

FACULTAT DE VETERINARIA
UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA

**Clonación y caracterización
de un nuevo tipo de proteína fosfatasa
en levadura**



Antonio Casamayor Gracia

Setiembre 1992

5. INTERRUPCION DEL GEN *PPZ1*.

5.1. CONSTRUCCIONES UTILIZADAS.

Un método sencillo para comprobar la función de un gen consiste en alterarlo, para después estudiar diferentes fenotipos de las cepas portadoras de la mutación y compararlos con los que presentan las cepas salvajes. Para conocer la o las funciones del producto del gen *PPZ1* se deleccionó *in vitro* un fragmento considerable de la región codificante, insertando en su lugar los marcadores auxotróficos de *S. cerevisiae* *URA3* o *TRP1*.

Uno de los experimentos de interrupción génica se llevó a cabo reemplazando el fragmento correspondiente a *PPZ1*, *BglII-BglII* de 0,95 kpb por el marcador auxotrófico *TRP1* (obtenido según se describe en 2.5.8), resultando en un fragmento de 1,7 kpb que fué purificado y utilizado para transformar células diploides de la cepa M5 dando lugar a la cepa JA-13 (figura 20-A).

También se reemplazó la secuencia de *PPZ1* *ClaI-ClaI* de 441 pb por la del gen *URA3*, obteniendo un fragmento de 3,1 kpb que se utilizó para transformar células M5 diploides obteniendo la cepa JA-14 (figura 20-B).

Las células transformadas fueron plaqueadas en medio sintético carente del aminoácido correspondiente en cada caso, para seleccionar las células portadoras de las interrupciones. La comprobación definitiva de las interrupciones se realizó mediante experimentos de Southern blot en los que se evidenció la interrupción del gen *PPZ1* (Figura 20-A y 20-B).

Como se observa en la figura 20, se han obtenido células diploides donde uno de sus dos genes *PPZ1* ha quedado interrumpido, manteniendo una copia normal en el otro cromosoma.

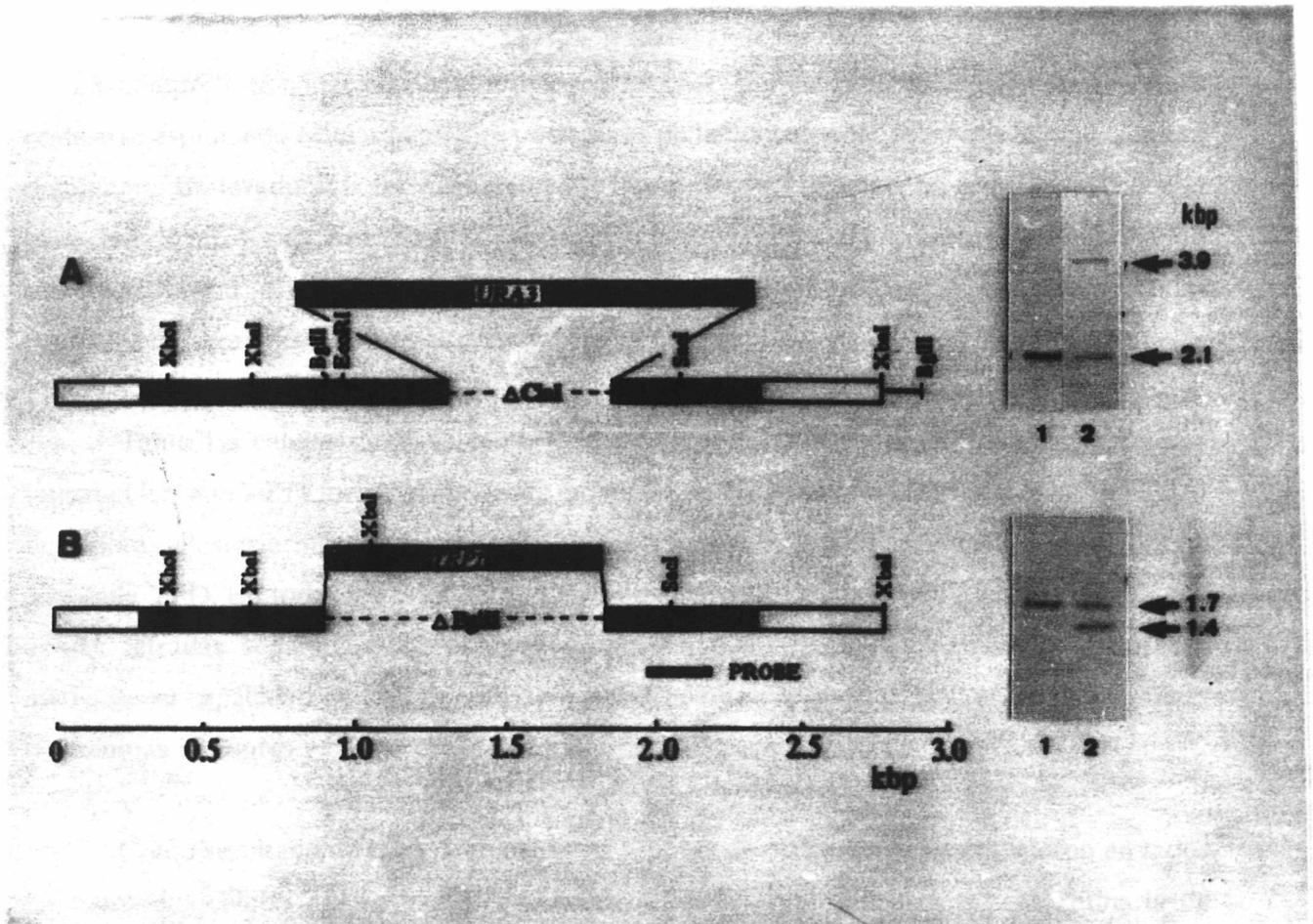


Figura 20. A) En la interrupción del gen *PPZ1* con *TRP1* se eliminó el fragmento *Bgl*II-*Bgl*III de 0,95 kpb, correspondiente a los aminoácidos 190 al 502, del fragmento *Xho*I-*Hind*III de 3,5 kpb clonado en Bluescript conteniendo la región codificante completa del gen (*PPZ*-G). En su lugar se insertó el fragmento de 0,85 kpb que contiene la región que codifica el gen *TRP1*. Del plásmido resultante se obtuvo un fragmento de 1,7 kpb después de digerir con *Xho*I y *Sac*I. B) La interrupción del gen *PPZ1* mediante el gen *URA3* se logró después de eliminar el fragmento *Cla*I-*Cla*I de 0,44 kpb correspondiente a los aminoácidos 361 a 507 del clon *PPZ1*-A. Seguidamente se procedió a la ligación de la secuencia del gen *URA3* contenida en un fragmento *Cla*I-*Cla*I de 1,5 kpb en las dianas *Cla*I, para obtener un nuevo plásmido cuya digestión con *Xba*I liberó el fragmento de 3,1 kpb utilizado en la transformación. El DNA genómico de las células diploides que presentaban un fenotipo *ura*⁺ en un caso y *trp*⁺ en el otro fué purificado y digerido con *Bgl*III o con *Xba*I, respectivamente. Después de separado electroforéticamente fué transferido a membranas de nylon y posteriormente hibridado utilizando el fragmento ST13-2 marcado con digoxigenina.

5.2. OBTENCION DE MUTANTES POR INTERRUPCION DE *PPZ1*.

La comprobación del efecto fenotípico provocado por la interrupción de un gen debe realizarse estudiando células haploides portadoras de la interrupción, salvo que la mutación sea dominante. En levadura, la transición entre la fase diploide y haploide no requiere más que la privación de nitrógeno. Ante estas condiciones adversas, la célula sufre una meiosis, formando una tétrada con cuatro esporas haploides como forma de resistencia. El retorno a las condiciones favorables provoca la germinación de las esporas.

Tanto las células de la cepa JA-13 como las de JA-14 (portadora cada una de una interrupción en *PPZ1*) fueron plaqueadas en medio de esporulación para inducir la formación de esporas. Posteriormente, cada una de las cuatro esporas fueron separadas e incubadas en placas de YPD. En todos los casos se produjo el crecimiento de las cuatro esporas de cada una de las tétradas separadas. Las nuevas células haploides obtenidas fueron caracterizadas mediante su capacidad de crecimiento en ausencia de uracilo o de triptófano para identificar las colonias mutantes y buscar en ellas un fenotipo diferencial.

Como resultado de la separación de las esporas de cada tétrada se obtuvieron en todos los casos dos células *MATa* y dos *MAT α* , identificables mediante una prueba rutinaria de inhibición del crecimiento de las células *MATa* por parte de la feromona factor α . Conociendo el sexo de cada célula, así como el marcador auxotrófico de cada una, se procedió a la creación de una cepa diploide homóloga para la interrupción, portadora de las dos interrupciones realizadas, es decir *ura⁺*, *trp⁺*. Esta nueva cepa se denominó JA-15.

Seguidamente se procedió a comprobar el nivel de expresión de *PPZ1* en las cepas portadoras de las interrupciones, tanto haploides como diploides. Para ello se utilizó como sonda el fragmento de *PPZ1* eliminado en la interrupción realizada con *URA3*.

Según el Northern blot de la figura 21 las cepas portadoras de las mutaciones en *PPZ1* no presentan niveles de mRNA de éste gen detectables. Además se observa que la cantidad de mRNA de *PPZ1* es 5 veces mayor en las células diploides que en las haploides (carriles 1 y 3 respectivamente).

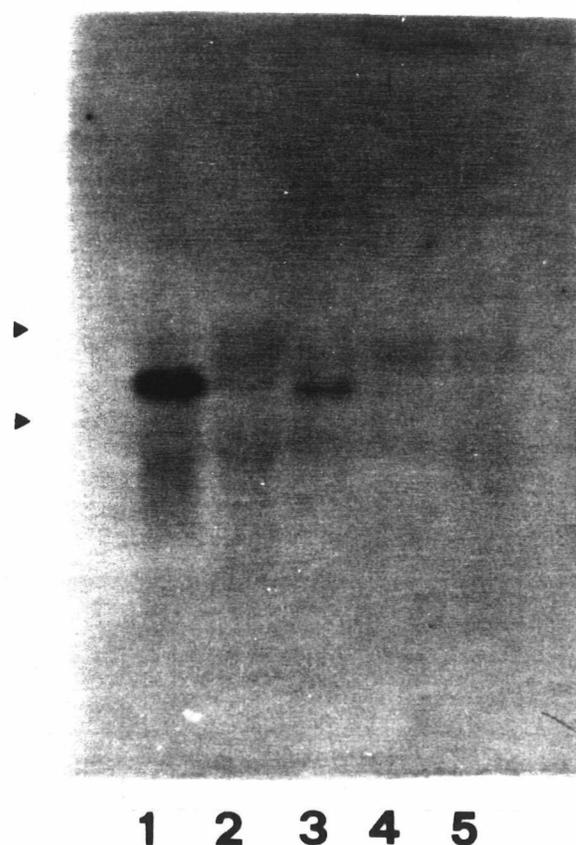


Figura 21. 30 μg de RNA total de las cepas diploides M5 (1) y JA-15 (2), así como de las haploides wt (3), JA-16 (4) y JA-17 (5) a una $\text{OD}_{600}=6$ fueron separados electroforéticamente y transferidos a membrana de nylon. Esta se hibridó con la sonda de *PPZ1* *ClaI-ClaI* de 441 pb, que corresponde al fragmento ausente en la cepa haploide JA-17.

