



UNIVERSIDADE DA CORUÑA  
Facultade de Ciencias

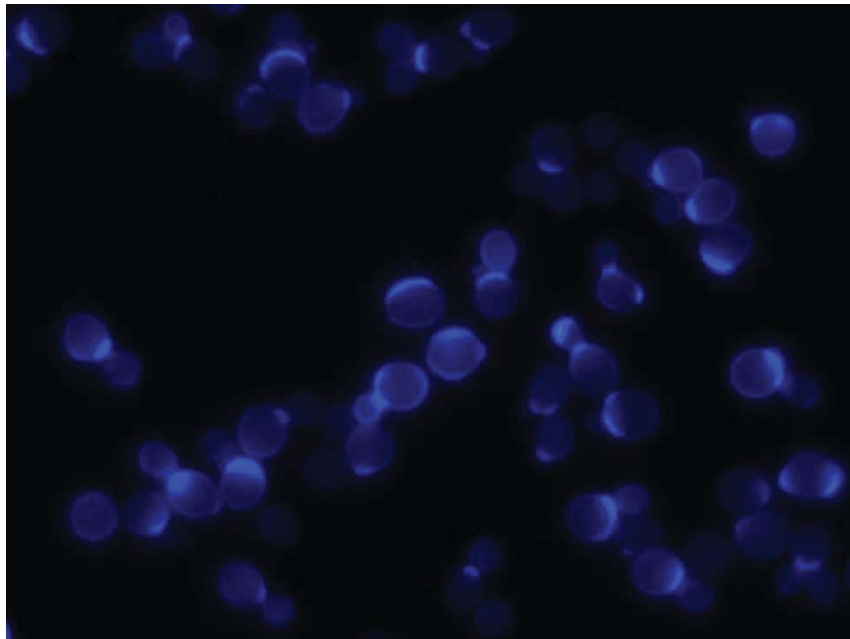
# Máster en Bioloxía Celular, Molecular e Xenética

## Memoria do Traballo de Fin de Máster

Importancia del número de copias de *SSU72* en la mitosis y la integridad de la pared celular.

Importance of the *SSU72* copy-number in the mitosis and cell-wall integrity.

Importancia do número de copias de *SSU72* na mitose e na integridade da parede celular.



**Marta Barturen Gómez**

Curso: 2020- 2021. Convocatoria: Xullo

Directora: María Ángeles Freire Picos



Facultade de Ciencias  
UNIVERSIDADE DA CORUÑA

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

INFORMA

QUE EL PRESENTE TRABAJO FIN DE MASTER PRESENTADO POR LA ALUMNA MARTA  
BARTUREN GÓMEZ TITULADO:

Importancia del número de copias de *SSU72* en la mitosis y la integridad de la pared celular.

Importance of the *SSU72* copy-number in the mitosis and cell-wall integrity.

Importancia do número de copias de *SSU72* na mitose e na integridade da parede celular.

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

Y para que conste firmo la presente en A Coruña a 14 de Julio de 2021

FREIRE PICOS  
MARIA ANGELES  
- 32760558W

Firmado digitalmente por FREIRE PICOS  
MARIA ANGELES - 32760558W  
Nombre de reconocimiento (DN): cn=ES,  
serialNumber=PICOS-32760558W,  
givenName=MARIA ANGELES, sn=FREIRE  
PICOS, o=FREIRE PICOS MARIA ANGELES  
- 32760558W  
Fecha: 2021.07.14 17:51:16 +02'00'

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

# ÍNDICE

<b>RESUMEN/ABSTRACT/RESUMO.....</b>	<b>3</b>
<b>PALABRAS CLAVE/KEY WORDS/ PALABRAS CLAVE.....</b>	<b>4</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
1.1 La fosfatasa Ssu72.....	5
1.2 Papel de Ssu72 en la mitosis.....	6
1.3 Pared celular de hongos.....	7
<u>1.3.1 Estructura de la pared y síntesis de quitinas.....</u>	<u>7</u>
<u>1.3.2 Integridad de la pared celular.....</u>	<u>9</u>
1.4 El factor Skt5 en la regulación de la síntesis de quitina.....	11
1.5 <i>SSU72</i> y su relación con la síntesis de quitina.....	12
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
3.1 Cepas utilizadas.....	14
<u>3.1.1 Levaduras.....</u>	<u>14</u>
<u>3.1.2 Bacterias.....</u>	<u>14</u>
3.2 Plásmidos.....	14
3.3 Medios de cultivo.....	15
<u>3.3.1 Medio LBA.....</u>	<u>15</u>
<u>3.3.2 Medio YPD.....</u>	<u>15</u>
<u>3.3.3 Medio CM-Ura.....</u>	<u>15</u>
<u>3.3.4 Medios en condiciones de estrés.....</u>	<u>17</u>
3.4 Transformación de bacterias.....	18

3.5 Extracción de DNA.....	18
3.6 Transformación de levaduras.....	18
3.7 Microscopía.....	19
3.8 Diluciones seriadas para el análisis de fenotipos en placa.....	19
3.9 Curvas de crecimiento.....	19
3.10 Fijación de células.....	20
3.11 Análisis estadístico.....	20
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>20</b>
4.1 Análisis de fenotipos relacionados con la pared celular.....	20
4.2 Comprobación del efecto del número de copias de <i>SSU72</i> y <i>SKT5</i> en aspectos relacionados con la pared celular.....	22
<u>4.2.1 Determinación de los tiempos de acción de Calcoflúor y NaCl.....</u>	<u>22</u>
<u>4.2.2 Curvas de crecimiento para el posterior análisis por microscopía.....</u>	<u>23</u>
4.4 Efectos observados a nivel celular.....	25
<u>4.4.1 Efecto de la sobreexpresión de <i>SSU72</i> y <i>SKT5</i> en las áreas de cada cepa.....</u>	<u>25</u>
<u>4.4.2 Efectos de los tratamientos en cada cepa.....</u>	<u>26</u>
<u>4.4.3 Efecto de la sobreexpresión de <i>SSU72</i> y <i>SKT5</i> en la morfología celular.....</u>	<u>29</u>
<b>5. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS/CONCLUSIÓN.....</b>	<b>34</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>36</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>40</b>

## RESUMEN

*SSU72* es una proteína esencial con diversas funciones en la célula. En trabajos anteriores del laboratorio se identificó al gen *SKT5* como un supresor en alto número de copias de mutaciones en *SSU72*. Dado que Skt5 es una proteína que regula la síntesis de quitina, se pudo relacionar a *SSU72* con una nueva función, la regulación de la síntesis de quitina. En este trabajo, se partió de la información previa para buscar alteraciones en la pared celular que afecten al crecimiento, área y morfología celular debido a los niveles de expresión de *SSU72* y *SKT5*. Para ello, se obtuvieron cepas que sobreexpresan estos genes y se analizó el crecimiento y la morfología celular en diferentes medios que afectan a la integridad de la pared y a la osmolaridad. Los resultados muestran la implicación de estos dos factores en los procesos analizados.

## ABSTRACT

*SSU72* is an essential protein with multiple functions in the cell. In previous studies, our team identified a high copy suppressor of *SSU72* mutations. Given that Skt5 is a protein that functions regulating chitin synthesis, our laboratory was able to associate *SSU72* with a new function, chitin synthesis regulation. In this work, we will resume from previous data in search for potential changes in cellular growth, areas and morphology, due to *SSU72* and *SKT5* expression levels. In order to achieve that purpose, we obtained cell strains overexpressing those genes and we analyzed cell growth and cell morphology in different media affecting cell-wall integrity and osmolarity. Our results show that *SSU72* and *SKT5* are involved in both of those processes.

## RESUMO

*SSU72* é unha proteína esencial con diversas funcións na célula. En anteriores traballos do laboratorio, identificouse ao xen *SKT5* como un supresor en alto número de copias de mutacións en *SSU72*. Sendo Skt5 unha proteína que regula a síntese de quitina púidose relacionar a *SSU72* cunha nova función, a regulación síntese de quitina. Neste traballo, partiuse da nosa información previa para buscar alteracións na parede celular que afecten ao crecemento, área e morfoloxía celular debido aos niveis de expresión de *SSU72* e *SKT5*. Para elo, obtivéronse cepas que sobreexpresaban estes xenes e analizouse o crecemento e morfoloxía celular en medios que afectan á integridade da parede e á osmolaridade. Os resultados amosan a implicación destes dous factores nos procesos analizados.

**PALABRAS CLAVE:**

*SSU72, SKT5, quitina, Saccharomyces cerevisiae, pared celular, gemación*

**KEY WORDS:**

*SSU72, SKT5, chitin, Saccharomyces cerevisiae, cell wall, budding*

**PALABRAS CLAVE:**

*SSU72, SKT5, quitina, Saccharomyces cerevisiae, parede celular, xemación*

## 1. Introducción

### 1.1 La fosfatasa Ssu72.

*SSU72* es un gen esencial en levaduras que codifica para una proteína de 206 aminoácidos conservada en eucariotas (Sun & Hampsey, 1996).

La primera función con la que se relacionó a esta proteína fue con la regulación de la transcripción a través de la interacción genética con el factor TFIIB y con la RNA polimerasa II (Pappas & Hampsey, 2000; Sun & Hampsey, 1996). Se observó que participa en el procesamiento 3' al formar parte del Complejo de Corte y Poliadenilación (CPF) y que está implicada tanto en la elongación como en la terminación transcripcional (Dichtl et al., 2002; Steinmetz & Brow, 2003). Posteriormente se descubrió que, en *Saccharomyces cerevisiae*, Ssu72 es imprescindible para la terminación de los pre-snoRNAs y de algunos pre-mRNAs (Ganem et al., 2003).

Krishnamurthy y colaboradores (2004) descubrieron que desde el punto de vista bioquímico, Ssu72 es una fosfatasa que interviene en la regulación de la transcripción al catalizar la desfosforilación del Dominio Carboxilo-Terminal (CTD) de la subunidad Rpb1 de la RNA polimerasa II. Este último, está formado por repeticiones en tándem del heptapéptido YSPTSPS, en un número que varía en función del organismo. Este dominio es necesario para la regulación de la transcripción al funcionar como punto de unión para muchas proteínas reguladoras que actúan modificándolo (Jeronimo et al., 2016). Así, Ssu72 actúa como una fosfatasa de la serina 5 de las repeticiones del CTD. Esta actividad es necesaria para que ocurra correctamente el inicio de la transcripción, con la polimerasa desfosforilada; y la elongación, en la que varía el número de repeticiones con la serina5 desfosforilada. Además, esta función es independiente de la relacionada con el procesamiento 3' (Krishnamurthy et al., 2004). Más tarde, se comprobó que Ssu72 también actúa como fosfatasa de la serina 7 del CTD (D. W. Zhang et al., 2012). La interacción de Ssu72 con TFIIB, facilitada por la subunidad Rpb4 de la RNA polimerasa II, permite la formación de *loops* de DNA, que conectan la región terminadora y el promotor para el reinicio de la transcripción en los genes con transcripción activa para iniciar un nuevo ciclo de transcripción (Allepuz-Fuster et al., 2019; Lamas-Maceiras et al., 2016; Ansari & Hampsey, 2005).

## 1.2 Papel de Ssu72 en la mitosis.

Durante la mitosis, las cromátidas hermanas son retenidas conjuntamente tras la replicación del DNA. En levaduras, la unión entre cromátidas ocurre gracias a los complejos cohesina que retienen las cromátidas hasta la anafase. En eucariotas superiores, queda una pequeña cantidad de cohesina durante la anafase, también con la misma función (Haering et al., 2002). La cohesina está formada por las subunidades codificadas por genes ortólogos en levaduras y humanos (Zhang et al., 2013).

En humanos, Ssu72 interacciona con la subunidad reguladora de los complejos cohesina, Rad21 y con la subunidad SA2, manteniéndola desfosforilada, y evitando que las cromátidas se separen de forma prematura en las fases S/G<sub>1</sub> temprana (Figura 1) (Kim et al., 2010).

La separación de las cromátidas está regulado por quinasas mitóticas, de las que depende su disociación. Una de ellas, la Aurora B, interacciona con Ssu72, fosforilándola en la Ser19, reduciendo su actividad como fosfatasa y dirigiendo su degradación dependiente de ubiquitinación (Kim et al., 2013). Así, Ssu72 es reclutada hacia la cromatina durante las fases S y G<sub>1</sub> del ciclo celular, manteniendo las cromátidas unidas, hasta que durante la profase, la quinasa Aurora B, actúa inhibiendo esta función para, finalmente, en la transición metafase-anafase, eliminarse Ssu72 de la cromatina y dar lugar a la separación de las cromátidas (Kim et al., 2016).

