

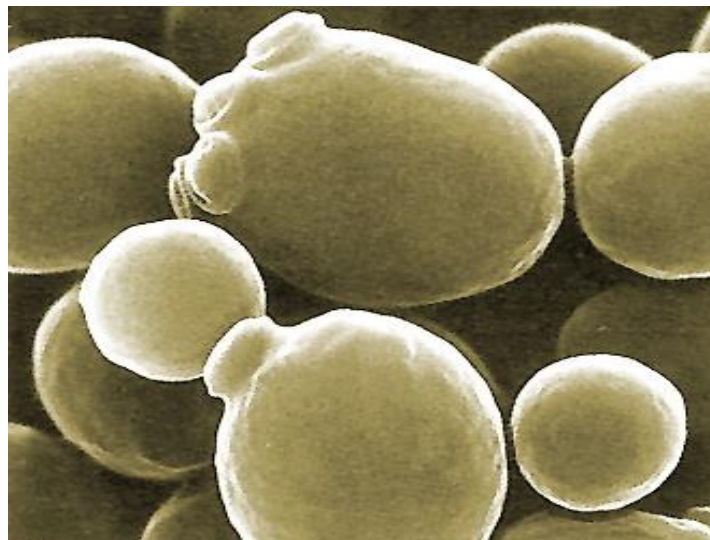
Máster de biología celular, molecular y genética

Memoria del Trabajo de Fin de Máster

Efecto del número de copias en la capacidad del gen *SKT5* de suprimir mutaciones de *SSU72* de levaduras.

Number copy effects on *SKT5* gene's ability to suppress yeast *SSU72* mutations.

Efecto do número de copias na capacidade do xen *SKT5* de suprimir mutacións de *SSU72* de lévedos.



MARTA MEJUTO GONZÁLEZ

A Coruña, 19 de Julio de 2017
Directora: M^a Ángeles Freire Picos

AGRADECIMIENTOS

Mis agradecimientos van dirigidos a mi tutora del trabajo de fin de máster, M^º Ángeles Freire Picos (sin la cual hubiese sido imposible la realización del presente trabajo) y a todo el personal del laboratorio de bioquímica y biología molecular que me ha brindado su apoyo en esta experiencia.

ÍNDICE

RESUMEN/ ABSTRACT	1
PALABRAS CLAVE	1
I. INTRODUCCIÓN	3
1.1 El gen <i>SSU72</i> y sus múltiples funciones en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
1.1 Análisis de supresión de mutantes de <i>ssu72</i>	4
1.2 La gemación en <i>S. cerevisiae</i>	6
1.3 <i>Ssu72</i> en la levadura <i>Kluyveromyces lactis</i>	8
1.4 Supresión del fenotipo de sensibilidad a la temperatura de la cepa <i>YMF72</i>	8
II. OBJETIVOS.....	11
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
3.1 Líneas celulares de bacterias y levaduras.....	13
3.1.1 Líneas celulares de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
3.1.2 Línea de <i>Escherichia coli</i>	13
3.2 Plásmidos.....	13
3.2.1 Supresor <i>18D2-5</i>	13
3.2.2 Clones en bajo número de copias	13
3.3 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento	13
3.3.1 LBA (medio Luria-Bertani con ampicilina) para bacterias.	14
3.3.2 LBA X-Gal (medio Luria-Bertani con ampicilina) para bacterias.....	14
3.3.3 CM-URA	14
3.4 Transformaciones.....	15
3.4.1 Bacteriana.....	15
3.4.2 Levaduras.....	15
3.5 Obtención de DNA plasmídico.....	15
3.5.1 Extracción con GeneJET Plasmid Miniprep Kit	15
3.5.2 Análisis de concentración	16
3.6 Análisis de restricción.....	16
3.6.1 Digestiones	16
3.6.2 Análisis por electroforesis	16
3.7 Secuenciación e identificación de genes supresores	17
3.10 Análisis de fenotipos.....	17
3.11 Microscopía	17
3.11.1Tinción de quitina	17

2.12	Análisis estadístico	18
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
4.1	Efecto del supresor en la cepa <i>YMF72</i>	19
4.1.1	Análisis de supresión de defectos de crecimiento por <i>SKT5</i> en alto número de copias.....	19
4.1.2	Análisis de supresión del fenotipo <i>ts⁻</i>	20
4.2	Análisis de supresores en bajo número de copias	20
4.2.1	Caracterización de supresores del fenotipo de <i>YMF72</i>	20
4.2.2	Efecto en el crecimiento.....	22
4.3	Estudio del efecto de expresión de <i>18D2</i> en el proceso de gemación	22
4.4	Análisis estadístico de los efectos causados por la expresión de <i>SKT5</i>	25
4.4.1	Morfología de las yemas.....	25
4.4.2	Tamaño celular	28
4.4.4	Análisis de la fluorescencia total de los cultivos.....	30
V.	CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....	35
VI.	BIBLIOGRAFÍA.....	37

RESUMEN/ ABSTRACT

En el presente trabajo hemos comprobado que el regulador de la quitina sintasa *SKT5* es capaz de suprimir fenotipos de crecimiento causados por la expresión del gen *KISSU72* en *S. cerevisiae*. Nuestros datos indican que la fosfatasa *Ssu72* además de actuar en el proceso de transcripción, el procesamiento de RNA y la separación en la anafase, también modula la síntesis de quitina. Análisis de microscopia de fluorescencia y estadísticos apoyan esta nueva función de la fosfatasa.

In the present work, we have verified that the regulator of the chitin synthase *SKT5* is able to suppress growth phenotypes caused by the expression of the *KISSU72* gene in *S. cerevisiae*. Our data indicate that the *Ssu72* phosphatase in addition to acting in the transcription process, RNA processing and separation in the anaphase, also modulates the synthesis of chitin. Fluorescence microscopy and statistical analysis support this new function of phosphatase.

PALABRAS CLAVE

SKT5, fosfatasa, *SSU72*, *KISSU72*, gemación, *Sacharomyces cerevisiae*

I. INTRODUCCIÓN

1.1 *El gen SSU72 y sus múltiples funciones en Saccharomyces cerevisiae*

El gen *SSU72* es esencial para la viabilidad celular (Sun *and* Hampsey, 1996), codifica para una proteína multifuncional conservada en todos los eucariotas. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* su actividad fosfatasa juega un papel fundamental en el inicio, elongación y terminación de la transcripción gracias a su interacción con la RNA polimerasa II (RNAPII). Esta última regula la transcripción de todos los genes que codifican para proteínas dando lugar a los RNA mensajeros (*mRNA*) además de RNA nucleares de pequeño tamaño (*snRNAs*) (revisado por Hahn, 2004). La RNAPII se diferencia de las otras RNA polimerasas, por la extensión presente en el extremo carboxilo de su subunidad mayor (Rpb1) denominada CTD (dominio carboxilo terminal). En *S. cerevisiae* está formado por unas 26 repeticiones del heptapéptido *Tyr₁-Ser₂-Pro₃-Thr₄-Ser₅-Pro₆-Ser₇* (se numeran las posiciones de los residuos en la repetición), en mamíferos son 52 y cantidades intermedias en los demás eucariotas

La fosforilación y desfosforilación de los residuos de serina 2, 5 y 7 es crítica para la actividad transcripcional de la RNAPII. El dominio CTD de la RNA pol II necesita estar hipofosforilado para que ésta pueda ser reclutada al promotor (Rosado-Lugo *and* Hampsey, 2014). Los cambios en el estado de fosforilación de estos residuos son esenciales para todo el ciclo de transcripción. Así, por ejemplo, en el proceso de elongación el residuo Ser-5-P de CTD es fosforilado por Kin28 del complejo *TFIIH* y a su vez la Ser-2 por Ctk1 del complejo *CTDK-1*. La desfosforilación la llevan a cabo *Ssu72* en el caso de la Ser-5-P mientras que la *Fcp1* tiene preferencia por la Ser-2-P. La actividad fosfatasa de *Ssu72* asegura el reinicio transcripcional hipofosforilando la RNAPII (Reyes-Reyes *and* Hampsey, 2007). (Krishnamurthy *et al.*, 2004; Bataille *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012). *Ssu72* interviene en la formación de *loops* de DNA, que aproximan el promotor y la región terminadora de genes transcripcionalmente activos necesarios para el reciclaje de la RNAPII al promotor permitiendo un nuevo ciclo de síntesis transcripcional (figura 1) (Rosado-Lugo *and* Hampsey, 2014; Lamas-Maceiras *et al.*, 2016).

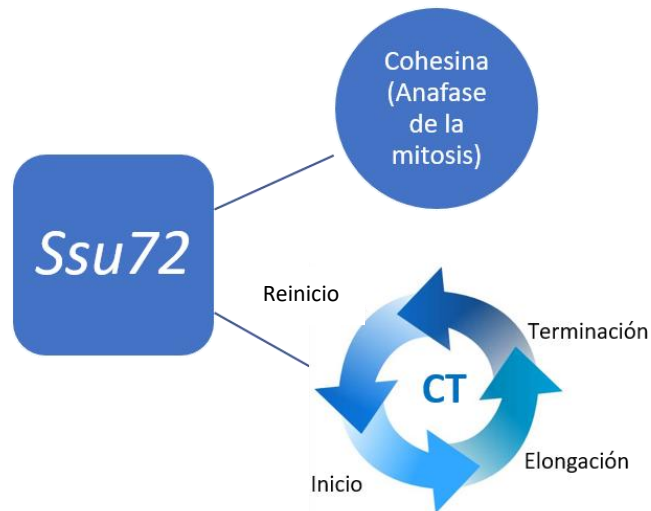


Figura1: Esquema de los procesos celulares en los que se ha descrito la implicación de la fosfatasa Ssu72. CT: ciclo de transcripción.

Con el tiempo se pudo comprobar que esta fosfatasa puede ejercer otras funciones, tanto en el núcleo como en el citoplasma. En el año 2010 se demostró que en humanos es necesaria para la desfosforilación de cohesina para permitir la separación de las cromátidas hermanas durante la Anafase (figura 1) (Kim, *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2016).

1.1 Análisis de supresión de mutantes de *ssu72*

La obtención de mutaciones en genes que codifican para un factor transcripcional permite identificar aquellos aminoácidos de la proteína importantes para su función en la célula. En el caso de *SSU72*, por ejemplo, el mutante *ssu72-2* sufre un reemplazamiento de una arginina, en la posición 129, por una alanina (R129A) que afecta a su actividad como fosfatasa (Pappas y Hampsey, 2000), la consecuencia es un fenotipo de sensibilidad a la temperatura (*ts*⁻). El análisis de supresión requiere de la existencia de fenotipos (como *ts*⁻) causados por mutaciones genéticas. La búsqueda de nuevas mutaciones supresoras de estos fenotipos permite identificar interacciones genéticas entre el gen supresor y el mutante. Esta estrategia se ha utilizado para poder identificar factores que interactúan con *Ssu72*, gracias al aislamiento de supresores en alto número de copias del fenotipo *ts*⁻. El propio *SSU72* se identificó como un supresor de mutaciones de *SUA7* (*TFIIB*). Alternativamente se busca la supresión en alto número de copias con el mismo fin expresado anteriormente.

En un estudio previo (Mejuto, 2016) identificamos el clon *18D2-5* como supresor en alto número de copias del mutante *18D2* de *Ssu72* (*stop-codon* en la posición 101 de la

proteína) (Freire-Picos, no publicado). El inserto está localizado en el cromosoma II y comprende las regiones cromosómicas que muestran la figura 2. Dentro de esta secuencia se descartaron las regiones codificadoras incompletas, quedando como posible candidato *SKT5* puesto que YBL062W es una región codificadora dudosa. *SKT5* codifica para una proteína activadora de *Chs3p* (quitina sintasa III) durante el crecimiento vegetativo.