5.3. FENOTIPOS ESTUDIADOS.

5.3.1. SENSIBILIDAD AL FACTOR α .

La parada del ciclo celular en la fase G_1 provocada por la feromona factor α sobre la cepa haploide *MATa ppz1* cuantificada mediante la medida de los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento resulta practicamente indistinguible del efecto del factor α sobre la cepa isogénica. A continuación se muestran en la tabla V los datos obtenidos en una cepa haploide portadora de una interrupción de *PPZ1* y en el respectivo control.

TABLA V. DIAMETRO DE LOS HALOS DE INHIBICION DEL CRECIMIENTO POR PARTE DEL FACTOR α .

Concentración de factor α ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Cepa <i>wt</i>	Cepa <i>ppz1</i>
0	7,0	7,0
0,625	11,63	10,63
1,25	13,88	11,38
2,5	14,63	12,38

5.3.2. SENSIBILIDAD AL CHOQUE TERMICO.

Se comprobó la viabilidad de la cepa haploide *ppz1* después de ser sometida a un choque térmico de 55°C durante 45 minutos. En este caso tampoco se encontraron diferencias con respecto a la cepa isogénica. Se realizaron también, como control, experimentos con una cepa *bcy1*, de la que se conoce que el choque térmico reduce su viabilidad.

5.3.3. CAPACIDAD DE CRECIMIENTO EN DIFERENTES FUENTES DE CARBONO.

Se ha comprobado si existen diferencias de crecimiento entre los mutantes haploides *ppz1* y la cepa isogénica en cuanto a la capacidad de crecimiento en diferentes fuentes de carbono, como son el glicerol, etanol, ácido láctico y galactosa. En ningún caso se ha observado diferencia alguna, tanto en las fuentes de carbono no fermentables como en la galactosa.

5.3.4. ACUMULACION DE GLUCOGENO.

La cantidad de glucógeno presente en la célula se determinó mediante tinción con vapores de yodo. La intensidad del color que presentan las células haploides *ppz1* no difiere de la de la cepa isogénica y por tanto, la ausencia de la proteína PPZ1 no provoca cambios notables en la cantidad de glucógeno celular.

5.3.5. ACTIVIDAD GLUCOGENO SINTASA.

La actividad del enzima glucógeno sintasa se determinó en cultivos de células JA-15 y en la cepa M5, de la cual procedía la mutada. Se tomaron muestras de los cultivos en diferentes momentos, desde el inicio de la fase exponencial hasta la fase estacionaria. Los resultados indican que la ausencia de PPZ1 no altera la actividad de la glucógeno sintasa.

6. EVIDENCIAS DE LA EXISTENCIA DE UN GEN SIMILAR A PPZ1.

Experimentos de Southern blot realizados con una sonda del gen *PPZ1* en condiciones poco selectivas permitieron identificar una serie de bandas que desaparecían cuando las membranas eran lavadas en condiciones de mayor selectividad (figura 22).

En los experimentos de Western blot realizados con extractos de la cepa M5 *ppz1* y utilizando el antisuero anti PPZ1, se detectó una proteína inmunorreactiva del mismo tamaño aparente que PPZ1. Puesto que previamente se había comprobado el genotipo de la citada cepa, la señal obtenida podía ser explicada por la existencia de una proteína similar a PPZ1, que también reaccionaba con el antisuero anti-PPZ1.

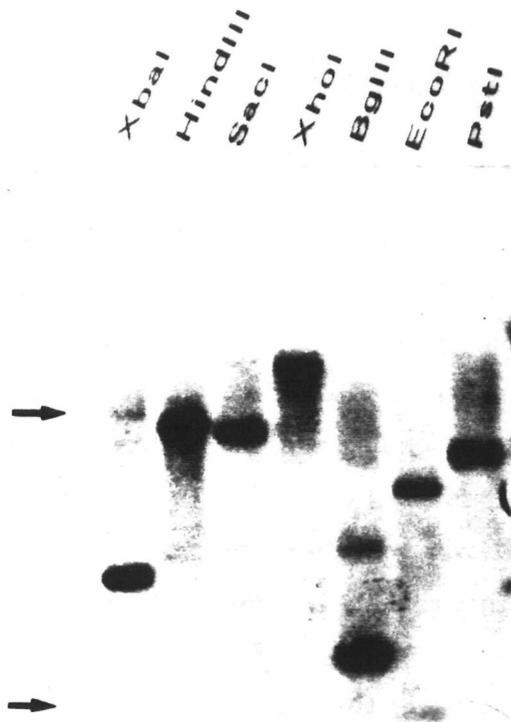


Figura 22. Southern blot de DNA genómico digerido con diferentes enzimas de restricción. La sonda utilizada fue el fragmento *XbaI*-*SacI* de 1,2 kpb marcado con [^{32}P]dCTP. La hibridación se realizó en presencia de 5 x SSC a 37°C y la membrana se lavó con 2x SSC a 37°C. Las flechas de la izquierda indican la altura de las bandas presentes en los carriles de *XbaI* y de *EcoRI* que desaparecen cuando la membrana es lavada en condiciones más selectivas.

Por otra parte, en experimentos de Northern blot realizados con RNA total de la cepa M5 *ppz1* utilizando el fragmento *PstI-AccI* de 2,3 kpb como sonda (carril 3 de la figura 17), se puede observar una débil señal a la misma altura que se encuentra el mRNA de *PPZ1*.

El conjunto de estos resultados parecía indicar la presencia de un gen similar a *PPZ1* en las células de la cepa M5.

6.1. AMPLIFICACION Y CARACTERIZACION DE UN FRAGMENTO DEL GEN *PPZ2*

Durante la realización del presente trabajo el laboratorio de P.T.W. Cohen presentó evidencias de la existencia de un gen muy similar a *PPZ1* en *S. cerevisiae* [Da Cruz e Silva, E.F. y col. (1991)]. En concreto, se publicó la secuencia nucleotídica de un fragmento de unas 0,66 kpb que se dedujo pertenecía a un gen denominado *PPZ2*. La región de *PPZ1* con la que se alinea el fragmento de *PPZ2* comprende desde el nucleótido 1.165 al 1.830, comenzando desde el inicio de traducción (es decir, desde el residuo 389 hasta el 610 de *PPZ1*). La identidad a nivel de nucleótidos entre las dos secuencias es del 79,1%. A nivel de aminoácidos es del 93,2%, alcanzando el 96,8% cuando se tienen en cuenta los cambios conservativos.

Con la intención de amplificar el fragmento del gen *PPZ2* y con la información de la secuencia parcial de *PPZ2* publicada diseñamos unos oligonucleótidos correspondientes a los extremos de la misma conteniendo en posición 5' las dianas de reconocimiento para el enzima *EcoRI* (figura 23).

La amplificación se realizó a partir de 0,2 µg de DNA genómico de M5 y se realizaron 30 ciclos en los que la temperatura de renaturalización era de 45°C y la concentración de Mg²⁺ de 2 mM.

El producto de la amplificación fué purificado, digerido con el enzima *EcoRI* y sometido a electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. La única banda de DNA amplificado de 0,63 kpb fué recortada, purificada y posteriormente ligada al vector plasmídico Bluescript SK(+), el cual había sido digerido con el enzima *EcoRI* y desfosforilado.

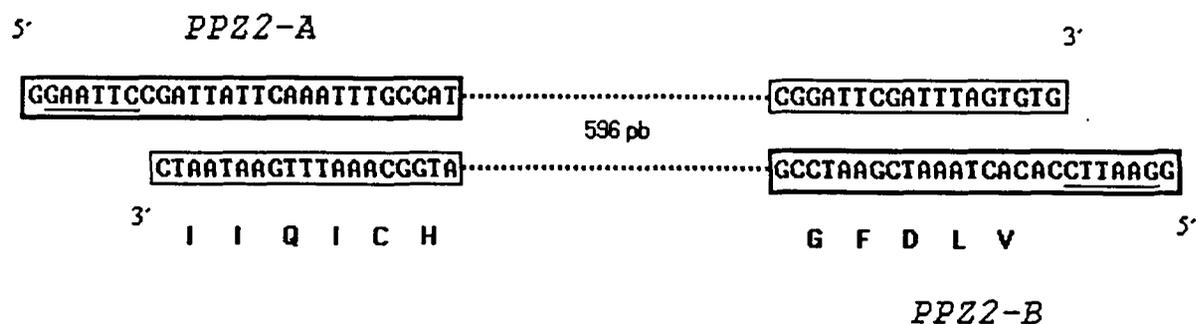


Figura 23. Las secuencias de los oligonucleótidos diseñados para amplificar *PPZ2* se encuentran en las cajas gruesas mientras que en las finas se ha representado la secuencia complementaria. Las regiones subrayadas de *PPZ2-A* y *PPZ-2* corresponden con las diana de restricción *EcoRI*. En la parte inferior se indica la secuencia aminoacídica codificada.

Para comprobar si el producto amplificado y clonado coincidía con la secuencia publicada, se procedió a secuenciar el fragmento clonado en Bluescript SK(+). De este modo advertimos que se trataba del mismo gen. La figura 24 muestra la secuencia nucleotídica obtenida y la aminoacídica deducida.