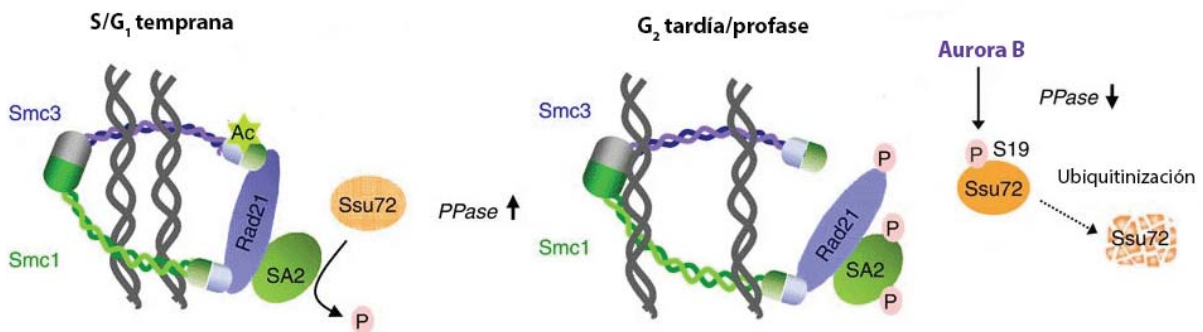


Figura 1. Regulación de la separación de las cromátidas hermanas a través del ciclo celular. Modificado de Kim et al., 2016.



### 1.3 Pared celular de hongos.

#### 1.3.1 Estructura de la pared y síntesis de quitina.

La pared celular de los hongos es una estructura formada principalmente por glucanos, quitina y manoproteínas. Define la forma de la célula a través de diferentes procesos como pueden ser la gemación o el crecimiento celular y que permite a las células mantener su integridad actuando como una barrera osmótica (Orlean, 2012).

El componente mayoritario de la pared es el  $\beta$ -1,3-glucano, que contiene ramificaciones en posición  $\beta$ -1,6 e interacciona mediante puentes de hidrógeno para dar lugar a una red tridimensional. En las zonas más externas de las cadenas del  $\beta$ -1,3-glucano se unen cadenas de  $\beta$ -1,6-glucano, que a su vez están unidas a proteínas GPI (proteínas modificadas con glicosilfosfatidilinositol). La quitina está formada por N-acetilglucosamina unida mediante enlaces  $\beta$ -1,4 y forma microfibras que interaccionan entre sí mediante puentes de hidrógeno. Se une a los extremos no reductores de los glucanos mediante enlaces  $\beta$ -1,4, y suele encontrarse en las zonas de gemación, como el *septum* o las cicatrices de gemación de la célula madre (Revisado por Klis et al., 2006).

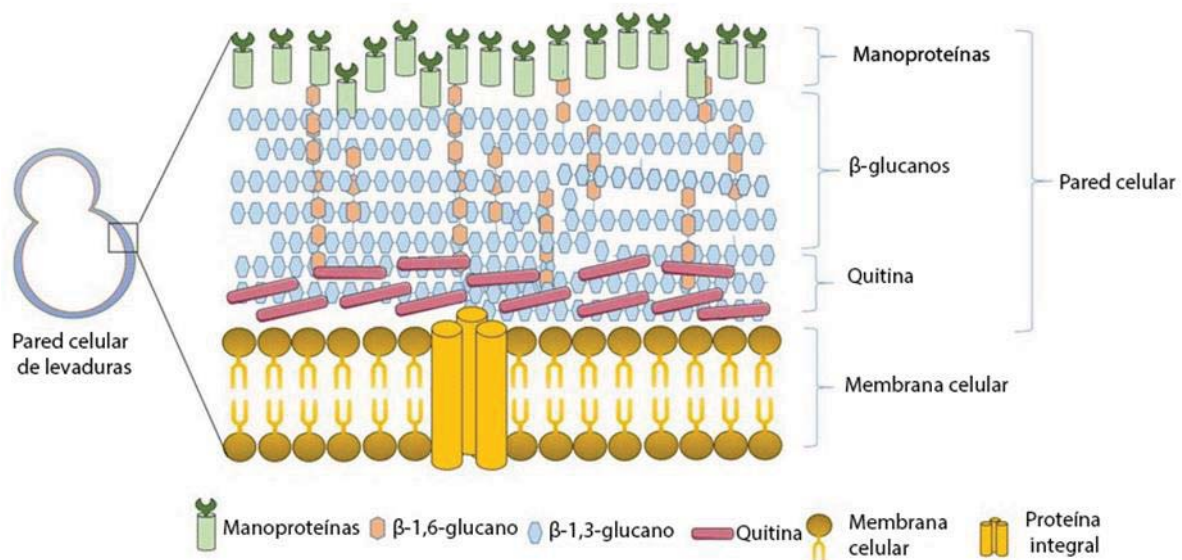


Figura 2. Estructura de la pared celular de los hongos, con la membrana celular en la parte más interna, rodeada de  $\beta$ -1,3-glucano y  $\beta$ -1,6-glucano, ambos con quitina, intercalada con ellos a través de los extremos no reductores, situados hacia la cara interna de la pared, próxima a la membrana celular. En la parte más externa se encuentran manoproteínas. Modificado de Kim et al., 2013.

El  $\beta$ -1,3-glucano proporciona elasticidad a la pared, mientras que las cadenas de  $\beta$ -1,6-glucano, más cortas, actúan como una unión flexible entre el  $\beta$ -1,3-glucano y la quitina y las manoproteínas, mediante enlaces covalentes (Figura 2). La quitina, en su forma cristalina, da lugar a una mayor resistencia a la pared, al depositarse en las zonas de gemación durante la fase  $G_1$  o, con menos frecuencia, en las paredes, bajo condiciones de estrés (Lesage & Bussey, 2006).

En *S. cerevisiae* la quitina es sintetizada por tres quitina sintasas (Chs1, Chs2, Chs3). La síntesis de quitina por Chs1 y Chs2 es minoritaria. Chs1 es necesaria para que la gemación ocurra con normalidad, mientras que Chs2 es responsable de la morfología, sus mutaciones causan problemas de crecimiento, dando lugar a células más alargadas y a yemas que no se separan correctamente (Silverman et al., 1988). Chs3 tiene especial importancia en las paredes laterales, en los puntos de gemación y en la formación de las cicatrices que permanecen en los puntos de gemación (Shaw et al., 1991). Al comienzo del ciclo celular, Chs3 forma el anillo de quitina en la base de la nueva yema. A continuación, se forma el *septum*, a partir del anillo, sintetizado por Chs2. Una vez formado el *septum*, se empieza a sintetizar la quitina de la pared de la célula hija, unida al glucano mediante enlaces  $\beta$ -1,4. Finalmente, la yema se separa al degradarse el *septum* y el anillo permanece en la célula madre, dando lugar a la cicatriz de gemación, mientras que en la célula hija el daño producido por la quitinasa al degradar el *septum* es reparado por Chs1 (Figura 3) (Park et al., 2002).

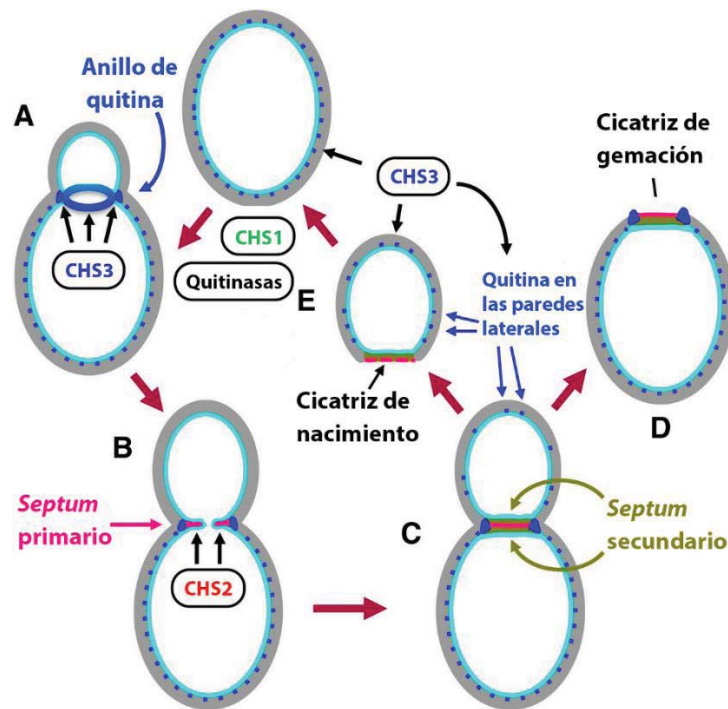


Figura 3. Función de las quitina sintetasas durante la gemación. Chs3 sintetiza el anillo de quitina en la base de la nueva yema (A). A continuación, se invagina la membrana celular y Chs2 sintetiza el *septum* primario, mientras que la yema permanece sin quitina en las paredes laterales (B). Se sintetiza el *septum* secundario y se empieza a sintetizar quitina en las paredes laterales de la yema (C). La yema se separa, dando lugar a la cicatriz de gemación, que permanece en la célula madre (D) y a la cicatriz de nacimiento, que es eliminada por quitinasas y reparada por CHS1 (E). Modificado de (Cabib & Durán, 2005).

En el cuello de las yemas, además de Chs3, intervienen otras proteínas necesarias para la remodelación de la membrana plasmática que tiene lugar durante la citocinesis y la morfogénesis. Entre ellas, tienen especial relevancia las septinas. Estas proteínas, situadas en la membrana celular entre la célula madre y la yema, son necesarias para la citocinesis, dando lugar a yemas alargadas cuando no funcionan correctamente. Las septinas actúan como una barrera que impide el intercambio de proteínas entre el citoplasma de las células madre y las yemas, se asocian con otras proteínas necesarias para la división, como pueden ser la actina y miosina del anillo contráctil, y atraen a las vesículas secretoras que se encuentran las quitina sintetasas (Bertin et al., 2012).

### 1.3.2 Integridad de la pared celular.

La pared celular tiene que adaptarse a las condiciones del medio y por ello, para mantener la integridad de la célula, se remodela continuamente, cambiando su composición de glucanos,

quitina y proteínas. Los cambios que se producen en el medio, como pueden ser los cambios en la osmolaridad, la presencia de enzimas, diferentes fuentes de carbono o simplemente daños mecánicos, tienen que ser detectados por la célula. Esto es posible gracias a sensores, situados en la membrana celular, que activan rutas de señalización que permiten mantener la integridad de la pared celular (CWI). En *S. cerevisiae* estos sensores se clasifican en dos grupos, el primero formado por las proteínas Wsc1, Wsc2 y Wsc3 y en el otro las proteínas Mid2 y Mtl1. Esta división se basa en el extremo N-terminal, a través del cual interaccionan con los glucanos o proteínas de la pared celular. Cuando los sensores son activados, se inicia la cascada de transducción de señales, comenzando por el GEF (*Guanine Nucleotid Exchange factor*) Rom2, que activa una cascada de MAPK que, en último término, afectará a la expresión de genes en el núcleo (Figura 4) (Kock et al., 2015).

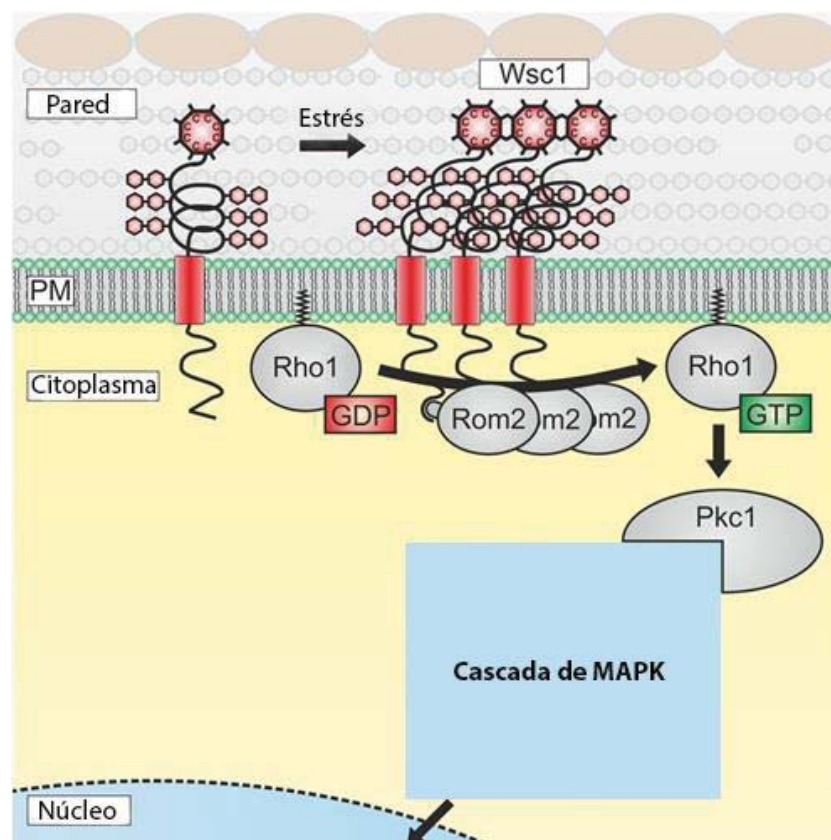


Figura 4. Ruta de señalización para el mantenimiento de la integridad de la pared celular. Modificado de (Kock et al., 2015).