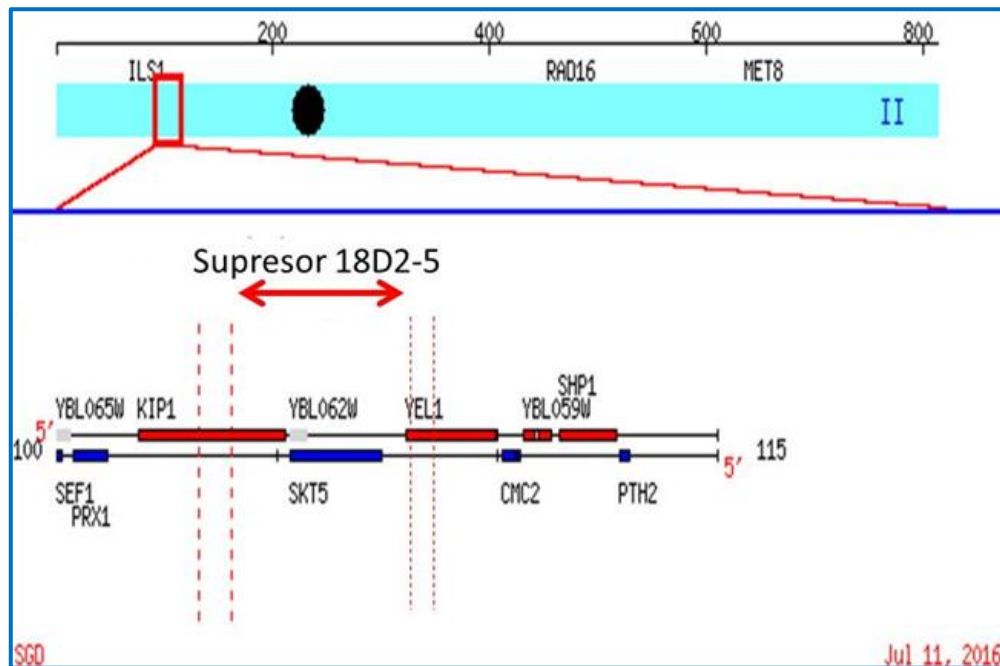


Figura 2: Localización cromosómica en el SGD tras el análisis de secuenciación y BlastN del candidato 18D2-5. Nos indica las zonas acotadas con los cebadores Ycp50U e Ycp50R (www.yeastgenome.org; modificado por Mejuto, 2016).

De hecho, *Skt5* forma un complejo con los factores *Glc 7* y *Bni4p*, cuya función es necesaria para la síntesis de quitina en el proceso de gemación (Rogg *et al.*, 2013). Dado que *SKT5* suprime el fenotipo ts^- de *S. cerevisiae*. *Glc7* es también una fosfatasa que actúa a nivel molecular en el procesamiento de RNA (al igual que *Ssu72*) y también es necesaria para determinar la posición y la regulación de la síntesis de quitina en el proceso de la gemación (figura 4) (Rogg *et al.*, 2013). Dada esta conexión con otras fosfatasas celulares, pensamos que *SSU72* podría ser un regulador del proceso de gemación. Función que no ha sido descrita hasta el momento.

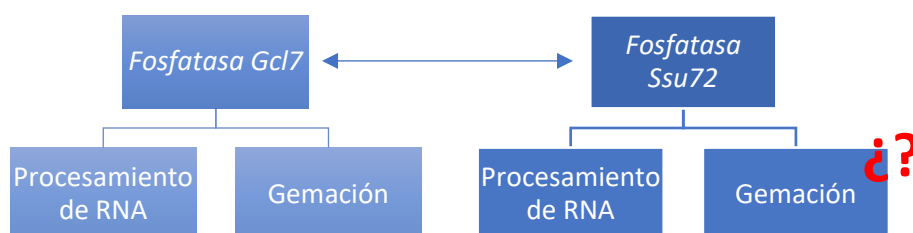


Figura 4: Esquema comparativo del papel de las fosfatasas *Gcl7* y *Ssu72* en la célula.

1.2 La gemación en *S. cerevisiae*

La gemación es un proceso de mitosis asimétrica. Como parte del proceso en la división celular, se genera una protuberancia, que se denomina yema, en cierta porción de la membrana plasmática. El núcleo de la célula progenitora se divide y uno de los núcleos hijos pasa a la yema. Durante el crecimiento vegetativo de *S. cerevisiae*, se produce la síntesis del tabique que va a separar físicamente las células de madre e hija durante la citocinesis y esta depende del correcto montaje del anillo del septo (Figura 5A y 5B). Septos y parches de actina se ensamblan en el cuello, formando dos anillos concéntricos como se representa en la figura 5C (Sacristan *et al.*, 2012).

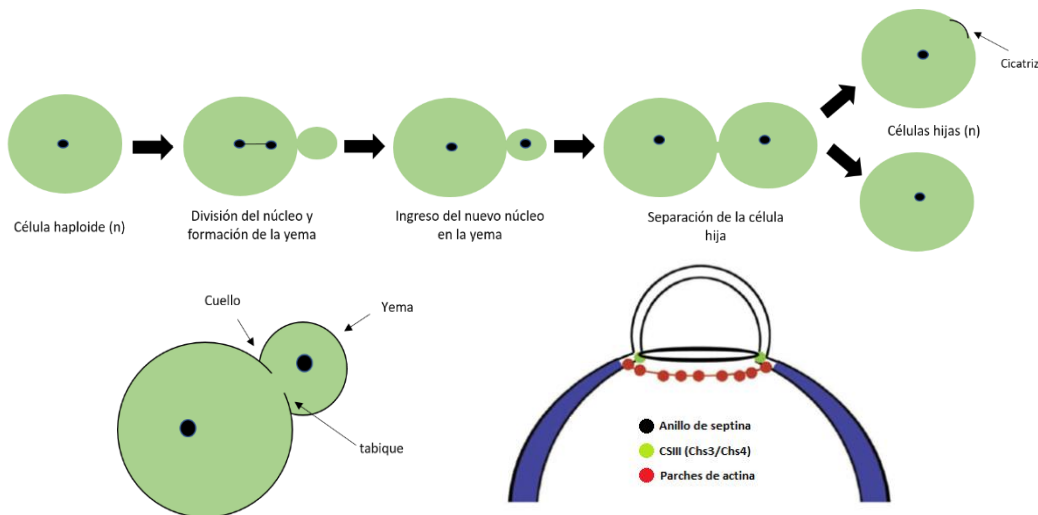


Figura 5: A. Representación gráfica del proceso de gemación durante la división celular. B: Representación gráfica de una célula madre gemando. C. Esquema de los componentes que intervienen en la formación de la yema durante la gemación (modificado de Sacristan *et al.*, 2012).

Un elemento clave en la estructura de las paredes celulares de levadura es la quitina. Este carbohidrato actúa como soporte para el ensamblaje del resto de los componentes de la yema (Kollar *et al.*, 1997). En *S. cerevisiae*, la mayoría de la quitina celular es sintetizada por la quitina sintasa III (CSIII), cuya subunidad catalítica es *Chs3*. La actividad de CSIII depende de la llegada de *Chs3* a la membrana plasmática, un proceso que es facilitado por otras proteínas. Se ha demostrado que la síntesis de quitina depende de *SKT5 (Chs4)*, *Chs5* y *Chs7*, similar a lo que ocurre durante el crecimiento vegetativo (revisado en Roncero, 2002).

La mayoría de la quitina se ensambla en un anillo de quitina en el cuello de la célula madre. Este anillo, aunque totalmente dispensable para la citocinesis, se vuelve esencial cuando este proceso se altera mínimamente bajo una variedad de condiciones (Gómez *et al.*, 2009; Roncero *and* Sánchez, 2010). Su síntesis depende de la activación de *CSIII* en la membrana plasmática pero también de su anclaje al cuello, ambos procesos están directamente vinculados a la función de *SKT5* (Trilla *et al.*, 1997; Sanz *et al.*, 2004; Reyes *et al.*, 2007). *SKT5* se requiere para la activación de *CSIII* a través de un mecanismo desconocido, pero se sabe que también interactúa con *Bni4*, y éste con el anillo septo (DeMarini *et al.*, 1997; Kozubowski *et al.*, 2003), permitiendo el ensamblaje correcto del anillo de quitina como se representa en la figura 6 (Sanz *et al.*, 2004).

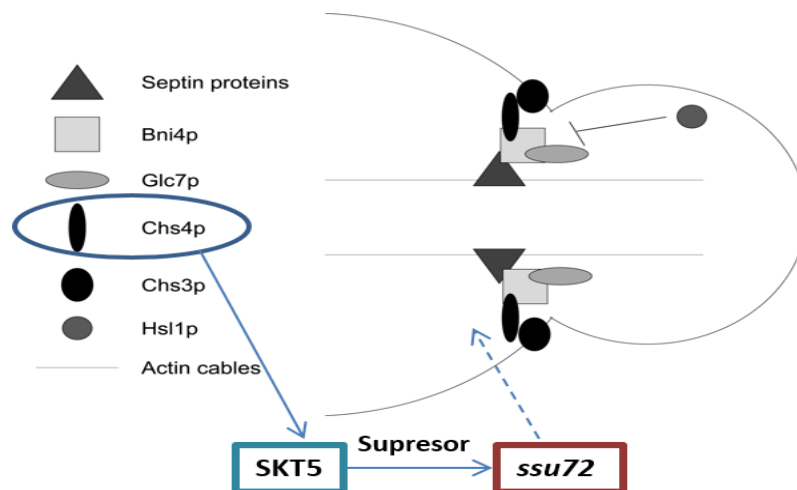


Figura 6: Esquema del complejo necesario para la formación del anillo de quitina que incluye *SKT5*(*Chs4*) (regulado por fosforilación y desfosforilación) (modificado de Rogg *et al.* 2013).

Bni4p es una proteína que facilita la interacción de filamentos de actina del septo a un surtido de proteínas en este complejo, incluyendo el activador *Chs3p/Chs4p*. Es probable que la quitina sintasa se reclute en el cuello de la yema después de que se haya determinado la posición del tabique, que depende de la localización del septo, *Bni4p*, *Chs3p* y *Chs4p*. *Bni4p* interactúa directamente con la fosfatasa *Glc7p*, si esto no ocurre, *Chs4p* y *Chs3p* no se localizan en el cuello de la yema. *Bni4p* es fosforilado en un ciclo celular dependiente de la pérdida de la quinasa *Hsl1p* resultando en un aumento de *Bni4p* en el cuello de la yema. El ensamblaje del anillo de quitina y del conjunto del tabique es un proceso complicado que requiere la interacción coordinada de una variedad de proteínas. Además, en vertebrados se producen oligómeros de quitina, que se acumula en muchas regiones y es particularmente

tóxica en las neuronas (Stern, 2017). La comprensión de estos mecanismos puede permitir la identificación de posibles dianas terapéuticas (Rogg *et al.* 2013).

1.3 *Ssu72* en la levadura *Kluyveromyces lactis*

K. lactis es una especie que se utiliza habitualmente por su interés biotecnológico y en estudios moleculares. A pesar de que sus genes presentan una alta homología con los de *S. cerevisiae*, la regulación transcripcional responde a características específicas de la especie, y por ello los estudios de expresión heteróloga muestran en muchos casos que estos factores no son equivalentes. Dada la relevancia celular de *SSU72*, estudios de nuestro laboratorio mostraron que la expresión del gen *SSU72* de *K. lactis*, *KISSU72*, en *S. cerevisiae* sólo complementa parcialmente a su ortólogo de *S. cerevisiae*. Si bien la cepa de *S. cerevisiae* expresando *KISSU72* (*YMF72*) es viable, su capacidad de crecimiento es menor en comparación con la cepa isogénica que expresa *SSU72*. Con respecto a los fenotipos de crecimiento, la cepa *YMF72* es sensible a la temperatura (*ts⁻*) por su peor capacidad de crecimiento a 37°C comparado con la cepa *YS89A* (Rodríguez-Torres *et al.*, 2013).

1.4 Supresión del fenotipo de sensibilidad a la temperatura de la cepa *YMF72*

Como se comentó anteriormente la cepa *YMF72* de *S. cerevisiae*, tiene un fenotipo de sensibilidad a la temperatura debido a la expresión del gen *KISSu72* de *K. lactis*. Podemos considerar este gen como un mutante de *SSU72* expresado en *S. cerevisiae*, es recesiva puesto que permite la búsqueda de supresoras del fenotipo *ts⁻*. Estudios previos del laboratorio (Freire-Picos y Stampfel, datos no publicados) llevaron a cabo una búsqueda de supresores del citado fenotipo en esta célula empleando la genoteca de M. Rose (Rose *et al.*, 1987). En la figura 7 se muestra la estrategia seguida. Como resultado se obtuvieron 73 candidatos a supresores, algunos de ellos se analizarán en este trabajo.

