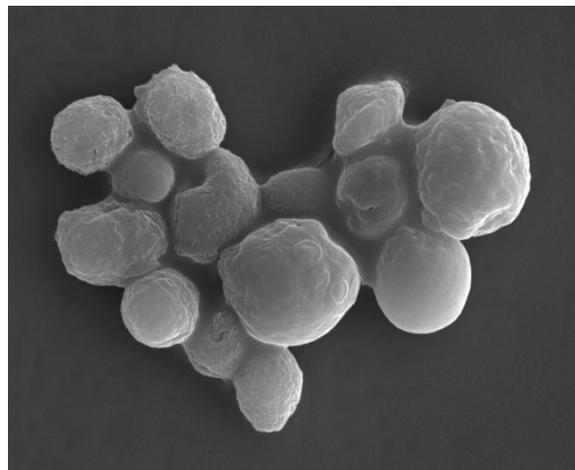
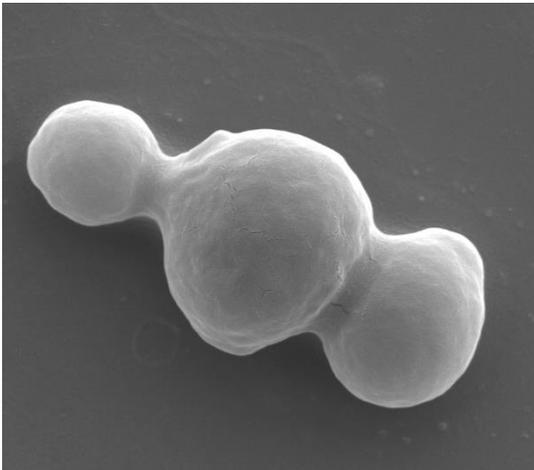


**ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DE LOS EFECTOS DE
SKT5 EN LA PRODUCCIÓN DE QUITINA EN
*Saccharomyces cerevisiae***

**ULTRASTRUCTURAL STUDY OF THE SKT5' EFFECTS
ON THE PRODUCTION OF CHITIN IN *Saccharomyces
cerevisiae***

**ESTUDO ULTRAESTRUCTURAL DOS EFECTOS DE
SKT5 NA PRODUÇÃO DE QUITINA EN
*Saccharomyces cerevisiae***

TRABAJO FIN DE MÁSTER



AGRADECIMEINTOS

Mis agradecimientos son para el laboratorio de bioquímica y biología molecular y para mi directora M^a Ángeles por el apoyo.

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DE LOS EFECTOS DE *SKT5* EN LA
PRODUCCIÓN DE QUITINA EN *Saccharomyces cerevisiae*

Directora: M^a Ángeles Freire Picos

El presente trabajo realizado por M^a Melisa Lorenzo Rodríguez está listo para ser
presentado y defendido, por ello autorizo su defensa.

A Coruña, 5 de septiembre, 2019

Firma del Tutor

M^a Ángeles Freire Picos

ÍNDICE

RESUMEN/ABSTRACT/RESUMO	7
PALABRAS CLAVE.....	7
INTRODUCCIÓN	8
1-El factor Ssu72 y sus múltiples funciones en la célula	8
1.1 El factor Ssu72 en eucariotas	8
1.2 Aspectos funcionales de Ssu72 entre especies	9
1.3 Interacciona genéticamente con SKT5, un regulador de la síntesis de quitina:	9
2-La pared de quitina en hongos síntesis y regulación	10
3- Efectos de la sobreexpresión de SKT5 en levaduras	13
OBJETIVOS	14
MATERIAL Y MÉTODOS	15
1-Líneas celulares de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
2-Plásmidos	15
3-Medios de cultivo	16
3.1 Medio LBA (Luria-Bertani con ampicilina) para bacterias.....	16
3.2 Medio CM-URA.....	16
Medio YPD (Yeast extract Peptone Dextrose).....	17
4-Extracción de DNA plasmídico:	17
5-Transformaciones	17
Levaduras	17
6-Microscopía	18
6.1 Preparación de las muestras de levadura para microscopio óptico	18
6.2 Preparación de las muestras de levadura para microscopio electrónico de transmisión y de barrido	18
6.3 Preparación de las muestras de levadura para microscopio confocal.....	19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
1-Puesta a punto de los tratamientos de las células para su análisis por microscopía electrónica y confocal	20
2-Análisis ultraestructural del papel de SSU72 en la síntesis de quitina	21
2.1-Análisis al microscopio electrónico de barrido	21
2.1.1-Efecto de la expresión de <i>KISSU72</i> en <i>S. cerevisiae</i>	21
2.1.2-Expresión de una copia extra de <i>SSU72</i>	22
2.1.3-Sobreexpresión de <i>SKT5</i> en las cepas expresando <i>KISSU72</i> y <i>SSU72</i>	23
3-Análisis de la distribución de quitina en el microscopio confocal	24
CONCLUSIONES/CONCLUSIONS/CONCLUSIÓN.....	27

BIBLIOGRAFÍA..... 28

RESUMEN/ABSTRACT/RESUMO

El gen *SSU72* codifica para una protein-fosfatasa esencial para la viabilidad celular. Estudios de nuestros laboratorios permitieron identificar al gen *SKT5*, como supresor en alto número de copias de defectos en *SSU72*. *SKT5* es un regulador de la síntesis de quitina. En este trabajo comprobamos mediante microscopía electrónica de barrido que variantes de *SSU72* causan alteraciones en la superficie de las células y combinado con *SKT5* forma agregados que están constituidos en gran medida por glucanos. Además, gracias a la microscopía confocal comprobamos que *SSU72* es importante como regulador de la localización del septum en la mitosis y otras anomalías en la célula.

The *SSU72* gene codes for a protein phosphatase essential for cell viability. Studies of our laboratories allowed to identify the *SKT5* gene, as a suppressor in high number of copies of defects in *SSU72*. *SKT5* is a regulator of chitin synthesis. In this work we verify by scanning electron microscopy that variants of *SSU72* cause alterations in the surface of the cells and combined with *SKT5* formed aggregates that are largely made up of glucans. In addition, thanks to confocal microscopy we verify that *SSU72* is important as a regulator of the location of the septum in mitosis and other abnormalities in the cell.

O xen *SSU72* codifica para unha protein-fosfatasa esencial para a viabilidade celular. Estudos dos nosos laboratorios permitiron identificar o xen *SKT5*, como supresor en alto número de copias de defectos en *SSU72*. *SKT5* é un regulador da síntesis de quitina. Neste traballo comprobamos mediante microscopía electrónica de barrido que variantes de *SSU72* causan alteracións na superficie das células e combinado con *SKT5* forma agregados que están constituidos en gran medida por glucanos. Ademáis, gracias a microscopía confocal comprobamos que *SSU72* é importante como regulador da localización do septum na mitosis e outras anomalías na célula.

PALABRAS CLAVE

SKT5, *SSU72*, FOSFATASA, QUITINA, *Saccharomyces cerevisiae*

INTRODUCCIÓN

1-El factor Ssu72 y sus múltiples funciones en la célula

1.1 El factor Ssu72 en eucariotas

El gen *SSU72* codifica para una proteína que es esencial para la viabilidad celular (Sun & Hampsey, 1996 ; Sun et al., 1996) desempeñando un papel importante en el procesamiento del extremo 3' del pre-mRNA, proceso acoplado a la transcripción de eucariotas (Dichtl et al., 2002) (Xiang et al., 2011).

Respecto a la función bioquímica, en Ssu72 inicialmente se observó su similitud a una proteína tirosina fosfatasa (PTPasas) (Meinhart et al., 2003) y posteriormente se identificó a Ssu72 como la fosfatasa específica de la serina 5 (ser5-P) de CTD (Dominio Carboxy-Terminal) de la RNA polimerasa II (RNAPII) que está constituido por 26 repeticiones del heptapéptido $Y_1S_2P_3T_4S_5P_6S_7$ (Krishnamurthy et al., 2004). Posteriormente se comprobó que también era una fosfatasa de serina 7 (ser7-P) (Zhang et al., 2012). Además, Ssu72 está relacionada con la proil-isomerasa Ess1, otro ejemplo de sus múltiples implicaciones en la regulación del CTD y su papel en la coordinación de los procesos cotranscripcionales (Werner-Allen et al., 2011).

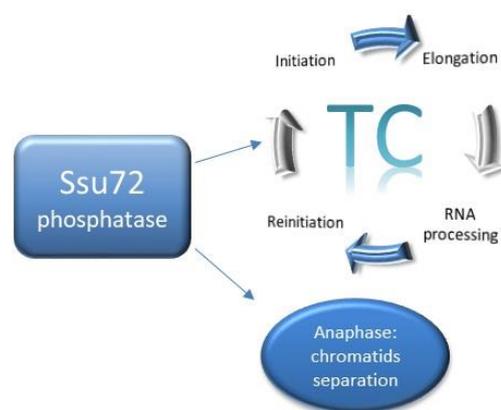


Figura 1. Procesos celulares en los que está implicada la fosfatasa Ssu72. TC: ciclo transcripcional

1.2 Aspectos funcionales de Ssu72 entre especies.

Si bien Ssu72 está altamente conservado en todos los eucariotas, incluido humanos (hSsu72), éste último no rescata una mutación letal *ssu72* en levaduras (Sun & Hampsey, 1996) (St-Pierre et al., 2005).

La levadura *Kluyveromyces lactis* está relacionada filogenéticamente con *S. cerevisiae* y se usa comúnmente en análisis biotecnológicos y evolutivos. La regulación transcripcional en esta levadura responde a características específicas que la diferencian de *S. cerevisiae*. En el trabajo de Rodríguez-Torres et al., 2013 se descubrió que la expresión del gen *SSU72* de *K. lactis* (*KISSU72*) en *S. cerevisiae* sólo lo complementa parcialmente identificando funciones no conservadas entre estos dos factores, como una menor actividad fosfatasa sobre ser-5P o la no complementación del fenotipo *ts⁻* (sensibilidad a la temperatura) puesto que no crece a 37°C. Mostrando las alternativas moleculares para los procesos co-transcripcionales fundamentales en estas dos especies de levaduras.

1.3 Interacciona genéticamente con SKT5, un regulador de la síntesis de quitina:

El análisis genético buscando supresores en alto número de copias del fenotipo *ts⁻* del mutante 18D₂ de *SSU72*, permitió identificar al gen *SKT5* (Freire-Picos, no publicado) (Mejuto, 2017).

La sobreexpresión de *SKT5* en células de *S. cerevisiae* expresando únicamente *KISSU72* complementa parcialmente el fenotipo *ts⁻* (Figura2) indicando que *SKT5* suprime sólo algunos defectos causados por la expresión heteróloga de *KISSU72*.

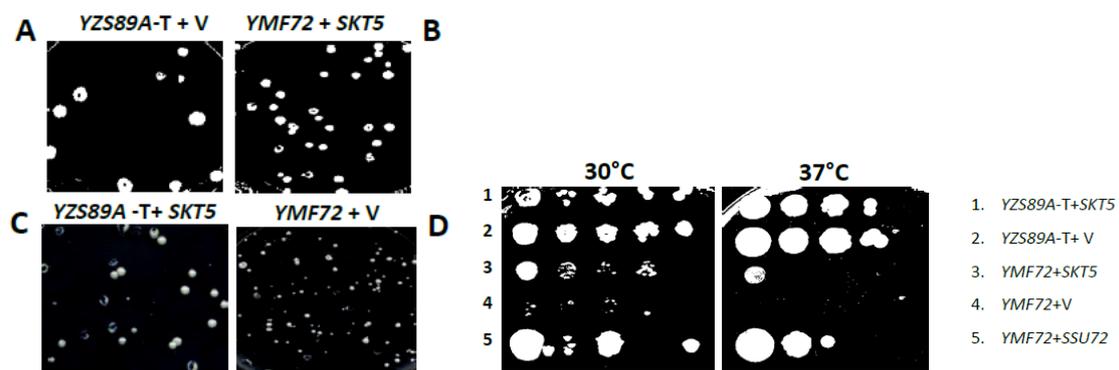


Figura 2. Complementación parcial del fenotipo *ts⁻* en la cepa YMF72 (expresando *KISSU72*) con crecimiento en medio CM-URA (Modificado de Mejuto, 2017).

La sobreexpresión de *SKT5* causa también variaciones en el tamaño y la forma de las yemas, así como un incremento del tamaño celular tanto en la expresión del mutante 18D₂ de *SSU72* como en la cepa YMF72 (expresando *KISSU72*). Por lo tanto, los datos de nuestro laboratorio muestran que la fosfatasa *SSU72* está implicada en los procesos de síntesis de quitina necesarios para la separación de la célula hija tras la mitosis (Mejuto, 2017).

2-La pared de quitina en hongos síntesis y regulación

La pared celular de *S. cerevisiae* proporciona integridad osmótica; define la forma de la levadura durante el crecimiento, la gemación y el resto de su ciclo vital. Contiene glicoproteínas que la adhieren a otras células de levadura (Orlean, 2012).

Uno de los componentes de esta pared es la quitina, polisacárido formado por unidades de N-acetilglucosaminas unidas mediante enlaces β -1,4 (Figura 3A). Las cadenas lineales de quitina forman asociaciones intra e inter-catenarias estabilizadas mediante enlaces de hidrógeno dando lugar a la formación de microfibrillas con una estructura rígida altamente cristalina (Geoghegan et al., 2017).

La quitina es el segundo carbohidrato más abundante en la tierra (después de la celulosa), con importantes aplicaciones industriales y comerciales. Así por ejemplo los estudios farmacológicos han mostrado que la inhibición de la quitina sintasa de la pared celular puede actuar como antifúngico (Latgé, 2007).

En la naturaleza la quitina se presenta de tres formas: α con una ordenación de todas las cadenas paralelas, β en una ordena de cadenas antiparalelas y δ que se piensa que tiene una estructura que implica hojas paralelas separadas por una única hoja antiparalela (Garret & Grishan, 1999). Estructuralmente la quitina puede dar lugar a materiales tan resistentes como los exoesqueletos de artrópodos. En la figura 3 se muestran algunos ejemplos de interacciones dependientes del grupo N-acetilo.

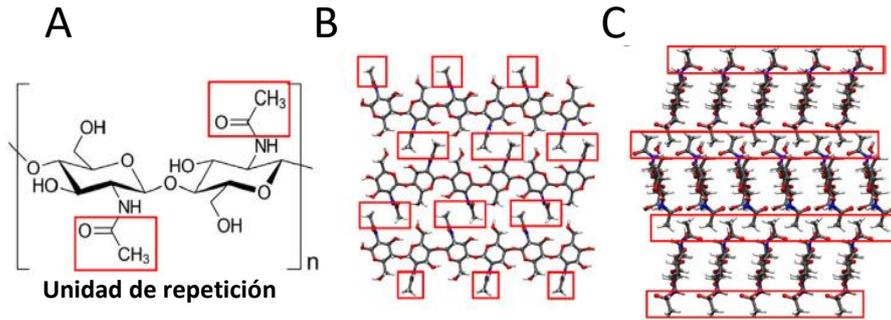


Figura 3. Estructura de la quitina. a) Estructura molecular de la unidad de repetición en una cadena de quitina con grupos acetilo (rojo). b) Vista lateral de una fibrilla de quitina. c) Sección transversal de una fibrilla de quitina (Modificado de Yu & Lau, 2017).

En la pared celular, la quitina se presenta en tres formas diferentes y polidispersas (Orlean, 2012):

- quitina libre, está unida al $\beta 1,3$ -glucano principalmente en el cuello entre la célula madre y la hija,
- unida al $\beta 1,6$ -glucano, en las paredes laterales (menor cantidad que la anterior)
- deslocalizada en las paredes laterales (su abundancia aumenta al 20% en los mutantes de *S. cerevisiae* en respuesta al estrés).

Respecto a la estructura de la pared fúngica, la parte interna es una matriz rica en quitina-glucano mientras que la parte externa es rica en glicoproteínas manosiladas. Las enzimas que contribuyen a la síntesis y remodelación de la pared son proteínas integrales y asociadas, como la quitina sintasa (Figura 4) (Geoghegan et al., 2017).

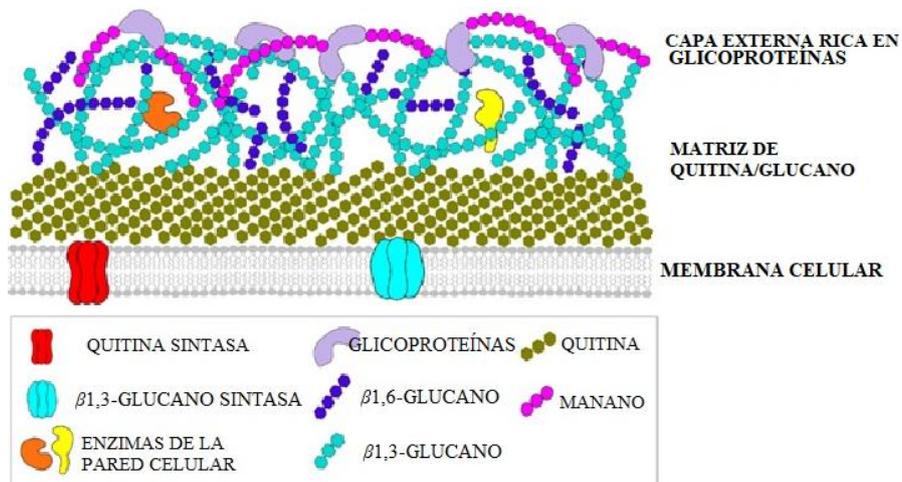


Figura 4. Estructura básica de la pared fúngica (Modificado de Geoghegan et al., 2017).

En levaduras, la quitina normalmente se deposita en un anillo en el cuello entre una célula madre y la yema emergente, en el tabique de división primario, así como en las paredes laterales de las células hijas recién separadas. Esta se puede visualizar *in situ* mediante tinción con calcoflúor, lo que permite apreciar que la mayoría de la quitina está presente en tabiques de división y cicatrices correspondientes a zonas de gemación antiguas.

Como podemos observar en la figura 5, la quitina sintasa III (CSIII) sintetiza un anillo de quitina alrededor de la base de la yema emergente. La membrana se invagina y la quitina sintasa III comienza a sintetizar quitina de la pared lateral en la yema. Después de la separación celular, la cicatriz de la yema permanece en la célula madre y contiene quitina residual. La digestión con quitinasa de la célula hija facilita la separación celular y la síntesis de la quitina de la pared lateral continúa a medida que la célula hija crece (Orlean, 2012).

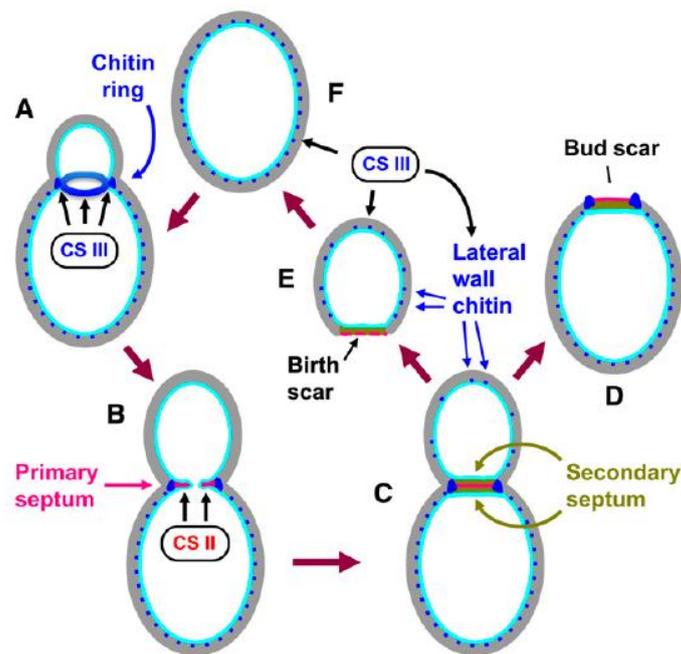


Figura 5. Proceso de gemación en levaduras (Modificada de Orlean, 2012).

En la célula, las enzimas quitina sintasa I (CSI) y III (CSIII) aparecen en partículas unidas a membranas intracelulares llamadas quitosomas. La producción de quitosomas está bloqueada en el mutante de endocitosis *end4-1*, lo que indica que se necesita endocitosis para la formación o el mantenimiento de quitosomas. Tras la citoquinesis, CSIII no es degradada sino que es redistribuida desde el cuello de la yema a los quitosomas (Ziman et al., 1996).

3- Efectos de la sobreexpresión de *SKT5* en levaduras

SKT5 o (*Chs4*) es un regulador de la síntesis de quitina, más concretamente es un regulador de la actividad de la CSIII (Trilla et al., 1997). Tal y como comentamos en el apartado 1 de esta introducción, el gen *SKT5* en alto número de copias complementa defectos de crecimiento en el mutante 18D₂ en *SSU72*. La sobreexpresión de *SKT5* causa un incremento en la producción de quitina, en *S. cerevisiae* y una disminución de la capacidad de crecimiento. Además, en el laboratorio se comprobó que causaba un aumento en el porcentaje de yemas con una morfología anormal y este defecto era más acusado cuando la cepa expresaba *K1Ssu72* tanto a 30 °C como a 37 °C (Mejuto, 2017).

Por otro lado, al microscopio óptico, la combinación de *K1SSU72* con *SKT5* causa la formación de estructuras intracelulares de quitina, un engrosamiento de la pared y un incremento del área celular (Mejuto, 2017) (Freire-Picos, no publicado).

Estas alteraciones merecen un análisis ultraestructural más detallado que nos proponemos llevar a cabo en este trabajo.

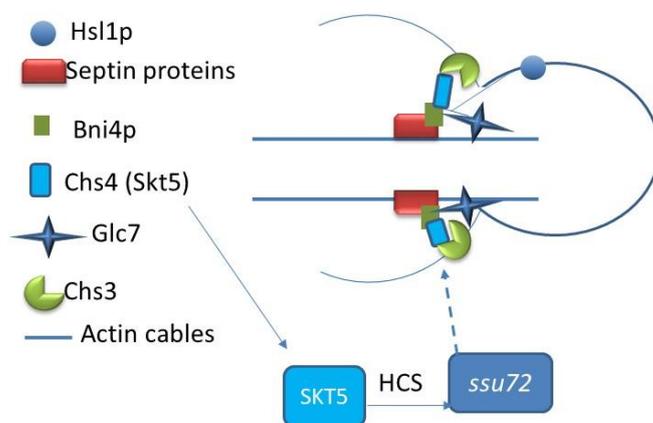


Figura 6. Esquema de nuestro punto de trabajo conectando *Ssu72* con la síntesis de quitina en levaduras. Complejo necesario para la formación del anillo de quitina que incluye a *SKT5* (*CHS4*) como supresor de mutaciones de alto número de copias (HC, High copy) de *ssu72* (Modificado de Rogg et al., 2013), y datos de nuestro laboratorio.

OBJETIVOS

A fin de caracterizar algunos de los defectos previamente encontrados en *S. cerevisiae* relacionados con la síntesis de quitina y el factor Ssu72, nos proponemos:

1-Analizar con mayor resolución las zonas de gemación, la pared celular y otras posibles alteraciones de células de *S. cerevisiae* con el gen *KISSU72* y diferentes niveles de *SKT5*.

1.1- Poner a punto del tratamiento de las células para su análisis por microscopía electrónica de barrido y confocal.

1.1-1. Analizar ultraestructuralmente los efectos de la expresión de *KISSU72* en *S. cerevisiae*, así como de la combinación de su expresión con el gen regulador de la síntesis de quitina *SKT5*.

1.2- Verificar por microscopía confocal los defectos relacionados con la sobreexpresión de quitina apreciados al microscopio electrónico.

MATERIAL Y MÉTODOS

1-Líneas celulares de *Saccharomyces cerevisiae*

En este trabajo se emplearon dos cepas de *S. cerevisiae* previamente descritas (Rodríguez-Torres et al., 2013)

1-**YZS89A-T** → *MATa ura3-52 leu2-3,112 his3 trp1D ssu72::LEU2 [pDP62: TRP1 SSU72]SKT5*

2- **YMF72** → *MATa ura3-52 leu2-3,112 his3 trp1D ssu72::LEU2 [pRG3: TRP1 KISSU72]SKT5*

La diferencia entre ambas es el gen *SSU72*, en el primer caso el plásmido expresa el de *S. cerevisiae* y en el segundo el de *K. lactis*. Ambas cepas tienen una copia silvestre de *SKT5*.

2-Plásmidos

- **p18D2-5**: plásmido con el gen *SKT5* de *S. cerevisiae*, en alto número de copias. (Freire-Picos, no publicado) (Mejuto, 2017)
- **pN471**: plásmido centromérico, con el gen *SSU72* en bajo número de copias (Sun & Hampsey, 1996)
- **Yep24**: vector de clonación en alto número de copias, lo emplearemos como control negativo en algunos experimentos (Carlson et al., 1984).

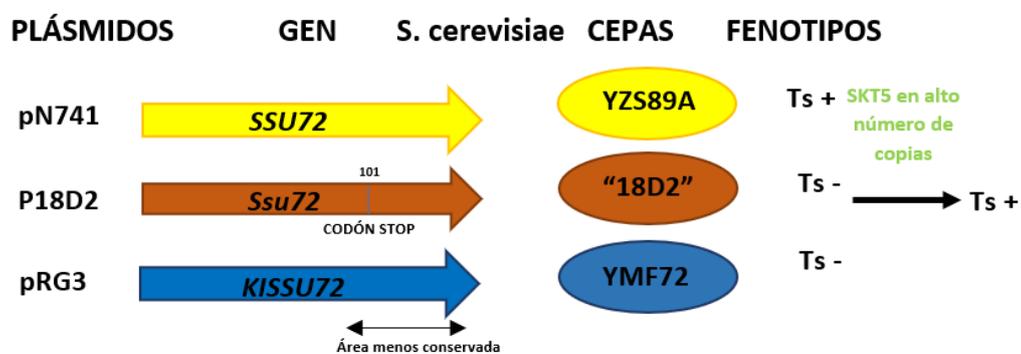


Figura7: Resumen gráfico de cepas de *S. cerevisiae* y plásmidos en los que se basa este trabajo

3-Medios de cultivo

Los medios de cultivo fueron esterilizados en un autoclave a 121°C y a 1 atm de presión durante 20 minutos. Los medios de cultivo especificados a continuación son medios líquidos. Para medios sólidos, se añade a mayores 7,5g de agar obteniendo así una concentración del 1,5%.

3.1 Medio LBA (Luria-Bertani con ampicilina) para bacterias.

Tabla 1. Componentes del medio LB

Componentes	Cantidad
Triptona	5g
NaCl	2,5g
Yeast extract	2,5g
H₂O	500ml

Tras la esterilización se añade 250 µl de ampicilina.

3.2 Medio CM-URA

Es un medio sintético completo (CM), con una auxotrofia de uracilo, que permite que crezcan levaduras que contengan el plásmido con el marcador URA3.

Tabla 2. Componentes del medio CM-URA

Componentes	Cantidad
Triptófano	30mg/L
Histidina, Leucina, Adenina y Tirosina	40mg/L
Dextrosa	2%
Mezcla de aminoácidos 200X	5ml
H₂O	1L

Tabla 3. Mezcla de aminoácidos 200X

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

Después de la esterilización del medio se añadió YNB (Yeast Nitrogen Base) descrito en la tabla 4, a una concentración final de 0,67%.

Tabla 4. Componentes del YNB.

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

*Tabla 5. Sales de traza 150X**

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

Medio YPD (Yeast extract Peptone Dextrose)

Es un medio rico para el crecimiento de levaduras, que contiene extracto de levadura, peptona y dextrosa.

Tabla 5. Componentes del medio YPD

Componentes	Cantidad
Yeast extract	20mg/L
Peptona	10mg/L
Dextrosa	20mg/L
H₂O	500ml

4-Extracción de DNA plasmídico:

Para obtener el DNA plasmídico, empleado posteriormente en estudios de expresión génica en levaduras, se cultivaron las cepas de bacteria con los plásmidos correspondientes en un medio LBA y posteriormente se empleó el GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific™) para su extracción.

5-Transformaciones

Levaduras

Se utilizó el método de transformación de levaduras en fase estacionaria “One Step” (Chen et al., 1992). Para esta transformación, se preparó un medio de cultivo YPD (2% Yeast extract, 1% peptona y 2% dextrosa), donde crecieron las células hasta que alcanzan su fase estacionaria (absorbancia a 600nm de 0,6). Se precipitaron las células y se

resuspendieron mediante vórtex en “One Step” buffer (0,2 acetato de litio, 40% PEG 3350 y 100mM ditiotreititol (DTT)). Se añadieron 5µl de DNA de esperma de salmón monohebra y 1µg de DNA plasmídico. Tras incubar a 45°C 30min las células se sembraron en placas con medio selectivo CM-URA a 30°C durante 3 días.

6-Microscopía

Los estudios de microscopía se efectuaron en las cepas de *S. cerevisiae*, centrado nuestra observación en la localización y estructuras de quitina.

6.1 Preparación de las muestras de levadura para microscopio óptico

Para el estudio de microscopía se realiza un tratamiento previo de tinción de la quitina utilizando un fluorocromo que se une a la quitina y a la celulosa llamado *Fluorescent Brightener 28MP Biomedicals*, LLC (calcoflúor blanco). Este compuesto permite visualizar la quitina que se encuentra en las paredes y en las zonas donde hay cicatrices o gemación.

Tabla 6. Componentes de los reactivos del método de tinción con calcoflúor

COMPONENTES			
REACTIVO A		REACTIVO B	
Hidróxido de potasio	6,25g	Calcoflúor blanco	0,01 g
Glicerol	6,25g	Evans Blue ^{ACROS ORGANICS}	0,02g
Agua destilada	50 ml	Agua destilada	50ml

Para observar las muestras al microscopio, siguiendo el protocolo de Remel BactiDrop™ Blanco de Calcoflúor, se depositó 1µl de muestra sobre el portaobjetos y se dejó secar en una estufa a 60°C, luego se añadió 1µl de cada reactivo respectivamente y se cubrió con el cubreobjetos para observar en el microscopio óptico Nikon Eclipse 50i con la fluorescencia adaptada, utilizando el filtro DAPI (calcoflúor, espectro de absorción: 460nm y espectro de emisión: 360nm). La visualización de las muestras al microscopio óptico de fluorescencia generalmente se conseguía con una ganancia de 1 y exposición de ¼ y el software NIS de Nikon.

6.2 Preparación de las muestras de levadura para microscopio electrónico

Siguiendo las instrucciones del servicio de microscopía del SAI (Servicio de Apoyo a Investigación) aplicamos el protocolo (Bauer et al., 2001) que se divide en una etapa de fijación, digestión enzimática. En nuestro caso nos encargamos del tratamiento hasta la etapa de post-fijación.’

En el SAI se encargaron de las etapas de postfijación, tinción, deshidratación e inclusión, tallado, ultra-microtomía y por último otra etapa de tinción dependiendo de si se emplea microscopía de barrido o de transmisión.

Tratamiento con Liticasa: Se trata de una glicosidasa (β 1,3-glucanasa) capaz de hidrolizar los enlaces de componentes presentes en la pared celular. Se emplea comúnmente para favorecer el análisis posterior de muestras de levaduras al microscopio electrónico y en protocolos de transformación.

En la digestión enzimática las células se encontraban resuspendidas en un buffer Tris HCl 50mM a pH 7,5; MgCl₂ 5mM; sorbitol 1,4M y 2-mercaptoethanol 0,5% con la enzima liticasa a una concentración de 0,15mg/ml durante 30 min a T^a ambiente.

6.3 Preparación de las muestras de levadura para microscopio confocal

Tratamiento para la fijación de las muestras con GFP. Consistió en una fijación con paraformaldehído y un lavado en buffer KPO₄/sorbitol (60 ml de sorbitol 2M, 10ml fosfato potásico 1M y 30ml de agua). Para las muestras con calcoflúor, se realizó el mismo tratamiento, pero en el portaobjetos se mezcla 1µl de muestra con 1µl de reactivo A y otra de reactivo B (descritos en el apartado 6.1) respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dado que nuestros datos previos indicaban un aumento en la frecuencia de las yemas con morfología alargada y zonas con un aumento de quitina decidimos profundizar en el análisis morfológico tanto con la microscopía electrónica para un análisis ultraestructural como con la microscopía confocal para así tener un enfoque de diferentes planos, buscando una visión tridimensional

1-Puesta a punto de los tratamientos de las células para su análisis por microscopía electrónica y confocal.

Siguiendo la metodología explicada en el apartado anterior y teniendo en cuenta que la quitina es un polisacárido de la pared celular, consideramos interesante hacer tratamiento de las células con liticasa que degrada glucanos de la pared, pero no quitina. Como resultado se obtienen esferoplastos, células sin pared o con la pared muy degradada. De este modo esperábamos poder apreciar mejor posibles cambios en la pared, de hecho, decidimos hacer análisis con y sin tratamiento para observar las posibles diferencias.

Los tratamientos con liticasa son menos eficientes que con zimolasa (Burden, s.f.), ésta última es activa en 10 minutos, no así la liticasa. Por tanto, procedimos a optimizar el tratamiento con liticasa, aumentando los tiempos de digestión con la enzima (de 10 a 30 minutos) y comprobamos el efecto sobre las células al microscopio óptico (Figura 8). Se observa (figura 8C) que el tratamiento con liticasa a los 30 minutos permite apreciar esferoplastos, si bien la digestión es parcial. Decidimos dejar la digestión en 30 minutos para no prolongar los protocolos de preparación de muestras.

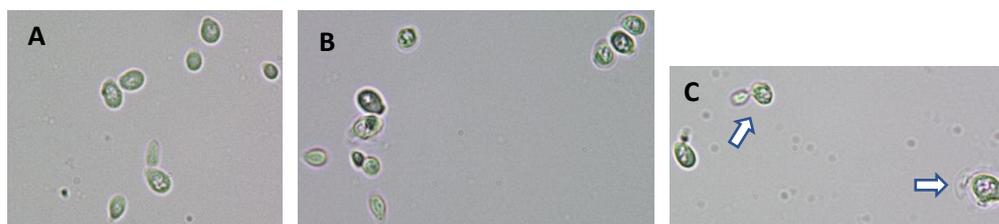


Figura 8. Observación al microscopio óptico de las células *S. cerevisiae* sin liticasa (A), tratadas con liticasa a los 10' (B) y tratados con liticasa a los 30' (C).

2-Análisis ultraestructural del papel de SSU72 en la síntesis de quitina

2.1-Análisis al microscopio electrónico de barrido

2.1.1 Efecto de la expresión de *KISSU72* en *S. cerevisiae*

Efectuamos un estudio ultraestructural en paralelo de células expresando las dos formas de *SSU72* no tratadas y tratadas con liticasa (Figura 9). En adelante vamos a considerar *KISSU72* como una forma mutante de *SSU72* que nos permitirán analizar defectos causados por la diferencia en la secuencia que permiten identificar nuevas funciones de la proteína Ssu72.

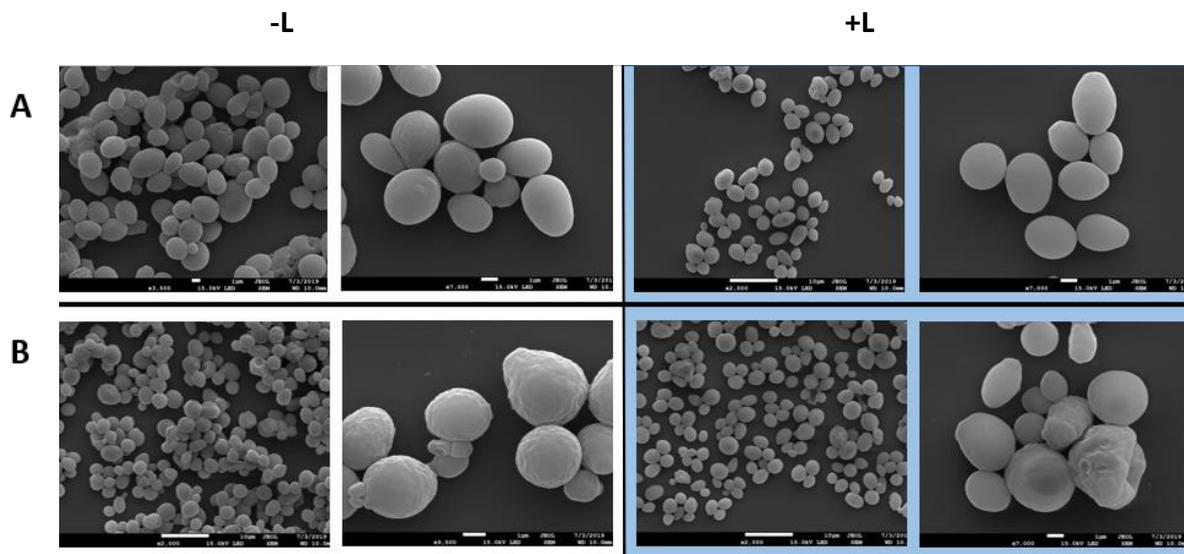


Figura 9. Observación del efecto de la expresión de *KISSU72* en *S. cerevisiae*. En el panel superior (A), se muestra *SSU72* y en el panel inferior (B) *KISSU72*. Sin liticasa (-L) y con liticasa (+L). En cada caso se muestra una en vista general (10 micras), y otra con más detalle (1 micra) según se indica en cada caso la barra blanca.

En la figura 9B se puede observar que al expresar *KISSU72* la superficie celular presenta un aspecto más rugoso, que con *SSU72* (figura 9A). En las imágenes también se aprecian anomalías como pequeñas yemas amorfas y muy rugosas pegadas a la célula madre.

El tratamiento con liticasa en todas las condiciones da a la superficie celular un aspecto más liso y más redondeado.

La expresión de *KISSU72* en *S. cerevisiae* provoca por tanto mayor rugosidad en la pared, aspecto que se elimina al tratar las células con la glicosidasa liticasa, lo que indica que las rugosidades están formadas por glucanos $\beta 1,3$. Este dato sugiere que Ssu72 podría estar también implicada en la síntesis/emplazamiento de estos componentes de la pared celular.

2.1.2-Expresión de una copia extra de *SSU72*

Con objeto de obtener varios controles en estos experimentos incluimos la expresión de una copia extra de *SSU72* como supresor de los defectos de *KISSU72*; para ello transformamos las cepas YMF72 e YZS89A-T con el plásmido pN471. Esperábamos que la cepa YMF72 (*KISSU72*) al contener una copia de *SSU72* tuviese un aspecto similar al de la cepa YZS89A-T (*SSU72*). Sin embargo, esto no fue así. Como se muestra en la figura 10B las células de la cepa YMF72 con la copia extra de *SSU72* presentan un aspecto más deteriorado, rugoso, formando agregados con una especie de cementación entre ellas, que no se aprecian en la cepa silvestre (Figura 10A). Esto puede ser debido a defectos de la síntesis de quitina a causa de una complementación parcial de *SSU72* a *KISSU72*.

En estas muestras también tratadas con liticasa (+L), se aprecia que las células están menos agregadas. Esto podría ser debido a que la liticasa degrada enlaces de $\beta 1,3$ -glucano. Sin embargo, la quitina presenta enlaces $\beta 1,4$. Como se comentó en la introducción, en la pared la quitina está a su vez unida al $\beta 1,3$ -glucano y al $\beta 1,6$ -glucano. La desaparición de la sustancia cementante indica que contiene glucanos $\beta 1,3$. Por tanto, la copia extra de *SSU72* causa una distribución anómala de los glucanos que pueden ser eliminados por liticasa.

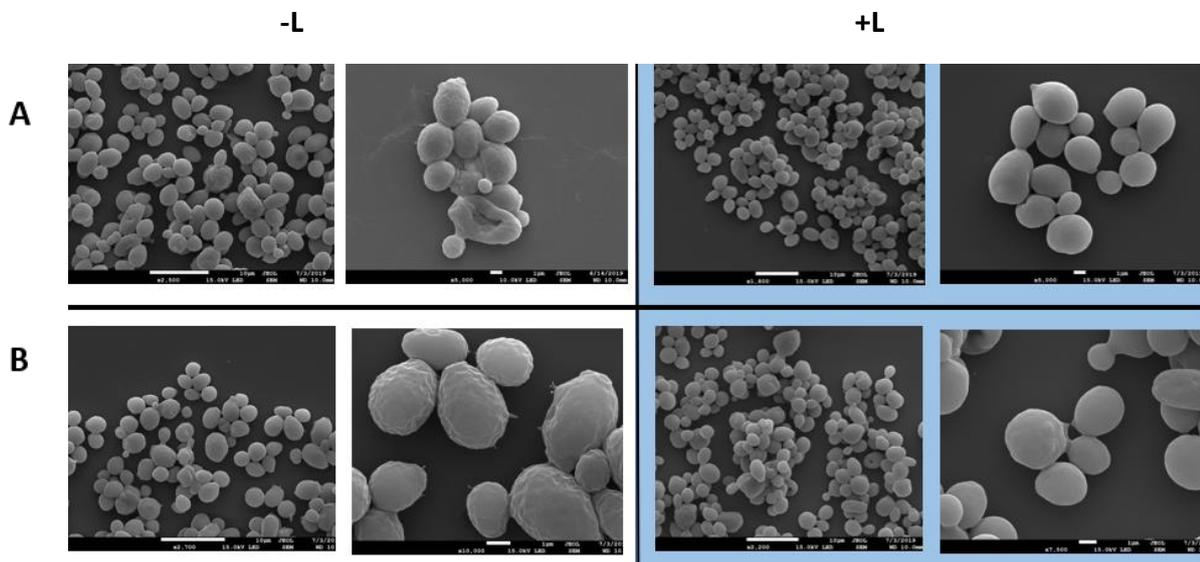


Figura 10. Observación del efecto de *SSU72* (pN471) en las cepas *SSU72* (YZS89A-T) y *KISSU72* (YMF72). En el panel superior (A), se muestra dos copias de *SSU72* y en el panel inferior (B) una copia de *SSU72* y una copia de *KISSU72*. Sin liticasa (-L) y con liticasa (+L). En cada caso se muestra una en vista general (10 micras), y otra con más detalle (1 micra) según se indica en cada caso.

2.1.3-Sobreexpresión de *SKT5* en las cepas expresando *KISSU72* y *SSU72*

Por último, se analiza también la superficie de las células sobreexpresando *SKT5* (plásmido 18D₂-5), el supresor en alto número de copias de mutantes *ssu72*.

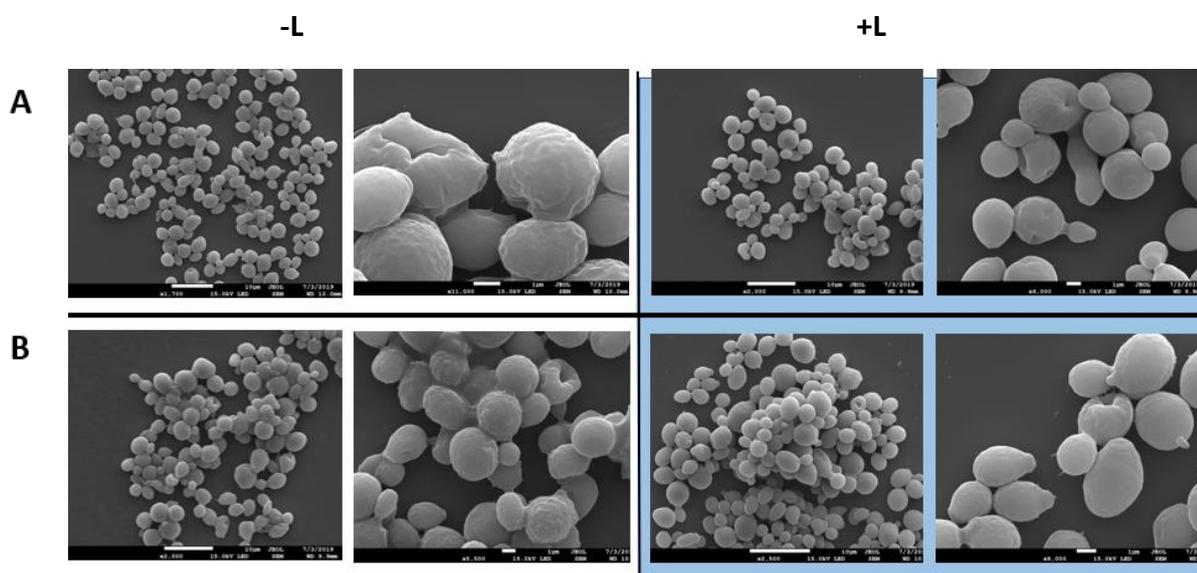


Figura 11. Sobreexpresión de *SKT5* (plásmido 18D₂-5) en las cepas *SSU72* (YZS89A-T) y *KISSU72* (YMF72). En el panel superior (A), se muestra una copia de *SSU72* y una de *SKT5*, en el panel inferior (B) una copia de *KISSU72* y una copia de *SKT5*. Sin liticasa (-L) y con liticasa (+L). En cada caso se muestra una en vista general (10 micras), y otra con más detalle (1 micra) según se indica en cada caso.

Como se aprecia en la figura 11 la sobreexpresión de *SKT5* causa un aumento de la rugosidad de la superficie celular. Pero, sobre todo la presencia de agregados de células con una especie de cementación entre ellas, que no aparecen en la cepa silvestre (Figura A y B sin liticasa).

Al tratar las células con liticasa, de nuevo desaparece buena parte de esta cementación indicando que se trata de glucanos $\beta 1,3$ y $\beta 1,6$. También se aprecian finas extensiones que podrían deberse bien a la digestión parcial de la liticasa o bien a que la propia quitina se encuentra en esas extensiones.

Por tanto, la sobreexpresión de *SKT5* afecta de modo especial a las cepas de *S. cerevisiae* expresando *KISSU72* y provocando una aglomeración de células cohesionadas por la presencia de glucanos (no sólo quitina) que mayoritariamente desaparecen tras la digestión con liticasa.

3-Análisis de la distribución de quitina en el microscopio confocal

Tras el análisis ultraestructural de la superficie celular, abordamos el estudio de la localización de la quitina en las mismas cepas que analizamos anteriormente en este trabajo. Se emplea esta metodología para verificar en qué planos de la célula se encuentra repartida la quitina. Las células se tiñeron con calcoflúor y se analizaron con objetivo para DAPI.

La figura 12 muestra cuatro imágenes correspondientes al gen *SSU72* (YZS89A-T). La imagen 12A es la cepa silvestre, donde no se aprecian anomalías en las células. La figura 12B presenta dos imágenes que muestran *SSU72* (YZS89A-T) con una copia extra de *SSU72* (en el plásmido pM471), en este caso se observa la pared celular más engrosada, lo que verifica las anomalías vistas anteriormente al microscopio electrónico, y además se aprecian defectos en la gemación tanto en el establecimiento de tabiques como su ausencia. En la figura 12C, comprobamos que la sobreexpresión de *SKT5*, causa una mayor producción de quitina en algunas paredes.

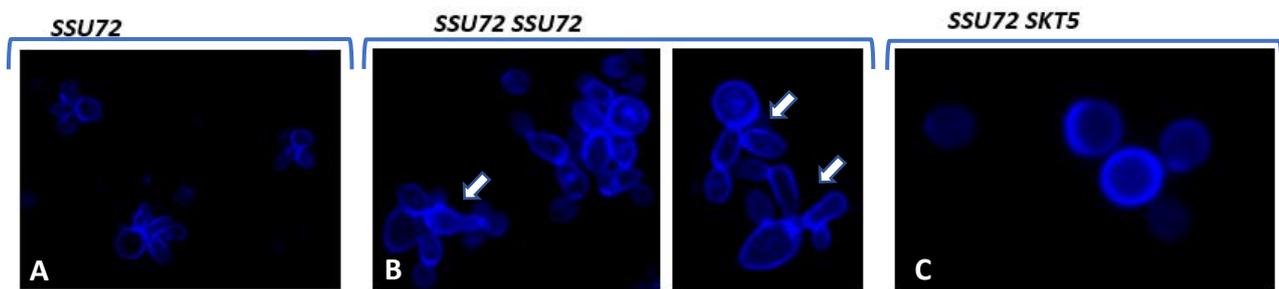


Figura 12. A. Observación al microscopio confocal de la muestra *SSU72* (YZS89A-T). B. Observación de dos imágenes al microscopio confocal de la muestra *SSU72* (YZS89A-T) con una copia de *SSU72*. C. Observación al microscopio confocal de la muestra *SSU72* (YZS89A-T) con *SKT5*.

La figura 13 muestra cinco imágenes correspondientes al gen *KISSU72* (YMF72). La figura 13A muestra imágenes de la cepa silvestre, en este caso no se aprecian muchas anomalías en las células. La figura 13B muestra *KISSU72* (YMF72) con una copia más de *SSU72*, donde se observa la pared celular más engrosada, lo que verifica que el gen *SSU72* que añadimos a mayores no suple el daño causado en este mutante, como se deducía en la figura 10B. En las tres imágenes de la figura 13C, se representan *KISSU72* (YMF72) sobreexpresando *SKT5*. Aquí también observamos una producción mayor de quitina y anomalías relacionadas con la producción quitina. Los agregados que se

observan en estas imágenes contienen quitina en el espacio intercelular. Además, también podemos ver quitina dentro de las células.

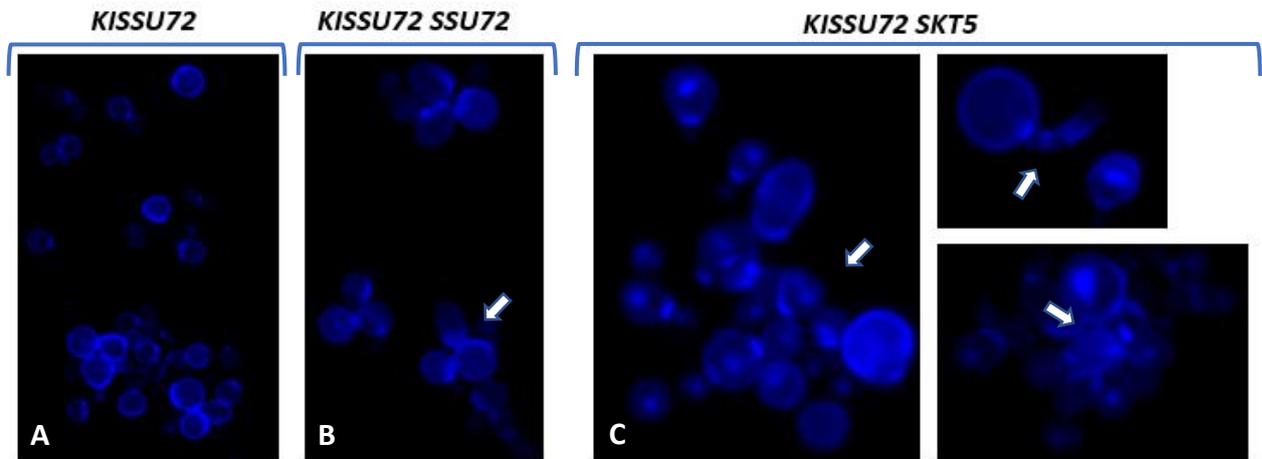


Figura 13.A. Observación al microscopio confocal de la muestra *KISSU72* (YMF72).

B. Observación al microscopio confocal de la muestra *KISSU72* (YMF72) con una copia de *SSU72*.

C. Se muestra tres imágenes al microscopio confocal de la muestra *KISSU72* (YMF72) con *SKT5*.

Los datos del confocal de las células expresando dos copias de *SSU72* confirman su papel como regulador en el posicionamiento del septum necesario para la separación de las células hijas, así como otras alteraciones en el patrón de división celular según se aprecia en la figura 13B.

Según Wall et al., 1997, la sobreexpresión del regulador de la quitina sintasa III, BNI4 causa la deslocalización en la deposición de quitina, probablemente afecta a algún factor del cuello de la yema, provocando cuellos de yemas muy agrandados. Datos previos de nuestro laboratorio (Mejuto, 2017) mostraron que *SKT5* influye en la división celular, tamaño de la célula y síntesis de quitina por el aspecto de las yemas en la germinación en las dos cepas respectivas (YMF72 y YZS89A-T) en *S. cerevisiae*. También influye provocando una mayor síntesis de quitina.

La sobreexpresión de *SKT5* permite recuperar el tamaño de las colonias de la cepa salvaje, por tanto, el efecto de la expresión de que *KISSU72* en *S. cerevisiae* se ven parte contrarrestado por *SKT5*.

En el presente trabajo hemos encontrado defectos celulares provocados por la expresión heteróloga de *KISSU72* que nos llevaron a comprobar no sólo su relación con *SKT5* y la síntesis de quitina sino su relación con la estructura de la pared celular y la deslocalización

de la deposición de quitina entre otras. Todas ellas son funciones novedosas de *SSU72* fuera del núcleo celular, y serán objeto de nuevos estudios en nuestro laboratorio.

CONCLUSIONES

Los resultados presentados nos permiten extraer las siguientes conclusiones:

- 1- Hemos puesto a punto las condiciones para el análisis por microscopía electrónica de barrido y de transmisión con cepas de *S. cerevisiae* expresando los genes *SSU72* o *KISSU72* y sobreexpresando o no el regulador de la quitina sintasa III (*SKT5*). Las imágenes de transmisión serán objeto de estudios posteriores.
- 2- La microscopía de barrido permitió comprobar que *KISSU72* afecta a la superficie de la pared celular causando mayor rugosidad.
- 3- La sobreexpresión de *SKT5* causa un aumento en la rugosidad de la superficie de las células especialmente combinada con *KISSU72*. En este caso se aprecian agregados celulares recubiertos de una especie de cementante que desaparece al digerir con liticasa (glicosidasa $\beta 1,3$ y $\beta 1,6$). Por tanto, la sustancia cementante está constituida en buena medida por este tipo de glucanos y *SSU72* afecta a su distribución extracelular.
- 4- La microscopía confocal permitió comprobar:
 - a) en la cepa YMF72 que en las aglomeraciones celulares también se aprecia quitina intracelular. En suma, *KISSU72* afecta a su distribución extracelular e intracelular de quitina.
 - b) La presencia de dos copias de *SSU72* da lugar a alteraciones en la posición del septum y la posición de nuevas yemas.

BIBLIOGRAFÍA

- Bauer, C., Herzog, V., & Bauer, M. F. (2001). Improved Technique for Electron Microscope Visualization of Yeast Membrane Structure. *Microscopy and Microanalysis*, 534–534.
- Burden, D. (Sin fecha). Zymolyase™ vs Lyticase & Glusulase PART ONE A Comparison of Zymolyase, Lyticase, and Glusulase. *Biotechnology Training & Consulting, Inc.*
- Carlson, M., Osmond, B. C., Neigeborn, L. & Botstein, D. (1984). A suppressor of SNF1 mutations causes constitutive high-level invertase synthesis in yeast. *Genetics*, 107: 19-32.
- Chen, D. C., Yang, B. C., & Kuo T. T. (1992). One-step transformation of yeast in stationary phase. *Current in Genetics*, 21:83-84.
- DeMarini, D. J., Adams, A. E. 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.
- Dichtl, B., Blank, D., Ohnacker, M., Friedlein, A., Roeder, D., Langen, H., & Keller, W. (2002). A role for SSU72 in balancing RNA polymerase II transcription elongation and termination. *Molecular Cell*, 10(5), 1139–1150.
- Garrett, R.H., & Grishan, C.M. (1999). *Biochemistry*. Saunders College Publishing, NY. Second edition.
- Geoghegan, I., Steinberg, G., & Gurr, S. (2017). The Role of the Fungal Cell Wall in the Infection of Plants. *Trends in Microbiology*, 25(12), 957–967.
- Mejuto, G.M. (2016). Identificación de genes supresores demutaciones en la fosfatasa *Ssu72*. Memoria del Trabajo de Fin de Grado. Facultade de ciencias da Universidade de A Coruña.
- Mejuto, G. M. (2017). Efecto del número de copias del gen *SKT5* de suprimir mutaciones de *SSU72* de levaduras. Memoria del Trabajo de Fin de Máster. MBMCG. Facultade de ciencias da Universidade de A Coruña.

- Krishnamurthy, S., He, X., Reyes-Reyes, M., Moore, C., & Hampsey, M. (2004). Ssu72 is an RNA polymerase II CTD phosphatase. *Molecular Cell*, *14*(3), 387–394.
- Latgé, J. P. (2007). The cell wall: A carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular Microbiology*, *66*(2), 279–290.
- Meinhart, A., Silberzahn, T., & Cramer, P. (2003). The mRNA transcription/processing factor Ssu72 is a potential tyrosine phosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(18), 15917–15921.
- Orlean, P. (2012). Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Genetics*, *192*(3), 775–818.
- Rogg, L. E., Fortwendel, J. R., Juvvadi, P.R., & Steinbach, W.J. (2013). Regulation of expression, activity and localization of fungal chitin syntases. *Medical Mycology*, *50*:2-17.
- Rodríguez-Torres, A. M., Lamas-Maceiras, M., García-Díaz, R., & Freire-Picos, M. A. (2013). Structurally conserved and functionally divergent yeast Ssu72 phosphatases. *FEBS Letters*, *587*(16), 2617–2622.
- St-Pierre, B. S., Liu, X., Kha, L. C. T., Zhu, X., Ryan, O., Jiang, Z., & Zacksenhaus, E. (2005). Conserved and specific functions of mammalian ssu72. *Nucleic Acids Research*, *33*(2), 464–477.
- Sun, Z. W., & Hampsey, M. (2015). 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*.
- Sun, Z. W., Tessmer, A., & Hampsey, M. (1996). Functional interaction between TFIIB and the Rpb9 (Ssu73) subunit of RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, *24*(13), 2560–2566.
- Werner-Allen, J. W., Lee, C. J., Liu, P., Nicely, N. I., Wang, S., Greenleaf, A. L., & Zhou, P. (2011). cis-proline-mediated ser(P) 5 dephosphorylation by the RNA polymerase II C-terminal domain phosphatase Ssu72. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(7), 5717–5726.

- Trilla, J.A., Cos, T., Duran, A., & 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.
- Xiang, K., Nagaike, T., Xiang, S., Kilic, T., Beh, M. M., James, L., & Tong, L. (2011). Crystal structure of the human symplekin-Ssu72-CTD phosphopeptide complex. Department of Biological Sciences, Columbia University. NY. *Nature* 467(7316), 729–733.
- Yu, Z., & Lau, D. (2017). Flexibility of backbone fibrils in α -chitin crystals with different degree of acetylation. *Carbohydrate Polymers*, 174, 941–947.
- Zhang, D. W., Mosley, A. L., Ramisetty, S. R., Rodríguez-Molina, J. B., Washburn, M. P., & 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. *Journal of Biological Chemistry*, 287(11), 8541–8551.
- Ziman, M., Chuang, J. S., & Schekman, R. W. (1996). Chs1p and Chs3p, two proteins involved in chitin synthesis, populate a compartment of the *Saccharomyces cerevisiae* endocytic pathway. *Molecular Biology of the Cell*, 7(12), 1909–1919.