

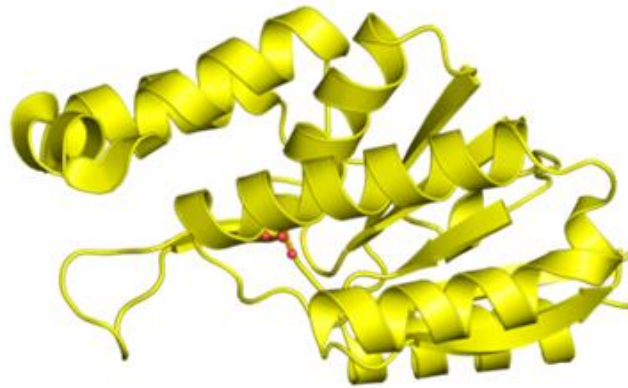
Grado en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

Identificación de genes supresores de mutaciones en la fosfatasa *Ssu72*.

Identification of supressor genes of *Ssu72* phosphatase-mutations.

Identificación de xenes supresores de mutacións na fosfatasa *Ssu72*.



MARTA MEJUTO GONZÁLEZ

En A Coruña a 15 de diciembre de 2016

Directora: M^ª Ángeles Freire Picos

ÍNDICE

RESUMEN/ ABSTRACT/ RESUMO

PALABRAS CLAVE

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 El factor Ssu72	1
1.1.1. Elongación y terminación transcripcional	2
1.1.2. Mutaciones de Ssu72.....	3
1.1.3. Búsqueda de supresores de mutantes de Ssu72.....	3
II. OBJETIVOS	5
III. MATERIALES Y MÉTODOS	7
3.1 Líneas celulares de bacterias y levaduras.....	7
3.1.1. Líneas celulares de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
3.1.2. Línea de <i>Escherichia coli</i>	7
3.2 Plásmidos.....	7
3.2.1. Genoteca de <i>S. cerevisiae</i> en YEp24.....	7
3.2.2. Plásmido pM471	8
3.3 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento	8
3.3.1. LBA (medio Luria-Bertani con ampicilina) para bacterias.	8
3.3.2. CM-URA	8
3.4 Transformaciones.....	9
3.4.1. Bacteriana.....	9
3.4.2. Levaduras.....	9
3.5 Obtención de DNA plasmídico.....	10
3.5.1. Extracción con GeneJET Plasmid Miniprep Kit	10
3.5.2. Análisis de concentración	10
3.6 Análisis de restricción.....	10
3.6.1. Digestiones	10
3.6.2 Análisis por electroforesis	10
3.7 Secuenciación e identificación de genes supresores	10
3.8 Análisis de fenotipos.....	11
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
4.1 Análisis de restricción.....	13
4.1.1. Recuperación de DNA plasmídico	13
4.1.2. Caracterización de DNA clonado y secuenciación.....	13

4.1.3 Identificación de los candidatos a supresores.....	16
- Candidatos a supresores.....	16
4.2 Análisis de complementación del fenotipo mutante	16
V. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS/CONCLUSIÓN	19
VI. BIBLIOGRAFÍA	21

RESUMEN/ ABSTRACT/ RESUMO

Ssu72 es una fosfatasa esencial para la viabilidad celular que desempeña varias funciones en la célula y está presente en todos los eucariotas. A fin de profundizar en el conocimiento de la función de *Ssu72* e identificar nuevos factores que interaccionen con él, se procedió al análisis de supresión, del fenotipo de sensibilidad a la temperatura de varios mutantes de éste factor con una genoteca en alto número de copias de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Tras la identificación y caracterización de los candidatos se encontraron dos posibles supresores. El resultado más prometedor es la implicación de *Skt5* (*Chs4*) una proteína reguladora de la actividad quitina sintasa como supresora de defectos en el mutante 18D2. Este resultado sugiere un nuevo papel de *Ssu72* en la célula.

Ssu72 is an essential phosphatase for cell viability that performs various functions in the cell and is present in all eukaryotes. To deepen the knowledge of the *Ssu72* functions and to identify new factors that interact with it, we performed suppression analysis, of the temperature sensitivity phenotype in several mutants of this factor with a high copy library of *Saccharomyces cerevisiae*. After the identification and characterization of the candidates were found two possible suppressors. The most promising result is the involvement of *SKT5* (*Chs4*) on regulatory protein chitin synthase activity as a suppressor of the 18D2 mutant defects. This result suggests a new role for *Ssu72* in the cell.

Ssu72 é unha fosfatasa esencial para a viabilidade celular que desempeña varias funcións para a célula e ademais está presente en tódolos eucariotas. Co fin de afondar no coñecemento da función de *Ssu72* e identificar novos factores que interatuen con ela, procedeuse a realizar unha análise de supresión, do fenotipo de sensibilidade á temperatura de varios mutantes de este factor cunha xenoteca en alto número de copias do lévedo *Saccharomyces cerevisiae*. Trala identificación e caracterización dos candidatos encontráronse dous posibles supresores. O resultado máis prometedor é o papel de *SKT5* (*Chs4*), unha proteína reguladora da actividade quitina sintasa como supresora de defectos no mutante *Ssu72*. Este resultado suxire un novo papel de *Ssu72* na célula.

PALABRAS CLAVE

Ssu72, RNA polimerasa II, fosfatasa, CTD (Dominio carboxilo terminal), análisis de supresión, levaduras.

I. INTRODUCCIÓN

La RNA polimerasa II (RNA pol II) (figura 1) cataliza 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*). La maquinaria transcripcional asociada a la RNA pol II consta de más de 60 polipéptidos incluyendo factores generales de transcripción, co-reguladores, activadores y represores específicos (revisado por Hahn, 2004).

El núcleo (o "core") de la enzima comprende las subunidades Rpb1 y Rpb2, las cuales forman el centro activo de la misma, así como las subunidades Rpb3, Rpb10, Rpb11 y Rpb12 necesarias para el ensamblaje del complejo. (Cramer *et al.*, 2001).

Esta enzima tiene un rasgo que la diferencia de las otras RNA polimerasas: la extensión del extremo carboxilo de su subunidad mayor (Rpb1) denominada dominio CTD (dominio carboxilo terminal). En *Saccharomyces 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 crítica para la actividad transcripcional de la RNA pol II. Existiendo quinasas y fosfatasa encargadas de regular el estado de fosforilación de CTD (Krishnamurthy *et al.*, 2004; Bataille *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012). El dominio CTD de la RNA pol II necesita estar hipo-fosforilado para que ésta pueda ser reclutada al promotor (Rosado-Lugo and Hampsey, 2014). En este trabajo nos concentramos en la fosfatasa *Ssu72*.