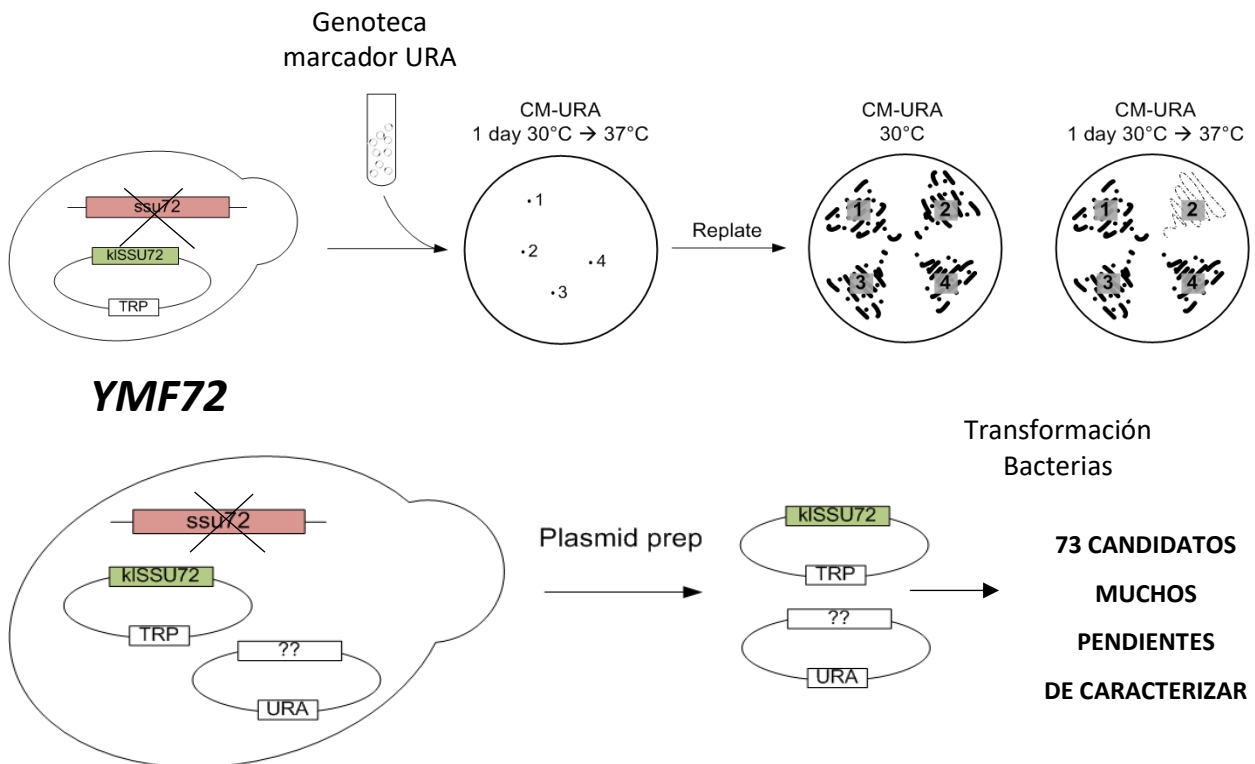


Figura 7: Estrategia seguida para la obtención candidatos a supresores en bajo número de copias del fenotipo ts- (modificado de Freire-Picos and Stampfel, datos no publicados).

En la figura 8 se muestran los análisis de 15 de los candidatos obtenidos según el proceso explicado en la figura 7.

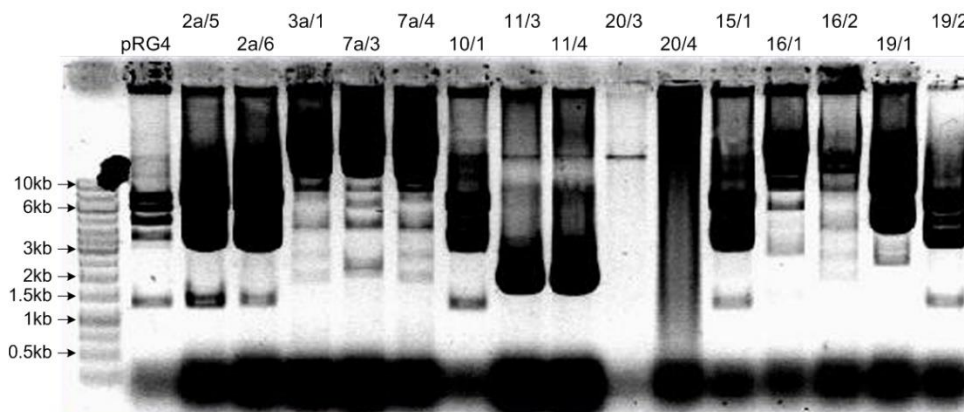


Figura 8: Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa de 15 candidatos a supresores del fenotipo ts- de YMF72 (Freire-Picos y Stampfel, datos no publicados). PRG4: candidato a SSU72.

En el presente trabajo se profundizará en la capacidad supresora de 18D2-5 para caracterizar su papel como supresor, y el posible papel de Ssu72 en el proceso de gemación celular. Si la supresión por la sobreexpresión de Skt5 compensa el defecto de crecimiento

provocado por la presencia de *KSSU72*, podríamos relacionar esta función con el dominio C-terminal de *SSU72* puesto que no está presente en la mutación que suprime (*18D2*). De corroborarse el papel supresor de *SKT5*, habremos encontrado una nueva implicación de la fosfatasa *Ssu72* en la célula. Es posible que esté relacionado con la regulación de la síntesis de quitina y la gemación en *S. cerevisiae*.

II. OBJETIVOS

En el presente trabajo proponemos:

1. Verificar el efecto de potenciales supresores obtenidos anteriormente en mutantes *Ssu72* de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Analizar su capacidad de actuar como supresores en bajo número de copias de la cepa *YMF72* por crecimiento en placa.
2. Comprobar posibles efectos de los supresores a nivel celular analizando al microscopio los llevar los posibles efectos de *SKT5* en la síntesis de quitina combinada con la presencia de *KISSU72*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Líneas celulares de bacterias y levaduras

3.1.1 Líneas celulares de *Saccharomyces cerevisiae*

Cepa	Genotipo	Fuente
YZS89A-T	(MATa <i>ura3-52 leu2-3,112 his3 trp1</i> Δ <i>ssu72::LEU2 [TRP1-SSU72]</i>)	Krisnamurthy et al., 2004
YMF72	(MATa <i>ura3-52 leu2-3,112 his3 trp1</i> Δ <i>ssu72::LEU2 [TRP1-KISSU72]</i>)	Rodríguez-Torres et al., 2013

3.1.2 Línea de *Escherichia coli*

Cepa	Genotipo	Fuente
DH5α	<i>fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 Φ80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	Taylor et al., 1993
XL1-blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIq ΔM15 Tn10 (Tet^r)]</i> .	Bullock et al., 1987

3.2 Plásmidos

3.2.1 Supresor 18D2-5

Plásmido que contiene *SKT5* en el vector episómico *YEp24* para expresión en levaduras con origen de replicación para *S. cerevisiae* y marcador *URA3* (Mejuto, 2016).

3.2.2 Clones en bajo número de copias

Colección de plásmidos candidatos a supresores en el vector centromérico *YCp50* (Rose et al., 1987), derivados del análisis de Gerald Stampfel en nuestro laboratorio (Freire y Stampfel, datos no publicados).

3.3 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Los medios utilizados en cultivos tanto de bacterias como de levaduras son descritos a continuación. Para la preparación de placas de cultivo (medios sólidos) se adicionó bacto-agar al 1,5%. Además, las soluciones se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a 121°C y 1 atmósfera de presión.

3.3.1 LBA (medio Luria-Bertani con ampicilina) para bacterias.

El medio Luria-Bertani con ampicilina (tabla 1) para la selección de bacterias transformadas con plásmidos que contengan genes de resistencia a la ampicilina como *YEp24*.

Tabla 1: Componentes del medio LBA

	Volumen de 500ml
Bactotripton	5g
NaCl	2,5g
Yeast extract	2,5g
Dextrosa (glucosa)	0,5g
Agar	7,5g
Ampicilina	250µl*

*Añadido tras la esterilización.

3.3.2 LBA X-Gal (medio Luria-Bertani con ampicilina) para bacterias.

Tabla 2: Componentes del medio LBA X-Gal

	Volumen de 500ml
Bactotripton	5g
NaCl	2,5g
Yeast extract	2,5g
Dextrosa (glucosa)	0,5g
Agar	7,5g
Ampicilina*	250µl*
IPTG*	250µl*
X-Gal*	125µl*

*Añadido tras la esterilización.

3.3.3 CM-URA

El CM-URA (tabla 3) un medio sintético completo (CM) con una auxotrofia para uracilo. Permite seleccionar células de levaduras que contengan plásmido con el marcador URA3. Para las placas se añadió agar al 1,5%.

Tabla 3: Componentes del medio CM-URA

**Mezcla de aminoácidos 200 X	5 mL
Histidina, Leucina, 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	2 g/L
Treonina	2 g/L
Fenil - Alanina	12 g/L

Tras la esterilización, se añadió el YNB (*Yeast Nitrogen Base*) (tabla 4) a una concentración final de 0,67%.

Tabla 4: Componentes del YNB.

YNB		Sales traza 150 X	
Vitaminas 300X	50 ml/L	Ácido bórico	75 mg/L
Sales traza 150 X	100 ml/L	Sulfato cúprico	6 mg/L
Fosfato de potasio	15 g/L	Ioduro potásico	15 mg/L
Sulfato de magnesio	7,5 g/L	Cloruro férrico	30 mg/L
Cloruro sódico	1,5 g/L	Molibdato sódico	30 mg/L
Cloruro cálcico	1,5 g/L	Sulfato de zinc	60 mg/L
Sulfato amónico	75 g/L		

3.4 Transformaciones

3.4.1 Bacteriana

Para la transformación de cada candidato partimos de 50 µl de células competentes de la cepa de *E. coli DH5α o XL-1Blue* (dependiendo de la disponibilidad), éstas se mezclaron con 1 µl de DNA plasmídico. Tras incubar 10 minutos en hielo, se sometieron a un choque térmico a 42°C durante un máximo de 2 minutos. Las células fueron sembradas en placas de LBA (figura 5) y se incubaron toda la noche a 37°C.

3.4.2 Levaduras

Se utilizó el método de transformación de levaduras en fase estacionaria “One Step” (Chen *et al.*, 1992). Se preparó un cultivo de células crecidas hasta la fase estacionaria en YPD (2% Yeast extract, 1% peptona y 2% dextrosa). Se precipitaron las células y se resuspendieron en un volumen final de 100 µL de “One Step” buffer (acetato de litio 0,2 M, 40% PEG 3350 y ditiotreitól 100 mM) además para cada transformación, se utilizó 1 µg de plásmido y 5 µL de DNA de esperma de salmón monohebra. Tras incubarlas 30 minutos a 45°C, las células se sembraron en medio selectivo CM-URA y se mantuvieron 2-3 días a 30°C.

3.5 Obtención de DNA plasmídico

3.5.1 Extracción con *GeneJET Plasmid Miniprep Kit*

El Kit *GeneJET Plasmid Miniprep de Thermo Scientific™* se utilizó para la obtención de DNA plasmídico a partir de bacterias, a pequeña y mediana escala dependiendo de las características del vector y de la extensión de la siembra en placa. Tras su crecimiento durante

toda la noche a 37 °C, se recogieron las células correspondientes a un cuarto de extensión y se siguió el protocolo del kit.

3.5.2 Análisis de concentración

Para realizar la medida de la concentración de DNA se tomaron 1 µL de la preparación de DNA. Las mediciones se llevaron a cabo en un espectrofotómetro UV/Vis de cuantificación de DNA (Implen Nanophotometer®). Se midió la absorbancia a 260nm (OD₂₆₀) y se calculó la concentración real teniendo en cuenta que DO₂₆₀=1 equivale a una concentración de 50 µg/mL de DNA.

3.6 Análisis de restricción

3.6.1 Digestiones

El DNA plasmídico fue digerido con las endonucleasas de restricción, que se indican en los resultados, (suministradas por los proveedores Takara y Thermo Scientific). Para cada enzima se utilizó el tampón y la temperatura suministrados por la casa comercial, a excepción de las dobles digestiones para las que se preparó buffer O'Farrel (tabla 5). De forma general, las digestiones transcurrieron por espacio de 2-3 horas a 37° C.

Tabla 5: Componentes de Buffer O'Farrel

10 X SALES	0,33 M Tris-acetato (pH7.9)
	0,66 M Acetato potásico
	0,1 M Mg Acetato magnésico
10 X DTT	5mM DTT esterilizado por filtración
10 X BSA	1 mg/mL de seroalbúmina bovina esterilizada por filtración

3.6.2 Análisis por electroforesis

Se prepararon geles de agarosa al 0,9%, empleando el tampón de electroforesis TAE (Tris 40 mM; EDTA 1 mM; acetato sódico 20 mM y acetato acético 30 mM a pH 8.0) y tampón de carga 10X (solución acuosa de glicerol al 50%, azul de bromofenol al 25% y xilen-cianol al 25%). Para visualizar los ácidos nucleicos en los geles de agarosa, se añadió Gel Green (BIOTUM) a cada muestra antes de cargar en el gel de electroforesis.