GATTATTCAAATTTGCCATAAGGCTCGTGAATTATTCCTTGCCCAACCT	49
I I Q I C H K A R E L F L A Q P	16
GCTCTCTTAGAATTATCTCCCTCGGTAAAAATAGTGGGTGATGTTTAC	97
A L L E L S P S V K I V G D V H	32
GGCCAATATGCAGATCTTTTGAGACTTTTTACCAAATGCGGTTTCCCC	145
G Q Y A D L L R L F T K C G F P	48
CCCATGGCAAATTACTIONTTTATAGGCGATTACGTAGATCGCGGTAAG	193
P M A N Y L F L G D Y V D R G K	64
CAGTCCCTGGAGACCATTTTACTATTACTATGCTATAAGATTAAATAT	241
Q S L E T I L L L C Y K I K Y	80
CCTGAAAATTTCTTCTCTTAAGAGGCAATCATGAATGTGCCAATGTT	289
P E N F F L L R G N H E C A N V	96
ACAAGAGTCTACGGGTTTTATGATGAATGTAAACGACGTTGTAATATC	337
T R V Y G F Y D E C K R R C N I	112
AAGATTTGGAAAACCTTTGTTGACACGTTCAACACGCTACCGTTAGCA	385
K I W K T F V D T F N T L P L A	128
GCCATCGTCACAGGAAAGATATTTTGTGTTTACGGTGGACTATCACCT	433
A I V T G K I F C V H G G L S P	144
GTTCTAAATTCATGGACGAAATTAGGCACGTTAGTAGGCCACCGAT	481
V L N S M D E I R H V S R P T D	160
GTACCCGATTTTCGGCTTAATTAATGACCTTTTATGGTCGGATCCTACA	529
V P D F G L I N D L L W S D P T	176
GATTCATCGAATGAATGGGAGGATAATGAGCGTGGAGTTAGTTTTTGT	577
D S S N E W E D N E R G V S F C	192
TACAATAAAGTGGCTATTAATAAATTTTAAACAAATTCGGATTCGAT	625
Y N K V A I N K F L N K F G F D	208
TTAGTGTG	633
L V	210

Figura 24. Secuencia nucleotídica amplificada del gen *PPZ2*. Se muestra también la secuencia de aminoácidos deducida, indicándose en negrita los residuos que no son comunes con *PPZ1*.

6.2. ANALISIS MEDIANTE SOUTHERN BLOT DE PPZ2.

Con la finalidad de conocer el mapa de restricción de la zona del genoma en la que se localiza en gen *PPZ2*, se realizaron los experimentos de Southern blot. En la figura 25 se muestra uno de los Southern blot realizados del gen *PPZ2*.

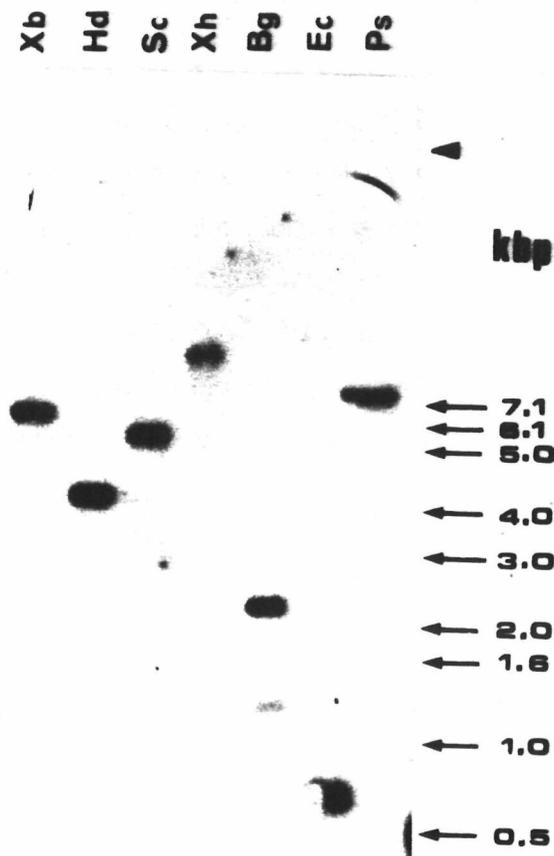


Figura 25. 10 μ g de DNA genómico de la cepa M5 de *S. cerevisiae* fueron digeridos con diferentes enzimas de restricción y sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 0,7% (p/vol). Los geles se transfirieron a membranas de nylon que fueron hibridadas, a 65°C, con el fragmento *EcoRI-EcoRI* de 0,63 kpb marcado radioactivamente. Los lavados se realizaron en solución conteniendo 0,1x SSC a 65°C. Xb: *XbaI*, Hd: *HindIII*, Sc: *SacI*, Xh: *XhoI*, Bg: *BglI*, Ec: *EcoRI*, Ps: *PstI*. Las flechas de la derecha indican la migración de los marcadores de DNA.

De los datos obtenidos del mapeo de la región correspondiente al entorno de la región amplificado de gen *PPZ2* se pone de manifiesto que la sonda utilizada reconoce un fragmento de extremos *EcoRI* de unos 0,66 kpb, prácticamente el tamaño de la propia sonda. También se observa que la digestión del DNA genómico con *BglII* genera dos fragmentos cuyas longitudes son de 1,2 kpb y de 2,1 kpb, debido a la presencia de una diana para este enzima dentro de la secuencia que hibrida con la sonda empleada.

6.3. ANALISIS MEDIANTE NORTHERN BLOT DEL GEN *PPZ2*.

Para verificar el tamaño del producto de expresión del gen *PPZ2* se realizó un experimento de northern blot con RNA de la cepa diploide M5 *ppz1* evitando así posibles interferencias con el RNA de *PPZ1*. Se preparará RNA total de células en diferentes fases del cultivo para comprobar si el mRNA que hibrida con la sonda del gen *PPZ2* experimenta variaciones durante el cultivo. El resultado se muestra en la figura 26-A. El transcrito del gen *PPZ2* posee un tamaño similar al del mRNA del gen *PPZ1*, pero las cantidades de mRNA no se modifican del mismo modo durante el cultivo. El mRNA de *PPZ2* es escaso al inicio de la fase exponencial y aumenta gradualmente hasta encontrar la mayor cantidad en la fase estacionaria.

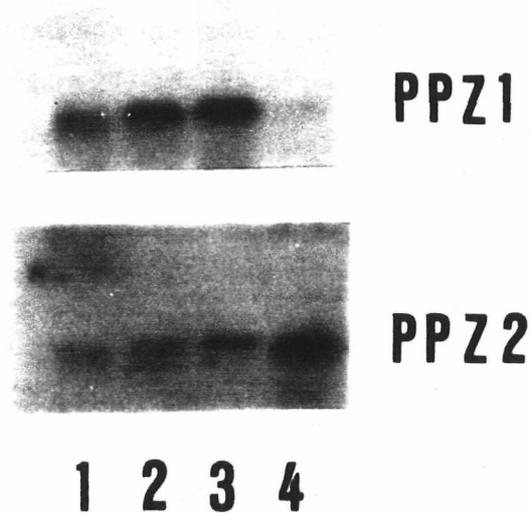


Figura 26. A) 40 μ g de RNA total de la cepa M5 homocigótica para la interrupción del gen *PPZ1*, fué separado mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (p/vol) en presencia de formaldehído. Una vez transferido a membrana de nylon fué hibridado con el fragmento *EcoRI-EcoRI* de 0,63 kpb correspondiente al gen *PPZ2*. La hibridación se realizó a 42°C en presencia de formamida desionizada al 50% (vol/vol) y los lavados se efectuaron a 50°C en 0,1x SSC, SDS al 0,1% (p/vol). Las OD_{600} del cultivo en el momento de tomar las muestras eran de 1, 4, 6 y 9 respectivamente. B) La misma membrana fué hibridada con la sonda de 2,3 kpb *BamHI-AccI* procedente del plásmido pPPZ-A correspondiente a *PPZ1* (después de haber eliminado la sonda de *PPZ2*) a 42°C con formamida al 50% (vol/vol) y lavada con 0,1x SSC a 65°C.

6.4. INTERRUPCION DEL GEN *PPZ2*.

La interrupción del gen *PPZ2* se realizó utilizando el mismo fragmento *Bam*HI-*Bgl*II de 0,85 Kb conteniendo el gen *TRP1* que el usado para una de las interrupciones del gen *PPZ1*. Este fragmento se introdujo en la secuencia amplificada por PCR clonada en el sitio *Eco*RI de Bluescript SK(+) y linealizada con *Bgl*II. De esta construcción se extrajo el fragmento de 1,48 kpb utilizado en la transformación mediante digestión con *Sac*I y *Cla*I, cuyas dianas se encuentran en el polilinker (figura 27). Las células transformadas fueron de la cepa JA-14. La selección de los transformantes se realizó en placas de medio sintético en ausencia de triptófano.

La comprobación de que se ha producido recombinación homóloga en el gen *PPZ2* y éste ha quedado interrumpido se realizó mediante Southern blot de DNA genómico, utilizando el fragmento amplificado de *PPZ2* como sonda marcada radioactivamente (figura 27).

Según los datos de la autorradiografía, se han obtenido diversos clones en los que se ha producido recombinación homóloga en el gen *PPZ2* (cepa JA-16). En ellos aparece una nueva banda de unos 2,9 kpb, además de las de 1,2 kpb y de 2,1 kpb. Como se puede apreciar, la intensidad de las bandas de 2,1 kpb en los carriles 3 y 4 es menor a la de las bandas de las cepas donde no se ha producido la recombinación. Ello se debe a que la cepa utilizada es diploide, y la recombinación ha tenido lugar en sólo uno de los cromosomas.

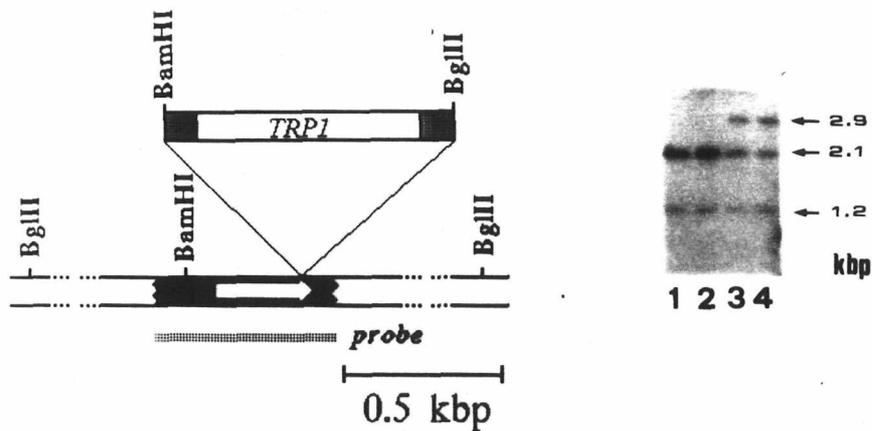


Figura 27. Obtención del fragmento de *PPZ2* interrumpido con el marcador auxotrófico *TRP1* con el que se transformaron células diploides de la cepa M5 portadoras de una copia mutada del gen *PPZ1*. Southern blot de 10 μ g de DNA genómico digerido con *BglIII* de colonias que crecieron en ausencia de triptófano después de ser transformadas con el fragmento *SacI-ClaI* portador del marcador *TRP1*. La hibridación con el fragmento *EcoRI-EcoRI* de 0,63 kpb marcado radioactivamente se realizó a 65°C y los lavados en 0,1x SSC y SDS al 0,1% (p/vol) a 65°C. Los carriles 1 y 2 corresponden a controles negativos, perteneciente a DNA de la cepa JA-11. Los carriles 3 y 4 pertenecen a cepas transformantes. Las flechas de la derecha indican el tamaño de los fragmentos de DNA que hibridan con la sonda.

