers* que anillan en ambos lados del inserto del plásmido (las secuencias adyacentes al sitio de clonación de la genoteca).

La base de datos SGD (*Saccharomyces Genome Database*) fue utilizada para realizar los análisis de las secuencias obtenidas tras la secuenciación. El primer paso consistió en un ensayo BLASTn, en el cuál, a partir de las lecturas resultantes de la secuenciación, identificamos el lugar de los clones en el genoma de *S. cerevisiae*. En esta base de datos se puede localizar las secuencias del BLASTn en su región cromosómica correspondiente. Así, teniendo en cuenta que el genoma de esta levadura se conoce completamente, sólo necesitamos acotar los extremos del inserto para conocer exactamente el total de genes contenidos en los plásmidos.

## 10. Ensayo X-gal overlay

Para analizar de modo cualitativo, los posibles efectos de una mutación en *SSU72* en la regulación de los genes *GAL*, empleamos el reportero para *Gal4-lacZ*. En una misma placa CM-URA, se sembraron 4 transformantes independientes de la cepa YZS89A y la cepa mutante 18D2 (YZS89C) de *SSU72* de forma que las colonias de cada una de ellas pudieran estar localizadas. Las cepas se encontraban transformadas con el plásmido pN629 que contiene el gen reportero *lacZ* con un promotor regulado por Gal4.

Para el desarrollo de color, se prepararon 10 ml de un gel de agarosa al 1% en un tampón fosfato 0,1M con pH7. Para evitar su solidificación se mantuvo a una temperatura de 65°C y se añadieron 400 µl de SDS al 10% y 400 µl de X-gal (40 mg/ml en dimetilformamida). Esta mezcla se vertió sobre la placa con las levaduras transformadas, de tal forma, que el gel con el sustrato forma una película sobre (*overlay*) las células. Estas fueron incubadas y monitorizadas a diferentes tiempos a una temperatura de 30°C (Rupp, 2002).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con los candidatos a supresores de mutaciones en *SSU72* comentados en la introducción, realizamos una caracterización más detallada, a fin de descubrir si alguno de estos supresores contenía algún gen funcionalmente relacionado con *SSU72* aportando nueva información científica.

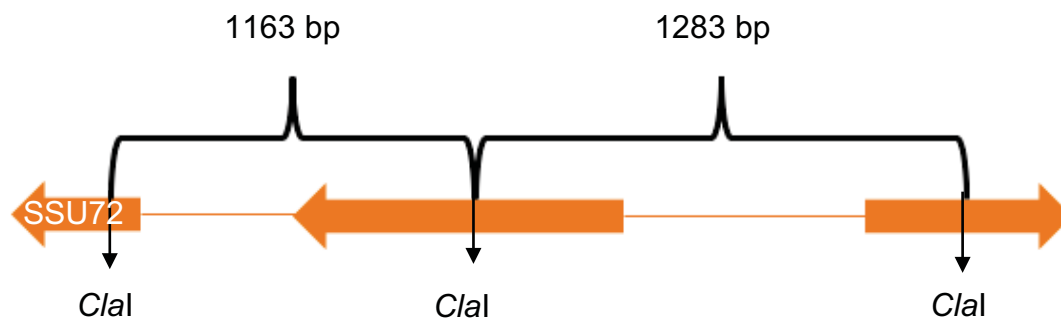
### 1. Amplificación de DNA plasmídico por transformación bacteriana y extracción de DNA amplificado

Tras descongelar los plásmidos que contenían los candidatos, se procedió a realizar transformaciones bacterianas con células competentes de *E.coli*. A partir de las bacterias transformadas, obtuvimos el DNA plasmídico necesario para varios análisis. Posteriormente, se realizó un análisis de restricción, que nos permitió averiguar si alguno de los clones debía su capacidad supresora a la presencia del propio *SSU72* y así poder descartarlos. Por último, se llevó a cabo la secuenciación y la búsqueda en bases de datos para identificar que genes podían ser los responsables de la supresión.