Esta ruta de señalización, además de ser activada por los cambios producidos en el medio y por situaciones de estrés, es regulada continuamente a lo largo del ciclo celular. Cuando hay factores en el medio que causan estrés en la pared celular, como el calcoflúor blanco, se produce una respuesta, indistintamente del tipo de estrés que se cause (Levin, 2005). Actualmente, se

creo que lo que realmente activa la ruta es la presión que se ejerce en la membrana plasmática, en función de la turgencia celular. De esta forma, una alta osmolaridad en el medio actuaría inhibiendo la activación de la ruta que mantiene la integridad celular. Adicionalmente, esta ruta estaría conectada a otras, como el ciclo celular o la ruta de respuesta a alta osmolaridad (HOG). (García et al., 2009; Levin, 2011).

#### 1.4 El factor Skt5 en la regulación de la síntesis de quitina.

El gen *SKT5* (*CHS4*) codifica para una proteína de 696 aminoácidos que funciona como un activador de Chs3. La ausencia de esta proteína en *S. cerevisiae* da lugar a células resistentes al calcoflúor blanco (Trilla et al., 1997). Skt5 es transportada en vesículas hasta la membrana celular, gracias a la interacción física con Chs3 y a la prenilación, que la dirige hacia la zona de gemación. Skt5 hace que Chs3 se acumule en la membrana y que CSIII permanezca activa, dando lugar a la síntesis de quitina (Reyes et al., 2007). Skt5 también interacciona con Bni4, que a su vez interacciona con las septinas del anillo de gemación, donde se sitúa esta proteína (Figura 5). Cambios en la expresión de Bni4 dan lugar a la deslocalización de la quitina y a cambios morfológicos. La interacción entre Bni4 y las septinas, junto a Skt5, hace que Chs3 se localice en la zona de gemación (DeMarini et al., 1997). Skt5 es necesaria para la gemación de *S. cerevisiae*, pero no para la esporulación, aunque existen otras proteínas homólogas que juegan un rol similar durante la esporulación (Rogg et al., 2012).

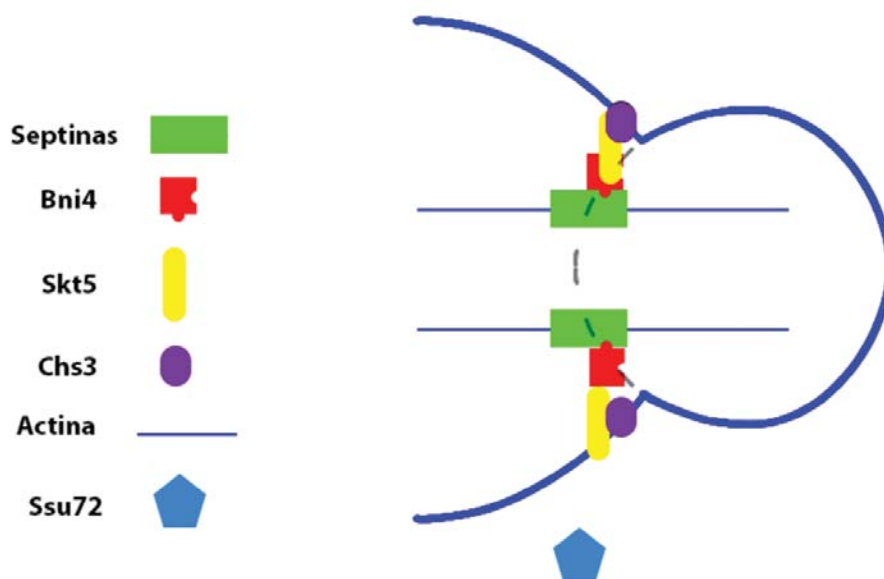


Figura 5. Interacción entre Ssu72, Skt5, Chs3, Bni4 y Ssu72 durante la síntesis de quitina en la gemación. Modificado de (Rogg et al., 2012).

## 1.5 *SSU72* y su relación con la síntesis de quitina.

En datos previos de nuestro laboratorio (Freire-Picos, no publicado), empleando una genoteca de *S. cerevisiae* (Carlson et al., 1984), se obtuvieron supresores en alto número de copias de mutaciones en el gen *SSU72* que causaban un fenotipo de sensibilidad al crecimiento a 37°C (fenotipo *ts<sup>-</sup>*). Partiendo de estos clones supresores, se comprobó que el gen *SKT5* es un supresor en alto número de copias del mutante 18D<sub>2</sub> de *SSU72* (con un codón *stop* en la posición 101) (Mejuto-González, 2017). *Skt5* es un regulador de la actividad quitina sintasa de *Chs3*, esta fue la primera evidencia de que *SSU72* está relacionada con la síntesis de quitina durante la gemación. Al ser el mutante 18D<sub>2</sub> una proteína con el extremo C-terminal truncado, se cree que es esta región la que se relaciona con esta función (Mejuto-González, 2017). Posteriormente, se observaron cambios en la superficie de la pared celular, mediante microscopía electrónica de barrido, en las células con una copia extra de *SSU72* y sobreexpresando *SKT5*. Se comprobó que los cambios observados (rugosidades) en la pared eran ocasionados por  $\beta$ -glucanos distribuidos de manera diferente a lo habitual, por tanto, se concluyó que *SSU72* está implicado en su síntesis y en su distribución. Mediante microscopía confocal, se observó que la presencia de una segunda copia de *SSU72* ocasiona el engrosamiento de la pared celular, defectos en la formación de tabiques y da lugar a cambios en la posición de las yemas; mientras que la sobreexpresión de *SKT5* da lugar a un aumento de la síntesis de quitina en ciertas zonas de la pared y a la presencia de quitina intercelular (Lorenzo-Rodríguez, 2019).

## 2. Objetivos

Partiendo de los datos previos del laboratorio en relación a la regulación de la síntesis de quitina mediada por *SSU72* y *SKT5*, se propuso:

- 1- Analizar los fenotipos de crecimiento para cepas de *S. cerevisiae* que sobreexpresen *SSU72* y *SKT5* en medios que afectan a la osmolaridad y la integridad de la pared celular.
- 2- Analizar mediante microscopía los efectos del estrés causado en las condiciones del objetivo anterior, en células crecidas en fase logarítmica.



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 Cepas utilizadas.

##### 3.1.1 Levaduras.

**YZS89A-T:** *MATa ura3-52 leu2-3,112 his3 trp1 Δ ssu72::LEU2 [TRP1- SSU72]*

Esta primera cepa, modificada a partir de YZS98A(Sun & Hampsey, 1996) variando el gen marcador (Rodríguez-Torres et al., 2013), fue la que se transformó para obtener las siguientes, con las que se trabajó.

**YMF2:** (*MATa ura3-52 leu2-3,112 his3 trp1 Δ ssu72::LEU2 [TRP1- SSU72] [URA3]*)

**YMF3:** (*MATa ura3-52 leu2-3,112 his3 trp1 Δ ssu72::LEU2 [TRP1- SSU72] [URA3-2MICRON- SKT5]*)

**YMF8:** (*MATa ura3-52 leu2-3,112 his3 trp1 Δ ssu72::LEU2 [TRP1- SSU72] [URA3-CEN3- SSU72]*)

##### 3.1.2 Bacterias.

Se empleó la siguiente cepa de *E. coli* XL-1-Blue (Bullock et al., 1987) para obtener una mayor cantidad de los plásmidos utilizados para las transformaciones

**XL1-blue:** *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIq ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]*.

#### 3.2 Plásmidos.

**pYep24:** Vector sin inserto (Botstein et al., 1979). Es un plásmido episómico, por tanto, con un alto número de copias en la célula. En este caso, será empleado como control negativo.

**p18D<sub>2</sub>-5:** plásmido aislado de una genoteca en alto número de copias. Contiene al gen *SKT5* de *Saccharomyces cerevisiae*. Obtenido como supresor en alto número de copias de la mutación 18D<sub>2</sub> de *SSU72* (Freire-Picos, no publicado; Mejuto-González, 2017).

**pN471:** plásmido con el gen *SSU72*. Es un plásmido centromérico (bajo número de copias) (Sun & Hampsey, 1996)



### 3.3 Medios de cultivo.

#### 3.3.1 Medio LBA.

Para el cultivo de bacterias, tras su transformación, se emplearon placas LB con Ampicilina. Se empleó este antibiótico para la selección de transformantes porque los plásmidos tienen el gen de resistencia a este antibiótico. El antibiótico se añadió tras la esterilización.

Medio LBA	
<b>Triptona</b>	5 g
<b>NaCl</b>	2,5 g
<b>Yeast Extract</b>	2,5 g
<b>Dextrosa</b>	0,5 g
<b>Agar</b>	7,5 g
<b>Agua destilada</b>	Hasta 500 mL
<b>Ampicilina</b>	0,5 mL (100mg/mL)

#### 3.3.2 Medio YPD.

Medio general para el cultivo de levaduras, las cepas no transformadas fueron sembradas en medio sólido YPD al 2%, un medio rico, no selectivo, previo a su transformación.

Medio YPD 2%	
<b>Peptona</b>	10 g
<b>Yeast Extract</b>	5 g
<b>Glucosa</b>	10 g
<b>Agar</b>	7,5 g

#### 3.3.3 Medio CM-Ura.

El medio CM-Ura es un medio completo de tipo sintético en el que se omite el uracilo. Se utilizó para sembrar las células transformadas, dado que los plásmidos contienen el marcador *URA3*, permitiendo así la selección de las células transformadas. En este caso, el YNB se esterilizó por separado del resto de componentes del medio y se añadió posteriormente, tras disminuir la temperatura.

<b>Medio CM -Ura</b>	
<b>Glucosa</b>	10 g
<b>Histidina</b>	20 mg
<b>Adenina</b>	20 mg
<b>Leucina</b>	20 mg
<b>Tirosina</b>	20 mg
<b>Triptófano</b>	20 mg
<b>Mezcla de aminoácidos 200X</b>	2,5 mg
<b>Agar</b>	7,5 g
<b>YNB</b>	33,5 mL
<b>Agua destilada</b>	Hasta 500 mL

<b>Mezcla de aminoácidos 200X</b>	
<b>Arginina</b>	2 g/L
<b>Isoleucina</b>	2 g/L
<b>Lisina</b>	8 g/L
<b>Metionina</b>	2 g/L
<b>Treonina</b>	2 g/L
<b>Fenil-Alanina</b>	12g/L

<b>YNB (<i>Yeast extract Peptone Dextrose</i>)</b>	
<b>Vitaminas 300X</b>	50 mL/L
<b>Sales traza 150X</b>	100 mL/L
<b>Fosfato de potasio</b>	15 g/L
<b>Sulfato de magnesio</b>	7,5 g/L
<b>Cloruro sódico</b>	1,5 g/L
<b>Cloruro cálcico</b>	1,5 g/L
<b>Sulfato amónico</b>	75 g/L

<b>Sales traza 150X</b>
-------------------------

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

Adicionalmente, se preparó medio CM-Ura-Trp, con la misma composición, pero sin incluir el triptófano ni uracilo. Este mismo medio también se empleó para preparar cultivos líquidos (sin añadir agar).

### 3.3.4 Medios en condiciones de estrés.

Para observar el crecimiento de las células transformadas, así como las posibles diferencias en la morfología celular y la gemación, se prepararon medios con diferentes condiciones de estrés. Se escogieron las condiciones previamente descritas por (Dragosits et al., 2010; Udom et al., 2019).

Para este objetivo, se prepararon medios sintéticos CM-Ura-Trp a los que se les añadieron los siguientes compuestos: calcofúor, glucosa 20%, sorbitol y dos concentraciones diferentes de NaCl.