3.7 Secuenciación e identificación de genes supresores

Los plásmidos que contenían candidatos a supresores fueron enviados a Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación de la Universidad de A Coruña (SAI) para su secuenciación. Los cebadores utilizados en la secuenciación se diseñaron para que anillasen a ambos lados del sitio *BamHI* (de clonación de la genoteca) son los siguientes:

- YCP50U 5'-CCCTCTTGCGGGATATCGT-3' T_m 56 °C
- YCP50R 5'-GAAGGAGCTGACTGGGTT-3' T_m 56 °C

Una vez obtenida la secuencia de los insertos se efectuó un análisis BLASTN (*Basic Local Alignment Search Tool Nucleotides*) en la base de datos “*Saccharomyces Genome Database*” (SGD) (www.yeastgenome.org).

3.10 Análisis de fenotipos

Se realizaron siembras de los transformantes con supresores en placas incubadas a 30°C y 37°C. Con el fin de obtener diluciones seriadas 1/10 de cada uno de los candidatos a supresor, empleamos una placa multi-Titer de 96 pocillos. Se realiza el traspaso de 20 µl de una columna a la siguiente para obtener un volumen final de 200µl.

3.11 Microscopía

A fin de conocer el efecto de la sobreexpresión de *SKT5* sobre la síntesis de quitina y otros posibles efectos en la morfología celular, llevamos a cabo un estudio de microscopía.

3.11.1 Tinción de quitina

Para la tinción de quitina se emplea el *Fluorescent Brightener 28 MP Biomedicals*, LLC (Calcofluor blanco). Se trata de un fluorocromo de tinción no específico que se une a la celulosa y la quitina. Este compuesto va a teñir las paredes celulares y, en levaduras, se une de manera específica en las zonas de gemación y cicatrices ricas en quitina, presentes en una célula madre tras la gemación (Stagoj *et al.*, 2004).

Tabla 6: Componentes de los reactivos empleados para la tinción con calcofluor.

REACTIVOS	
REACTIVO A	
Hidróxido de potasio	12.5g
Glicerol	12.5g
Agua destilada	100ml
REACTIVO B	
Calcofluor blanco	0.1g
Evans Blue <small>ACROS ORGANICS</small>	0.04g
Agua destilada	100ml

Siguiendo las instrucciones del proveedor, para la tinción, sobre un portaobjetos se depositan partes iguales de los reactivos A, B y medio de cultivo (en nuestro caso 1 μ l de cada uno). Las células se analizan en un microscopio Nikon Eclipse 50i con fluorescencia adaptada. Para la observación de las muestras con fluorescencia se emplea el filtro DAPI, ya que, el espectro de excitación del calcofluor blanco es de 460nm y el de emisión de 360nm.

2.12 Análisis estadístico

Se calcularon las medias y las desviaciones estándar de los siguientes parámetros: morfología anómala de las yemas, tamaño celular y luminosidad desprendida por célula en las diferentes cepas transformadas. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa *IBM SPSS Statistic* versión 21.0.0.

Empleando un análisis de la varianza de una vía (ANOVA) se comprobó si existían diferencias significativas entre las diferentes cepas transformadas a diferentes temperaturas en función a los parámetros anotados. En el caso de verificar de que existe variabilidad en los datos se aplicará sobre los mismos el test de Tukey para analizar de qué forma afecta a cada cepa los diferentes plásmidos en los distintos tratamientos (30°C y 37°C) y así poder dividirlos en grupos similares. El test de Tukey se aplicó en todos los casos al nivel de significación 0.05 ($p < 0.05$).

Por otra parte, a través de un contraste de hipótesis para dos medias por medio de la prueba T-Student se van a comparar por separado las cepas transformadas crecidas a 30°C y las crecidas a 37°C a un nivel de significación 0.05 ($p < 0.05$).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Efecto del supresor en la cepa YMF72

4.1.1 Análisis de supresión de defectos de crecimiento por SKT5 en alto número de copias

La expresión *KISSU72* en *S. cerevisiae* (cepa *YMF72*) complementa parcialmente a *SSU72* (Rodríguez-Torres *et al.*, 2013). A fin de comprobar si el supresor de la mutación *18D2* (*18D2-5*) que contiene *SKT5*, era capaz de complementar los defectos de crecimiento de *YMF72*, se transformó con *18D2-5*, y se realizaron controles de la cepa silvestre (*YZS89A-T*) y la mutante (*YMF72*) con el vector *YEp24*. En la figura 9 se muestran los resultados del crecimiento en placa de los transformantes a 30°C durante 6 días.

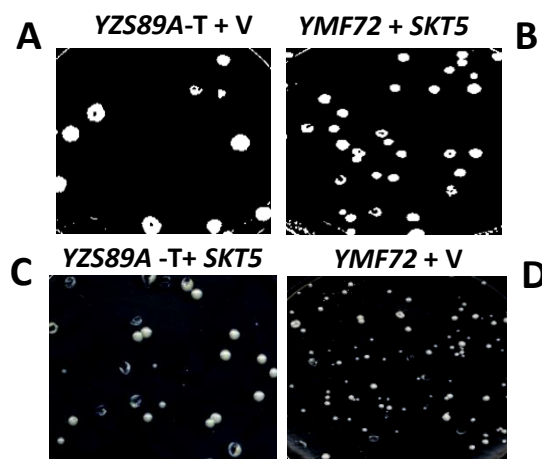


Figura 9: Crecimiento de la cepa *YMF72* en medio CM-URA a 30°C con el plásmido *18D2-5* (*SKT5*) y varios controles. V: vector *YEp24*.

Como se muestra en la figura 8B el supresor *18D2-5* con *SKT5* en alto número de copias, es capaz de complementar el defecto de crecimiento de la cepa *YMF72*, ya que si lo comparamos con el control negativo (la cepa *YMF72* transformada con el vector vacío, figura 8D), el tamaño de las colonias es claramente mayor. La sobreexpresión de *SKT5* permite recuperar el tamaño de las colonias de la cepa salvaje, por tanto, el defecto de la expresión de *KISSU72* en *S. cerevisiae* se ve suprimido por *SKT5*, que codifica para una proteína implicada en la síntesis de quitina.

4.1.2 Análisis de supresión del fenotipo ts^-

A fin de comprobar mejor las diferencias de todos los candidatos crecidos en la misma placa, se efectuaron diluciones seriadas 1/10 de células que muestran defectos de crecimiento con respecto a la cepa salvaje de *S. cerevisiae* a diferentes temperaturas (figura 10). En paralelo las mismas muestras se replicarán en una placa a 37°C para comprobar los fenotipos de crecimiento.

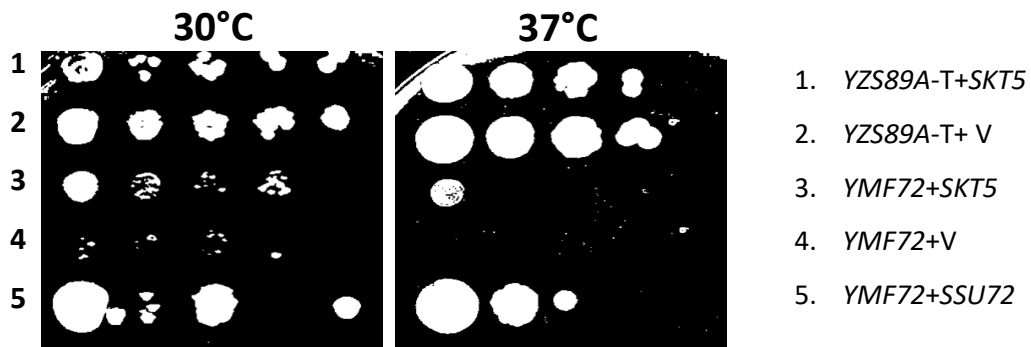


Figura 10: Placas CM-URA de las diluciones seriadas de cada una de las cepas transformadas incubadas a 30°C y 37°C. V: Vector

Lo primero que llama la atención al comparar ambas figuras es el defeco de crecimiento a 37°C, como se puede observar en el general las colonias de *YMF72* son más pequeñas, por poseer un peor crecimiento. Cabe destacar, como se explica en la figura 10, tanto en la cepa *YMF72* con el candidato *18D2-5* como en la cepa *YMF72* con *13-1* (contiene el propio *SSU72*) el defecto se corrige parcialmente, especialmente si lo comparamos con la cepa mutante transformada con el vector (línea 4). En el caso del *13-1* el crecimiento es similar al salvaje (figura 10, comparación línea 2 y 5). El crecimiento en diluciones seriadas muestra una complementación parcial del fenotipo ts^- por *SKT5*.

4.2 Análisis de supresores en bajo número de copias

4.2.1 Caracterización de supresores del fenotipo de *YMF72*

Como se comentó en la introducción en anteriores estudios se obtuvieron supresores en bajo número de copias en la cepa *YMF72* quedaron pendientes de caracterización (figuras 7 y 8). En este trabajo nos centramos en 8 candidatos que previamente habían mostrado ts^+ de *SSU72*.

Para el estudio de los candidatos se llevó a cabo un análisis de restricción. Se realizaron digestiones de los candidatos con enzimas de restricción cuyo patrón de corte en *SKT5* es conocido. A continuación (figura 11A), se incluye el resultado de la electroforesis obtenido en la digestión de los candidatos con *EcoRI*. Con el análisis de restricción de candidatos a supresores, se obtuvo un patrón de bandas que fue útil para decidir cuáles se enviaron a secuenciar a Servicios Centrales de la UDC los candidatos de los carriles 4, 8, 9 y 10 por presentar un patrón similar a *SKT5*. Los candidatos de los carriles 5 y 11 fueron descartados por no presentar una concentración óptima para el análisis y, por último, a los candidatos correspondientes a los carriles 6 y 7 se les realizó un nuevo análisis como se indica la figura 11B con otras enzimas de restricción (*XhoI* y *EcoRI*) y se enviaron a secuenciar posteriormente.

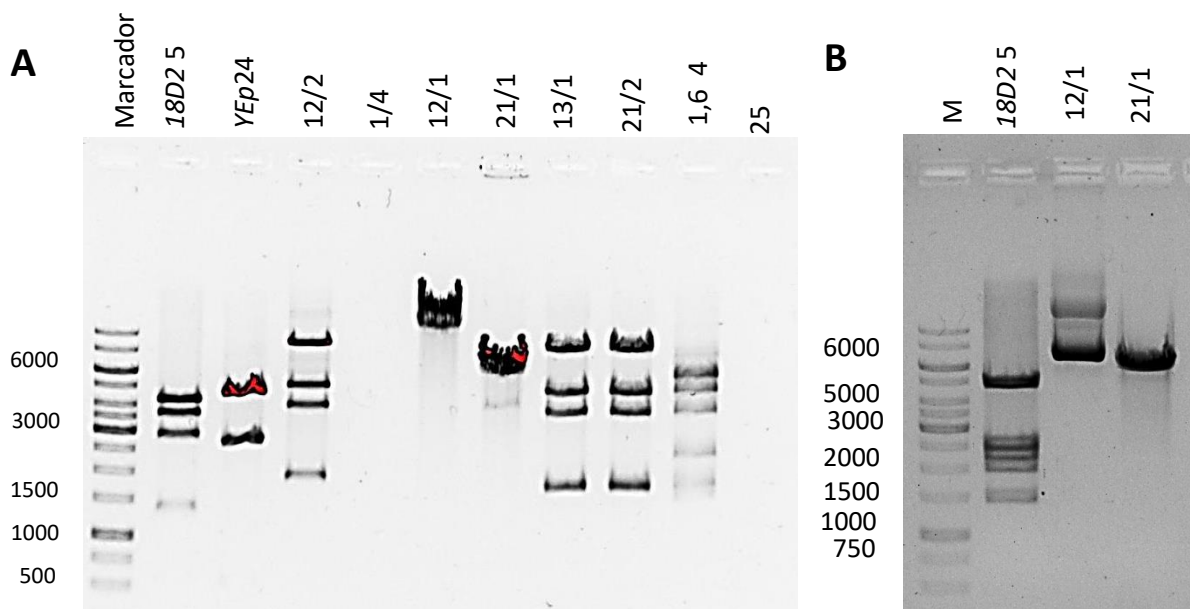


Figura 11: A. Electroforesis en gel de agarosa para el análisis de restricción de candidatos a supresores en bajo número de copias del fenotipo YMF72 con *EcoRI*. B. Electroforesis en gel de agarosa para el análisis de restricción de candidatos a supresores en bajo número de copias del fenotipo YMF72 con *XhoI* y *EcoRI*.