4.- DISCUSSION.

En este trabajo se ha utilizado la técnica de PCR para identificar fragmentos de DNA genómico correspondientes a secuencias relacionadas con las de las proteína fosfatasa con el fin de clonar y caracterizar nuevos miembros de ésta familia de proteínas. Ello ha sido posible gracias al alto grado de conservación de las secuencias de los diferentes tipos de proteína fosfatasa a través de la evolución. Esta aproximación ya había sido utilizada con éxito en el laboratorio de G.L. Johnson para aislar y secuenciar fragmentos correspondientes a diversos genes correspondientes a proteína fosfatasa de tipo 1, 2A y 2C de mamífero [Wadzinski, B.E. y col. (1990)]. Diversos genes han sido ya clonados utilizando esta técnica, como es el caso de *CNA2 (CMP2)* [Cyert, M.S. y col. (1991)] o de las proteína tirosina fosfatasa de levadura [Guang, K., y col. (1991); Otilie, S. y col. (1991)].

Entre los fragmentos amplificados, se encontraban los correspondientes a los genes de *S. cerevisiae* *SIT4* [Arndt, K.T. y col. (1989)] y *PPH22* [Sneddon, A.A. y col. (1990)]. En cambio, no se obtuvo ningún clon que contuviera la secuencia correspondiente al gen *DIS2S1* [Ohkura, H. y col. (1989)] aunque el análisis de su secuencia nucleotídica sugiere que se produjo la amplificación bajo las condiciones utilizadas. La causa de no encontrar ningún clon con el producto de amplificación de este gen puede ser la presencia de un sitio de restricción interno para el enzima *EcoRI* en el fragmento amplificado. Así, tras la digestión con *EcoRI* y *HindIII*, dicho fragmento es dividido en dos moléculas de DNA cuyo tamaño es menor de 200 pb y, por tanto, no se recupera con las bandas de 225-250 pb, por lo que no se incluyó en las reacciones de ligación. De hecho, se demostró la presencia de las secuencias de *DIS2S1* en la mezcla de amplificación cuando los fragmentos amplificados no digeridos fueron separados electroforéticamente, transferidos a membranas y estas hibridadas en condiciones de muy alta selectividad con la sonda del gen *DIS2S1*.

Además de las secuencias de genes de proteína fosfatasa de *S. cerevisiae* ya conocidos, se obtuvieron dos nuevos tipos de secuencias, denominados ST4-2 y ST13-2. El primero de ellos corresponde a un gen que ha sido recientemente caracterizado en nuestro laboratorio, mientras que la presente memoria se ha fundamentado en la clonación y caracterización del segundo.

La secuencia de 60 aminoácidos deducida de ST13-2 resultó ser idéntica a una región de PPZ1, una proteína fosfatasa de 348 residuos relacionada con las proteínas fosfatasas de tipo 1 cuyo cDNA se localizó inicialmente en una biblioteca de cerebro de conejo [Cohen, P.T.W. y col. (1990)]. Ello significaba que nos encontrábamos ante una de las proteínas mejor conservadas a lo largo de la evolución. Este hecho nos animó posteriormente a comprobar la existencia en diferentes especies de los genes que codifican ésta proteína mediante experimentos de Southern blot de DNA genómico de *S. pombe*, rata, visón, hombre, e incluso en plantas superiores en condiciones poco selectivas. Pero únicamente se detectó la presencia de una secuencia relacionada con PPZ1 en el genoma de la línea celular de epitelio de pulmón de visón Mv1Lu, comprendida en un fragmento *EcoRI-EcoRI* de 2,0 kpb aproximadamente. Este resultado no concordaba con la existencia de una misma proteína en *S. cerevisiae* y en conejo.

Los experimentos iniciales de Northern blot, utilizando el fragmento ST13-2 como sonda, indicaron que la proteína de levadura portadora de la secuencia ST13-2 podía ser mayor que el resto de las fosfatasas de tipo 1 conocidas (300-350 aminoácidos) al encontrar que el tamaño del transcrito era de unas 2,7 kb aproximadamente. Este hecho, junto con la completa identidad con PPZ1, condujeron a la clonación del gen de levadura contenedor de la secuencia ST13-2 y posterior secuenciación.

El gen PPZ1 ha sido localizado en el cromosoma XIII, donde hasta ahora no se ha encontrado codificada ninguna serina-treonina fosfatasa. La mayor parte de los genes de las fosfatasas conocidas pertenecen al cromosoma IV (*CNA1*, *SIT4*, *PPH21*, *PPH22* y *PPH3*).

El análisis de la secuencia nucleotídica del clon positivo de 4,5 Kpb (PPZ-A) revela un ORF que codifica una proteína de 692 aminoácidos. El codón de inicio ATG está precedido en la posición -3 por un residuo de adenina, el cual se encuentra altamente conservado en *S. cerevisiae* como secuencia consenso para el inicio de traducción [Cigan, A.M. y col. (1987)]. Se localizan también dos secuencias consenso (TATA) en posiciones -151 y -164. La proteína codificada por este ORF presenta una serie de interesantes características. En primer lugar posee un tamaño mucho mayor que el de las subunidades catalíticas de las PP-1, PP-2A y PP-2C de levadura, *Drosophila*, plantas y mamíferos.

En función de su estructura primaria, esta proteína puede ser dividida en dos regiones. La secuencia carboxi-terminal de la proteína es esencialmente idéntica a la secuencia de la proteína de cerebro de conejo de 348 aminoácidos denominada PPZ1 descrita por Cohen, P.T.W. y col. (1990). Las únicas diferencias se encuentran localizadas en la Gly-340 y en la Ser-440. Durante la realización de este trabajo, se ha evidenciado que el cDNA de *PPZ1* no corresponde a un mRNA expresado en conejo, sino que a una secuencia parcial de un gen de levadura [Da Cruz e Silva, E.F. y col. (1991)]. Por este motivo parece razonable pensar que el gen contenedor de la secuencia ST13-2 clonado en nuestro laboratorio es probablemente la forma completa del gen de levadura *PPZ1*, mientras que el clonado en el laboratorio de P.T.W. Cohen representa no más del 50% de la secuencia codificante.

Por otra parte, la mitad amino-terminal de *PPZ1* presenta diversas características remarcables. En primer lugar es considerablemente más básica que la mitad carboxi-terminal (pI 10,3 frente a 5,6). Además, es muy rica en residuos de serina, conteniendo el 80% del total de serinas presentes en la proteína, lo que representa el 26% de los aminoácidos de la mitad amino-terminal. Cuando esta parte de la proteína se comparó con las existentes en un banco de datos, la secuencia más similar encontrada fue la de la región correspondiente a la fosvitina que se encuentra en el producto del gen de la vitelogenina, donde la identidad es del 32% en una región de 121 aminoácidos [Van het Ship, F.D. y col. (1987)]. La característica más relevante de la fosvitina, proteína de 217 aminoácidos, es que contiene gran cantidad de residuos de serina, intercalados con argininas, lisinas y asparaginas. A pesar de que el contenido de serinas de la *PPZ1* no es tan elevado como en la fosvitina, éstas se encuentran sin excepción en combinación con los residuos mencionados.

El hecho de que la proteína *PPZ1* tenga casi 700 residuos hace que sea la mayor de las proteínas conocidas hasta ahora con características de subunidad catalítica de serina/treonina fosfatasas. En *S. cerevisiae*, sólo las proteínas codificadas por los genes *CMP1* y *CMP2*, correspondientes al tipo 2B, poseen una extensión considerable de residuos que no presentan homología con el resto de las subunidades catalíticas. En el caso de la *PPZ1*, y a diferencia de lo que ocurre con las *PP-2B*, el segmento de la proteína que no se corresponde con la región catalítica se encuentra en la mitad amino-terminal.

La función de la extensión amino-terminal de PPZ1 no se conoce hasta el momento. Pero es bien conocida la existencia de proteínas en mamífero y en levadura que contienen en una misma cadena polipeptídica tanto la región catalítica como la reguladora. Sin ir más lejos, las mismas subunidades catalíticas de las PP-2B de levadura se caracterizan por una extensión carboxi-terminal de unos 200 residuos en el que se encuentra el dominio de unión a la calmodulina el cual se comporta como elemento regulador [Kinkaid, R.L. y col. (1989)]. También se conoce que la subunidad catalítica de la PP-1 de músculo esquelético de conejo es susceptible de fosforilación por diversas proteína tirosinas quinasas. Así por ejemplo, la actividad quinasa de $pp60^{v-src}$ causa un descenso de la actividad PP-1 [Johansen, J.W. e Ingebritsen, T.S. (1986)], mientras que la fosforilación por *v-abl* no tiene efecto sobre la misma, pero sí que regula la interacción con el I-2 [Villa-Moruzzi, E. y Dalla Zonca, P. (1991)]. Por todo ello, no se puede excluir la posibilidad de que la proteína PPZ1 contenga regiones tanto catalíticas como reguladoras, y que la extensión amino-terminal sea capaz de regular la actividad de la mitad carboxi-terminal.