Tabla 1: Compuestos añadidos a los medios (CM-Ura-Trp) para estudiar fenotipos asociados con la integridad de la pared y la osmolaridad.

<b>Tratamiento</b>	<b>[final]</b>
<b>Calcofúor</b>	0,01 mg/mL
<b>Glucosa 20%*</b>	40 g
<b>Sorbitol</b>	54,66 g [1,5 M]
<b>NaCl</b>	14,03 g [1,2 M]
<b>NaCl</b>	7,02 g [7,0,2 M]

\* En el medio de glucosa 20% se añadieron 40 g de glucosa en sustitución de los 4 g del medio CM-Ura-Trp.

Se preparó un *stock* de medio con calcoflúor (con una concentración de 0,1 mg/mL), que se añadió tras la esterilización del medio, utilizando un filtro. Se prepararon también placas con medio CM-Ura-Trp con glucosa al 20%, sorbitol y diferentes concentraciones de NaCl (Tabla 1).

En todos los casos, los medios fueron esterilizados a 121°C y 1 atm de presión en el autoclave durante 20 min.

### 3.4 Transformación de bacterias.

Para la amplificación de DNA plasmídico se efectuaron transformaciones de células *E. coli*. Para ello, se emplearon células competentes en stock del laboratorio, congeladas en alícuotas a -80°C. Se descongelaron tantos tubos como transformaciones en hielo durante 15 min, se añadieron 2 µL del plásmido correspondiente y se incubó la mezcla durante 2 min a 42°C. Finalmente, se sembraron las células en medio sólido LB con ampicilina y se incubaron a 37°C durante 24h.

### 3.5 Extracción de DNA.

Para la extracción de los transformantes se recogió masa celular de cada una de las resimebras crecidas en medio LBA y se utilizó el GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific™), repitiendo dos veces el paso de elución para un mayor rendimiento, obteniendo un volumen final de 80 µL.

### 3.6 Transformación de levaduras.

Las levaduras se transformaron con los plásmidos de interés, siguiendo el protocolo *One Step* (Chen et al., 1992). En primer lugar, recogieron células crecidas en placas con medio YPD al 2%. Tras alcanzar la fase estacionaria, se cogió una pequeña cantidad de masa celular, se resuspendieron las células en 100 µL de *buffer One Step* (Acetato de litio 0,2 M, PEG 3350 40%, Ditiotreititol 100mM) y se transformaron las células con 4 µL de DNA plasmídico. Se incubaron las células a 45°C durante 30 min. Finalmente, se sembraron los candidatos en placas CM-Ura y se incubaron a 30°C durante 48-72 h.

### 3.7 Microscopía.

Para analizar el efecto de los tratamientos en la distribución de la quitina, se tiñeron las células con calcoflúor blanco (*Fluorescent Brightener 28MP Biomedicals*) y se observaron en microscopio de fluorescencia. Esta tinción interacciona con la quitina de la pared celular y permite apreciar la distribución de la misma con un filtro DAPI, dados los espectros de absorción y emisión (absorción a 460 nm, emisión a 360nm).

Tabla 2: reactivos necesarios para la tinción con calcoflúor.

Reactivo A		Reactivo B	
<b>Hidróxido de potasio</b>	6,25 g	<b>Calcoflúor blanco</b>	0,01 g
<b>Glicerol</b>	6,25 g	<b><i>Evans Blue (ACROS organics)</i></b>	0,02 g
<b>Agua destilada</b>	50 mL	<b>Agua destilada</b>	50 mL

Para la tinción de las muestras, se prepararon los reactivos A y B (Tabla 2) y se añadió 1  $\mu$ L de cada uno sobre 1  $\mu$ L de células en el caso de los cultivos líquidos, y de masa celular en el caso de los cultivos sólidos. Las preparaciones se observaron con un microscopio óptico *Nikon Eclipse 50i* y empleando el software *NIS Elements D*.

### 3.8 Diluciones seriadas para el análisis de fenotipos en placa.

Para los análisis fenotípicos de crecimiento se hicieron diluciones seriadas con las diferentes cepas. Se partió del cultivo inicial y se hicieron sucesivas diluciones 1:10 con agua destilada estéril, tras lo cual se sembraron las células diluidas con un replicador de placas en nuevas placas CM-Ura-Trp y se incubaron a 30°C durante 72 h. Para tener en resultado gráfico las placas, se escanearon las a las 48 h y 72 h.

### 3.9 Curvas de crecimiento.

Se hicieron precultivos de las tres cepas en 10 mL de medio CM-URA-Trp líquido y se incubaron durante 24 h a 30°C en agitación. A partir de los precultivos, se hicieron cultivos de 120 mL para cada una de las cepas y se dejaron crecer hasta una absorbancia aproximada de

0,15 (a 600 nm). Tras ello, se midieron las absorbancias a 600 nm cada 2h hasta llegar a valores aproximados de 0,6. Adicionalmente se midieron las absorbancias a las 24h tras el inicio del cultivo.

### 3.10 Fijación de células.

Tras recoger muestras de 1 mL cada uno de los cultivos, éstos se fijaron añadiendo 100  $\mu$ L de paraformaldehído y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min. Se centrifugaron las muestras y se eliminaron los sobrenadantes. Se lavó el precipitado con 600  $\mu$ L de  $KPO_4$ /sorbitol (60 mL de sorbitol 2M, 10 mL de fosfato potásico 1 M y 30 mL de agua destilada) y se resuspendieron las células en 35  $\mu$ L del mismo compuesto. Tras la fijación, las células se mantuvieron a 4°C en oscuridad hasta el momento de su análisis mediante microscopía.

### 3.11 Análisis estadístico.

Para analizar los datos obtenidos al medir las áreas celulares se utilizó el software StatGraphics. En el caso de las áreas se utilizaron pruebas ANOVA para verificar que las diferencias observadas eran significativas. Al comparar los resultados de las áreas entre los controles de las diferentes cepas, al no tener los datos una distribución normal fue necesario emplear una prueba no paramétrica, en este caso se utilizó una prueba de Kruskal-Wallis. Para las diferentes morfologías observadas simplemente se hicieron recuentos y se compararon los porcentajes.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1 Análisis de fenotipos relacionados con la pared celular.

Para estudiar el efecto de la sobreexpresión de SKT5 y SSU72 en la regulación de la osmolaridad y la integridad de la pared celular, se analizó el crecimiento de las tres cepas (YMFM2, YMFM3 e YMFM8), sembrando diluciones seriadas de las mismas, en placas selectivas conteniendo algún tipo de estrés (Figura 6): glucosa al 20%, calcoflúor, sorbitol 1,5 M y NaCl 1,2 y 0,6 M y se utilizó como control medio CM-Ura-Trp sin tratamiento. La cepa YMFM2 (silvestre, Wt), utilizada como control, expresa una sola copia de *SSU72*. La cepa

YMFM3 (*HC SKT5*) sobreexpresa *SKT5* y también posee una copia de *SSU72*, mientras que la cepa YMFM8 contiene una copia adicional de *SSU72* (2x *SSU72*).

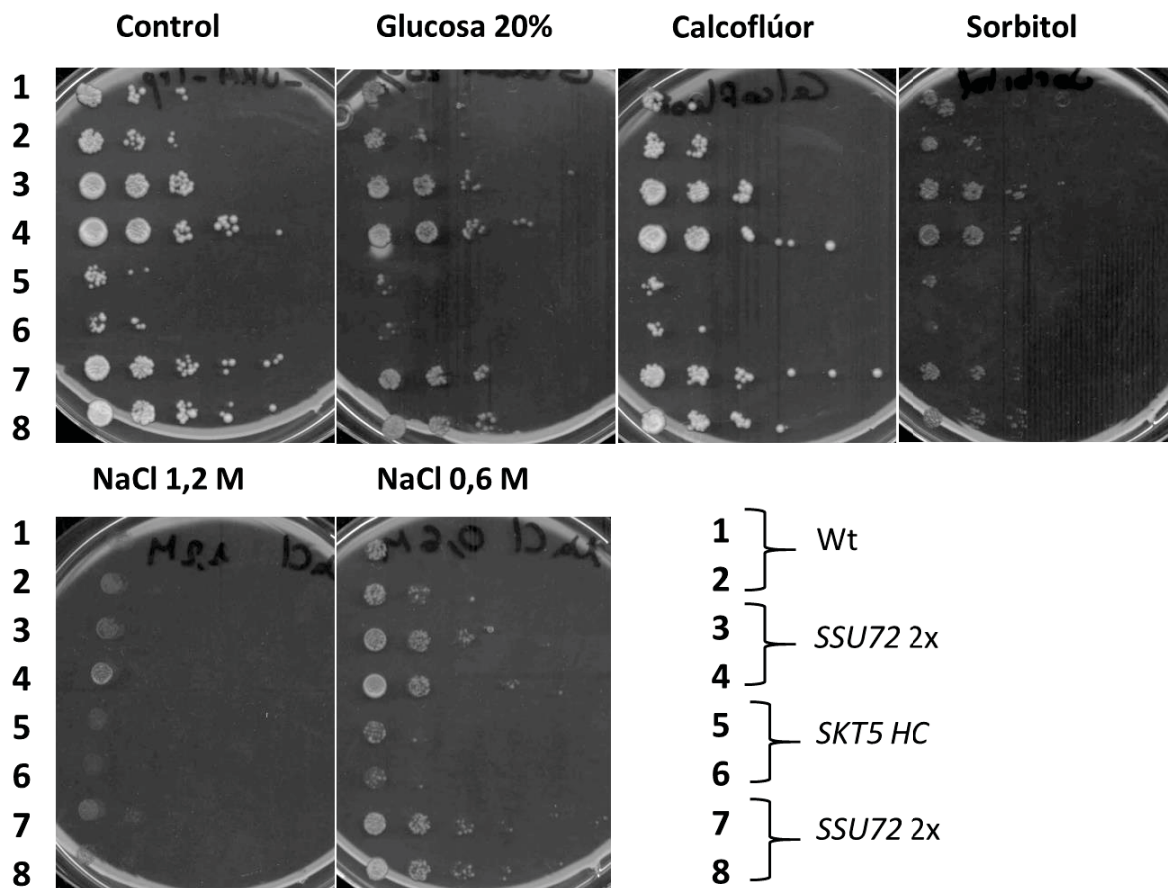


Figura 6. Diluciones seriadas en placas con medios CM-Ura-Trp y diferentes tipos de estrés de las cepas YMFM2, YMFM3 e YMFM8 cultivadas durante 72 h a 30°C. Las muestras 1 y 2 se corresponden con la cepa silvestre, las muestras 3, 4, 7, 8 con la cepa con dos copias de *SSU72* y las muestras 5 y 6 con la cepa que sobreexpresa *SKT5*.

Como se aprecia en la figura 6, las situaciones de estrés a las que sometimos a las células provocan, en general, un menor crecimiento comparado con el de la placa control; en medio sin estrés. En el medio no tratado, la cepa con doble copia de *SSU72* es la que presenta un mayor crecimiento, mientras que la cepa que sobreexpresa *SKT5* tiene un crecimiento menor a la silvestre.

La cepa con doble copia de *SSU72* (de la que se analizaron cuatro colonias independientes), es la que mejor crece en los casos con estrés y en el control. Cabe destacar que en los medios con calcoflúor y sorbitol ve menos afectado su crecimiento que las demás cepas (se parecía un buen crecimiento al menos hasta la tercera dilución). El medio con sorbitol redujo mucho el

crecimiento, especialmente al sobreexpresar *SKT5*, que prácticamente no tiene crecimiento en este medio, ni tampoco en el medio rico en glucosa al 20%. Este mismo medio también parece afectar bastante al crecimiento de la cepa silvestre, al igual que el medio con NaCl 0,6 M, en el cuál llega a reducirse hasta llegar a igualar a la cepa que sobreexpresa *SKT5*, que a pesar de ser la que menos crece no muestra una reducción tan marcada con respecto al control, en comparación con las otras cepas. En el medio con NaCl 1,2 M se observó un crecimiento mínimo en las tres cepas.

En suma, tras este primer análisis fenotípico pudimos comprobar defectos de crecimiento relacionados con la osmolaridad (en glucosa, sorbitol y NaCl) y con la integridad de la pared celular en medio con calcoflúor. La presencia de una copia extra de *SSU72* supone una ventaja en las células sometidas a ambos tipos de estrés. Si bien el crecimiento al sobreexpresar *SKT5* ya es menor que el Wt sin tratamiento, parece que en glucosa y sorbitol esta diferencia con la cepa silvestre se ve algo más acentuada porque no crece nada ya en la primera dilución.