Tras la secuenciación de los candidatos. Comprobamos que 4 de ellos (12/2, 13/1, 21/2 y 1.6-4) eran el propio *Ssu72* actuando como supresor en bajo número de copias. Este resultado era de esperar ya que este se complementa a sí mismo. Además, hubo 2 candidatos (12/1 y 21/1) de los que no obtuvimos una lectura en la secuenciación y que serán objeto de futuros estudios.

Pese a no haber identificado ningún nuevo supresor en bajo número de copias, la aparición de 4 candidatos que contienen *SSU72* indica que el análisis de supresión es adecuado. En adelante se utilizó el candidato *13-1* como control (*SSU72+ vector YCp50*) en estudios de crecimiento.

4.2.2 Efecto en el crecimiento

En la figura 12, podemos observar el efecto en el crecimiento de dos de los candidatos. Si comparamos el crecimiento de la cepa *YMF72* transformada con el candidato *13-1* con la cepa con vector vacío, se observa que complementa completamente el defecto de crecimiento, lo que era de esperar, ya que tras la secuenciación se obtuvo que este era el propio *Ssu72*. Por otro lado, el candidato *12-1* (que no dio lectura en la secuenciación) no suprime el defecto ya que las colonias muestran un tamaño muy similar al control sin inserto.

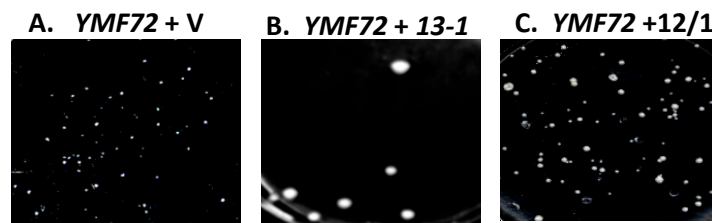


Figura 12: Placas con medio de CM-URA a 30°C, dónde se muestra las diferencias de crecimiento en colonias de la cepa *YMF72* transformada con el vector *YEp24 (V)* y dos candidatos en bajo número de copias (*12-1* y *13-1*).

4.3 Estudio del efecto de expresión de *18D2* en el proceso de gemación

Dado que *SKT5* permite que las células de *YMF72* transformadas alcancen tamaños de colonias mayores además de tratarse de un regulador de la quitina sintasa, y a fin de verificar si realmente *SKT5* tiene consecuencias en el proceso de división celular, nos propusimos estudiar las posibles diferencias en el tamaño, la síntesis de quitina por el aspecto de las yemas en la gemación en los diferentes candidatos. Se llevaron a cabo estudios de los efectos de la sobreexpresión de este gen en las células de *S. cerevisiae* expresando en *KISSU72* (cepa *YMF72*) y *SSU72* (cepa *YZS89A-T*). Para ello, se procedió al marcaje de quitina, con calcofluor. Las fotografías se tomaron a células en cultivo que crecieron tanto a 30°C como a 37°C. En las figuras 13 y 14 se incluyen algunas imágenes de los resultados obtenidos por microscopía de fluorescencia.

30°C

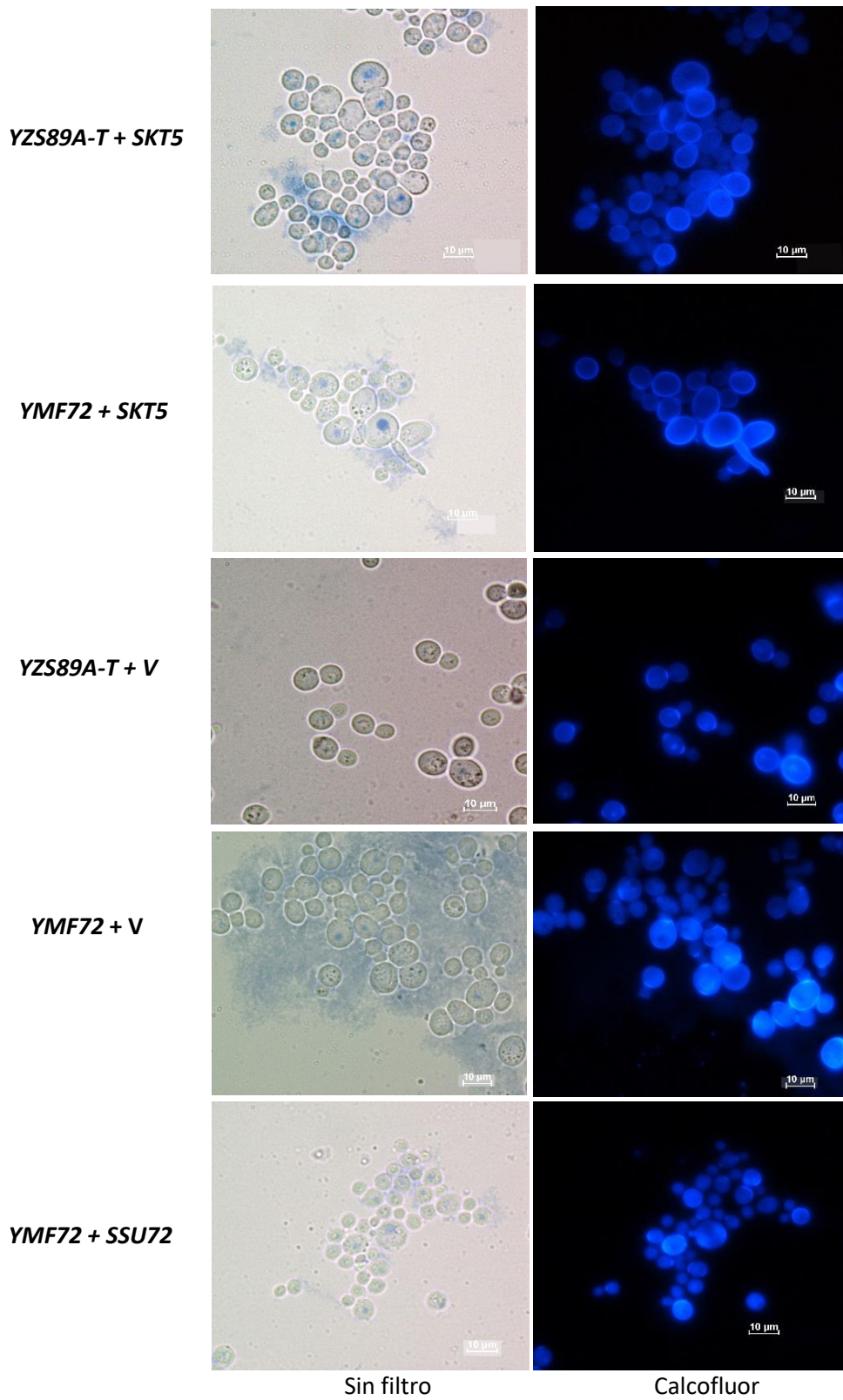


Figura 13: Análisis de la distribución de quitina por microscopía de fluorescencia (con y sin filtro) en células incubadas a 30°C. V: vector

37°C

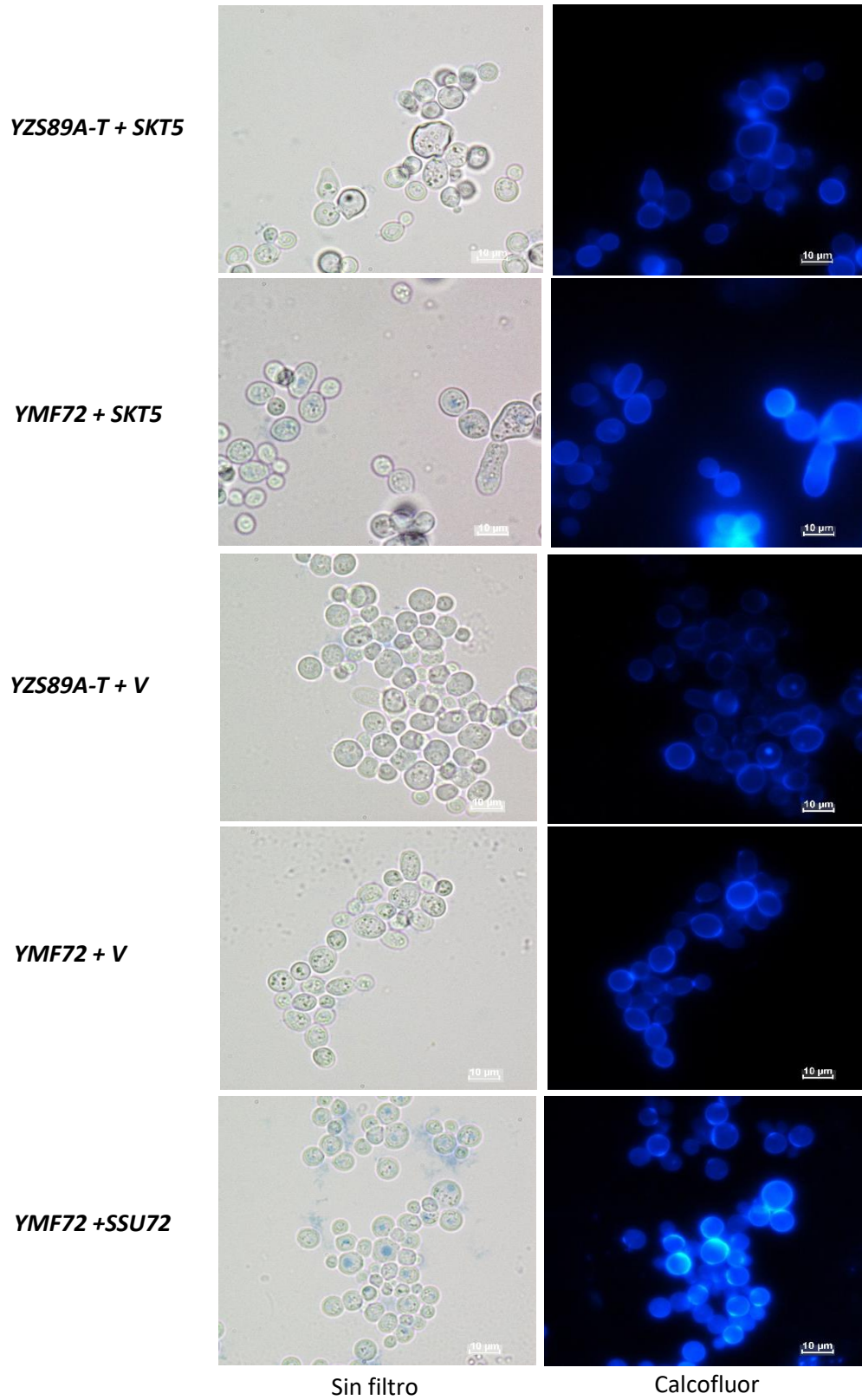


Figura 14: Análisis de la distribución de quitina por microscopía de fluorescencia (con y sin filtro) en células incubadas a 30°C. V: vector

Una de las características que llama la atención es que tanto en la cepa *YMF72* como en la *YZS89A-T*, la expresión de *SKT5* da lugar a la aparición de formas anómalas en las yemas, puesto que, muchas pasan de una forma esférica a ser alargadas (figura 15).

También se observa que la cepa *YMF72* crece peor que *YZS89A-T* y el tamaño de estas células es aparentemente inferior.

Decidimos por tanto efectuar un análisis estadístico para comprobar que resultados eran relevantes.

4.4 Análisis estadístico de los efectos causados por la expresión de SKT5

4.4.1 Morfología de las yemas

Empleando el programa NIS-Elements D, se analizó el porcentaje de anomalías de las yemas en cada cepa transformada, anotando como morfología anómala formas exageradamente alargadas (figura 15) de las células estudiadas (n=200).



Figura 15: Imagen que representa los parámetros tomados para seleccionar las yemas morfológicamente anómalas. Como se observa tienen formas más alargadas, difieren de la morfología esférica habitual.