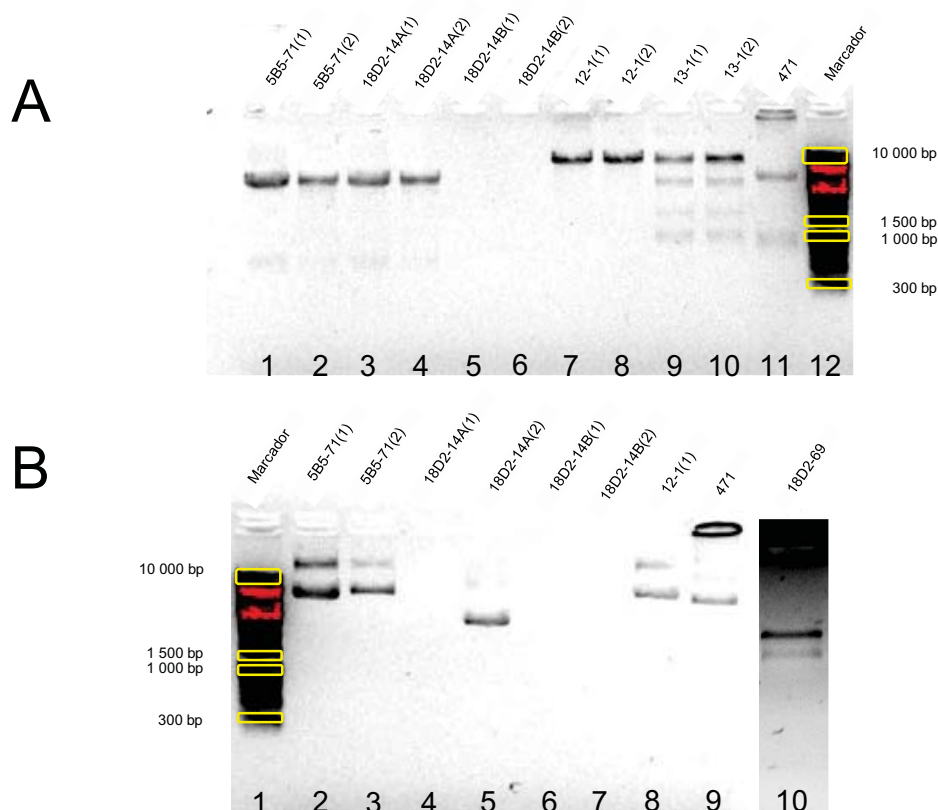
Las bacterias se transformaron con los candidatos 5B5-71, 18D2-14, 18D2-16, 18D2-69, 12-1 y 13-1. Los transformantes permitieron hacer la extracción del DNA plasmídico siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos.

### 2. Análisis de restricción y electroforesis

A fin de comparar el patrón de corte de *SSU72* con los candidatos a supresores, utilizamos la enzima de restricción *ClaI* (el patrón de corte de *SSU72* en el plásmido pM471 se muestra en la figura 6). Esta digestión es una primera aproximación, pues si coincidiera alguna de las bandas habría que verificar con otra digestión o bien mediante secuenciación. Una vez obtenidas las digestiones se llevó a cabo una electroforesis que permitió descartar los clones que poseían el mismo patrón de corte que *SSU72*.



**Figura 6:** Mapa de restricción mostrando el patrón de corte con *Clal* del inserto en el plásmido pM471 con *SSU72*. Como resultado de la digestión con las enzimas de restricción *Clal* aparecen dos bandas en la electroforesis, una correspondiente a un fragmento de 1163bp y otra correspondiente a un fragmento de 1283 bp.



**Figura 7:** Resultados de electroforesis en gel de agarosa. (A) En los pocillos 1 al 10 se encuentran los plásmidos con los candidatos a supresores (la mayoría digeridos por duplicado), en el pocillo 11 se encuentra el plásmido pM471 con el gen *SSU72*. El pocillo 12 contiene el marcador de pesos moleculares. (B) En el pocillo 1 se encuentra el marcador de pesos moleculares. En los pocillos 2 al 8 se encuentran los candidatos digeridos con la enzima de restricción *Clal*, en el pocillo 9, se encuentra el plásmido pM471 digerido con la misma enzima. En el pocillo 10 se encuentra el candidato 18D2-69 también digerido con la enzima *Clal*.

Como se puede observar en la figura 7(B), tras la electroforesis y debido a la baja definición de las bandas, solo pudimos apreciar que 5B5-71, 18D2-69 y 12-1 no presentaban bandas de restricción comunes al control con *SSU72* y por lo tanto debían contener algún otro gen de interés. El plásmido 13-1 fue descartado por no cumplir este objetivo. 5B5-71 y 18D2-14 presentan un patrón similar (figura 7A), por eso escogimos sólo uno de los candidatos, en este caso 5B5-71. El hecho de haber obtenido dos candidatos con el mismo patrón durante la ronda inicial de búsqueda de supresores nos hace pensar que se trate de un buen candidato.