## 4.2 Comprobación del efecto del número de copias de *SSU72* y *SKT5* en aspectos relacionados con la pared celular.

Una vez comprobados los fenotipos de crecimiento en respuesta a los tipos de estrés causados por la sobreexpresión de *SSU72* y *SKT5*, decidimos estudiar su efecto a nivel celular. Decidimos analizar el efecto de los tratamientos con calcoflúor y NaCl 0,6 M en la fase logarítmica de la curva de crecimiento para observar las variaciones en la capacidad de resistencia a tipos de estrés.

### 4.2.1 Determinación de los tiempos de acción de Calcoflúor y NaCl.

Se comenzó determinando experimentalmente los tiempos de acción del calcoflúor y NaCl para asegurar la presencia de cambios observables en las células mediante microscopía. Para ello, se recogieron muestras tras 15 min, 30 min y 60 min en cultivos líquidos (10 mL) modificados según se indica en la sección de métodos. Los mejores resultados se obtuvieron con tiempos de incubación de 30 min, puesto que con tiempos de incubación de 15 min los cambios eran menos claros y con 60 min el número de células o bien disminuía drásticamente, o bien daba lugar a agregados difíciles de interpretar mediante microscopía (Figura 7)





Figura 7. Agregados formados tras dejar crecer las células del control en medio con calcoflúor durante 1 h.

#### 4.2.2 Curvas de crecimiento para el posterior análisis por microscopía.

A fin de comprobar y comparar el efecto de los tratamientos que afectan a la integridad de la pared celular y la osmolaridad, en las células que expresan dos copias de *SSU72* o sobreexpresan *SKT5*, se siguió el siguiente esquema de trabajo (Figura 8).

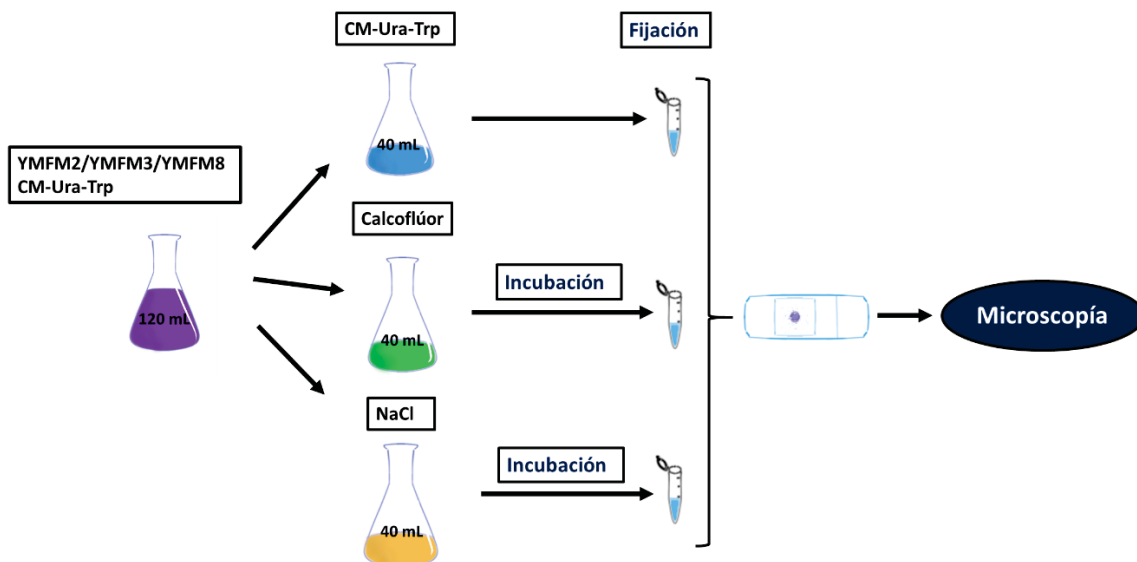


Figura 8. Esquema de trabajo seguido. Se partió de los cultivos de cada una de las muestras (120 mL), que se dividieron en tres cultivos de menor volumen (40 mL). A estos cultivos más pequeños se le añadieron calcoflúor y NaCl, para observar los efectos de estos agentes en la integridad de la pared

celular y para conocer el efecto de la osmolaridad en las cepas transformadas. A partir de estos cultivos se obtuvieron las muestras para el análisis morfológico y a partir de los cultivos CM-Ura-Trp se midieron las absorbancias hasta las 24 h para las curvas de crecimiento.

Para el estudio por microscopía de los efectos de los tratamientos en fase logarítmica, se hizo un seguimiento de los cultivos de los que se tomaron las células. Las curvas se muestran en la figura 9. Los cultivos se inocularon a partir de un precultivo (crecido toda la noche) hasta obtener una absorbancia a 600 nm ( $A_{600}$ ) próxima a 0,15. A partir de aquí se fueron tomando muestras cada 2 h hasta alcanzar un valor  $A_{600}$  de 0,4 a 0,6.

En la figura, se observa el crecimiento de las tres cepas durante el experimento. Además, dado que la cepa que YMF3, que sobreexpresa SKT5, tenía un crecimiento más lento, se extendió el tiempo de cultivo hasta las 24 h (Figura 9B) para comprobar que, como ya se podía intuir por el crecimiento en placa, el cultivo líquido mostraba también peor crecimiento.

Como se puede apreciar en la figura, durante las primeras medidas, no se observaron grandes diferencias entre ninguna de las cepas. Las primeras diferencias comenzaron a observarse en la cepa que sobreexpresa *SKT5*, a partir de las 6h, manteniendo un crecimiento más lento respecto a las otras dos líneas que se mantuvo hasta la última medida, a las 24h. Las cepas silvestre y con dos copias de *SSU72* presentaron un crecimiento muy similar, al igual que ocurrió con las diluciones seriadas crecidas en placa. Este último resultado, indica que la presencia de una copia extra del gen *SSU72* no afecta negativamente a la capacidad de crecimiento de los cultivos. Por otro lado, la sobreexpresión de *SKT5* reduce la capacidad de crecimiento, efecto que comienza a ser apreciable desde la fase logarítmica (Figura 9). Esto último coincide con los datos obtenidos anteriormente, en los que se observó una reducción del crecimiento al sobreexpresar *SKT5* junto a un incremento de la síntesis de quitina (Mejuto-González, 2017) y con nuestros resultados de crecimiento en placa (Figura 6).

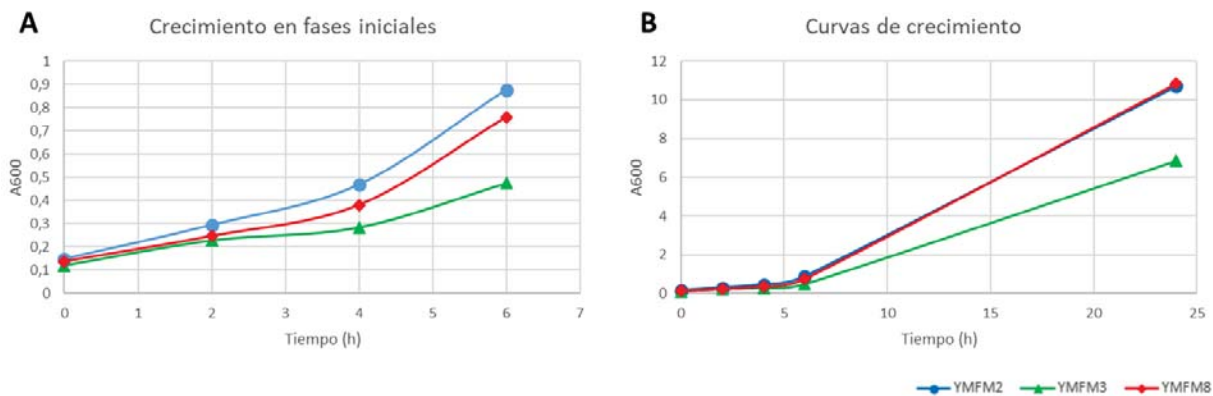


Figura 9. Curvas de crecimiento de las tres cepas. Se observa un crecimiento similar entre las cepas silvestre y con doble copia de *SSU72*, aunque en el caso de la cepa silvestre parece que el crecimiento es algo mayor en las primeras fases del crecimiento. Durante esta etapa se ve que el crecimiento de la cepa YMF3, que sobreexpresa *SKT5* en alto número de copias, tiene un crecimiento más reducido, especialmente desde las 2h tras inocular el cultivo (A). Esta tendencia se mantiene hasta la última medida, a las 24h (B).

#### 4.4 Efectos observados a nivel celular.

El escrutinio inicial de las células al microscopio permitió detectar variaciones en las áreas y morfologías celulares que decidimos analizar en detalle.

##### 4.4.1 Efecto de la sobreexpresión de *SSU72* y *SKT5* en las áreas celulares.

Tras analizar y fotografiar células, de cada cepa se analizó el mismo número de células (n=150). Primero se muestran las variaciones entre cepas sin tratamiento y posteriormente el efecto de los tratamientos para cada una.

Inicialmente, se compararon las áreas entre cada una de las cepas no tratadas (Figura 10). Se observaron diferencias significativas en la cepa las células que sobreexpresan *SKT5* (cepa YMF3), pero no entre las cepas Wt (YMF2) y con doble copia de *SSU72* (YMF8), entre las que el análisis de varianza (ANOVA) no muestra diferencias significativas.

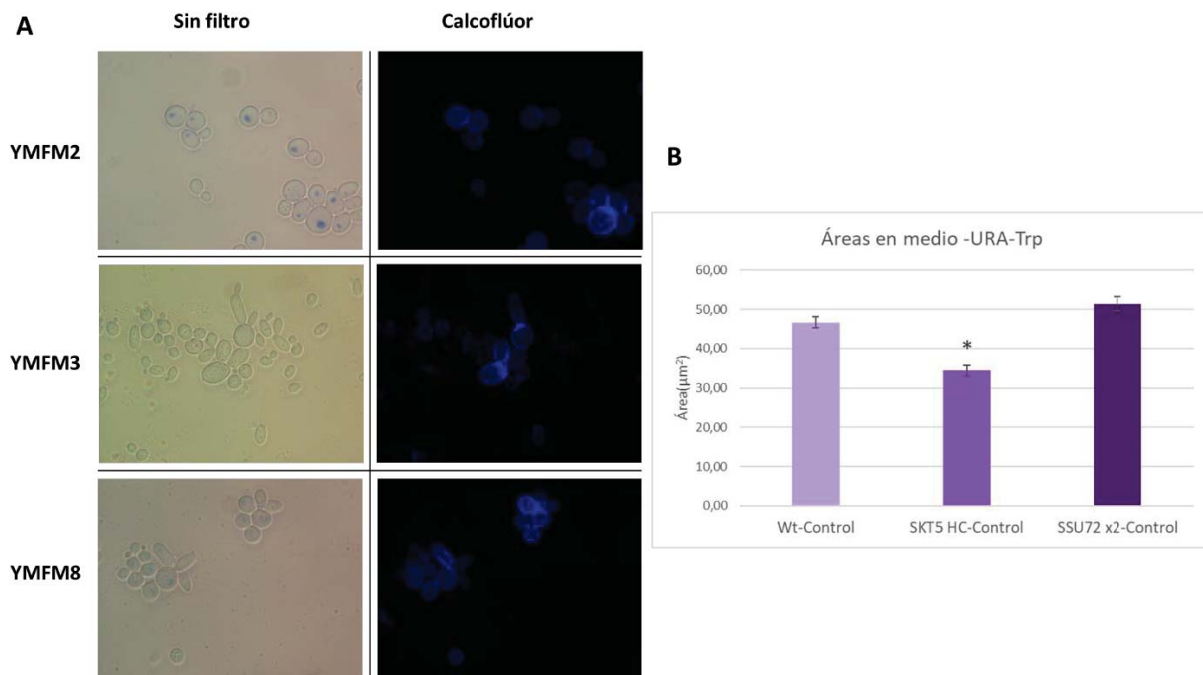


Figura 10. Imágenes de los controles, en medio CM-Ura-Trp de las tres cepas, sin filtro a la derecha, y con filtro DAPI, a la izquierda, dónde se puede observar la quitina de la pared (A). Gráfica con las medias y varianzas del área celular para los controles de las tres cepas. Se observan diferencias significativas en la cepa que sobreexpresa *SKT5*, con un área menor que el control (\* $p < 0,05$ ).

Por tanto, podemos concluir que la sobreexpresión de *SKT5* afecta negativamente no sólo al crecimiento celular, sino más concretamente, da lugar a una reducción del tamaño celular.

#### 4.4.2 Efectos de los tratamientos en cada cepa.

Se observaron células de las tres cepas en medios sin tratamiento, calcoflúor y NaCl 0,6 M, y se midieron las áreas celulares en cada una de las cepas con un  $n=150$  para cada una.

**-Cepa silvestre:** Se encontraron diferencias significativas con el control tanto en el medio con calcoflúor como en el medio con NaCl (Figura 11). En ambos casos, el área es menor que en el control y ambos medios causan una reducción en las áreas muy similar.

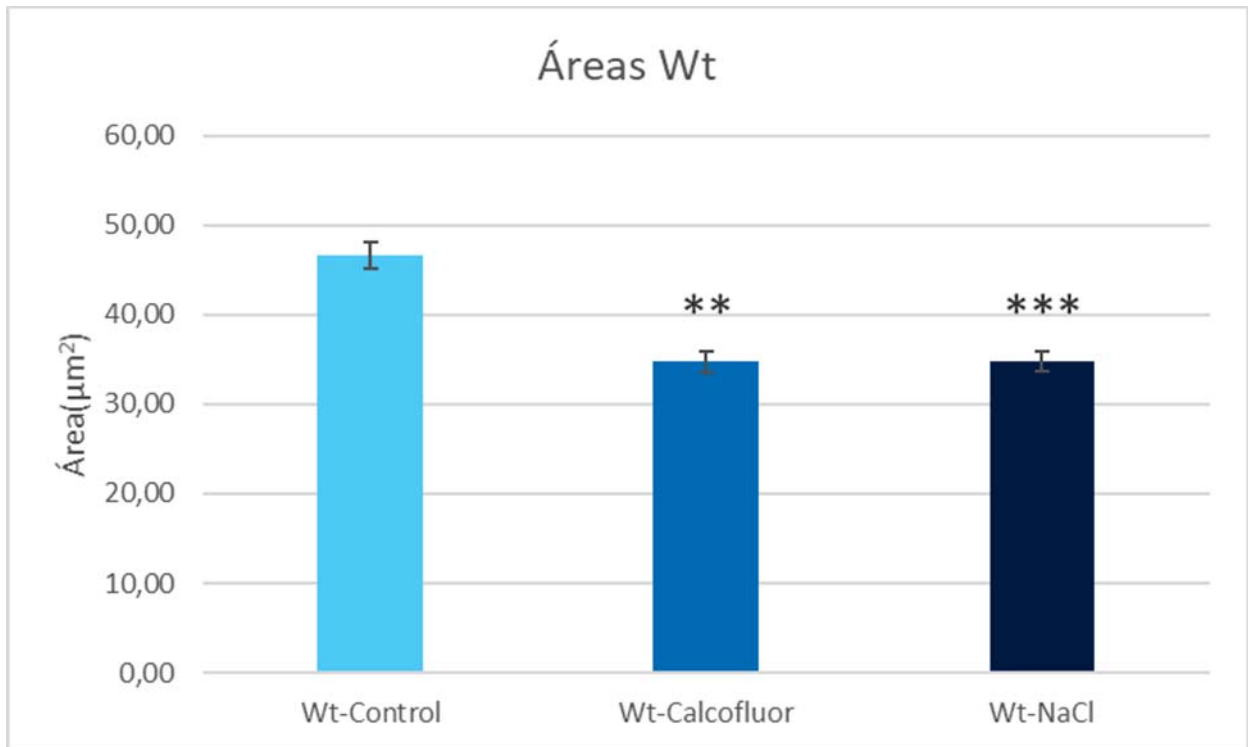


Figura 11. Pueden observarse cambios significativos con respecto a las áreas del control, tanto en las células en medio con calcoflúor como en las incubadas en medio con NaCl 0,6 M (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

-**SKT5 HC**: Se encontraron diferencias significativas en ambos medios. En este caso, las células presentaron áreas más pequeñas en el medio con calcoflúor y mayores que en el control en el medio con NaCl (Figura 12). Por tanto, la sobreexpresión de *SKT5* afecta tanto a la integridad de la pared como a la osmolaridad. Es probable, que *SKT5* esté implicado en la regulación de la osmolaridad, dado que se observó un mayor tamaño celular en el medio con NaCl que no aparece en la cepa silvestre, mientras que las células continúan siendo sensibles al calcoflúor. Si bien, este cambio podría atribuirse al aumento en la síntesis de quitina observada previamente (Mejuto-González, 2017), parece poco probable porque no explicaría la menor área en el medio con calcoflúor.

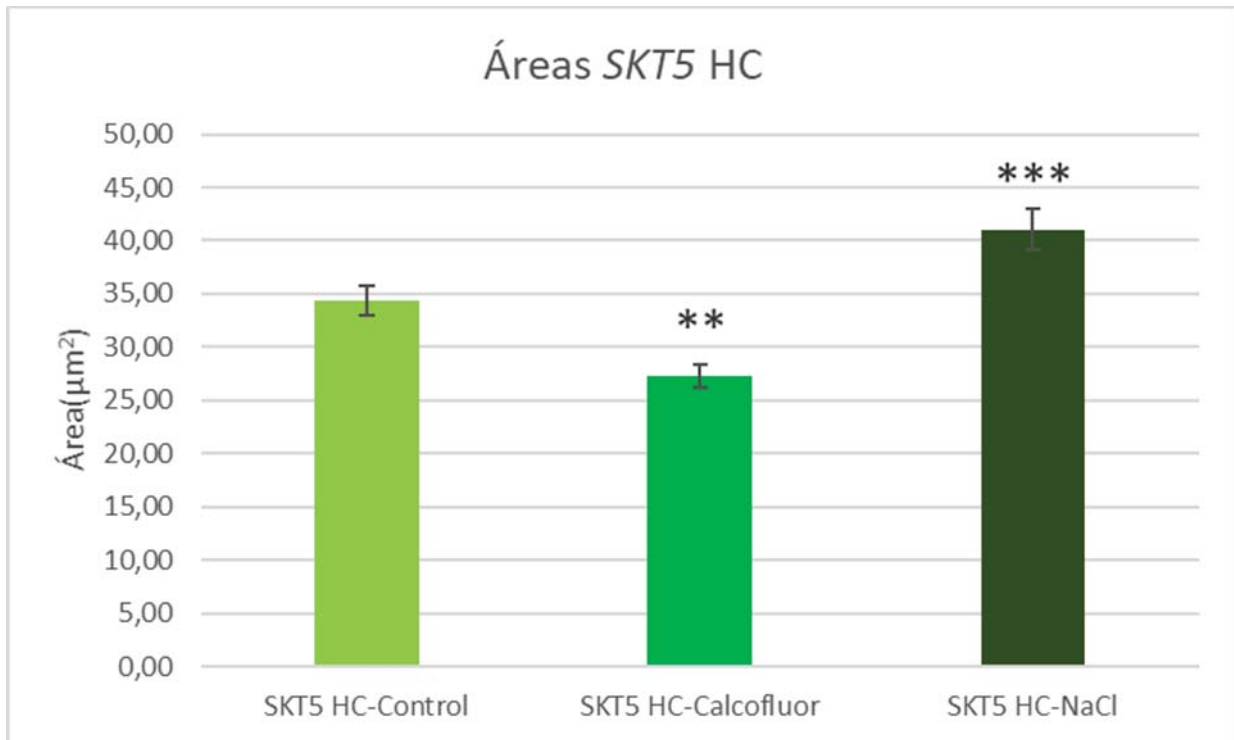


Figura 12. Al medir las áreas se observaron cambios significativos con respecto al control en los dos medios utilizados. En el medio con calcoflúor las áreas fueron significativamente menores (\*\* $p < 0,01$ ), mientras que en el medio con NaCl éstas fueron mayores (\*\* $p < 0,001$ ).

-*SSU72 x2*: En esta línea se encontraron diferencias significativas con el control en el medio con calcoflúor. Esto nos indica que la copia extra de *SSU72* está afectando a la capacidad de crecimiento de células individuales (Figura 13). Dado que el calcoflúor afecta a la integridad de la pared celular, la mayor resistencia a este compuesto podría deberse a una alteración en la pared relacionada con la quitina. Otra posible explicación sería que *SSU72* afecte a la ruta HOG, necesaria para la sensibilidad al calcoflúor. Cuando esta ruta se inactiva, las células pueden hacerse resistentes al calcoflúor, mientras que la resistencia basal a las sales disminuye (García-Rodríguez et al., 2000). Esto también coincidiría con los datos observados en el análisis de fenotipos, en los que la cepa con doble copia de *SSU72* parece ser más resistente al calcoflúor. Si esto fuera así, sería probable que *SSU72* y *SKT5* tengan roles opuestos en la osmorregulación y remodelación de la pared, lo que explicaría también la menor reducción en el crecimiento de la cepa que sobreexpresa *SKT5* en la placa con NaCl 0,6 M.

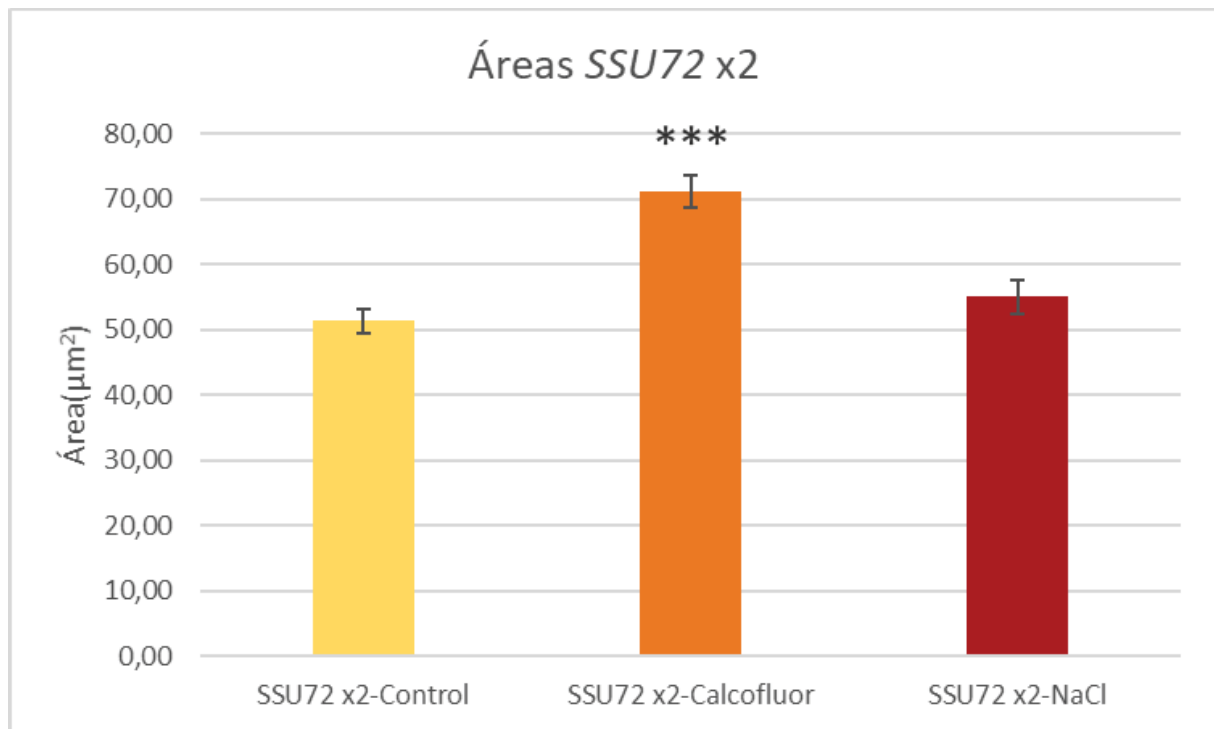


Figura 13. Al comparar las áreas de esta cepa en los diferentes medios se observó un aumento significativo en el medio con calcofúor (\*\* $p < 0,001$ ), mientras que en el medio con NaCl no se observaron cambios con respecto al control.

#### 4.4.3 Efecto de la sobreexpresión de *SSU72* y *SKT5* en la morfología celular.

Además del tamaño celular, se apreciaron una serie de alteraciones morfológicas que decidimos estudiar. Se analizaron diversas características relacionadas con la morfología de las células y las yemas para cada una de las cepas en los diferentes medios. Para ello, se hicieron recuentos con un n de 150 para cada muestra en el caso de las células, y con las yemas que se encontraron durante el análisis de esas 150 células (n mínimo de 65 para las yemas) y se utilizaron porcentajes del número total de células y del número total de yemas.

Los datos observados fueron, para las células, la presencia de células con morfología alargada, células abiertas, con tabiques deslocalizados o con más de una yema en la misma célula. Para las yemas, se contabilizaron yemas con morfologías alargadas; con morfología irregular; yemas laterales, yemas ramificadas una única vez o con más de una ramificación y yemas sin constricción (Figura 16). Para determinar estas categorías se tuvo en cuenta que estas características fuesen claramente observables en las imágenes obtenidas.

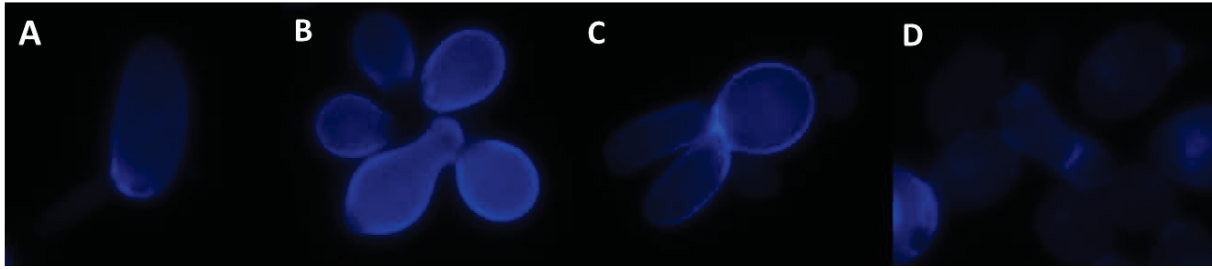


Figura 14. Imágenes de las diferentes morfologías encontradas en las células. Célula con morfología alargada (A). Células abiertas (B). Célula con más de una yema (C). Célula con un tabique deslocalizado (D).

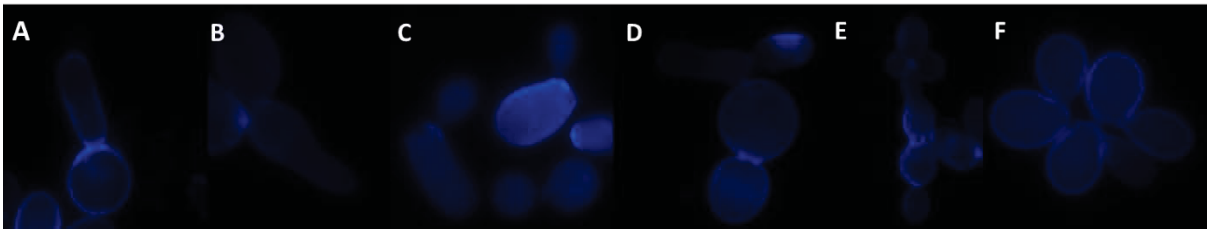


Figura 15. Morfologías observadas en las yemas. Morfología alargada (A). Amorfa (B). Localización lateral (C). Ramificadas, una vez (D) o varias (E). Sin cuello (F).

En la figura 16 se muestra una comparativa de los gráficos con los porcentajes de alteraciones concretas en las tres cepas, mientras que en la figura 17 se comparan los resultados obtenidos al observar las yemas.



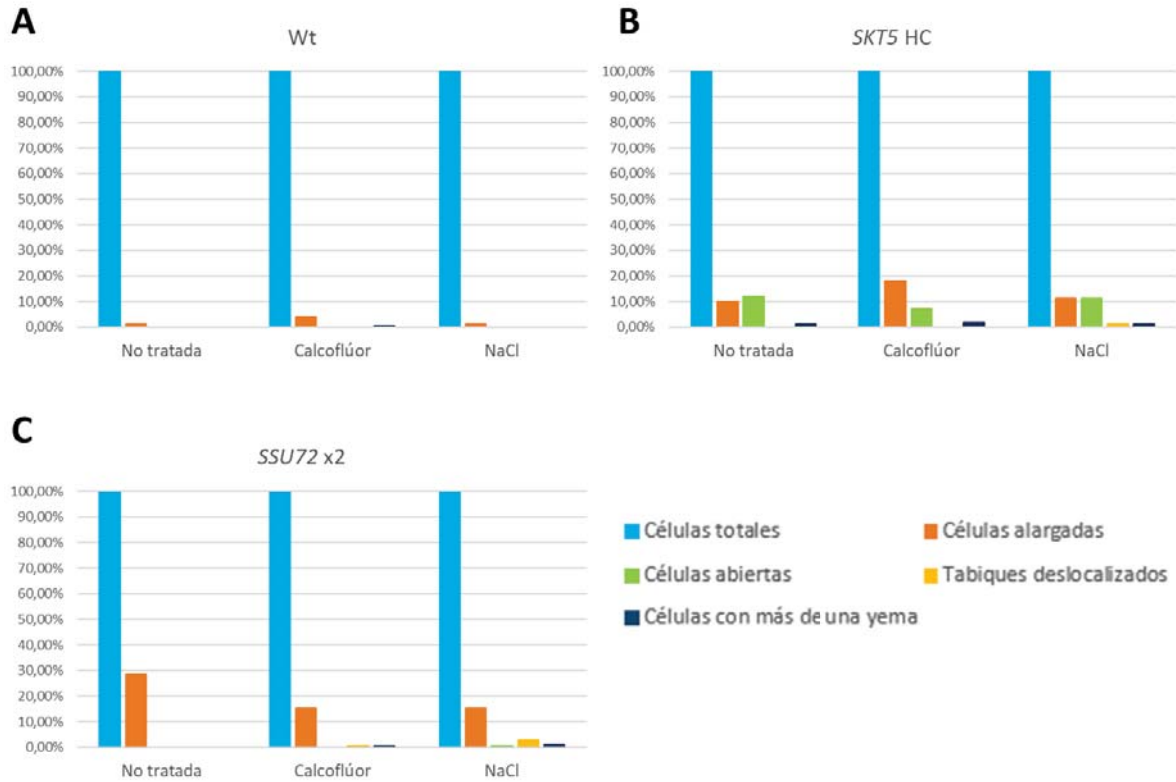


Figura 16. Gráficas con los porcentajes de las diferentes alteraciones en la morfología celular observadas en cada una de las cepas.

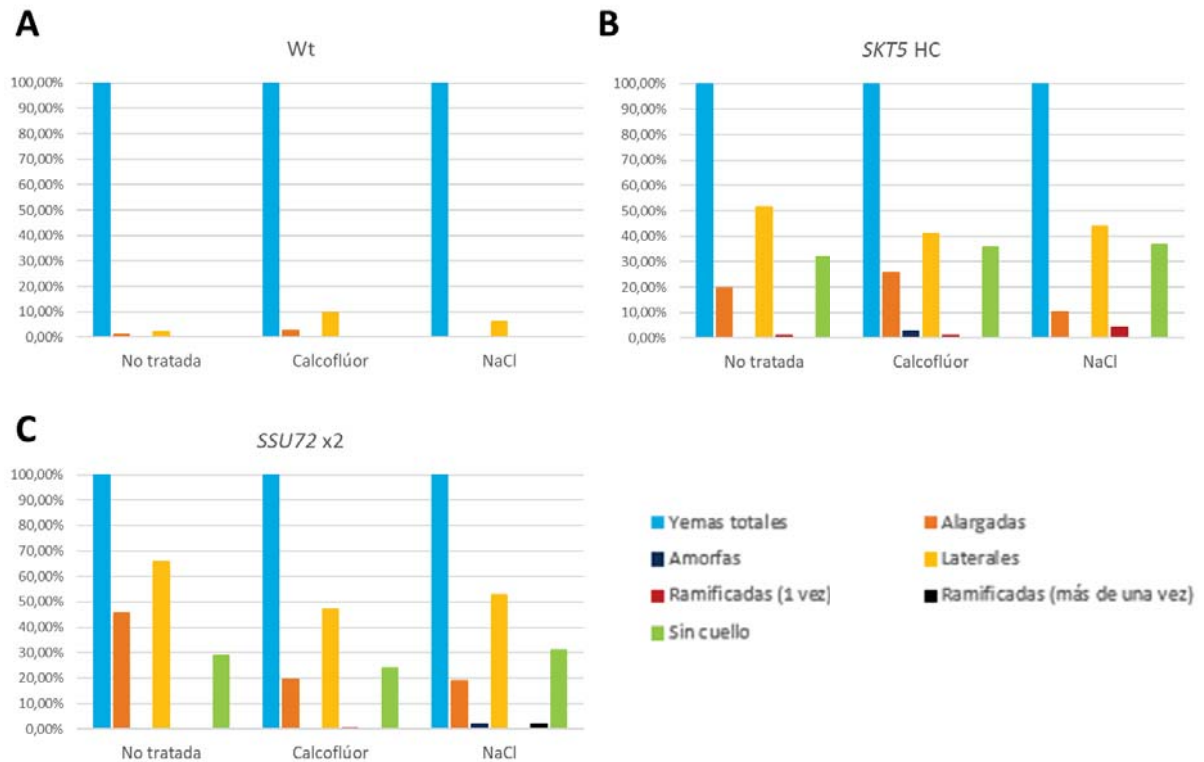


Figura 17. Gráficas con los porcentajes obtenidos al hacer los recuentos de las diferentes morfologías observadas en las yemas de cada cepa.

En las células silvestres prácticamente no se encontraron morfologías fuera de lo habitual, como era de esperar. En algunos casos aparecieron un bajo número de células y yemas alargadas (Figura 14A, 15A), también algunas yemas laterales, es decir, yemas que no crecen siguiendo la polaridad de la célula a partir de la que se originan (Figura Figura 15C). Adicionalmente, aparecieron algunas células con más de una yema (Figura 15D), pero en valores residuales. En todos los casos parece que estas morfologías, fuera de lo esperado en la cepa silvestre, aumentan en las células incubadas en medio con calcoflúor o NaCl.

La cepa que sobreexpresa *SKT5* en alto número de copias presentó diferencias claras con respecto a la cepa silvestre. Los porcentajes de células alargadas fueron de más del doble, y en el caso de las yemas alargadas esta proporción fue aún mayor. En estas células se encontraron casos de células abiertas\_(alrededor del 7-12%), es decir, células en las que parece faltar la quitina en uno de los lados de la pared (Figura 14B). Esto podría ser un artefacto del microscopio, pero parece que en muchos casos estas zonas coinciden con las zonas de la pared que estaban unidas a la célula madre durante la gemación. En este caso, aparece un mayor porcentaje de yemas sin cuello (Figura 15F), en las que el cuello no está bien formado y la yema y la célula madre quedan conectadas. La presencia de células abiertas podría deberse a algún cambio en los mecanismos de reparación de las cicatrices que quedan tras la gemación y de formación del *septum*, relacionados con la actividad de Chs1 y Chs2, mientras que las yemas en las que el cuello no se forma correctamente podrían deberse a cambios en la regulación de Chs3 para la formación del anillo de quitina, lo que indicaría que *SKT5* tiene un papel en la citocinesis. También aumenta mucho en comparación con la cepa silvestre el porcentaje de yemas laterales (40-50%). Siguen apareciendo células con más de una yema, pero los valores son muy bajos, aunque en esta cepa también aparecen en el medio CM-Ura-Trp. No parece haber grandes diferencias entre los diferentes medios. Podría considerarse que tanto en el medio con calcoflúor como en el medio con NaCl el porcentaje de yemas alargadas es algo menor. Estos resultados coinciden con los obtenidos en trabajos anteriores, en los que se observan estos cambios en la morfología celular y en la posición de las yemas al sobreexpresar *SKT5*.

En la cepa que con doble copia de *SSU72* (YMF8) se encontraron porcentajes altos de células alargadas, incluso algo mayores que en la cepa que sobreexpresa *SKT5*. El número de yemas con morfología alargada aumenta bastante en el medio control, al igual que la presencia de yemas laterales, que asciende a más de la mitad de las yemas de esa muestra. Continúan apareciendo yemas sin constricción, en porcentajes similares a la cepa anterior. En este caso, ya no aparecen células sin quitina en alguna zona de la pared. En los medios con calcoflúor o

NaCl parece haber una reducción en el número de células y yemas alargadas, también de yemas laterales. También aparecen algunas células con tabiques deslocalizados, sin que haya gemación (Figura 14D) y células con más de una yema (Figura 15C), aunque ambos porcentajes son muy bajos.

Los resultados obtenidos indican que la presencia de copias adicionales de *SSU72* y *SKT5* causan cambios tanto en la morfología de la célula madre como en las yemas. Esto sugiere que la estequiometría de estos dos factores implicados en la síntesis de quitina, tanto en el cuello como en la yema, es importante para definir la forma y para una correcta citocinesis. Por otro lado, nuestros datos en medios con calcoflúor muestran, sin duda, la implicación de *SSU72* en la integridad de la pared celular.

Los cambios en los niveles de expresión de *SSU72* y *SKT5* dieron lugar, en ambas cepas, a la presencia de células madre y yemas alargadas, cambios en la posición de las yemas y a cambios en la formación del cuello que une a las células madre con las yemas. Esto sugiere que las dos proteínas están relacionadas con la gemación al regular a las diferentes quitina sintasas (no únicamente a *Chs3*) y que afectan a la polaridad celular, dando lugar a yemas en posiciones fuera de lo habitual. También cabría la posibilidad de que estas proteínas afecten a la actividad de las septinas, que anteriormente ya se ha relacionado con cambios en la longitud celular (Gladfelter et al., 2004).

No descartamos que los cambios se deban a mecanismos de regulación en los que participan proteínas diferentes para cada caso, de manera que los cambios sean independientes, a pesar de que la manera en que afectan a la morfología sea parecida.

Finalmente, las diferentes respuestas a calcoflúor y NaCl sugieren que la función de *SSU72* y *SKT5* en la gemación y en la regulación e integridad de la pared celular son independientes, dado que al medir las áreas sí se encontraron diferencias en función del medio.

## 4. Conclusiones

Las principales conclusiones del presente trabajo son:

- 1- El estudio del crecimiento en medios con estrés que afectan a la osmorregulación e integridad de la pared celular mostraron que el aumento del número de copias, tanto de *SSU72* como de *SKT5* causan defectos de crecimiento.
- 2- La presencia de una copia extra de *SSU72* hace que la cepa YMF8 sea más resistente al calcoflúor que la cepa silvestre. Al sobreexpresar *SKT5* se observa el efecto contrario.
- 3- El análisis de células en fase logarítmica sometidas a estrés osmótico y calcoflúor muestran que la sobreexpresión de *SSU72* y *SKT5* dan lugar a cambios en el área y la morfología celular.
- 4- Podemos concluir que ambos genes además de afectar a la síntesis de quitina en el cuello de la célula, afectan a la citocinesis, a la integridad de la pared celular y a la osmorregulación.

## Conclusions

The main conclusions of this work are:

- 1- Cell growth study in media affecting osmorregulation and cell-wall integrity showed that an increase in copy number in both *SSU72* and *SKT5* lead to growth defects.
- 2- The presence of an extra-copy of *SSU72* turns the strain YMF8 more resistant to calcofluor than wild type. While overexpressing *SKT5* causes the opposite effect.
- 3- Logarithmic phase analysis in cells subjected to osmotic stress and calcofluor showed that *SSU72* and *SKT5* overexpression produces changes in cellular area and morphology.
- 4- We can conclude that both genes, in addition to affect chitin synthesis in mother cell's neck, are also involved in cytokinesis, cell-wall integrity and osmorregulation.

## Conclusões

As principais conclusões do presente trabalho são:

1- O estudo do crecemento en emdios con estrés que afectan á osmorregulación e integridade da parede celular mostraron que o aumento do número de copias, tanto de *SSU72* como de *SKT5* causan defectos do crecemento.

2- A presenza dunha copia extra de *SSU72* fai que a cepa YMFM8 sexa máis resistente ao calcoflúor que a cepa silvestre. Ao sobreexpresar *SKT5* obsérvase o efecto contrario.

3- A análise de células en fase logarítmica sometidas a estrés osmótico e calcoflúor mostran que a sobreexpresión de *SSU72* e *SKT5* dan lugar a cambios na área e morfoloxía celular.

4- Podemos concluir que ambos xenes, ademáis de afectar a síntese de quitina no colo da célula, tamén afectan á citocinese, a integridade da parede celular e á osmorregulación.

## Bibliografía

- Allepuz-Fuster, P., O'Brien, M. J., González-Polo, N., Pereira, B., Dhoondia, Z., Ansari, A., & Calvo, O. (2019). RNA polymerase II plays an active role in the formation of gene loops through the Rpb4 subunit. *Nucleic Acids Research*, *47*(17), 8975–8987.
- Ansari, A., & Hampsey, M. (2005). A role for the CPF 3' -end processing machinery in RNAP II-dependent gene looping. *Genes and Development*, *19*(24), 2969–2978.
- Bertin, A., McMurray, M. A., Pierson, J., Thai, L., McDonald, K. L., Zehr, E. A., García, G., Peters, P., Thorner, J., & Nogales, E. (2012). Three-dimensional ultrastructure of the septin filament network in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, *23*(3), 423–432.
- Botstein, D., Falco, S. C., Stewart, S. E., Brennan, M., Scherer, S., Stinchcomb, D. T., Struhl, K., & Davis, R. W. (1979). Sterile host yeasts (SHY): A eukaryotic system of biological containment for recombinant DNA experiments. *Gene*, *8*(1), 17–24.
- Bullock, W., Fernández, J. M., & Short, J. M. (1987). XL1-Blue, high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with  $\beta$ -galactosidase section. *Bio Techniques*, *5*, 376–379.
- Cabib, E., & Durán, A. (2005). Synthase III-dependent chitin is bound to different acceptors depending on location on the cell wall of budding yeast. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(10), 9170–9179.
- Carlson, M., Osmond, B. C., & Neigeborn, L. (1984). a Suppressor of Snfi Mutations Causes Yeast. *Genetic Analysis*, 19–32.
- Chen, D. C., Yang, B. C., & Kuo, T. T. (1992). One-step transformation of yeast in stationary phase. *Current Genetics*, *21*(1), 83–84.
- DeMarini, D. J., Adams, A. E. M., Fares, H., De Virgilio, C., Valle, G., Chuang, J. S., & Pringle, J. R. (1997). A septin-based hierarchy of proteins required for localized deposition of chitin in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Journal of Cell Biology*, *139*(1), 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.

- Dragosits, M., Stadlmann, J., Graf, A., Gasser, B., Maurer, M., Sauer, M., Kreil, D. P., Altmann, F., & Mattanovich, D. (2010). The response to unfolded protein is involved in osmotolerance of *Pichia pastoris*. *BMC Genomics*, *11*(1), 1–16.
- Ganem, C., Devaux, F., Torchet, C., Jacq, C., Quevillon-Cheruel, S., Labesse, G., Facca, C., & Faye, G. (2003). Ssu72 is a phosphatase essential for transcription termination of snoRNAs and specific mRNAs in yeast. *EMBO Journal*, *22*(7), 1588–1598.
- García-Rodríguez, L. J., Durán, A., & Roncero, C. (2000). Calcofluor antifungal action depends on chitin and a functional high- osmolarity glycerol response (HOG) pathway: Evidence for a physiological role of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG pathway under noninducing conditions. *Journal of Bacteriology*, *182*(9), 2428–2437.
- García, R., Rodríguez-Peña, J. M., Bermejo, C., Nombela, C., & Arroyo, J. (2009). The high osmotic response and cell wall integrity pathways cooperate to regulate transcriptional responses to zymolyase-induced cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(16), 10901–10911.
- Gladfelter, A. S., Zyla, T. R., & Lew, D. J. (2004). Genetic interactions among regulators of septin organization. *Eukaryotic Cell*, *3*(4), 847–854.
- Haering, C. H., Löwe, J., Hochwagen, A., & Nasmyth, K. (2002). Molecular Architecture of SMC Proteins and the Yeast Cohesin Complex C-terminal domains forming a head would be part of. *Molecular Cell*, *9*, 773–788.
- Jeronimo, C., Collin, P., & Robert, F. (2016). The RNA Polymerase II CTD: The Increasing Complexity of a Low-Complexity Protein Domain. *Journal of Molecular Biology*, *428*(12), 2607–2622.
- 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., & Lee, C. W. (2010). The hsSsu72 phosphatase is a cohesin-binding protein that regulates the resolution of sister chromatid arm cohesion. *EMBO Journal*, *29*(20), 3544–3557.
- Kim, H. S., Fernandes, G., & Lee, C. W. (2016). Protein phosphatases involved in regulating mitosis: Facts and hypotheses. *Molecules and Cells*, *39*(9), 654–662.
- Kim, H. S., Kim, S. H., Park, H. Y., Lee, J., Yoon, J. H., Choi, S., Ryu, S. H., Lee, H., Cho, H. S., & Lee, C. W. (2013). Functional interplay between Aurora B kinase and Ssu72

- phosphatase regulates sister chromatid cohesion. *Nature Communications*, 4.
- Klis, F. M., Boorsma, A., & De Groot, P. W. J. (2006). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 23(3), 185–202.
- Kock, C., Dufrêne, Y. F., & Heinisch, J. J. (2015). Up against the wall: Is yeast cell wall integrity ensured by mechanosensing in plasma membrane microdomains? *Applied and Environmental Microbiology*, 81(3), 806–811.
- 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.
- Lamas-Maceiras, M., Singh, B. N., Hampsey, M., & Freire-Picos, M. A. (2016). Promoter-terminator gene loops affect alternative 3'-End Processing in Yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 291(17), 8960–8968.
- Lesage, G., & Bussey, H. (2006). Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(2), 317–343.
- Levin, D. E. (2005). Cell Wall Integrity Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(2), 262–291.
- Levin, D. E. (2011). Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: The cell wall integrity signaling pathway. *Genetics*, 189(4), 1145–1175.
- Lorenzo-Rodríguez, M. (2019). Estudio ultraestructural de los efectos de *SKT5* en la producción de quitina en *Saccharomyces cerevisiae*. Facultad de ciencias, Universidade da Coruña.
- Mejuto-González, M. (2017). Efecto del número de copias en la capacidad del gen *SKT5* de suprimir mutaciones de *SSU72*. Facultad de Ciencias, Universidade da Coruña.
- Orlean, P. (2012). Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Genetics*, 192(3), 775–818.
- Pappas, D. L., & Hampsey, M. (1996). Functional interaction between Ssu72 and the Rpb2 Subunit of RNA Polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 24(13), 2560–2566.
- Park, H. S., Choi, S. J., Park, N. H., Kim, C. H., Kim, S. U., & Choi, W. (2002). Identification of a domain in yeast chitin synthase 3 interacting with chitin synthase 4 by two-hybrid



- analysis. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12(6), 943–949.
- Reyes, A., Sanz, M., Duran, A., & Roncero, C. (2007). Chitin synthase III requires Chs4p-dependent translocation of Chs3p into the plasma membrane. *Journal of Cell Science*, 120(12), 1998–2009.
- 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.
- Rogg, L. E., Fortwendel, J. R., Juvvadi, P. R., & Steinbach, W. J. (2012). Regulation of expression, activity and localization of fungal chitin synthases. *Medical Mycology*, 50(1), 2–17.
- Shaw, J. A., Mol, P. C., Bowers, B., Silverman, S. J., Valdivieso, M. H., Duran, A., & Cabib, E. (1991). The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Journal of Cell Biology*, 114(1), 111–123.
- Silverman, S. J., Sburlati, A., Slater, M. L., & Cabib, E. (1988). Chitin synthase 2 is essential for septum formation and cell division in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(13), 4735–4739.
- Steinmetz, E. J., & Brow, D. A. (2003). Ssu72 Protein Mediates Both Poly(A)-Coupled and Poly(A)-Independent Termination of RNA Polymerase II Transcription. *Molecular and Cellular Biology*, 23(18), 6339–6349.
- Sun, Z. W., & Hampsey, M. (1996). Synthetic enhancement of a TFIIB defect by a mutation in SSU72, an essential yeast gene encoding a novel protein that affects transcription start site selection in vivo. *Molecular and Cellular Biology*, 16(4), 1557–1566.
- Trilla, J. A., Cos, T., Duran, A., & Roncero, C. (1997). Characterization of CHS4 (CAL2), a gene of *Saccharomyces cerevisiae* involved in chitin biosynthesis and allelic to SKT5 and CSD4. *Yeast*, 13(9), 795–807.
- Udom, N., Chansongkrow, P., Charoensawan, V., & Auesukaree, C. (2019). Coordination of the cell wall integrity and highosmolarity glycerol pathways in response to ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(15), 1–16.
- 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.

Zhang, N., Jiang, Y., Mao, Q., Demeler, B., Tao, Y. J., & Pati, D. (2013). Characterization of the Interaction between the Cohesin Subunits Rad21 and SA1/2. *PLoS ONE*, 8(7).

**Abreviaturas del tema:**

**CTD:** Extremo Carboxilo Terminal de la subunidad mayor de la RNA polimerasa II.

**HOG:** *High osmolarity glycerol*.

**CWI:** *Cell Wall Integrity*.

**Wt:** *wild type* (silvestre).