En primer lugar, a fin de comprobar si existen diferencias significativas entre el porcentaje de anomalía de las yemas en las diferentes cepas bajo la misma temperatura, se realiza un análisis de la varianza de una vía (ANOVA). Tras verificar que existe variabilidad en los datos se aplica sobre los mismos el test de Tukey para analizar de qué forma afecta a cada cepa los diferentes plásmidos y así poder dividirlos en grupos similares (figura 16)

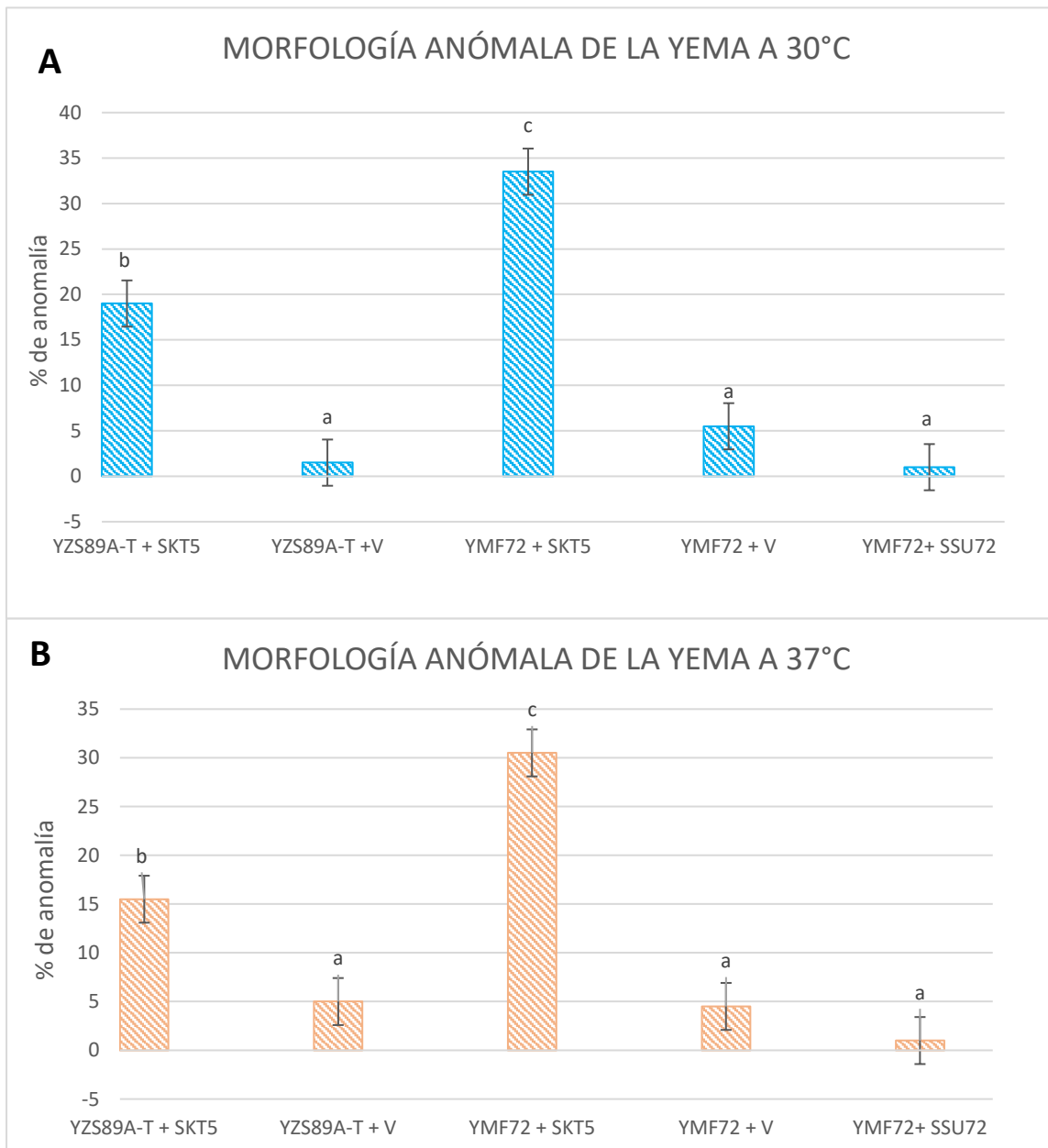


Figura 16: Representación gráfica de las diferentes cepas transformadas en función del porcentaje de yemas anómalas a 30°C (A) y 37°C (B). Las barras representan el error estándar y las etiquetas de datos representan la división en grupos similares según el test de Tukey. V: Vector

Tanto en la figura 16A como en la 16B, podemos observar que el porcentaje de yemas anómalas se incrementa significativamente en las cepas transformadas con el plásmido *18D2-5* (*SKT5*) con respecto a las demás. Con el 95% de confianza el test de Tukey las organiza en tres grupos similares, un grupo para las cepas transformadas con el vector sin inserto (a), otro grupo para la cepa salvaje con *SKT5* (b) y un último grupo para la cepa mutante con *SKT5* (c).

Además, con la finalidad de comprobar si existen diferencias significativas en cuanto a la morfología anómala de las yemas en cada cepa transformada en función de su crecimiento a 30°C o 37°C en un recuento total de 200 células (figura 17).

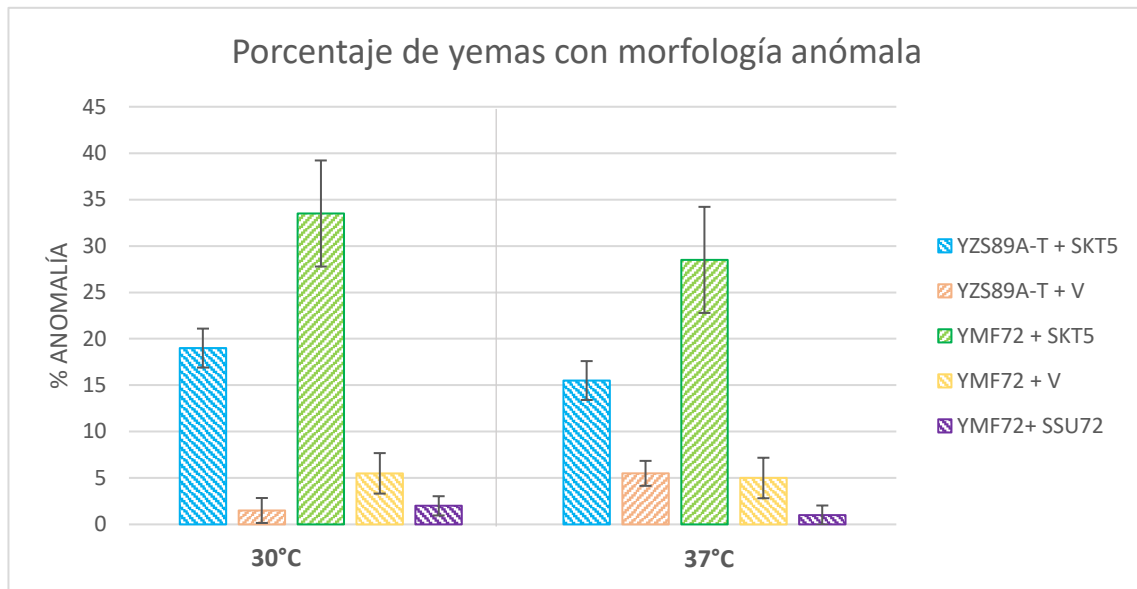


Figura 17: Representación gráfica del porcentaje de morfología anómala de las yemas de las cepas que se indican. Se representa a la izquierda cada una de las cepas transformadas a 30°C con sus respectivos errores estándar en comparación con las cepas transformadas a 37°C

En el gráfico de barras, se observa que el porcentaje de yemas anómalas es significativamente superior en las cepas que contienen *SKT5*, tanto a 30°C como a 37°C, indistintamente de la temperatura (el grado de significación para el estadístico t-student es de 0,387 para la cepa salvaje y de 0,276 para la cepa mutante, ambas superiores al nivel de significación de 0,05). Por tanto, concluimos que, la sobreexpresión de *SKT5* causa este efecto tanto en la cepa salvaje como en la mutante. En las tres cepas restantes observamos que en porcentaje de anomalía no supera el 5,5%.

En el caso de la cepa salvaje con el vector observamos que, a 30°C, el número de yemas anómalas es significativamente menos que a 37°C (el grado de significación para el estadístico t-student es de 0,022 inferior al nivel de significación de 0,05). Este no es el caso de la cepa mutante con el vector a la cual la temperatura no provoca cambios en la morfología (el grado de significación para el estadístico t-student es de 0,382, superior al nivel de significación de 0.05). Por último, a la cepa transformada con el candidato en bajo número de copias, *13-1* (que contiene a *Ssu72*), tampoco parece afectarle la temperatura en cuanto a la morfología de las yemas (el grado de significación para el estadístico t-student es de 0,466, superior al nivel de significación de 0,05).

La cepa salvaje sobreexpresando *SKT5* muestra un mayor porcentaje de yemas anómalas en comparación con la que expresa vector sólo, esto puede tener relación con el menor tamaño de las colonias de esta cepa como se muestra en la figura 9.

4.4.2 Tamaño celular

A fin de comprobar si existen diferencias significativas en el tamaño celular entre las diferentes cepas bajo la misma temperatura (n=80), se realiza un análisis de la varianza de una vía (ANOVA). Tras verificar que existe variabilidad en los datos se aplica sobre los mismos el test de Tukey para analizar de qué forma afecta a cada cepa los diferentes plásmidos y así poder dividirlos en grupos similares (figura 18).

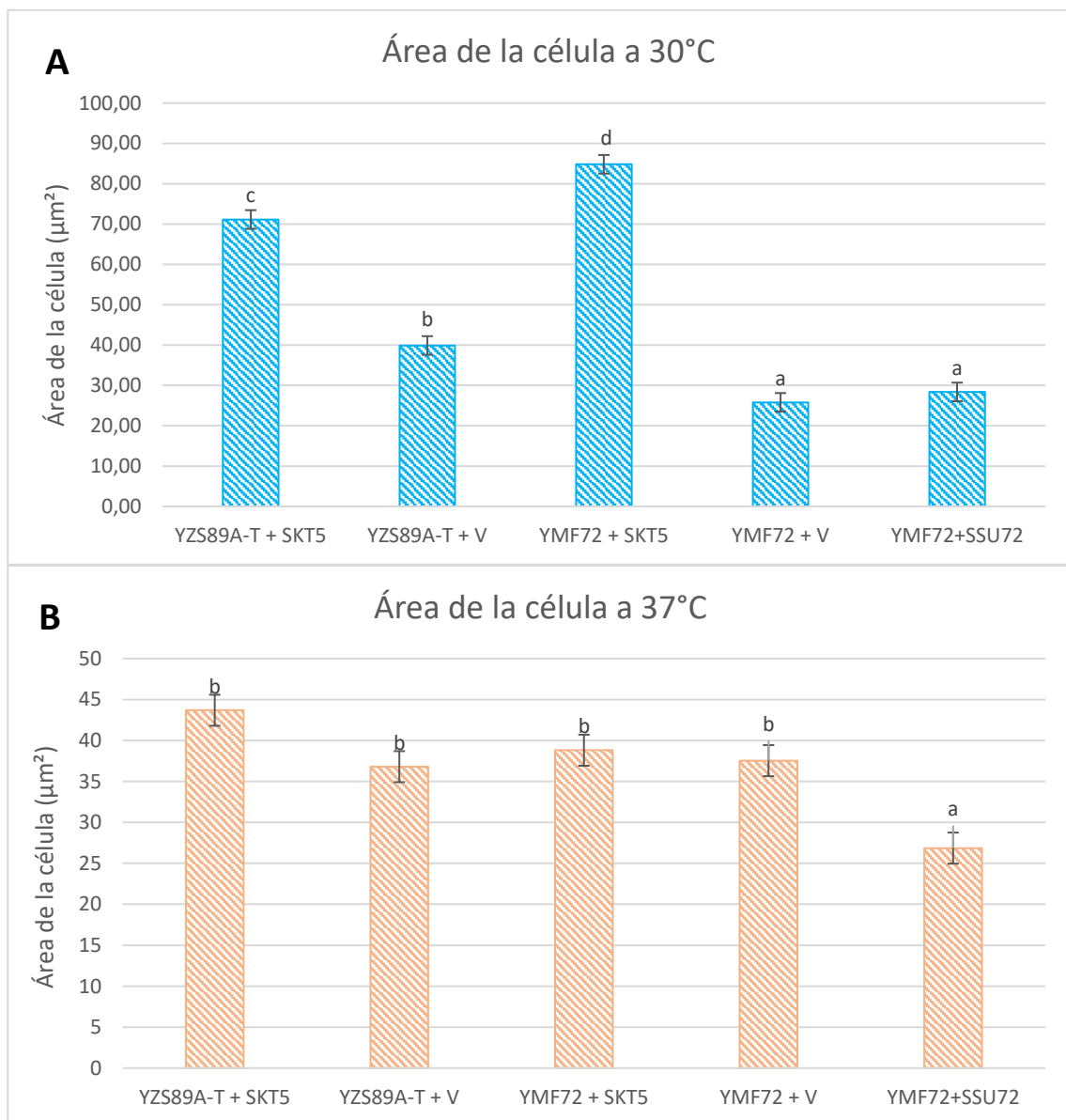


Figura 18: Representación gráfica de las diferentes cepas transformadas en función del tamaño celular a 30°C (A) y 37°C. Las barras representan el error estándar y las etiquetas de datos representan la división en grupos similares. V: Vector

En la figura 18A podemos observar que, del mismo modo que el porcentaje de anomalía en las yemas, el área de las células también aumenta significativamente en las cepas con *SKT5* con respecto a las demás. También se observa un incremento significativo en la cepa *YZS89A-T* transformada con el vector vacío, aunque no tan agudo como en las cepas transformadas con el plásmido *18D2-5*. Con el 95% de confianza el test de Tukey las organiza en cuatro grupos similares, un grupo para la cepa *YMF72* transformada con el vector sin inserto y con *SSU72* (a), otro grupo para la cepa *YZS89A-T* con el vector vacío (b), un tercer grupo para la cepa salvaje con *SKT5* (c) y un último grupo para la cepa mutante con *SKT5* (d).