### 3. Secuenciación y búsqueda en bases de datos

Los clones 5B5-71, 18D2-69 y 12-1 se enviaron a secuenciar al SAI. Del clon 18D2-69 obtuvimos lecturas a ambos lados del sitio de clonaje. En el caso de 5B5-71, sólo obtuvimos lectura con el primer *reverse*, mientras que en el 12-1 no obtuvimos ninguna. A causa de la situación generada por la pandemia del Covid-19, quedó pendiente la repetición de la secuenciación para completar la información de estos dos últimos candidatos.

Empleando la base de datos SGD (*Saccharomyces Genome Database*) se comprobó qué genes se encontraban en las secuencias de los clones 5B5-71 (lectura con *primer reverse*, un extremo) y 18D2-69 (ambos extremos). Comenzamos por un análisis de homología con el programa BLASTn, gracias a ello, identificamos las secuencias situadas en los extremos de los insertos y a partir de ahí, localizamos los cromosomas y coordenadas dentro de la secuencia cromosómica.

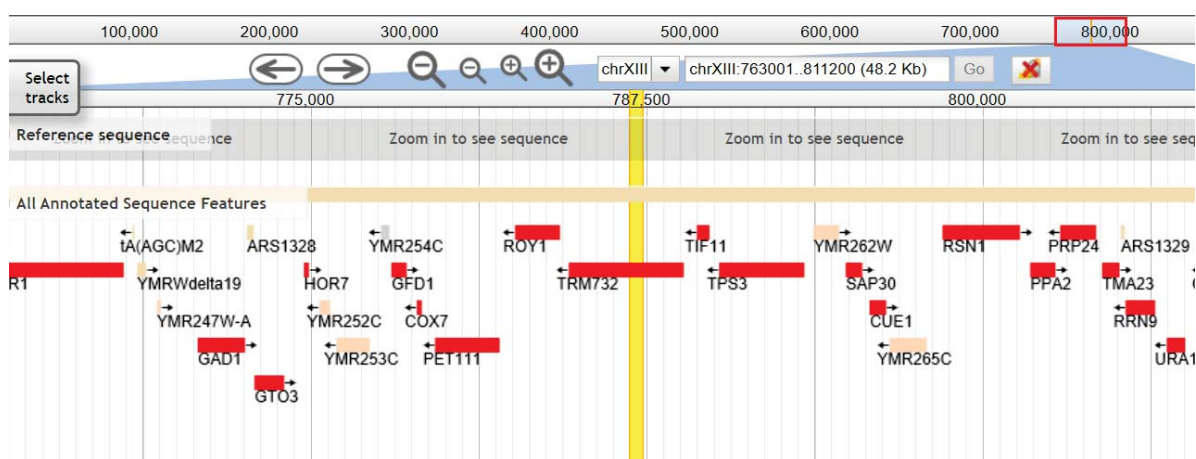
Genes en el plásmido 18D2-69:

La secuencia del clon de 18D2-69 pertenece al cromosoma XIII y gracias a la información obtenida por las lecturas de secuenciación de ambos extremos del inserto, sabemos que la secuencia se corresponde con las coordenadas del citado cromosoma (Figura 8 A y B). Por tanto, abarca cuatro genes, conocidos como *TIF11*, *TPS3*, *YMR262W* y *SAP30*:

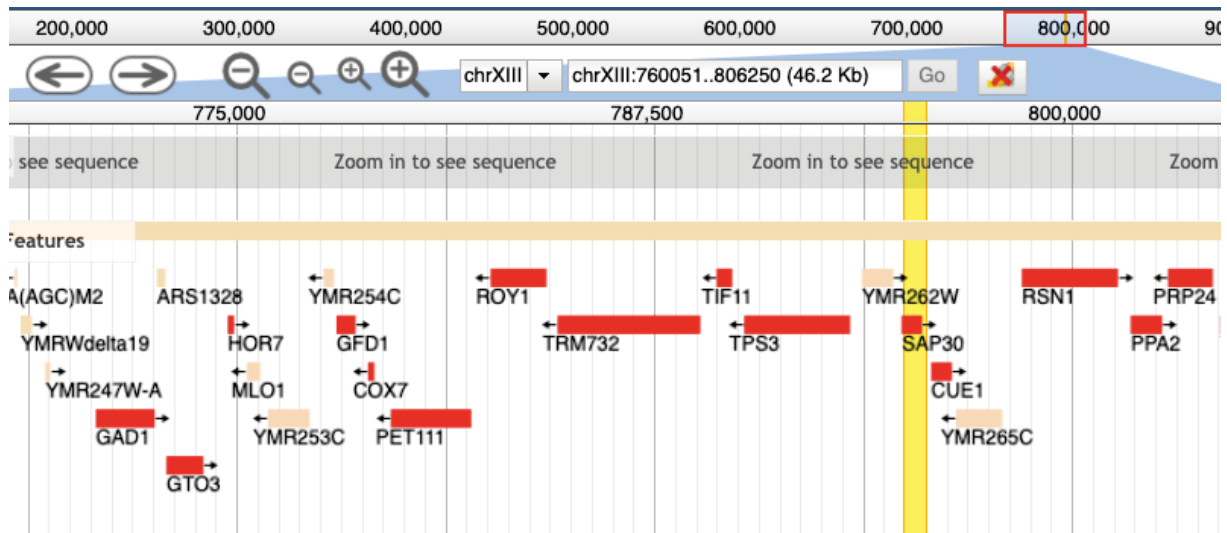
- ***TIF11***, es un gen de 462 pares de bases que codifica para un factor de inicio traduccional (eIF1A).

- **TPS3** es un gen de 3165 pares de bases que codifica para una subunidad reguladora del complejo trehalosa 6-fosfato sintasa/fosfatasa.
- **YMR262W** es un gen de 942 pares de bases con función desconocida.
- **SAP30** es un gen de 606 pares de bases que codifica para un componente del complejo de desacetilación de histonas Rpd3L. Su papel consiste en silenciar los telómeros, el rDNA y los *loci* involucrados en el apareamiento. También se encuentran implicada en el mantenimiento de los telómeros.

De estos cuatro genes del clon 18D2-69, y a falta de verificaciones por subclonado, pensamos que *SAP30* es el que tiene más probabilidades de ser el responsable de la supresión fenotípica característica (*ts<sup>-</sup>*) de la cepa que expresa el mutante 18D2. Pues existe una relación de *Ssu72* en su papel como factor esencial para la formación de *DNA-loops* y el complejo de desacetilación de histonas que evita la acetilación de la histona H4 en el promotor del gen que ha establecido el *DNA-loop*. En trabajos anteriores se descartó Rpd3L como factor implicado, pero en sus experimentos empleaban un mutante del extremo N-terminal de *Ssu72* (Castelnuovo and Stutz 2013). El mutante 18D2 (Trp101Stop) pierde el extremo carboxilo, por lo tanto, también la capacidad de establecer diferentes interacciones que pueden afectar a la desacetilación de histonas relacionada con el establecimiento de *DNA-loops*, por lo que probablemente, la sobreexpresión de Rpd3L, las compense.



**Figura 8(A):** Parte de la secuencia del cromosoma XIII de *Saccharomyces cerevisiae*. En ella se muestra el fragmento correspondiente al clon 18D2-69 con los genes *TIF11*, *TPS3* e *YMR262W*. La banda amarilla representa la lectura de secuenciación de un extremo del inserto con el *primer universal*. Captura de pantalla obtenida y modificada a partir de un análisis BLASTn en la base de datos online SGD <https://www.yeastgenome.org/locus/S000004874>.



**Figura 8(B):** Parte de la secuencia del cromosoma XIII de *Saccharomyces cerevisiae*. En ella se muestra el fragmento correspondiente al clon 18D2-69 con los genes *TIF11*, *TPS3* e *YMR262W*. La banda amarilla representa la lectura de secuenciación de un extremo del inserto con el *primer reverse*. Captura de pantalla obtenida y modificada a partir de un análisis BLASTn en la base de datos online SGD <https://www.yeastgenome.org/locus/S000004874>.

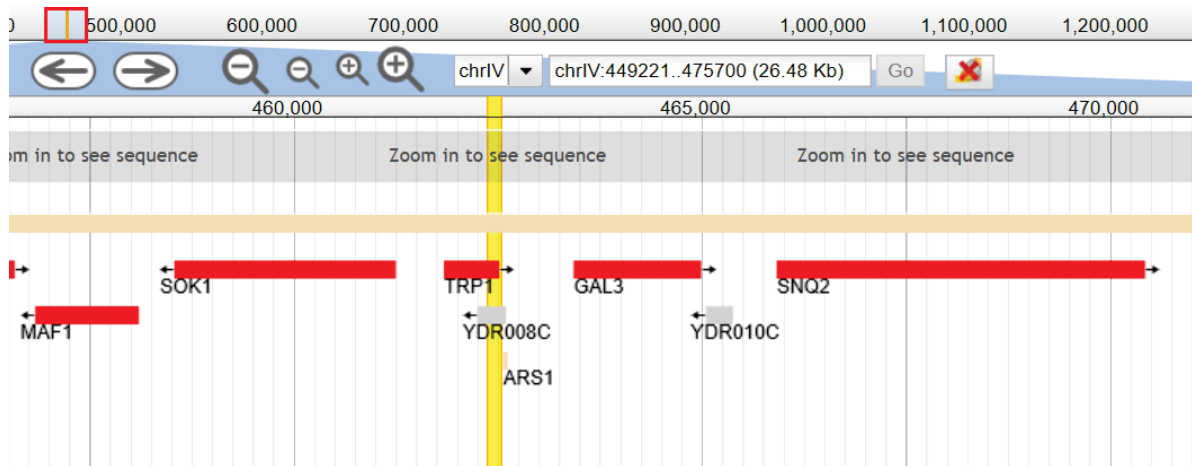
Genes en el plásmido 5B5-71:

La secuencia leída con el *primer reverse* del clon 5B5-71 pertenece al cromosoma IV de *Saccharomyces cerevisiae* y en el extremo secuenciado nos encontramos con dos genes, *GAL3* y, probablemente, *SNQ2*:

- ***GAL3*** es un gen de 1563 pares de bases que codifica para un factor de transcripción involucrado en la activación de los genes *GAL* en respuesta a la presencia de galactosa.
- ***SNQ2*** es un gen de 4506 pares de bases que codifica para un transportador ABC (ATP-binding cassette).

En este caso, *GAL3* parece ser el gen supresor de las cepas mutantes en *SSU72*, pues también es un factor de transcripción que, específicamente regula la expresión de los genes *GAL*. Además, no estamos seguros de que el gen *SNQ2* se encuentre dentro del inserto, debido a la ausencia de la lectura del *primer forward*.

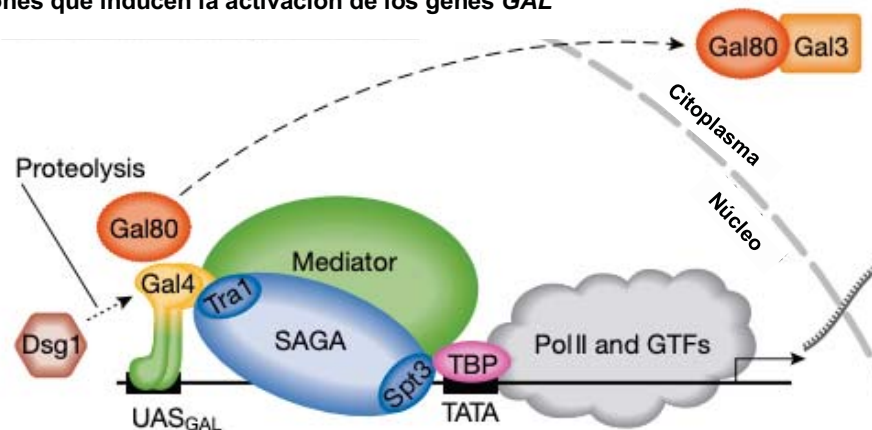




**Figura 9:** Parte de la secuencia del cromosoma IV de *Saccharomyces cerevisiae*. En ella se muestra el fragmento correspondiente al clon 5B5-71 con los genes *GAL3* y *SNQ2*. La banda amarilla representa la lectura de secuenciación de un extremo del inserto con el *primer reverse*. Captura de pantalla obtenida y modificada a partir de la base de datos online SGD <https://www.yeastgenome.org/locus/S000002416>.

Los genes *GAL* forman un regulón de genes necesarios para la utilización de la galactosa como fuente de carbono, permitiendo a la levadura crecer en ese medio. El activador transcripcional de estos genes es Gal4. En medios con glucosa, Gal4 se encuentra reprimido por Gal80 que enmascara su dominio de activación transcripcional. La proteína Gal3 es necesaria para liberar a Gal4 de la represión por Gal80, permitiendo la activación de los genes *GAL* en presencia de galactosa (Traven et al., 2006).

#### Condiciones que inducen la activación de los genes *GAL*

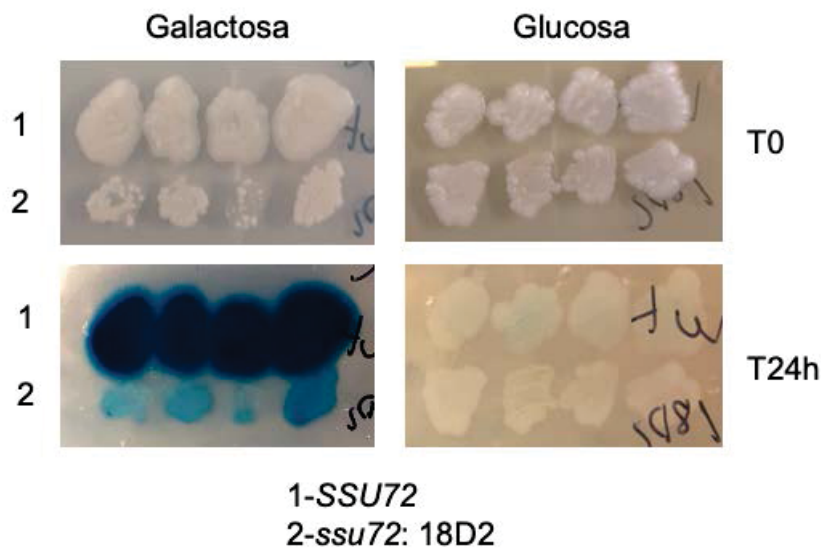


**Figura 10:** representación gráfica de la liberación mediada por Gal3 que experimenta el activador Gal4 de su represor Gal80 en condiciones de inducción de los genes *GAL* (modificado de Traven et al., 2006).

#### 4. Ensayo x-gal overlay

Para ver si la mutación de 18D2 afecta a la activación de Gal4 mediada por Gal3, se transformaron cepas de levadura con el plásmido pN629 que expresa el gen reportero *lacZ*, con la región UAS (*Upstream Activation Sequence*) de *GAL1/10*, cuya transcripción es activada por Gal4.

El gel con *X-gal* se vertió sobre las placas con las dos cepas de levadura transformadas con el plásmido pN629, y crecidas en medio con glucosa (Gal4 reprimido) y galactosa (existe activación por Gal4 gracias a Gal3). En la figura 11 se puede apreciar un color azul intenso en la cepa silvestre YZS89A en presencia de galactosa, indicando que el sustrato estaba siendo metabolizado por los genes *GAL*, con lo cuál Gal4 había sido desreprimido por Gal3 para activar la transcripción de dichos genes. La cepa mutante 18D2 de *SSU72* mostró un color azul claro en presencia de galactosa (visible tras varias horas, en la figura 11 se muestra a las 24 horas), indicando que la activación del gen reportero por Gal4 se había reducido drásticamente.



**Figura 11:** Se muestran placas con galactosa y glucosa, la fila 1 corresponde a la cepa *wild type* YZS89A y la fila 2 corresponde a la cepa 18D2. Tras 24 horas de exposición al gel con X-gal, la cepa YZS89A se encuentra de un color azul más intenso que la cepa 18D2.

Esto nos lleva a pensar que probablemente *GAL3* (y no *SNQ2*) sea el gen supresor del clon 5B5-71. Lo que pone en relevancia la importancia de *Ssu72* interactuando con *GAL3*, mediando en la activación por Gal4, puesto que en un mutante de *SSU72*, la activación de *GAL4* es mucho menor que en una cepa silvestre. Por otro lado, si la cepa mutante 5B5 de *SSU72* ve suprimido su fenotipo *ts<sup>-</sup>* con el clon 5B5-71, la supervivencia de las células mutantes se ve favorecida por el apoyo funcional que aporta Gal3, aunque el crecimiento no sea en galactosa. Pendientes de futuras comprobaciones, nuestros resultados indican nuevas funciones conjuntas de estos dos factores.

## CONCLUSIONES

La búsqueda de genes supresores de mutaciones en el gen *SSU72* nos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

- Los candidatos a supresores 5B5-71, 18D2-14, 18D2-69 y 12-1 no contenían al gen *SSU72* por lo que, contienen otros genes supresores del fenotipo *ts<sup>-</sup>* de mutaciones en este gen.
- El gen *SAP30* (del clon 18D2-69) parece ser el responsable de la supresión fenotípica característica de las cepas mutantes en *SSU72*, obtenidas para llevar a cabo esta investigación, pues se conoce una relación funcional entre *Ssu72* como factor esencial para la formación de *DNA-loops*, con la proteína *Sap30*, como parte del complejo de desacetilación de histonas (*Rpd3L*).
- En el caso de 5B5-71, el gen *GAL3*, parece ser el responsable de la supresión fenotípica. Mostramos que en el mutante 18D2 de *SSU72*, la eficiencia del proceso de activación de *Gal4* era escasa lo que apoya el resultado de que *Gal3* está funcionalmente relacionada con *Ssu72*.

A procura de xenes supresores de mutacións no xen *SSU72* permítenos chegar as seguintes conclusións:

- Os candidatos a supresores 5B5-71, 18D2-69 e 12-1 non contiñan o propio xen *SSU72* polo que conteñen outros xenes supresores do fenotipo *ts<sup>-</sup>* de mutacións neste xen.
- O xen *SAP30* (do clon 18D2-69) parece o responsable da supresión fenotípica característica das cepas mutantes en *SSU72*, obtidas para levar a cabo esta investigación, xa que se coñece unha relación funcional entre *Ssu72* como factor esencial para a formación de *DNA-loops*, con a proteína *Sap30*, como parte do complexo de desacetilación de histonas (*Rpd3L*).
- No caso de 5B5-71, o xen *GAL3* parece ser o responsable da supresión fenotípica. Mostramos que no mutante 18D2 de *SSU72*, a eficiencia do proceso de activación de *Gal4* era limitado o que apoia o resultado de que *Gal3* se encontra funcionalmente relacionada con *Ssu72*.

The searching for suppressors of mutations in the *SSU72* gene let us to conclude that:

- 5B5-71, 18D2-69 and 12-1 clones does not contain the *SSU72* gene so they must have another suppressor genes of the fenotype *ts<sup>-</sup>* mutations.
- The gene *SAP30* (form the clone 18D2-69) seems to be the responsible of the phenotipyc suppression from the *SSU72* mutant strains, since it is known a functional relation between *Ssu72* as an essential factor of the *DNA-loops* formation and the *Sap30* protein as a part of the desacetilation complex (*Rpd3L*).
- From the clone 5B5-71, the gene *GAL3* seems to be the responsible of the phenotipyc suppression. We have shown that in the *SSU72* 18D2 mutant, the efficiency of activation of *Gal4* was very limited, wich supports our result regarding *Gal3* as functionally related to *Ssu72*.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ansari, A. and Hampsey, M. (2005). A role for the CPF 3'-end processing machinery in RNAP II-dependent gene looping. *Genes & Development*, 19: 2969–2978.
- Berroteran, R.W., Ware, D.E. and Hampsey, M. (1994). The *sua8* suppressors of *Saccharomyces cerevisiae* encode replacements of conserved residues within the largest subunit of RNA polymerase II and affect transcription start site selection similarly to *sua7* (TFIIB) mutations. *Molecular and Cellular Biology*, 14: 226–237.
- Carlson, M., Osmond, B.C., Neigeborn, L. and Botstein, D. (1984). A suppressor of *SNF1* mutations causes constitutive high-level invertase synthesis in yeast. *Genetics*, 107: 19–32.
- Castelnuovo, M. and Stutz, F. (2013). Gene loops and HDACs to promote transcription directionality. *Nucleus*, 4: 92–94.
- Chen, D.C., Yang, B.C. and Kuo, T.T. (1992). One-step transformation of yeast in stationary phase. *Current Genetics*, 21: 83–84.
- Ganem, C., Devaux, F., Torchet, C., Jacq, C., Quevillon-Cheruel, S., Labesse, ... C. and Faye, G. (2003). *Ssu72* is a phosphatase essential for transcription termination of snoRNAs and specific mRNAs in yeast. *The EMBO Journal*, 22: 1588–1598.
- Heidemann, M. and Eick, D. (2012). Tyrosine-1 and threonine-4 phosphorylation marks complete the RNA polymerase II CTD phospho-code. *RNA Biology*, 9: 1144–1146.
- Kim, H.-S., Baek, K.-H., Ha, G.-H., Lee, J.-C., Kim, Y.-N., Lee, J., ... Lee, C.-W. (2010). The *hsSsu72* phosphatase is a cohesin-binding protein that regulates the resolution of sister chromatid arm cohesion. *The EMBO Journal*, 29: 3544–3557.
- Krishnamurthy, S., He, X., Reyes-Reyes, M., Moore, C. and Hampsey, M. (2004). *Ssu72* is an RNA polymerase II CTD phosphatase. *Molecular Cell*, 14: 387–394.
- Lorenzo Rodríguez, M.M. (2019). *Estudio ultraestructural de los efectos de SKT5 en la producción de quitina en Saccharomyces cerevisiae*. (Trabajo de fin de máster, Universidade da Coruña). Recuperado de: <http://hdl.handle.net/2183/24506>

- Luo, Y., Yogesha, S.D., Cannon, J.R., Yan, W., Ellington, A.D., Brodbelt, J.S., and Zhang, Y. (2013) Novel modifications on C-terminal domain of RNA polymerase II can fine-tune the phosphatase activity of *Ssu72*. *ACS Chemical Biology*, 8: 2042–2052.
- Meinhart, A., Kamenski, T., Hoepfner, S., Baumli, S. and Cramer, P. (2005) A structural perspective of CTD function. *Genes & Development*, 19: 1401–1415.
- Mejuto González, M. (2016). *Identificación de genes supresores de mutaciones en la fosfatasa Ssu72*. (Trabajo de fin de grado, Universidade da Coruña). Recuperado de: <http://hdl.handle.net/2183/17961>
- Mejuto González, M. (2017). *Efecto del número de copias en la capacidad del gen SKT5 de suprimir mutaciones de Ssu72 de levaduras*. (Trabajo de fin de máster, Universidade da Coruña). Recuperado de: <http://hdl.handle.net/2183/19685>
- Michels, C.A. (2002). *Genetic techniques for biological research: a case study approach*. New York: John Wiley & Sons.
- Nedea, E., He, X., Kim, M., Pootoolal, J., Zhong, G., Canadien, V., ...Greenblatt, J. (2003). Organization and function of APT, a subcomplex of the yeast cleavage and polyadenylation factor Involved in the formation of mRNA and small nucleolar RNA 3'-ends. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 33000–33010.
- Pinto, I., Ware, D.E. and Hampsey, M. (1992). The yeast *Sua7* gene encodes a homolog of human transcription factor TFIIB and is required for normal start site selection in vivo. *Cell*, 68: 977–988.
- Rodríguez-Torres, A.M., Lamas-Maceiras, M., García-Díaz, R. and Freire-Picos, M.A. (2013). Structurally conserved and functionally divergent yeast *Ssu72* phosphatases. *FEBS Letters*, 587: 2617–2622.
- Rosado-Lugo, J.D. and Hampsey, M. (2014). The *Ssu72* phosphatase mediates the RNA polymerase II initiation-elongation transition. *Journal of Biological Chemistry*, 289: 33916–33926.

- Rose, M.D., Novick, P., Thomas, J.H., Botstein, D. and Fink, G.R. (1987). A *Saccharomyces cerevisiae* genomic plasmid bank based on a centromere-containing shuttle vector. *Gene*, 60: 237–243.
- Rupp, S. (2002). LacZ Assays in Yeast. *Methods in Enzymology*, 635: 112–131.
- Saccharomyces* Genome Database Project. Disponible en: <https://www.yeastgenome.org/>. [consultado el 30 de abril de 2020].
- St-Pierre, B., Liu, X., Kha, L-C.T., Zhu, X., Ryan, O., Jiang, Z., and Zacksenhaus, E. (2005) Conserved and specific functions of mammalian *Ssu72*. *Nucleic Acids Research*, 33:464-477.
- Sun, Z.W. and Hampsey, M. (1996). Synthetic enhancement of a TFIIB defect by a mutation in *Ssu72*, an essential yeast gene encoding a novel protein that affects transcription start site selection in vivo. *Molecular and Cellular Biology*, 16: 1557–1566.
- Taylor, R.G., Walker, D.C. and McInnes, R.R. (1993). *E. coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic Acids Research*, 21: 1677–1678.
- Traven, A., Jelacic, B. and Sopta, M. (2006). Yeast Gal4: a transcriptional paradigm revisited. *EMBO reports*, 7: 496–499.
- Woychik, N.A. and Hampsey, M. (2002) The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell*, 108:453–463.
- Yurko, N.M. and Manley J.L. (2018) The RNA polymerase II CTD “orphan” residues: emerging insights into the functions of Tyr-1, Thr-4, and Ser-7. *Transcription*, 9: 30–40.