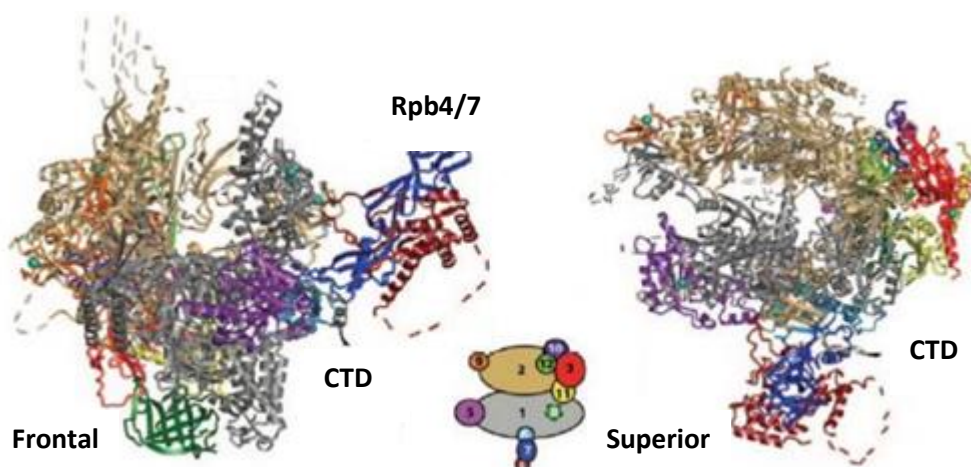


Figura 1: Estructura basada en datos cristalográficos de la RNA pol II en vista frontal y superior. Además se muestra un diagrama de interacciones de las distintas subunidades que la componen. Las esferas azules son los iones de Zn^{2+} y la esfera rosa representa el ión Mg^{2+} en el centro activo. Se marca la posición de CTD no cristalografiada (modificado de Armache *et al.*, 2005).

1.1 El factor *Ssu72*

El gen *SSU72* es esencial para la viabilidad celular (Sun and Hampsey, 1996), codifica para una proteína multifuncional conservada en todos los eucariotas. En *S. cerevisiae* la proteína tiene un tamaño de 206 aminoácidos y su actividad fosfatasa juega un papel fundamental en el inicio, elongación y terminación de la transcripción.

Ssu72 interacciona con el factor de transcripción *TFIIB*, una proteína esencial para el inicio de la transcripción cuya función es reclutar el complejo TFIIF-RNA pol II al promotor y así seleccionar el sitio de inicio de la transcripción (Sun and Hampsey, 1996).

La actividad fosfatasa de *SSU72* se propuso tras comprobar la existencia del motivo CX₅RS en su extremo amino, característicos de fosfatasa de bajo peso molecular (figura 2, en verde) (Meinhart *et al.*, 2003). En las secuencias de *Ssu72* de las cuatro especies que se alinean figura 2 el motivo está altamente conservado en eucariotas.



Figura 2: Alineamiento múltiple de secuencias de *SSU72* en *K. lactis*, *S. cerevisiae*, *S. pombe* y humanos utilizando el programa Clustal W (modificado de Rodríguez-Torres *et al.*, 2013).

Posteriormente se demostró su papel como la fosfatasa de la serina en la posición 5 de CTD (Ser-5-P) (Krisnamurthy *et al.*, 2004) y más recientemente, como fosfatasa de Ser-7-P (Bataille *et al.*, 2012).

1.1.1. Elongación y terminación transcripcional

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 defosforilación 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* en el complejo de pre-inicio (PIC) (Reyes-Reyes *and* Hampsey, 2007).

También juega un papel fundamental en la terminación ya que es un componente del complejo de terminación *CPF (Cleavage and polyadenylation factor)* (He *et al.*, 2003; Reyes-Reyes *and* Hampsey, 2007; Rodríguez Torres *et al.*, 2013). Los mutantes de *Ssu72* afectan negativamente al proceso de elongación transcripcional. La mutación *ssu72-2* provoca una acumulación de Ser-5-P y como consecuencia un descenso en la elongación transcripcional (Reyes-Reyes *and* Hampsey, 2007). Además, se ha demostrado su intervención en la formación de *loops* de DNA, que aproximan el promotor y la región terminadora de genes transcripcionalmente activos. Un proceso fundamental para el reciclaje de la

RNAPII al promotor para poder comenzar de nuevo el ciclo de síntesis de RNA (Rosado-Lugo *and* Hampsey, 2014; Lamas-Maceiras *et al.*, 2016).

Esta fosfatasa puede ejercer funciones independientes, tanto en el núcleo como en el citoplasma. En mamíferos, *Ssu72* reside principalmente en el citoplasma y en menor grado en el núcleo, aunque puede ser transportado de un sitio a otro (St-Pierre *et al.*, 2005). En el año 2010 se demostró que en humanos es necesaria para la desfosforilación de cohesina durante la anafase (Kim, *et al.*, 2010; revisado por Kim *et al.*, 2016).

1.1.2 Mutaciones de *Ssu72*

La obtención de mutantes para un factor transcripcional permite identificar los aminoácidos de la proteína importantes para su función en la célula. En el caso de *SSU72*, existen varias ya publicadas, así por ejemplo, el alelo *ssu72-2* sufre un reemplazamiento de de una arginina, en la posición 129, por una alanina (R129A) (Pappas y Hampsey, 2000). El resultado es un fenotipo de sensibilidad a la temperatura de 37°C (Ts⁻). Para poder identificar factores que interactúan con *Ssu72*, se procede al aislamiento de supresores en alto número de copias del fenotipo Ts⁻ de varios mutantes que se detallan a continuación.

1.1.3 Búsqueda de supresores de mutantes de *Ssu72*

Los análisis de supresión son empleados para identificar genes que están funcionalmente relacionados con otros genes de interés. Una mutación supresora es una mutación que interactúa con los efectos de otra, por tanto, reduce sus efectos fenotípicos. Las mutaciones supresoras pueden ser intragénicas (en el mismo gen que la mutación original) o intergénicas (en otro gen). También se pueden suprimir defectos causados por mutaciones en un gen sobre-expresando un segundo gen que esté relacionado funcionalmente con él (Michaels *and* Amasino, 2001).

A fin de profundizar en el conocimiento de la función de *Ssu72* y así concretamente identificar nuevos factores que interaccionan directa o indirectamente con él se transformó una colección de mutantes de *SSU72* (Freire Picos *and* Hampsey, datos no publicados) con una genoteca de *S. cerevisiae* de alto número de copias. En el presente trabajo partimos de 37 candidatos a supresores de los mutantes 18D2, 5B5, 11D1, 17C5, 17D6 y 3F3. En la tabla 1 se detallan las características de las mutaciones y el número de potenciales supresores del que partimos.

Tabla 1: Descripción de los mutantes de *Ssu72* utilizados para la búsqueda de supresores en este trabajo.

Mutantes <i>SSU72</i>		MUTACIONES	Ts	Nº supresores
5B5	2	G154->C, y S 200-> P	-	9
11D1	4	N6->H, N65->S	-	3
17C5	1	Stop aa 205	-	5
18D2	1	Stop Trp101	-	13
3F3	1	N56->D	-	1
17D6	3	L50->Gln, E 149->Asp	-	7

II. OBJETIVOS

1. Identificar nuevos genes supresores de mutaciones en alto número de copias de *Ssu72*.
2. Comprobar los fenotipos de los supresores expresados en el mutante *ssu72-2*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Líneas celulares de bacterias y levaduras

3.1.1 Líneas celulares de *Saccharomyces cerevisiae*

Cepa	Genotipo	Fuente
YZS89A	<i>MATα ssu72::LEU2 [pM586: URA3 SSU72]</i>	Krisnamurthy <i>et al.</i> , 2004
YZS84	<i>MATα ssu72-2 ura3</i>	Reyes-Reyes <i>and</i> Hampsey, 2007

3.1.2 Línea de *Escherichia coli*

Cepa	Genotipo	Fuente
DH5 α	<i>fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 Φ80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	Taylor <i>et al.</i> , 1993

3.2 Plásmidos

3.2.1 Genoteca de *S. cerevisiae* en YEp24

El plásmido YEP24 está en un vector episómico para expresión en levaduras con origen de replicación para *S. cerevisiae* y marcador *URA3*. Se utilizó para la construcción de una genoteca de alto número de copias que utilizamos en este trabajo (Carlson *and* Bostein, 1984). Como se indica en la figura 3 el sitio *Bam*HI fue utilizado para la clonación del DNA genómico en la construcción de la genoteca.

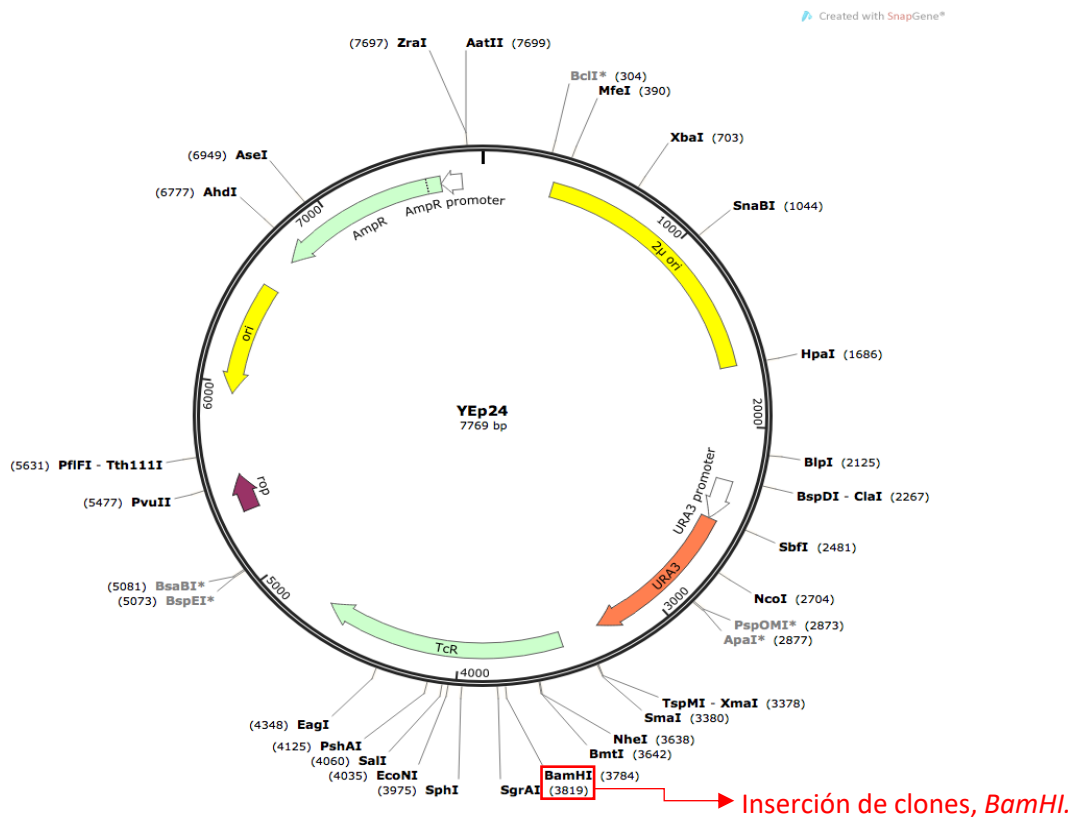


Figura 3: Se muestra el vector de clonación y la situación del sitio en el que se clonaron los fragmentos de DNA genómico de *S. cerevisiae* (www.snapgene.com).

3.2.2 Plásmido pM471

Como se aprecia en la figura 4, este plásmido contiene, entre otros, un fragmento de DNA en *HindIII*-*HindIII* de 3,8 kb clonado en el vector pRS316 donde fue introducido *SSU72* (modificado de Sun and Hampsey, 1996).

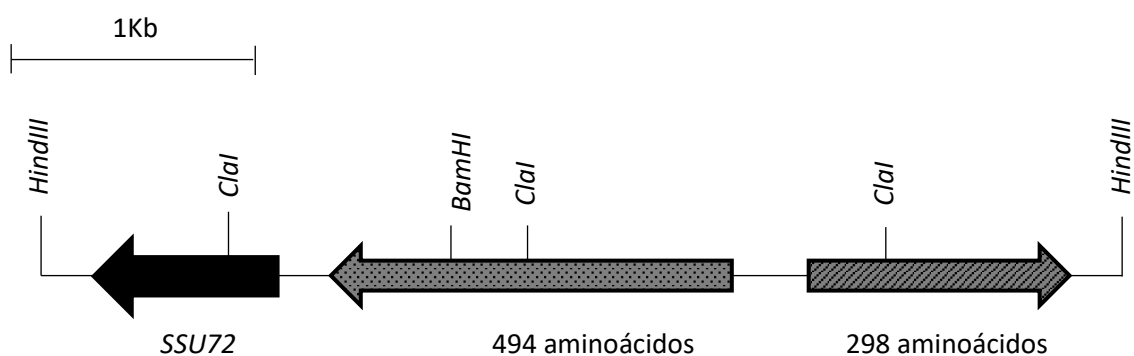


Figura 4 : Mapa de restricción del inserto en el plásmido pM471 que contiene el gen *SSU72* (modificado de Sun and Hampsey, 1996)

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 2) para la selección de bacterias transformadas con plásmidos que contengan genes de resistencia a la ampicilina como YEp24.

Tabla 2: 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 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.

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, 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.

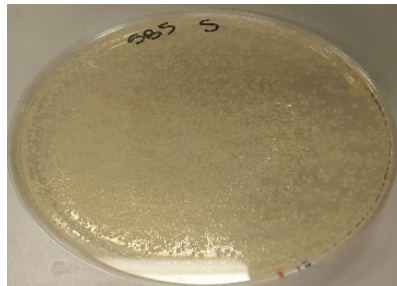


Figura 5: Ejemplo de crecimiento bacteriano en placa LBA de transformación con un candidato al cabo de 14h a 37°C.

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 ditiotreitolo 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'-CCCTCTGCGGGATATCGT-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).

3.8 Análisis de fenotipos

Se realizaron siembras de los transformantes con supresores en placas incubadas a 14°C, 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. En la figura 7 se muestra la estrategia seguida, se realiza el traspaso de 20 μ l de una columna a la siguiente para obtener un volumen final de 200 μ l. Además, se realizaron 3 controles que incluyen:

1. La cepa silvestre con el vector *YEp24* (control positivo).
2. La cepa mutante *Ssu72* en el vector *YEp24* (control negativo).
3. *Ssu72* con el plásmido *p471* (control positivo).

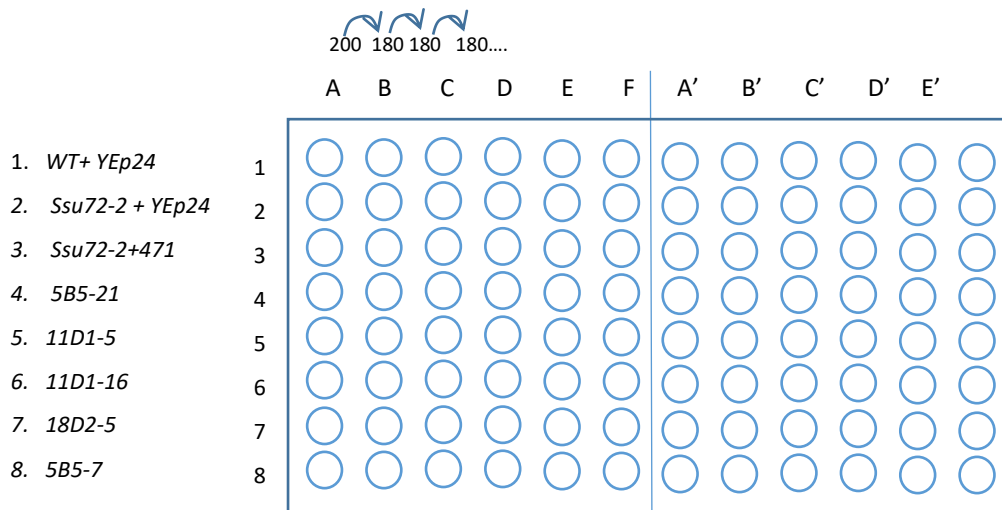


Figura 7: Esquema de los inóculos para las diluciones seriadas de la Figura 16.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dado que los candidatos a supresores de diferentes mutantes de *SSU72* se encontraban congelados y a fin de identificar y caracterizar genes supresores de mutaciones en la fosfatasa *Ssu72*, se efectuaron una serie de transformaciones bacterianas para amplificar el DNA correspondiente a cada plásmido. El siguiente paso fue descartar los que contenían el mismo patrón de restricción que *Ssu72* y secuenciar los clones nuevos para poder identificar qué genes estaban actuando como supresores.

En paralelo, se llevará a cabo la verificación de fenotipos, transformando de nuevo levaduras con estos clones.

4.1 Análisis de restricción

4.1.1 Recuperación de DNA plasmídico

Para amplificar el DNA de los candidatos se llevaron a cabo las transformaciones bacterianas que se suman en la tabla 1. Tras esto, se procedió a la cuantificación de las minipreps para comprobar las concentraciones de DNA mediante el nanofotómetro. Debido a la limitación de tiempo, se descartaron aquellos con una baja concentración para su posterior análisis (tabla 6, celdas amarillas).

Tabla 6: Candidatos supresores de la mutación de *SSU72*

CANDIDATOS A SUPRESORES														TOTAL
18D2	17	13	5	14 ₁	14 ₂	11	7	6	12	23	10	16	69	13
5B5	4	5	22 ₁	22 ₂	21 ₁	21 ₂	71	7	X					9
17D6	24	8	21	19	6	5	29							7
11D1	14	5	13											3
17C5	7 ₁	7 ₂	E	17										4
3F3	2													1

4.1.2 Caracterización de DNA clonado y secuenciación

Si el análisis de supresión es adecuado, es de esperar que aparezca el propio *Ssu72* como supresor de las mutaciones. Por ello, se procedió a descartar aquellos cuyo patrón de restricción fuese igual al de *Ssu72*. Para ello se realizaron digestiones de los candidatos con enzimas de restricción cuyo patrón de corte en *Ssu72* es conocido. Dependiendo de la disponibilidad de las enzimas se efectuaron las siguientes combinaciones: *Clal-HindIII*, *BamHI-HindIII*, y *HindIII*, como control se emplea el plásmido pM471 (figura 4).

A continuación (figura 8), se incluyen ejemplos de los resultados de electroforesis obtenidos en el análisis de candidatos. Se analizaron duplicados procedentes de candidatos independientes de la misma transformación. En el apartado A, se observa una buena concentración y calidad de DNA. Con análisis de restricción de candidatos a supresores, se obtuvo un patrón de bandas que fue útil para descartar los

candidatos de los carriles 3, 4 y 5 por presentar un patrón de bandas similar a *SSU72* (en el apartado B el asterisco nos indica la banda de 1kb que utilizamos para el descarte), quedando 18D2-69a como dudoso.

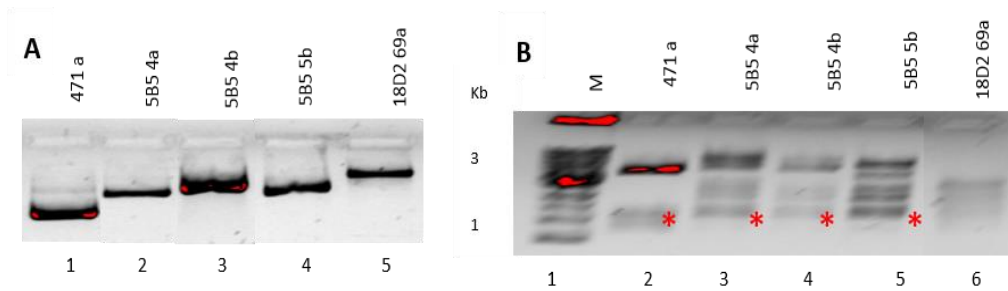


Figura 8: Resultados de electroforesis en gel de agarosa. A: Comprobación de la cantidad de DNA plasmídico extraído. B: Análisis de restricción con *Bam*HI y *Cl*aI mediante electroforesis en gel de agarosa

Tras las nuevas digestiones (figura 9), se descartaron los carriles 3 y 4 por presencia de, aunque débil, un patrón de bandas similar al propio PM471. En la figura 10, se muestran ejemplos de patrones de bandas no solapantes con el de *Ssu72* por lo que los candidatos 18D2-5, 18D2-16 y 5B5-71 se seleccionaron para su posterior secuenciación.

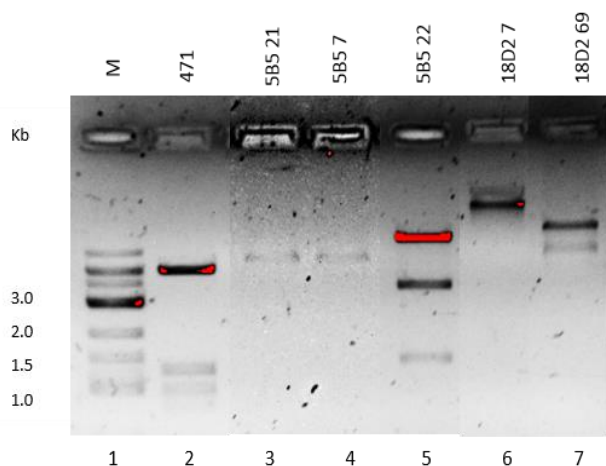


Figura 9: Resultados de electroforesis en gel de agarosa. Análisis de restricción con *Bam*HI y *Cl*aI.

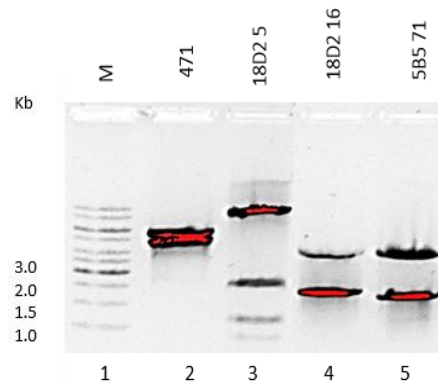


Figura 10: Resultados de electroforesis en gel de agarosa. Análisis de restricción con *Hind*III.

Gracias al análisis de restricción de candidatos a supresores (figura 11), pudimos descartar los candidatos que corresponden a los carriles 4, 5, 8, y 11 (por presentar un patrón de bandas similar al propio PM471). Los demás candidatos se seleccionaron para secuenciación.

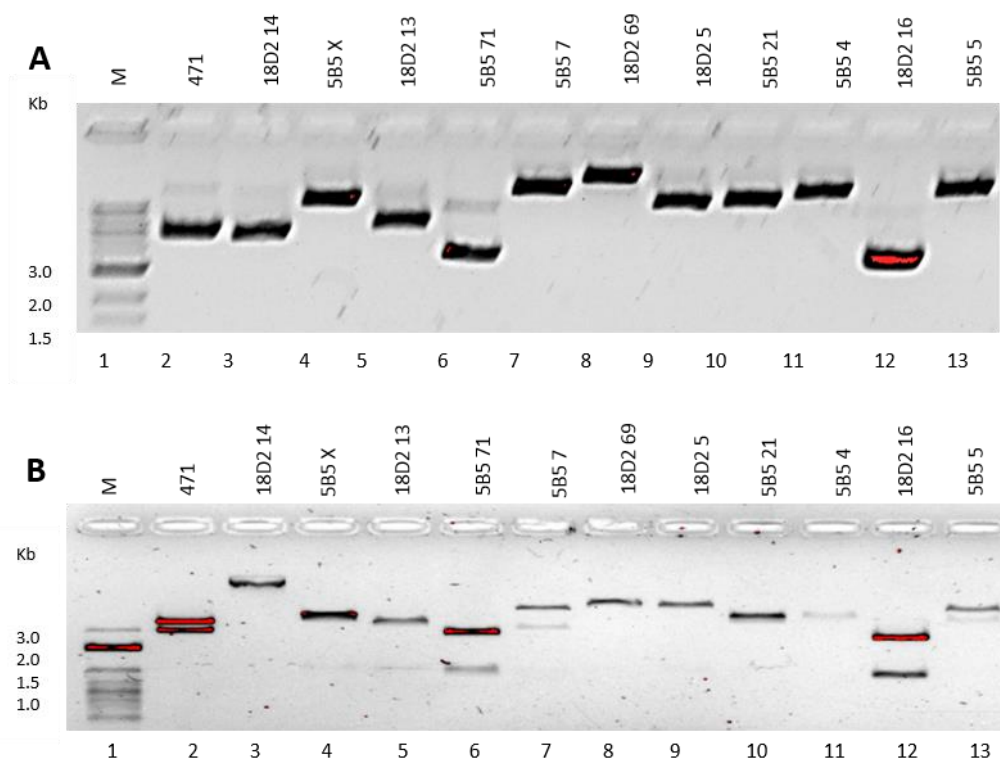


Figura 11: Resultados de electroforesis en gel de agarosa. A: Comprobación de la concentración de DNA plasmídico extraído. B: Análisis de restricción con *HinIII* mediante electroforesis en gel de agarosa.

Dado que el proceso de análisis de complementación puede durar varios días enviamos a secuenciar todos los candidatos para tener identificados los candidatos en el momento del análisis final. En la tabla 7 se resumen los resultados obtenidos tras la secuenciación de los candidatos. Comprobamos que 4 de ellos (11D1-5, 11D1-13, 5B5-5 y 5B5-21) eran el propio *Ssu72* actuando como supresor, esto era de esperar ya que este complementa con la secuencia y suprime la mutación. Además, hubo 2 candidatos (18D2-14 y 5B5-71) de los que no obtuvimos una lectura en la secuenciación, tal vez porque la concentración de DNA plasmídico en la muestra no fuese suficiente. El resultado de uno de los candidatos (5B5-7) mostró una secuencia bacteriana (contaminante de la propia genoteca). Y por último se encontraron 2 posibles candidatos a supresores de *SSU72*, uno de ellos pendiente de volver a analizar ya que el resultado de la secuenciación nos muestra una mezcla de secuencias. Además este candidato (18D2-16), mostró un mal crecimiento en placa y la calidad de DNA extraído era baja. Este dato probablemente se deba a que la expresión del gen contenido en el plásmido resulte tóxico para la bacteria.

Tabla 7: Resumen de los resultados obtenidos de los candidatos supresores

Candidatos	Resultados
5B5-71	pendiente secuenciación
11D1-5	<i>Ssu72</i>
5B5-21	<i>Ssu72</i>
5B5-7	Secuencia bacteriana
18D2-5	Posible supresor
11D1-13	<i>Ssu72</i>
18D2-14	pendiente secuenciación
5B5-5	<i>Ssu72</i>
18D2-16	Mezcla de secuencias (pendiente de aislamiento)

4.1.3 Identificación de los candidatos a supresores

Al secuenciar a ambos lados del sitio *Bam*HI de la genoteca, con los cebadores diseñados, podemos acotar los extremos de los clones y posteriormente identificar los posibles genes supresores.

Al tratarse de genes de *S. cerevisiae*, tras la obtención de la secuencia se procedió al análisis BLASTN en la base de datos SGD. Al secuenciar a ambos lados del sitio *Bam*HI con los cebadores diseñados podemos acotar los extremos de los clones.

- Candidatos a supresores

El clon supresor 18D2-5 está localizado en el cromosoma II y comprende las regiones cromosómicas que muestra la figura 13. Dentro de esta secuencia se descartaron las regiones codificadoras (*open reading frame*, ORF) incompletos, quedando como posibles candidatos Skt5 y/o YBL062W. Según la base de datos SGD, YBL062W es una región codificadora dudosa, mientras que, Skt5 es un activador de Chs3p (quitina sintasa III) durante el crecimiento vegetativo.

En *S. cerevisiae* Skt5 interactúa con un total de 163 proteínas, algunos de ellos reguladores transcripcionales como Ume6 o quinasas como Ypki o Tpri (Kozubowski *et al.* 2003; Ghosh and Cannon, 2013).

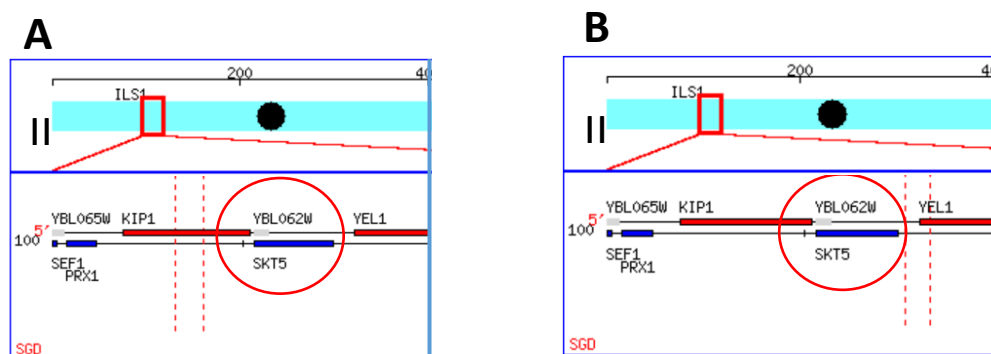


Figura 13: A y B: capturas de pantalla del resultado del BLASTN en el SGD tras el análisis del candidato 18D2-5 que nos indica las zonas acotadas con los cebadores Ycp50U (A) y Ycp50R (B) para la identificación de genes supresores. El círculo delimita las dos únicas regiones codificadoras completas en la secuencia.

4.2 Análisis de complementación del fenotipo mutante

A fin de comprobar si los nuevos candidatos a supresores eran capaces de complementar los defectos de crecimiento a 37°C del mutante *ssu72-2* se realizaron transformaciones en la cepa YZS84. Las células transformadas permitieron efectuar análisis de complementación.

Dado que en el análisis de supresión inicial los candidatos complementaban el defecto de crecimiento a 37°C de los diferentes mutantes (18D2, 5B5 y 11D1), se comenzó por verificar que todos eran capaces de suprimir el defecto del mismo mutante *ssu72-2*. El control negativo fue *ssu72-2*, este es incapaz de crecer a 37°C, por el contrario, el control positivo al llevar incluido el plásmido con *SSU72*, este debería complementar a *ssu72-2* y permitir observar crecimiento. Cada uno de estos controles se compararon con cada uno de los candidatos a supresores del fenotipo Ts.

En la figura 14 se observa el crecimiento de diferentes candidatos a supresores de la mutación de *Ssu72* en *S. cerevisiae*, con los siguientes controles: positivo (plásmido PM471), negativo (vector YEp24) y la cepa silvestre (*SSU72* + YEp24) creciendo sobre placas de *CM-URA* a diferentes temperaturas. A la derecha se muestra el esquema de lo sembrado en cada uno de los sectores de las placas.

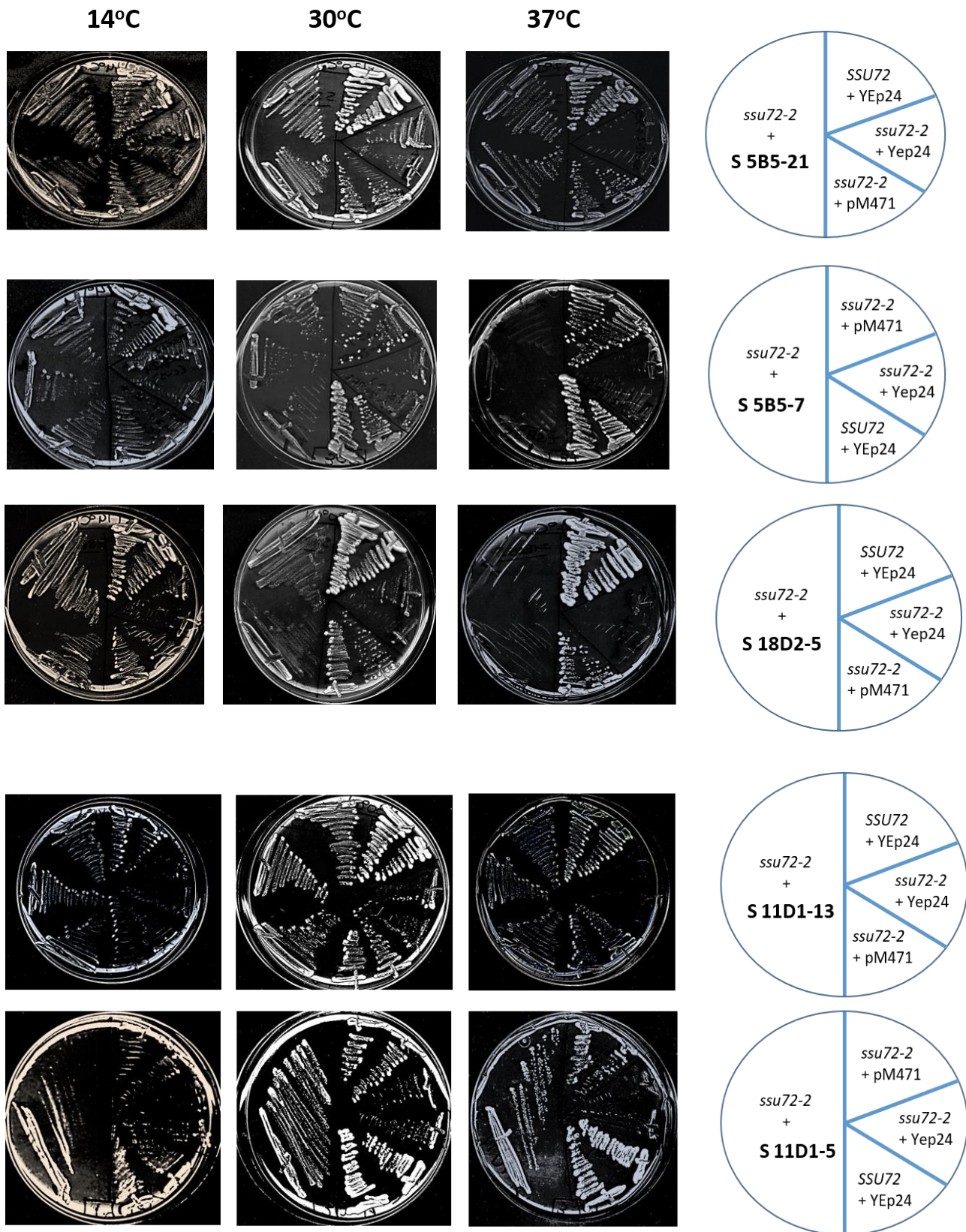


Figura 14: Fenotipos en crecimiento sobre placas CM-URA de los candidatos a supresores de *ssu72-2*: 5B5-21, 5B5-7, 18D2-5, 11D1-13 Y 11D1-5.

Tras obtener los datos de secuenciación y combinar esta información pudimos comprobar que los que mejor complementaron fueron los candidatos 11D1-5, 11D1-13, 5B5-21 y 5B5-5 que contenían el propio *Ssu72*. Sin embargo, esperábamos que el análisis fenotípico mostrara un crecimiento similar a la cepa

silvestre. En el caso de los tres primeros esto si ocurre (figura 14), pero no es el caso del 5B5-5 en el cual ya se observó un escaso crecimiento a 30°C.

A fin de comparar 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* (wt) a diferentes temperaturas (figura 15).

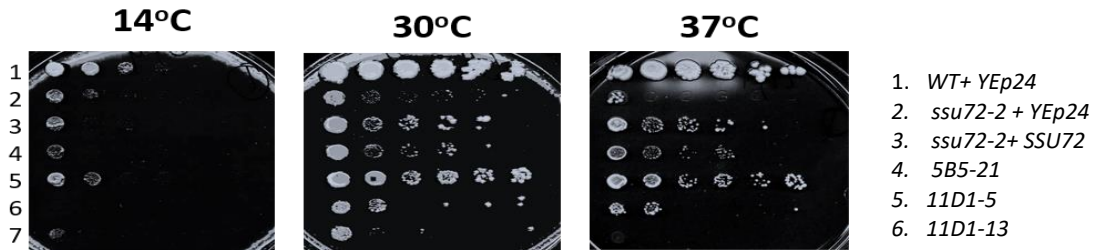


Figura 15: Resultado de las diluciones seriadas de varios candidatos a supresores de la mutación *ssu72-2* con sus respectivos controles. WT: wild type (cepa silvestre).

Los pocillos 2 (control negativo) y 7 (18D2-5) no crecen bien a 37°C lo que nos indica que el candidato 18D2-5 no complementa la mutación de *SSU72*.

Dado que se trata de dos supresores de un defecto en el extremo C-terminal de *SSU72*, es muy posible que supriman defectos no relacionados con la fosforilación de CTD. De hecho, *Skt5* forma un complejo con otros factores (*Glc 7* y *Bni4p*) cuya función es necesaria para la síntesis de quitina en el proceso de gemación, como se representa en la figura 16B (Roog *et al.*, 2013). De los dos genes candidatos a supresores de 18D2, consideramos que, probablemente el gen supresor sea *SKT5*, reguladora de la actividad quitina sintasa. *Glc7* es también una fosfatasa que actúa a nivel molecular en el procesamiento de RNA (al igual que *Ssu72*) (figura 16A) y también es necesaria para determinar la posición y la regulación de la síntesis de quitina en el proceso de la gemación como se representa en la figura 16B. Por esta conexión con otras fosfatasas celulares, pensamos que es más probable que éste (y no la secuencia presente en la hebra complementaria) sea el supresor.

La supresión implica que al estar sobreexpresada *Skt5* compensa el defecto en la actividad fosfatasa provocada por la mutación en *SSU72*. Si se confirma este resultado 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.

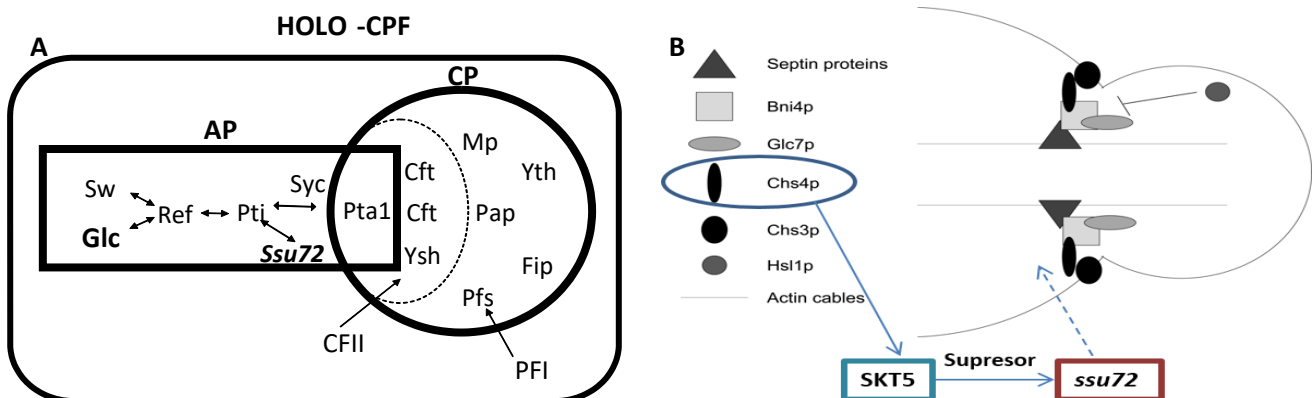


Figura 16: A. Complejo holo-CPF de la maquinaria de procesamiento 3' del mRNA. Los diferentes factores que lo forman incluyen las fosfatasas *Ssu72* y *Glc7*. Las dobles flechas indican interacciones conocidas entre los componentes de APT en el núcleo (Modificado de He *et al.*, 2003). B. Esquema del complejo que forma *SKT5* (regulado por fosforilación y desfosforilación) (modificado de Rogg *et al.* 2013).

V. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS/CONCLUSIÓNS

Como resultado del presente trabajo llegamos a las conclusiones que se indican a continuación:

1. La estrategia metodológica empleada para identificar los supresores fue acertada, como lo confirman haber obtenido cuatro candidatos que eran el propio *Ssu72*, actuando como supresor de sí mismo.
2. Se identificaron dos posibles genes candidatos a supresores de *SSU72*, uno de ellos pendiente de volver a analizar.
3. Los análisis fenotípicos mostraron supresión de la mutación de *ssu72-2* (Ts⁻) por clones con *SSU72*.
4. El clon supresor de 18D2-5 no suprime a *ssu72-2* sin embargo, dado su potencial interés, habrá que estudiar su efecto sobre el propio mutante 18D2. Contiene dos posibles genes supresores *SKT5* y/o *YBL062W* (ambos solapados en el genoma). Posteriores estudios serán necesarios para saber cuál de los dos es el supresor y, de ser *SKT5*, el papel de *Ssu72* en el proceso de gemación celular.

As a result of the present work we arrive at the following conclusions:

1. The methodology strategy used to identify the suppressors was adequate, as confirmed the four candidates who were *Ssu72*, which acts as a suppressor of itself.
2. Two possible 18D2-suppressors candidate's genes were identified, one of which is pending further analysis.
3. Phenotypic analyses showed suppression of *ssu72-2* mutation (Ts⁻) by clones with *SSU72*.
4. The 18D2-5 suppressor clone does not suppress *ssu72-2*, however, given its interest, its effect on the 18D2 mutant itself need to be studied. It contains two possible suppressor genes *SKT5* and/or *YBL062W* (both overlapping in the genome). Subsequent studies will be necessary to know which one of them is the suppressor and the role of *Ssu72* in the cellular budding process.

Como resultado deste traballo, chegouse ás conclusións que se indican a continuación:

1. A estratexia metodolóxica utilizada para identificar supresores foi adecuada, como o confirman os catro candidatos que eran o propio *Ssu72*, que actúa como un supresor de si mesmo.
2. Identificáronse dous posibles xenes candidatos a supresores de *SSU72*, un deles pendente de volver analizar.
3. A análise fenotípica mostrou supresión de *ssu72-2* mutación (Ts⁻) só por clons con *SSU72*.
4. O clon supresor 18D2-5 non suprime *ssu72-2* e dado o seu interese, haberá que estudar o seu efecto sobre o propio mutante 18D2. Contén dous xenes supresores, *Skt5* e/ou *YBL062W* (ambos superpostos no xenoma). Posteriores estudos serán necesarios para saber cal dos dous é o supresor e o papel de *Ssu72* no proceso de xemación.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- **Armache, K. J.; Mitterweger, S.; Meinhart, A. and Cramer, P.** (2005). *Structures of complete RNA polymerase II and its subcomplex, Rpb4/7*. Journal of Biological Chemistry, **280**: 7131-7134.

- **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.

- **Carlson, M.; Osmond, B. C.; Neigeborn, L. and Botstein, D.** (1984). *A suppressor of SNF1 mutations causes constitutive high-level invertase synthesis in yeast*. Genetics, **107**: 19-32.

- **Chen, D. C.; Yang, B. C. and Kuo T. T.** (1992). *One-step transformation of yeast in stationary phase*. CurrGenet, **21**: 83-84.

- **Cramer, P.; Bushnell, D. A. and Kornberg, R. D.** (2001). *Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution*. Science, **8**: 1863-1876.

- **Ghosh, A. and Cannon, J. F.** (2013). *Analysis of Protein Phosphatase-1 and Aurora protein kinase suppressors reveals new aspects of regulatory protein function in Saccharomyces cerevisiae*. PLoS ONE, **8**: e69133.

- **Hahn, S.** (2004). *Structure and mechanism of the RNA Polymerase II transcription machinery*. Nature Structural & Molecular Biology, **11**: 394-403.

- **He, X. H.; Khan, A.U.; Cheng, H.; Pappas, D. L.; Hampsey, M. and Moore, C. L.** (2003) *Functional interactions between the transcription and mRNA 3'-end processing machineries mediated by Ssu72 and Sub1*. Genes Dev, **17**: 1030-1042.

- **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.

- **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.

- **Meinhart, A.; Silberzahn, T. and Cramer, P.** (2003). *The mRNA transcription/processing factor Ssu72 is a potential tyrosine phosphatase*. Journal of Biological Chemistry, **278**: 15917-15921.

- **Michaels, S. D. and Amasino, R. M.** (2001). *Loss of flowering locus C activity eliminates the late-flowering phenotype of FRIGIDA and autonomous pathway mutations but not responsiveness to vernalization*. The Plant Cell, **13**: 935-941.

- **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.

- **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.

- **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.

- **St-Pierre, B.; Liu, X.; Kha, L. T.; Zhu, X.; Ryan, O.; Jiang, Z. and Zacksenhaus, E.** (2005). *Conserved and specific functions of mammalian ssu72*. Nucleic Acids Research, **33**: 464–477.

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

- **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

Datos del vector YEp24:

- http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/yeast_plasmids/YEp24/