

Resumen

Sus1 es una proteína conservada implicada en remodelación de cromatina y biogénesis de moléculas de ARNm. El gen *SUS1* de *Saccharomyces cerevisiae* es peculiar, ya que contiene dos intrones y sufre un proceso de ajuste (corte y empalme) alternativo, reteniendo uno o ambos intrones en respuesta a cambios en las condiciones ambientales. El ajuste del ARNpre-m de *SUS1* puede permitir a la célula controlar la expresión de la proteína Sus1, pero los mecanismos que regulan este proceso son poco conocidos. En este proyecto de tesis hemos investigado si la estructura adoptada por secuencias de ARN de *SUS1* contribuye a regular el proceso de ajuste de este gen. Utilizando análisis *in silico* junto con espectroscopia de RMN, electroforesis en gel y experimentos de desnaturalización térmica monitorizados por UV, primero demostramos que el ARN del segundo intrón (I2) del gen *SUS1* forma una horquilla débilmente estable de 37 nucleótidos. Esta horquilla contiene nucleótidos del sitio de ramificación (*branch site*) en su bucle apical y nucleótidos del sitio 3' de empalme adyacentes al extremo inferior del tallo. A través de ensayos funcionales descubrimos que dos de cuatro mutantes que alteran la estructura de la horquilla I2 exhibían peor expresión de *SUS1*. Experimentos de RT-PCR semi-cuantitativos indicaron que todos los mutantes acumularon ARNpre-m *SUS1* no ajustado y/o indujeron cambios en los niveles de ARNm maduro con respecto a la secuencia silvestre. Además, las funciones celulares de Sus1 relativas a desubicitinación de histona H2B y transporte de ARNm se vieron afectadas en los mutantes de la horquilla I2 que inhibían el proceso de ajuste. La segunda parte de la memoria de tesis se centra en el análisis del exón central (E2) situado entre los dos intrones del gen *SUS1*. Este exón puede eliminarse durante el proceso de ajuste, se genera en forma circular, e influye en el procesamiento de los intrones adyacentes, una situación inusual para las regiones exónicas de *S. cerevisiae*, donde el ajuste se basa principalmente en el reconocimiento de intrones. Utilizando experimentos de espectroscopía de RMN, electroforesis en gel, desnaturalización térmica y modificación química combinados con predicciones computacionales, demostramos que el ARN del exón E2 de *SUS1* forma un tallo conservado de doble hélice coronado por una intersección de tres hélices. Una de las horquillas que emergen de esta intersección presentó una estabilidad térmica significativa, así como un bucle apical rico en purinas inusualmente estructurado. Este bucle contiene dos pares de bases G:A consecutivos y está estructuralmente relacionado con el bucle de substrato de la ribozima VS. Ensayos celulares revelaron que tres mutantes con estructuras modificadas de E2 exhibían peor expresión de *SUS1*, y que una mutación compensatoria que restauraba el tallo conservado recuperaba la expresión a los niveles de la secuencia silvestre. Experimentos de RT-PCR semicuantitativos indicaron que todos los mutantes de E2 eran capaces de alterar las cantidades de transcritos ajustados y no ajustados de *SUS1* con respecto a la secuencia silvestre. En general, los resultados obtenidos en este proyecto de tesis indican que las estructuras de ARN formadas por el exón central y el segundo intrón del gen *SUS1* de *S.*

cerevisiae son relevantes para el ajuste y otros procesos de biogénesis del ARNm del gen *SUS1*.