Por otra parte, en la figura 18B, que representa el tamaño celular de células incubadas a 37°C, observamos que el tamaño medio se iguala entre las diferentes cepas, a excepción de la cepa *YMF72* transformada con *SSU72*. Con una confianza del 95% el test de Tukey divide a las cepas en dos grupos, por un lado, la cepa *YMF72* transformada con *SSU72* (la única que nos muestra diferencias significativas con respecto a las demás) y por otro un grupo con las demás cepas transformadas, las cuales no muestran diferencias significativas en cuanto al tamaño celular a 37°C.

Para comprobar si la temperatura afectaba en el tamaño de cada cepa transformada por separado, se mide el área de dichas células en las diferentes cepas transformadas a 30°C y 37°C a un total de 80 células y se representó la media de los datos obtenidos en la figura 19.

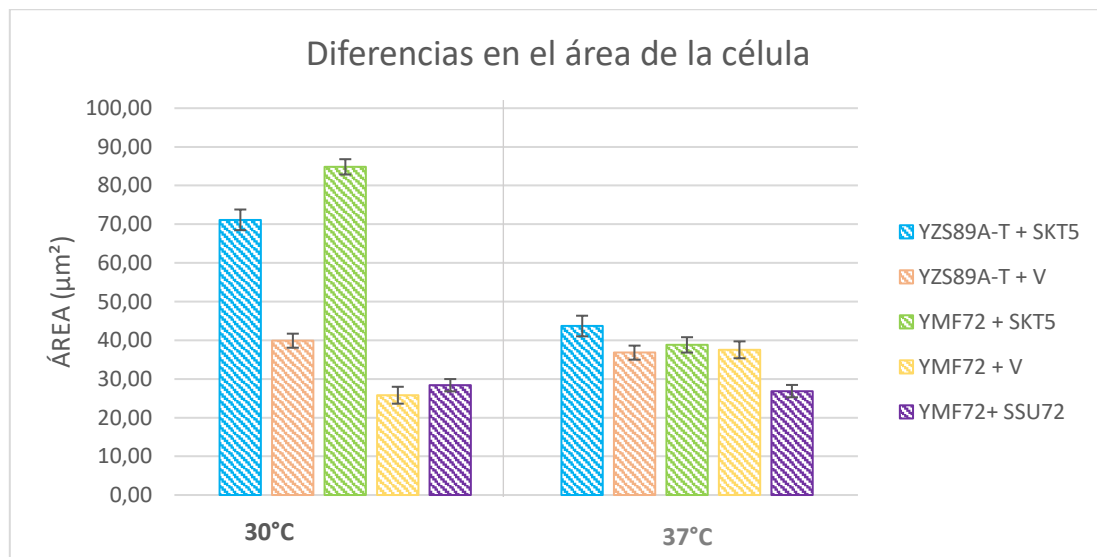


Figura 19: Representación gráfica de las diferentes áreas medias de cada una de las cepas transformadas. se representa a la izquierda cada una de las cepas transformadas a 30°C con sus respectivos errores estándar en comparación con las cepas transformadas a 37°C

En la gráfica observamos que, en las cepas, tanto salvaje como mutante, que contienen a *SKT5*, a 37°C, se reduce significativamente el área celular (aproximadamente un 27% y un 46% respectivamente). Es decir, cuando las células crecen a 37°C se aprecia que a pesar de expresar a *SKT5* el tamaño celular disminuye (el grado de significación para el estadístico t-student es de 0,032 para la cepa salvaje y de 0,001 para la cepa mutante, ambas superiores al nivel de significación de 0,05).

Además, también se observa que la cepa salvaje con el vector (*YEp24*) presenta homogeneidad en el tamaño de las células indistintamente de la temperatura (el grado de significación para el estadístico t-student es de 0,145, superior al nivel de significación de 0,05). Por el contrario, la cepa *YMF72* transformada con el vector vacío sí muestra diferencias significativas en el tamaño celular en función de la temperatura (el grado de significación para el estadístico t-student es de 0,04, inferior al nivel de significación de 0,05). Teniendo en cuenta que se trata de una cepa que no crece a 37°C éste resultado puede reflejar una situación de estrés transitorio durante las 2h que se mantuvieron las células a esta temperatura. Por último, comentar que la cepa transformada con *SSU72* posee un tamaño celular homogéneo a ambas temperaturas (el grado de significación para el estadístico t-student es de 0,224, superior al nivel de significación de 0,05).

La disminución del tamaño celular a 37°C de las células que expresan *SKT5* comparado con la de 30°C posiblemente esté relacionado con la regulación del propio *SKT5* en la célula y no con *SSU72* (tanto en *K. lactis* como en *S. cerevisiae*).

4.4.4 Análisis de la fluorescencia total de los cultivos

Por último, se analizó la fluorescencia que emiten las células al microscopio de fluorescencia (n=80). El Calcofluor tiñe la quitina emitiendo una fluorescencia blanquecina, por tanto, cuanto mayor sea la cantidad de quitina en las células mayor fluorescencia se observará. Si bien, la fluorimetría permite cuantificar los niveles de fluorescencia se procederá a esta medida en estudios posteriores, para el presentetrabajo utilizamos la detección de luminosidad del programa *NIS-Elements*, en la figura 20 se observan los resultados.

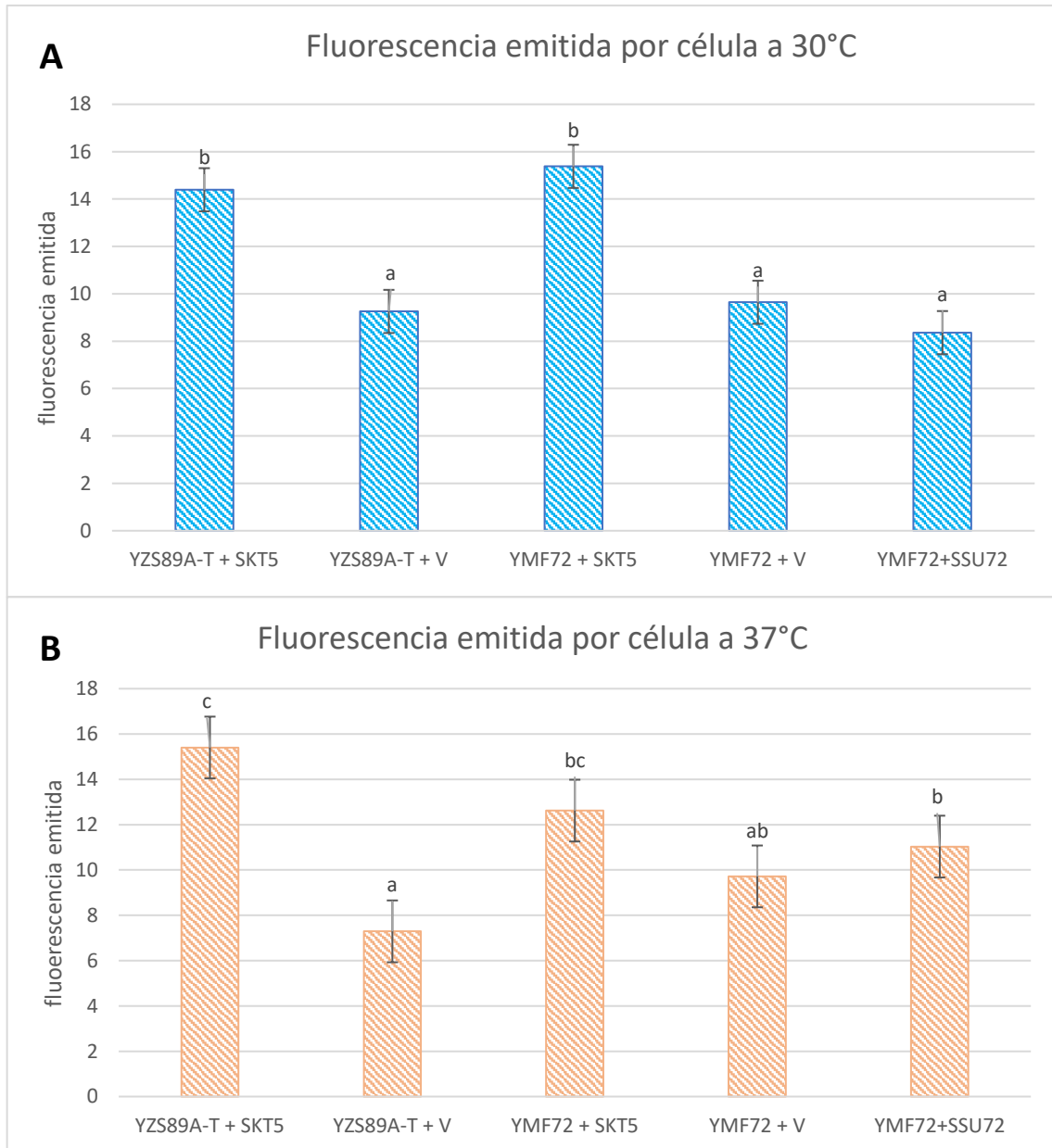


Figura 20: Representación gráfica de las diferentes cepas transformadas en función de la fluorescencia desprendida a 30°C (A) y 37°C (B). Las barras representan el error estándar y las etiquetas de datos representan la división en grupos similares. V: Vector

En la figura 20A, podemos observar que del mismo modo que el porcentaje de anomalía en las yemas y el área de las células, la fluorescencia emitida también aumenta significativamente en las cepas con *SKT5* con respecto a las demás. Con el 95% de confianza el test de Tukey las organiza en dos grupos similares, un grupo para ambas cepas transformadas con el vector sin inserto y con *SSU72* (a), y otro grupo la cepa salvaje y mutante con *SKT5* (b).

Por otra parte, en la figura 20B, que representa la fluorescencia emitida por las células incubadas a 37°C, Con una confianza del 95% el test de Tukey divide a las cepas en tres grupos, por un lado, la cepa salvaje con el vector (a) muestra diferencias significativas con respecto a las cepas mutante y salvaje transformadas con *SKT5*(c y bc respectivamente) y con *SSU72*(b), pero a su vez es similar a la cepa mutante transformada con el vector vacío (ab). Las células de cepas expresando *SKT5* poseen mayor fluorescencia a 37°C que las demás y son similares entre ellas.

En la figura 21 se representa una media de los porcentajes de fluorescencia tomados a un total de 80 células con el programa *NIS-Elements D* a 30°C y 37°C para comprobar si existen diferencias significativas entre las diferentes cepas transformadas.

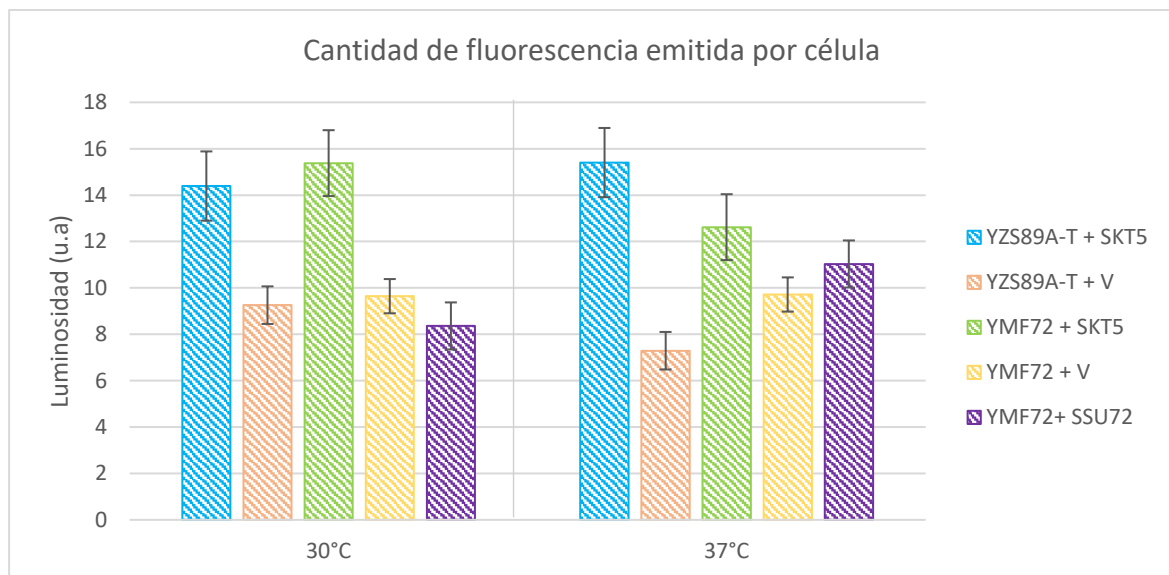


Figura 21: Representación gráfica de los valores medios de fluorescencia emitida por cada célula. se representa a la izquierda cada una de las cepas transformadas a 30°C con sus respectivos errores estándar en comparación con las cepas transformadas a 37°C. u.a: unidades arbitrarias.