El análisis de la secuencia primaria de la mitad amino-terminal revela la presencia de múltiples residuos de serina situados en un contexto correspondiente al de secuencias consenso para la fosforilación por diferentes proteína quinasas de levadura [Kemp, B.E. y Pearson, R.B. (1990); Kennelly, P.J. y Krebs, E.G. (1991)]. De hecho, la fosvitina, cuya función es, precisamente, la de reserva de fósforo, es una de las proteínas más fosforiladas de la naturaleza. Así, si consideramos las secuencias de PPZ1 que son reconocidas por algunas proteína quinasas, encontramos 6 residuos susceptibles de fosforilación por la PK-A, 20 por la PK-C, 14 por la CK-II y 9 por la CaM quinasa II. En el caso de la PK-A, dos de las serinas (Ser-122 y Ser-209) encajan perfectamente en la secuencia -R-R-X-S-, la cual actúa como centro de fosforilación en la fructosa-1,6-bisfosfatasa y en la proteína ADR-1 [Rittenhouse, J. y col. (1986); Cherry, J.R. y col. (1989)]. De las proteína quinasas mencionadas anteriormente, la PK-A y la PK-C únicamente poseen secuencias consenso de fosforilación en la región amino-terminal de PPZ1. Estos hechos parecen sugerir la posibilidad de regulación de la actividad PPZ1 mediante procesos de fosforilación reversible de residuos de su mitad amino-terminal. Nuestro laboratorio está interesado en la purificación de PPZ1 y comprobar la capacidad de ser fosforilada tras la incubación con diferentes proteína quinasas.

En los experimentos de Northern blot observamos, si tenemos en cuenta la concentración de glucosa en el medio de cultivo, que la mayor cantidad de mRNA de *PPZ1* coincide con un nivel de glucosa equivalente a la mitad del que había inicialmente. Cuando la concentración de glucosa llega al mínimo, el nivel de mRNA alcanza, de nuevo, los valores iniciales. Este hecho no es raro ya que se conocen casos en los que las cantidades de un mRNA experimentan variaciones durante el cultivo. Por ejemplo, el gen *DIS2S1* incrementa la cantidad de mRNA total hasta 4 veces al final de la fase exponencial, lo que puede sugerir que la activación de la glucógeno sintasa que se ha detectado en esta fase sea consecuencia del aumento de expresión de la fosfatasa que la desfosforila y activa [Feng, Z. y col. (1991)].

En los experimentos de Western blot se utilizaron los anticuerpos desarrollados contra una amplia región de la proteína expresada en bacteria que comprende desde el aminoácido 118 hasta el final de la proteína. Los anticuerpos preparados contra esta región de la proteína son capaces de reconocer la molécula completa presente en la célula. Estos experimentos indican que el producto de la traducción del mRNA del gen *PPZ1* es una proteína que muestra una masa molecular muy cercana a la prevista. Una evidencia adicional que apoya el hecho de que la señal detectada corresponde con la proteína *PPZ1* proviene de la observación de que la proteína inmunoreactiva se incrementa cuando el extracto celular procede de levaduras portadoras del gen *PPZ1* en un plásmido multicopia.

En la levadura, las proteína fosfatasas se encuentran implicadas en el control del ciclo celular y de la transcripción génica. Se han descrito diversos fenotipos, en algunos casos muy severos, como consecuencia de la interrupción de genes de fosfatasas [Ohkura, H. y col. (1989); Sneddon, A.A. y Stark, M.J.R. (1991); Sneddon, A.A. y col. (1990); Ronne, H. y col. (1991); Clotet, J. y col. (1991)]. Sin embargo, los experimentos de interrupción génica han demostrado que *PPZ1* no resulta esencial para el crecimiento de la célula, puesto que las células haploides portadoras de un alelo interrumpido del gen pueden sobrevivir. Las células mutantes tampoco se han podido distinguir de la cepa isogénica cuando se ha realizado el estudio de la capacidad de crecimiento con fuentes de carbono no fermentables, o cuando se ha comparado la sensibilidad tanto al choque térmico como a la hormona factor α . Este último hecho parece indicar que *PPZ1* no tiene como sustrato proteínas como el factor de transcripción *STE12* que son fosforiladas por cualquiera de las proteína quinasas que intervienen en la transducción de la señal desde el receptor del factor α hasta el núcleo (como *STE11*, *STE7*, *FUS3* o *KSS1*)

[revisado en Sprague, G.F. (1991) y Marsch, L. y col. (1991)]. Además, las células diploides homocigóticas para la interrupción son capaces de esporular tan eficientemente como la cepa isogénica.

Aunque se ha demostrado la interconversión entre las formas fosforiladas y desfosforiladas de la glucógeno sintasa tanto *in vivo* como *in vitro*, no se conocen bien las proteína quinasas y fosfatasa que la regulan [Rothman-Denes, L.B. y Cabib, E. (1979); Huang, K.P. y Cabib, E. (1974); François, J. y col. (1988); François, J. y Hers, H.G. (1988); Peng, Z.-Y. y col. (1990)]. Recientemente, en el laboratorio de Reimann, se ha demostrado que la PP-2A de *S. cerevisiae* puede activar *in vitro* la glucógeno sintasa [Peng, Z.-Y. y col. (1991)]. En el mismo laboratorio, también se ha comprobado la importancia de las proteína fosfatasa de tipo 1 (DIS2S1) en la regulación de la glucógeno sintasa [Feng, Z. y Wilson (1991)], a las que se les asigna un papel más importante que el que poseen las PP-2A.

El hecho de que la interrupción del gen *PPZ1* tenga consecuencias fenotípicas no detectables puede explicarse en el caso de que el producto del gen estudiado no se encuentre implicado en ninguna de las funciones relacionadas con los fenotipos analizados. Otra posible explicación sería la existencia de uno o más genes cuyos productos pudieran realizar la/s función/es de la proteína *PPZ1*. En relación con esta última posibilidad, hemos tenido evidencias de la presencia de un gen similar a *PPZ1*. En experimentos de Southern blot realizados utilizando una sonda del gen *PPZ1* en condiciones de baja selectividad se evidenció la presencia de una secuencia relacionada con *PPZ1*, puesto que se detectaron bandas que desaparecían al lavar la misma membrana en condiciones más selectivas. Recientemente se publicó la secuencia nucleotídica de un clon parcial de 665 pb denominado *PPZ2* [Da Cruz e Silva, E.F. y col. (1991)]. La secuencia conocida codifica un fragmento de proteína muy similar a *PPZ1* (con una identidad del 93%). Posteriores experimentos de Southern blot utilizando el fragmento amplificado por PCR de *PPZ2* como sonda en condiciones de alta selectividad han permitido verificar la presencia de este segundo gen muy relacionado estructuralmente con *PPZ1*. Sin embargo, los experimentos de Northern blot realizados en condiciones de baja selectividad con la sonda de *PPZ1* no revelan otra señal que no sea la obtenida en condiciones altamente selectivas con la misma sonda. En consecuencia, una posibilidad sería que el nivel de expresión de *PPZ2* fuera mucho menor que el de *PPZ1*. La otra explicación a este hecho podría ser que el tamaño del mRNA de *PPZ2* fuera muy similar al de *PPZ1* y por ello no fuera posible

identificarlos en un Northern blot. Si este fuera el caso, *PPZ2* podría codificar una proteína tan grande como *PPZ1*. Los experimentos de Northern blot realizados empleando la sonda de *PPZ2* a partir de RNA total procedente de células con los dos alelos del gen *PPZ1* interrumpidos parecen confirmar esta última posibilidad ya que se verifica la presencia de un mRNA del mismo tamaño que el correspondiente a *PPZ1*. Es importante hacer notar que la cantidad de mRNA de *PPZ2* durante el cultivo no varía del mismo modo que lo hace el mRNA de *PPZ1*. A diferencia del mRNA de éste último gen, el de *PPZ2* experimenta un incremento a medida que el cultivo envejece, detectándose mayor cantidad cuando las células han llegado a la fase estacionaria.

Una cuestión que aún no tiene respuesta es porqué una proteína tan similar a *PPZ1* no se encontró cuando se amplificaron secuencias genómicas mediante PCR, utilizando unos oligonucleótidos como cebadores con los que se logró amplificar *PPZ1*. De hecho, la comparación de secuencias entre el oligonucleótido MP-1s y *PPZ2* sugiere que debió producirse la hibridación y, por tanto, sucesivas extensiones. Pero como no disponemos de la secuencia de *PPZ2* que debe corresponder con el cebador MP-3as, una posibilidad sería que entre ambas existieran suficientes diferencias como para impedir la hibridación. También podría darse en caso de la presencia de una diana *HindIII* o *EcoRI* entre los dos cebadores, lo que impediría la clonación del fragmento amplificado después de haberlo digerido con ambas enzimas. Pero la secuencia nucleotídica de la que disponemos no revela la presencia de ninguna diana de restricción para estas enzimas. En cambio, el mapeo de *PPZ2* ha permitido verificar la existencia de una diana de restricción *EcoRI* entre el extremo 3' de la secuencia amplificada y la región que debe ser complementaria del oligonucleótido MP-3as. Utilizando como sonda la secuencia publicada de *PPZ2* y posteriormente amplificada en nuestro laboratorio, detectamos que se encuentra contenida en un fragmento de DNA genómico de extremos *EcoRI* de una longitud prácticamente idéntica a la de la sonda utilizada. Por este motivo, cuando la mezcla conteniendo los fragmentos amplificados inicialmente por PCR fue digerida con *EcoRI* y con *HindIII*, la molécula de DNA amplificada de *PPZ2* presentaría extremos *EcoRI* en ambos extremos y no podría ligarse al vector.

La presencia de una pareja de genes codificando proteína fosfatasa muy similares en levadura no sería un hecho aislado, ya que existen precedentes. Este es el caso de la pareja de



genes *PPH21* y *PPH22*, que codifican proteínas con una identidad mayor del 90%. Asimismo, y también en *S. cerevisiae*, las proteínas codificadas por *CMP1* y *CMP2* poseen una identidad del 64%. En otra especie de levadura (*S. pombe*), las proteínas codificadas por *dis2⁺* y *sds21⁺* muestran una identidad del 79%. El significado de este hecho permanece desconocido.

5.- BIBLIOGRAFIA.

5. BIBLIOGRAFIA.

- * AGOSTINIS, P.; GORIS, J.; VANDENHEEDE, J.R.; WAELKENS, E., PINNA, L.A. y MERLEVEDE, W. (1986) FEBS Lett. 207, 167-172.
- * AITKEN, A. y COHEN, P. (1982) FEBS Lett. 147, 54-58.
- * AITKEN, A., BILHAM, T. y COHEN, P. (1982) Eur. J. Biochem. 126, 235-246.
- * ALEMANY, S., TUNG, H.Y.L., SHENOLIKAR, S., PILKIS, S.J. y COHEN, P. (1984) Eur. J. Biochem. 145, 51-56.
- * ALEXANDER, D.R. (1990) The New Biologist 2, 1049-1062.
- * ANDRES, J.L., JOHANSEN, J.W. y MALLER, J.L. (1987) J. Biol. Chem. 262, 14389-14393.
- * ARIÑO, J., WOON, C.W., BRAUTIGAN, D.L., MILLER, T.B. y JOHNSON, G.L. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 4252-4256.
- * ARNDT, K.T., STYLES, C.A. Y FINK, G.R. (1987) Science 237, 874-880.
- * ARNDT, K.T., STYLES, C.A. y FINK, G.R. (1989) Cell 56, 527-537.
- * AXTON, J.M., DOMBRADI, V., COHEN, P.T.W. y GLOVER, D.M. (1990) Cell 63, 33-46.
- * BAI, G-E. ZHANG, Z., AMIN, J., DEANS-ZIRATTU, S.A. y LEE, E.Y.C. (1988). FASEB J. 2, 3010-3016.
- * BALLOU, L.M., JENO, P., THOMAS, G.A. (1988) J. Biol. Chem. 263, 1188-1194.
- * BERBEN, G., DUMONT, J., GILLIQUET, V., BOLLE, P.-A. y HILGER, F. (1991) Yeast 7, 475-477.
- * BERGMAYER, H.U., BERNT, E., SCHMIDT, F. y STORK, H. (1974) Methods of Enzymatic Analysis, (Bergmeyer, H.U. ed.) Vol. 3, pp 1196-1201. Verlag Chemie Weinheim. Academic Press. New York-London.
- * BIOLAJAN, C. y TAKAI, A. (1988) Biochem. J. 256, 283-290.
- * BOOHER, R. y BEACH, D. (1986) Mol. Cell. Biol. 6, 3523-3530.
- * BOOHER, R. y BEACH, D. (1989) Cell 57, 1009-1016.
- * BRAUTIGAN, D.L., SUNWOO, J., LABBE, J.-C., FERNANDEZ, A. y LAMB, N.J.C. (1990) Nature 344, 74-78.
- * CARLING, D., ZAMMIT, V. y HARDIE, D.G. (1987) FEBS Lett. 223, 217-222.
- * CAUDWELL, F.B. HIRAGA, A. y COHEN, P. (1986) FEBS Lett. 194, 85-90.
- * CHEN, S.C., KRAMER, G. y HARDESTY, B. (1989) J. Biol. Chem 264, 7267-7275.
- * CHERRY, J.R., JOHNSON, T.R., DOLLARD, C., SHUSTER, J.R. y DENIS, C.L. (1989) Cell 56, 409-419.
- * CHISHOLM, A.A.K. y COHEN, P. (1988a) Biochim. Biophys. Acta 968, 392-400.
- * CHISHOLM, A.A.K. y COHEN, P. (1988b) Biochim. Biophys. Acta 971, 163-169.

5. BIBLIOGRAFIA.

- * CHUNG, C.T.; NIEMELA, S.L y MILLER, R.H. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 2172-2175.
- * CIGAN, A.M. Y DONAHUE, T.F. (1987) Gene 59, 1-18.
- * CLOTET, J., POSAS, F., CASAMAYOR, A., SCHAAFF-GERSTENLAGER, I. y ARIÑO, J. (1991) Curr. Genet. 19, 339-342.
- * COHEN, P.; KLUMPP, S. y SHELLING, D.L. (1989a) FEBS Letters 250, 596-600.
- * COHEN, P., SCHELLING, D.L. y STARK, M.J.R. (1989b) FEBS Letters 250, 601-606.
- * COHEN, P. (1989) Annu. Rev. Biochem. 58, 453-508.
- * COHEN, P. y COHEN, P.T.W. (1989) J. Biol. Chem. 264, 21435-21438.
- * COHEN, P., HOLMES, C.F.B. y TSUKITANI, Y. (1990) TIBS 15, 98-102.
- * COHEN, P.T.W. (1988) FEBS Letters 232, 17-23.
- * COHEN, P.T.W. y COHEN, P. (1989) Biochem. J. 260, 931-934.
- * COHEN, P.T.W., BREWIS, N.D., HUGHES, V. y MANN, D.J. (1990) FEBS Letters 268, 355-359.
- * COOL, D.E., TONKS, N.K., CHAMBONNEAU, H., WALSH, K.A., FISCHER, E.H. y KREBS, E.G. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 5257-5261.
- * CYERT, M.S. y KIRSCHNER (1988) Cell 53, 185-195.
- * CYERT, M.S. y THORNER, J. (1989) Cell 57, 891-893.
- * CYERT, M.S., KUNISAWA, R., KAIM, D. y THORNER, J. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 7376-7380.
- * DA CRUZ E SILVA, O.B. y COHEN, P.T.W. (1987) FEBS Letters 266, 176-178.
- * DA CRUZ E SILVA, O.B., ALEMANY, S., CAMPBELL, D.G. y COHEN, P.T.W. (1987) FEBS Letters 221,415-422.
- * DA CRUZ E SILVA, O.B., DA CRUZ E SILVA, E.F., y COHEN, P.T.W. (1988) FEBS Letters 242, 106-110
- * DA CRUZ E SILVA, E.F. y COHEN, P.T.W. (1989) Biochim. Biophys. Acta 1009, 293-296.
- * DA CRUZ E SILVA, E.F., HUGHES, V., McDONALD, P., STARK, M.J.R. y COHEN, P.T.W. (1991) Biochim. Biophys. Acta 1089, 269-272.
- * DEPAOLI ROACH, A.A. (1984) J. Biol. Chem. 259, 12144-12152.
- * DENT, P., CAMPBELL, D.G., HUBBARD, M.J. y COHEN, P. (1989) FEBS Lett. 148, 67-72.
- * DENT, P., LAVOINNE, A., NAKIELNY, S., CAUDWELL, F.B., WATT, P. y COHEN, P. (1990) Nature 348, 302-308.

5. BIBLIOGRAFIA.

- * DI SALVO, J., WALLKENS, E., GIFFORD, D. GORIS, J. y MERLEVEDE, W. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117, 493-500.
- * DI SALVO, J., GIFFORD, D. y KOKKINAKIS, A. (1985) *Adv. Enzyme Regul.* 23, 103-122.
- * DOMBRADI, V.; AXTON, M.; GLOVER, D.M. and COHEN, P.T.W. (1989) *FEBS Letters* 247, 391-395.
- * DOMBRADI, V., AXTON, J.M., BARKER, H.M. y COHEN, P.T.W. (1990a) *FEBS Letters* 275, 39-43.
- * DOMBRADI, V., AXTON, J.M., BREWIS, N.D., DA CRUZ E SILVA, E.F., ALPHEY, L. Y COHEN, P.T.W. (1990b) *Eur. J. Biochem.* 194, 739-745.
- * ELION, E.A., GRISAFI, P.L. y FINK, G.R. (1990) *Cell* 60, 649-664.
- * ERNST, V., LEVIN, D.H., FOULKES, J.G. y LONDON, I.M. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 7092-7096.
- * FEINBERG, A.P. y VOGELSTEIN (1983) *Anal. Biochem.* 137, 6- 13.
- * FELIX, M.A., LABBE, J.C., DOREE, M., HUNT, T. y KARSENTI, E. (1990) *Nature* 346, 379-382.
- * FENG, Z., WILSON, S.E., PENG, Z.-Y., SCHLENDER, K.K., REIMANN, E.M. y TRUMBLY, R.J. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 23796-23801.
- * FERNANDEZ, A., BRAUTIGAN, D.L. y LAMB, N.J.C. (1992) *J. Cell. Biol.* 116, 1421-1430.
- * FERRER, A., CAELLES, C. y HEGARDT, F.G. (1987a) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148, 1009-1016.
- * FERRER, A., CAELLES, C., MASSOT, N. y HEGARDT, F.G. (1987b) *J. Biol. Chem.* 262, 13507-13512.
- * FISCHER, E.H., CHARBONNEAU, H. y TONKS, N.K. (1991) *Science* 253, 401-406.
- * FOULKES, J.G. y MALLER, J.L. (1982) *FEBS Letters* 150, 155-160.
- * FOULKES, J.G., ERNST, V., LEVIN, D.H. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 1439-1443.
- * FOWLES, C., AKHTAR, M. y COHEN, P. (1989) *Biochemistry* 28, 9385-9391.
- * FRANÇOIS, J., VILLANUEVA, M.E., y HERS, H.G. (1988) *Eur. J. Biochem.* 174, 551-559.
- * FRANÇOIS, J. y HERS, H.G. (1988) *Eur. J. Biochem.* 174, 561-567.
- * FRANÇOIS, J.M., THOMPSON-JAEGER, S., SKROCH, J., ZELLENKA, U, SPEVAK, W. y TATCHELL, K. (1992) *EMBO J.* 11, 87-96.
- * FREMISCO, J.R., GLASS, D.B. y KREBS, E.G. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 4240-4245.
- * GERACE, I. y BLOBEL, G. (1980) *Cell* 19, 277-287.
- * GIETZ, R.D. y SUGINO, A. (1988) *Gene* 74, 527-534.
- * GLASS, D.B. y SMITH, S.B. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 14797-14803.

5. BIBLIOGRAFIA.

- * GLASS, D.B., EL-MAGHRABI, M.R. y PILKIS, S.J. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 2987-2993.
- * GOLDBETER, A. y KOSHLAND, D.E. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 4460-4471.
- * GORIS, J., HERMANN, J., HENDRIX, P., OZON, R. y MERLEVEDE, W. (1989) *FEBS Letters* 245, 91-94.
- * GORNALL, A.G., BARDAWILL, C.S. y DAVID, H.N. (1949) *J. Biol. Chem.* 177, 751.
- * GOULD, K.L. y NURSE, P. (1989) *Nature* 342, 39-45.
- * GUANG, K., DESCHENES, R.J., QIU, H. y DIXON, J.E. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 12964-12970.
- * GUARENTE, L., YOCUM, R.R. y GIFFORD, P. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 7410-7414.
- * GUERINI, D. y KLEE, C.B. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 9183-9187.
- * GUERINI, D., KRINKS, M.H., SIKELA, J.M., HAHN, W.E. y KLEE, C.B. (1989) *DNA* 8, 675-682.
- * HANKS, S.K. y QUINN, A.M. (1991) *Methods in Enzymol.* 200, 38-62.
- * HASHIMOTO, Y., KING, M.M. y SODERLING, T.R. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7001-7005.
- * HASHIMOTO, Y. Y SODERLING, T.R. (1989) *J. Biol. Chem.* 264. 16524-16529.
- * HEALY, A.M., ZOLNIEROWICZ, S., STAPLETON, A.E., GOEBL, M., DePAOLI-ROACH, A.A. y PRINGLE, J.R. (1991) *Mol. and Cell. Biol.* 11, 5767-5780.
- * HERSHEY, J.W.B. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 20823-20826.
- * HIRAGA, A. y COHEN. P. (1986) *Eur. J. Biochem* 161, 763-769.
- * HOLMES, C.F., TONKS, N.K., MAJOR, H. y COHEN, P. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 929, 208-219.
- * HOLZER, H. (1987) *Adv. Prot. Phosphatases* 4, 153-164
- * HONKANEN, R.E., ZWILLER, J., MOORE, R.E., DAILY, S.L., KHATRA, B.S., DUKELOW, M. y BOYNTON, A.L. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 19401-19404.
- * HONKANEN, R.E., ZWILLER, J., DAILY, S.L., KHATRA, B.S., DUKELOW, M. y BOYNTON, A.L. (1991) *J. Biol. Chem* 266, 6614-6619.
- * HUANG, K.P. y CABIB, E. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 3851-3857.
- * HUANG, F.L. y GLINSMANN, W.H. (1976) *Eur. J. Biochem.* 70, 419-426.
- * HUBBARD, M.J. y COHEN, P. (1989a) *Eur. J. Biochem.* 180, 457-465.
- * HUBBARD, M.J. y COHEN, P. (1989b) *Eur. J. Biochem.* 186, 711-716.
- * HUBBARD, M.J. y COHEN, P. (1989c) *Eur. J. Biochem.* 186, 701-709.
- * HUCHON, D., OZON, R. y DEMAILLE, J.G. (1981) *Nature* 294, 358-359.
- * HUNTER, T. (1987) *Cell* 50, 823-829.

5. BIBLIOGRAFIA.

- * IMOYA, T., IMAZU, M., USUI, H., KINOHARU, N. y TAKEDA, M. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 1526-1535.
- * INGBRITSEN, T.S., PARKER, R.A. y GIBSON, D.M. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 1138-1144.
- * INGBRITSEN, T.S. y COHEN, P. (1983a) *Eur. J. Biochem.* 132, 255-261.
- * INGBRITSEN, T.S. y COHEN, P. (1983b) *Science* 221, 331- 338.
- * INGBRITSEN, T.S., BLAIR, J., GUY, P.S., WITTERS, L. y HARDIE, D.G. (1983a) *Eur. J. Biochem.* 132, 275-281.
- * INGBRITSEN, T.S., FOULKES, J.G. y COHEN, P.(1983b) *Eur. J. Biochem.* 132, 263-274.
- * INGBRITSEN, T.S., STUART, A.A. y COHEN, P. (1983c) *Eur. J. Biochem.* 132, 297-307.
- * ITO, H., FUKUDA, Y., MURATA, K. y KIMURA, A. (1983) *J. Bacteriol.* 153, 163-168.
- * ITO, A., HASHIMOTO, T., HIRAI, M., TAKEDA, T., SHUNTOH, H., KUNO, T. y TANAKA, C. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163, 1492-1497.
- * JENO, P., BALLOU, L.M., NOVAK-HOFER, I., THOMAS, G.A. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 406-410.
- * JOHANSEN, J.W. e INGBRITSEN, T.S. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 207-211.
- * JOHNSON, G.L., BRAUTIGAN, D.L., SHRINER, C., JASPERS, S., ARIÑO, A., MOLE, J.E., MILLER, T.B. jr. y MUMBY, M.C. (1987) *Mol. Endocrinol.* 1, 745-748.
- * KAMABAYASHI, C., ESTES, R., SLAUGHTER, C. y MUMBY, M.C. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 13251-13260.
- * KAPLAN, R. y col. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 7000-7004.
- * KARSENTI, E., BRAVO, R. y KIRSCHNER, M. (1987) *Dev. Biol.* 119, 442-453.
- * KEMP, B.E. y PEARSON, R.B. (1990) *Trend in Biochem. Sci.* 15, 342-346.
- * KENNELLY, P.J. y KREBS, E.G. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 15555-15558.
- * KHEW-GOODALL, Y. y HEMMINGS, B.A. (1988) *FEBS Letters* 238, 265-268.
- * KHEW-GOODALL, Y., MAYER, R.E., MAURER, F., STONE, S.R. y HEMMINGS, B.A. (1991) *Biochemistry* 30, 89-97.
- * KINKAID, R.L., NIGHTINGALE, M.S. y MARTIN, B.M. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8983-8987.
- * KINKAID, R.L., GIRI, P.R., HIGUCHI, S., TAMURA, J., DIXON, S.C., MARIETTA, C.A., AMORESE, D.A. y MARTIN, B.M. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 11312-11319.
- * KINOSHITA, N., OHKURA, H. y YANAGIDA, M. (1990) *Cell* 63, 405-415.
- * KISHIMOTO, A., NISHIYAMA, K., NAKANISHI, H., URATSUJI, Y., NOMURA, H., TAKEYAMA, Y. y NISHIZUKA, Y. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 12492-12499.

5. BIBLIOGRAFIA.

- * KITAGAWA, Y., SAKAI, R., TAHIRA, T., TSUDA, H., ITO, N., SUGIMURA, T. y NAGAO, M. (1988a) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157, 821-827.
- * KITAGAWA, Y., TAHIRA, T., IKEDA, I., KIKUCHI, K. TSUIKI, S., SUGIMURA, T. y NAGAO, M. (1988b) *Biochim. Biophys. Acta.* 951, 123-129.
- * KITAGAWA, Y., SHIMA, H., SASAKI, K. y NAGAO, M. (1991) *Biochem. Biophys. Acta* 1089, 339-344.
- * KÖHRER, K. y DOMDEY, H. (1991) en *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology* GUTHRIE, C. y FINK, G.R. (1991). Academic press, INC. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers.
- * KYTE, J. y DOOLITTLE, R.F. (1982) *J. Mol. Biol.* 157, 105-132.
- * KUENZEL, E.A., MULLIGAN, J.A., SOMMERCORN, J. y KREBS, E.G. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 9136-9140.
- * LAEMMLI, U.K. (1970) *Nature* 227, 680-685.
- * LAYNE, E. (1957) *Methods in Enzymol.* 3 (Colowick, S.P. y Kaplan, N.O. ed.) Academic Press N.Y., 450.
- * LAU, K.-H. W., FARLEY, J.R. y BAYLINK, D.J. (1989) *Biochem. J.* 257, 23-36.
- * LEE, T.H., SOLOMON, M.J., MUMBY, M.C. y KIRSCHNER, M.W. (1991) *Cell* 64, 415-423.
- * LINDBERG, R.A., QUINN, A.M. y HUNTER, T. (1992) *TIBS* 17, 114-119.
- * LIU, Y., ISHII, S., TOKAI, M., TSUTSUMI, H., OHKI, O., AKADA, R., TANAKA, K., TSUCHIYA, E., FUKUI, S. y MIYAKAWA, T. (1991) *Mol. Gen Genet.* 227, 52-59.
- * LOHKA, M.J., KYES, J.L. y MALLER, J.L. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7, 760-768.
- * MACKINTOSH, C., CAMPBELL, D.G., HIRAGA, A. y COHEN, P. (1988) *FEBS Lett.* 234, 189-194.
- * MACKINTOSH, C. y COHEN, P. (1989) *Biochem. J.* 262, 335-339.
- * MACKINTOSH, R.W., HAYCOX, G., HARDIE, D.G. y COHEN, P.T.W. (1990) *FEBS Lett.* 276, 156-160.
- * MACKINTOSH, C. (1991) *Adv. in Protein Phosphatases* 6 Supp. 16.
- * MACKINTOSH, C., COGGINS, J. y COHEN, P. (1991) *Biochem. J.* 273, 733-738.
- * MARIN, O., MEGGIO, F., MARCHIORI, F., BORIN, G. y PINNA, L.A. (1986) *Eur. J. Biochem.* 160, 239-244.
- * MARSCH, L., NEIMAN, A.M. y HERSKOWITZ, I. (1991) *Annu. Rev. Cell. Biol.* 1115, 699-728.
- * MARSTON, F.A.O. (1987) In *DNA cloning: A practical approach* (ed. D.M. Glover) vol. 3, p. 59, IRL Press, Oxford.
- * MATHEWS, R.J., CAHIR, E.D. y THOMAS, M.L. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4444-4448
- * MAYER, R.E., HENDRIX, P., CRON, P., MATTHIES, R., STONE, S.R., GORIS, J., MERLEVEDE, W., HOFSTEENGE, J. y HEMMING, B.A. (1991a) *Biochemistry* 30, 3589-3597.

5. BIBLIOGRAFIA.

- * MAYER, R.E., KHEW-GOODALL, Y., STONE, S.R., HOFSTEENGE, J. y HEMMING, B.A. (1991b) *Adv. in Protein Phosphatases* 6, 265-286.
- * MCGOWAN, C. y CHOEN, P. (1987) *Eur. J. Biochem.* 166, 713- 722.
- * MCPARTLIN, A.E., BARKER, H.M. y COHEN, P.T.W. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1088, 308-310.
- * MESSING, J. (1983) *Methods in Enzimol.* vol, 101, pp. 20- 78, Academic Press.
- * MIAKE-LYE, R. y KIRSCHNER, M. (1985) *Cell* 41, 165-175.
- * MIESKES, G., BRAULKE, T. y VON FIGURA, K. (1991) *Adv. in Protein Phosphatases* 6, Supp. 13-14.
- * MISHRA, C. (1983) *FEMS Lett.* 18, 25-29.
- * MUMBY, M.C., RUSSELL, K.L., GARRARD, L.J. y GREEN D.D. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 6257-6265.
- * MURRAY, J., SCARPA, M., NICOLETTA, R. y CESARINI, G. (1987) *EMBO J.* 6, 4205-4212.
- * NIMMO, G.A. y COHEN, P. (1978) *Eur. J. Biochem.* 87, 341-351.
- * NITSCHKE, K., FLEIG, U., SCHELL, J. y PALME, K. (1992) *EMBO J.* 11, 1327-1333.
- * OHKURA, H., KINOSHITA, N., MIYATANI, S., TODA, T. y YANAGIDA, M. (1989) *Cell* 57, 997-1007.
- * OLIVIER, A.R., BALLOU, L.M. y THOMAS, G. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4720-24.
- * ORGAD, S., DUDAI, Y. y COHEN, P. (1987) *Eur. J. Biochem.* 164, 31-38.
- * OTTILIE, S., CHERNOFF, J., HANNING, G., HOFFMAN, C.H. y ERIKSON, R. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3455-3459.
- * PALCZEWSKI, K., McDOWELL, J.H., JAKES, S., INGEBRITSEN, T.S. y HARGRAVE, P.A. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 15770-15773.
- * PAIN, V.M. (1986) *Biochem. J.* 235, 625-637.
- * PAYNE, M.E., SCHWORER, C.M. y SODERLING, T.R. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 2376-2382.
- * PARIS, H., GAPANATH, M.K., SILBERMAN, S.R., AYLWARD, J.H. y LEE, E.Y. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 7510-7518.
- * PATO, M.D. y ADELSTEIN, R.S. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 7047-7054.
- * PATO, M.D. y KERC, E. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 3770-3774.
- * PEARSON, R.B., WOODGETT, J.R., COHEN, P. y KEMP, B.E. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 14471-14476.
- * PELECH, S., COHEN, P., FISHER, M.J., POGSON, C.I., EL-MAGHRABI, M.R. y PILKIS, S.J. (1984) *Eur. J. Biochem.* 145, 39-49.
- * PENG, Z.-Y., TRUMBLY, R.J. y REIMANN, E.M. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 13871-13877.

5. BIBLIOGRAFIA.

- * PENG, Z.-Y., WANG, W., WILSON, S.E., SCHLENDER, K.K., TRUMBLY, R.J. y REIMANN, E.M. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 10925- 10932.
- * SZYSZKA, R., KUDLICKI, W., KRAMER, G., HARDESTY., B., GALABRU, J. y HOVANESSIAN, A. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 3827-2831.
- * PICARD, A. CAPONY, J.P., BRAUTIGAN, D.L. y DOREE, M. (1989) *J. Cell. Biol.* 109, 3347-3354.
- * PONDAVEN, P. y COHEN, P. (1987) *Eur. J. Biochem.* 167, 135-140.
- * POSAS, F. y ARIÑO, J. (1989a) *Nucleic Acids Res.* 17, 8369.
- * POSAS, F. y ARIÑO, J. (1989b) *Nucleic Acids Res.* 17, 8370.
- * POSAS, F., CLOTET, J. y ARIÑO, J. (1991a) *FEBS Letters* 279, 341-345.
- * POSAS, F, CASAMAYOR, A., MUNS, M.T. y ARIÑO, J. (1991b) *Adv. in Prot. Phosphatases*, vol 6, Supp. pp 57. Leuven University Press, Belgium.
- * RITTENHOUSE, J., HARRSCH, P.B., KIM, J.N. y MARCUS, F. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 3939-3943.
- * RONNE, H., CARLBERG, M., HU, G.-Z. y NEHLIN, J.O. (1991) *Mol. and Cell. Biology* 11, 4876-4884.
- * ROTHMAN-DENES, L.B., CABIB, E. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 66, 967-974.
- * ROTHSTEIN, R.J. (1983) *Methods in Enzimol.* 101, 202-211
- * RUSSELL, P. y NURSE, P. (1987) *Cell* 49, 559-567.
- * SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. y MANIATIS, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd. ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- * SASAKI, K., SHIMA, H., KITAGAWA, Y., IRINO, S., SUGIMURA, T. y NAGAO, M. (1990) *Jpn. J. Cancer Res.* 81, 1272-1280.
- * SATO, C., NISHIZAWA, K., NAKAYAMA, T. OHTSUKA, K. y NAKAMURA, H. (1988) *Exp. Cell. Res.* 175, 136-147.
- * SCHEIDTMANN, K.H., MUMBY, M.C., RUNDELL, K. y WALTER, G. (1991) *Mol. Cell. Biol.* 11, 1996-2003.
- * SCHEISTL, R.H. y GIETZ, R.D. (1989) *Curr. Genet.* 16, 339- 346.
- * SERRA, D., AINS, G. y HEGARDT, F. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 14681-14685.
- * SHENOLIKAR, S. y NAIRN, A.C. (1991) *Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research* 13, 1-121. ed. by P. Greengard and G.A. Robinson. Raven Press, Ltd., New York.
- * SHERMAN, F., FINK, G.R., HICKS, J.B. (1986) in *"Methods in Yeast Genetics"*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- * SIEGL, G., MACKINTOSH, C. y STITT, M. (1990) *FEBS Lett.* 270, 198-202.

- * SIMANIS, V. y NURSE, P. (1986) *Cell* 45, 261-268.
- * SNEDDON, A.A., COHEN, P.T.W. and STARK, M.J.R. (1990) *EMBO J.* 9, 4339-4346.
- * SNEDDON, A.A. Y STARK, M.J.R. (1991) *Adv. in Prot. Phosphatases* 6, 307-330.
- * SOLOMON, , M.J., GLOTZER, M., LEE, T.H., PHILIPPE, M. y KIRSCHNER, M.W. (1990) *Cell* 63, 1013-1024.
- * SPRAGUE, G.F. (1991) *TIG* 7, 393-398.
- * STEELE, F.R., WASHBURN, T., RIEGER, R. y O'TOUSA, J.E. (1992) *Cell* 69, 669-676.
- * STEWART, A.A., CROUCH, D., COHEN, P. y SAFER, B. (1980) *FEBS Lett.* 119, 16-19.
- * STONE, S.R., HOFSTEENGE, J. y HEMMING, B.A. (1987) *Biochemistry* 26, 7215-7220.
- * STRALFORS, P., HIRAGA, A. y COHEN, P. (1985) *Eur. J. Biochem.* 149, 295-303.
- * STRYER, L. (1986) *Annu. Rev. Neurosci.* 9, 87-119.
- * SUTTON, A., IMMANUEL, D. y ARNDT., K.T. (1991) *Mol. and Cell. Biology* 11, 2133-2148.
- * TABOR, R.S. (1990) en *Current Protocols in Molecular Biology*. Published by Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience. AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A. y STRUHL, K.
- * TACHIBANA, K., SCHEUER, P.J., TSUKITANI, Y., KIKUCHI, H., VAN ENGEN, D., CLARDY, J., GOPICHAND, Y. y SCHMITZ, F.J. (1981) *J. Am. Chem. Soc.* 103, 2469-2471.
- * TAKAI, A., BIOLAJAN, C., TROSCKA, M. y RUEGG, J.C. (1987) *FEBS Lett.* 217, 81-84.
- * TAMURA, S. y TSUIKI, S (1980) *Eur. J. Biochem* 111, 217-224.
- * TAMURA, S., LYNCH, K.R., LARNER, J., FOX, J., YASUI, A., KIKUCHI, K., SUZUKI, Y. y TSUIKI, S. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1796-1800.
- * TAN, A.W.H., (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 582, 543-547.
- * TASH, J.S., KRINKS, M., PATEL, J., MEANS, R.L. KLEE, C.B. y MEANS, A.R. (1988) *J. Cell Biol.* 106, 1625-1633.
- * THALER, C.D. y HAIMO, L.T. (1990) *J. Cell Biol.* 111, 1939-1948.
- * THOMAS, J.A., SCHLENDER, K.K. y LARNER, J. (1968) *Anal. Biochem.* 25, 486-499.
- * TODA, T., CAMERON, S., SASS, P., ZOLLER, M., McMULLEN, B., HURWITZ, M., KREBS, E.G. y WIGLER, M. (1987a) *Mol. Cell. Biol.* 7, 1371-1377.
- * TODA, T., CAMERON, S., SASS, P., ZOLLER, M. y WIGLER, M. (1987b) *Cell* 50, 277-287.
- * TONKS, N.K., CHARBONNEAU, H., DILTZ, C.D., KUMAR, S., CICIRELLI, M.F., KREBS, E.G., WALSH, K.A. y FISCHER, E.H. (1989) *Adv. Prot. Phosphatases* 5, 149-180.

5. BIBLIOGRAFIA.

- * TOTH, B., BOLLEN, M. y STALMANS, W. (1988) J. Biol. Chem. 263, 14061-14066.
- * TSUIKI, S., KIKUCHI, K., TAMURA, S., HIRAGA, A. y SHNEHA, R. (1985) Adv. Protein Phosphatases 1. 193-214.
- * TRECO, A.D. (1990) en Current Protocols in Molecular Biology. AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A. y STRUHL, K. Published by Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience.
- * TUNG, H.Y.L., y COHEN, P. (1984a) Eur. J. Biochem. 145, 57-64.
- * TUNG, H.Y., RESINK, T.J., HEMMING, B.A., SHENOLIKAR, S. y COHEN, P. (1984b) Eur. J. Biochem. 138, 635-641.
- * TUNG, H.Y.L., ALEMANY, S. y COHEN, P. (1985) Eur. J. Biochem. 148, 253-263.
- * USUI, H., IMAZU, M., MAETA, K., TSUKAMOTO, H., AZUMA, K. y TAKEDA, M. (1988) J. Biol. Chem. 263, 3752-3761.
- * VAN HET SHIP, F.D., SAMALLO, J., BROOS, J., OPHIUS, J., MOJET, M., GRUBER, M. y GREER, A.B. (1987) J. Mol. Biol. 169, 245-260.
- * VERDE, F., LABBE, J.C., DOREE, M. y KARSENTI (1990) Nature 343, 233-238.
- * VILLA-MORUZZI, E. y DALLA ZONCA, P. (1991) Adv. Protein Phosphatases 6, Supp. 51-53.
- * VIRSHUP, D.M., KAUFFMAN, M.G. y KELLY, T.J. (1989) EMBO J. 8, 3891-3898.
- * WADZINSKI, B.E., HEASLEY, L.E. and JOHNSON, G.L. (1990) J. Biol. Chem. 265, 21504-21508.
- * YANG, S.I., LICKTEIG, R.L., ESTES R.C., RUNDELL, K., WALTER, G. y MUMBY, M.C. (1991) Mol. Cell. Biol. 11, 1988-1995.
- * YE, R.R. y BRETSCHER, A. (1992) Eur. J. Biochem. 204, 713-723.
- * VAN ZYL, W.H., WILLS, N. y BROACH, J.R. (1989) Genetics 123, 55-68.
- * WAELEKENS, E., GORIS, J. y MERLEVEDE, W. (1987) J. Biol. Chem 262, 1049-1059.
- * WOODGET, J.R., GOULD, K.L. y HUNTER, T. (1986) Eur. J. Biochem. 161, 177-184.




Universitat Autònoma de Barcelona

Servei de Biblioteques

Reg. 222749

Sig. _____

Ref. 12500