Como podemos observar las cepas que expresan *SKT5* poseen una mayor luminosidad a 30 °C y a 37°C, indistintamente de la temperatura para la cepa salvaje y mutante, las diferencias no son significativas con (el grado de significación para el estadístico t-student es de 0,229 y 0,322 respectivamente, superior al nivel de significación de 0,05). La cepa salvaje (*YZS89A-T*) con el vector vacío muestra diferencias significativas en cuanto a la temperatura (el grado de significación para el estadístico t-student es de 0,004, inferior al nivel de significación de 0,05), las células que crecieron a 37°C poseen una menor luminosidad que las

de 30°C, es decir, la cantidad de quitina desciende con la temperatura en esta cepa. Por el contrario, en el caso de la cepa mutante transformada con el vector no se observan diferencias en función de la temperatura (el grado de significación para el estadístico t-student es de 0,560, superior al nivel de significación de 0,05). Por último, la cepa mutante (*YMF72*) transformada con *13-1* (que contiene a *SSU72*) desarrolla una mayor luminosidad a la temperatura de 37°C (el grado de significación para el estadístico t-student es de 0,011, inferior al nivel de significación de 0,05). Como se comentó anteriormente estos resultados de fluorescencia emitida se comprobarán posteriormente por fluorometría.

Como resumen y para unificar los resultados podemos afirmar que *SKT5* complementa los fenotipos de crecimiento de las cepas *YMF72* y su expresión también afecta a la cepa salvaje *YZS89A-T*, ya que, en todos los análisis hemos obtenido que las cepas que contienen dicho gen poseen un mayor porcentaje de morfologías anómalas en las yemas, un mayor tamaño celular y posiblemente, una mayor síntesis de quitina en comparación con las demás cepas que actuaron como controles. Además, también obtuvimos una complementación parcial del fenotipo ts^- y pudimos observar como aquellas colonias correspondientes a la cepa *YMF72* transformada con *SKT5* tenían un mayor tamaño.

Por tanto, *SKT5* es el supresor de los defectos de crecimiento causados por la expresión de *KISSU72* en *S. cerevisiae*. Este resultado nos indica que la fosfatasa *SSU72* está relacionada con la síntesis de quitina durante la gemación, función que no había sido descrita. Dado que *SKT5* también suprime al mutante *18D2* de *SSU72* (que tiene trucado el extremo carboxilo terminal y que esta región es menos conservada entre *KISSU72* y *SSU72*) probablemente sea la región C-terminal de *SSU72* y *KISSU72* la responsable de dicha función.

Este resultado también indica que la regulación de la gemación es diferente entre las dos especies de levadura (*K. lactis* y *S. cerevisiae*).

V. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

1. La sobreexpresión del regulador de la quitina sintasa, *SKT5*, complementa los fenotipos de crecimiento relacionados con la expresión de *KISSU72* en *S. cerevisiae*. Por tanto, *SKT5* es el supresor de los defectos de expresar *KISSU72* en *S. cerevisiae*. Este resultado indica que la fosfatasa *SSU72* está implicada en el proceso de síntesis de quitina necesaria para la gemación, aspecto desconocido hasta el momento como función de esta fosfatasa.

2. La sobreexpresión de *SKT5* causa variaciones significativas en tamaño y forma de las yemas en las cepas, expresada tanto en *SSU72* como con *KISSU72*.

3. Los análisis estadísticos realizados indican que la sobreexpresión de *SKT5* causa también un incremento significativo en el tamaño celular. Este cambio es mayor en las células que expresan *KISSU72* independientemente de la temperatura, lo que indica el efecto combinado de la regulación de la síntesis de quitina y la variante de *Ssu72* expresada. Posiblemente debido a la necesidad de mantener la síntesis de quitina en esta cepa.

1. Overexpression of the chitin synthase regulator, *SKT5*, complements the growth phenotypes related to the expression of *KISSU72* in *S. cerevisiae*. Therefore, *SKT5* is the suppressor of *KISSU72* expression defects in *S. cerevisiae*. This result indicates that the phosphatase *SSU72* is involved in the process of chitin synthesis necessary for budding, an aspect unknown up to now as a function of this phosphatase.

2. Overexpression of *SKT5* causes significant variations in bud size and shape in strains, expressed with both *SSU72* and *KISSU72*.

3. Statistical analyzes indicate that overexpression of *SKT5* also causes a significant increase in cell size. This change is greater in cells expressing *KISSU72* regardless of temperature, indicating the combined effect of regulation of chitin synthesis and variant *Ssu72* expressed variant. Possibly due to the need to maintain the synthesis of chitin in this strain.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Bataille, A. R.; Jeronimo, C.; Jacques, P. E.; Laramée, L.; Fortin, M. E.; Bosque, A.; Bergeron, M.; Hanes, S. D. and Robert F. (2012). *A Universal RNA Polymerase II CTD Cycle orchestrated by Complex Interplays between kinase, phosphatase, and isomerase enzymes along genes*. *Molecules and cells*, **45**: 158-170.
- Bullock, W.; Fernández, J.M. and Short, J.M. (1987) XL1-Blue, high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with b-galactosidase section. *Biotechniques* **5**: 376–9.
- Chen, D. C.; Yang, B. C. and Kuo T. T. (1992). *One-step transformation of yeast in stationary phase*. *Current in Genetics*, **21**: 83-84.
- DeMarini, D.J.; Adams, A.E.M.; Fares, H.; De Virgilio, C.; Valle, G.; Chuang, J.S. and Pringle, J.R. (1997). *A septin-based hierarchy of proteins required for localized deposition of chitin in the Saccharomyces cerevisiae cell wall*. *Journal of Cellular Biology* **139**: 75–93.
- Gómez, A.; Perez, J.; Reyes, A.; Duran, A. and Roncero, C. (2009) *Slt2 and Rim101 contribute independently to the correct assembly of the chitin ring at the budding yeast neck in Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* **8**: 1449–1559.
- Hahn, S. (2004). *Structure and mechanism of the RNA Polymerase II transcription machinery*. *Nature Structural & Molecular Biology*, **11**: 394-403.
- Kim, H. S.; Fernandes, G. and Lee, C. W. (2016). *Protein phosphatases involved in regulating mitosis: facts and hypotheses*. *Molecules and Cells*, **39**: 654-662.
- Kim, H. S.; Baek, K. H.; Ha, G. H.; Lee, J. C.; Kim, Y. N.; Lee, J.; Park, H. Y.; Lee, N. R.; Lee, H.; Cho, Y. and Lee, C. W. (2010). *The Ssu72 phosphatase is a cohesin-binding protein that regulates the resolution of sister chromatid arm cohesion*. *EMBO Journal*, **29**: 3544-3557.
- Kollar, R.; Reinhold, B.B.; Petrakova, E.; Yeh, H.J.; Ashwell, G.; Drgonova, J., et al. (1997) *Architecture of the yeast cell wall. Beta(1→6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1→3)-glucan, and chitin*. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 17763–17775.
- Kozubowski, L.; Panek, H.; Rosenthal, A.; Bloecher, A.; DeMarini, D. J. and Tatchell, K. (2003). *A Bni4-Glc7 phosphatase complex that recruits chitin synthase to the site of bud emergence*. *Molecular and Biology Cell*, **14**: 26-39.
- Krishnamurthy, S.; He, X.; Reyes-Reyes, M.; Moore, C. and Hampsey, M. (2004). *Ssu72 is an RNA polymerase II CTD phosphatase*. *Molecules and Cells*, **14**: 387-394.

- **Lamas-Maceiras, M.; Singh, B. N.; Hampsey, M. and Freire-Picos, M. A.** (2016). *Promoter-Terminator gene loops affect alternative 3'-end processing in yeast*. Journal of Biological Chemistry, **291**: 8960-8968.

- **Mejuto, M.** (2016). *Identificación de genes supresores de mutaciones en la fosfatasa Ssu72*. Trabajo de fin de grado. Facultad de ciencias de la Univeridad de A coruña.

- **Pappas, D. R. and Hampsey, M.** (2000). *Functional Interaction between Ssu72 and the Rpb2 Subunit of RNA Polymerase II in Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and Cellular Biology, **20**: 8343–8351.

- **Reyes-Reyes, M. and Hampsey, M.** (2007). *Role for the Ssu72 C-terminal domain phosphatase in RNA polymerase II transcription elongation*. Molecular and Cellular Biology, **27**: 926–936.

- **Reyes, A.; Sanz, M.; Duran, A. and Roncero, C.** (2007) *Chitin synthase III requires Chs4p-dependent translocation of Chs3p into the plasma membrane*. Journal of Cell Science 120: 1998–2009.

- **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.

- **Rogg, L. E.; Fortwendel, J. R.; Juvvadi, P. R. and Steinbach, W. J.** (2013). *Regulation of expression, activity and localization of fungal chitin synthases*. Medical Mycology, **50**: 2–17.

- **Roncero, C.** (2002) *The genetic complexity of chitin synthesis in fungi*. Current in Genetics **41**: 367–378.

- **Roncero, C. and Sanchez, Y.** (2010) *Cell separation and the maintenance of cell integrity during cytokinesis in yeast: the assembly of a septum*. Yeast **27**: 521–530.

- **Rosado-Lugo, J. and Hampsey, M.** (2014). *The Ssu72 phosphatase mediates the RNA polymerase II initiation-elongation transition*. The journal of biological chemistry, **289**: 33916–3392.

- **Rose, M. D.; Novick, P.; Tomas, J. H.; Bostein, D. and Fink G.R.** (1987). *A Saccharomyces cerevisiae genomic plasmid bank based on a centromere-containing shuttle vector*. Gene **60** :237-243.

- **Sacristan, C.; Reyes, A. and Roncero, C.** (2012). *Neck compartmentalization as the molecular basis for the different endocytic behaviour of Chs3 during budding or hyperpolarized growth in yeast cells*. Molecular Microbiology **83**: 1124–1135.

- **Sanz, M.; Castrejon, F.; Duran, A., and Roncero, C.** (2004). *Saccharomyces cerevisiae Bni4p directs the formation of the chitin ring and also participates in the correct assembly of the septum structure*. Microbiology **150**: 3229–3241.

- **Stagoj, M.N.; Komel, R. and Comino A.** (2004). *Microtiter plate assay of yeast cell number using the fluorescent dye Calcofluor White M2R*. *BioTechniques* **36**: 380-382.

- **Stern, R.** (2017). *Go Fly a Chitin: The Mystery of Chitin and Chitinases in Vertebrate Tissues*. *Frontiers in Bioscience* **22**: 580-595.

- **Sun, Z. W. and Hampsey, M.** (1996). *Synthetic enhancement of a TFIIIB 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.

- **Trilla, J.A.; Cos, T.; Duran, A. and Roncero, C.** (1997) *Characterisation of CHS4 (CAL2), a gene of Saccharomyces cerevisiae involved in chitin biosynthesis and allelic to SKT5 and CSD4*. *Yeast* **13**: 795–807.

- **Zhang, Z. W.; Mosley, A. L.; Ramisetty, S. R.; Rodríguez-Molina, J. B.; Washburn, M. P. and Ansari, A. Z.** (2012). *Ssu72 phosphatase-dependent erasure of phospho-Ser7 marks on the RNA Polymerase II C-terminal domain is essential for viability and transcription termination*. *The Journal of Biological Chemistry*, **287**: 8541-8551.

PÁGINAS WEB

Bibliográfica:

- www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed

Análisis de secuencias de *S. cerevisiae* (SGD):

- www.yeastgenome.org

Imagen *S. cerevisiae* portada:

- https://www.google.es/search?q=saccharomyces+cerevisiae&safe=active&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwj7f61_pTVAhUCsBQKHedpB8UQ_AUICigB&biw=1366&bih=700#imgrc=rooNFSR0Mki0oM: