




FACULTAT DE VETERINÀRIA DE BARCELONA

Dept. Bioquímica i Biologia Molecular



**CARACTERITZACIÓ  
MOLECULAR DE SUBUNITATS  
REGULADORES DE LA  
FOSFATASA PPZ1 EN EL  
LLEVAT *Saccharomyces  
cerevisiae*.**

IVAN MUÑOZ MUÑOZ

SETEMBRE 2004



Universitat Autònoma de Barcelona

Unitat de Veterinària

Dept. Bioquímica i Biologia Molecular

**CARACTERITZACIÓ**  
**MOLECULAR DE SUBUNITATS**  
**REGULADORES DE LA**  
**FOSFATASA PPZ1 EN EL**  
**LLEVAT *Saccharomyces***  
***cerevisiae*.**

**TESI DOCTORAL**

**IVAN MUÑOZ MUÑOZ**

**SETEMBRE 2004**

## **Caracterització molecular de subunitats reguladores de Ppz1 en *S. cerevisiae***

---

JOAQUIM ARIÑO CARMONA, Catedràtic del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFICO:

Que IVAN MUÑOZ MUÑOZ ha realitzat el treball amb títol:

**“Caracterització molecular de subunitats reguladores de la fosfatasa Ppz1 en el llevat *Saccharomyces cerevisiae*”**

sota la meva direcció en la Unitat de Veterinària del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona.

I perquè consti, a efecte de ser presentat com a memòria per a l'obtenció del grau de Doctor en Bioquímica i Biologia Molecular, signo el present certificat.

Dr. JOAQUIM ARIÑO CARMONA

Bellaterra, Setembre de 2004.

**ABREVIACIONS USADES EN AQUEST TREBALL**

<b>ATCC:</b>	<u>A</u> merican <u>T</u> ype <u>C</u> ulture <u>C</u> ollection
<b>BLAST:</b>	<u>B</u> est <u>L</u> ocal <u>A</u> lignment <u>S</u> earch <u>T</u> ool
<b>BZIP:</b>	<u>b</u> asic <u>L</u> eucine <u>Z</u> ipper
<b>CDK:</b>	<u>C</u> yclin <u>D</u> ependent Protein <u>K</u> inase
<b>CDRE:</b>	<u>C</u> alcineurin <u>D</u> ependent <u>R</u> esponsive <u>E</u> lement
<b>CFW:</b>	<u>C</u> alco <u>F</u> luor <u>W</u> hite
<b>CKI</b>	<u>C</u> yclin <u>D</u> ependent Protein <u>K</u> inase <u>I</u> nhibitor
<b>EF1-B<math>\alpha</math>:</b>	<u>E</u> longation <u>F</u> actor 1-B $\alpha$
<b>FMN:</b>	<u>F</u> lavin <u>M</u> ono <u>N</u> ucleotide
<b>GST:</b>	<u>G</u> lutathion- <u>S</u> - <u>T</u> ransferase
<b>HA:</b>	<u>H</u> emagglutinin
<b>HOG:</b>	<u>H</u> igh <u>O</u> smolarity <u>G</u> lycerol
<b>HPLC:</b>	<u>H</u> igh <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> romatography
<b>MAP:</b>	<u>M</u> itogen <u>A</u> ctivated <u>P</u> rotein
<b>MAPK:</b>	<u>M</u> itogen <u>A</u> ctivated <u>P</u> rotein <u>K</u> inase
<b>MBF:</b>	<u>S</u> wi6- <u>M</u> bp1 <u>B</u> inding <u>F</u> actor
<b>OA:</b>	<u>O</u> kadaik <u>A</u> cid
<b>ORF:</b>	<u>O</u> pen <u>R</u> eading <u>F</u> rame
<b>PNPP:</b>	<u>P</u> - <u>N</u> itrophenyl <u>P</u> iro <u>P</u> hosphate
<b>PP:</b>	<u>P</u> hosfopantethein
<b>PP:</b>	<u>P</u> rotein <u>P</u> hosphatase
<b>PPC:</b>	4'- <u>P</u> hosfopantothenoic <u>C</u> ystein
<b>SBF:</b>	<u>S</u> wi4- <u>S</u> wi6 <u>B</u> inding <u>F</u> actor
<b>SDS-PAGE:</b>	<u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulphate- <u>P</u> olyacrilamide <u>G</u> el <u>E</u> lectrophoresis
<b>SGD:</b>	<u>S</u> accharomyces <u>G</u> enome <u>D</u> atabase
<b>TMA:</b>	<u>T</u> etra <u>M</u> ethyl <u>A</u> mmonium
<b>TOR:</b>	<u>T</u> arget of <u>R</u> apamycin
<b>YPD:</b>	<u>Y</u> east <u>P</u> eptone <u>D</u> extrose

### **Agraïments:**

Tan lluny que em semblava fa uns anys i aquest moment ha arribat. Estic assegut davant la pantalla de l'ordinador pensant en totes aquelles persones a qui he d'agrair haver arribat fins aquí i poder, finalment, escriure el resultat del treball d'aquests darrers cinc anys. De sobte m'he sentit una mica aclaparat amb aquesta responsabilitat. M'acabo d'adonar que si hi ha una cosa que es mira tothom d'una tesi són, precisament, els agraïments. És molt de temps, i hi ha moltes persones amb les que estic, en major o menor grau, en deute. No voldria deixar-me a ningú. Siguin moltes hores de penes i treballs, sigui només un acudit, una paraula d'ànim o de comprensió o una mirada de complicitat, l'ajut de tota aquesta gent ha estat insubstituïble. Estic segur que si m'hagués faltat una sola d'aquestes persones en la meua vida jo no seria ara on sóc. No sé si aquestes línies podran substituir tot el temps que no he pogut passar amb elles ni les paraules d'agraïment que, de ben segur, no he pronunciat. Potser aquest sigui el moment: A tots vosaltres, de tot cor, Gràcies!

Primer de tot voldria agrair al Dr. Joaquim Ariño tot el temps i paciència que m'ha dedicat. La seva capacitat de treball i el seu afany per fer les coses bé són un estímul constant per a qualsevol i un exemple a seguir.

M'agradaria agrair especialment als meus companys de laboratori l'Ernesto, l'Amparo, la Raquel, la Laia i la Loli el fet d'haver compartit amb mi tots aquests anys. De ben segur que ells són, amb diferència, els que més m'han hagut d'aguantar, com si fos una mena de matrimoni, per "lo bo i lo dolent". Ningú com ells coneix com de repetitius poden arribar a ser els meus acudits i ningú com ells ha hagut d'aguantar amb paciència les meves preguntes, els meus dubtes i les conseqüències d'algú despistat com jo. Als "nous" i no tan nous, Maria Platara, Maribel, Asier, Martí i Xavi, que ens han permès recordar la il·lusió del que comença i amb els quals s'ha donat el necessari procés de renovació del laboratori. A aquelles persones que han passat pel laboratori i que finalment han triat camins diferents, no sense haver-nos deixat abans un munt de records inesborrables, com la Ester, l'Anna Ferré i la Judith.

Vull agrair al Pep Clotet, a la Laia de Nadal, al Cesc Posas i a l'Anna Barceló els coneixements que han compartit amb nosaltres i la paciència que van tenir quan tot just començàvem. Ells ens van ensenyar a moure'ns pel laboratori com si fos casa nostra. Al meu

## **Caracterització molecular de subunitats reguladores de Ppz1 en *S. cerevisiae***

---

"veí" l'Antonio Casamayor, per la seva fina ironia i la gran quantitat de coneixements que amaga darrere i que traspuen en la més banal de les converses.

Als altres "veïns" de laboratori. A la nombrosa família de "Fàtimos", Antonio, Joel, Judit, Alba, Vicky, Marta, Xavi, Carles, Albert, Ariadna...i sobretot amb els que he compartit festes i no tan festes, dinars, sopars, cafès, converses i somnis, com la Maria Ontiveros, el Sergio i l'Àlex. També a les "Bassoles" (que ja no van soles) i a les "Quintanilles" i, sobretot, al doctor Néstor Gómez.

Als tècnics de laboratori, com la "mama" Anna Vilalta i els seus carinyosos clatellots, la Mireia i la Maria Jesús, pel seu treball i dedicació.

A persones d'altres laboratoris amb qui ha estat un veritable plaer de treballar com els doctors Pascual Sanz, Adda Garcia-Gimeno i Armando Albert. La seva aclaparadora capacitat de fer un bon treball han estat un gran estímul per a mi.

Als meus vells amics i companys des de fa tant de temps, el "gran Jorge" (/Jordi Llopis Olvera), la "gran Eva", el Perpiman i el Super-Gregorio. Si hagués de fer una llista amb tot el que els dec...Gràcies per tot, nois, de tot cor. Als meus amics de Manresa, el Jordi Urraca, el Jordi Costa, l'Albert Riu i el Juanma. Sense la seva companyia, els seus "Nostradamus" i la seva paciència escoltant coses intel·ligibles sobre experiments complicats la vida seria molt, molt, avorrida.

A la meva família, els meus germans i, sobretot, els meus pares. Tot i que queda molt lluny, ells són els que van perdre temps i paciència en ensenyar-me a estudiar i a perseverar, a ser constant i a confiar en mi. Ells han invertit il·lusions i esforços i jo, òbviament, els ho dec tot a ells.

A la Sandra, per tot. Només ella ha patit com ningú el procés d'elaboració d'aquest treball i, amb tot, mai no m'ho ha retret. Sense ella, aquests darrers anys no haurien estat els mateixos i les meves il·lusions i esperances de futur, tampoc.

INDEX DE CONTINGUTS

1. PRESENTACIÓ.....	1
2. INTRODUCCIÓ.....	3
2.1- CARACTERÍSTIQUES GENERALS DE LES SER/THR FOSFATASES DE TIPUS Z DEL LLEVAT <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	
2.1.1- Classificació de les Ser/Thr Fosfatases de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	3
2.1.2- La Ser/Thr Fosfatasa de Tipus 1.....	4
2.1.3- Mecanismes d'interacció de les subunitats reguladores i la PP1c. El Motiu RVxF.....	6
2.1.4- Glc7, la Ser/ Thr Fosfatasa de Tipus 1 del llevat.....	8
2.1.5- Les fosfatases de Tipus Z del llevat: Ppz1 i Ppz2.....	10
2.1.6- Subunitats Reguladores de Ppz1. La proteïna Hal3.....	13
2.2- LES FOSFATASES PPZ I LA REGULACIÓ DEL CICLE CEL·LULAR EN <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	
2.2.1- El Cicle Cel·lular del Llevat.....	16
2.2.2- Mecanismes de Regulació del Cicle Cel·lular.....	17
2.2.3- L'Activitat d'algunes Ser/Thr Fosfatases és Important per a la Regulació del Cicle Cel·lular. La Fosfatasa Sit4 i la Via TOR.....	19
2.2.4- Paper de les Fosfatases PPZ en el Control del Cicle Cel·lular.....	20
2.3- LES FOSFATASES PPZ1 I PP1 I LA REGULACIÓ DE LA HOMEOSTASI SALINA EN <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	
2.3.1- El Transport d'Ions en la Regulació de la Homeostasi Intracel·lular.....	22
2.3.2- Principals Sistemes de Sortida d'Ions. Les ATPases Ena1 i Pma1.....	23
2.3.3- Principals Sistemes d'Entrada d'Ions. Els Transportadors Trk1 i Trk2.....	25
2.3.4- Paper de les Fosfatases PP1 i PPZ en la Regulació de la Tolerància Salina.....	26

2.4- LES FOSFATASES PP1 I PPZ I LA REGULACIÓ DE LA INTEGRITAT CEL·LULAR EN <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> .....	29
3. RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	32
3.1- IDENTIFICACIÓ DE SUPRESSORS MULTICÒPIA DE LA PARADA DEL CICLE CEL·LULAR EN LA TRANSICIÓ G1-S EN <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> .	
3.1.1- Creació d'un Doble Mutant Condicional <i>sit4Δ hal3Δ</i> .....	32
3.1.2- Identificació i Subclonació de ORFs Responsables del Fenotip Supressor...	33
3.1.3- Aïllament de 13 Gens Supressors del Fenotip de la Soca JC002.....	35
3.1.4- Les Fosfatases de Tipus 2A són Efectors Positius de la Transició G1/S.....	36
3.1.5- Aïllament de Ptc2, una Fosfatasa de Tipus 2C.....	38
3.1.6- Les Quinases Hal4 i Ptk2 són Reguladors Positius de la Transició G1/S.....	38
3.1.7- Aïllament de Nous Gens que Podrien Regular la Transició G1/S.....	39
3.1.7- Efecte de la Sobreexpressió dels Gens Supressors en els Fons Genètics <i>sit4Δ</i> , <i>hal3Δ</i> i <i>mpk1Δ</i> .....	41
3.2 CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL DE HAL3, LA SUBUNITAT INHIBIDORA DE LA FOSFATASA PPZ1 DEL LLEVAT, MITJANÇANT UN ESTUDI PER MUTAGÈNESI	
3.2.1 Avaluació de la Rellevància Funcional dels Residus His <sup>378</sup> i <sup>265</sup> HVLF <sup>268</sup> de Hal3.....	44
3.2.2 Un Experiment de Mutagènesi a l'Atzar Identifica una Zona de Hal3 Important per a la Unió i Inhibició de Ppz1.....	47
3.2.3 Un Estudi més Detallat d'alguns Residus Importants en la Unió i/o Inhibició de Ppz1 Revela Possibles Funcions de Hal3 Independents de la Fosfatasa.....	52
3.3- CARACTERITZACIÓ MOLECULAR D' <i>YPII</i> , UN NOU INHIBIDOR DE LA PROTEÏNA FOSFATASA DE TIPUS 1 DE <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> .	
3.3.1- El Producte del Gen YFR003c Interacciona Físicament amb Glc7 i amb Ppz1.....	55
3.3.2- Yfr003c és capaç d'inhibir específicament a la Fosfatasa Glc7.....	56



3.3.3- El Triptòfan 53 de Yfr003c és un Residu Important en la Unió i Inhibició de la Fosfatasa Glc7.....	58
3.3.4- <i>YPII</i> és un Gen Essencial.....	59
3.3.5- Anàlisi Fenotípic de la Sobreexpressió d' <i>YPII</i> .....	60
4. CONCLUSIONS.....	64
5. BIBLIOGRAFIA.....	66
6. ANNEXES:	

**ARTICLE 1:**

**Identification of multicopy suppressors of cell cycle arrest at the G1-S transition of *Saccharomyces cerevisiae*.**

Ivan Muñoz, Ernesto Simon, Nuria Casals, Josep Clotet and Joaquin Ariño.

Yeast 2003; 20:157-169.

**ARTICLE 2:**

**Functional Characterization of the Yeast Ppz1 Phosphatase Inhibitory subunit Hal3. A Mutagenesis Study.**

Ivan Muñoz, Amparo Ruiz, Maribel Marquina, Anna Barceló, Armando Albert and Joaquin Ariño.

The Journal of Biological Chemistry, 2004; 279:42619-42627.

**ARTICLE 3:**

**Molecular Characterization of Ypi1, a Novel *Saccharomyces cerevisiae* Type 1 Protein Phosphatase Inhibitor.**

Maria Adelaida Garcia-Gimeno, Ivan Muñoz, Joaquin Ariño and Pascual Sanz.

The Journal of Biological Chemistry, 2003; 278:47744-47752.

## **I. PRESENTACIÓ**

La fosfo-defosforilació de residus (serines, treonines i tirosines) és un dels mecanismes de regulació de proteïnes més estesos en els éssers vius. Aquest tipus de reaccions les porten a terme, de forma coordinada, les proteïnes quinases i les fosfatases. El genoma del llevat *Saccharomyces cerevisiae* codifica un nombre més elevat de serin/treonin quinases que de fosfatases. A diferència de les primeres, la localització subcel·lular, l'activitat i l'especificitat de substrat de moltes serin/treonin fosfatases ve marcada per la unió de la subunitat catalítica a diferents proteïnes que actuen com a subunitats reguladores. Així doncs, un aspecte molt interessant a resoldre és l'estudi del mecanisme d'actuació i d'interacció entre les subunitats reguladora i catalítica.

Una de les Ser/Thr fosfatases més estudiades en els darrers anys és la fosfatasa de tipus 1 (PP1). Aquesta proteïna, molt conservada a nivell evolutiu, és essencial i ha estat involucrada en multitud de processos biològics diferents, des del metabolisme dels carbohidrats a la regulació del cicle cel·lular. Tant la manca com l'excés d'activitat PP1 són perjudicials per a la cèl·lula, motiu pel qual aquesta proteïna presenta una regulació extremadament fina. Multitud de subunitats reguladores s'encarreguen de modular aquest enzim en les diferents funcions que desenvolupa en la cèl·lula. L'estudi de la unió entre les diferents subunitats reguladores i la fosfatasa han permès aprofundir en el coneixement de la regulació de la fosfatasa PP1. A més, han permès identificar, entre d'altres, una zona present en moltes d'aquestes subunitats reguladores, anomenada motiu RVxF, que és imprescindible per a la unió amb la fosfatasa i que interacciona amb una butxaca apolar de PP1 situada lluny del centre catalític de l'enzim.

El genoma del llevat presenta dos gens, anomenats *PPZ1* i *PPZ2*, que codifiquen les dues isoformes de les fosfatases de tipus Z d'aquest organisme. Aquestes proteïnes, àmpliament estudiades en el nostre laboratori, presenten una meitat carboxi-terminal que té una alta similitud amb la fosfatasa de tipus 1 del llevat i on es troba el centre catalític de l'enzim. A diferència de la PP1, les fosfatases de tipus Z no són essencials però intervenen en importants processos biològics, com són la regulació de la homeostasi salina, el manteniment de la integritat del llevat i la progressió del cicle cel·lular. En el moment d'iniciar aquest treball només es coneixia una subunitat reguladora per a Ppz1, codificada per *HAL3/SIS2*. El producte d'aquest gen interacciona amb la meitat carboxi-terminal i exerceix una regulació inhibidora de totes les funcions

conegudes de Ppz1. Estudis previs demostraven que Ppz1 i Sit4, una fosfatasa relacionada amb la família de les PP2A, desenvolupen funcions contràries en la regulació de la transició entre les fases G1 i S, un important punt de control del cicle cel·lular. Per aquest motiu, la del·lecció conjunta de *SIT4* i *HAL3* és letal. Aquest fet ens va portar a dissenyar un doble mutant condicional *sit4Δ hal3Δ*, una soca que en condicions no permissives presentava signes evidents d'una parada en fase G1. Amb aquesta soca hem realitzat un estudi per tal d'identificar nous gens involucrats en la regulació de la transició G1 a S i a la vegada aprofundir en el coneixement dels mecanismes d'acció de la fosfatasa Ppz1 en la biologia del llevat *Saccharomyces cerevisiae*. Aquest treball ens ha permès identificar una sèrie de gens que no havien estat involucrats prèviament en la transició G1/S i tres gens (que hem anomenat *VHS1-3*) dels quals no es disposava d'informació prèvia.

D'altra banda, el mecanisme d'interacció i d'inhibició que Hal3 du a terme sobre Ppz1 és desconegut. Tot i que les fosfatases PPZ són exclusives de fongs, Hal3 es troba força conservada evolutivament, amb homòlegs en fongs, plantes i mamífers. Estructuralment, Hal3 presenta una cua carboxi-terminal característica, extremadament rica en residus àcids. Per tal d'aprofundir en el mecanisme d'acció d'aquesta proteïna reguladora de Ppz1, hem portat a terme un estudi de mutagènesi dirigida que inclou una zona similar al motiu RVxF i un residu (His<sup>90</sup>) que es troba conservat i que s'ha demostrat que té un paper important en la funció de AtHal3a, una de les dues isoformes homòlogues de Hal3 que es troben en la planta *Arabidopsis thaliana*. A més, hem realitzat un estudi de mutagènesi a l'atzar de la zona més conservada de Hal3 seguit d'un estudi de pèrdua de funció, cosa que ens ha permès identificar una sèrie de residus importants per a la unió i/o inhibició de Ppz1.

Finalment, hem estudiat el paper biològic del gen YFR003c. Evidències fenotípiques preliminars apuntaven que la proteïna codificada per aquest gen podia interaccionar funcionalment amb la via de la fosfatasa Ppz1. Estudis més detallats *in vitro* ens han permès demostrar que aquesta proteïna és capaç d'unir-se i inhibir a la PP1c de llevat, codificada pel gen *GLC7*. Per aquest motiu hem posat a aquest gen el nom d'*YPI1* (Yeast Phosphatase Inhibitor 1). Estudis *in vivo* posteriors ens han permès aportar proves addicionals del paper d'aquesta proteïna com a reguladora negativa de *Glc7*, sense descartar que també pugui interaccionar amb la fosfatasa Ppz1.

## **II. INTRODUCCIÓ**

## **2.1- PAPER DE LES SER/THR FOSFATASES DE TIPUS Z EN LA BIOLOGIA DEL LLEVAT *Saccharomyces Cerevisiae*.**

La fosforilació de residus - sobretot en Serines, Treonines i Tirosines - és un dels mecanismes de regulació reversibles de l'activitat de les proteïnes més estesos en els éssers vius. Aquest procés és dut a terme per l'acció específica i oposada de les diferents proteïnes quinases i fosfatases presents en les cèl·lules eucariotes. Tot i que hom podria pensar que a cada quinasa li correspon una fosfatasa específica, el genoma dels organismes eucariotes codifica un nombre força més elevat de serin/treonin quinases que de fosfatases. Per tal de portar a terme la seva funció biològica, algunes Ser/Thr proteïnes fosfatases han desenvolupat una estratègia evolutiva basada en la unió a subunitats reguladores, que determinen l'activitat específica de l'enzim.

### **2.1.1- Classificació de les Ser/Thr Fosfatases de *Saccharomyces cerevisiae*.**

Les proteïnes fosfatases es classifiquen, depenent del tipus de residu que desfosforilen, en serin-treonin fosfatases, tirosin fosfatases i fosfatases duals (poden catalitzar la reacció de desfosforilació tant de serines i treonines com de tirosines). Les Ser/Thr fosfatases, les més abundants i sobre les quals se centra aquest treball, es classifiquen, al seu torn, en dos grans grups. D'una banda tenim el de les PPP, constituït per fosfatases àmpliament estudiades i representades en els organismes eucariotes, com les de tipus-1 i les fosfatases 2A i 2B. A l'altra banda trobem el grup de les PPM, que estaria format per les fosfatases de tipus-2C.

Les PPP presenten diferències bioquímiques i funcionals que s'han usat per a la seva subclassificació (Cohen i Cohen, 1989). Dins d'aquest grup, les de tipus-1 desfosforilen preferentment la subunitat  $\beta$  de la fosforilasa quinasa, mentre que les de tipus-2 actuen sobre la subunitat  $\alpha$ . A més, les PP1 són sensibles a l'activitat dels polipèptids inhibidors 1 i 2 i depenen de la presència de  $Mn^{2+}$  per a catalitzar *in vitro* la reacció de desfosforilació, mentre que les de tipus-2 no responen a aquests inhibidors. La necessitat de cations divalents ha permès classificar, al seu torn, les fosfatases de tipus 2 en PP2A, que no requereix d'aquests ions, i PP2B (també anomenada Calcineurina) que depèn de  $Ca^{2+}$  i de calmodulina per a dur a terme la seva funció. Estructuralment, totes les PPP comparteixen entre elles un alt grau de similitud,

especialment en una zona d'uns 150 aminoàcids, que és considerada el *core* catalític de l'enzim (Ingebritsen i Cohen, 1983; Stralfors *et al.*, 1985; Cohen *et al.*, 1989).

Un grup apart dins la família de les PPP el formen una sèrie de nous membres que, tot i que relacionats estructuralment amb les proteïnes de tipus 1 i 2A presenten trets diferencials en quant a la seva funció, com les fosfatases PPZ del llevat *Saccharomyces cerevisiae* (Cohen, 1997; Ariño, 2002), de les que parlarem a bastament en aquest treball.

Finalment, les PP2C presenten característiques comuns amb les de tipus-2A i 2B - actuen sobre la subunitat  $\alpha$  de la fosforilasa quinasa i no responen als inhibidors 1 i 2 - però són diferents a les PPP des del punt de vista estructural. A més, requereixen de la presència de  $Mg^{++}$  per a desenvolupar plenament la seva activitat, motiu pel qual s'han classificat, com dèiem, dins el grup de les PPM.

### **2.1.2- La Ser/Thr Fosfatasa de Tipus 1.**

Els estudis portats a terme els darrers anys amb la fosfatasa de tipus 1 han incrementat de forma significativa el coneixement que tenim del mecanisme d'acció i de regulació d'aquest important enzim eucariota. Això ha permès, a la vegada, entendre millor el paper d'aquestes proteïnes en la biologia cel·lular i facilitar l'estudi d'altres fosfatases similars.

La subunitat catalítica de la proteïna fosfatasa de tipus 1 (a partir d'ara PP1c) està codificada en els mamífers per 4 gens, coneguts amb el nom de PP1 $\alpha$ , PP1 $\beta$ , PP1 $\gamma$ 1 i PP1 $\gamma$ 2 (Dombrádi *et al.*, 1990; Shima *et al.*, 1993). En el llevat, en canvi, aquest enzim és el producte d'un sol gen, anomenat *GLC7* o *DIS2* (Kinoshita *et al.*, 1990; Clotet *et al.*, 1991; Feng *et al.*, 1991; Stark, 1996). Més significatiu que el nombre de isoformes és la presència, en la majoria d'organismes, de multitud de subunitats reguladores. En mamífers s'han descrit més de 50 proteïnes que d'alguna manera poden interaccionar amb la subunitat catalítica de PP1 (Ceulemans *et al.*, 2002); en el llevat en trobem un nombre menor, però igualment significatiu: fins a l'actualitat s'han descrit

més de 10 subunitats reguladores i les funcions que aquestes desenvolupen (veure més endavant).

La proteïna fosfatasa de tipus 1 participa en multitud de funcions cel·lulars, des de la regulació del metabolisme del glucogen, la fisiologia muscular, el processament del RNA, la síntesi proteica, la transmissió de senyals nervioses, la inducció de l'apoptosi i el control de diversos *checkpoints* i esdeveniments que es donen en les diferents fases del cicle cel·lular (per a una revisió detallada vegeu Cohen, 2002). Tant la manca com l'excés d'activitat PP1 són perjudicials per la cèl·lula. Per aquest motiu, i per a portar a terme totes aquestes funcions, la subunitat catalítica requereix de la unió amb diferents proteïnes reguladores, que són les responsables, no només de la localització subcel·lular del complex sinó també de la especificitat pel substrat. Això ha permès alguns autors de classificar aquestes subunitats en diferents grups, atenent al tipus de regulació que exerceixen sobre la isoforma catalítica. D'aquesta manera, M. Bollen (Bollen, 2001) diferencia entre: subunitats moduladores de l'activitat (com els inhibidors 1 i 2 ja mencionats); proteïnes *targeting* (que s'encarregarien de la localització de la subunitat catalítica); subunitats substrat (que a més de reguladores serien substrats de la fosfatasa) i un quart grup de pèptids, la funció dels quals encara està per determinar. Per aquest autor, la funció de la fosfatasa vindria donada, en cada moment, per la unió de la subunitat catalítica a una subunitat reguladora. La combinació de diferents proteïnes reguladores, cadascuna amb una capacitat d'interacció específica - possiblement regulable per fosfo-desfosforilació, hormones i metabòlits - amb la subunitat catalítica seria la responsable de la localització subcel·lular i la funció concreta del complex en cada situació particular.

Pel que fa a subunitats moduladores de l'activitat, és important destacar el cas dels inhibidors-1, 2 i DARPP-32. En tots tres casos es tracta de proteïnes termoestables, que interaccionen físicament i inhibeixen a la subunitat catalítica de PP1. El més remarcable és que la seva activitat pot ser modulada per fosfo-desfosforilació. Efectivament, la fosforilació de la Treonina 35 i la Serina 67 de l'inhibidor-1 i de la Treonina 34 de DARPP-32 (homòleg de I-1 que es troba principalment al teixit cerebral) per la proteïna quinasa dependent d'AMPC els converteix en potents inhibidors de la fosfatasa de tipus 1 (Bollen and Stalmans, 1992; Brautigan, 1994; Shenolikar, 1994; Endo *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 2000). Pel contrari, l'associació de l'inhibidor-2



desfosforilat amb la PP1c dóna lloc a un complex inactiu; aquest només pot ser reactivat mitjançant fosforilació del residu Thr<sup>72</sup> de l'Inhibidor-2 per la glucogen sintasa quinasa (GSK3) i/o la Ser<sup>86</sup> per la Caseina quinasa II (Merlevede *et al.*, 1984; Park *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 2000; Connor *et al.*, 2000). En aquests mecanismes inhibitoris podrien intervenir diferents regions de l'inhibidor, que interaccionarien amb zones específiques de la fosfatasa, amb una afinitat que es podria veure afectada per la fosforilació de residus concrets com els que hem mencionat (Huang *et al.*, 1999).

### 2.1.3- Mecanismes d'interacció de les subunitats reguladores i la PP1c. El Motiu RVxF.

Precisament és en la línia de la interacció específica entre la PP1c i les seves subunitats reguladores on s'han donat alguns dels avenços més significatius en el coneixement del mecanisme d'acció de aquesta fosfatasa. L'estudi de les proteïnes reguladores G<sub>M</sub>, G<sub>L</sub> i M<sub>110</sub>, involucrades en el metabolisme del glucogen, va demostrar que, *in vitro*, la presència d'una subunitat desplaçava les altres del complex proteic. Aquesta evidència experimental apuntava a que la unió d'aquestes a la PP1c era mútuament exclusiva i que, per tant, totes aquestes subunitats interaccionaven de la mateixa manera amb la PP1c o ho feien a través de seqüències parcial o totalment sobreposants. La comparació de les seqüències de G<sub>M</sub> i G<sub>L</sub> va permetre identificar una zona altament conservada de només 13 aminoàcids de G<sub>M</sub> que era capaç d'unir-se a la subunitat catalítica (Doherty *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 1997). La resolució tridimensional del cristall format pel complex G<sub>M</sub> unit a PP1c va demostrar la importància d'una petita seqüència, que es va anomenar motiu RVxF, en la interacció de G<sub>M</sub> amb la subunitat catalítica (Egloff *et al.*, 1997). Aquesta seqüència, inicialment de només 4 aminoàcids, s'acoblava a un canal apolar de la superfície de la fosfatasa, situat força lluny del centre catalític de l'enzim (Egloff *et al.*, 1997). Estudis addicionals amb biblioteques de pèptids van identificar les seqüències VxF i VxW precedides per residus bàsics (especialment una arginina o una lisina) com a motius d'unió a PP1c (Zhao i Lee, 1997). Multitud de treballs portats a terme tant amb proteïnes de mamífers com també de llevats han ajudat a definir la seqüència consens d'aquest important motiu d'unió, que sovint es troba degenerada, però que apareix en la majoria de les subunitats reguladores conegudes de mamífer (Bollen, 2001), així com també del llevat. Actualment es considera que el motiu RVxF estaria format, depenent dels autors, per la

seqüència **(R/K/H/N/S)**  $x_1$  **(V/I/L)**  $x_2$  **(F/W/Y)** on  $x_1$  pot trobar-se absent o ésser qualsevol residu excepte un aminoàcid hidrofòbic gran i  $x_2$  qualsevol aminoàcid excepte un residu hidrofòbic gran o una fosfoserina (en negreta, els residus més freqüents) (Bollen, 2001; Cohen, 2002; Ceulemans *et al.*, 2002).

Atenent a aquesta definició, el motiu RVxF es trobaria en gairebé el 10% de totes les proteïnes humanes, i un nombre similar en les d'altres organismes eucariotes (Cohen, 2002), la majoria de les quals, òbviament, no interaccionen amb la PP1c. Per a dur a terme la seva funció, cal que aquest residu quedi exposat en la superfície de la subunitat reguladora. A més, s'ha comprovat per algunes d'aquestes proteïnes que el motiu RVxF va precedit per les estructures anomenades repeticions d'anquirines, que formarien una mena de “mà” amb uns “dits” que intervindrien en la interacció amb la PP1c i facilitarien la unió mediada pel motiu RVxF. Per tant, per a cada proteïna concreta que contingui la seqüència consens, o una variació d'aquesta, cal determinar si aquesta juga un paper determinant en la funció de la proteïna. En aquest sentit, està descrit que la sola mutació dels residus hidrofòbic (V/I/L) i/o aromàtic (F/W/Y) del motiu és suficient per a disminuir o inhibir totalment la interacció amb l'enzim (Dombek *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2001).

A part del motiu RVxF, altres zones poden jugar un paper secundari en la unió de la subunitat reguladora amb la PP1c. Alguns autors, per exemple, apunten la existència d'un segon motiu d'interacció amb la fosfatasa que seria el següent: **F-x-x-(R/K)-x-(R/K)** (Garcia *et al.*, 2004; per a més informació vegeu la pàgina web: <http://pp1signature.pasteur.fr/>). A més, s'han descrit zones secundàries per algunes subunitats reguladores, amb un paper molt important en la regulació de la seva activitat. Aquest és el cas, per exemple, de la seqüència IKGI en l'inhibidor-2 (Huang *et al.*, 1999). Tot i que encara poc estudiades, aquestes interaccions addicionals - potser regulades per fosforilació, hormones i/o metabòlits - ajudarien no només a estabilitzar la unió mediada pel motiu RVxF sinó que també podrien modular-ne la activitat i especificitat (Bollen, 2001; Cohen, 2002).

### 2.1.4- Glc7, la Ser/ Thr Fosfatasa de Tipus 1 del llevat.

A diferència del què passa en els mamífers, el genoma del llevat només conté un gen, anomenat *GLC7*, que codifica per l'única isoforma catalítica de la PP1 en aquest organisme (Kinoshida *et al.*, 1990; Clotet *et al.*, 1991; Feng *et al.*, 1991). Aquest gen essencial, conegut també amb els noms de *DIS2* o *CID1* codifica una proteïna de 312 aminoàcids amb una massa molecular de 36 Kda, que presenta un alt grau de similitud amb les isoformes de mamífers i que, de forma anàloga al què passa en aquests, desenvolupa multitud de funcions en el llevat.

De la mateixa manera que la seva homòloga de mamífer, Glc7 necessita de la unió a diferents subunitats reguladores per a dur a terme totes aquestes funcions. Tot i això, en el moment d'iniciar aquest treball no es coneixia cap subunitat que actués com a inhibidora de Glc7. Fins i tot l'homòleg de llevat de l'inhibidor 2 de mamífer, anomenat Glc8 (Tung *et al.*, 1995), actua més aviat com a activador de Glc7 (Nigavekar *et al.*, 2002). Igual com passa en mamífers, aquestes subunitats també solen contenir un (o més) motius RVxF imprescindibles per a la unió amb la subunitat catalítica i la seva mutació té efectes dràstics en la funció de la proteïna reguladora (Dombek *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2001). (Es pot veure una recopilació de les diferents subunitats reguladores de Glc7 descrites en el llevat a la **Taula 1**).

Pel què fa a les funcions que desenvolupa, *GLC7* va ésser identificat inicialment com un gen relacionat amb el metabolisme de carbohidrats en el llevat, donat que és necessari per l'acúmul de glucogen intracel·lular (Peng *et al.*, 1990; Feng *et al.*, 1991; Hardy i Roach, 1993). Igual com passa en mamífers, la PP1c del llevat és la responsable d'activar mitjançant desfosforilació a la glucogen sintasa, la isoforma principal de la qual és codificada pel gen *GSY2* en *Saccharomyces cerevisiae*. Aquest procés sembla ser regulat per la unió de la fosfatasa a la subunitat codificada per *GAC1* que conté una zona d'unió a la glucogen sintasa a més d'un motiu RVxF necessari per a la interacció amb Glc7 (Wu *et al.*, 2001).

## Caracterització molecular de subunitats reguladores de Ppz1 en *S. cerevisiae*

**Taula 1:**

Subunitats reguladores de Glc7 i funcions que regulen en el llevat *Saccharomyces cerevisiae*.

NOM	FUNCIONS	Motiu RVxF	HOMÒLEGS FUNCIONALS MAMÍFERS	REFERÈNCIES
<i>BNI4</i>	Mitosi. Aparició gema i localització quitina sintasa.	+	-	De Marini <i>et al.</i> , 1997; Kozubowski <i>et al.</i> , 2003
<i>BUD14</i>	Mitosi. Resposta a feromones, creixement polaritzat i filamentós.	(+)	-	Cullen <i>et al.</i> , 2002
<i>EGP1</i>	Control del creixement	(+)	-	Hisamoto <i>et al.</i> , 1995
<i>FIN1</i>	Mitosi?	(+)	-	Mayordomo and Sanz, 2002
<i>GAC1</i>	Metabolisme glucogen. Unió a glucogen sintasa ( <i>Gsy2</i> )	+	Ppp1r3c/R5	François <i>et al.</i> , 1992; Wu <i>et al.</i> , 2001
<i>GIP1</i>	Meiosi i esporulació. Organització septines i formació paret espora.	(+)	Ppp1r3c/R5	Tu <i>et al.</i> , 1996; Tachikawa <i>et al.</i> , 2001
<i>GIP2</i>	Metabolisme glucogen?	(+)	Ppp1r3c/R5	Tu <i>et al.</i> , 1996
<i>GLC8</i>	Metabolisme glucogen.	(+)	Inhibidor-2/Ppp1r2	Tung <i>et al.</i> , 1995; Nigavekar <i>et al.</i> , 2002; Tan <i>et al.</i> , 2002
<i>MHP1</i>	Citosquelet	(+)	Tau	Irminger <i>et al.</i> , 1996; Irminger <i>et al.</i> , 1998; Walsh <i>et al.</i> , 1998
<i>PIG1</i>	Metabolisme Glucogen.	(+)	Ppp1r3c/R5	Cheng <i>et al.</i> , 1997
<i>PIG2</i>	Metabolisme Glucogen. Mitosi?	(+)	Ppp1r3c/R5	Cheng <i>et al.</i> , 1997
<i>RED1</i>	Meiosi i esporulació	(+)	-	Rockmill <i>et al.</i> , 1988; Tu <i>et al.</i> , 1996; Bailis <i>et al.</i> , 2000
<i>REG1/HEX2</i>	Repressió per glucosa	+	-	Tu and Carlson, 1995; Alms <i>et al.</i> , 1999; Dombek <i>et al.</i> , 1999; Sanz <i>et al.</i> , 1999
<i>REG2</i>	Repressió per glucosa. Regulació creixement.	(+)	-	Frederick and Tatchell, 1996
<i>SCD5/FTB1</i>	Secreció. Organització citosquelet d'actina i endocitosi.	+	Ppp1r3b/GL	Tu <i>et al.</i> , 1996; Chang <i>et al.</i> , 2002
<i>SDS22/EGP1</i>	Mitosi. Estabilitat cromosòmica i localització nuclear	-	Ppp1r7/Sds22	Mackelvie <i>et al.</i> , 1995; Hong <i>et al.</i> , 2000; Peggie <i>et al.</i> , 2001
<i>SHP1</i>	Mitosi. Diferenciació en Meiosi. Metabolisme Glucogen.	(+)	-	Zhang <i>et al.</i> , 1995
<i>SLA1</i>	Ensamblatge citosquelet. Endocitosi.	(+)	-	Holtzman <i>et al.</i> , 1993; Venturi <i>et al.</i> , 2000.
<i>YPI1</i>	Mitosi, metabolisme glucogen, integritat cel·lular	+	Ppp1r11/Inhibidor-3/HCG-V	Garcia-Gimeno <i>et al.</i> , 2003

En la casella Motiu RVxF, el signe + indica la presència d'un motiu RVxF la importància funcional del qual ha estat estudiada. El signe (+) indica la existència en la proteïna d'una o més seqüències compatibles amb aquest motiu però que no han estat prèviament mapejades. La recerca informàtica d'aquestes seqüències s'ha realitzat amb el programa Network Protein Sequence Analysis, disponible a la xarxa en: <http://npsa-pbil.ibcp.fr>.

A part de la que acabem de mencionar, s'han descrit multitud de funcions en les que la desfosforilació induïda per Glc7 té un paper més o menys rellevant. Així, s'ha vist que l'activitat fosfatasa de Glc7 és important en el fenomen de repressió per glucosa, procés regulat per subunitats com Reg1 i Reg2 (Tu i Carlson, 1995; Huang *et al.*, 1996; Frederick i Tatchell, 1996; Sanz *et al.*, 1999). Diferents estudis han posat en

evidència que Glc7 és imprescindible en la mitosi, concretament en la progressió del cicle entre les fases G2 a M (Hisamoto *et al.*, 1994; Francisco *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1995; Black *et al.*, 1995; Bloetcher i Tatchell, 1999) però també durant el desenvolupament de la meiosi (Zhang *et al.*, 1995; Tu *et al.*, 1996). A raó de diferents treballs, sembla evident que Glc7 juga un paper molt important en la regulació del funcionament del citoesquelet del llevat. Així, és responsable de la formació dels *kinetochore*, i la manca d'activitat PP1 activa el *checkpoint* que controla la formació del fus acromàtic (*spindle/kinetochore*) (Bloetcher i Tatchell, 1999; Sassoon *et al.*, 1999); en concret, el complex format per Glc7 i la subunitat codificada per *GLC8* regulen la correcta segregació de les cromàtides germanes que es dona en l'anafase. D'altra banda, la unió de la proteïna Bni4 a Glc7 és responsable de la localització de la quitina sintasa en el coll de la gema (*bud neck*) (Kozubowsky *et al.*, 2003); el complex format per Scd5 i Glc7 és important per a la regulació de la endocitosi i la reorganització del citoesquelet d'actina (Chang *et al.*, 2002); la unió de Gip1 i Glc7 regula l'organització de les septines i la formació de la paret de l'asca durant el procés d' esporulació (Tachikawa *et al.*, 2001) i, finalment, Glc7 controla el creixement filamentós i polaritzat i la resposta a feromones mitjançant la unió a la subunitat coneguda com a Bud14 (Cullen i Sprague, 2002).

Finalment, i gràcies a l'estudi del fenotip de diferents al·lels mutants de Glc7, s'ha posat de manifest que aquesta proteïna també pot participar en el manteniment de la integritat cel·lular (Andrews i Stark, 2000) i en regulació de la homeostasi iònica del llevat (Williams-Hart *et al.*, 2002), tot i que no es coneixen les subunitats que regulen aquestes funcions de la fosfatasa.

### 2.1.5- Les fosfatases de Tipus Z del llevat: Ppz1 i Ppz2.

Com hem dit anteriorment, algunes de les darreres funcions identificades per a Glc7 estan relacionades amb el manteniment de la homeostasi salina i la integritat cel·lular. En aquest sentit, el genoma del llevat codifica dues fosfatases no essencials anomenades Ppz1 i Ppz2, de 692 i 710 aminoàcids, respectivament, que a més de desenvolupar un paper important en la progressió del cicle cel·lular a nivell de la transició G1/S (Clotet *et al.*, 1999) són claus en la tolerància osmòtica i salina del llevat (Posas *et al.*, 1993; Posas *et al.*, 1995-a). Tot i que no presenten homòlegs en

organismes superiors, s'han trobat proteïnes similars en altres fongs com *Schizosaccharomyces pombe* (anomenada Pzh1) i *Neurospora crassa* (Pzl-1). Aquestes comparteixen amb Ppz1 i Ppz2 característiques estructurals i funcionals (Balcells *et al.*, 1997; Balcells *et al.*, 1998; Szoor *et al.*, 1998; Vissi *et al.*, 2001). Des del punt de vista estructural, aquestes fosfatases presenten dues meitats diferenciades. La carboxi-terminal (d'uns 300 aminoàcids) és força similar en totes elles; en aquesta zona Ppz1 i Ppz2 comparteixen una identitat del 93% a nivell aminoacídic i a la vegada un 62% d'identitat amb el *core* catalític de PP1c. La zona amino-terminal és molt més variable. En Ppz1 i Ppz2, és rica en Ser i Thr i presenta un residu (Gly2) que s'ha comprovat que en Ppz1 és miristilat *in vivo*. S'ha descrit que aquesta meitat pot jugar un paper important en la funció de Ppz1, possiblement com a reguladora de la carboxi-terminal, on resideix l'activitat fosfatasa de la proteïna (Clotet *et al.*, 1996). La presència de Ser i Thr en la extensió amino-terminal fa pensar en un mecanisme de regulació per fosfo-desfosforilació d'aquest enzim; de fet, s'ha demostrat que, *in vitro*, aquesta zona pot ésser fosforilada per les quinases PK-A, PK-C i CK-2 (Posas *et al.*, 1995-b). Malauradament, aquesta possibilitat no ha pogut ésser demostrada *in vivo* (resultats no publicats).

La primera de les funcions descrites per a les fosfatases PPZ té a veure amb el manteniment de la integritat cel·lular. La del·lecció de *PPZ1* produeix un defecte lític que és més evident en certes circumstàncies, especialment a altes temperatures i/o si s'afegeix al medi determinades concentracions de cafeïna (Posas *et al.*, 1993). La del·lecció de *PPZ2*, que no presenta cap fenotip observable en una soca salvatge, agreuja considerablement els efectes de la manca de Ppz1. A més, aquests efectes són additius amb la falta de Mpk1/Slt2, la MAP-quinasa situada al final de la via de transducció de senyal involucrada en el manteniment de la integritat cel·lular del llevat i controlada per la quinasa Pkc1. De fet, la doble delecció de *PPZ1* i *MPK1* dóna lloc a un fenotip lític letal que només pot ésser compensat per l'addició de sorbitol, un polialcohol que proporciona estabilitat osmòtica al medi. De forma oposada, la sobreexpressió de *PPZ1* compensa part dels defectes característics d'una soca *mpk1Δ* (Posas *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1993; Posas *et al.*, 1995-a).

La segona de les funcions té a veure amb el manteniment de la homeostasi salina. La falta de Ppz1 incrementa de forma molt notable la tolerància del llevat a altes concentracions d'alguns cations tòxics, com sodi o liti, efecte que es veu incrementat per la delecció conjunta d'ambdues fosfatases. Almenys part d'aquest fenotip és degut a un increment de la expressió d'*ENA1/PMR2* (Posas *et al.*, 1995; Ruiz *et al.*, 2003), un gen finament regulat a nivell transcripcional i que codifica una ATPasa de sodi que constitueix el principal element detoxificador d'aquest ió en *S. cerevisiae* (Haro *et al.*, 1991). Estudis més recents (Yennush *et al.*, 2002; Merchan *et al.*, 2004), que tractarem més endavant a bastament, atorguen a les fosfatases PPZ un paper rellevant en el control de l'activitat dels transportadors de potassi anomenats Trk1 i Trk2, que tenen una funció destacada en el manteniment del potencial de membrana i per tant de la homeostasi salina del llevat

Les proteïnes fosfatases PPZ també estan involucrades en la regulació de la traducció de proteïnes (De Nadal *et al.*, 2001). La resolució de gels d'electroforesis bidimensionals comparant extractes proteics marcats amb  $^{32}\text{P}$  va permetre identificar una proteïna que presentava una mobilitat diferent en dobles mutants *ppz1Δ ppz2Δ* comparat amb cèl·lules salvatges. Un cop identificada, aquesta proteïna va resultar ésser la subunitat 1B $\alpha$  del factor de elongació de la traducció (eEF1- $\beta$ ). Tot i que no s'ha pogut demostrar que desfosforili aquest element, Ppz1 és capaç d'unir-se *in vitro* amb eEF1- $\beta$ . A més, la manca de la fosfatasa disminueix la sensibilitat a drogues que inhibeixen la traducció, i la sobreexpressió del factor d'elongació alleuja els defectes de creixement associats a la sobreexpressió de Ppz1, efecte que es perd en el mutant eEF1- $\beta$  S86A. Aquestes evidències experimentals apunten a un paper de Ppz1 sobre l'estat de fosforilació del factor d'elongació i, possiblement, en la fidelitat de la traducció (De Nadal *et al.*, 2001).

A més de les funcions que hem descrit fins ara, les fosfatases PPZ també juguen un paper molt important en la progressió del cicle cel·lular. La sobreexpressió de Ppz1 dona lloc a un fenotip de creixement lent, un retard en l'aparició de la gema i la duplicació del DNA i una disminució en els nivells de ciclins (*CLN2* i *CLB5*), que es tradueixen en un alentiment en la transició de la fase G1 a S del cicle. Aquest efecte, com veurem més endavant, és contrari en molts aspectes al que porta a terme una altra

fosfatasa relacionada amb el grup de les PP2A, codificada per *SIT4* (Clotet *et al.*, 1999). La delecció d'aquest gen produeix, depenent del fons genètic, cèl·lules inviàbles o cultius que presenten un creixement molt lent amb un alt percentatge de cèl·lules no gemades (Sutton *et al.*, 1991-a).

### 2.1.6- Subunitats Reguladores de Ppz1. La proteïna Hal3.

Els defectes associats a la manca de *SIT4* poden ser compensats, en part, per la sobreexpressió de *SIS2* (Di Como *et al.*, 1995-a). Aquest gen és al·lèlic de *HAL3*, que va ser clonat en un *screen* paral·lel com un important factor involucrat en la tolerància salina en *S. cerevisiae*. Efectivament, la sobreexpressió d'aquest gen permet al llevat de créixer en medis amb un alt contingut de sodi o liti, de forma parcialment dependent d'*ENAI* i independent de calcineurina, mentre que la seva delecció produeix halosensibilitat (Ferrando *et al.*, 1995). Aquest mecanisme d'acció és justament contrari a com actua la fosfatasa Ppz1. Això va permetre el nostre laboratori d'establir una relació funcional entre ambdós gens (De Nadal *et al.*, 1998). En el moment d'iniciar el treball que presentem aquí s'acabava de descriure que Hal3 actuava com la primera subunitat reguladora coneguda de Ppz1, capaç d'unir-se i inhibir la fosfatasa *in vivo* i *in vitro*. De fet, es va demostrar que la unió de Hal3 a la meitat carboxi-terminal de Ppz1 regula totes les funcions conegudes de la fosfatasa (De Nadal *et al.*, 1998).

El gen *HAL3/SIS2* codifica una proteïna de 562 aminoàcids amb una cua carboxi-terminal molt característica, extremadament rica en residus àcids (sobretot àcids aspàrtics). A diferència de les fosfatases PPZ, exclusives de fongs, crida l'atenció el fet que Hal3 es trobi força conservada evolutivament, amb homòlegs en fongs, plantes i mamífers, tot i que en general no mantenen la cua àcida. Com ja hem dit, aquesta proteïna actua en el llevat com a subunitat reguladora de la fosfatasa Ppz1 (De Nadal *et al.*, 1998) i, molt possiblement, també de Ppz2 (Ruiz *et al.*, 2003). Hal3 s'uneix a la zona carboxi-terminal de Ppz1, on resideix el centre catalític de l'enzim. Aquesta unió inhibeix l'activitat fosfatasa de Ppz1 tant *in vitro* com, probablement, *in vivo* (De Nadal *et al.*, 1998). Com caldria esperar, la sobreexpressió de *HAL3* té efectes contraris als de *PPZ1*; és a dir, hi ha un increment de la tolerància del llevat a altes concentracions de cations potencialment tòxics, com sodi o liti (Ferrando *et al.*, 1995); agreuja el fenotip lític d'un mutant *slt2/mpk1Δ*, de forma que la soca resultant només és viable si s'afegeix



al medi sorbitol (De Nadal *et al.*, 1998); és capaç de recuperar, en part, el defecte de creixement associat a la del·lecció de la fosfatasa Sit4 i induir-ne la síntesi de ciclins (Di Como *et al.*, 1995a; Clotet *et al.*, 1999); accelera la sortida d'una parada induïda per la feromona  $\alpha$ -factor (Di Como *et al.*, 1995a; Ferrando *et al.*, 1995) i incrementa la velocitat de gemació (De Nadal *et al.*, 1998). Per a desenvolupar totes aquestes funcions, Hal3 depèn totalment de la presència de Ppz1 i de Ppz2, de manera que en absència d'aquestes dues fosfatases la sobreexpressió de *HAL3* no té efectes fenotípics (De Nadal *et al.*, 1998; Ruiz *et al.*, 2003). Pel contrari, la manca de Hal3 incrementa de forma evident la sensibilitat a cations tòxics (Ferrando *et al.*, 1995; De Nadal *et al.*, 1998) i millora el defecte lític d'un mutant *mpk1* $\Delta$  (De Nadal *et al.*, 1998). Finalment la doble del·lecció *sit4 hal3* produeix un fenotip de letalitat sintètica consistent amb un bloqueig en la fase G1 (Di Como *et al.*, 1995a; Simon *et al.*, 2001). L'efecte de Hal3 en la progressió de cycle cel·lular també és absolutament dependent de la presència de Ppz1. Per aquest motiu, s'ha proposat que Sit4 i el complex Hal3-Ppz1 podrien regular la transició entre les fases G1 i S del cycle cel·lular en dues vies de senyalització de funció contraposada (Clotet *et al.*, 1999).

Com ja hem mencionat anteriorment, Hal3 està conservada evolutivament. Estudis portats a terme amb *Arabidopsis thaliana* van demostrar que la isoforma proteica coneguda com AtHal3a d'aquesta planta era capaç de complementar, en part, el defecte salí d'una soca de llevat *hal3* $\Delta$ . A més, es va observar que quan aquesta proteïna era expressada en bactèria mitjançant una fusió amb una cua de poli-histidines, la mostra purificada adquiria una tonalitat groguenca, característica d'enzims que contenen un cromòfor. El coenzim alliberat de la proteïna per calor i analitzat mitjançant HPLC va resultar ésser un grup flavinmononucleòtid (FMN), cosa que demostra que AtHal3 és, en realitat, una flavoproteïna (Espinosa-Ruiz *et al.*, 1999). Aquesta proteïna ha estat posteriorment cristal·litzada i se n'ha resolt la estructura tridimensional (Albert *et al.*, 2000). Aquests autors apunten la possibilitat que AtHal3a actuï com a una deshidrogenasa, en part gràcies a la seva similitud amb la proteïna bacteriana anomenada EpiD, una flavoproteïna involucrada en la maduració del lantibiòtic Epidermina. En aquest mecanisme intervindria la Histidina 90 (que en alineament de seqüència es correspondria amb la His<sup>378</sup> de Hal3). Treballs posteriors han definit una funció concreta per a AtHal3, si més no *in vitro*. Aquesta flavoproteïna

és capaç de catalitzar la reacció de descarboxilació de 4'-Fosfopantotenoilcisteïna (PPC) a Fosfopantetheïna (PP), un pas clau en la síntesi de CoenzimA. Ara bé, en aquest procés tindria un paper destacat la Cisteïna 175 que, sorprenentment, no es troba conservada en Hal3 (Kupke *et al.*, 2001; Kupke *et al.*, 2003; Hernández-Acosta *et al.*, 2002; Steinbacher *et al.*, 2003).

El genoma del llevat presenta dos ORF, *YOR054c*, i *YKL088w* que codifiquen dues proteïnes, des del punt de vista estructural, homòlogues de Hal3. Totes tres comparteixen una important similitud en la meitat carboxi-terminal de la seqüència i totes presenten una cua carboxi-terminal molt àcida. El primer d'aquests gens, *YOR054c*, no essencial, ha estat clonat com a supressor multicòpia d'una soca mutant condicional *sit4 hal3* en la recerca experimental que presentem en aquest treball, i ha rebut el nom de *VHS3* (Muñoz *et al.*, 2003; veure resultats i discussió). Aquest gen és un probable homòleg funcional de Hal3, ja la seva sobreexpressió és capaç de complementar, en part, els defectes fenotípics associats a la falta de Hal3 (Muñoz *et al.*, 2003; Ruiz *et al.*, 2004). A més, s'ha demostrat que *VHS3* es pot unir a Ppz1 *in vivo* i *in vitro* i inhibeix l'activitat de la fosfatasa d'una forma gairebé tant eficient com Hal3. D'altra banda, la doble del·lecció de *HAL3* i *VHS3* és letal, efecte del qual no se'n coneixen les causes però que cal destacar que sembla ser independent de la presència de les fosfatases PPZ (Ruiz *et al.*, 2004). Pel contrari, cal remarcar que *YKL088w* sí és essencial i codifica una proteïna la funció de la qual és desconeguda pel moment, però que podria actuar de forma contrària a Vhs3 i Hal3 i, a més, tenir funcions independents de Ppz1 (Ruiz *et al.*, no publicat). Ambdós gens estan essent caracteritzats amb detall en el nostre laboratori.

Un important tema a resoldre és el mecanisme d'acció de Hal3 sobre Ppz1. Encara no es coneixen els residus involucrats en la interacció entre ambdues proteïnes, ni com Hal3 és capaç d'inhibir a la fosfatasa. L'estudi de la estructura de Hal3 no aporta gaires pistes. Hal3 conté una zona ,<sup>263</sup>KLHVLF<sup>268</sup>, que s'assembla al motiu RVxP present en moltes subunitats reguladores de PP1c. Amb tot, Hal3 no s'uneix ni inhibeix a Glc7 *in vitro* (De Nadal *et al.*, 1998; Garcia-Gimeno *et al.*, 2003). D'altra banda, no es coneix si ScHal3 té a veure amb la síntesi de CoenzimA, ja que tot i que conservaria la His<sup>378</sup>, relacionada amb el possible mecanisme de deshidrogenació proposat per a AtHal3, no presenta la cisteïna involucrada en la descarboxilació de PPC.

## **2.2- LES FOSFATASES PPZ I LA REGULACIÓ DEL CICLE CEL·LULAR EN *Saccharomyces Cerevisiae***

Un dels objectius més importants de la biologia continua essent comprendre la successió d'esdeveniments que es donen durant el complex procés de divisió cel·lular. El llevat, com qualsevol cèl·lula eucariota, ha d'integrar multitud de senyals externs i interns abans de decidir-se a començar un nou cicle cel·lular. Un cop iniciat, s'han de donar tota una sèrie de successos en un precís programa temporal que, de forma seqüencial i molt ben coordinada, desemboquin en la duplicació de tot el material genètic i l'obtenció de dues cèl·lules filles.

### **2.2.1- El Cicle Cel·lular del Llevat**

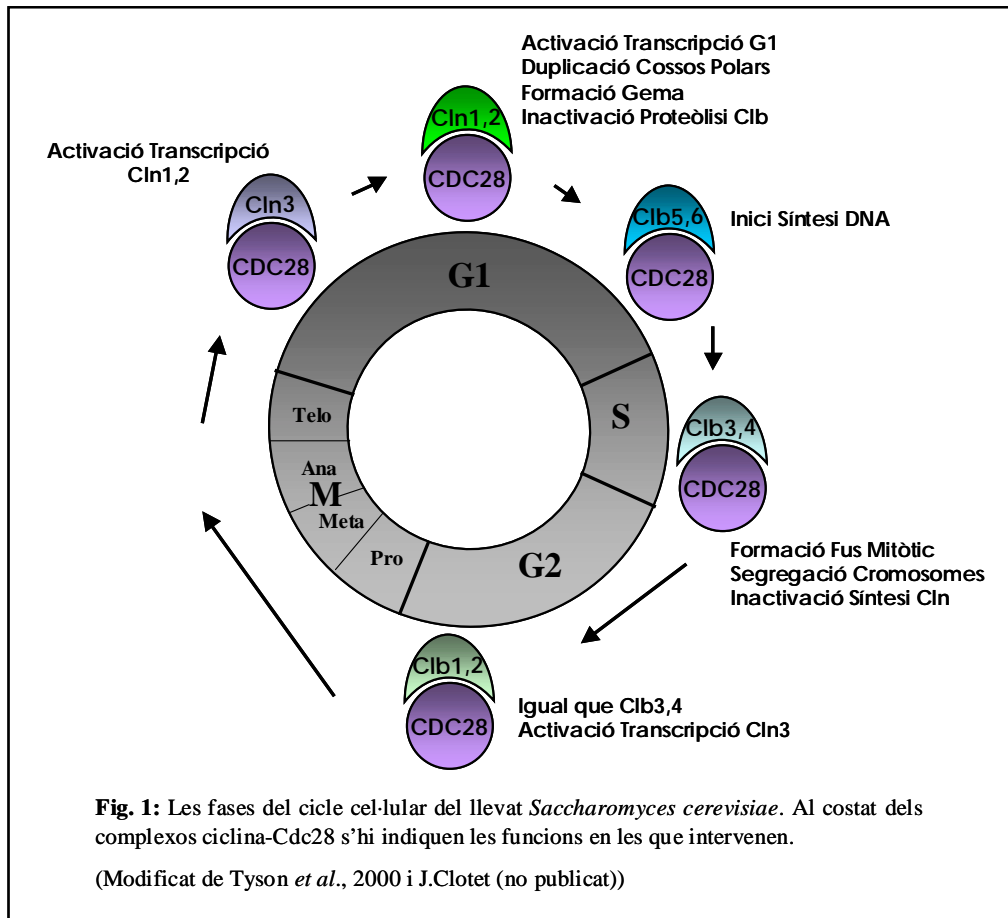
En tot procés de divisió cel·lular hi ha dos fets conceptuals que cal que es donin de forma gradual i coordinada. Un d'ells és la replicació del DNA (ó cicle cromosòmic) i l'altre és el creixement de la cèl·lula en tamany i components cel·lulars i la posterior separació de les dues cèl·lules filles (o cicle de creixement) (Per a una revisió, veure Tyson *et al.*, 2002).

En els organismes eucariotes el cicle cromosòmic es dona en dues fases diferents. En la primera d'elles, anomenada fase S (per Síntesis del DNA), el material genètic es duplica, donant lloc a l'aparició de les cromàtides germanes, unides per unes proteïnes anomenades cohesines. En la segona fase, coneguda per M o Mitosi, aquestes cromàtides es separen i passen a cadascuna de les dues cèl·lules filles. Aquestes dues fases estan separades per dos *gaps*, o intervals, coneguts com a G1 i G2. La successió d'aquests processos dona lloc al típic cicle cel·lular eucariota: G1-S-G2-M. Per tal de controlar que l'alternança d'aquestes fases es fa de forma correcta, la cèl·lula presenta dos punts de control o *checkpoints*. El primer, situat en G1, controla que les condicions externes siguin correctes, que la cèl·lula sigui prou gran com per iniciar un nou cicle i que els possibles danys en el DNA que s'hagin pogut donar en l'anterior duplicació hagin estat correctament reparats. El *checkpoint* de la fase G2 controla que el DNA s'hagi duplicat correctament durant la fase S, s'hagin corregit possibles nous danys en el material genètic i que la cèl·lula sigui prou gran com per entrar en una nova mitosi (Per una revisió completa, vegeu Chen *et al.*, 2000 i Tyson *et al.*, 2002).

### 2.2.2- Mecanismes de Regulació del Cicle Cel·lular.

En el llevat *Saccharomyces cerevisiae* la decisió d' iniciar la entrada en un nou cicle es dóna en un punt clau de control anomenat *Start*, situat en la transició de les fases G1 i S. L'element central en el control de l'execució d'aquest punt clau de no retorn, on s'inicia la duplicació del DNA, dels cossos polars i l'aparició incipient de la gema, és la quinasa dependent de ciclins (o CDK) codificada pel gen *CDC28* (Mendenhall i Hodge, 1998). A diferència del que passa en mamífers, Cdc28 és la única de les cinc CDK que en el llevat que s'encarrega del control del cicle cel·lular. La expressió de *CDC28* és força estable de manera que la seva activitat ve marcada, no només per fosfo-desfosforilació, sinó sobretot per la unió a un tipus de proteïnes anomenades ciclins. Aquestes, al seu torn, es defineixen com proteïnes capaces d'unir-se i activar una CDK. Les ciclins mostren importants i característiques fluctuacions periòdiques al llarg del cicle. Per aquest motiu, tradicionalment s'han classificat en dos grans grups: les ciclins de G1 (Cln1, Cln2 i Cln3), que s'expressen de forma preferent en aquesta fase, i les ciclins de tipus B, de Clb1 a Clb6, que s'expressen en tres onades successives des del punt de *Start* fins a la Mitosi.

Cap al final de la telofase, el complex format per Cdc28 i Cln3 és el responsable del control del tamany de la cèl·lula. Quan aquesta ha assolit unes proporcions adequades, Cln3-Cdc28 activa els complexos transcripcionals coneguts com a SBF (format per Swi4 i Swi6) i MBF (Swi6 i Mbp1). Aquests factors de transcripció són els responsables de la inducció específica de gens que es dóna en la fase G1, entre els quals destaquen les ciclins *CLN1*, *CLN2*, *CLB5* i *CLB6*. Aquestes, al seu torn, regulen els esdeveniments que es donaran a continuació, és a dir, l'inici de la gemació i duplicació dels cossos polars i del DNA i també l'expressió de la onada de ciclins de la fase S (*CLB3* i *CLB4*). En la següent fase, coneguda com a G2, el llevat torna a créixer i es prepara per a iniciar la Mitosi. D'aquest procés s'encarreguen les ciclins de G2 (Clb1 i Clb2) que al seu torn actuen com a desencadenants de la nova onada de ciclins que es donarà en la transició M/G1 (*CLN3* i *CLB6*) i, per tant, de la entrada, si és pertinent, a un nou cicle cel·lular (**Figura 1**).



Molts altres elements modulen o actuen de forma paral·lela a la transcripció específica de cicle cel·lular mediada pels complexos SBF i MBF, tot i que la seva relació amb aquests factors no sempre està ben definida. Un paper important el juguen, per exemple, les proteïnes inhibidores de CDKs (o CKI), que en el llevat estan codificades pels gens *FAR1* i *SIC1*, l'activitat de les quals és imprescindible per regular les funcions específiques de Cdc28 (Mendenhall i Hodge, 1998). També és rellevant per a la progressió del cicle cel·lular el producte del gen *BCK2*, que va ser inicialment clonat com un supressor multicòpia de la mutació de la quinasa Pkc1 (Lee *et al.*, 1993). La sobreexpressió de *BCK2* és capaç d'induir la expressió de *CLN1* i *CLN2*, fins i tot en absència de Cdc28 funcional, mentre que la del·lecció de *BCK2* es tradueix en una lleugera disminució del nivell d'aquestes ciclins (Epstein i Cross, 1994; Di Como *et al.*, 1995-a; Wijnen i Futcher, 1999). La transcripció específica de la transició G1/S també requereix de l'activitat d'algunes fosfatases, com Sit4, Ppz1 o Glc7, com veurem a continuació.

### **2.2.3- L'Activitat d'algunes Ser/Thr Fosfatases és Important per a la Regulació del Cicle Cel·lular. La Fosfatasa Sit4 i la Via TOR.**

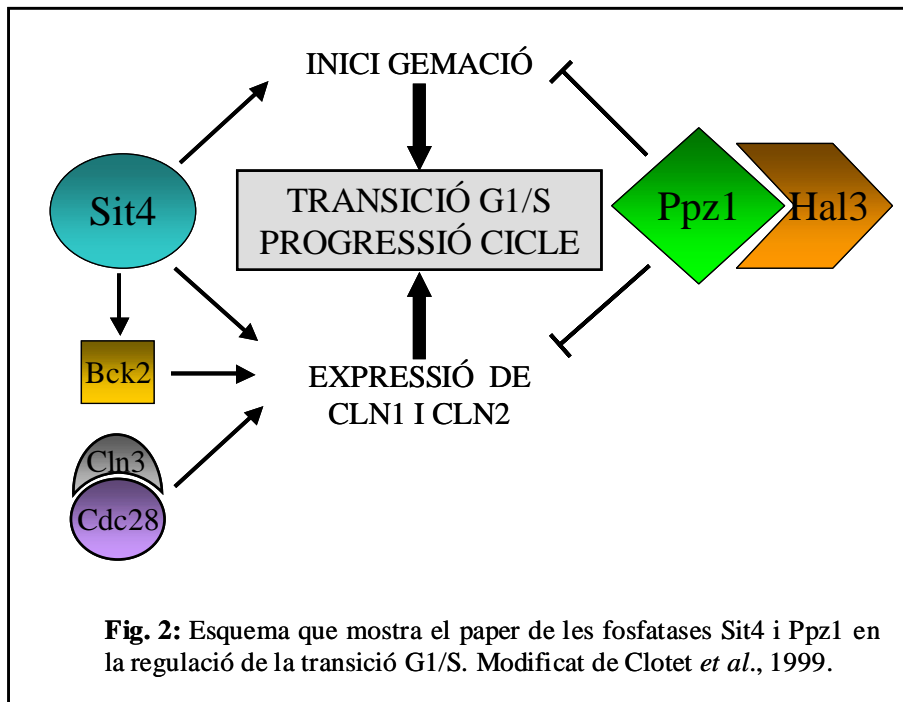
El producte del gen *SIT4* codifica una proteïna fosfatasa conservada evolutivament i relacionada amb les Ser/Thr fosfatases de Tipus 2A, a la que pertanyen altres membres com Pph21, Pph22 (les dues subunitats catalítiques de la PP2A) i la fosfatasa Pph3 (Arndt *et al.*, 1989; Cohen, 1997; Ariño, 2002). L'efecte de l'absència de Sit4 depèn del locus polimòrfic anomenat *SSD1*, de tal manera que en absència de *SSD1* o en una soca *ssd1-d* la delecció de *SIT4* resulta letal. Per contra, en presència de *SSD1* o en soques *ssd1-v*, la falta de Sit4 dóna lloc a cultius enriquits en cèl·lules no gemades i que mostren un creixement força lent, característic d'un retard en la transició de G1 a S (Sutton *et al.*, 1991-a; Sutton *et al.*, 1991-b). Altres evidències reforcen la hipòtesi del paper de Sit4 en aquest important punt del cicle cel·lular. Així, la expressió d'aquest gen és important almenys per a dos fets claus en la progressió a la fase S. Un d'ells és la expressió de les ciclines de G1, *CLN1* i *CLN2*, i el factor de transcripció *SWI4*, pels quals és necessària la presència de Sit4, en una via que seria additiva a la de Cln3 (Fernández-Sarabia *et al.*, 1992) i, potser parcialment dependent de *BCK2* (Di Como *et al.*, 1995-b). A més, intervé en l'aparició de la gema (Fernández-Sarabia *et al.*, 1992), funció que podria compartir amb el gen *BEM2/IPL2* (Cid *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1995).

D'altra banda, Sit4 s'associa amb una sèrie de proteïnes anomenades SAP's (Sit4 Associated Proteins) (Luke *et al.*, 1996), tot i que no està clar si aquestes actuen com a substrat o com a proteïnes reguladores. Més interessant és la unió de Sit4 amb Tap42, una proteïna essencial i conservada que juga un paper important en la via de la quinasa TOR (Target Of Rapamycin) controlada per nutrients. En efecte, aquesta via, que s'activa en presència de nutrients (sobretot fonts de nitrogen) i s'inhibeix per la droga anomenada Rapamicina, actua com a controlador central del creixement de les cèl·lules eucariotes. En presència d'una bona font de nitrogen (com glutamina o amoni) la quinasa TOR manté Sit4 inactiva promovent l'associació d'aquesta amb Tap42, a la que també s'hi poden unir Pph21 i Pph22. En absència d'aquests nutrients, o si s'afegeix Rapamicina al medi, Tor s'inactiva, el que permet la dissociació del complex i l'activació de Sit4. De qualsevol manera, la pèrdua de la funció de la quinasa TOR resulta en una severa inhibició de l'inici de la traducció, probablement degut a una falta

d'activació del factor d'elongació eIF4E, que es tradueix en una parada en G1. En concordància amb això, el bloqueig que es produeix quan es tracten les cèl·lules amb Rapamicina podria ésser un efecte de la manca de traducció de la ciclina Cln3. En resum, la fosfatasa Sit4 podria actuar com un element central en la coordinació de les vies de disponibilitat de nutrients i de creixement cel·lular (Per a una revisió, veure Crespo i Hall, 2002).

### 2.2.4- Paper de les Fosfatases PPZ en el Control del Cicle Cel·lular

Com ja hem apuntat prèviament, les fosfatases de tipus Z també desenvolupen un paper important en el control del cicle cel·lular del llevat. En efecte, un treball desenvolupat en el nostre laboratori havia evidenciat que la sobreexpressió de *PPZI* produïa un important retard en el creixement d'una soca salvatge. Aquest efecte és encara més dramàtic si en comptes del promotor propi del gen se n'utilitza un de més potent (com el de *GALI*). En aquest cas, la sobreexpressió de *PPZI* produeix un bloqueig total del creixement (Clotet *et al.*, 1996). Un estudi posterior va demostrar que la sobreexpressió de *PPZI* causa un alentiment en la duplicació del DNA i en l'aparició de la gema i una disminució en el nivell d'expressió d'algunes ciclines, com *CLN2* i *CLB5*. Aquests resultats són compatibles amb un retard en la transició de les fases G1 a S. Pel contrari, la del·lecció de *PPZI* millora el defecte de creixement característic del mutant *sit4Δ* i accelera la sortida d'un bloqueig en G1 induït per la feromona  $\alpha$ -factor en aquest mutant (Clotet *et al.*, 1999). D'altra banda, la manca de Sit4 pot ésser compensada per la sobreexpressió de *HAL3* donat que aquesta actua com a subunitat reguladora negativa de Ppz1 (Di Como *et al.*, 1995-a, Clotet *et al.*, 1999). Totes aquestes evidències experimentals posen de manifest, doncs, que les fosfatases Sit4 i Ppz1 poden desenvolupar funcions contràries en la progressió del cicle cel·lular, controlant de forma oposada la síntesi de ciclines i l'aparició de la gema. En concordància amb això, la doble del·lecció de *sit4* i *hal3* és sintètica letal, donant lloc a cèl·lules rodones (no gemades) i amb un contingut 1C del DNA, característic d'una parada en G1 (Simón *et al.*, 2001; Muñoz *et al.*, 2003) (En la **Figura 2** es pot veure un esquema teòric de les funcions de Sit 4 i Ppz1 en la progressió del cicle cel·lular).





### **2.3- LES FOSFATASES PPZ I PP1 I LA REGULACIÓ DE LA HOMEOSTASI SALINA EN *Saccharomyces Cerevisiae*.**

Una de les propietats fonamentals de les cèl·lules vives és el manteniment de la homeostasi iònica. D'aquesta depenen tota una sèrie de paràmetres de vital importància per a la seva supervivència, com són el tamany, la turgència, el pH intern, la concentració de cations intracel·lular i el potencial de membrana. Per a mantenir aquests paràmetres el més constant possible, la cèl·lula ha de regular en cada moment el pas d'ions per la seva membrana plasmàtica, en resposta als canvis que es donin en el medi extracel·lular. El llevat, un organisme de vida lliure, ha de tolerar un ampli marge de variacions en la pressió osmòtica del medi, la concentració de nutrients i sals, i el pH. La presència de paret cel·lular i una estratègia de transport de membrana diferent als mamífers permet al llevat tolerar un medi extracel·lular molt variable.

#### **2.3.1- El Transport d' Ions en la Regulació de la Homeostasi Intracel·lular.**

Els ions mono i divalents, com el sodi, el liti, el potassi, el calci, el magnesi i el manganès juguen un paper molt important en la biologia de tota cèl·lula eucariota i, per tant, també del llevat *Saccharomyces cerevisiae*. Amb tot, la concentració d'aquests ions en l'interior cel·lular ha de ser finament regulada per tal d'evitar-ne un excés que resulti perjudicial per a la cèl·lula (Serrano, 1996). La toxicitat depèn de cada catió en concret; mentre el potassi presenta un ampli marge de tolerància, la concentració intracel·lular de sodi s'ha de mantenir el més baixa possible. Això és degut, en part, al fet que el sodi, i també el liti, però no el potassi, poden desplaçar el catió magnesi del centre actiu d'alguns enzims, com és el cas de la fosfatasa Hal2 (Dichtl *et al.*, 1997; Murguía *et al.*, 1995). És per aquest motiu que les cèl·lules retenen una gran quantitat de potassi en el seu interior, mentre que expulsen activament el sodi i el liti. L'acúmulo d'aquest catió i l'expulsió activa de protons és el que permet la cèl·lula de mantenir un potencial de membrana, responsable de funcions tant importants com el transport de nutrients (i de cations). El gradient d'ions entre el medi extracel·lular i el citoplasma també determina la pressió osmòtica interna, responsable de la entrada o sortida d'aigua per la membrana permeable i, per tant, del tamany i turgència de la cèl·lula i de l'estat d'hidratació de membranes i molècules (Serrano,1996).

El llevat és un organisme de vida lliure que presenta una ràpida adaptació a canvis en la concentració de sals o de nutrients soferts en el medi extracel·lular en el que es troba. Per a respondre-hi, ha de posar a treballar una gran quantitat de transportadors de membrana, dels quals se n'han descrit més de 200 (per a una revisió del "Transportoma" del llevat, vegeu Van Belle and André, 2001). Menys conegudes són les vies de transmissió de senyal involucrades en l'activació coordinada d'aquesta multitud de transportadors que, només recentment, han començat a ésser elucidades i en les quals podria jugar un paper important el mecanisme de fosfo-desfosforilació. La exposició a altes concentracions de sals dóna lloc a un estrès salí que la cèl·lula combat utilitzant tres estratègies diferents: 1) Expulsar activament els ions tòxics, 2) Controlar estrictament la entrada de cations i 3) segrestar cations tòxics en la vacuola (Sychrová, 2004).

### 2.3.2- Principals Sistemes de Sortida d'Ions. Les ATPases Pma1 i Ena1.

En el llevat *Saccharomyces cerevisiae* el potencial de membrana és generat principalment per la ATPasa de protons, codificada pel gen essencial anomenat *PMA1* (Serrano *et al.*, 1986). Aquesta proteïna de membrana expulsa protons del citoplasma a l'exterior cel·lular mitjançant el consum d'energia en forma d'ATP. Del potencial elèctric generat per Pma1 en depenen multitud de funcions cel·lulars, com la entrada de nutrients però també de substàncies tòxiques; per aquest motiu, l'activitat d'aquesta proteïna està finament regulada tant per factors nutricionals, ambientals i per situacions que impliquen un *stress* cel·lular. A més, tant en el llevat com en plantes la meitat carboxi-terminal de la proteïna conté un domini autoinhibitori, que ha estat objecte de nombrosos estudis de mutagènesi, i que pot ésser regulat per fosfo-desfosforilació (Portillo *et al.*, 1991; Eraso i Portillo, 1994; Portillo, 2000). En aquest aspecte, s'ha descrit que la quinasa Ptk2 actua regulant de forma positiva l'activitat de Pma1. Així la del·lecció de *PTK2* produeix cèl·lules hipertolerants a sodi, a liti i a substàncies tòxiques el transport de les quals depèn del potencial de membrana, com espermina, higromicinaB i TMA (Tetrametilamoni) (Goossens *et al.*, 2000).

Per a combatre la entrada massiva d'ions tòxics que es produeix en situacions d'estrès salí, el llevat utilitza principalment dos transportadors de membrana: l'ATPasa de sodi i els antiportadors sodi - protó (Sychrová, 2004). En *S. cerevisiae* la principal

bomba de sodi de membrana és codificada pel gen *ENAI/PMR2*. Aquest és en realitat el primer d'un tàndem correlatiu de 4 o 5 gens (el nombre depèn de la soca) molt similars, que s'expressen molt poc de forma constitutiva. De tots ells només la expressió d'*ENAI* és capaç de ser induïda, a nivell transcripcional, per altes concentracions de sodi, liti, pH alcalí o una pressió osmòtica elevada en un mecanisme en el que intervenen diferents vies de transducció de senyal i factors de transcripció (Garcia-deblás *et al.*, 1993; Wieland *et al.*, 1995; Mendizábal *et al.*, 2001).

El genoma del llevat codifica, a més, un antiportador sodi-protó de membrana plasmàtica anomenat Nha1 que, donat la seva natura, és actiu principalment a pH àcid (Prior *et al.*, 1996). Aquest tipus de transportadors, que existeix també en bacteries i en organismes superiors, utilitza el potencial de membrana generat per Pma1 i l'excés de protons en el medi que es dona en un pH baix per a entrar protons a favor de gradient i a la vegada expulsar cations com sodi, potassi o liti sense consum d'energia (Bañuelos *et al.*, 1998, Kinclová *et al.*, 2001). Aquesta proteïna consta d'una meitat amino-terminal, on es troben una sèrie de dominis transmembrana repetitius, i una llarga cua carboxi-terminal situada en el costat citoplàsmic. De forma similar al que passa en altres transportadors (com Pma1, per exemple), la zona carboxi-terminal podria jugar un paper destacat en la regulació funcional i la especificitat de la proteïna (Kinclová *et al.*, 2001, Simon *et al.*, 2001; Simon *et al.*, 2003). A més, també s'ha apuntat la possibilitat que Nha1 pugui jugar un paper destacat en el cicle cel·lular del llevat. En concret, la sobreexpressió acceleraria el pas de les fases G1 a S del cicle, que es troba retardat en un mutant condicional *sit4 hal3*. En aquesta nova funció descrita també hi intervindria la zona carboxi-terminal de l'antiportador (Simón *et al.*, 2001; Simón *et al.*, 2003). Molt recentment s'ha descrit un gen, anomenat *COS3*, que codifica una proteïna que és capaç d'unir-se *in vitro* a la zona juxtamembranal anterior a la cua carboxi-terminal de Nha1. La del·lecció d'aquest gen disminueix la tolerància a sal i la sobreexpressió la incrementa, d'una forma que és dependent de la presència de *NHA1*. Aquestes observacions experimentals suggereixen la possibilitat que Cos3 actui com a una proteïna activadora de la funció salina de l'antiportador (Mitsui *et al.*, 2004).

### 2.3.2- Principals Sistemes d'Entrada d' Ions. Els Transportadors Trk1 i Trk2.

Mitjançant la captació de potassi, la cèl·lula intenta disminuir el potencial de membrana, i així evitar la entrada de cations tòxics, com sodi o liti, mediada per transportadors inespecífics de baixa afinitat. Per assegurar-se la entrada de potassi a l'interior cel·lular el llevat té dos transportadors de potassi, coneguts amb el nom de Trk1 i Trk2 (Ko *et al.*, 1990; Ko i Gaber, 1991). A més, estudis experimentals utilitzant la tècnica de *patch-clamp* han identificat un canal, anomenat Tok1, que pot transportar potassi en determinades situacions (Fairman *et al.*, 1999) i han evidenciat l'activitat un transportador de potassi no específic de baixa afinitat que encara no han estat identificat, però que ha estat temptativament anomenat Nsc1 (Bihler *et al.*, 1998; Bihler *et al.*, 2002). (veure **Figura 3**).

Trk1 i Trk2 juguen un paper cabdal en el manteniment de la homeostasi salina. En condicions normals, aquests transportadors utilitzen el gradient de membrana generat per Pma1 per a captar cations potassi sense consum energètic. L'afinitat d'aquests transportadors pel potassi es veu molt incrementada en situacions de dejuni d'aquest catió, però també en situacions de *stress* salí. La del·lecció de *TRK1* es tradueix en un increment a la sensibilitat al sodi (Gómez *et al.*, 1996) i en un fenotip de creixement lent en medis pobres en potassi i que se soluciona en bona mesura amb l'addició d'aquest catió (Ko *et al.*, 1990). Tot i que la del·lecció de *TRK2* no és tan perjudicial per la cèl·lula, agreuja considerablement la falta de *TRK1*. Així, els mutants *trk1Δ trk2Δ* requereixen de l'addició al medi de potassi (Ko i Gaber, 1991) i presenten una hiperpolarització de la membrana plasmàtica (Madrid *et al.*, 1998). En conseqüència, són molt sensibles a sodi, liti, espermina, higromicinaB i TMA (Mulet *et al.*, 1999).

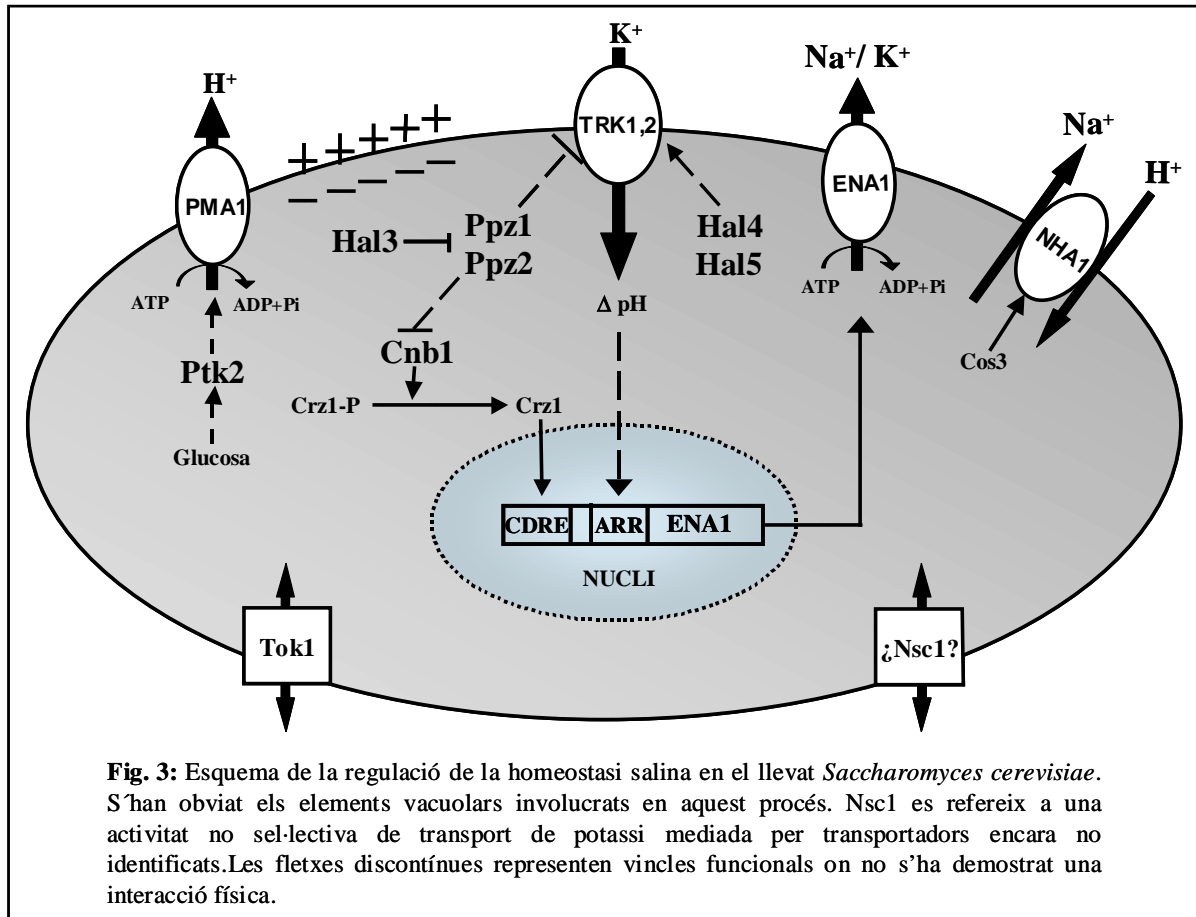
El mecanisme de regulació d'aquests transportadors encara no es coneix en profunditat però podria ésser modulats per fosfo-desfosforilació. Un paper important en la regulació dels transportadors Trk1 i Trk2 el juguen les quinases codificades pels gens homòlegs *HAL4/SAT4* i *HAL5*, que van ésser inicialment clonats per la seva capacitat de conferir halotolerància de forma independent a Ena1 i a la via de senyalització del Calci (Mulet *et al.*, 1999). Aquests gens codifiquen dues proteïnes que pertanyen a la mateixa família de quinases que Ptk1, Ptk2 i Npr1, totes elles involucrades en el control de

transportadors de membrana (Hunter i Plowman, 1997). La del·lecció de *HAL4*, *HAL5* i, especialment, la doble del·lecció d'ambdós gens produeix un fenotip d'halosensibilitat molt similar a la que presenta el doble mutant *trk1Δ trk2Δ*. A més, l'halotolerància deguda a la sobreexpressió de *HAL4* o *HAL5* depèn totalment de la presència dels transportadors Trk1 i Trk2. Totes aquestes evidències experimentals apunten doncs cap a un paper activador de les quinases Hal4 i Hal5 en el transport de potassi mediat pels transportadors Trk1 i Trk2 (Mulet *et al.*, 1999).

### 2.3.4- Paper de les Fosfatases PPZ i PP1 en la Regulació de la Tolerància Salina

Com ja hem citat anteriorment, les fosfatases de tipus Z desenvolupen un paper important en el manteniment de la homeostasi salina. Inicialment s'havia postulat que la funció salina de Ppz1 i Ppz2 depenia totalment de la presència d'Ena1 (Posas *et al.*, 1995-a). Per contra, s'havia descrit que la sobreexpressió de *HAL3* conferia tolerància a sodi fins i tot en absència de *ENA1-4* ( Ferrando *et al.*, 1995). Aquesta aparent contradicció es va resoldre en un estudi posterior, on es demostrava que el paper de Ppz1 i Ppz2 també podia ésser, almenys en part, independent de l'ATPasa de sodi (Yennush *et al.*, 2002). En aquest article s'evidenciava que la del·lecció conjunta de les dues fosfatases produïa una alcalinització intracel·lular que podia ser la responsable indirecta de l'increment de la expressió d'*ENA1*, possiblement a través de l'acció específica sobre zones induïbles per pH alcalí del seu promotor. De fet, els mutants *ppz1Δ ppz2Δ* presenten, a més d'una alcalinització del citosol, una despolarització de la membrana plasmàtica, com ho demostra el fet que són més tolerants a higromicina, espermina i TMA. Aquest comportament del doble mutant es podria explicar per un possible paper inhibitori de les fosfatases de tipus Z sobre els transportadors de potassi Trk1 i Trk2. Consistent amb aquesta hipòtesi, l'efecte fenotípic de la del·lecció de *PPZ1* i *PPZ2* o la sobreexpressió de la seva subunitat reguladora Hal3 depenen en gran mesura (però no totalment) de la presència d'aquests importants transportadors de membrana (Yennush *et al.*, 2002). A part de la solidesa de les proves aportades, aquesta hipòtesi és molt interessant perquè permet explicar la majoria (si no tots) dels efectes fenotípics atribuïbles a les fosfatases PPZ. Així, la del·lecció de Ppz1 i Ppz2 incrementaria la tolerància salina perquè permetria la captació massiva de potassi i, per tant, disminuiria el potencial de membrana i la cèl·lula podria evitar de forma més eficient la entrada de cations tòxics. A la vegada, l'increment de potassi intracel·lular

produiria un increment del pH del citosol mitjançant un mecanisme compensatori de gradient de càrregues positives a l'interior i exterior cel·lular. Aquesta alcalinització del citoplasma seria la responsable de l'increment en la expressió d'*ENA1* que s'observa en els mutants *ppz1 ppz2*, donat que el promotor d'aquest gen té regions que són capaces de respondre a pH alcalí (Serrano *et al.*, 2002) (Veure **Figura 3**)



Amb tot, la del·lecció conjunta de *PPZ1* i *PPZ2* o la sobreexpressió de *HAL3* en una soca *trk1Δ trk2Δ* segueixen produint un increment observable en la tolerància salina. Per tant, una part de l'efecte salí de les fosfatases de tipus Z ha de ser necessàriament independent dels transportadors Trk. En aquest sentit, estudis portats a terme en el nostre laboratori han evidenciat que en un mutant *ppz1* l'increment de la transcripció d'*ENA1* depèn exclusivament d'una regió del seu promotor anomenada CDRE (per Calcineurin Dependent Responsive Element). Aquesta regió és la responsable del control que la fosfatasa calcineurina exerceix sobre la transcripció d'*Ena1*. A més, l'increment de la expressió d'*ENA1* en el mutant *ppz1* és bloquejat per

la del·lecció de *CNBI* (que codifica la subunitat reguladora de la calcineurina) i per la droga FK506 (que inhibeix selectivament la calcineurina). Per tant, sembla que la fosfatasa Ppz1 podria, a més, controlar indirectament la expressió de l'ATPasa de sodi Ena1 exercint una regulació negativa en la via de senyalització de la fosfatasa calcineurina.

A diferència del què passa amb les fosfatases de tipus Z, el paper de Glc7 en el manteniment de la homeostasi salina del llevat ha estat molt menys estudiat i és pràcticament desconegut. Tot i que la PP1 de mamífer havia estat prèviament involucrada en transport iònic, l'única referència de la funció de Glc7 en la homeostasi salina del llevat data de l'any 2002 (Williams-Hart *et al.*, 2002). Aquest treball parteix de l'observació que l'al·lel *glc7-109* (K259A, R260A) presenta un fenotip de sensibilitat a cations tòxics mono i divalents, a drogues com la higromicinaB i a pH alcalí que pot ser millorat, en part, amb l'addició de potassi al medi. De fet, el mutant *glc7-109* podria presentar una hiperpolarització de la membrana plasmàtica, cosa que explicaria la identificació de la bomba de protons *PMA1* com a supressor dels defectes fenotípics d'aquest al·lel. D'altra banda, el treball que presentem aquí aporta proves addicionals al paper de Glc7 en el manteniment de la homeostasi iònica del llevat. En efecte, la sobreexpressió d'*YP11*, que codifica una proteïna que podria actuar com a subunitat inhibidora de Glc7, confereix halotolerància a altes concentracions de liti fins i tot en una soca a la que li manquen les fosfatases Ppz1 i Ppz2 (veure Resultats i Discussió).

### **2.3- LES FOSFATASES PPZ1 I PP1 I EL MANTENIMENT DE LA INTEGRITAT CEL·LULAR EN *Saccharomyces Cerevisiae*.**

Un tret característic dels llevats és la presència d'una paret, necessària pel manteniment de la forma i la integritat física de la cèl·lula. L'efecte protector d'aquesta rígida estructura s'ha de combinar, però, amb la necessitat de la cèl·lula de proliferar. Per aquest motiu, la paret ha de ser remodelada durant el creixement vegetatiu o polaritzat induït per feromones i quan es dona la fusió amb una altra cèl·lula. A més, hi ha un seguit de condicions externes que comprometen la integritat del llevat, com són la exposició a altes temperatures, a ambients hipotònics o a la presència en el medi de compostos que interfereixen amb la síntesi de la paret. El llevat és capaç de respondre a aquests tipus de situacions mitjançant l'activació d'una via de senyalització coneguda com a via d'integritat cel·lular o de MAP-quinases controlades per la proteïna quinasa de tipus C.

El genoma del llevat codifica almenys 4 proteïnes anomenades Mid2, Wsc1, Wsc2 i Wsc3 que es troben en la membrana plasmàtica i que actuen com a sensors d'estrès de la paret cel·lular. En condicions que comprometen la estabilitat d'aquesta estructura, aquests sensors són capaços d'activar a Rom2, un factor bescanviador de GDP/GTP que al seu torn activa a Rho1. Aquesta proteïna activa, per un costat, la maquinària enzimàtica encarregada de la síntesi de glucans de paret, i per l'altre, la via de la proteïna quinasa C, codificada en el llevat pel gen *PKC1*. Aquesta quinasa és la responsable d'iniciar la cascada de MAP-quinases, que comença amb Bck1 (una MAPKKK, és a dir, una MAP-quinasa-quinasa-quinasa) que fosforila a Mkk1 i Mkk2, dues MAPKK redundants responsables de la fosforilació dual (en els residus Thr190 i Tyr192) de la MAPK coneguda com a Mpk1 o Slt2. La quinasa Mpk1 fosforilada (activa) és l'encarregada d'entrar al nucli i desencadenar la transcripció específica de gens en resposta a l'agressió en la paret cel·lular. Gens com *FKS1*, *FKS2*, *MNN1* i *CSD2*, que codifiquen enzims responsables de la síntesi d'elements de paret, són dependents de la presència de Mpk1. És més, el factor de transcripció Rlm1 i el complex transcripcional conegut com a SBF (format per Swi4 i Swi6, del que hem parlat en l'apartat referit al cicle cel·lular) són dianes directes de l'acció d'aquesta quinasa. De fet, Mpk1 és capaç no només d'unir-se i activar mitjançant fosforilació a Swi6 sinó que també podria tenir un efecte directe sobre el factor de transcripció Swi4.



Això permet, doncs, establir un vincle directe entre la via de la integritat cel·lular i el control del cycle cel·lular en el llevat *Saccharomyces cerevisiae* (veure revisions a Heinisch *et al.*, 1999; Mager i Siderius, 2002)

Hi ha descrits una sèrie de fenotips associats a defectes genètics en aquesta via de senyalització. Mutacions en qualsevol dels elements que en formen part, com per exemple la del·lecció de la Map-quinasa Mpk1, donen lloc a cèl·lules especialment sensibles a medis hiposmòtics i a altes temperatures (37° C o superiors). En aquestes condicions, les cèl·lules són propenses a lisar-se. Aquests defectes es poden corregir mitjançant l'addició al medi de cultiu d'un estabilitzant osmòtic, com sal a altes concentracions o sorbitol (veure una revisió a Levin i Errede, 1995). A més, els mutants *mpk1/slt2Δ* són particularment sensibles a alguns compostos, com cafeïna o blanc de calcofluor (CFW), que interfereixen amb la formació de la paret o a estaurosporina, una droga que actua inhibint l'activitat de la quinasa Pkc1.

A més dels elements que formen part de la via de senyalització de Pkc1, també hi ha fosfatases que desenvolupen un paper important en el manteniment de la integritat cel·lular. De fet, la primera funció atribuïda a les fosfatases de tipus Z té a veure, com ja hem dit, amb aquest important procés cel·lular. Efectivament, la doble del·lecció dels gens *PPZ1* i *PPZ2* dona lloc a cèl·lules de major tamany que són sensibles a cafeïna i a altes temperatures. Aquests defectes poden ser reduïts significativament mitjançant l'addició de sorbitol al medi de creixement (Posas *et al.*, 1993; Hugues *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1993). Un efecte similar es produeix mitjançant la sobreexpressió de Hal3, cosa que concorda amb el paper que aquesta proteïna exerceix com a inhibidora de les fosfatases Ppz1 i Ppz2 (De Nadal *et al.*, 1998). A més, els defectes deguts a la sobreexpressió de Hal3 o a la del·lecció de *PPZ1* i/o *PPZ2* són additius als causats per la del·lecció de la MAP-quinasa Mpk1/Slt2. D'aquesta manera, tant la manca de Ppz1 com l'excés de Hal3 resulten letals en un mutant *mpk1Δ* i, de nou, aquest defecte es pot compensar amb l'addició de sorbitol al medi de cultiu. Per aquest motiu, s'ha considerat habitualment que les fosfatases PPZ podien intervenir en algun punt de la via de senyalització controlada per Pkc1. D'altra banda, el paper de Ppz1 i Ppz2 com a reguladores del transport de potassi també permet explicar per què aquestes fosfatases són claus en la regulació de la integritat cel·lular. La del·lecció de *PPZ1* i *PPZ2* augmenta de forma significativa la quantitat de potassi intracel·lular donant lloc a un

increment de la pressió osmòtica i, per tant, a la entrada d'aigua a l'interior de la cèl·lula. Això augmenta la turgència i per tant el tamany de la cèl·lula i, en conseqüència, causa un estrès de paret, responsable de l'augment de fosforilació de Mpk1 que es detecta en mutants *ppz1Δ ppz2Δ*. A més, alguns dels gens regulats per la via d'integritat cel·lular estan sobreexpressats en absència de les fosfatases PPZ, d'una forma que és dependent de la presència dels transportadors de potassi Trk1 i Trk2 (Yennush *et al.*, 2002; Merchan *et al.*, 2004).

D'altra banda, el fet que Ppz1 i Sit4 desenvolupin funcions contraposades en la regulació del cicle cel·lular ha portat alguns investigadors a estudiar quin paper pot desenvolupar Sit4 i la via de la quinasa TOR en la regulació de la via d'integritat cel·lular. Dos articles força recents aporten dades molt interessants al respecte. En aquest sentit, presenten evidències experimentals que apunten al fet que la parada en G1/S deguda a la del·lecció de Sit4 podria ser mediada, al menys en part, per una sobreactivació de la quinasa Pkc1. La fosfatasa Sit4 actuaria per sota dels sensors de membrana i per sobre de Pkc1 en aquesta via de transducció de senyal (De la Torre-Ruiz *et al.*, 2002). A més, aquest efecte estaria controlat per la quinasa TOR i la via de senyalització en resposta a disponibilitat de nutrients. Així, la inhibició de Tor1 i Tor2 induïda per rapamicina dóna lloc a una activació de Mpk1 en un procés que depèn de la regulació exercida per l'associació de la fosfatasa Sit4 i la subunitat Tap42 (Torres *et al.*, 2002).

Finalment, l'estudi d'un al·lel termosensible de Glc7 (*glc7-10*) també ha permès establir un vincle funcional entre la fosfatasa de tipus 1 del llevat i la via de transmissió de senyal que controla la integritat cel·lular. En condicions restrictives (altes temperatures), la soca *glc7-10* presenta característiques compatibles amb una parada entre la metafase i la telofase del cicle cel·lular. Aquests defectes de creixement es suprimeixen en medis amb alta osmolaritat i, en canvi, són additius amb la del·lecció de *MPK1* o *BCK1* o amb la sobreexpressió d'una versió no funcional de Pkc1. Així doncs, sembla ser que la desfosforilació que porta a terme la fosfatasa de tipus 1 també és capaç de promoure el manteniment de la integritat cel·lular d'una forma que depèn de la via de transducció de senyal controlada per la quinasa Pkc1 (Andrews i Stark, 2000).

## **III. RESULTATS I DISCUSSIÓ**

### **3.1- IDENTIFICACIÓ DE SUPRESSORS MULTICÒPIA DE LA PARADA DEL CICLE CEL·LULAR EN LA TRANSICIÓ G1-S EN *Saccharomyces Cerevisiae*.**

Les cèl·lules de llevat que sobreexpressen la fosfatasa Ppz1 presenten un fenotip de creixement lent característic. Estudis portats a terme en el nostre laboratori havien evidenciat que aquestes cèl·lules tenen més dificultats que una soca salvatge per sortir d'una parada en G1 induïda per la feromona  $\alpha$ -factor i mostren un retard considerable en l'aparició de la gema. Es més, les cèl·lules que sobreexpressen Ppz1 presenten una disminució dels nivells de transcripció de ciclins de G1 com Cln2 i Clb5 i una pèrdua del patró d'expressió cíclic característic d'aquestes. Aquests efectes poden ser revertits mitjançant la sobreexpressió de la subunitat reguladora Hal3. El gen que codifica aquest enzim és al·lèlic de *SIS2*, i havia estat clonat prèviament com un supressor multicòpia del defecte de creixement d'un mutant *sit4Δ*. Curiosament, els efectes de la del·lecció de la fosfatasa Sit4 són molt similars als que es donen amb la sobreexpressió de Ppz1. De fet, la falta de Ppz1 és capaç de millorar el creixement d'un mutant *sit4Δ*, accelerar l'aparició de la gema i la duplicació del DNA i incrementar la síntesi de ciclins. Aquests resultats apunten a un paper de la fosfatasa Ppz1 en la regulació del cicle cel·lular del llevat i evidencien que aquesta fosfatasa pot actuar de forma oposada a Sit4 en la regulació de la transició G1-S de *S. cerevisiae* (Clotet *et al.*, 1999).

#### **3.1.1- Creació d'un Doble Mutant Condicional *sit4Δ hal3Δ*.**

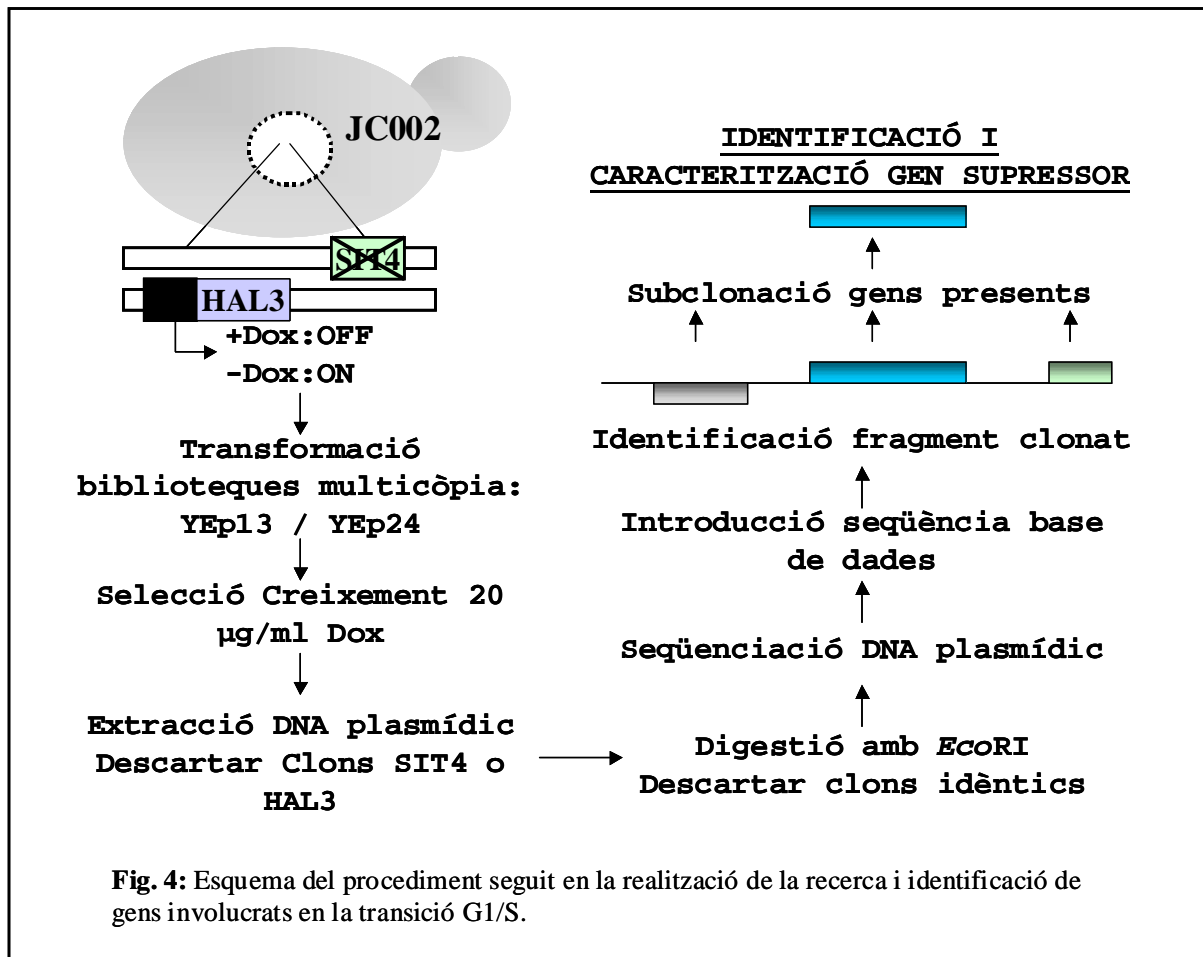
En concordància amb el què dèiem, doncs, el doble mutant *sit4Δ hal3Δ* és letal (Di Como *et. al.*, 1995-a; Simon *et al.*, 2001). Aquest fet ens ofería la possibilitat de realitzar un treball experimental per tal de cercar supressors multicòpia d'aquest fenotip de letalitat sintètica. Aquesta recerca havia de permetre aprofundir no només en el coneixement de la regulació de la transició G1/S en el llevat *S. cerevisiae*, sinó també en el mecanisme d'acció que desenvolupen les fosfatasas Sit4 i Ppz1 en aquest punt important del cicle cel·lular. Per a desenvolupar aquest objectiu calia crear una soca que fos doble mutant *sit4Δ hal3Δ* de forma condicional. Aquesta soca va rebre el nom de JC002 i es va generar mitjançant la substitució, en un mutant *sit4* (soca JA110, descrita en Clotet *et al.*, 1999), del promotor de *HAL3* per un *cassette* que contenia l'element anomenat *tetO*. Aquest promotor heteròleg presenta la característica de poder ser

reprimint fortament mitjançant l'addició al medi de doxiciclina, un antibiòtic que, a les concentracions utilitzades, no inhibeix el creixement del llevat (Bellí *et al.*, 1998). Les característiques fenotípiques d'aquesta soca han estat detallades en un treball previ realitzat en el nostre laboratori (Simon *et al.*, 2001). En absència de doxiciclina aquesta soca es comporta aproximadament com un mutant *sit4*, és a dir, presenta un creixement lent característic, es mostra molt sensible a temperatures altes (37°C o superior) i no pot aprofitar fonts de carboni no fermentables (com glicerol, per exemple). L'addició al medi de doxiciclina, generalment a una concentració de 20 µg/ml, en redueix de forma ràpida i dràstica la capacitat de proliferació, de tal manera que en plaques que contenen l'antibiòtic, gairebé no s'observa creixement macroscòpic després de 48-72h. La caracterització detallada d'aquest fenotip va revelar que la soca JC002 presenta un índex de gemació molt baix (amb cultius enriquits en cèl·lules rodones no gemades) i un retard sever en la duplicació del DNA (Simon *et al.*, 2001). Aquestes evidències experimentals apuntaven a una parada característica en la fase G1 del cicle cel·lular; per tant, aquesta soca va ésser considerada un bon model de treball per al nostre estudi.

### 3.1.2- Recerca i Subclonació de ORFs Responsables del Fenotip Supressor.

Per tal de trobar gens que suprimissin el fenotip pràcticament terminal que presenta la soca JC002, aquesta va ésser transformada amb dues biblioteques genòmiques de llevat clonades en vectors multicòpia. La primera de les genoteques plasmídiques està basada en el vector YEp13 (*LEU2*) i prové de la col·lecció ATCC, número 37415. La segona d'elles està clonada en el plàsmid YEp24 (*URA3*), i va ser cedida generosament pel Dr. Ramon Serrano (Institut de Biologia Molecular i Cel·lular de Plantes, UPV). Es va avaluar la capacitat de més de 100.000 transformants de créixer en plaques que contenen 20 µg/ml de doxiciclina, avaluant la seva capacitat de desenvolupar colònies macroscòpiques passades 72-96 hores d'incubació a 28°C. Mitjançant aquest procediment es van seleccionar uns 130 clons, que s'anomenaren, de forma provisional, amb el nombre que es corresponia a l'ordre en que havien estat aïllats precedit per una "V" (de Viable). Inicialment s'obtenia el DNA plasmídic que contenien aquests clons i era amplificat en *Escherichia coli*. A continuació, se sotmetia el DNA a digestió amb l'enzim *EcoRI*, per tal d'eliminar inserts idèntics i se'n seqüenciava la regió contigua als extrems 5' i 3' del plàsmid. Posteriorment s'utilitzava un fragment d'aquesta seqüència (uns 30-40 parells de nucleòtids) per a realitzar una

recerca, mitjançant BLAST (Best Local Alignment Search Tool), que permetés identificar el fragment del genoma del llevat que s'havia clonat. En aquest procediment va ser de gran ajuda el fet que el genoma del llevat estigui totalment seqüenciat i es pugui consultar en la base de dades anomenada SGD (*Saccharomyces Genome Database*, <http://www.yeastgenome.org>). Amb tot, molts dels clons aïllats inicialment van resultar portadors dels gens *SIT4* o *HAL3*. Per aquest motiu, es va optar per detectar la presència d'aquests gens mitjançant PCR analítica abans de seqüenciar el DNA plasmídic. Això va permetre descartar uns 80 clons que contenen un o altre gen. La resta se'ls va considerar possibles positius i es va procedir a identificar-ne el DNA clonat mitjançant el procés que acabem de descriure. Un cop identificat el fragment genòmic complet contingut en cada clon, es va procedir a la subclonació dels diferents ORF presents.



En alguns casos els nostres esforços es varen centrar en la subclonació d'un gen del qual se sabia, o hi havia sospites raonades, que podia estar intervenint en el control del cicle

cel·lular. Aquest és el cas de *SWI4*, *CLN3* o *BCK2*, però també de *PPH21* o *PPH22*, per exemple. En altres casos, va caldre subclonar els diferents gens que estaven presents en els inserts que havíem aïllat per tal d'identificar el responsable de la supressió del fenotip de la soca JC002 (Es pot veure un esquema del procediment seguit en la **Fig. 4**).

### 3.1.3- Aïllament de 13 Gens Supressors del Fenotip de la Soca JC002.

De 43 clons aïllats que no contienien *SIT4* ni *HAL3*, el procediment que acabem de detallar va permetre identificar un total de 13 gens que eren capaços de suprimir el fenotip associat a la soca JC002 en condicions no permissives. El recull mostrat en la taula I de l'article 1 permet extreure algunes primeres conclusions. En primer lloc, es pot veure com la majoria dels gens van ser aïllats més d'un cop. És més, en algun dels casos aquests provenien de fragments genòmics diferents però parcialment sobreposants en la seva seqüència. En segon lloc, destaca el paper funcional d'aquests gens. Crida l'atenció, per exemple, l'aïllament d'un nombre significatiu de Ser/Thr quinases i fosfatases, algunes d'elles estretament relacionades amb el manteniment de la homeostasi salina; la identificació d'altres gens pels quals encara no se n'havia descrit cap funció ó l'aïllament d'elements com *SWI4*, *CLN3* ó *BCK2* que ja havien estat involucrats prèviament en la regulació de la transició G1/S. És important mencionar l'aparició en la nostra recerca d'aquests darrers gens, perquè precisament és el tipus de supressors que *a priori* hom esperaria trobar. *SWI4* és un factor de transcripció, i forma part, junt amb *SWI6* del complex transcripcional anomenat SBF. Aquest complex és un dels elements que indueixen la expressió específica de gens que es dona al final de la fase G1, com les ciclins *CLN1*, *CLN2* ó *PCL1*, però també una sèrie de gens involucrats en la síntesi de la paret cel·lular (Sidorova i Breeden, 1993; Spellman *et al.*, 1998). Donat que tant Sit4 com Hal3 són necessaris per a l'acúmulo de Swi4 (Fernandez-Sarabia *et al.*, 1992; Di Como *et al.*, 1995-a), sembla lògic que aquest factor de transcripció hagi aparegut en la nostra recerca. D'altra banda, *CLN3* codifica una de les principals ciclins de G1, que s'associa a Cdc28 i actua com un important activador del complex SBF que acabem de mencionar (Stuart i Wittenberg, 1995). *BCK2* és un gen no essencial que codifica una proteïna involucrada en la via de les MAP quinases controlada per Pkc1 (Lee *et al.*, 1993), però també activa l'expressió de gens regulats per SBF (Di Como *et al.*, 1995-b). De fet, s'ha proposat que Bck2 podria situar-se en una branca de la via funcional de la fosfatasa Sit4 (Levine *et al.*, 1996 No és Arndt di

como?). Ni la del·lecció de *CLN3* ni la de *BCK2* són letals, però el doble mutant és inviable, potser degut al fet que aquesta soca és incapaç d'expressar nivells adequats de les ciclins *CLN1*, *CLN2* i *CLB5* (Epstein i Cross, 1994).

La identificació d'aquests gens aporta una prova consistent de la validesa del mètode emprat, donat que aquest és el tipus de supressors que, *a priori*, hom esperaria aïllar. De totes maneres, no es podia descartar la possibilitat que alguns dels supressors identificats estigués afectant d'alguna manera en la regulació del promotor *tetO*. També es podria pensar, veient la quantitat de gens aïllats que intervenen directa o indirectament en el transport de membrana, que alguns d'aquests gens influeixi de forma decisiva en la entrada de la doxiciclina a l'interior cel·lular. Per a eliminar aquesta possibilitat es va transformar la soca JC173, que és un diploid heterozigot viable *SIT4/sit4 HAL3/hal3* amb cadascun dels gens hipotèticament supressors. Es va induir la esporulació d'aquesta soca i es va sotmetre a una anàlisi aleatòria d'espores. D'aquesta manera es va verificar si la soca doble mutant haploid contenint el plàsmid supressor era viable o no. Tots els plàsmids que havien estat prèviament identificats van conferir viabilitat al doble mutant *sit4Δ hal3Δ*, confirmant d'aquesta manera els resultats obtinguts amb la soca JC002.

### 3.1.4- Les Fosfatases de Tipus 2A són Efectors Positius de la Transició G1/S

Com es pot veure en la taula 1 i la Figura 1 de l'article, en aquesta recerca experimental vam aïllar els gens *PPH21* i *PPH22*, que codifiquen les dues isoformes catalítiques de la fosfatasa de tipus 2A del llevat i presenten una alta similitud (89% d'identitat) a nivell aminoacídic (Stark, 1996). És destacable la identificació d'aquests dos gens en el nostre treball, perquè aquest tipus de fosfatasa, tot i que força estudiada, no havia estat prèviament involucrada en aquest punt de regulació del cicle cel·lular. De fet, s'ha descrit que Pph21 i Pph22 influeixen en la regulació de la transició G2/M (Lin i Arndt, 1995; Evans i Stark, 1997; Stevenson *et al.*, 2001). Cal dir, però, que les PP2A estan relacionades estructural i funcionalment amb Sit4. De fet, poden compartir funcions amb Sit4 en la via de control de disponibilitat de nutrients regulada per la quinasa TOR, unint-se a la subunitat coneguda com a Tap42 (Di Como i Arndt, 1996; Jiang i Broach, 1999). Això plantejava la possibilitat que també Ppz1 pogués tenir un paper en la regulació d'aquesta important via de transducció de senyal. Per a



comprovar-ho, vam sembrar el doble mutant *ppz1Δ ppz2Δ* i el mutant *hal3Δ* en plaques amb el fàrmac anomenat rapamicina que, com hem dit en la introducció, és capaç de bloquejar selectivament la quinasa Tor. Vam usar concentracions de rapamicina que inhibien de forma visible el creixement de la soca salvatge (5 ng/ml). En aquestes plaques, el doble mutant *ppz1Δ ppz2Δ* va mostrar un creixement considerablement superior a la soca salvatge, un fenotip contrari al que es va donar en el mutant *hal3Δ*. Aquest efecte es pot veure també en un cultiu líquid, on l'addició de rapamicina a una concentració de 5 µg/ml inhibeix de forma ostensible no només un mutant *hal3Δ*, sinó també una soca que sobreexpressa *PPZ1*. Pel contrari, la del·lecció de *PPZ1* incrementa la tolerància a rapamicina, un efecte que és additiu amb la del·lecció de *PPZ2* i similar al que es dona amb la sobreexpressió de *HAL3*. Aquests resultats evidencien, doncs, que les fosfatases PPZ poden jugar un paper regulador en la via de senyalització de TOR i, per tant, aquesta pot estar severament afectada en la soca JC002. En aquestes condicions, la sobreexpressió de *PPH21* o *PPH22* podria millorar parcialment aquest defecte i permetre el creixement del mutant en condicions no permissives.

Per a veure fins a quin punt l'activitat d'aquests dos gens era específica en la supressió del fenotip del mutant JC002, vam provar l'efecte de la sobreexpressió de *PPH3*, que codifica una fosfatasa que pot compartir funcions amb les PP2A (Ronne *et al.*, 1991). Tot i que no havia estat clonat en la nostra recerca, la sobreexpressió de *PPH3* va suprimir el fenotip del mutant condicional d'una forma fins i tot més vigorosa que *PPH21* i *PPH22*. A més, un dels clons aïllats contenia una versió truncada (només els primers 443 residus) de *PAMI* (YDR251w), una proteïna *coiled-coil* que pot suplir, en multicòpia, la manca d'activitat PP2A (Hu i Ronne, 1994). Inicialment vam pensar que l'efecte supressor es podia deure a *PAMI* però un cop subclonat la potència fenotípica d'aquest gen truncat fou força feble (Veure Figura 1 de l'article) i, sorprenentment, la versió íntegra clonada en el mateix plàsmid no va ser capaç de mostrar fenotip supressor. L'efecte del clon es va atribuir posteriorment a la presència d'un altre ORF, anomenat YDR247w, del que parlarem més endavant.

### 3.1.5- Aïllament de Ptc2, una Fosfatasa de Tipus 2C.

Una altra fosfatasa aïllada en aquest treball és la codificada pel gen *PTC2* (YER089c) que forma part, junt amb altres 5 membres, de la família de les fosfatases de tipus 2C (Stark, 1996). Cal dir que ni la del·lecció d'aquest gen en un fons salvatge ni en una soca *sit4Δ* va produir defectes fenotípics apreciables. Donat que no havien estat involucrats prèviament en aquesta funció, vam voler provar si altres membres d'aquesta família també podien regular la transició G1/S. En efecte, tant la sobreexpressió de *PTC1* com de *PTC3* van exercir un cert efecte positiu en el creixement de la soca JC002 en doxiciclina, tot i que en ambdós casos amb menor capacitat que *PTC2*. S'ha descrit una sèrie de funcions que poden estar regulades per l'acció de les fosfatases de tipus 2C. Entre d'altres, intervenen en el control de la via de resposta a proteïnes mal plegades (*Unfolded protein response*, Welihinda *et al.*, 1998) i la via de MAP quinases HOG (Warmka *et al.*, 2001; Young *et al.*, 2002). Els fets que presentem evidencien que les fosfatases de tipus 2C, i especialment Ptc2, poden actuar com reguladors positius de la transició G1/S. Això és força sorprenent, donat que evidències prèvies han demostrat que Ptc2 i Ptc3 són les principals fosfatases amb activitat sobre Cdc28 i, per tant, hom esperaria que aquestes proteïnes actuessin com a elements negatius en la progressió del cicle cel·lular (Cheng *et al.*, 1999). D'altra banda, hi ha evidències experimentals que demostren que Ptc2 estaria relacionada amb RAD53, MEC1 i els *checkpoints* de control de replicació del DNA. En aquest sentit, s'ha descrit recentment que Ptc2 i Ptc3 són importants per a la inactivació del *checkpoint* que es dona després d'una ruptura del DNA de doble cadena i, per tant, en la progressió del cicle en aquesta fase (Leroy *et al.*, 2003).

### 3.1.6- Les Quinases Hal4 i Ptk2 són Reguladors Positius de la Transició G1/S.

A més de fosfatases, la nostra aproximació experimental ha permès identificar algunes quinases com a possibles candidates a la regulació de la transició de les fases G1 a S. Així, vam aïllar els gens *HAL4/SAT4* (YCR088w) i *PTK2/STK2* (YJR059w), que pertanyen a una família de quinases reguladores de transportadors de membrana i dins de la qual es troben altres membres com Kkq8, Ptk1 i Hal5 (Stark, 1996; Mulet *et al.*, 1999; Goossens *et al.*, 2000). Aquest darrer, homòleg estructural i funcional de Hal4, no l'havíem aïllat. Per aquest motiu també vam provar la seva potència com a

supressor. Aquest gen es va mostrar similar a Hal4 en la seva capacitat de suprimir el fenotip de JC002 en condicions no permissives. Hal4 i Hal5 regulen de forma positiva l'activitat dels transportadors de potassi de membrana Trk1 i Trk2. Una explicació molt atractiva de perquè aquestes fosfatases poden estar regulant la transició G1/S parteix del descobriment recent que la funció de Hal3-Ppz1 en cicle cel·lular i en homeostasi iònica és deguda a l'efecte regulador negatiu de les fosfatases PPZ sobre els transportadors Trk1 i Trk2 (Yennush *et al.*, 2002). Per tant, és possible que la soca JC002, que en condicions no permissives ha de presentar uns nivells d'expressió de *HAL3* molt baixos, tingui sobreactivada la fosfatasa Ppz1. Això podria causar una manca en el contingut intracel·lular de potassi, tal i com s'ha descrit en mutants *hal3Δ* (Ferrando *et al.*, 1995). Aquesta carència podria ésser parcialment compensada per un increment en l'activitat dels transportadors Trk1/2 induït per la sobreexpressió de *HAL4* i *HAL5*. D'altra banda, la quinasa codificada per *PTK2* activa l'ATPasa de membrana Pma1 (Goossens *et al.*, 2000), que és el principal mecanisme de sortida de protons del llevat. L'efecte de la quinasa Ptk2 en la homeostasi del potassi i, per tant, en la transició G1/S podria ésser indirecte. L'augment en la expulsió de protons a l'exterior cel·lular produeix un increment en el potencial de membrana que podria incrementar, de retruc, la entrada de cations potassi i la sortida del bloqueig en la transició G1/S.

Un altre gen involucrat en el manteniment de la homeostasi salina del llevat que hem aïllat ha estat *NHA1*, que codifica un antiportador sodi/protó de membrana plasmàtica. La identificació d'aquest gen i el possible mecanisme de control que aquest pot exercir sobre el cicle cel·lular s'han descrit extensament en un article previ publicat per membres del nostre laboratori (Simon *et al.*, 2001). Posteriorment, l'estudi dels elements estructurals de la proteïna involucrats en aquesta funció ha demostrat que regions concretes de la cua carboxi-terminal intracel·lular de l'antiportador juguen una funció destacada (Simon *et al.*, 2003).

### 3.1.7- Aïllament de Nous Gens que Podrien Regular la Transició G1/S.

Addicionalment, l'ús de la soca JC002 ens ha permès identificar una sèrie de gens dels que hi ha molt poca informació disponible fins a la data. Entre ells trobem *YAP7* (YOL028c), un gen que codifica un factor de transcripció de la família bZIP (per basic Leucine Zipper), que es caracteritzen per un domini atípic d'unió al DNA

(Fernandes *et al.*, 1997; Rodrigues-Pousada *et al.*, 2004). També hem aïllat YDR247w, un ORF que codifica una proteïna amb una homologia aproximada del 50% amb la quinasa Sks1/Sha3. Cal destacar que el gen que codifica la quinasa Sks1 ha estat identificat prèviament com un supressor multicòpia de la mutació *snf3Δ*, un element de membrana plasmàtica que actua com a sensor de glucosa en el medi (Yang i Bisson, 1996; Vagnoli i Bisson, 1998). Donat que no s'havia caracteritzat prèviament, hem posat a aquest gen el nom de *VHS1* (per Viabilitat en un mutant *Hal3Δ Sit4Δ*). El segon d'ells és YIL135c, que hem anomenat *VHS2*, i codifica una proteïna de 436 residus de la que no es disposa d'informació prèvia. Finalment, hem posat el nom de *VHS3* a l'ORF YOR054c, que codifica una proteïna homòloga estructural i funcional de Hal3 i que per aquest motiu ha estat caracteritzada posteriorment en detall en el nostre laboratori (Ruiz *et al.*, 2004).

Donat que no hi havia informació prèvia que fes referència a cap d'aquests tres gens no essencials, ens vam plantejar la possibilitat d'estudiar l'efecte fenotípic de la seva del·lecció en diverses condicions. Aquests mutants, que havien estat generats en el fons genètic BY4741 i formaven part de la col·lecció de del·leccions sistemàtiques del *Saccharomyces Deletion Project*, van ser generosament cedits pel Dr. Jose L. Revuelta (Universitat de Salamanca). Es va provar l'efecte de diferents quantitats de LiCl (150-300 mM), NaCl (fins a 1,6M), rapamicina (2-50 nM) i cafeïna (1-15 mM), a més de sotmetre aquestes cèl·lules a altes temperatures (38,5°C) o medis amb un 2% de glicerol com a única font de carboni. En cap cas es van veure efectes importants atribuïbles a la del·lecció d'algun d'aquests gens, tot i que el mutant *vhs1Δ* es va mostrar una mica més sensible a altes concentracions de clorur sòdic i el mutant *vhs2Δ* lleugerament més sensible a altes concentracions de clorur de liti que la soca isogènica salvatge.

No és estrany l'aparició de Vhs3 com a supressor multicòpia de la soca JC002. De fet, el treball portat a terme per Ruiz *et al.*, 2004 demostra que la sobreexpressió d'aquest gen és capaç de suplir, en part, la falta de Hal3 a tots els efectes i, a més, accelera la sortida de la parada en G1 característica d'una soca *sit4*. En aquest sentit, la del·lecció de Vhs3 en un fons *sit4Δ* dona lloc a cèl·lules viables, però que presenten un creixement encara més lent que el mutant *sit4*, amb un retard més important de l'inici de la gemació i la duplicació del DNA. És més, l'aparició de *VHS3* en aquest *screen*

aporta una evidència addicional a la hipòtesi que aquesta proteïna actui com a homòleg funcional de Hal3 i, per tant, com a subunitat inhibidora de la fosfatasa Ppz1. Cal puntualitzar, però, que en presència de Hal3 la funció d'aquest gen seria secundària; ho demostra el fet que, a diferència del que passa amb Hal3, la del·lecció *per se* de Vhs3 no tingui efectes fenotípics observables.

### 3.1.7- Efecte de la Sobreexpressió dels Gens Supressors en els Fons Genètics *sit4Δ*, *hal3Δ* i *mpk1Δ*

La soca JC002 presenta sengles del·leccions que afecten a dues vies de senyalització diferents, involucrades de forma aparentment contrària en el control de la transició G1/S (Clotet *et al.*, 1999). Aquest fet generava el dubte de saber a quina via de transducció de senyal podíem atribuir els efectes de la sobreexpressió de cadascun dels gens que havíem aïllat. La del·lecció de Sit4 produeix un fenotip de creixement lent característic (degut com dèiem a un allargament de la fase G1). Amb tot, cap dels gens que havíem aïllat incrementava de forma significativa la velocitat de creixement d'aquesta soca (no mostrat), excepció feta, evidentment, de Hal3. Per aquest motiu ens vam plantejar la possibilitat de forçar les condicions de creixement de *sit4*, i sotmetre'l a situacions que comprometen el creixement d'aquesta soca. Així, vam provar l'efecte de la sobreexpressió dels gens aïllats en el nostre treball en el mutant *sit4*, sotmès a altes temperatures o a medis amb glicerol (no fermentable) com a única font de carboni. El resultat es pot veure en la figura 3 de l'article 1. Cal destacar que, a diferència del que hom podria esperar, hi ha una baixa correlació en l'efecte atribuïble a la sobreexpressió dels gens supressors d'un fenotip a altre. Així, les fosfatases Pph21 i Pph22 es mostren relativament vigoroses en permetre el creixement en glicerol. Això no és d'estranyar, donat que tant les fosfatases de Tipus 2A com Sit4 actuen positivament en la via TOR, unint-se a la subunitat Tap42 (Di Como i Arndt, 1996; Jiang i Broach, 1999). Tot i això, aquestes fosfatases presenten un fenotip realment pobre a altes temperatures. Per contra, la sobreexpressió de la fosfatasa Pph3, relacionada funcionalment amb les PP2A, mostra un fenotip oposat. Similar efecte trobem entre les fosfatases de tipus 2C, on Ptc1 és la més feble en glicerol i la més potent a 38,5°C. Cal destacar el fenotip de *VHS3*, que com ja hem dit actua de forma anàloga a Hal3, i del gen que codifica l'antiportador

Nha1, que es mostra especialment potent quan es sotmet el mutant *sit4Δ* a altes temperatures d'incubació.

De la mateixa manera que hem fet per Sit4, ens vam plantejar si algun d'aquests gens podia estar involucrat en la via de Hal3 i de la fosfatasa Ppz1. Al contrari del que passa amb *SIT4*, la delecció de *HAL3* no afecta la capacitat de creixement d'una soca en condicions normals. Ara bé, la falta d'aquesta subunitat reguladora de Ppz1 es tradueix en una important sensibilitat a altes concentracions de sals, especialment clorur de liti i clorur de sodi (Ferrando *et al.*, 1995). Com ja hem dit, alguns dels gens que havíem identificat havien estat prèviament relacionats amb el manteniment de la homeostasi salina. Per aquest motiu, vam provar l'efecte de la sobreexpressió dels gens supressors en un mutant *hal3* sotmès a creixement en plaques suplementades amb liti i sodi. La figura 4 de l'article 1 mostra com les quinases Hal4 i Hal5 i recuperen, amb força potència, la manca de Hal3 en plaques amb altes concentracions de liti i, en menor mesura també de sodi. Aquest efecte era d'esperar, donat el seu paper de reguladors del transport de potassi, un catió molt important en el manteniment de la homeostasi salina (Mulet *et al.*, 1999). Contràriament, la sobreexpressió de *PTK2* va tenir un efecte lleugerament negatiu, tal i com s'ha descrit per cèl·lules salvatges (Goossens *et al.*, 2000). És destacable el fenotip de *PTC3*, que va incrementar sensiblement la tolerància de la soca *hal3Δ* a sodi i a liti, mentre que la sobreexpressió de *PTC1* o *PTC2* no van mostrar cap efecte beneficiós. De fet, les fosfatases de tipus 2C han estat involucrades en la regulació de la via de MAP quinases de resposta a alta osmolaritat controlada per la quinasa Hog1 (Wamka *et al.*, 2001; Young *et al.*, 2002). Amb tot, és improbable que el fenotip que s'observa amb la sobreexpressió de *PTC3* sigui degut a la inactivació d'aquesta via, donat que aquest efecte es veu a concentracions de sals prou baixes com per no produir un *stress* osmòtic apreciable. A més, l'efecte diferencial de Ptc3 demostra que, tot i formar part de la mateixa família, aquestes fosfatases presenten funcions diferenciades en la biologia del llevat. Cal destacar l'efecte de la sobreexpressió del gen *VHS3*, que presenta un fenotip força modest en tots dos tipus de plaques. Tal i com s'ha descrit posteriorment, l'efecte de la sobreexpressió de *VHS3* només és evident en absència de Hal3. Aquests resultats reforcen la hipòtesi de Vhs3 com un homòleg de Hal3 però amb un paper comparativament menor que aquest en la regulació de la fosfatasa Ppz1 (Ruiz *et al.*, 2004).

Tant la manca de *PPZ1* com la sobreexpressió de *HAL3* agreugen el fenotip lític del mutant *mpk1Δ/slt2Δ*, una MAP-quinasa involucrada, precisament en el manteniment de la integritat cel·lular (Lee *et al.*, 1993; Posas *et al.*, 1995-a; de Nadal *et al.*, 1998; Yennush *et al.*, 2002; Merchan *et al.*, 2004). Per tal de comprovar fins a quin punt els gens supressors que havíem aïllat s'assemblaven a *HAL3*, vam estudiar l'efecte de la seva sobreexpressió en un mutant *mpk1Δ*. Aquesta soca presenta problemes de creixement en plaques de medi sintètic a altes temperatures (37°C) si aquestes no es complementen amb un estabilitzant osmòtic, com el sorbitol (generalment a una concentració de 1 M). La sobreexpressió dels gens que codifiquen les fosfatases de Tipus 2C, especialment *PTC1*, millora de forma molt significativa el creixement d'aquesta soca en absència de sorbitol. Això no és d'estranyar, donat que aquest va ser inicialment aïllat com un gen capaç de suplir, en part, els defectes fenotípics associats a alguns al·lels termosensibles de Pkc1 i, a més, la doble del·lecció *mpk1Δ ptc1Δ* és sintètica letal (Huang i Symington, 1995). La sobreexpressió de *SWI4* també mostra un efecte molt vigorós en plaques sense sorbitol. Aquest gen codifica un factor de transcripció que, com hem dit, forma part junt amb Swi6 del complex transcripcional conegut com a SBF, responsable de la inducció de la expressió de ciclines de G1 però també elements involucrats en la síntesi de paret (Sidorova i Breeden, 1993; Spellman *et al.*, 1998). No és d'estranyar, doncs, que la del·lecció de *SWI4* mostri, en algunes soques, un defecte de creixement a altes temperatures que pot ser compensat mitjançant l'addició de sorbitol. A més, tant la del·lecció de Swi4 com de Swi6 són sensibles a substàncies que causen *stress* de paret cel·lular (Igual *et al.*, 1996). De fet, hi ha evidències experimentals que apunten a la possibilitat que la quinasa Pkc1 estigui regulant, en part, la transcripció específica de gens induïda per Swi4 (Baetz *et al.*, 2001). Per aquest motiu sembla lògic, doncs, que la sobreexpressió de *SWI4* pugui compensar la del·lecció de la quinasa Mpk1. Finalment, l'efecte de *PTC1* i *SWI4* només és superat per la sobreexpressió del gen *BCK2*. No debades, aquest gen va ésser aïllat com un supressor multicòpia de la manca d'activitat de Pkc1, capaç de rescatar un mutant *mpk1Δ* (Lee *et al.*, 1993-b).

### 3.2 CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL DE HAL3, LA SUBUNITAT INHIBIDORA DE LA FOSFATASA PPZ1 DEL LLEVAT MITJANÇANT UN ESTUDI PER MUTAGÈNESI.

En el moment d'iniciar aquest treball només s'havia identificat una subunitat reguladora de les fosfatases PPZ codificada, com ja hem dit, pel gen *HAL3/SIS2*. Aquest havia estat aïllat inicialment en dos treballs diferents, per la seva capacitat de conferir tolerància a altes concentracions de sal i per revertir, en part, els defectes en cicle d'un mutant *sit4Δ* (Ferrando *et al.*, 1995; Di Como *et al.*, 1995). Un treball desenvolupat en el nostre laboratori havia demostrat, *a posteriori*, que els efectes fenotípics d'aquest gen eren atribuïbles al seu paper com a subunitat reguladora negativa de la fosfatasa Ppz1. En aquest treball es descriu com Hal3 s'uneix, mitjançant un mecanisme desconegut, a la meitat carboxi-terminal de la fosfatasa i inhibeix fortament l'activitat d'aquest enzim (De Nadal *et al.*, 1998). Un interessant aspecte és resoldre quin és el mecanisme d'unió entre Ppz1 i la subunitat Hal3, esbrinar com aquesta interacció és capaç de modular l'activitat de la fosfatasa i identificar quins són els residus de Hal3 i de Ppz1 involucrats en aquest procés. Donat que la meitat carboxi-terminal de Ppz1 és similar a PP1c (que en el llevat és codificada per *GLC7*) també és interessant determinar si la interacció de Hal3 i Ppz1 es dona per mecanismes similars a la que es dona entre la fosfatasa PP1c i les seves subunitats reguladores.

#### 3.2.1 Avaluació de la Rellevància Funcional dels Residus His<sup>378</sup> i <sup>265</sup>HVLF<sup>268</sup> de Hal3.

Estructuralment, Hal3 no presenta un grau de similitud significatiu amb cap de les subunitats reguladores conegudes de les fosfatases de tipus 1 i, a més, no interacciona amb Glc7 (De Nadal *et al.*, 1998; García-Gimeno *et al.*, 2003). De totes maneres, una anàlisi de la seqüència d'aquesta proteïna ens va permetre identificar una zona, <sup>263</sup>KLHVLF<sup>268</sup>, que és, fins a cert punt, compatible amb el motiu RVxF, si exceptuem el fet que el residu bàsic és una histidina i no una arginina o una lisina (més freqüents). En el llevat s'han identificat seqüències similars que tenen un paper important en l'activitat de algunes subunitats reguladores de Glc7. És el cas de Gac1, per exemple, que conté la zona <sup>69</sup>KNVRF<sup>73</sup>, on la valina 71 i, sobretot, la fenilalanina 73 són imprescindibles per la unió i funció sobre Glc7 (Wu *et al.*, 2001). Per tant, vam



considerar necessari avaluar la importància funcional d'aquest element en Hal3. Per a fer-ho vam canviar la His<sup>265</sup> per una glicina i la Phe<sup>268</sup> per una alanina. A continuació vam provar l'efecte individual d'aquests canvis en la seqüència de Hal3 en les funcions de la proteïna *in vivo*. Vam avaluar la capacitat d'aquestes versions de la proteïna de complementar, tant en monocòpia com en multicòpia, els defectes d'una soca a la que s'havia del·leccionat Hal3. Donat que aquesta soca és sensible a sal, vam provar l'efecte de les mutacions H265G i F268A en plaques suplementades amb clorur de liti o de sodi. En la figura 1 de l'article 2 es pot veure com la mutació F268A no va afectar de forma apreciable la capacitat de Hal3 de conferir tolerància salina a aquesta soca. En canvi, la mutació H265G va reduir parcialment aquesta capacitat, però ambdues es van comportar com la proteïna nativa quan va ésser expressades en vectors multicòpia. A més la sobreexpressió d'ambdues versions va bloquejar, tal i com fa Hal3, el creixement d'una soca *mpk1Δ* en un medi sintètic no suplementat amb sorbitol. Finalment, totes dues versions de Hal3, tant en nivells normals com en sobreexpressió, van permetre superar el bloqueig que presenta la soca JC002 (*sit4Δ tetO:HAL3*) en plaques que contenen 20 µg/ml de doxiciclina.

Com hem mencionat a la introducció, s'ha proposat que Hal3 forma part d'una família que inclou proteïnes de fongs (*Saccharomyces cerevisiae* i *Candida tropicalis*), plantes (*Oryza sativa* i *Arabidopsis thaliana*), *Drosophila melanogaster*, *Chaenorabditis elegans*, ratolins i humans (Espinosa-Ruiz *et al.*, 1999). La presència d'una cua carboxi-terminal àcida és una particularitat que, en aquesta família, només comparteixen les proteïnes de llevat. Entre els homòlegs que acabem de mencionar es troben les dues isoformes la proteïna Hal3 de la planta *Arabidopsis thaliana*, conegudes com AtHal3a i AtHal3b. Tot i que són més semblants a les seves homòlogues animals que a les de fongs, la sobreexpressió de AtHal3a, la més estudiada de les dues isoformes, és capaç de complementar parcialment la sensibilitat salina d'un llevat *hal3Δ*. L'expressió heteròloga en *E. coli* de AtHal3a havia aportat evidències que apuntaven que aquest enzim podia ésser, en realitat, una flavoproteïna (Espinosa-Ruiz *et al.*, 1999). Gràcies a la seva cristal·lització es va poder resoldre la estructura terciària d'aquesta proteïna que s'organitza de forma homotrimèrica (Albert *et al.*, 2000). A més, es va apuntar la possibilitat que AtHal3a actués, en realitat, com una deshidrogenasa, catalitzant la  $\alpha$ - $\beta$  deshidrogenació d'un residu peptidilcisteïna. En aquest mecanisme

estaria involucrada la histidina 90, que es troba conservada en Hal3 (en la posició 378, concretament) (Albert *et al.*, 2000) . Per tant, ens vam preguntar si aquest residu podia jugar un paper clau en la funció de Hal3 *in vivo*. Després de ser analitzada pels mateixos fenotips que hem descrit anteriorment, una versió de Hal3 que contenia la mutació de H<sup>378</sup> per una Ala es va comportar exactament igual com una versió salvatge de la proteïna.

A continuació, ens vam plantejar la possibilitat d'estudiar si les mutacions que hem descrit podien modificar la capacitat de Hal3 d'unir-se i/o inhibir a Ppz1. Amb aquest propòsit, vam generar la proteïna de fusió GST-Ppz1 $\Delta$ 1-334, que conté aproximadament la meitat carboxi-terminal de Ppz1, que recordem és la zona on resideix l'activitat fosfatasa de la proteïna. Aquesta s'expressava en *E. coli* i es purificava mitjançant una columneta de glutatió-sefarosa 4B (Amersham Biosciences), una matriu que conté glutatió unit de forma covalent. La columna de glutatió-sefarosa així generada s'utilitzava com a sistema d'afinitat de Hal3. Les versions de la proteïna Hal3 que hem mencionat anteriorment es van expressar en una soca de llevat *ppz1* $\Delta$  i els extractes obtinguts, que contenien quantitats similars de Hal3, es van incubar amb les columnetes de glutatió-sefarosa que contenien la proteïna de fusió GST-Ppz1 $\Delta$ 1-334 unida. Només el canvi H265G va disminuir lleugerament l'eficiència d'unió de la proteïna Hal3 a Ppz1. A continuació vam voler investigar si aquestes mutacions tenien algun efecte en la capacitat de Hal3 d'inhibir l'activitat fosfatasa de Ppz1 *in vitro*. S'ha descrit que Ppz1 és capaç de desfosforilar eficientment *p*-nitrofenilfosfat (pNPP) (Posas *et al.*, 1995-b). Aquest és un compost incolor, que en desfosforilar-se passa a *p*-nitrofenol, que presenta un color groc característic, capaç d'ésser mesurat a 405 nm en un espectrofotòmetre convencional. Per a fer-ho, vam generar proteïnes de fusió GST amb les versions de Hal3 subjectes a estudi. D'altra banda, la proteïna de Ppz1 $\Delta$ 1-334 expressada en *E. coli* era alliberada de la GST mitjançant l'ús d'una proteasa recombinant comercial (PreScission, Amersham Pharmacia) expressament dissenyada per aquesta finalitat. Quantitats creixents de les diferents versions de Hal3 expressades en *E. coli* s'incubaven cinc minuts a 30°C amb Ppz1  $\Delta$ 1-334, per donar temps a que es produís la interacció. Posteriorment s'afegia el substrat i s'analitzava l'activitat *p*-nitrofenilfosfatasa de Ppz1 *in vitro*. De nou, només el canvi H265G va disminuir lleument la capacitat de Hal3 d'inhibir la fosfatasa.

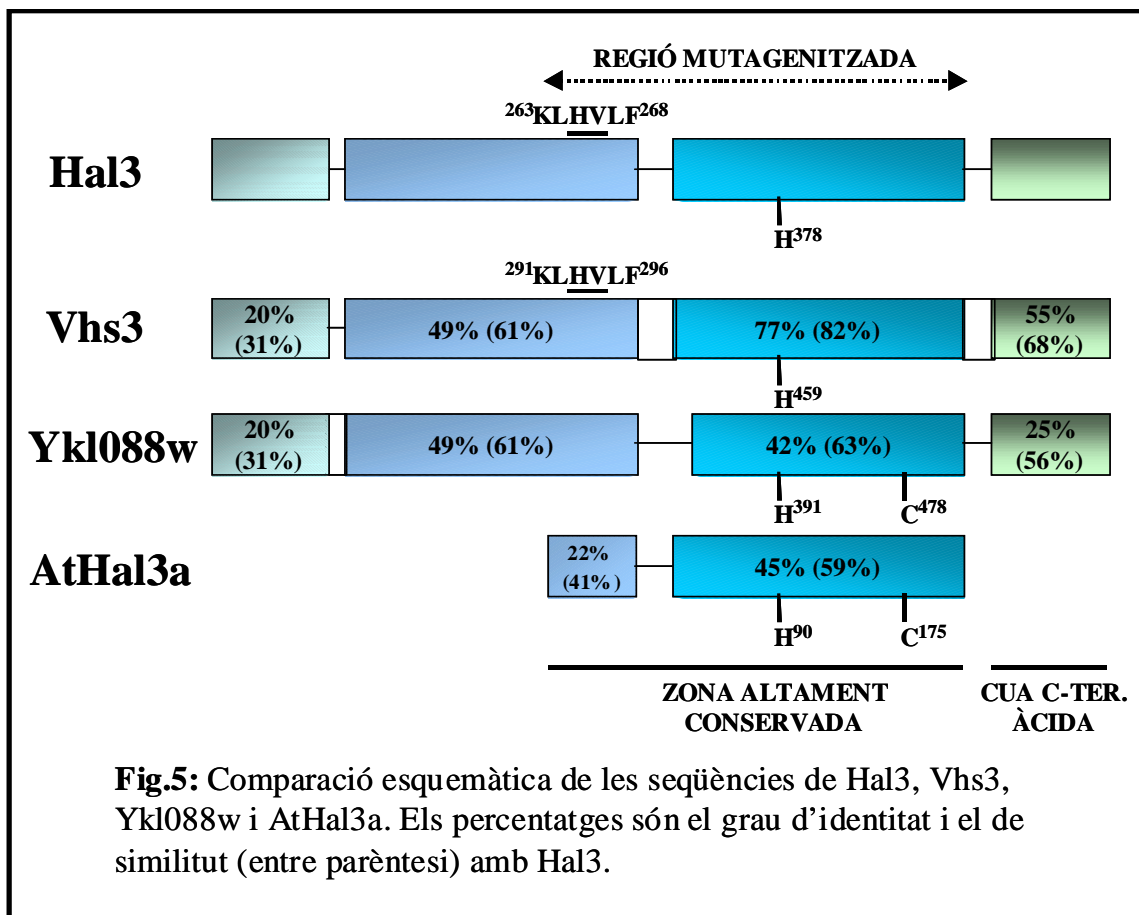
Les evidències experimentals que presentem indiquen que la zona <sup>263</sup>KLHVLF<sup>268</sup> no té un paper rellevant en la interacció de Hal3 i Ppz1. El canvi de la histidina 265 per una glicina disminueix l'activitat de Hal3 tant *in vivo* com *in vitro* (perjudicant la eficiència d'interacció amb Ppz1 i, conseqüentment, la capacitat d'inhibició) però això es podria deure a la diferència tan dràstica de tamany en aquest residu. A més, la mutació de la fenilalanina, un residu que en altres estudis s'ha demostrat que resulta imprescindible en el motiu d'unió, no ha produït cap efecte en l'activitat de Hal3 (Dombek *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2001). Cal ressaltar que hi ha algunes subunitats reguladores de PP1 que no contenen cap motiu RVxF. És el cas de la proteïna anomenada Sds22, per exemple (MacKelvie *et al.*, 1995). Amb tot, la estructura d'aquesta proteïna no s'assembla a Hal3 i evidències experimentals relativament recents apunten que no és probable que aquesta subunitat reguladora de Glc7 interaccioni amb Ppz1 (Ceulemanns *et al.*, 2002).

D'altra banda, les nostres dades experimentals demostren que una versió de Hal3 amb el canvi H378A és, pel que fa a les funcions d'aquesta proteïna relacionades amb Ppz1, totalment indistingible de la proteïna nativa. Per tant, aquest residu no té un paper fonamental en la activitat inhibidora que Hal3 exerceix sobre la fosfatasa. Cal ressaltar, però, que hi ha dades experimentals que demostren que Hal3 pot tenir funcions independents de Ppz1 (Ruiz *et al.*, 2004). Per tant, i com veurem més endavant, no es pot descartar que aquest residu tingui un paper rellevant en possibles funcions de Hal3 no relacionades amb la fosfatasa.

### **3.2.2 Un Experiment de Mutagènesi a l'Atzar Identifica una Zona de Hal3 Important per a la Unió i Inhibició de Ppz1.**

Donat que l'aproximació anterior no havia permès identificar residus importants en la funció de Hal3, ens vam plantejar la possibilitat de desenvolupar una estratègia experimental diferent. En el moment d'iniciar aquest treball es coneixia la existència de dos gens de llevat, *VHS3* i l'ORF YKL088w, relacionats estructuralment amb *HAL3*. Com ja hem dit, *Vhs3* és capaç de suplir, en part, la manca de Hal3 (Muñoz *et al.*, 2003). Per a YKL088w no es disposava d'informació prèvia referent al seu paper fisiològic en el llevat. Tots tres gens comparteixen un grau important d'identitat en una

zona compresa aproximadament entre els residus Arg<sup>256</sup> i Ile<sup>480</sup> de Hal3, just per sobre de l'inici de la característica cua carboxi-terminal àcida d'aquestes proteïnes (veure **Figura 5**). Aquesta regió és, a la vegada, la més conservada en la resta de membres de la família de Hal3, tal i com passa amb AtHal3a. Cal ressaltar que aquesta zona conté la seqüència <sup>263</sup>KLHVLF<sup>268</sup> i el residu H<sup>378</sup> estudiats prèviament. Per tant, ens vam plantejar de fer una recerca experimental encaminada a trobar residus d'aquesta regió conservada implicats en la funció i inhibició de Ppz1. Per a fer-ho vam generar una biblioteca de versions de Hal3 mutades a l'atzar, mitjançant una reacció de PCR propensa a la generació d'errors (Fromant *et al.*, 1995) (veure materials i mètodes de l'article 2).



Aquesta aproximació es basa en la capacitat de *HAL3* de bloquejar, en multicòpia, el creixement d'una soca *mpk1Δ* en plaques sense un estabilitzant osmòtic. Per tant, els transformants que creixen en condicions no permissives són candidats a portar una versió no funcional de Hal3. D'un total d'unes 40000 colònies vam obtenir 225 clons; d'aquests només la meitat, aproximadament, presentava un DNA plasmídic amb un patró de bandes compatible amb la presència de *HAL3* íntegre després d'ésser digerit

per *EcoRI*. Aquests clons es va tornar a transformar en la mateixa soca per verificar-ne el fenotip i la resta foren descartats. Amb tot, hi havia la possibilitat de clonar gens que donessin una proteïna truncada o que no s'expressés en nivells suficients. Per aquest motiu, es va procedir a obtenir extracte proteic total dels 85 clons restants i es va avaluar per *immunoblott* amb anticossos específics anti-Hal3 la presència de la proteïna sencera. Això va permetre descartar gairebé un 80% dels clons degut a que no van donar senyal, aquesta era sensiblement menys intensa que la proteïna nativa o la proteïna era d'un tamany inferior a l'esperat. La resta, 17 clons en total, van ésser seqüenciats per a cercar mutacions que es traduïssin en canvis en la seqüència de la proteïna. Com es pot veure en la taula 2 de l'article 2, nou d'aquestes mutacions van resultar úniques i, a més, amb la particularitat que la majoria d'elles es concentren en els darrers 40 residus de Hal3. En concordància amb els nostres resultats anteriors, cap de les mutacions trobades va afectar ni la regió <sup>263</sup>KLHVLF<sup>268</sup> ni el residu H<sup>378</sup>. A continuació, vam voler determinar quina era la potencia exhibida per aquestes mutacions sobre algunes de les funcions que desenvolupa Hal3. Com es pot veure en la figura 3 de l'article 2, algunes de les mutacions, com Y313D o I480F, afecten molt poc a Hal3 mentre que d'altres, com les que involucren els residus E<sup>460</sup>, V<sup>462</sup> i N<sup>478</sup> permeten un creixement de la soca *mpk1Δ* igual, o fins i tot major, que la soca transformada amb un plàsmid buit. Similar efecte es pot veure per al fenotip salí de Hal3. Així, la halotolerància (a sodi i liti) conferida per les mutacions dels residus Y<sup>313</sup> i I<sup>480</sup> és una mica inferior quan s'expressen en un vector monocòpia, però és gairebé igual que la proteïna salvatge quan aquestes versions són sobreexpressades. En el cas de les mutacions V390G, I446K, N466I i N478D produeixen una acusada pèrdua de tolerància a sal en monocòpia, que també pot ésser parcial o totalment restablerta quan aquestes versions són sobreexpressades (veure figura 4 de l'article 2). En canvi, les mutacions W452G, E460G i V462A produeixen una pèrdua total del fenotip salí de Hal3 fins i tot en multicòpia, de tal manera que es comporten gairebé igual que un plàsmid buit. Un resultat similar es dona quan s'observa l'efecte de totes aquestes versions a l'hora de permetre el creixement de la soca JC002 en condicions no permissives. De nou, l'efecte de les mutacions en els residus W<sup>452</sup> i, especialment E<sup>460</sup> i V<sup>462</sup> es tradueix en una pèrdua aparentment total de la funció de la proteïna.

En aquest punt, la pregunta era si aquests canvis identificats en la seqüència de Hal3 alteraven la capacitat d'aquesta proteïna d'unir-se, i per tant, d'inhibir a Ppz1 o si,

pel contrari, feien perdre la capacitat de regular la fosfatasa mantenint la possibilitat d'interaccionar-hi. Per tant, vam portar a terme experiments d'unió *in vitro* com els que hem comentat anteriorment. Els canvis en els residus V<sup>390</sup>, I<sup>446</sup> i W<sup>452</sup> van disminuir substancialment la capacitat de Hal3 d'unir-se a Ppz1. És possible, tot i que molt menys evident, que els canvis en els residus Y<sup>313</sup> i I<sup>480</sup> també afectin la interacció entre ambdues proteïnes. La resta de mutacions no va disminuir de forma significativa la capacitat de Hal3 d'unir-se a la fosfatasa. A continuació, vam avaluar la capacitat d'aquestes versions, expressades en *E. coli* d'inhibir a Ppz1 *in vitro*, de forma anàloga al que hem explicat anteriorment. D'aquesta manera, vam poder comprovar com les mutacions que alteren la interacció entre Hal3 i Ppz1 també disminueixen de forma més o menys significativa la capacitat d'inhibir la fosfatasa (com és d'esperar). El més significatiu és, però, que algunes de les versions de Hal3, com V462A i, especialment E460G, que no veuen afectada la seva capacitat d'interaccionar amb Ppz1 són, parcial o totalment, incapaces d'inhibir la fosfatasa. Això apunta la possibilitat que Hal3 tingui regions (que inclouen residus com I<sup>446</sup> i W<sup>452</sup>) específiques per a la interacció amb Ppz1 i d'altres, la funció dels quals tindria més a veure amb la inhibició de l'activitat de la fosfatasa, com passa amb els residus E<sup>460</sup> i V<sup>462</sup> (Es pot veure un resum dels fenotips obtinguts per a cada versió de Hal3 en la **Taula 2**)

Aquests resultats demostren que les regions de Hal3 involucrades en la unió a Ppz1 i en la inhibició semblen ser independents. És important destacar que gran part de les mutacions que hem identificat, especialment aquelles que produeixen majors alteracions en la funció de Hal3, estan localitzades en una zona relativament petita de la proteïna (del residu 446 al 480). Això indica que aquesta regió, prèvia a la cua àcida i força conservada, té un paper molt important en la regulació de Ppz1.

## Caracterització molecular de subunitats reguladores de Ppz1 en *S. cerevisiae*

**Taula 2**

Resum dels fenotips més significatius de les versions de Hal3 estudiades en aquest treball

Canvi aminoacídic	Posició AtHal3	Soca					Assaigs <i>in vitro</i>	
		<i>Hal3Δ</i>		<i>sit4Δ tetO:HAL3</i>		<i>mpk1Δ</i>	Unió Ppz1 <sup>1-334Δ</sup>	Inhibició Fosfatasa
Mutagènesi dirigida		monocopia	multicopia	monocopia	multicopia	multicopia		
H265G	-	++	+++	++	+++	+	++	++++
F268A	L24	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++++
H378A	H90#	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++++
Mutagènesi a l'atzar								
Y313D	-	+	+++	++	+++	+	+++	++++
V390G	I102	-	++	+	++	-	+	+
I446K	L158	-	+	-	+	-	++	+
W452G	-	-	-	+	+	-	+	+
E460G	I169	-	-	-	-	--*	+++	--*
V462A	K171	-	-	+	-	--*	+++	++
N466I	C175#	-	++	+	++	-	+++	++++
N478D	S187	-	+	+	+	--*	++	+++
I480F	I189	++	+++	+++	+++	+	++	++++
Controls								
Vector		-	-	-	-	-	-	-
HAL3		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++++

\* : Actuen com a dominants negatius

# : Residus que han estat implicats en el mecanisme funcional d' AtHAL3 *in vitro*

Fins al moment, ni la estructura terciària de Hal3 ni la de Ppz1 han estat resoltes. Un dels nostres objectius a més llarg termini és la cristal·lització d'ambdues proteïnes. De moment, hem treballat en la optimització de les condicions d'expressió i de purificació de les proteïnes de fusió GST-Ppz1 i GST-Hal3 i el grup del Dr. Armando Albert (del Laboratori de Química Física Rocasolano, CSIC) està intentant obtenir-ne cristalls. De qualsevol manera, estudis de modelització amb dues biblioteques diferents de proteïnes caracteritzades tridimensionalment mostren com, amb una alta probabilitat, la regió de Hal3 situada entre els residus 256 i 480 presentaria una estructura terciària homòloga a AtHal3 i EpiD (Albert *et al.*, 2000; Blaesse *et al.*, 2000). Aquest grup de flavoproteïnes actua en forma d'homotrímerns, on el grup flavinmononucleòtid (FMN) està situat entre dos protòmers adjacents. Dades d'ultracentrifugació obtingudes en el laboratori del Dr. Albert avalen la hipòtesi que Hal3 actuï també com un trímer (no mostrat). Per tant, hem considerat raonable modelar una possible estructura terciària de Hal3 usant la obtinguda per a AtHal3a. D'aquesta manera, hem intentat predir la

localització en la proteïna dels residus que hem estudiat en Hal3. Com es pot veure en la figura 7 de l'article 2, la majoria dels canvis puntuals afectarien residus situats en la superfície de la proteïna. Només la valina 390 estaria situada en l'interior hidrofòbic de Hal3, de tal forma que és difícil predir quins canvis de conformació pot causar la mutació d'aquest aminoàcid. A més, gairebé tots aquests residus es situen en la mateixa àrea de la molècula, cosa que apunta a una direccionalitat en la interacció Hal3-Ppz1. Aquests set aminoàcids formen tres grups diferents: la isoleucina 446 i el triptòfan 452 es localitzen en el llaç que connecta la hèlix alfa 5 i la fulla beta 6 mentre que la asparragina 478 i la isoleucina 480 es troben en la zona amino-terminal de la alfa 6. En el cas de les mutacions E460G, V462A i N466I es localitzen en una àrea coneguda com el “*flap*”, una zona que en AtHal3a es manté desestructurada excepte si un substrat s'uneix a la proteïna (Albert *et al.*, 2000; Blaesse *et al.*, 2000). Precisament, aquestes són les mutacions que afecten la capacitat de Hal3 d'inhibir la fosfatasa sense alterar, en absolut, la capacitat d'ambdues proteïnes d'interaccionar. Per tant, aquests resultats demostren que Ppz1 i Hal3 interaccionen almenys en dos punts diferents, i que la inhibició, en la que molt probablement desenvolupa un paper important el *flap* de Hal3, es dona quan tots dos punts estan ocupats. Aquest fet és similar al descrit per a algunes subunitats reguladores de PP1, on hi ha una interacció principal (sovint a través del motiu RVxF) i una o més interaccions secundàries, importants per la especificitat de la regulació de la fosfatasa (Bollen, 2001).

### 3.2.3 Un Estudi més Detallat d'alguns Residus Importants en la Unió i/o Inhibició de Ppz1 Revela Possibles Funcions de Hal3 Independents de la Fosfatasa.

Un dels objectius del nostre laboratori és identificar noves subunitats reguladores de les fosfatases de tipus Z. Com ja hem mencionat, un possible candidat és la proteïna codificada per *VHS3*. El treball desenvolupat fins ara, encarat a caracteritzar funcionalment aquest gen, havia demostrat que la doble del·lecció de *VHS3* i *HAL3* era letal. Ni l'anàlisi de tètades ni la separació aleatòria d'espores no havien aconseguit generar cèl·lules haploids que continguessin ambdues del·leccions. Hom podria pensar que això és degut a una sobreactivació de l'activitat PPZ *in vivo*, però, sorprenentment, aquest fet era independent de la presència de les fosfatases Ppz1 i Ppz2. És a dir, tampoc es van poder obtenir espores viables del triple mutant *hal3 vhs3 ppz1* ni del quàdruple mutant *hal3 vhs3 ppz1 ppz2* (Ruiz *et al.*, 2004). A més, el doble mutant *hal3 vhs3*



contenint *HAL3* clonat en un vector monocòpia era capaç de donar espores viables però vam ser incapaços de fer perdre el plàsmid a aquesta soca, ni per passis successius en medi no selectiu ni mitjançant l'ús de àcid 5-fluororotí (que exerceix una selecció negativa pel marcador *URA3* que conté el plàsmid). Tots aquests resultats apuntaven la possibilitat que Hal3 (i Vhs3) tinguin alguna important funció fisiològica independent de les fosfatases PPZ (Ruiz *et al.*, 2004). Per a investigar més sobre aquesta hipòtesi, vam pensar que seria interessant esbrinar l'efecte d'algunes de les mutacions identificades en Hal3 en la supressió del fenotip sintètic letal. Per a fer-ho, vam transformar una soca diploid *HAL3/hal3 VHS3/vhs3* (soca MAR6) amb vectors monocòpia contenint algunes de les versions de Hal3 que afectaven de forma més ostensible la capacitat d'unió a Ppz1 (portadores de les mutacions I446K i W452G) o d'inhibir la fosfatasa (E460G, V462A i N478D). A més del vector amb la còpia nativa de Hal3 com a control, vam transformar també la versió que contenia la mutació en la histidina 378. L'anàlisi de tètredes va evidenciar que, com era d'esperar, la soca transformada amb la versió salvatge de *HAL3* donava lloc a 4 espores viables per tètreda. En canvi, i de forma inesperada, de la soca que contenia la versió amb la mutació en la His378 ens fou impossible recuperar cap doble mutant viable, tot i haver analitzat un total de 27 tètredes. De fet, la distribució de les tètredes va ser de 4 tipus parentals (2 colònies viables), 5 tipus no parentals (totes 4 colònies viables) i 18 tetratipus (3 colònies viables). Aproximadament el mateix resultat es va obtenir per a la soca que contenia un plàsmid buit, amb una distribució 4:4:17 (de 25 tètredes analitzades) i cap espora doble mutant aïllada. Calia considerar la possibilitat que algunes de les 5 mutacions seleccionades en la regió de Hal3 compresa entre els residus 446 i 480 també resultés letal. Degut a la quantitat de treball que representa dissecionar un nombre tan elevat de tètredes, vam avaluar l'efecte d'aquestes mutacions mitjançant una anàlisi aleatòria d'espores. En aquest cas, s'indueix la esporulació del cultiu de cèl·lules diploids, i les ascospores que componen la tètreda es separen de forma mecànica (sonicació o agitació amb boles de vidre). Posteriorment, s'analitza en placa el fenotip de les colònies obtingudes. Cal remarcar que mitjançant aquesta aproximació experimental tampoc es van poder obtenir espores dobles haploids viables del plàsmid buit ni de la versió de Hal3 que contenia la mutació H378A, i que en l'experiment havíem usat com a controls. D'altra banda, de totes cinc versions de Hal3, fins i tot les que presenten canvis que afecten més severament la funció de Hal3 *in vivo*, com W452G i E460G, es van recuperar colònies viables que contenien els tres marcadors

corresponents a les dues del·leccions i al plàsmid (entre un 15 i un 24%). D'aquestes, més del 90% eren espores haploids. Com es pot veure en la figura 6 de l'article 2, aquestes espores creixien, tant en medi mínim com en medi ric, aproximadament igual que una soca haploid salvatge. A més, l'avaluació del fenotip salí seguia evidenciant la pèrdua de funció d'aquestes versions en uns nivells molt similars als que hem descrit per a una soca *hal3Δ*.

Per tant, aquests resultats confirmen la observació prèvia que les mutacions de *HAL3* i *VHS3* són sintètiques letals (Ruiz *et al.*, 2004). Aquesta inviabilitat és capaç de ser rescatada per versions de Hal3 que mostren defectes molt importants en la regulació de Ppz1 tant *in vivo* com *in vitro*, ja sigui d'unió com d'inhibició de l'activitat de la fosfatasa. Pel contrari, una versió de Hal3 que conté una mutació en la Histidina 378 no presenta cap defecte fenotípic atribuïble a les funcions conegudes de Hal3, s'uneix i inhibeix a Ppz1 *in vitro* com si fos la proteïna nativa, però no és capaç de conferir viabilitat al doble mutant. Cal destacar que aquest residu també està conservat en Vhs3 i es correspondria amb la histidina 459 (veure **Figura 5**). De fet, la substitució d'aquesta histidina per una alanina també elimina la capacitat de *VHS3* de rescatar la letalitat del doble mutant. En aquest treball demostrem que la histidina 378 de Hal3 és imprescindible en la supressió de la letalitat, de la mateixa manera que s'ha descrit per la histidina 459 de Vhs3 (Ruiz *et al.*, 2004). Aquests aminoàcids són equivalents a la H90 de AtHal3, que podria estar involucrada en la  $\alpha,\beta$ -deshidrogenació d'un residu de peptidilcisteïna (Albert *et al.*, 2000). Treballs posteriors han demostrat amb detall que AtHal3 pot catalitzar, *in vitro*, la reacció de descarboxilació de 4'-fosfopantenoilcisteïna a 4'-fosfopantetheïna, un pas clau en la síntesi del CoenzimA (Kupke *et al.*, 2001; Hernández-Acosta *et al.*, 2002; Steinbacher *et al.*, 2003; Kupke *et al.*, 2003). Una possible explicació és que Hal3 i Vhs3 formin part de la via de la síntesi de CoA. Aquesta hipòtesi, molt atractiva, topa amb el fet que en el mecanisme catalític de descarboxilació descrit per a AtHal3 hi juga un paper clau la cisteïna 175, un residu que no es troba conservat en Hal3 ni en Vhs3. No obstant, aquest aminoàcid sí que es troba en YKL088w, un ORF essencial que, com dèiem, presenta homologia estructural amb Hal3 i Vhs3 de *Saccharomyces cerevisiae*, i amb AtHal3a (Espinosa-Ruiz *et al.*, 1999; veure **figura 5**). YKL088w també està essent caracteritzat en el nostre laboratori i, pel moment, el seu paper fisiològic és desconegut.

### **3.3- CARACTERITZACIÓ MOLECULAR D' *YPII*, UN NOU INHIBIDOR DE LA PROTEÏNA FOSFATASA DE TIPUS 1 DE *Saccharomyces Cerevisiae*.**

El tercer dels treballs experimentals que presentem en aquesta tesi forma part d'una col·laboració existent entre el nostre grup i el del Dr. Pascual Sanz, de l'Institut de Biomedicina de València. En aquest laboratori estaven interessats en cercar proteïnes similars als inhibidors de PP1c de mamífers que poguessin actuar sobre Glc7, la seva homòloga en llevat. Una d'aquestes possibles subunitats reguladores era la codificada per l'ORF YFR003c, una proteïna que s'havia aïllat per la seva capacitat d'interaccionar amb Glc7 en diferents *screenings* de doble híbrid (Tu *et al.*, 1996; Uetz *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2001) i que havia estat descrita com un possible homòleg estructural de l'inhibidor-3 d'humans (Zhang *et al.*, 1998).

#### **3.3.1- El Producte del Gen YFR003c Interacciona Físicament amb Glc7 i amb Ppz1**

YFR003c codifica una proteïna essencial, petita -155 aminoàcids- i molt rica en residus hidrofílics. Tot i que el pes molecular estimat és d'uns 18 KDa, mostra una mobilitat electroforètica aberrant en un gel d'acrilamida, de tal manera que migra com si es tractés d'una proteïna de gairebé 30 KDa. Totes aquestes característiques són molt similars a les descrites per algunes de les proteïnes inhibidores de la PP1c de mamífers. Una recerca informàtica detallada de la proteïna utilitzant una anàlisi per BLAST va revelar que tant Yfr003c com l'inhibidor-3 humà s'assemblaven força a un grup de proteïnes també petites i hidrofíliques. L'alineament de seqüències i un arbre filogenètic (creat amb el software de Genebee, disponible a [www.genebee.msu.su](http://www.genebee.msu.su)) mostren com aquestes podrien formar una nova família de proteïnes que es trobarien molt conservades al llarg de la evolució, amb homòlegs presents des dels llevats fins als mamífers (Fig. 1 de l'article 3).

Així doncs, YFR003c es convertia en un bon candidat a codificar una nova subunitat reguladora de Glc7 en el llevat. Amb tot, no es podia descartar que aquesta proteïna interaccionés amb altres fosfatases presents en el llevat. De fet, un estudi que investigava les interaccions genètiques entre la fosfatasa de tipus 1 del llevat i les fosfatases de tipus Z havia demostrat que Yfr003c era capaç d'unir-se, per doble híbrid,

tant a Glc7 com a Ppz1 (Venturi *et al.*, 2000). En aquest sentit, resultats experimentals previs obtinguts en el laboratori del Dr. Sanz i en el nostre indicaven que la sobreexpressió de YFR003c mitjançant un promotor potent (com el d'*ADHI*) podia incrementar la tolerància a sal del llevat, tant en una soca salvatge com en un mutant *hal3* (no mostrats); per tant, tampoc es podia descartar, *a priori*, un possible paper regulador de la proteïna codificada per aquest gen sobre la fosfatasa Ppz1, estructuralment similar a Glc7 i amb un paper important en el manteniment de la tolerància salina.

Per tal d'esbrinar si Yfr003c és capaç d'unir-se a físicament a Glc7 o bé a Ppz1 es van dur a terme experiments de copurificació per afinitat amb glutatió-sefarosa similars al que hem descrit per a Hal3. Per a fer-ho, es va fusionar a la zona amino-terminal de Yfr003c una triple cua de l'epítot Hemaglutinina (HA), de forma que pogués ésser detectada amb anticossos anti-HA específics. Com ja s'ha mencionat, la proteïna de fusió creada i expressada en llevat presentava una mobilitat electroforètica superior a l'esperada (d'uns 30 Kda). Com es pot veure a la figura 2A de l'article 3, Yfr003c és capaç d'unir-se *in vitro* a la proteïna recombinant GST-Glc7. És més, tal i com s'observa en la fig. 2B, Yfr003c també es pot unir a la meitat carboxi-terminal de Ppz1 (GST-Ppz1<sub>1-344</sub>Δ), amb una afinitat aparentment similar a la que s'uneix a Glc7.

### 3.3.2- Yfr003c és capaç d'inhibir específicament a la Fosfatasa Glc7.

Donat que la proteïna objecte del nostre estudi s'uneix tant a la zona catalítica de Ppz1 com a Glc7 *in vitro*, vam voler investigar si Yfr003c era capaç de modificar d'alguna manera l'activitat d'aquestes fosfatasas. Havia estat descrit prèviament que ambdues proteïnes de fusió GST-Glc7 i GST-Ppz1<sub>Δ1-334</sub> expressades en *E. coli* podien utilitzar com a substrat el compost anomenat *p*-nitrofenilfosfat (pNPP). Per a portar a terme aquest tipus d'experiment es va construir una nova proteïna de fusió GST-Yfr003c, de tal manera que aquest enzim era expressat en bactèria i es purificava amb el sistema d'afinitat de glutatió-sefarosa que acabem de comentar. Per tal d'evitar una possible interferència de la cua de GST en l'activitat de l'inhibidor, aquesta va ésser alliberada mitjançant proteòlisi amb la proteasa comercial PreScission. De forma similar als experiments d'inhibició *in vitro* que hem comentat per Hal3, es preincubaven quantitats creixents d'Yfr003c amb una quantitat fixa de fosfatasa durant 5 minuts a

30°C, per tal de donar temps a que es donés la interacció. Com a controls es va usar la proteïna GST i la proteïna de fusió GST-Hal3. Aquests experiments van posar de manifest que, si bé Yfr003c és capaç d'inhibir a Ppz1, l'efecte en l'activitat d'aquesta fosfatasa és molt modest, especialment comparat amb l'inhibidor Hal3. Per contra, Yfr003c pot inhibir de forma molt més efectiva Glc7, una fosfatasa l'activitat de la qual gairebé no es veu modificada per la presència de Hal3 (veure figures 3A i 3C de l'article 3). Aquesta capacitat d'inhibició *in vitro* no es veu afectada si s'incuba prèviament Yfr003c a 95°C durant 5 minuts (no mostrat). Això demostra que l'activitat d'aquesta proteïna també és estable a altes temperatures, tal i com s'ha descrit per alguns inhibidors de PP1c de mamífers.

Sembla evident que Yfr003c es pot comportar, *in vitro*, com a un nou inhibidor de la fosfatasa Glc7. Tot i que hi ha descrit un nombre important de subunitats reguladores, encara no s'ha trobat cap inhibidor específic per a Glc7. Experiments *in silico* portats a terme amb aquesta fi han fracassat. A més, Glc8, l'homòleg estructural de l'inhibidor-2 del llevat, actua més aviat com un activador de la fosfatasa (Nigavekar *et al.*, 2002). Per tant, vam voler avaluar fins a quin punt la inhibició de Glc7 exercida per Yfr003c podia ésser observada també en substrats fisiològics de la fosfatasa. Per a fer-ho, vam utilitzar el domini amino-terminal de la proteïna Reg1, marcat també amb un epítip HA. Aquesta proteïna és a la vegada reguladora i substrat fisiològic de Glc7. En efecte, en condicions favorables de glucosa, Reg1 pot ésser desfosforilada per la fosfatasa de tipus 1. Per contra, en condicions de creixement en baixa glucosa, la quinasa anomenada Snf1 s'encarrega de fosforilar-la (Sanz *et al.*, 2000). Aquesta modificació pot ser fàcilment observada en un gel de SDS-PAGE, donat que la proteïna fosforilada migra més lent que la no fosforilada. Utilitzant com a substrat un extracte proteic que contenia HA-Reg1<sub>1-443</sub> fosforilada provinent d'un cultiu de llevat que havia estat sotmès a un *shift* en baixa glucosa (del 4% al 0,05%), vam poder comprovar que aquesta proteïna de fusió era capaç de ser desfosforilada tant per GST-Glc7 com per GST-Ppz1<sub>Δ1-334</sub>. Ara bé, mentre que quantitats creixents de Yfr003c (prèvia incubació amb la fosfatasa pertinent) podien evitar la desfosforilació induïda per Glc7, aquesta proteïna era incapaç d'inhibir l'activitat HA-Reg1 fosfatasa de Ppz1.

Per tal de verificar si Yfr003c es comporta com un inhibidor específic de PP1c, o pel contrari pot actuar també sobre altres fosfatases, vam provar l'efecte que aquesta

proteïna podia exercir sobre l'activitat específica de la PP2A, un altre enzim capaç de desfosforilar pNPP *in vitro*. Aquest experiment es va dur a terme utilitzant PP2A comercial purificada a partir de ronyó boví (Calbiochem) que, de forma anàloga al que ja em explicat anteriorment, s'incubava prèviament amb diferents quantitats d'inhibidor. Com a control es va usar un compost anomenat àcid okadaic (OA), un inhibidor força específic de les PP2A. Tan sols 1 ng d'aquest producte és capaç de disminuir l'activitat de la fosfatasa bovina a nivells gairebé inapreciables, mentre que una quantitat 10 cops major d'OA només va disminuir l'activitat de Glc7 en un 10%, aproximadament. Pel contrari, 5 µg de Yfr003c, que com hem dit disminueixen de forma molt considerable l'activitat de Glc7, pràcticament no van afectar l'activitat de la PP2A.

### 3.3.3- El Tryptòfan 53 de Yfr003c és un Residu Important en la Unió i Inhibició de la Fosfatasa Glc7

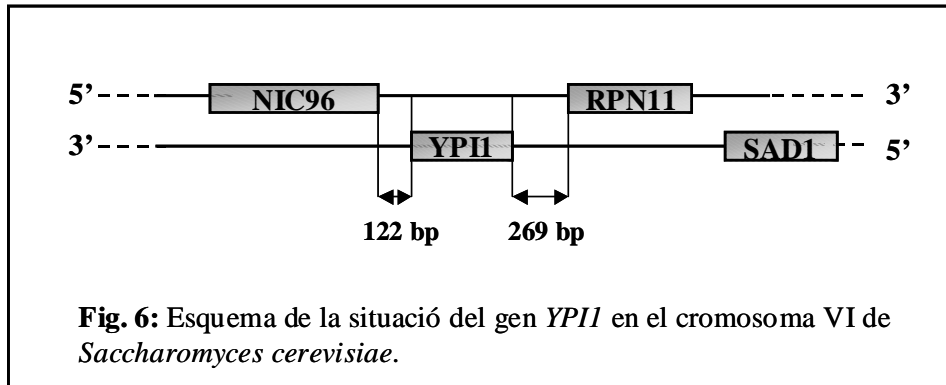
Com hem mencionat anteriorment, el motiu RVxF és una regió consens present en moltes de les proteïnes que interaccionen amb la PP1, i té un paper cabdal en la interacció de la subunitat reguladora i la fosfatasa (Egloff *et al.*, 1997). Un aspecte important a resoldre en el cas d'Yfr003c era si aquesta proteïna podia presentar una zona compatible amb el motiu RVxF. La regió que es mostra en l'alineament de seqüències (figura 1 de l'article 3) és una de les més conservades en totes les proteïnes d'aquesta hipotètica família. Precisament, continguda en aquesta seqüència existeix una regió compatible amb aquest motiu: <sup>48</sup>RHNVRWEE<sup>55</sup> amb la particularitat que la més freqüent fenilalanina seria substituïda, en la majoria dels membres, per un triptòfan (com pel cas d'Yfr003c). S'ha demostrat que la mutació del residu F/W (habitualment a una Alanina) és capaç d'afeblir considerablement, si no d'eliminar, la interacció fructífera entre la proteïna reguladora i la fosfatasa Glc7 (Wu *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2002; Kozubowski *et al.*, 2003). Per tant, es va realitzar una estratègia de mutagènesi dirigida, substituint el residu triptòfan per una alanina. Aquest canvi puntual en la seqüència de la proteïna no només va afeblir significativament la capacitat d'Yfr003c d'unir-se a les fosfatases Glc7 i Ppz1 sinó que, a més, va produir una pèrdua total de l'activitat inhibidora d'aquesta proteïna (veure figures 2 i 3 de l'article 3).

En resum, Yfr003c és una proteïna petita, rica en residus hidrofílics, presenta una mobilitat aberrant en un gel d'acrilamida i la seva activitat és estable a altes

temperatures. Les evidències experimentals que presentem demostren que aquesta proteïna és capaç d'unir-se a Glc7 i a Ppz1 però és comports, almenys *in vitro*, com un inhibidor específic de la activitat fosfatasa de Glc7. En aquest sentit, Yfr003c presenta una zona <sup>51</sup>VXW<sup>53</sup>, que és compatible amb el motiu RVxF d'unió a PP1. A més demostrem que la mutació del residu W<sup>53</sup> present en aquest motiu elimina la capacitat d'Yfr003c d'interaccionar amb Glc7 i d'inhibir aquesta fosfatasa. Tots aquests resultats apunten a que Yfr003c es comporta com un nou inhibidor endogen de la proteïna fosfatasa Glc7 del llevat *Saccharomyces cerevisiae*. Per aquest motiu, hem anomenat aquesta proteïna Ypi1 (Yeast Phosphatase Inhibitor 1), nom amb el qual ens hi referirem a partir d'ara.

### 3.3.4- *YPII* és un Gen Essencial.

Abans d'iniciar assaigs fenotípics que poguessin aclarir quin paper fisiològic pot estar jugant Ypi1 en el llevat, calia esbrinar si era cert que aquesta proteïna està codificada per un gen essencial. Hi havia motius per dubtar dels resultats de l'anàlisi de del·lecció sistemàtica, donat que *YPII*, que es troba en la cadena Crick del DNA, té molt a prop dos gens (codificats en la Watson) que han estat força estudiats i la manca dels quals s'ha demostrat letal (**Figura 6**). La del·lecció sistemàtica podia haver afectat el final d'un gen i/o l'inici de l'altre i, per tant, cabia la possibilitat que la suposada essencialitat de *YPII* fos en realitat un artefacte. Per a comprovar aquest punt, es va interrompre exclusivament l'ORF de *YPII* en una soca diploid mitjançant la recombinació amb un cassette que porta el determinant heteròleg KanMX (que en el llevat confereix resistència a geneticina). Un cop obtinguda, es va transformar aquesta soca amb els vectors pWS (buit) o el mateix plàsmid contenint una versió salvatge de la proteïna Ypi1. Es va induir la esporulació d'aquestes soques, es van disseccionar almenys 10 tètades en cada cas i es van analitzar les espores resultants. En la soca portadora del plàsmid buit el fenotip de letalitat va segregar en una proporció de 2:2 i no es va obtenir cap espora positiva a la geneticina. En canvi, en la soca amb la construcció pWS-*YPII* totes les espores foren viables, i el fenotip de creixement en geneticina va segregar en una proporció 2:2. Aquests resultats confirmaven, doncs, la essencialitat del gen *YPII*. Això suggereix, evidentment, la possibilitat que la proteïna codificada per aquest gen tingui un paper destacat en la fisiologia del llevat.



### 3.3.5- Anàlisi Fenotípic de la Sobreexpressió d'*YPII*.

És molt interessant, per tant, esbrinar quin paper fisiològic pot tenir *YPII* en la biologia de *Saccharomyces cerevisiae*. Donat que la del·lecció d'aquest gen és letal, ens vam plantejar com a aproximació la possibilitat d'estudiar els efectes fenotípics atribuïbles a un increment en la seva expressió. D'entrada, cal dir que la sobreexpressió de *YPII* no afecta de forma significativa la taxa de creixement de cèl·lules salvatges en condicions normals d'incubació (no mostrat). Primer de tot vam estudiar l'efecte d'*YPII* en l'acúmulo cel·lular de glucogen, un important procés cel·lular regulat en el llevat per la fosfatasa *Glc7* (Feng *et al.*, 1991; Hardy i Roach, 1993). Una forma clàssica de demostrar diferències qualitatives en l'acúmulo de glucogen intracel·lular és usar vapors de iode per a tenyir cultius en placa. Aquest procediment confereixen un color marronós a la colònia, la intensitat del qual permet extrapolar la quantitat de glucogen intracel·lular. Aquesta prova havia donat resultats poc concloents (no mostrat), així que ens vam plantejar realitzar un experiment quantitatiu més fiable. Per a fer-ho, es van créixer en medi ric líquid (YPD) les cèl·lules transformades amb un plàsmid buit (pWS) o amb el mateix plàsmid contenint *YPII* (pWS-*YPII*) i es varen recollir per filtració després d'assolir densitats òptiques (a 660 nm) de 8-9 o de 11-12. Posteriorment es lisaren les cèl·lules de forma mecànica (vorteig amb boles de vidre) i es va tractar el sobrenedant amb  $\alpha$ -amiloglucosidasa comercial (Roche). La glucosa alliberada d'aquesta manera es va mesurar mitjançant un kit comercial basat en l'acoblament de la reacció colorimètrica de la glucosa-oxidasa. Aquest procediment va demostrar que els llevats que sobreexpressen *YPII* acumulen menys glucogen intracel·lular, especialment a densitats òptiques molt altes (figura 6, article 3). Aquest resultat és de nou compatible amb una inhibició de *Glc7*. Efectivament, la unió de la subunitat codificada per *GAC1* a



la fosfatasa és capaç d'activar a la glucogen sintasa, la isoforma principal de la qual és codificada per *GSY2* en el llevat (Wu *et al.*, 2001). Una inhibició de Glc7 seria compatible amb una hiperfosforilació de la glucogen sintasa i, per tant, una disminució en l'acúmulo de glucogen intracel·lular. Aquest efecte sembla ser específic de Glc7, donat que cèl·lules que presenten una del·lecció de *PPZ1*, de *PPZ2* o d'ambdós presenten uns nivells de glucogen similars a una cèl·lula salvatge (Posas *et al.*, 1993; Venturi *et al.*, 2000).

A continuació, vam voler veure quin efecte podia tenir la sobreexpressió de Ypi1 en la progressió del cicle cel·lular, donat que tant Ppz1 com Glc7 intervenen, de diferent forma, en la regulació d'aquest procés (Clotet *et al.*, 1999; Hisamoto *et al.*, 1994; Mackelvie *et al.*, 1995; Bloecher *et al.*, 1999; Sassoon *et al.*, 1999). Per a fer-ho, vam usar la soca JC002 (que hem utilitzat en els treballs anteriors) i que, com dèiem, presenta un bloqueig molt important en la transició G1/S. La sobreexpressió de *YP11* va permetre el creixement de la soca JC002 en condicions no permissives (20 µg/ml de doxiciclina), tot i que en menor grau que *HAL3*. Aquest efecte es perdia totalment en el mutant Ypi1W53A cosa que, de nou, apunta a un paper important d'aquest residu en la funció de la proteïna *in vivo*. Com ja hem dit, la del·lecció de la fosfatasa Sit4 expandeix considerablement la transició G1/S (Sutton *et al.*, 1991-a; Sutton *et al.*, 1991-b). Per tant, vam voler investigar si Ypi1 podia millorar també els defectes causats per la del·lecció d'aquesta fosfatasa. No vam poder observar efecte en un medi amb una font de carboni no respirable (glicerol al 2%), però la sobreexpressió d'aquest gen va millorar lleugerament el defecte de creixement del mutant *sit4Δ* sotmès a temperatura alta (37°C). A més, en cèl·lules *sit4Δ* que havien estat prèviament bloquejades en la fase G1 del cicle mitjançant la feromona  $\alpha$ -factor, la sobreexpressió d'*YP11* va permetre iniciar la gemació i la síntesi de DNA més ràpidament.

Com ja hem comentat amb anterioritat, tant la fosfatasa de tipus 1 com Ppz1 són necessàries en el manteniment de la integritat del llevat (Andrews i Stark, 2000; Posas *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1993; Merchan *et al.*, 2004). En aquest sentit, la del·lecció conjunta de *PPZ1* i de *MPK1/SLT2* són sintètiques letals sense un estabilitzant osmòtic en el medi. En concordància, la sobreexpressió de Hal3 també resulta letal en absència de Mpk1 (De Nadal *et al.*, 1998; Muñoz *et al.*, 2003; Muñoz *et al.*, 2004). Per tant, vam

voler investigar l'efecte de la sobreexpressió d'Ypi1 en una soca *mpk1Δ*. Com es pot observar a la figura 8 de l'article 3, un excés d'*YP11* perjudica, tot i que en menor grau que *HAL3*, la capacitat de creixement d'aquest mutant (especialment en un medi sintètic). En les mateixes condicions, la sobreexpressió de la versió Ypi1 W53A no mostra efectes fenotípics apreciables.

Les evidències experimentals que presentem aporten solidesa a la hipòtesi que Ypi1 actui *in vivo* com un inhibidor de la fosfatasa Glc7, tot i que la possibilitat que també pugui tenir un cert efecte sobre Ppz1 no pot ser totalment descartada. S'han descrit interaccions genètiques entre Ppz1 i Glc7 que podrien compartir subunitats reguladores i algunes funcions (Venturi *et al.*, 2000). Resultats no publicats obtinguts en el nostre laboratori, que fan referència al manteniment de la tolerància salina, reforcen la hipòtesi de Ypi1 com a inhibidor específic de Glc7. Com hem dit, la sobreexpressió d' *YP11* incrementa la tolerància a sal d'una soca salvatge, sobretot a clorur de liti. Aquest efecte d'halotolerància no només es manté sinó que s'incrementa en una soca *ppz1Δ* o fins i tot *ppz1Δ ppz2Δ*. Aquest efecte d'Ypi1 podria ser, de nou, vehiculat a través de Glc7, donat que s'ha descrit recentment que aquesta fosfatasa també regula la homeostasi iònica (Williams-Hart *et al.*, 2002).

L'estudi de l'efecte d'un gen a partir de la seva sobreexpressió presenta desavantatges evidents respecte a la del·lecció. No es pot eliminar la possibilitat que l'excés d'Ypi1 desplaci l'equilibri d'interacció, *in vivo*, entre algunes subunitats reguladores i la subunitat catalítica. Per aquest motiu, esperem que l'estudi del fenotip del mutant condicional que estem generant ens porti, en el futur, proves més concloents del paper d'aquesta proteïna en la biologia del llevat *Saccharomyces cerevisiae*. A més hem iniciat un estudi encarat a determinar si Ypi1 és fosforilat *in vivo*, de forma anàloga al que passa amb els inhibidors-1 i DARPP-32 en humans. Aquests enzims són actius després d'ésser fosforilats per la proteïna quinasa A (Shenolikar, 1994; Oliver i Shenolikar, 1998). Cal destacar que Ypi1 conté dues seqüències consens per a fosforilació per aquesta quinasa (<sup>65</sup>KKKT<sup>68</sup> i <sup>128</sup>KKRS<sup>131</sup>), tot i que encara no sabem si realment juguen un paper fisiològic en la regulació d'aquest inhibidor.

## **Caracterització molecular de subunitats reguladores de Ppz1 en *S. cerevisiae***

---

Finalment, la cristal·lització d'Ypi1, que també està en marxa en aquests moments (gràcies a una col·laboració amb la Dra. Lydia Taberero, de la Universitat de Manchester), pot millorar considerablement el coneixement que actualment tenim d'Ypi1 i del seu mecanisme de regulació i d'interacció amb la fosfatasa Glc7 en el llevat *Saccharomyces cerevisiae*.

## **IV. CONCLUSIONS**

**Identificació de supressors multicòpia de la parada en la transició G1-S del cicle cel·lular en el llevat *Saccharomyces cerevisiae*.**

1. L'ús d'una soca doble mutant condicional *sit4Δ hal3Δ* (JC002) ha permès aïllar un total de 13 gens que són possibles candidats a regular la transició entre les fases G1 i S en el llevat:
  - Alguns d'aquests gens desenvolupen funcions conegudes en la progressió del cicle cel·lular: *SWI4*, *CLN3* i *BCK2*.
  - La resta dels gens aïllats no havien estat prèviament involucrats en la regulació de la transició G1/S. La majoria d'aquests estan relacionats en processos de fosfo-desfosforilació. Entre ells, hi ha membres de la família de les fosfatases de tipus 2A (*PPH21* i *PPH22*), de tipus 2C (*PTC2*) i components de la família de quinases de Hal5 (*HAL4* i *PTK2*).
  - Hem identificat tres gens sense funció coneguda fins al moment, que hem anomenat *VHS1*, *VHS2* i *VHS3*. El darrer d'aquests gens codifica una proteïna relacionada estructural i funcionalment amb Hal3.

**Caracterització funcional de Hal3, subunitat inhibidora de la fosfatasa Ppz1.**

1. L'estudi mitjançant mutagènesi dirigida de Hal3 ha posat de manifest que la zona <sup>263</sup>KLHVLF<sup>268</sup>, similar al motiu RVxF d'unió a PP1c, així com el residu H<sup>378</sup>, que es correspon a la Histidina 90 en AtHal3a, no són necessaris per la unió de Hal3 a la fosfatasa Ppz1 ni per a la seva inhibició.
2. Un estudi de mutagènesi a l'atzar de la regió més conservada de Hal3 seguit d'una selecció per pèrdua de funció ha permès identificar un total de 9 residus que són importants per a la funció de Hal3 relacionada amb Ppz1.
3. Set d'aquests residus es concentren en una petita zona, que va des de l'aminoàcid 446 al 480, i que és anterior a la cua carboxi-terminal àcida característica d'aquesta proteïna.
4. La majoria dels canvis identificats en la seqüència de la proteïna afecten la capacitat de Hal3 d'unir-se i d'inhibir a Ppz1, mentre que els canvis en l'àcid aspàrtic 460 i la valina 462 no alteren la capacitat d'unió però generen versions de Hal3 que no són capaces d'inhibir la fosfatasa.

5. Versions que afecten de forma molt important la capacitat de Hal3 d'unir-se i/o inhibir la fosfatasa complementen la letalitat del doble mutant *hal3Δ vhs3Δ*. Pel contrari, la mutació H378A, que no afecta les funcions de Hal3 relacionades amb Ppz1, es mostra incapaç de complementar aquest fenotip.
6. Hal3 pot tenir funcions independents de Ppz1 que podrien involucrar elements estructurals no relacionats amb el seu paper d'inhibidor de la fosfatasa, com la histidina 378.

### Caracterització molecular d'Ypi1, un nou inhibidor de la proteïna fosfatasa de tipus 1 del llevat *Saccharomyces cerevisiae*.

1. L'ORF de llevat anomenat YFR003c codifica una proteïna petita, hidrofílica i que presenta una mobilitat aberrant en un gel de poliacrilamida.
2. El producte d'aquest gen interacciona, *in vitro*, tant amb la fosfatasa Glc7 com amb la zona catalítica de Ppz1 però només és capaç d'inhibir de forma efectiva i específica a Glc7. Per aquest motiu, hem anomenat aquesta proteïna Ypi1.
3. Ypi1 podria formar part d'una família de proteïnes conservades en eucariotes que contenen una zona compatible amb un motiu RVxF d'unió a PP1. En el cas de Ypi1, la mutació del residu W<sup>53</sup> present en la seqüència <sup>48</sup>RVHNVRW<sup>53</sup> disminueix de forma dràstica la capacitat d'aquesta proteïna d'unir-se i inhibir a Glc7.
4. Hem comprovat que la del·lecció de Ypi1 és letal, cosa que apunta que aquesta proteïna té un paper destacat en la biologia del llevat.
5. La sobreexpressió d'Ypi1 dóna lloc a una sèrie de fenotips compatibles amb un paper d'aquesta proteïna com a inhibidora de Glc7; tots aquests resultats permeten proposar a Ypi1 com el primer inhibidor conegut de la fosfatasa Glc7 en el llevat *Saccharomyces cerevisiae*.

## **V. BIBLIOGRAFIA**

**Albert,A., Martinez-Ripoll,M., Espinosa-Ruiz,A., Yenush,L., Culianez-Macia,F.A., and Serrano,R.** (2000). The X-ray structure of the FMN-binding protein AtHal3 provides the structural basis for the activity of a regulatory subunit involved in signal transduction. *Structure. Fold. Des.*, 8, 961-969.

**Andrews,P.D. and Stark,M.J.** (2000). Type 1 protein phosphatase is required for maintenance of cell wall integrity, morphogenesis and cell cycle progression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.*, 113 ( Pt 3), 507-520.

**De la Torre-Ruiz, Torres,J., Arino,J., and Herrero,E.** (2002). Sit4 is required for proper modulation of the biological functions mediated by Pkc1 and the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 277, 33468-33476.

**Arino,J.** (2002). Novel protein phosphatases in yeast. *Eur. J. Biochem.*, 269, 1072-1077.

**Arndt,K.T., Styles,C.A., and Fink,G.R.** (1989). A suppressor of a HIS4 transcriptional defect encodes a protein with homology to the catalytic subunit of protein phosphatases. *Cell*, 56, 527-537.

**Baetz,K., Moffat,J., Haynes,J., Chang,M., and Andrews,B.** (2001). Transcriptional coregulation by the cell integrity Mitoge-activated protein kinase Slr2 and the cell cycle regulator Swi4. *Mol Cell Biol.*, 19,6515-6528.

**Balcells,L., Gomez,N., Casamayor,A., Clotet,J., and Arino,J.** (1997). Regulation of salt tolerance in fission yeast by a protein-phosphatase-Z-like Ser/Thr protein phosphatase. *Eur. J. Biochem.*, 250, 476-483.

**Balcells,L., Martin,R., Ruiz,M.C., Gomez,N., Ramos,J., and Arino,J.** (1998). The Pzh1 protein phosphatase and the Spm1 protein kinase are involved in the regulation of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in fission yeast. *FEBS Lett.*, 435, 241-244.

**Banuelos,M.A., Sychrova,H., Bleykasten-Grosshans,C., Souciet,J.L., and Potier,S.** (1998). The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology*, 144 ( Pt 10), 2749-2758.

**Belli,G., Gari,E., Aldea,M., and Herrero,E.** (1998). Functional analysis of yeast essential genes using a promoter-substitution cassette and the tetracycline-regulatable dual expression system. *Yeast*, 14, 1127-1138.

**Bihler,H., Slayman,C., Bertl,A.** (1998). NSC1: a novel high-current inward rectifier for cations in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, 432, 59-64.

**Bihler,H., Slayman,C., Bertl,A.** (2002). Low-affinity uptake by *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by NSC1, a calcium blocked non-specific cation channel. *Biochimica et Biophysica acta.* 1558, 109-118.



**Black,S.,Andrews,P.D.,Sneddon,A.A.,and Stark,M.J.**(1995). A regulated MET3-GLC7 gene fusion provides evidence of a mitotic role for *Saccharomyces cerevisiae* protein phosphatase 1. *Yeast*.11,747-759.

**Blaesse,M., Kupke,T., Huber,R., and Steinbacher,S.** (2000). Crystal structure of the peptidyl-cysteine decarboxylase EpiD complexed with a pentapeptide substrate. *EMBO J.*, 19, 6299-6310.

**Bloecher,A. and Tatchell,K.** (1999). Defects in *Saccharomyces cerevisiae* protein phosphatase type I activate the spindle/kinetochore checkpoint. *Genes Dev.*, 13, 517-522.

**Bollen,M.** (2001). Combinatorial control of protein phosphatase-1. *Trends in Biochemical Sciences*, 26, 426-431.

**Bollen,M. and Stalmans,W.** (1992). The structure, role, and regulation of type 1 protein phosphatases. *Crit Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 27, 227-281.

**Brautigam,D.L.** (1994). Protein phosphatases. *Recent Prog. Horm. Res.*, 49, 197-214.

**Ceulemans,H., Stalmans,W., and Bollen,M.** (2002). Regulator-driven functional diversification of protein phosphatase-1 in eukaryotic evolution. *Bioessays*, 24, 371-381.

**Chang,J.S., Henry,K., Wolf,B.L., Geli,M., and Lemmon,S.K.** (2002). Protein phosphatase-1 binding to scd5p is important for regulation of actin organization and endocytosis in yeast. *J. Biol. Chem.*, 277, 48002-48008.

**Chen,K.C., Csikasz-Nagy,A., Gyorffy,B., Val,J., Novak,B., and Tyson,J.J.** (2000). Kinetic analysis of a molecular model of the budding yeast cell cycle. *Mol. Biol. Cell*, 11, 369-391.

**Cheng,A.,Ross,K.E.,Kaldis,P., and SolomonM.J.** (1999). Dephosphorilation of cyclin-dependent kinases by type 2C protein phosphatases. *Genes Dev.* 13, 2946-2957.

**Cid,V.J., Cenamor,R., Sanchez,M., and Nombela,C.** (1998). A mutation in the Rho1-GAP-encoding gene BEM2 of *Saccharomyces cerevisiae* affects morphogenesis and cell wall functionality. *Microbiology*, 144 ( Pt 1), 25-36.

**Clotet,J., Posas,F., Casamayor,A., Schaaff-Gerstenschlager,I., and Arino,J.** (1991). The gene DIS2S1 is essential in *Saccharomyces cerevisiae* and is involved in glycogen phosphorylase activation. *Curr. Genet.*, 19, 339-342.

**Clotet,J., Posas,F., de Nadal,E., and Arino,J.** (1996). The NH2-terminal extension of protein phosphatase PPZ1 has an essential functional role. *J. Biol. Chem.*, 271, 26349-26355.

**Clotet,J., Gari,E., Aldea,M., and Arino,J.** (1999). The yeast ser/thr phosphatases sit4 and ppz1 play opposite roles in regulation of the cell cycle. *Mol. Cell Biol.*, 19, 2408-2415.

**Cohen,P.T.** (1988). Two isoforms of protein phosphatase 1 may be produced from the same gene. *FEBS Lett.*, 232, 17-23.

**Cohen,P. and Cohen,P.T.** (1989). Protein phosphatases come of age. *J. Biol. Chem.*, 264, 21435-21438.

**Cohen,P.T., Schelling,D.L., da Cruz e Silva OB, Barker,H.M., and Cohen,P.** (1989). The major type-1 protein phosphatase catalytic subunits are the same gene products in rabbit skeletal muscle and rabbit liver. *Biochim. Biophys. Acta*, 1008, 125-128.

**Cohen,P.T.** (1997). Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem. Sci.*, 22, 245-251.

**Cohen,P.T.** (2002). Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J. Cell Sci.*, 115, 241-256.

**Connor,J.H., Frederick,D., Huang,H., Yang,J., Helps,N.R., Cohen,P.T., Nairn,A.C., DePaoli-Roach,A., Tatchell,K., and Shenolikar,S.** (2000). Cellular mechanisms regulating protein phosphatase-1. A key functional interaction between inhibitor-2 and the type 1 protein phosphatase catalytic subunit. *J. Biol. Chem.*, 275, 18670-18675.

**Crespo,J.L. and Hall,M.N.** (2002). Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66, 579-91, table.

**Cullen,J., and Sprague, G.**(2002).The Glc7p-interacting protein Bud14p attenuates polarized growth, pheromone response,and filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eucaryot. Cell.*, 884-894.

**De la Torre-Ruiz, Torres,J., Arino,J., and Herrero,E.** (2002). Sit4 is required for proper modulation of the biological functions mediated by Pkc1 and the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 277, 33468-33476.

**De Nadal,E., Clotet,J., Posas,F., Serrano,R., Gomez,N., and Arino,J.** (1998). The yeast halotolerance determinant Hal3p is an inhibitory subunit of the Ppz1p Ser/Thr protein phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95, 7357-7362.

**De Nadal,E., Fadden,R.P., Ruiz,A., Haystead,T., and Arino,J.** (2001). A role for the Ppz Ser/Thr protein phosphatases in the regulation of translation elongation factor 1B $\alpha$ . *J. Biol. Chem.*, 276, 14829-14834.

**Di Como,C.J., Bose,R., and Arndt,K.T.** (1995a). Overexpression of SIS2, which contains an extremely acidic region, increases the expression of SWI4, CLN1 and CLN2 in sit4 mutants. *Genetics*, 139, 95-107.

**Di Como,C.J., Chang,H., and Arndt,K.T.** (1995b). Activation of CLN1 and CLN2 G1 cyclin gene expression by BCK2. *Mol. Cell Biol.*, 15, 1835-1846.

**Di Como,C.J. and Arndt,K.T.** (1996). Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases. *Genes Dev.*, 10, 1904-1916.

**Dichtl,B., Stevens,A., and Tollervey,D.** (1997). Lithium toxicity in yeast is due to the inhibition of RNA processing enzymes. *EMBO J.*, 16, 7184-7195.

**Doherty,M.J., Young,P.R., and Cohen,P.T.** (1996). Amino acid sequence of a novel protein phosphatase 1 binding protein (R5) which is related to the liver- and muscle-specific glycogen binding subunits of protein phosphatase 1. *FEBS Lett.*, 399, 339-343.

**Dombek,K.M., Voronkova,V., Raney,A., and Young,E.T.** (1999). Functional analysis of the yeast Glc7-binding protein Reg1 identifies a protein phosphatase type 1-binding motif as essential for repression of ADH2 expression. *Mol. Cell Biol.*, 19, 6029-6040.

**Dombradi,V., Axton,JM., Brewia,ND., da Cruz e Silva,EF., Alphey,L. and Cohen,PT.**(1990). Drosophila contains three genes that encode distinct isoforms of protein phosphatase 1. *Eur J Biochem.* 27;194(3):739-45.

**Egloff,M.P., Johnson,D.F., Moorhead,G., Cohen,P.T.W., Cohen,P., and Barford,D.** (1997). Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *Embo Journal*, 16, 1876-1887.

**Endo,S., Zhou,X., Connor,J., Wang,B., and Shenolikar,S.** (1996). Multiple structural elements define the specificity of recombinant human inhibitor-1 as a protein phosphatase-1 inhibitor. *Biochemistry*, 35, 5220-5228.

**Epstein,C.B. and Cross,F.R.** (1994). Genes that can bypass the CLN requirement for *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle START. *Mol. Cell Biol.*, 14, 2041-2047.

**Eraso,P. and Portillo,F.** (1994). Molecular mechanism of regulation of yeast plasma membrane H(+)-ATPase by glucose. Interaction between domains and identification of new regulatory sites. *J. Biol. Chem.*, 269, 10393-10399.

**Espinosa-Ruiz,A., Belles,J.M., Serrano,R., and Culianez-Macia,F.A.** (1999). *Arabidopsis thaliana* AtHAL3: a flavoprotein related to salt and osmotic tolerance and plant growth. *Plant J.*, 20, 529-539.

**Evans,D.R. and Stark,M.J.** (1997). Mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* type 2A protein phosphatase catalytic subunit reveal roles in cell wall integrity,actin cytoskeleton organization and mitosis. *Genetics*, 145, 227-241.

**Fairman,C., Zhou,X.,and Kung,C.** (1999). Potassium uptake through the TOK1 K<sup>+</sup> channel in the budding yeast. *J. Membr. Biol*, 168, 149-157.

**Feng,Z.H., Wilson,S.E., Peng,Z.Y., Schlender,K.K., Reimann,E.M., and Trumbly,R.J.** (1991). The Yeast Glc7-Gene Required for Glycogen Accumulation Encodes A Type-1 Protein Phosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 23796-23801.

**Fernandes,L., Rodrigues-Pousada,C., and Struhl,K.** (1997). Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. *Mol. Cell Biol.*, 17, 6982-6993.

**Fernandez-Sarabia,M.J., Sutton,A., Zhong,T., and Arndt,K.T.** (1992). SIT4 protein phosphatase is required for the normal accumulation of SWI4, CLN1, CLN2, and HCS26 RNAs during late G1. *Genes Dev.*, 6, 2417-2428.

**Ferrando,A., Kron,S.J., Rios,G., Fink,G.R., and Serrano,R.** (1995). Regulation of cation transport in *Saccharomyces cerevisiae* by the salt tolerance gene HAL3. *Mol. Cell Biol.*, 15, 5470-5481.

**Francisco,L., Wang,W., and Chan,C.S.** (1994). Type 1 protein phosphatase acts in opposition to IpL1 protein kinase in regulating yeast chromosome segregation. *Mol. Cell Biol.*, 14, 4731-4740.

**Frederick,D.L., and Tatchell,K.** (1996).The REG2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a type 1 protein phosphatase-binding protein that functions with Reg1p and the Snf1 protein kinase to regulate growth. *Mol Cell Biol.* 16,2922-2931.

**Fromant,M., Blanquet,S., and Plateau,P.** (1995). Direct random mutagenesis of gene-sized DNA fragments using polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.*, 224, 347-353.

**Garcia,A., Cayla,X., Caudron,B., Deveaud,E., Roncal,F., and Rebollo,A.** (2004). New insights in protein phosphorylation: a signature for protein phosphatase 1 interacting proteins. *C R. Biol.*, 327, 93-97.

**Garciadeblas,B., Rubio,F., Quintero,F.J., Banuelos,M.A., Haro,R., and Rodriguez-Navarro,A.** (1993). Differential expression of two genes encoding isoforms of the ATPase involved in sodium efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, 236, 363-368.

**Garcia-Gimeno,M.A., Munoz,I., Arino,J., and Sanz,P.** (2003). Molecular Characterization of Ypil, a Novel *Saccharomyces cerevisiae* Type 1 Protein Phosphatase Inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 278, 47744-47752..

**Goossens,A., de La,F.N., Forment,J., Serrano,R., and Portillo,F.** (2000). Regulation of yeast H(+)-ATPase by protein kinases belonging to a family dedicated to activation of plasma membrane transporters. *Mol. Cell Biol.*, 20, 7654-7661.

**Hardy,T.A. and Roach,P.J.** (1993). Control of yeast glycogen synthase-2 by COOH-terminal phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 268, 23799-23805.

**Haro,R., Garcideblas,B., and Rodriguez-Navarro,A.** (1991). A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett.*, 291, 189-191.

**Heinisch,J.,Lorberg,A.,Schmitz,H.,and Jacoby,J.**(1999). The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *S.cerevisiae*.*Mol.Microbiol.* 32,671-680.

**Hernandez-Acosta,P., Schmid,D.G., Jung,G., Culianez-Macia,F.A., and Kupke,T.** (2002). Molecular characterization of the Arabidopsis thaliana flavoprotein AtHAL3a reveals the general reaction mechanism of 4'-phosphopantothienoylcysteine decarboxylases. *J. Biol. Chem.*, 277, 20490-20498.

**Hisamoto,N., Sugimoto,K., and Matsumoto,K.** (1994). The Glc7 type 1 protein phosphatase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for cell cycle progression in G2/M. *Mol. Cell Biol.*, 14, 3158-3165.

**Hu,G.Z. and Ronne,H.** (1994). Overexpression of yeast PAM1 gene permits survival without protein phosphatase 2A and induces a filamentous phenotype. *J. Biol. Chem.*, 269, 3429-3435.

**Huang,K.N., and Symington,L.S.** (1995). Suppressors of a *Saccharomyces cerevisiae* *pkc1* mutation identify alleles of the phosphatase gene *PTC1* and of a novel gene encoding a putative basic leucine zipper protein. *Genetics*, 141,1275-1285.

**Huang,D., Chun,K.T., Goebel,M.G., and Roach,P.J.** (1996). Genetic interactions between *REG1/HEX2* and *GLC7*, the gene encoding the protein phosphatase type 1 catalytic subunit in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 143, 119-127.

**Huang,H.B., Horiuchi,A., Watanabe,T., Shih,S.R., Tsay,H.J., Li,H.C., Greengard,P., and Nairn,A.C.** (1999). Characterization of the inhibition of protein phosphatase-1 by DARPP-32 and inhibitor-2. *J. Biol. Chem.*, 274, 7870-7878.

**Huang,K.X. and Paudel,H.K.** (2000). Ser67-phosphorylated inhibitor 1 is a potent protein phosphatase 1 inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97, 5824-5829.

**Hubbard,M.J., Dent,P., Smythe,C., and Cohen,P.** (1990). Targetting of protein phosphatase 1 to the sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle by a protein that is very similar or identical to the G subunit that directs the enzyme to glycogen. *Eur. J. Biochem.*, 189, 243-249.

**Hunter,T. and Plowman,G.D.** (1997). The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem. Sci.*, 22, 18-22.

**Igual,J.C., Johnson,A.L., and Johnston,L.H.** (1996). Coordinated regulation of gene expression by the cell cycle transcription factor *Swi4* and the protein kinase C MAP kinase pathway for yeast cell integrity. *EMBO J.*, 15, 5001-5013.

**Ingebritsen,T.S. and Cohen,P.** (1983). Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. *Science*, 221, 331-338.

**Ito,T., Chiba,T., Ozawa,R., Yoshida,M., Hattori,M., and Sakaki,Y.** (2001). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98, 4569-4574.

**Jiang,Y., and Broach,J.R.** (1999).Tor proteins and protein phosphatase 2A reciprocally regulate Tap42 in controlling cell growth in yeast. *EMBO J.* 18, 2782-2792.

**Johnson,D., Cohen,P., Chen,M.X., Chen,Y.H., and Cohen,P.T.** (1997). Identification of the regions on the M110 subunit of protein phosphatase 1M that interact with the M21 subunit and with myosin. *Eur. J. Biochem.*, 244, 931-939.

**Kinclova,O., Potier,S., and Sychrova,H.** (2001). The *Zygosaccharomyces rouxii* strain CBS732 contains only one copy of the HOG1 and the SOD2 genes. *J. Biotechnol.*, 88, 151-158.

**Kinoshita,N., Ohkura,H. And Yanahida, M.**(1990).*Cell.*63,405-415.

**Ko,C.H. and Gaber,R.F.** (1991). TRK1 and TRK2 encode structurally related K<sup>+</sup> transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, 11, 4266-4273.

**Kozubowski,L., Panek,H., Rosenthal,A., Bloecher,A., DeMarini,D.J., and Tatchell,K.** (2003). A Bni4-Glc7 phosphatase complex that recruits chitin synthase to the site of bud emergence. *Mol. Biol. Cell*, 14, 26-39.

**Kupke,T., Hernandez-Acosta,P., Steinbacher,S., and Culianez-Macia,F.A.** (2001). *Arabidopsis thaliana* flavoprotein AtHAL3a catalyzes the decarboxylation of 4'-Phosphopantothenoyleysteine to 4'-phosphopantetheine, a key step in coenzyme A biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 276, 19190-19196.

**Kupke,T., Hernandez-Acosta,P., and Culianez-Macia,F.A.** (2003). 4'-phosphopantetheine and coenzyme A biosynthesis in plants. *J. Biol. Chem.*, 278, 38229-38237.

**Lee,K.S., Hines,L.K., and Levin,D.E.** (1993-a). A pair of functionally redundant yeast genes (PPZ1 and PPZ2) encoding type 1-related protein phosphatases function within the PKC1-mediated pathway. *Mol. Cell Biol.*, 13, 5843-5853.

**Lee,K.S., Irie,K., and Gotoh,Y.** (1993-b).A yeast mitogen activated protein kinase homolog (Mpk1p) mediates signalling by protein kinase C. *Mol Cell Biol.* 13, 3067-3075.

**Levin,D.E. and Errede,B.** (1995). The proliferation of MAP kinase signaling pathways in yeast. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7, 197-202.

**Leroy,C., Lee,S.E., Vaze,M.B., Ochsenbien,F., Guerois,R., Haber,J.E., and Marsolier-Kergoat,M.C.** (2003). PP2C phosphatases Ptc2 and Ptc3 are required for DNA checkpoint inactivation after a double-strand break. *Mol. Cell*, 11, 827-835.

**Lin,F.C.,and Arndt,K.T.** (1995).The role of the *Saccharomyces cerevisiae* type 2A phosphatase in actin cytoskeleton and entry into mitosis. *EMBO J.* 14,2745-2759.

**Luke,M.M., Della,S.F., Di Como,C.J., Sugimoto,H., Kobayashi,R., and Arndt,K.T.** (1996). The SAP, a new family of proteins, associate and function positively with the SIT4 phosphatase. *Mol. Cell Biol.*, 16, 2744-2755.

**MacKelvie,S.H., Andrews,P.D., and Stark,M.J.** (1995). The *Saccharomyces cerevisiae* gene SDS22 encodes a potential regulator of the mitotic function of yeast type 1 protein phosphatase. *Mol. Cell Biol.*, 15, 3777-3785.

**Mager,W.,and Siderius,M.**(2002).Novel insights into the osmotic stress response. *FEMS.*, 2,251-257.

**Mendenhall,M.D. and Hodge,A.E.** (1998). Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62, 1191-1243.

**Mendizabal,I., Pascual-Ahuir,A., Serrano,R., and de Larrinoa,I.F.** (2001). Promoter sequences regulated by the calcineurin-activated transcription factor Crz1 in the yeast ENA1 gene. *Mol. Genet. Genomics*, 265, 801-811.

**Mendoza,I., Rubio,F., Rodriguez-Navarro,A., and Pardo,J.M.** (1994). The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 269, 8792-8796.

**Merchan,S., Bernal,D., Serrano,R., and Yenush,L.** (2004). Response of the *Saccharomyces cerevisiae* Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway to increases in internal turgor pressure caused by loss of Ppz protein phosphatases. *Eukaryot. Cell*, 3, 100-107.

**Merlevede,W., Vandenheede,J.R., Goris,J., and Yang,S.D.** (1984). Regulation of ATP-Mg-dependent protein phosphatase. *Curr. Top. Cell Regul.*, 23, 177-215.

**Mitsui,K., Ochi,F., Nakamura,N., Doi,Y., Inoue,H., and Kanazawa,H.** (2004). A novel membrane protein capable of binding the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter (Nha1p) enhances the salinity-resistant cell growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 279, 12438-12447.

**Mulet,J.M., Leube,M.P., Kron,S.J., Rios,G., Fink,G.R., and Serrano,R.** (1999). A novel mechanism of ion homeostasis and salt tolerance in yeast: the Hal4 and Hal5 protein kinases modulate the Trk1-Trk2 potassium transporter. *Mol. Cell Biol.*, 19, 3328-3337.

**Munoz,I., Simon,E., Casals,N., Clotet,J., and Arino,J.** (2003). Identification of multicopy suppressors of cell cycle arrest at the G1-S transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 20, 157-169.

**Munoz,I., Ruiz,A., Marquina,M., Barceló,A., Albert,A., and Ariño,J.** (2004). Functional Characterization of the Yeast Ppz1 Inhibitor Subunit Hal3. A Mutagenesis Study. *J.Biol. Chem.* 279, 279:42619-42627.

**Murguia,J.R., Belles,J.M., and Serrano,R.** (1996). The yeast HAL2 nucleotidase is an in vivo target of salt toxicity. *J. Biol. Chem.*, 271, 29029-29033.

**Nigavekar,S.S., Tan,Y.S., and Cannon,J.F.** (2002). Glc8 is a glucose-repressible activator of Glc7 protein phosphatase-1. *Arch. Biochem. Biophys.*, 404, 71-79.

**Oliver,C.J. and Shenolikar,S.** (1998). Physiologic importance of protein phosphatase inhibitors. *Front Biosci.*, 3, D961-D972.

**Park,I.K. and DePaoli-Roach,A.A.** (1994). Domains of phosphatase inhibitor-2 involved in the control of the ATP-Mg-dependent protein phosphatase. *J. Biol. Chem.*, 269, 28919-28928.

**Peng,Z.Y., Trumbly,R.J., and Reimann,E.M.** (1990). Purification and characterization of glycogen synthase from a glycogen-deficient strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 265, 13871-13877.

**Portillo,F., Eraso,P., and Serrano,R.** (1991). Analysis of the regulatory domain of yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by directed mutagenesis and intragenic suppression. *FEBS Lett.*, 287, 71-74.

**Portillo,F.** (2000). Genetic characterization of the (534)DPPR motif of the yeast plasma membrane H<sup>(+)</sup>-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1468, 99-106.

**Posas,F., Casamayor,A., and Arino,J.** (1993). The PPZ protein phosphatases are involved in the maintenance of osmotic stability of yeast cells. *FEBS Lett.*, 318, 282-286.

**Posas,F., Camps,M., and Arino,J.** (1995-a). The PPZ protein phosphatases are important determinants of salt tolerance in yeast cells. *J. Biol. Chem.*, 270, 13036-13041.

**Posas,F.,Bollen,M.,Stalmans,W.,and Arino,J.** (1995-b). Biochemical characterization of recombinant yeast PPZ1, a protein phosphatase involved in salt tolerance. *FEBS Letters*. 368,39-44.

**Prior,C., Potier,S., Souciet,J.L., and Sychrova,H.** (1996). Characterization of the NHA1 gene encoding a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiporter of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, 387, 89-93.

**Ronne,H., Carlberg,M., Hu,G.Z., and Nehlin,J.O.** (1991). Protein phosphatase 2A in *Saccharomyces cerevisiae*: effects on cell growth and bud morphogenesis. *Mol. Cell Biol.*, 11, 4876-4884.

**Ruiz,A., Yenush,L., and Arino,J.** (2003). Regulation of ENA1 Na<sup>(+)</sup>-ATPase gene expression by the Ppz1 protein phosphatase is mediated by the calcineurin pathway. *Eukaryot. Cell*, 2, 937-948.



**Ruiz,A.,Munoz,I.,Serrano,R.,González,A.,Simon,E., and Arino,J.** (2004) Functional characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* VHS3 gene. *J. Biol. Chem.* 279, 34421-34430.

**Sanz,P., Alms,G.R., Haystead,T.A., and Carlson,M.** (2000). Regulatory interactions between the Reg1-Glc7 protein phosphatase and the Snf1 protein kinase. *Mol. Cell Biol.*, 20, 1321-1328.

**Sassoon,I., Severin,F.F., Andrews,P.D., Taba,M.R., Kaplan,K.B., Ashford,A.J., Stark,M.J.,**

**Serrano,R., Kielland-Brandt,M.C., and Fink,G.R.** (1986). Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>), K<sup>+</sup>- and Ca<sup>2+</sup>-ATPases. *Nature*, 319, 689-693.

**Serrano,R.** (1996). Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int. Rev. Cytol.*, 165, 1-52.

**Serrano,R.,Ruiz,A.,Bernal,D.,Chambers,J.R.,andArino,J.**(2002). The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*:evidence for calcium-mediated signalling.*Mol.Microbiol.*46,1319-1333.

**Shenolikar,S.** (1994). Protein serine/threonine phosphatases--new avenues for cell regulation. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 10, 55-86.

**Shima, H., Hatano,Y, Chun, YS, Surgimura, T, Zhang, Z, Lee, EY and Nagao, M.** (1993).Identification of catalytic subunit isotypes PP1 gamma PP1 delta and PP1 alpha in various rat tissues. *Biochem Biophys Res Commun.*, 14;192(3):1289-96.

**Sidorova, J.,and Breeden,L.** (1993). Analysis of the SWI4/SWI6 protein complex, which directs G1-S specific transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.*, 13, 1069-1077.

**Simon,E., Clotet,J., Calero,F., Ramos,J., and Arino,J.** (2001). A screening for high copy suppressors of the *sit4 hal3* synthetically lethal phenotype reveals a role for the yeast Nha1 antiporter in cell cycle regulation. *J. Biol. Chem.*, 276, 29740-29747.

**Simon,E., Barcelo,A., and Arino,J.** (2003). Mutagenesis analysis of the yeast Nha1 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter carboxy-terminal tail reveals residues required for function in cell cycle. *FEBS Lett.*, 545, 239-245.

**Sorger,P.K., and Hyman,A.A.** (1999). Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* kinetochores by the type 1 phosphatase Glc7p. *Genes Dev.*, 13, 545-555.

**Spellman, P.T., Sherlock,G.,Zhang, M.Q., et al.** (1998).Comprehensive identification of cell-cycle regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell.* 9, 3273-3297.

**Stark,M.J.** (1996). Yeast protein serine/threonine phosphatases: multiple roles and diverse regulation. *Yeast*, 12, 1647-1675.

**Steinbacher,S., Hernandez-Acosta,P., Bieseler,B., Blaesse,M., Huber,R., Culianez-Macia,F.A., and Kupke,T.** (2003). Crystal structure of the plant PPC decarboxylase AtHAL3a complexed with an ene-thiol reaction intermediate. *J. Mol. Biol.*, 327, 193-202.

**Stevenson, L.F, Kennedy, B.K.,Harlow,E.** (2001). A large-scale overexpression screen in *Saccharomyces cerevisiae* identifies previously uncharacterized cell cycle genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98, 3946-3951.

**Stralfors,P., Hiraga,A., and Cohen,P.** (1985). The protein phosphatases involved in cellular regulation. Purification and characterisation of the glycogen-bound form of protein phosphatase-1 from rabbit skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.*, 149, 295-303.

**Sutton,A., Immanuel,D., and Arndt,K.T.** (1991-a). The SIT4 protein phosphatase functions in late G1 for progression into S phase. *Mol. Cell Biol.*, 11, 2133-2148.

**Sutton,A., Lin,F., and Arndt,K.T.** (1991-b). The SIT4 protein phosphatase is required in late G1 for progression into S phase. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 56, 75-81.

**Sychrova,H.** (2004). Yeast as a model organism to study transport and homeostasis of alkali metal cations. *Physiol Res.*, 53 Suppl 1, S91-S98.

**Szoor,B., Feher,Z., Zeke,T., Gergely,P., Yatzkan,E., Yarden,O., and Dombradi,V.** (1998). pzl-1 encodes a novel protein phosphatase-Z-like Ser/Thr protein phosphatase in *Neurospora crassa*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1388, 260-266.

**Tachikawa,H., Bloecher,A., Tatchell,K., and Neiman,A.M.** (2001). A Gip1p-Glc7p phosphatase complex regulates septin organization and spore wall formation. *J. Cell Biol.*, 155, 797-808.

**Torres,J., Di Como,C.J., Herrero,E., and De La Torre-Ruiz MA** (2002). Regulation of the cell integrity pathway by rapamycin-sensitive TOR function in budding yeast. *J. Biol. Chem.*, 277, 43495-43504.

**Tu,J. and Carlson,M.** (1995). REG1 binds to protein phosphatase type 1 and regulates glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, 14, 5939-5946.

**Tu,J., Song,W., and Carlson,M.** (1996). Protein phosphatase type 1 interacts with proteins required for meiosis and other cellular processes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, 16, 4199-4206.

**Tung,H.Y., Wang,W., and Chan,C.S.** (1995). Regulation of chromosome segregation by Glc8p, a structural homolog of mammalian inhibitor 2 that functions as both an activator and an inhibitor of yeast protein phosphatase 1. *Mol. Cell Biol.*, 15, 6064-6074.

**Tyson,J.J., Csikasz-Nagy,A., and Novak,B.** (2002). The dynamics of cell cycle regulation. *Bioessays*, 24, 1095-1109.

**Uetz,P., Giot,L., Cagney,G., Mansfield,T.A., Judson,R.S., Knight,J.R., Lockshon,D., Narayan,V., Srinivasan,M., Pochart,P., Qureshi-Emili,A., Li,Y., Godwin,B., Conover,D., Kalbfleisch,T., Vijayadamodar,G., Yang,M., Johnston,M., Fields,S., and Rothberg,J.M.** (2000). A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 403, 623-627.

**Vagnoli,P. and Bisson,L.F.** (1998). The SKS1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is required for long-term adaptation of *snf3* null strains to low glucose. *Yeast*, 14, 359-369.

**Van Belle,D. and Andre,B.** (2001). A genomic view of yeast membrane transporters. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 13, 389-398.

**Venturi,G.M., Bloecher,A., Williams-Hart,T., and Tatchell,K.** (2000). Genetic interactions between GLC7, PPZ1 and PPZ2 in *saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 155, 69-83.

**Vissi,E., Clotet,J., de Nadal,E., Barcelo,A., Bako,E., Gergely,P., Dombradi,V., and Arino,J.** (2001). Functional analysis of the *Neurospora crassa* PZL-1 protein phosphatase by expression in budding and fission yeast. *Yeast*, 18, 115-124.

**Wang,H. and Jiang,Y.** (2003). The Tap42-protein phosphatase type 2A catalytic subunit complex is required for cell cycle-dependent distribution of actin in yeast. *Mol. Cell Biol.*, 23, 3116-3125.

**Warmka,J.,Hanneman,J.,Lee,J.,Amin,D.,and Ota,I.**(2001). Ptc1, a type 2C ser/thr phosphatase, inactivates the HOG pathway by dephosphorylating the mitogen-activated protein kinase Hog1. *Mol Cell Biol.* 21, 51-60.

**Wieland,J., Nitsche,A.M., Strayle,J., Steiner,H., and Rudolph,H.K.** (1995). The PMR2 gene cluster encodes functionally distinct isoforms of a putative Na<sup>+</sup> pump in the yeast plasma membrane. *EMBO J.*, 14, 3870-3882.

**Wijnen,H. and Futcher,B.** (1999). Genetic analysis of the shared role of CLN3 and BCK2 at the G(1)-S transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 153, 1131-1143.

**Williams-Hart,T., Wu,X., and Tatchell,K.** (2002). Protein phosphatase type 1 regulates ion homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 160, 1423-1437.

**Wu,X., Hart,H., Cheng,C., Roach,P.J., and Tatchell,K.** (2001). Characterization of Gac1p, a regulatory subunit of protein phosphatase type I involved in glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Genet. Genomics*, 265, 622-635.

**Yang,Z. and Bisson,L.F.** (1996). The SKS1 protein kinase is a multicopy suppressor of the *snf3* mutation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 12, 1407-1419.

**Yang,J., Hurley,T.D., and DePaoli-Roach,A.A.** (2000). Interaction of inhibitor-2 with the catalytic subunit of type 1 protein phosphatase. Identification of a sequence analogous to the consensus type 1 protein phosphatase-binding motif. *J. Biol. Chem.*, 275, 22635-22644.

**Yenush,L., Mulet,J.M., Arino,J., and Serrano,R.** (2002). The Ppz protein phosphatases are key regulators of K<sup>+</sup> and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression. *EMBO J.*, 21, 920-929.

**Young,C.,Mapes,J.,Hanneman,J.,Al-Zarban,S.,and Ota,I.**(2002). Ole ofPtc2 type 2C ser/thr phosphatase in yeast high-osmolarity glycerol pathway inactivation.*Eucariot. Cell.*6,1032-1040.

**Zhang,S., Guha,S., and Volkert,F.C.** (1995). The *Saccharomyces* SHP1 gene, which encodes a regulator of phosphoprotein phosphatase 1 with differential effects on glycogen metabolism, meiotic differentiation, and mitotic cell cycle progression. *Mol. Cell Biol.*, 15, 2037-2050.

**Zhang,J., Zhang,L., Zhao,S., and Lee,E.Y.** (1998). Identification and characterization of the human HCG V gene product as a novel inhibitor of protein phosphatase-1. *Biochemistry*, 37, 16728-16734.

**Zhao,S., and Lee,E.** (1997). A protein phosphatase-1-binding motif identified by the panning of a random peptide display library. *J.Biol. Chem.*, 272, 28368-28372.

**VI. ANNEXES**

Research Article

# Identification of multicopy suppressors of cell cycle arrest at the G<sub>1</sub>–S transition in *Saccharomyces cerevisiae*

Ivan Muñoz<sup>1</sup>, Ernesto Simón<sup>1</sup>, Núria Casals<sup>2</sup>, Josep Clotet<sup>1,2</sup> and Joaquín Ariño<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Barcelona

<sup>2</sup> Departament de Bioquímica, Facultat de Ciències de la Salut, Universitat Internacional de Catalunya, S. Cugat del Vallès 08190, Barcelona

\*Correspondence to:  
Joaquín Ariño, Dept. Bioquímica  
i Biologia Molecular, Facultat de  
Veterinària, Ed. V, Universitat  
Autònoma de Barcelona,  
Bellaterra 08193, Barcelona,  
Spain.  
E-mail: Joaquin.Ariño@uab.es

## Abstract

**Inactivation of *HAL3* in the absence of *SIT4* function leads to cell cycle arrest at the G<sub>1</sub>–S transition. To identify genes potentially involved in the control of this phase of the cell cycle, a screening for multicopy suppressors of a conditional *sit4 hal3* mutant (strain JC002) has been developed. The screening yielded several genes known to perform key roles in cell cycle events, such as *CLN3*, *BCK2* or *SWI4*, thus proving its usefulness as a tool for this type of studies. In addition, this approach allowed the identification of additional genes, most of them not previously related to the regulation of G<sub>1</sub>–S transition or even without known function (named here as *VHS1-3*, for viable in a *hal3 sit4* background). Several of these gene products are involved in phospho-dephosphorylation processes, including members of the protein phosphatase 2A and protein phosphatases 2C families, as well as components of the Hal5 protein kinase family. The ability of different genes to suppress *sit4* phenotypes (such as temperature sensitivity and growth on non-fermentable carbon sources) or to mimic the functions of Hal3 was evaluated. The possible relationship between the known functions of these suppressor genes and the progress through the G<sub>1</sub>–S transition is discussed. Copyright © 2002 John Wiley & Sons, Ltd.**

**Keywords:** cell cycle regulation; G<sub>1</sub>–S transition; protein phosphatases; protein kinases; *Saccharomyces cerevisiae*

Received: 10 June 2002  
Accepted: 11 October 2002

## Introduction

Progression through the eukaryotic cell cycle requires regulation of many diverse processes in a precise temporal program. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae* key control processes occur at the G<sub>1</sub>–S transition, which precedes initiation of DNA replication. Phase-specific transcription at this point of the cell cycle is a relevant event, critical for the production of major regulators of *CDC28*, the unique cyclin-dependent kinase controlling cell cycle in *S. cerevisiae*. Among these regulators appears the main G<sub>1</sub> cyclin genes, *CLN1* and *CLN2* (Witteberg *et al.*, 1990), as well as *CLB5* and *CLB6*, S-phase cyclin genes that allows initiation of DNA synthesis (Kühne and Linder, 1993; Schwob and Nasmyth, 1993). Expression of

those genes is generally ascribed to the function of two related transcription factors, SBF (composed of the *SWI4* and *SWI6* gene products) and MBF (composed of Swi6 and Mbp1), which are responsible for most of the periodic, late G<sub>1</sub>-specific mRNA production in normal dividing cells. Apart from SBF and MBF, other factors that modulate or act in parallel with SBF and MBF exist, such as *CLN3* (Levine *et al.*, 1996), *SIT4* (Sutton *et al.*, 1991; Fernandez-Sarabia *et al.*, 1992), *BCK2* (Di Como *et al.*, 1995b; Epstein and Cross, 1994) and *SIS2/HAL3* (Di Como *et al.*, 1995a), although their relationships with these factors are not well defined.

The *Saccharomyces cerevisiae* gene *SIT4* encodes a type 2A-related Ser–Thr protein phosphatase

(Arndt *et al.*, 1989) homologous to the *Schizosaccharomyces pombe* Ppe1 (Shimanuki *et al.*, 1993) and human PP6 phosphatases (Bastians and Ponstingl, 1996). This phosphatase is required for the execution of START, as it is necessary for the normal expression of G<sub>1</sub> cyclins mRNA (which are required for DNA synthesis) in a pathway additive to that of *CLN3*. In addition to the role in cyclin expression, *SIT4* is also required for bud emergence (Fernández-Sarabia *et al.*, 1992). Consequently, cells lacking Sit4 are either unviable or exhibit a slow growth phenotype (Sutton *et al.*, 1991).

The cell growth defect of *sit4* Δ mutants is largely overcome by high-copy expression of *SIS2* (Di Como *et al.*, 1995a). This gene, also known as *HAL3*, was identified independently by its ability to confer tolerance to high salinity (Ferrando *et al.*, 1995). While deletion of *SIS2/HAL3* causes no evident growth defect, this gene is essential in the absence of *SIT4* function, because both participate in the stimulation of transcription of *SWI4*, *CLN1*, *CLN2* and *CLB5* (Di Como, 1995a). Therefore *HAL3* appears to be another important factor that controls passing through G<sub>1</sub> phase. Furthermore, *HAL3* is a negative regulatory subunit of the Ppz1 Ser–Thr protein phosphatase (De Nadal *et al.*, 1998). Ppz1 negatively controls G<sub>1</sub> cyclin expression (i.e. *CLN2* and *CLB5*) and thus, plays an opposite role to that of Sit4 in regulating the cell cycle (Clotet *et al.*, 1999). The current evidence indicates that the function of Hal3 in G<sub>1</sub> regulation is mediated by the Ppz1 phosphatase.

The observation that *sit4* and *hal3* mutations display synthetic lethality, due to a G<sub>1</sub> blockade (Di Como *et al.*, 1995a; Simón *et al.*, 2001), prompted us to design a genetic screening to search for novel components of the cell cycle regulatory machinery that controls G<sub>1</sub>–S transition. To this end, we constructed a conditional *sit4 hal3* mutant strain and transformed the cells with multicopy genomic libraries to identify genes that allowed growth under restrictive conditions. The characterization of one of these genes, *NHAI*, has been described recently (Simón *et al.*, 2001). We describe here the isolation and characterization of additional genes that can be considered novel potential regulators involved in the control of the G<sub>1</sub>–S transition.

## Experimental procedures

### Growth of *Escherichia coli* and yeast strains

*E. coli* strains DH5α or DH5 were used as a host for DNA cloning. Bacterial cells were grown at 37 °C in LB medium containing 50 μg/ml ampicillin, when needed, for plasmid selection. Yeast cells were grown at 28 °C in YPD medium or, when indicated, in complete minimal (CM) synthetic medium lacking specific nutrients (Adams *et al.*, 1997). Yeast strains used in this work derive from strain JA100 *MATa ura 3–52 leu2-3,112 trp1-1 his4 can-1<sup>r</sup>* (De Nadal *et al.*, 1998).

### Recombinant DNA techniques

*E. coli* and *S. cerevisiae* cells were transformed using standard techniques as previously described (De Nadal *et al.*, 1998). Restriction reactions, DNA ligations, and other standard recombinant DNA techniques were carried out as described elsewhere (Sambrook *et al.*, 1989).

### Construction of strain JC002 and screening for suppressors

To produce strain JC002 the *HAL3* promoter was replaced in a *sit4* mutant (strain JA110, described in Clotet *et al.*, 1999), by a cassette containing the *tetO* promoter element (Bellí *et al.*, 1998), which can be strongly repressed by doxycycline (details can be found in Simon *et al.*, 2001).

For functional screening, strain JC002 was transformed with high-copy plasmid yeast genomic DNA libraries (based on plasmid YEp13, ATCC number 37415, and plasmid YEp24, a gift from Ramón Serrano). Transformants (around 100 000 in total) were selected for the ability to grow on synthetic media in the presence of 20 μg/ml doxycycline. Macroscopic colonies observed after 3–4 days of incubation were considered as positives, recovered, and checked for the presence of *SIT4* or *HAL3* in the plasmid of growing colonies by PCR. Clones that appeared negative for *SIT4* and *HAL3* inserts were given a number preceded by the letter 'V' (for viable) and subjected to further characterization. Plasmid DNA of these cells was isolated, amplified in bacteria, and subjected to restriction mapping with *EcoRI* to identify identical inserts. The clones selected were transformed again into JC002 to test for suppression

of the doxycycline sensitivity. The fragment of the yeast genome contained in each independent clone was identified by DNA sequencing using specific oligonucleotides priming to regions nearby the cloning site of the vector.

### Isolation of the ORFs responsible for the suppressor phenotype

The identification of the specific ORF responsible for suppression of the *hal3 sit4* synthetic lethality was carried out by subcloning each ORF contained into the genomic fragments and testing its ability to act as a suppressor. The subcloning strategies involved in some cases a large number of steps and details will be available on request. Briefly, the *SWI4* gene (including 430 pb of his own promoter and 370 pb of 3' non-translated region) was recovered from clone V39 and cloned into the *XbaI-SmaI* sites of plasmid YEplac195 (Gietz and Sugino, 1988). A 2.75 Kbp *BglII-XhoI* fragment containing *CLN3* was excised from V51 and cloned into the *BamHI-SalI* sites of plasmid YEplac195. The *BCK2* gene (a 5.8 Kbp *XbaI-XbaI* fragment) was recovered from clone V41 and subcloned into the *XbaI* site of YEplac195.

A 2.45 Kbp *XbaI-HindIII* fragment from the genomic clone V3 and containing *PPH21*, as well as a 2.4 Kbp *BamHI-EcoRI* fragment excised from V8, containing the *PPH22* gene, were cloned into the respective sites of YEplac181 (Gietz and Sugino, 1988). A *PAMI* C-terminally truncated genomic version ( $\Delta 431$ , containing about 1000 bp of promoter plus 1293 bp of coding region) was recovered from the genomic clone V40 and subcloned into the *SmaI* site of YEplac195. A *XhoI-SphI* fragment including about 800 bp of promoter region, and the entire YDR247w ORF plus 650 bp of the 3' region was cloned into the *SalI-SphI* sites of YEplac195. The whole version of *PAMI*, cloned in multicopy plasmid, was provided by Dr H. Ronne (Hu and Ronne, 1994). A 3.2 Kbp *PvuII-SphI* fragment containing ORF YDL133w and a C-terminally truncated version of *CDC53* was recovered from V3 and cloned into these sites of YEplac195.

The entire *SAT4-HAL4* gene (containing 550 pb of promoter region, and 300 pb of 3' untranslated region) was cloned as a 2.65 Kbp *HpaI* fragment, obtained from V50, into the *SmaI* site of YEplac195. The 3.4 Kbp *BamHI-BamHI* genomic

fragment containing the gene *PTK2* (with 700 pb promoter and 270 pb of terminator region) derives from V48 and was cloned in YEplac195. A 2.5 Kbp *EcoRV-EcoRV* fragment, recovered from V78 and containing the *PTC2* ORF flanked by 950 pb of promoter and 135 pb of 3' untranslated region, was cloned into the *SmaI* site of YEplac195. A 3.2 Kbp *BamHI-SphI* fragment of YIL135c, excised from V7, and a 2.6 Kbp *EcoRI-EcoRV* fragment from V71, containing the entire *YAP7* gene, were inserted in the appropriate sites of YEplac195.

In addition of the indicated ORFs, recovered from the suppressor screening, a number of related genes were tested within this work. A 1.5 Kbp *EcoRI-SalI* fragment containing the *PTC1* gene, a 5.1 Kbp *EcoRI-EcoRI* fragment including *PTC2*, and a *SacI-HindIII* of about 2.7 Kbp containing the *PTC3* gene, all of them kindly provided by Dr H. Saito (Boston, MA), were independently cloned into YEplac195. A multicopy version of the *PPH3* gene was kindly provided by Dr H. Ronne (Hu and Ronne, 1994). A 3.3 Kbp *BamHI-BamHI* fragment containing the entire ORF of *HAL5* (Mulet *et al.*, 1999), kindly provided by Dr R. Serrano (Valencia, Spain), was subcloned into the *BamHI* site of YEplac195 plasmid.

### Gene disruptions

Gene disruptions were performed by the one-step technique (Rothstein, 1983) and confirmed by analytical PCR with specific oligonucleotides. Construction of strains JA101 (*ppz1::URA3*), JA104 (*hal3::LEU2*) and JA110 (*sit4::TRP1*) was described in Clotet *et al.* (1999); generation of strain JA105 (*ppz1::URA3 ppz2::TRP1*) was reported in De Nadal *et al.* (1998), strain JC10 (*mpk1::LEU2*) was described in Vissi *et al.* (2001), and details on the construction of strain JC173 (*MATa/α HAL3/hal3::LEU2; SIT4/sit4::TRP1*) can be found in Clotet *et al.* (1999). Disruption of the *PTC2* gene on JA100 (wild-type) and JA110 (*sit4Δ*) backgrounds, to generate strain IM001 (*ptc2Δ*) and IM002 (*sit4Δ ptc2Δ*), respectively, was carried out by replacing a 1.2 Kbp fragment of the *PTC2* ORF (from the initiating ATG up to 150 nucleotides upstream from the STOP codon) with the *KanMX* marker (Wach, 1994). Deletion mutants in the BY4741 background for the *VHS1* (YDR247w), *VHS2* (YIL135c) and *VHS3*



(YOR054w) genes were generated by the *Saccharomyces* Genome Deletion Project (Winzeler *et al.*, 1999) and generously provided by Jose L. Revuelta (University of Salamanca, Spain).

### Other techniques

Sporulation, tetrad dissection and other classical genetics manipulations were performed essentially as in Adams *et al.* (1997). Yeast cells were arrested at G<sub>1</sub> phase by treatment with  $\alpha$ -factor as described in Clotet *et al.* (1999). Budding index was determined by microscopic counting, and DNA content monitored by flow cytometry essentially as in Clotet *et al.* (1999).

Growth on plates (drop tests) was assessed as in Posas *et al.* (1995). Tolerance to cations and sensitivity to rapamycin was determined in liquid cultures or plates as in Calero *et al.* (2000).

## Results

### Isolation and characterization of suppressor clones

To identify genes involved in the G<sub>1</sub>–S cell cycle transition a conditional *sit4 hal3* mutant (strain JC002), which reproduces a blockage at this step of the cell cycle, was constructed. Briefly, this strain presents a deletion in the *SIT4* locus and has a substitution of the *HAL3* promoter by a cassette based on the tetracycline-regulatable *tetO*

promoter. This promoter is repressed in the presence of doxycycline, and after 12 h of growth in the presence of the antibiotic most cells appear with an haploid content of DNA and as unbudded, rounded morphology, typical of an arrest in G<sub>1</sub> phase (Simon *et al.*, 2001).

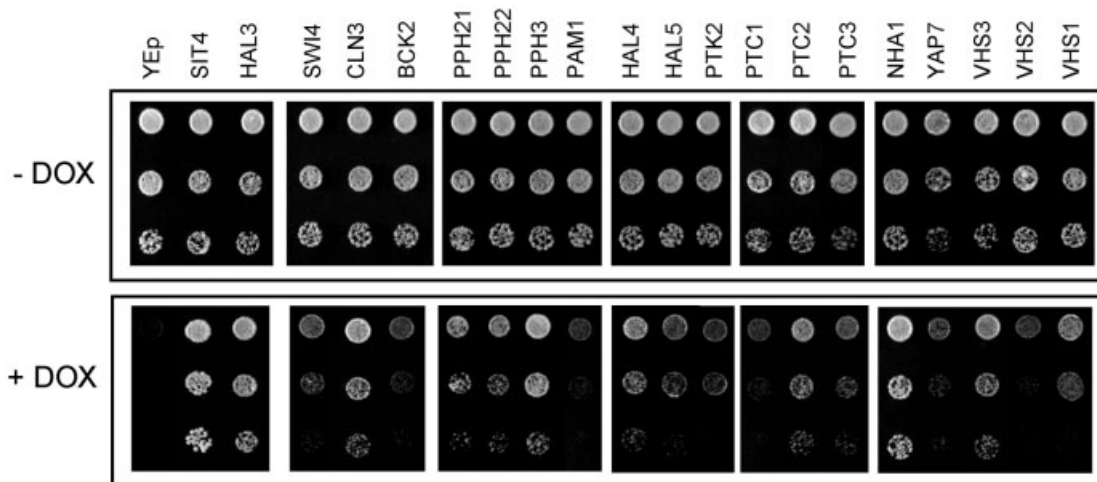
Strain JC002 was transformed with multicopy genomic libraries and screened for suppressors that allowed yeast cell growth under restrictive conditions. About 130 transformants were selected by its ability to develop macroscopic colonies within 3–4 days of incubation in the presence of doxycycline. About 80 positive clones that contained plasmids bearing *SIT4* or *HAL3* genes were discarded by PCR analysis. Upon appropriate subcloning (see Materials and methods), the suppressor genes were identified.

As shown in Table 1 and Figure 1, the genes *SWI4*, *CLN3* and *BCK2* were identified as suppressors of the conditional *sit4 hal3* phenotype, *CLN3* being the most potent suppressor. We considered these results as a validation of our screen, because these genes were already known to be positive effectors of G<sub>1</sub>–S transition, and therefore corresponded to the kind of suppressors expected. However, the possibility that a given suppressor gene might affect the uptake of doxycycline or alter somehow the regulation of the *tetO* promoter could not be ruled out. To avoid this possible artifact, we transformed each isolated suppressor gene into the viable diploid strain JC173 (heterozygous for *sit4* and *hal3* mutations), sporulation was induced, and tetrads were dissected. For each case, the

**Table 1.** Suppressor genes of the JC002 G<sub>1</sub>–S cell cycle blockage

Gene	Clones <sup>#</sup>	Functional role
<i>SWI4</i>	3	Transcription factor of the SBF complex
<i>CLN3</i>	9	G <sub>1</sub> cyclin, required for the expression of other G <sub>1</sub> cyclins
<i>BCK2</i>	5	Works in a pathway additive with <i>CLN3</i>
<i>PPH21</i>	2	Ser–Thr protein phosphatase 2A, catalytic subunit
<i>PPH22</i>	3	Ser–Thr protein phosphatase 2A, catalytic subunit
<i>HAL4</i>	1	Ser–Thr protein kinase, member of the Hal5 family
<i>PTK2</i>	2	Ser–Thr protein kinase, member of the Hal5 family
<i>PTC2</i>	1	Ser–Thr protein phosphatase 2C
<i>NHA1</i>	2	Antiporter Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> . Regulates G <sub>1</sub> –S transition by unknown mechanism
YDR247w ( <i>VHS1</i> )	7	Ser–Thr protein kinase, unknown function
<i>YAP7</i>	1	Transcription factor of the AP-1 family
YIL135c ( <i>VHS2</i> )	5	Unknown protein
YOR054c ( <i>VHS3</i> )	2	<i>HAL3</i> homologue (about 40% identity), unknown function

<sup>#</sup>Clones denotes the number of clones containing each gene isolated in the screening.



**Figure 1.** Relative potency of high-copy suppressors of strain JC002 growth defect. Strain JC002, transformed with multicopy plasmids bearing only the indicated genes, were spotted on CM plates lacking uracil (2% glucose) with or without doxycycline (DOX, see Materials and methods), and incubated at 28 °C. Growth was scored after 3 days. *PAM1* refers to the C-terminally truncated ORF derived from the genomic clone V40. The suppressor effect of the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter, described in Simón *et al.* (2001) is included for comparison

plasmid-borne suppressor gene was able to allow growth of the haploid *sit4 hal3* mutant, thus confirming the results obtained by using strain JC002.

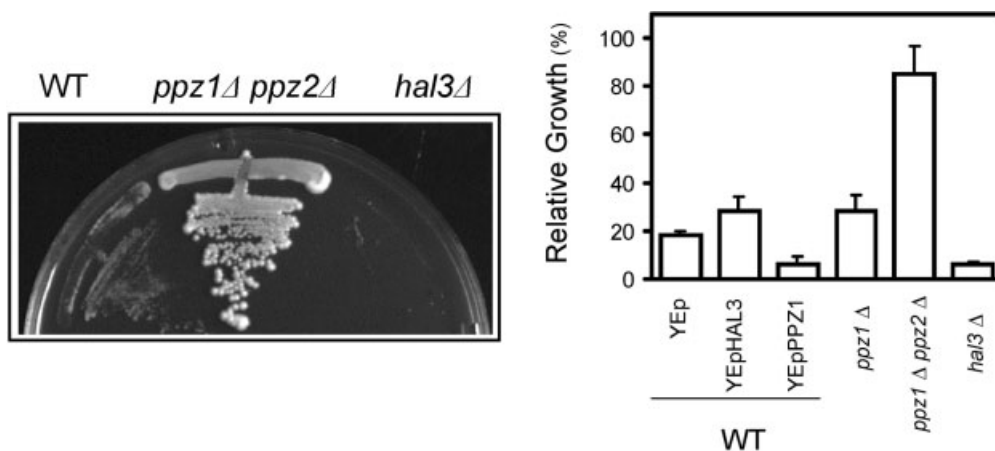
#### Protein phosphatases 2A and Ptc2 as positive effectors of the G<sub>1</sub>-S transition

The genes *PPH21* and *PPH22* were also identified in our study (Table 1). They encode the two isoforms of the catalytic subunit of type 2A protein phosphatases (PP2Ac) in *S. cerevisiae*, which show 89% identity at the amino acid level and play very similar cellular functions (Stark, 1996). Both genes recovered JC002 blocked cells with similar potency (Figure 1). We observed, however, that the whole genomic clone containing *PPH21* was less efficient than the subcloned *PPH21* ORF (not shown). A possible reason for this difference could be the presence in the genomic clone of some element having a negative effect on cell growth when in high-copy number. In fact, wild-type cells transformed with an episomal plasmid lacking the phosphatase gene and bearing only the YDL133W gene (a putative integral membrane protein of unknown function) and a C-terminally truncated version of *CDC53*, displayed a slight growth defect (not shown). Cdc53 is known to be a central element of the ubiquitination pathway involved in the degradation of Cln2 (Willems *et al.*, 1996). Therefore, it is not unlikely that

the observed negative effect could be derived from the high-copy expression of a truncated form of Cdc53.

Despite the similitude between PP2Ac and Sit4 (55% identity), it is thought that these two types of phosphatases perform different functions in cell cycle control. However, both phosphatases positively act in the TOR (target of rapamycin) signalling pathway. Since inhibition of this pathway by lack of nutrients or exposure to the drug rapamycin leads to blockage in G<sub>1</sub> and cells that overexpress *SIT4* display rapamycin resistance, we considered the possibility that the TOR pathway might be severely impaired in JC002 grown under non-permissive conditions, due to the simultaneous loss of function of *SIT4* and *HAL3*. As shown in Figure 2, *hal3Δ* cells are more sensitive than wild-type cells to rapamycin. This sensitivity is probably due to an overactivation of the Ppz protein phosphatases, as supported by the observation that *ppz1Δ* and *ppz1Δ ppz2Δ* cells are more resistant than wild-type cells, whereas overexpression of *PPZ1* yields cells more sensitive to rapamycin.

The gene *PPH3* encodes a phosphatase with PP2Ac-related functions (Ronne *et al.*, 1991). Although this gene was not recovered in our screening, its functional connection with PP2Ac enzymes prompted us to test it as suppressor of the G<sub>1</sub>-S



**Figure 2.** Lack of PPZ protein phosphatases increases rapamycin resistance. (Left) The indicated strains were streaked on YPD plates containing 5 ng/ml rapamycin and incubated at 28 °C. Growth was scored after 3 days. (Right) Wild-type cells transformed with the indicated plasmids or isogenic strains bearing specific mutations were inoculated in liquid YPD media supplemented with 5 μg/ml rapamycin. After 12 h the density of the cultures was monitored at 660 nm. Relative growth is expressed as percentage of the growth measured in the absence of added rapamycin. Data are presented as the mean ± SE of three independent experiments

blockage in JC002 cells. As shown in Figure 1, *PPH3* is able to rescue the JC002 growth defect. This observation provides further support to the notion that PP2A-related activities can play a role in the G<sub>1</sub>–S transition. Interestingly, clone V40 included a truncated form (431 amino-terminal residues) of the *PAM1* gene (YDR251w), encoding a coiled-coil protein described to suppress in multicopy the loss of PP2A activity (Hu and Ronne, 1994). Once subcloned, however, the suppressor effect of this truncated form was very mild and, surprisingly, a entire version of *PAM1* had no effect at all (not shown). Further analysis of this genomic clone revealed that the suppressor effect could be attributed to YDR247w (discussed below).

*PTC2* (YER089c) encodes one of the five members of the type 2C Ser–Thr phosphatase (PP2C) family in budding yeast (Stark, 1996). Our results show that *PTC2* is able to overcome the G<sub>1</sub> arrest of JC002 doxycycline-treated cells (Figure 1), suggesting a novel function for this phosphatase as a positive factor of the G<sub>1</sub>–S transition. However, deletion of *PTC2* on a *sit4* background did not enhance the growth defect due to the lack of Sit4 (not shown). We also tested whether *PTC1* or *PTC3*, the closest members of the family, had an equivalent high-copy suppressor effect. As shown in Figure 1, *PTC3* was

slightly less efficient than *PTC2*, whereas *PTC1* had very little effect. These results agree with previous findings pointing out specific functions for the members of type 2C phosphatase family in yeast.

#### Identification of members of the *HAL5* family as regulators of G<sub>1</sub>–S transition

Upon subcloning, the suppressor activity of genomic clones V48 and V50 could be attributed to the genes *PTK2* (*STK2*, YJR059w) and *HAL4* (*SAT4*, YCR008w). These genes encode structurally related Ser–Thr protein kinases belonging to the *HAL5* family that includes Hal5, Kkq8, Sat4, Ptk1 and Ptk2. As shown in Figure 1, high-copy number *HAL4* and *PTK2* expression recovers JC002 cells from G<sub>1</sub> block. Although it was not identified in our screening, we tested the *HAL4* homologue, *HAL5*, and found that it was also able to recover JC002 growth at non-permissive conditions (Figure 1) and that both genes had some additive effect (not shown).

#### Novel genes possibly involved in the G<sub>1</sub>–S transition

In our screening we also identified a number of genes for which there is very little information available and that are being characterized in more

detail. As mentioned above, most of the suppressor effect of the genomic clone V40 could be attributed to ORF YDR247w (named here as *VHS1*), which encodes a Ser/Thr protein kinase related to *Sz. pombe* Ran1 (34% identity) and sharing some similarity with *S. cerevisiae* Sha3 and Snf1 kinases (44% and 29% identity, respectively). At this moment, there is virtually no functional information on this gene product. It has been reported that a null mutant is viable and that its message peaks during S phase of the cell cycle (Spellman *et al.*, 1998), a circumstance that might be related with the phenotype described here.

The *YAP7* gene (YOL028c) was found to be responsible for the suppressor phenotype of clone V71, although its potency was relatively low. It encodes a transcription factor of the basic leucine zipper (bZIP) family (Fernandes *et al.*, 1997). *S. cerevisiae* contains eight members of a novel fungi-specific family of bZIP proteins (the Yap family), which is defined by four atypical residues on the DNA-binding surface. Members of the Yap family carry out distinct biological functions: Yap1 and Yap2 are transcriptional activators involved in pleiotropic drug resistance, and Yap4 activity affects chromosome stability (Fernandes *et al.*, 1997). At present, there is no information on the specific functions of Yap7 in the cell.

YOR054c, a close homologue of the Hal3 protein that we renamed *VHS3*, was also recovered in our screening and showed a rather high suppressor capacity (Figure 1). Because of its similarity with *HAL3*, this gene is currently under detailed characterization in our laboratory. YIL135c, here renamed *VHS2* (Table 1 and Figure 1), codes for a 436-residue protein of unknown function, that is 30% identity with yeast Mlf3, also of unknown function.

### Suppression of other defects of *sit4* cells

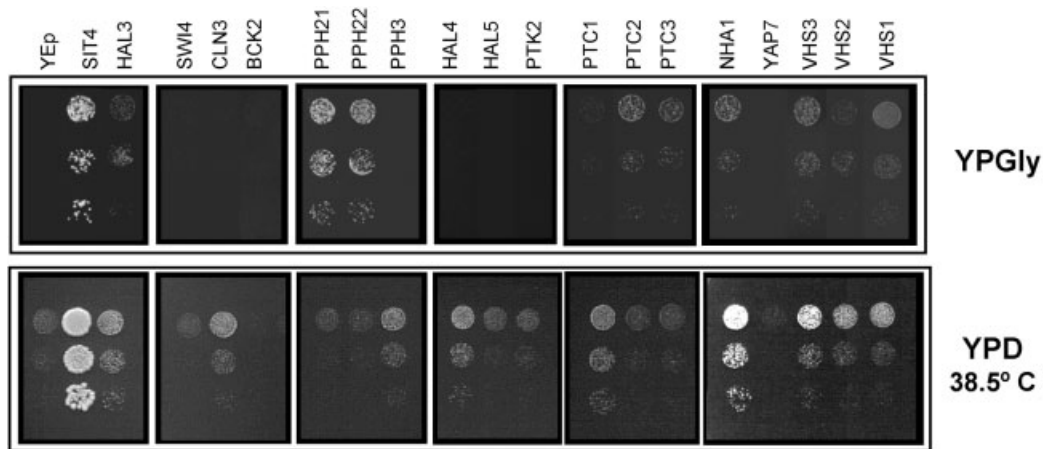
In our specific strain background most of the suppressor genes did not improve in a significant form growth of a *sit4* mutant in asynchronous culture (not shown). To evaluate more accurately this possible effect in some cases, such as the *PTC2* phosphatase gene, *sit4* cells bearing the suppressor gene were arrested in G<sub>1</sub> with  $\alpha$ -factor, and the kinetics of the arrest release monitored by measuring DNA content and budding index. Again, no remarkable differences were observed. On the other hand, *sit4* mutants cells are unable

to utilize glycerol, ethanol or acetate as carbon sources (Sutton, 1991), suggesting a defect in respiratory metabolism. This is in agreement with our observation that *sit4* mutant cells stain red in the presence of tetrazolium salts and that respiration rates in these cells are near to zero (data not shown and C. Gancedo, personal communication). We wondered whether the clones obtained in our screening could be able to overcome the respiration defect of *sit4* cells. To test this, we transformed a *sit4* mutant with each suppressor gene and transformants were grown in synthetic medium and spotted in rich medium containing glycerol as the only carbon source. As shown in Figure 3, about half of the suppressor genes failed to sustain growth of the *sit4* mutant on glycerol, including *SWI4*, *CLN3*, *BCK2* and all tested members of the *HAL5* family of kinases. The *PPH21/PPH22* pair of phosphatase genes, but not *PPH3*, were the most effective in this test, providing evidence for differential functions of PP2Ac and Pph3. These results indicate that the respiratory defect of a *sit4* mutant is probably functionally unrelated to its cell cycle defect.

Another phenotype associated to the lack of Sit4 function is a temperature-sensitive growth defect (Sutton, 1991). To test whether suppression of the cell cycle defect also implies improvement of growth at high temperature, *sit4* cells bearing the different suppressors were grown at 38.5 °C. As deduced from Figure 3, high-copy expression of *CLN3*, *PPH3*, *HAL4*, *PTC1*, *NHA1*, *VHS1*, *VHS2* and *VHS3* improved growth at high temperature. It is remarkable that very little correlation was observed between the three suppressor phenotypes tested. For instance, *PPH21* and *PPH22* allowed rather vigorous growth on glycerol, but were ineffective in promoting growth at 38.5 °C, a behaviour opposite to that of the related phosphatase gene *PPH3*.

### Effect of high-copy expression of suppressor genes on *hal3* and *slt2/mpk1* mutant backgrounds

The characterization of the suppressor genes was further expanded by testing their ability to mimic Hal3-related phenotypes. Lack of Hal3 does not result in a significant cell growth defect under standard conditions, but *hal3* cells are hypersensitive to sodium and lithium cations (Ferrando *et al.*, 1995). Since some of the suppressor genes identified in this screening had been previously related to



**Figure 3.** Suppression of the growth defect on glycerol and high temperature of a *sit4* mutant. Strain JA110 (*sit4::TRP1*) was transformed with multicopy plasmids carrying the indicated genes and cultures were spotted on rich plates with glycerol (2%) as carbon source and incubated at 28 °C for 4 days (upper panel), or on YPD plates and incubated at 38.5 °C for 60 h (lower panel)

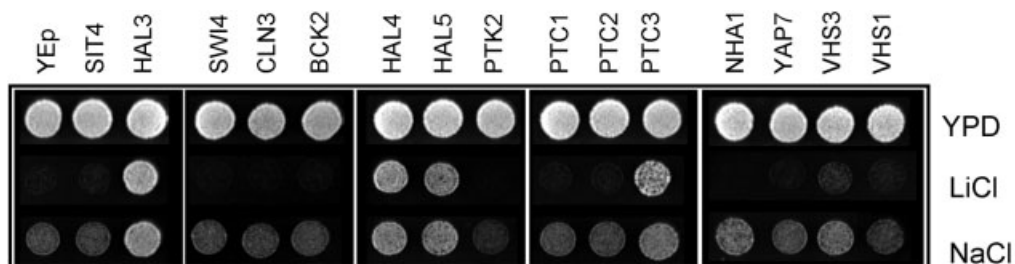
ion homeostasis mechanisms, we wanted to know whether this was a general property and could be extended to all of them. To test this, we transformed a *hal3* strain with a set of suppressor genes and tested cell growth in the presence of high concentrations of LiCl or NaCl (Figure 4). As expected, *HAL4* and *HAL5* were able to increase salt tolerance. In contrast, *PTK2* had a slightly negative effect, as had been previously determined for wild-type cells (Goossens *et al.*, 2000). *PTC3* substantially increased tolerance to lithium and sodium, while *PTC1* and *PTC2* had virtually no effect.

High-copy expression of Hal3 aggravates the lytic phenotype of a Slit2/Mpk1 mitogen-activated protein (MAP) kinase mutant (De Nadal *et al.*, 1998). Therefore, we tested the phenotype derived by high-copy expression of the suppressor genes in this MAP kinase-deficient background. As shown

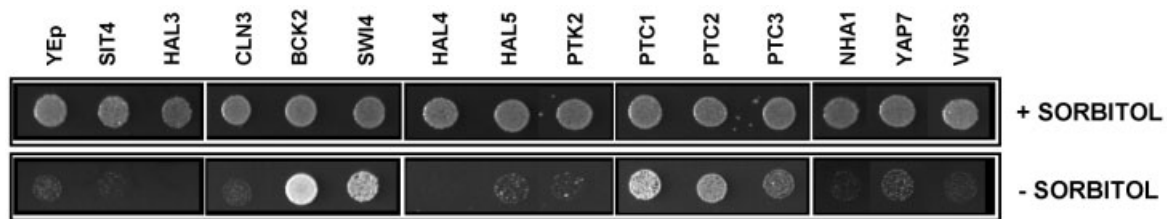
in Figure 5, growth of *slt2/mpk1* cells at 37 °C is affected very differently by the suppressor genes. In contrast to the behaviour of *HAL3*, expression of *SWI4* and *BCK2* was able to substantially improve growth of the MAP kinase mutant. A similar effect was obtained upon expression of *PTC1*, whereas *PTC2* had a lesser effect and expression of *PTC3* barely improved growth. On the other hand, expression of *HAL4*, but not of *HAL5* or *PTK2*, aggravated the cell growth defect. Therefore, the effects of expression of the different genes on a MAP kinase-deficient strain are not only far from homogeneous, but even opposite.

#### Phenotypic analysis of *vhs1-3* mutants

Cells lacking *VHS1*, *VHS2* or *VHS3* grew normally on rich medium. As there was virtually no information on the function of these genes, we tested



**Figure 4.** Suppression of the salt-sensitive phenotype of *hal3* cells. Strain JA104 (*hal3::LEU2*) was transformed with multicopy plasmids carrying the indicated genes and spotted on YPD plates containing 150 mM LiCl or 700 mM NaCl. Growth was monitored after 3 days



**Figure 5.** Effect of overexpression of suppressor genes on the lytic phenotype of the *slt2/mpk1* MAP kinase mutant. Strain JC10 (*mpk1::LEU2*) was transformed with the indicated multicopy plasmids. Cells were grown on synthetic medium lacking uracil and spotted in the same medium with or without 10% sorbitol. Plates were transferred at 37 °C and growth resumed for 50 h

growth of the mutants under a number of conditions, such as high temperature (38.5 °C), growth on glycerol, or the presence of caffeine (1–15 mM), rapamycin (2–50 nM), LiCl (150–300 mM) and NaCl (0.7–1.6 M). Cells lacking *VHS2* were slightly sensitive to lithium chloride and caffeine, while *vhs1* mutants were somewhat sensitive to high concentrations of NaCl (1.4 M). Lack of *VHS3* resulted in a mild sensitivity to LiCl and NaCl, a phenotype that was much more evident in a *hal3* background. No phenotypic differences from the wild-type strain were observed under the rest of conditions tested.

## Discussion

One of the major strengths of functional screenings based on gene overexpression lies in the ability to recover genes with redundant function. For this reason, we expected that our screening might uncover genes which could bypass the absence of *HAL3* or *SIT4* (e.g. negative regulatory subunits of Ppz1, or substrates of the phosphatases). This approach can be considered as complementary of other screenings, such as the original *cdc* screening (Hartwell *et al.*, 1970, 1973), based in a loss-of-function approach, or the most recent very strong overexpression screenings (Espinet *et al.*, 1995; Stevenson *et al.*, 2001). Our conditional *sit4 hal3* suppression screening identified genes, such as *SWI4* or *CLN3*, known to be key elements in the G<sub>1</sub>-S transition. *SWI4* is one of the two components of the SBF transcription factor (the other is *SWI6*) that induce the late G<sub>1</sub>-specific expression of the G<sub>1</sub> cyclins *CLN1*, *CLN2* and *PCL1* as well as a number of genes involved in cell-wall biosynthesis (Sidorova and Breeden,

1993; Spellman *et al.*, 1998). Because *Sit4* and *Hal3* are required for proper accumulation of *SWI4* (Fernandez-Sarabia *et al.*, 1992; DiComo *et al.*, 1995a), under non-permissive conditions JC002 cells should be defective in *SWI4* expression. Therefore, it seems logical that, in doxycycline-treated JC002 cells, high levels of *SWI4* would restore efficient SBF function and would overcome the G<sub>1</sub> arrest.

*CLN3* is a G<sub>1</sub> cyclin associated with *CDC28*. The *Cln3*-*Cdc28* complex is an important activator of SBF-dependent transcription (Stuart and Wittenberg, 1995). In a *cln3* null mutant the expression of SBF genes is delayed, but there is enough residual SBF activity to prevent a cell cycle arrest. *Bck2* is a non-essential protein that also has the ability to activate SBF-regulated genes (Di Como *et al.*, 1995b). Similarly, in a *bck2* mutant, expression of SBF-regulated genes is delayed, but not abrogated. A *cln3 bck2* double mutant fails to express normal levels of *CLN1*, *CLN2* and *CLB5*, and probably for this reason is not viable (Epstein and Cross, 1994; Di Como *et al.*, 1995b). Thus, *BCK2* has a shared function with *CLN3* in activating the expression of G<sub>1</sub> cyclins and other SBF-dependent genes (Wijnen and Futcher, 1999). In fact, *BCK2* appears to mediate only a branch of *SIT4* function, and *bck2* mutants grow nearly as wild-type cells. In our hands, the potency of suppression of *BCK2* is rather poor (Figure 1), accordingly to the proposed minor role for *BCK2* in this phase of the cell cycle (Levine *et al.*, 1996). In any case, the finding of *SWI4*, *CLN3* and *BCK2* as suppressor genes provides support to the rationale for the screening.

Despite the fact that *PPH22* was reported to partially suppress at high-copy the growth defect of *sit4* mutations (Sutton *et al.*, 1991) it is generally accepted that *Sit4* plays an important role in the

control of G<sub>1</sub> (Sutton *et al.*, 1991), whereas Pph21 and Pph22 influence the G<sub>2</sub>–M transition (Lin and Arndt, 1995; Evans and Stark, 1997; Yang *et al.*, 2000; Stevenson *et al.*, 2001). Our results indicate that the role of Sit4 in the G<sub>1</sub>–S transition can be partially replaced by an increment of PP2A activity provided by any PP2A phosphatase isoform. A possible explanation for this overlapping functions raises from the observation that *SIT4* and *PP2A* positively act in the TOR signalling pathway, by binding the Tap42 subunit (Di Como and Arndt, 1996; Jiang and Broach, 1999). Inhibition of this pathway by lack of nutrients or exposure to the drug rapamycin leads to blockage in G<sub>1</sub>, while cells that overexpress *SIT4* display rapamycin resistance (Di Como and Arndt, 1996). Our data indicates that lack of Hal3 or overexpression of Ppz1 results in decreased rapamycin tolerance (Figure 2) and allows to speculate that the TOR pathway may be severely impaired in JC002 grown under non-permissive conditions. In this scenario, overexpression of *PPH21* or *PPH22* would lead to a partial recuperation of the TOR signalling pathway function sufficient to allow the cells to progress in the cell cycle.

In addition to type 2A phosphatases, *PTC2* (YER089c), a member of the type 2C family in yeast, display a suppressor effect on JC002 cells. The potency of *PTC2* is greater than that its homologues *PTC1* or *PTC3*, thus suggesting a novel function for this phosphatase as a positive factor of the G<sub>1</sub>–S transition and confirming previous findings pointing out specific functions for the members of type 2C phosphatase family in yeast. A number of relevant cellular functions have been reported to be negatively regulated by *PTC2*: unfolded protein response (Welihinda *et al.*, 1998), the HOG MAPK pathway (Warmka *et al.*, 2001), and Cdc28 activity (Cheng *et al.*, 1999). In addition, Ptc2 has been implicated in functions related to *RAD53*, *MEC1* and the DNA checkpoints pathways (Marsolier *et al.*, 2000). It should be noted that the observation that Ptc2 can act, under some circumstances, as a positive effector of the cell cycle is rather surprising, since previous evidence has demonstrated that Ptc2 and Ptc3 are the major cyclin-dependent protein kinase phosphatase activities in yeast (Cheng *et al.*, 1999) and, therefore, one should expect that these proteins would act as negative effectors of cell cycle.

The suppressor genes *HAL4* and *PTK2* belong to the same Ser–Thr protein kinase family (Hunter and Plowman, 1997). Hal4 and Hal5 activate potassium transporters Trk1 and Trk2, thus increasing potassium uptake, which results in increased resistance to lithium, sodium and low pH (Mulet *et al.*, 1999). Ptk2 activates the Pma1 plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase (Goossens *et al.*, 2000), thus modulating the electrical membrane potential. This results in a pleiotropic phenotype in *ptk2* mutants, with increased tolerance to sodium, lithium and other toxic cations. As shown in Figure 1, high-copy number expression of *HAL4*, *PTK2*, and also *HAL5*, allows growth of strain JC002 under non-permissive conditions. A possible clue on how these kinases could help to recover these cells from G<sub>1</sub> block comes from the recent finding that the function on salt tolerance and cell cycle of the Hal3/Ppz phosphatase system could be attributed to the negative regulatory effect of the phosphatases on the Trk1/Trk2 potassium transporters (Yenush *et al.*, 2002), thus providing a link between potassium uptake and cell cycle progression. Therefore, the positive effect on G<sub>1</sub>–S transition of Hal4/Hal5 could be attributed to its positive role on the Trk1/2 potassium transporters, while the effect of Ptk2 would be indirect, by stimulating proton output, increasing membrane potential and, therefore, favouring potassium uptake. This would counteract the lower potassium content attributed to *hal3* cells (Ferrando *et al.*, 1995).

We have also tested most cell blockage suppressor genes as suppressors of *sit4* phenotypes, as well as for their ability to mimic Hal3 functions. It is remarkable that very little correlation was observed when tested as suppressors of both *sit4* temperature-sensitive and inability to grow on non-fermentable carbon sources phenotypes. A similar scenario was found when tested for saline tolerance on a *hal3* background (Figure 4). Once again, the members of PP2C gene family displayed different behaviour. *PTC1* and *PTC2* had no effect, while *PTC3* substantially increased tolerance to lithium and sodium. This effect is probably independent of its role on the regulation of the osmotically-induced Hog1 MAP kinase, since it has been shown that all three phosphatases suppress growth defects due to Hog1 hyperactivation (Warmka *et al.*, 2001), and the effect of *PTC3* overexpression is also observed at concentrations of LiCl low enough as not to produce a significant osmotic stress response.

It is remarkable that, in contrast with previously described results for high level expression of Sit4 on wild-type cells (Masuda *et al.*, 2000), we did not observe a positive effect of overexpression of Sit4 on lithium tolerance in the hypersensitive *hal3* background. This may be due to that these authors used a very powerful, *GAL*-based expression system, whereas in our case the phosphatase is expressed from its own promoter. In addition, the different carbon source used in these experiments may be of relevance, as it is known that glucose starvation affects expression of the *ENA1* ATPase gene (Alepuz *et al.*, 1997; Proft and Serrano, 1999), a major determinant for salt tolerance.

The Slt2/Mpk1 MAP kinase is activated by the protein kinase C-MAPK module (Lee *et al.*, 1993a) in response to cell wall stress. Lack of the Slt2/Mpk1 MAP kinase results in a lytic phenotype at 37 °C, which is rescued by a high concentration of sorbitol (Torres *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1993a), whereas it is aggravated by high-copy expression of Hal3 (De Nadal *et al.*, 1998). In addition, recent evidence suggests that Sit4 affects the activity of Slt2/Mpk1 by inhibiting the upstream Pkc1 (De la Torre-Ruiz *et al.*, 2002). Our data indicates that the effect of expression of the different genes on a MAP kinase-deficient strain are far from homogeneous and, in some cases, opposite to that expected for a gene mimicking Hal3 function. An example is *BCK2*, isolated initially as a gene able to bypass the lack of Pkc1 activity and whose overexpression was able to rescue a *slt2/mpk1* mutant (Lee *et al.*, 1993b). The finding of a suppressor effect for *PTC1* (the most prominent member of the PP2C family in this test) was not surprising, since this gene was isolated as a multicopy suppressor of defects of specific *pkc1* mutant alleles (Huang and Symington, 1995) and it has been documented that the *mpk1 ptc1* mutations are synthetically lethal.

### Acknowledgements

We thank F. Posas for helpful discussion and H. Saito, R. Serrano, H. Ronne and J. L. Revuelta for different plasmids and mutants. The support of C. Gancedo in respiration measurements is acknowledged. The excellent technical assistance of M. José Adserias, Pau Pina, Anna Vilalta and Yolanda Prado is acknowledged. E. Simón is the recipient of a fellowship from the Universitat Autònoma de Barcelona and I. Muñoz is the recipient of a fellowship from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Spain).

This work was supported by Grants PB98-0565-C4-02 and BMC2002-04011-C05-04 (Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain) and by an 'Ajut de Suport als Grups de Recerca de Catalunya' (2001SGR-00193) from the Generalitat de Catalunya, both to J.A.

### References

- Adams A, Gottschlings DE, Kaiser CA, Stearns T. 1998. *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York.
- Alepuz PM, Cunningham KW, Estruch F. 1997. Glucose repression affects ion homeostasis in yeast through the regulation of the stress-activated *ENA1* gene. *Mol Microbiol* **26**: 91–98.
- Arndt KT, Styles CA, Fink GR. 1989. A suppressor of a *HIS4* transcriptional defect encodes a protein with homology to catalytic subunit of protein phosphatases. *Cell* **56**: 527–537.
- Bastians H, Ponstingl H. 1996. The novel human protein serine/threonine phosphatase 6 is a functional homologue of budding yeast Sit4p and fission yeast *ppe1*, which are involved in cell cycle regulation. *J Cell Sci* **109**: 2865–2874.
- Bellí G, Garí E, Aldea M, Herrero E. 1998. Functional analysis of yeast essential genes using a promoter-substitution cassette and the tetracycline-regulatable dual expression system. *Yeast* **14**: 1127–1138.
- Calero F, Gómez N, Ariño J, Ramos J. 2000. Trk1 and Trk2 define the major K<sup>+</sup> transport system in fission yeast. *J Bacteriol* **182**: 394–399.
- Clotet J, Garí E, Aldea M, Ariño J. 1999. The yeast Ser/Thr phosphatases Sit4 and Ppz1 play opposite roles in regulation of the cell cycle. *Mol Cell Biol* **19**: 2408–2415.
- Cheng AY, Ross KE, Kaldis P, Salomon MJ. 1999. Dephosphorylation of cyclin-dependent kinases by type 2C protein phosphatases. *Genes Dev* **13**: 2946–2957.
- De la Torre-Ruiz MA, Torres J, Ariño J, Herrero E. 2002. Sit4 is required for proper modulation of the biological functions mediated by Pkc1 and the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **277**: 33468–33476.
- De Nadal E, Clotet J, Posas F, Serrano R, Gómez N, Ariño J. 1998. The yeast halotolerance determinant Hal3 is an inhibitory subunit of the Ppz1p Ser–Thr protein phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 7357–7362.
- Di Como CJ, Bose R, Arndt KT. 1995a. Overexpression of *SIS2*, which contains an extremely acidic region, increases the expression of *SWI4*, *CLN1* and *CLN2* in *sit4* mutants. *Genetics* **139**: 95–107.
- Di Como CJ, Chang H, Arndt KT. 1995b. Activation of *CLN1* and *CLN2* G<sub>1</sub> cyclin gene expression by *BCK2*. *Mol Cell Biol* **15**: 1835–1846.
- Di Como CJ, Arndt KT. 1996. Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases. *Genes Dev* **10**: 1904–1916.
- Epstein CB, Cross FR. 1994. Genes that can bypass the *CLN* requirement for *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle START. *Mol Cell Biol* **14**: 2041–2047.
- Espinete C, de la Torre MA, Aldea M, Herrero E. 1995. An efficient method to isolate yeast genes causing overexpression-mediated growth arrest. *Yeast* **11**: 25–32.



- Evans DR, Stark MJ. 1997. Mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* type 2A protein phosphatase catalytic subunit reveal roles in cell wall integrity, actin cytoskeleton organization and mitosis. *Genetics* **145**: 227–241.
- Fernandes L, Rodrigues-Pousada C, Struhl K. 1997. Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. *Mol Cell Biol* **17**: 6982–6993.
- Fernández-Sarabia MJ, Sutton A, Zhong T, Arndt KT. 1992. *SIT4* protein phosphatase is required for the normal accumulation of *SWI4*, *CLN1*, *CLN2* and *HCS26* RNA during late G<sub>1</sub>. *Genes Dev* **6**: 2417–2428.
- Ferrando A, Kron SJ, Ríos G, Fink GR, Serrano R. 1995. Regulation of cation transport in *Saccharomyces cerevisiae* by the salt tolerance gene *HAL3*. *Mol Cell Biol* **15**: 5470–5481.
- Gietz RD, Sugino A. 1988. New yeast–*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **74**: 527–534.
- Goossens A, de La Fuente N, Forment J, Serrano R, Portillo F. 2000. Regulation of yeast H(+)-ATPase by protein kinases belonging to a family dedicated to activation of plasma membrane transporters. *Mol Cell Biol* **20**: 7654–7661.
- Hartwell LH, Culotti J, Reid B. 1970. Genetic control of the cell-division cycle in yeast: I. Detection of mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* **66**: 352–359.
- Hartwell LH, Mortimer RK, Culotti J, Culotti M. 1973. Genetic control of the cell division cycle in yeast: V. Genetic analysis of *cdc* mutants. *Genetics* **74**: 267–286.
- Hu GZ, Ronne H. 1994. Overexpression of yeast *PAM1* gene permits survival without protein phosphatase 2A and induces a filamentous phenotype. *J Biol Chem* **269**: 3429–3435.
- Huang KN, Symington LS. 1995. Suppressors of a *Saccharomyces cerevisiae* *pkc1* mutation identify alleles of the phosphatase gene *PTC1* and of a novel gene encoding a putative basic leucine zipper protein. *Genetics* **141**: 1275–1285.
- Hunter T, Plowman GD. 1997. The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem Sci* **22**: 18–22.
- Jiang Y, Broach JR. 1999. Tor proteins and protein phosphatase 2A reciprocally regulate Tap42 in controlling cell growth in yeast. *EMBO J* **18**: 2782–2792.
- Kühne C, Linder P. 1993. A new pair of B-type cyclins from *Saccharomyces cerevisiae* that function early in the cell cycle. *EMBO J* **12**: 3437–3447.
- Lee KS, Irie K, Gotoh Y, et al. 1993a. A yeast mitogen-activated protein kinase homolog (Mpk1p) mediates signalling by protein kinase C. *Mol Cell Biol* **13**: 3067–3075.
- Lee KS, Hines LK, Levin DE. 1993b. A pair of functionally redundant yeast genes (*PPZ1* and *PPZ2*) encoding type 1-related protein phosphatases function within the PKC1-mediated pathway. *Mol Cell Biol* **13**: 5843–5853.
- Levine K, Huang K, Cross FR. 1996. *Saccharomyces cerevisiae* G<sub>1</sub> cyclins differ in their intrinsic functional specificities. *Mol Cell Biol* **16**: 6794–6803.
- Lin FC, Arndt KT. 1995. The role of *Saccharomyces cerevisiae* type 2A phosphatase in the actin cytoskeleton and in entry into mitosis. *EMBO J* **14**: 2745–2759.
- Marsolier MC, Roussel P, Leroy C, Mann C. 2000. Involvement of the PP2C-like phosphatase Ptc2p in the DNA checkpoint pathways of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **154**: 1523–1532.
- Masuda CA, Ramírez J, Pena A, Montero-Lomeli M. 2000. Regulation of monovalent ion homeostasis and pH by the Ser–Thr protein phosphatase *SIT4* in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**: 30957–30961.
- Mulet JM, Leube MP, Kron SJ, Ríos G, Fink GR, Serrano R. 1999. A novel mechanism of ion homeostasis and salt tolerance in yeast: the *hal4* and *hal5* protein kinases modulate the Trk1–Trk2 transporter. *Mol Cell Biol* **19**: 3328–3337.
- Posas F, Camps M, Ariño J. 1995. The PPZ protein phosphatases are important determinants of salt tolerance in yeast cells. *J Biol Chem* **270**: 13036–13041.
- Proft M, Serrano R. 1999. Repressors and upstream repressing sequences of the stress-regulated *ENA1* gene in *Saccharomyces cerevisiae*: bZIP protein Sko1p confers HOG-dependent osmotic regulation. *Mol Cell Biol* **19**: 537–546.
- Rothstein RJ. 1983. One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol* **101**: 202–211.
- Ronne H, Carlberg M, Hu GZ, Nehlin JO. 1991. Protein phosphatase 2A in *Saccharomyces cerevisiae*: effects on cell growth and bud morphogenesis. *Mol Cell Biol* **11**: 4876–4884.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York.
- Schwob E, Nasmyth K. 1993. *CLB5* and *CLB6*, a new pair of B cyclins involved in DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **7**: 1160–1175.
- Shimanuki M, Kinoshita N, Ohkura H, Yoshida T, Toda T, Yanagida M. 1993. Isolation and characterization of the fission yeast protein phosphatase gene *ppe1*<sup>+</sup> involved in cell shape control and mitosis. *Mol Biol Cell* **4**: 303–313.
- Sidorova J, Breeden L. 1993. Analysis of the SWI4/SWI6 protein complex, which directs G<sub>1</sub>–S-specific transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **13**: 1069–1077.
- Simón E, Clotet J, Calero F, Ramos J, Ariño J. 2001. A screening for high-copy suppressors of the *sit4 hal3* synthetically lethal phenotype reveals a role for the yeast Nha1 antiporter in cell cycle regulation. *J Biol Chem* **276**: 29740–29747.
- Spellman PT, Sherlock G, Zhang MQ, et al. 1998. Comprehensive identification of cell-cycle regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell* **9**: 3273–3297.
- Stark M. 1996. Yeast protein serine/threonine phosphatases: multiple roles and diverse regulation. *Yeast* **12**: 1647–1675.
- Stevenson LF, Kennedy BK, Harlow E. 2001. A large-scale overexpression screen in *Saccharomyces cerevisiae* identifies previously uncharacterized cell cycle genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 3946–3951.
- Stuart D, Wittenberg C. 1995. CLN3, not positive feedback, determines the timing of CLN2 transcription in cycling cells. *Genes Dev* **9**: 2780–2794.
- Sutton A, Immanuel D, Arndt KT. 1991. The *SIT4* protein phosphatase functions in late G<sub>1</sub> for progression into S phase. *Mol Cell Biol* **11**: 2133–2148.
- Torres L, Martin H, García-Sáez MI, et al. 1991. A protein kinase gene complements the lytic phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* *lyt2* mutants. *Mol Microbiol* **5**: 2845–2854.
- Vissi E, Clotet J, De Nadal E, et al. 2001. Functional analysis of the *Neurospora crassa* Pz11 protein phosphatase by expression in budding and fission yeast. *Yeast* **18**: 115–124.
- Wach A, Brachat A, Pohlmann R, Philippsen P. 1994. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**: 1793–1808.

- Warmka J, Hanneman J, Lee J, Amin D, Ota I. 2001. Ptc1, a type 2C Ser-Thr phosphatase, inactivates the HOG pathway by dephosphorylating the mitogen-activated protein kinase Hog1. *Mol Cell Biol* **21**: 51–60.
- Welihinda AA, Tirasophon W, Green SR, Kaufman RJ. 1998. Protein Ser-Thr phosphatase Ptc2p negatively regulates the unfolded protein response by dephosphorylating Ire1p kinase. *Mol Cell Biol* **18**: 1967–1977.
- Wijnen H, Futcher B. 1999. Genetic analysis of the shared role of *CLN3* and *BCK2* at the G<sub>1</sub>-S transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **153**: 1131–1143.
- Willems AR, Lanker S, Patton EE, et al. 1996. Cdc53 targets phosphorylated G<sub>1</sub> cyclins for degradation by the ubiquitin proteolytic pathway. *Cell* **86**: 453–463.
- Winzeler EA, et al. 1999. Functional characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* **285**: 901–906.
- Wittenberg C, Sugimoto K, Reed SI. 1990. G<sub>1</sub>-specific cyclins of *S. cerevisiae* cell cycle, periodicity, regulation by mating pheromone, and association with the p34<sup>cdc28</sup> protein kinase. *Cell* **62**: 225–237.
- Yang H, Jiang W, Gentry M, Hallberg RL. 2000. Loss of a protein phosphatase 2A regulatory subunit (Cdc55p) elicits improper regulation of Swe1p degradation. *Mol Cell Biol* **20**: 8143–8156.
- Yenush L, Mulet JM, Ariño J, Serrano R. 2002. The Ppz protein phosphatases are key regulators of K<sup>+</sup> and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression. *EMBO J* **21**: 920–929.

# Functional Characterization of the Yeast Ppz1 Phosphatase Inhibitory Subunit Hal3

A MUTAGENESIS STUDY\*<sup>‡</sup>

Received for publication, May 20, 2004, and in revised form, July 28, 2004  
Published, JBC Papers in Press, July 29, 2004, DOI 10.1074/jbc.M405656200

Iván Muñoz<sup>‡§</sup>, Amparo Ruiz<sup>‡¶</sup>, Maribel Marquina<sup>‡</sup>, Anna Barceló<sup>‡</sup>, Armando Albert<sup>||</sup>,  
and Joaquín Ariño<sup>‡\*\*</sup>

From the <sup>‡</sup>Department de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola 08193, Barcelona, Spain and <sup>||</sup>Grupo de Cristalografía Macromolecular y Biología Estructural, Instituto de Química Física Rocasolano, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid 28006, Spain

***Saccharomyces cerevisiae* Hal3 is a conserved protein that binds the carboxyl-terminal catalytic domain of the PP1c (protein phosphatase 1)-related phosphatase Ppz1 and potently inhibits its activity, thus modulating all of the characterized functions so far of the phosphatase. It is unknown how Hal3 binds to Ppz1 and inhibits its activity. Although it contains a putative protein phosphatase 1c binding-like sequence (<sup>263</sup>KLHVLV<sup>268</sup>), mutagenesis analysis suggests that this motif is not required for Ppz1 binding and inhibition. The mutation of the conserved His<sup>378</sup> (possibly involved in dehydrogenase catalytic activity) did not impair Hal3 functions or Ppz1 binding. Random mutagenesis of the 228 residue-conserved central region of Hal3 followed by a loss-of-function screen allowed the identification of nine residues important for Ppz1-related Hal3 functions. Seven of these residues cluster in a relatively small region spanning from amino acid 446 to 480. Several mutations affected Ppz1 binding and inhibition *in vitro*, whereas changes in Glu<sup>460</sup> and Val<sup>462</sup> did not alter binding but resulted in Hal3 versions unable to inhibit the phosphatase. Therefore, there are independent Hal3 structural elements required for Ppz1 binding and inhibition. *S. cerevisiae* encodes a protein (Vhs3) structurally related to Hal3. Recent evidence suggests that both mutations are synthetically lethal. Surprisingly, versions of Hal3 carrying mutations that strongly affected Ppz1 binding or inhibitory capacity were able to complement lethality. In contrast, the mutation of His<sup>378</sup> did not. This finding suggests that Hal3 may have both Ppz1-dependent and independent functions involving different structural elements.**

In contrast with the high number of protein kinases, eukaryotic cells contain a relatively small number of proteins with

\* This work was supported by Grants BMC2002-04011-C05-04, GEN2001-4707-C08-03 (to J.A.), and BMC2002-04011-C05-03 (to A.A.) from the Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain and Fondo Europeo de Desarrollo Regional. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>‡</sup> The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains Supplemental Table.

<sup>§</sup> Recipient of a fellowship from the Ministerio de Educación y Cultura.

<sup>¶</sup> Recipient of a fellowship from the Generalitat de Catalunya.

\*\* To whom correspondence should be addressed: Dept. de Bioquímica i Biologia Molecular Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola 08193, Barcelona, Spain. Tel.: 34-93-5812182; Fax: 34-93-5812006.

Ser/Thr protein phosphatase activity. A general strategy to refine specificity and to allow fine control of thousands of different dephosphorylation reactions in the cells has been the association of a catalytic subunit with a number of different regulatory subunits, which would confer to the catalytic protein specificity for given substrate(s), defined regulatory properties, or/and restricted subcellular location. Such a strategy is particularly important in the case of type 1 Ser/Thr phosphatases (for review see Refs. 1 and 2).

Ppz1 is a type 1-related yeast Ser/Thr protein phosphatase composed of a catalytic carboxyl-terminal domain and an NH<sub>2</sub>-terminal extension (3). The catalytic domain is approximately 60% identical to the mammalian and plant catalytic subunits of protein phosphatase 1 (PP1c).<sup>1</sup> In yeast cells, Ppz1 is involved in a variety of cell processes including regulation of salt tolerance, maintenance of cell wall integrity, and regulation of cell cycle at the G<sub>1</sub>/S transition (4). These functions can be explained as a result of an inhibitory activity on the Trk1/Trk2 potassium transporters (5), although Trk-independent functions have been also reported (6).

The activity of Ppz1 is regulated by Hal3/Sis2, a conserved protein identified several years ago in two independent screens as a high-copy suppressor of the *sit4* growth defect (7) and by its capacity to confer halotolerance (8). Hal3 acts as a negative regulatory subunit of Ppz1 by binding to the phosphatase carboxyl-terminal catalytic domain (9) and strongly inhibits Ppz1 activity, thus modulating its diverse physiological functions. Therefore, the overexpression of Hal3 provides increased salt tolerance, whereas *hal3* cells are hypersensitive to sodium and lithium cations. *sit4* and *hal3* mutations display synthetic lethality due to G<sub>1</sub> blockade, whereas high-copy expression of *HAL3* accelerates entry into S phase after an  $\alpha$ -factor-induced G<sub>1</sub> arrest in a *sit4* mutant (7, 10). Finally, high-copy expression of Hal3 aggravates the lytic phenotype of a Slt2/Mpk1 MAP kinase mutant, whereas, in contrast, a lack of *HAL3* improves growth of this strain (9).

Homologs of Hal3 have been found in plants and animals (11), although they lack the acidic tail. The *Arabidopsis thaliana* AtHal3a isoform was found to be a flavoprotein able to partially complement a *hal3* yeast mutant. Resolution of its three-dimensional structure allows Albert *et al.* (12) to propose that the plant protein could act as a dehydrogenase through a mechanism that might involve His<sup>90</sup>, a residue conserved in yeast Hal3 (His<sup>378</sup>). Further work uncovered that AtHal3a

<sup>1</sup> The abbreviations used are: PP1c, protein phosphatase 1; CM, complete minimal medium; CM-uracil, CM lacking uracil; GST, glutathione *S*-transferase.

TABLE I  
Yeast strains used in this work

Strain	Relevant genotype	Source/reference
JA100	<i>MATa ura3-52 leu2-3,112 his4 trp1-1 can-1r</i>	9
JC002	JA100 <i>sit4::TRP1 tetO:HAL3</i>	10
JC010	JA100 <i>slt2::LEU2</i>	35
MAR20	JA100 <i>slt2::TRP1 hal3::LEU2</i>	16
JA104	JA100 <i>hal3::LEU2</i>	9
EDN75	JA100 <i>ppz1::KAN</i>	32
IM021	JA100 <i>ppz1::KAN hal3::LEU2</i>	This work
MAR6	1788 <i>MATa/α HAL3/hal3::LEU2 VHS3/vhs3::URA3</i>	16
MAR23	JA100 <i>tetO:HAL3 vhs3::URA3</i>	16

could catalyze the decarboxylation of 4'-phosphopantothenoylcysteine (13), suggesting that this protein could be involved in coenzyme A biosynthesis, and pointed out an important role of Cys<sup>175</sup> in the catalytic mechanism (13, 14). It is worth noting that a such Cys residue is not conserved in yeast Hal3. The *S. cerevisiae* genome contains two genes, *VHS3* and *YKL088w*, encoding proteins that are 49 and 28% identical to Hal3, respectively. Recent evidence suggests that Vhs3 could be functionally related to Hal3 on the basis that high-copy *VHS3* partially complements the absence of Hal3 function (15) and that recent work in our laboratory has revealed that Vhs3 binds to and inhibits Ppz1 *in vitro* (16).

The mechanism of binding between PP1c and its different regulatory subunits and how these interactions modulate the phosphatase activity has received considerable attention in the last few years, particularly after the elucidation of the PP1c structure (17, 18). A number of structural features shared by most known PP1c regulatory subunits have been defined. The most common one is the existence of a motif, initially identified as a RVXF sequence (19, 20) and subsequently found in many regulatory subunits as more or less conserved variations of the original sequence. In addition to this motif, additional interactions sites are probably required in many cases (for review see Ref. 1). In contrast, besides the early observation that the characteristic highly acidic tail of Hal3 is required for function *in vivo* (7, 8), very little is known regarding the structural elements defining the cellular role of Hal3 or its function as phosphatase inhibitor. Interestingly, Hal3 does not structurally resemble previously characterized PP1c phosphatase inhibitors and it does not bind or inhibit *in vitro* yeast PP1c (encoded by *GLC7* in *S. cerevisiae*) (9, 21). Therefore, previous experience and knowledge on the regulation of Glc7 by its diverse regulatory subunits were of little help to face the question of how Hal3 might bind to and inhibit Ppz1.

To gain insight into the Hal3 regulatory mechanisms, we have developed a mutagenesis analysis followed by a loss-of-function genetic screen aiming to identify residues relevant for Hal3 function. The results presented here show that His<sup>378</sup> has no function in regulating Ppz1 activity and allow us to identify a number of residues, most of them clustering between residues 446 and 480, which are important for Ppz1 binding and/or inhibition. In addition, we provide evidence pointing to possible Ppz1-independent functions for Hal3.

#### MATERIALS AND METHODS

**Growth Conditions of *Escherichia coli* and *S. cerevisiae* Strains**—Except when otherwise indicated, *E. coli* DH5α strain was used as plasmid DNA host and was grown in LB medium at 37 °C supplemented with 50 μg/ml ampicillin when needed for plasmid selection. Yeast cells were grown unless otherwise stated at 28 °C in YPD medium or in complete minimal medium (CM) lacking the appropriate requirements for plasmid selection. All of the yeast strains used in this work are derived from JA-100 (9) and are listed in Table I.

**Recombinant DNA Techniques and Plasmid Construction**—*E. coli* and *S. cerevisiae* cells were transformed using standard techniques as previously described (9). Restriction reactions, DNA ligations, and other

standard recombinant DNA techniques were carried out as described previously (22).

The source for the *HAL3* gene was plasmid YEplac195-HAL3, which contains a 2.4-kbp BclI-HindIII DNA genomic fragment (8). Plasmid pGEM3Z-HAL3 was constructed by digestion of YEplac195-HAL3 with EcoRI/HindIII and cloning of the 2.4-kbp fragment into the same sites of plasmid pGEM3Z (Promega). Plasmid YEplac195-Hal3 was obtained by cloning the EcoRI/HindIII *HAL3* fragment into the same sites of YEplac195 (23).

Mutation of His<sup>265</sup> to glycine was made by PCR using oligonucleotides 5'-Hal3H265AR and 3'-Hal3HpaI (see Supplemental Table) to amplify a fragment of ~700 bp that was then digested and cloned into the BamHI/HpaI sites of the gapped YEplac195-Hal3 to yield YEplac195-Hal3(H265G). The mutation of Phe<sup>268</sup> to alanine was made in a similar way but using oligonucleotides 5'-Hal3F268A and 3'-Hal3HpaI. The version of Hal3 in which His<sup>378</sup> was replaced by alanine was made by a sequential PCR strategy using the pairs of oligonucleotides 5'-HAL3BamHI/3'-HAL3His378Ala and 5'-HAL3His378Ala/3'-HAL3HpaI in the first step and 5'-Hal3BamHI and 3'-Hal3HpaI in the second step. The amplification fragment was cloned into the BamHI/HpaI sites of the gapped YEplac195-Hal3 to yield YEplac195-Hal3(H378A).

**Random PCR Mutagenesis and Screen for Loss of Hal3 Activity**—Random PCR mutagenesis was performed essentially as described by Fromant *et al.* (24) using MgCl<sub>2</sub> at a final concentration of 4.7 mM to minimize the occurrence of insertions and/or deletions. YEplac195-HAL3 and oligonucleotides 5'-Hal3BamHI\_2 and 3'-Hal3HpaI\_2 were used to amplify the 716-bp fragment between the BamHI and the HpaI sites found in the *HAL3* coding sequence. Four different reactions were made in the presence of one of the forcing dNTPs. The products of several independent PCR reactions were pooled, purified, and digested with BamHI and HpaI and cloned in the same sites of the gapped plasmid pGEM3Z-HAL3. Ligation products were introduced into *E. coli* competent cells by electroporation. Approximately 30,000 independent colonies were recovered and mixed. Plasmid DNA was prepared, digested with EcoRI/HindIII, and electrophoresed. The 2.4-kbp band was recovered and cloned into YEplac195 to yield at least 30,000 colonies.

The plasmid library was used to transform strain JC010 (*slt2Δ*) using enough DNA to yield around 3000 transformants/plate (determined using control CM lacking uracil (CM-uracil) plates and containing 1 M sorbitol). Approximately 40,000 transformants were plated in CM-uracil medium, and plates were incubated for 48–72 h. Clones able to generate macroscopic colonies under these conditions (usually 20–30/plate) were picked out and grown for an additional 3–6 h in sterile 96-well plates filled with CM-uracil medium. They were then replicated in CM-uracil plates and in the same plates containing 1 M sorbitol, 1 M NaCl, 0.2 M LiCl, or 3 mM caffeine for initial characterization of the clones. Plasmids from the selected clones were then extracted, amplified in *E. coli*, and subjected to restriction mapping to verify the nature of the insert. The constructs were reintroduced in strain JC010, and the phenotypes were reassessed as indicated above. Clones showing a consistent behavior were considered positives and subjected to further analysis. To ensure that the absence of function did not result from truncations of the protein, the presence of the entire Hal3 protein was assessed. For this purpose, yeast cell lysates of selected clones were prepared as described by de Nadal *et al.* (9), 40 μg of total protein were analyzed by SDS-PAGE, and Hal3 was immunodetected using anti-Hal3 polyclonal antibodies. The plasmids expressing a full-length protein then were subjected to sequence analysis covering the entire BamHI-HpaI fragment in search of mutations producing a change in the amino acid sequence of the protein that could be responsible for the loss of Hal3 function.

All of the mutated versions of *HAL3* were removed from YEplac195 by digestion with EcoRI and HindIII, and the resulting 2.4-kbp frag-



ments were cloned into the same sites of plasmids YCp33 (*URA3* marker), YCp22 (*TRP1* marker), and YEplac 112 (*TRP1* marker).

**In Vitro Binding Assays**—*In vitro* binding assays were performed as follows. GST-Ppz1 $\Delta_{1-344}$  was expressed in bacteria and bound to glutathione-agarose beads essentially as described previously (21). Yeast extracts of strain IM021 (*ppz1 hal3*) transformed with the YEplac195 multicopy plasmids carrying the different versions of Hal3 under study were basically prepared as described by de Nadal *et al.* (9). 1 mg of total protein from each sample was mixed with 50  $\mu$ l of the affinity beads and incubated for 1 h at 4 °C with gentle shaking. The washing procedure was essentially as described previously (9) with the exception that the beads were finally resuspended in 100  $\mu$ l of 2 $\times$  SDS sample buffer and boiled. Samples (10  $\mu$ l) were analyzed by SDS-PAGE and probed using anti-Hal3 polyclonal antibodies.

**In Vitro Phosphatase Assays**—The effect of the different versions of Hal3 as inhibitors of Ppz1 phosphatase activity was analyzed using bacterially expressed proteins. To this end, the entire open reading frame of the different *HAL3* versions was amplified by PCR using oligonucleotides 5'-*HAL3*EcoRI and 3'-*HAL3*XhoI to generate a 1.7-kbp fragment that was then cloned into these same sites of plasmid pGEX6P-1 (Amersham Biosciences). The different versions of GST-Hal3 generated were expressed using 1 mM isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside for induction at 37 °C for 3 h. Conditions of expression and purification of bacterial recombinant GST-Ppz1 $\Delta_{1-344}$  were essentially as described previously (21). Once bound to the glutathione-agarose affinity column, the recombinant phosphatase was treated for 4 h at 4 °C with PreScission protease (Amersham Biosciences) following the manufacturer's indications (80 units/ml resin) to cleave the GST moiety. The eluted GST-free phosphatase was analyzed by SDS-PAGE and quantified.

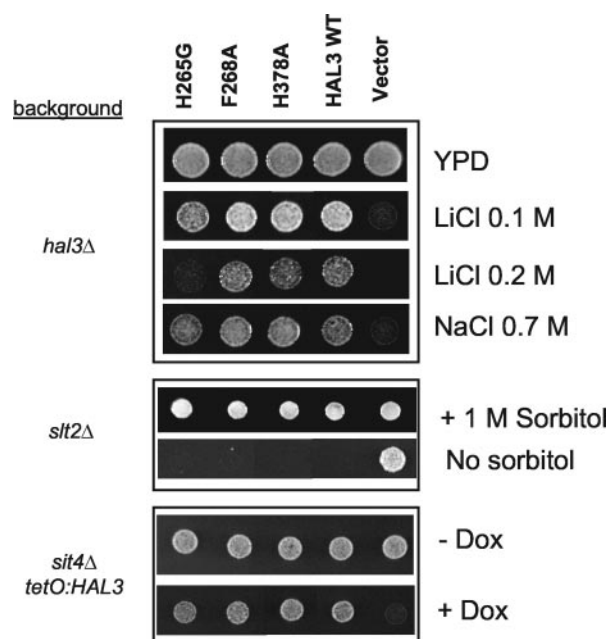
Because bacterial expression of the different GST-Hal3 versions produced variable amounts of shorter polypeptides, the amount of intact GST-Hal3 present in the samples used in the assays was determined as follows. A 10- $\mu$ l aliquot of each version eluted from the glutathione-agarose affinity column was analyzed by SDS-PAGE and Coomassie Blue-stained. The gel was scanned, and the amount of intact protein in each sample was quantified by comparison using commercial software with different amounts of a bovine serum albumin solution of known concentration.

The Ppz1 phosphatase activity was measured using *p*-nitrophenylphosphate as substrate essentially as described previously (21) with the following modifications. 0.5  $\mu$ g of Ppz1 phosphatase was used, the concentration of substrate was 10 mM, and the assay was carried out for 20 min at 30 °C. Different amounts of each version of GST-Hal3 were incubated in the presence of the phosphatase for 5 min at 30 °C, and the assay was started by the addition of the substrate.

**Other Techniques**—Growth on plates (drop tests) was assessed as described previously (25). Random spore analysis was performed essentially as described previously (26).

## RESULTS

**Evaluation of the Functional Relevance of His<sup>378</sup> and the 265HVLFF<sup>268</sup> Residues in Hal3**—As mentioned in the Introduction, Hal3 does not exhibit significant similarity with known regulatory subunits of type 1 protein phosphatases. However, it contains a HVLFF sequence (residues 265–268) that resembles the consensus RVXF sequence found in many PP1c regulatory subunits and we considered it necessary to evaluate whether this region could act as a regulatory element. To this end, we mutated His<sup>265</sup> to glycine and Phe<sup>268</sup> to alanine and tested the ability of these versions of Hal3 to mimic the function of the native protein, both at normal levels and under overexpression conditions. As shown in Fig. 1, the mutation of Phe<sup>268</sup> to Ala did not affect the ability of the protein to restore wild type tolerance in a *hal3* strain, whereas a change of His<sup>265</sup> to Gly reduced this ability partially (Fig. 1, upper panel). When these *HAL3* versions were overexpressed, they behaved essentially as the wild type forms (data not shown). When overexpressed, both versions were also able to block growth of a *slt2/mpk1* strain in the absence of sorbitol, similarly to native Hal3 (Fig. 1, middle panel). Finally, when they were expressed in low-copy (Fig. 1, lower panel), both versions allowed the growth of strain JC002 (*sit4 tetO:HAL3*), which suffers a G<sub>1</sub>/S blockade in the presence of doxycycline due to lack of *HAL3* expression (10).



**FIG. 1. Effect of mutations on the 265HVLFF<sup>268</sup> region and of His<sup>378</sup> on different functions of Hal3.** Upper panel, the centromeric plasmid YCplac33 carrying the indicated versions of Hal3 was introduced in strain JA104 (*hal3*), and cultures were spotted on YPD plates containing the indicated concentration of LiCl or NaCl. Growth was monitored after 36 h. Middle panel, the different versions of Hal3 cloned in the high-copy plasmid YEplac185 were introduced into strain JC010 (*slt2*), and cultures were spotted on synthetic medium (lacking uracil) plates with or without sorbitol and grown for 3 days. Lower panel, plasmids used for the experiment shown in the upper panel were introduced into strain JC002 (*sit4 tetO:HAL3*), and cultures were spotted on synthetic medium (lacking uracil) plates in the presence or absence of 20  $\mu$ g/ml doxycycline. Growth was monitored after 2 days.

On the basis of the structure of the AtHal3a protein, it was reasonable to assume that His<sup>378</sup> in *S. cerevisiae* Hal3 (equivalent to AtHal3a His<sup>90</sup>) could have functional relevance. However, when we mutated this residue to Ala and performed all of the functional tests described above, this mutated version of Hal3 displayed a completely wild type phenotype (Fig. 1). Previous work has shown that the Hal3 functions tested above are mediated by Ppz1 and result from inhibition of this phosphatase. Therefore, we investigated whether these mutated versions were still able to effectively bind and inhibit Ppz1. A GST-fused version of the phosphatase domain was expressed in *E. coli* and bound to glutathione-agarose to form an affinity system for Hal3. The different Hal3 versions were expressed at similar levels in *ppz1* yeast cells, and extracts were allowed to bind to the affinity beads. As shown in Fig. 2, left panel, the F268A and H378A versions were able to bind Ppz1 as the wild type form, whereas the H265G form was slightly less effective. To test the capacity of the different Hal3 versions to inhibit the catalytic activity of Ppz1, they were expressed in *E. coli* and *in vitro* inhibition assays were carried out. As it can be observed in Fig. 2, right panel, the F268A and H378A versions displayed an inhibitory potency very similar to that of wild type Hal3. The H265G mutated form allowed almost full inhibition of Ppz1, although it was slightly less effective than native Hal3.

In conclusion, these results indicate that the 265HVLFF<sup>268</sup> motif in Hal3 is probably not critical for Ppz1 binding and inhibition. Similarly His<sup>378</sup>, although theoretically equivalent to AtHal3a His<sup>90</sup>, is not relevant for Ppz1 regulation.

**A Screen for Mutations Resulting in Loss of Function Reveals a Small Region in Hal3 Important for Ppz1 Binding and/or Inhibition**—As the approach described above failed to reveal residues important for regulation of Ppz1 by Hal3, we decided

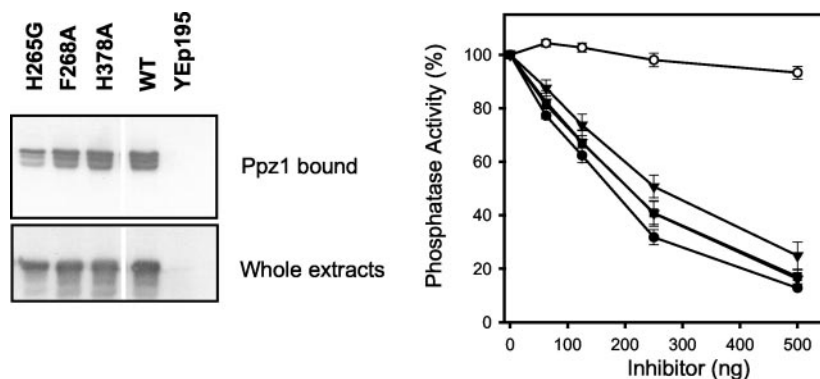


FIG. 2. Analysis of *Hal3* versions mutated in the <sup>265</sup>HVLV<sup>268</sup> region or in His<sup>378</sup> for binding and inhibition of Ppz1. Left panel, the bacterially expressed catalytic domain of Ppz1 (Ppz1 $\Delta_{1-344}$ ) fused to GST was bound to glutathione-agarose beads. Protein extracts from strain IM021 (*ppz1 hal3*) transformed with multicopy plasmids carrying different versions of *Hal3* were prepared and incubated with the affinity beads. After extensive washing, the presence of *Hal3* in the material retained by the beads was analyzed by immunoblot using anti-*Hal3* polyclonal antibodies. The amount of *Hal3* in each extract was also evaluated by the immunoblot (lower panel) of 50  $\mu$ g of total protein. Right panel, different amounts of bacterially expressed GST (open circles) or GST-*Hal3* (closed circles) or the different *Hal3* mutated version (H265G, closed triangles; F268A, open triangles; H378A, squares) were incubated with recombinant Ppz1( $\Delta_{1-344}$ ), and the phosphatase activity was measured as indicated under "Materials and Methods." Values correspond to the mean  $\pm$  S.E. from at least three different assays and are expressed as percentage of phosphatase activity relative to control without inhibitors. WT, wild type.

to create a PCR-based library of mutated versions of the regulatory protein and set up a screen for loss of function. The region was subjected to mutagenesis encompassed from Arg<sup>256</sup> to Ile<sup>480</sup> just upstream of the highly acidic tail, and it corresponds to the most conserved region among eukaryotes. This approach depicted in Fig. 3 is based on the ability of high-copy expression of *HAL3* to inhibit growth in synthetic medium of a *slt2/mpk1* mutant except if an osmotic stabilizer, such as sorbitol, is present. Therefore, transformants growing in the non-permissive conditions should harbor non-functional forms of *Hal3*. The screen of  $\sim$ 40,000 colonies yielded around 225 positive clones. The subsequent analysis of the plasmid insert allowed the discarding of  $\sim$ 50% of those inserts. The remaining clones were introduced again in strain JC10 (*slt2/mpk1*) and re-tested for growth. Protein extracts were prepared from 85 clones, subjected to SDS-PAGE electrophoresis, and transferred to membranes, and immunoblots were developed using anti-*Hal3* polyclonal antibody. Approximately 80% of the clones did not give signal with the antibody, did not contain a full size protein (probably due to premature stop codons), or exhibited the right protein size but at low levels of expression and therefore were also discarded. 17 clones passed all of these tests and were subjected to DNA sequencing in search of mutations. The relevant changes identified in this study are shown in Table II. Nine changes appeared to be unique. Interestingly, they were not scattered through the entire region that was subjected to mutagenesis but mostly concentrated in the last 40 carboxyl-terminal residues. In three cases, multiple mutations affecting more than one amino acid were found. It is worth noting that two of them included a change also found as a single mutation. The third one represents a triple change in which one of the mutations (S459P) lies in the vicinity of several residues affected by single mutations. These multiple mutated versions have not been further characterized.

As it can be deduced from Fig. 3, left panel, the potency of the phenotype exhibited by the different *Hal3* versions was not identical when they were tested in high-copy under different conditions in a *slt2/mpk1* background. The mutation of Tyr<sup>313</sup> and Ile<sup>480</sup> resulted in a relatively weak loss of function, whereas changes affecting residues Glu<sup>460</sup>, Val<sup>462</sup>, and Asn<sup>478</sup> allowed a vigorous growth comparable, if not stronger, to that of cells transformed with an empty plasmid. The introduction of the diverse forms of *Hal3* both as a low-copy and high-copy number into *hal3* cells allowed us to test the potency of the mutations in the salt tolerance phenotype. As shown in Fig. 4,

the ability to confer a salt-tolerant phenotype of *Hal3* versions containing changes in Tyr<sup>313</sup> and Ile<sup>480</sup> was somewhat less pronounced than that of the wild type protein. The mutation in Val<sup>390</sup>, Ile<sup>446</sup>, Asn<sup>466</sup>, and Asn<sup>478</sup> resulted in a marked loss of function when present in low-copy number. However, an increase in salt tolerance could be observed when these versions were expressed in a high-copy number, suggesting that they still retained some functional capacity. In contrast, the changes in Trp<sup>452</sup>, Glu<sup>460</sup>, and Val<sup>462</sup> resulted in a complete loss of the ability to increase tolerance to sodium or lithium ions, even when these versions were overexpressed. This pattern was reproduced quite closely when the different forms of *Hal3* were introduced both in low- and high-copy numbers in strain JC002, and these cells were grown in the presence of doxycycline (Fig. 4, lower panel). In this case, the Glu<sup>460</sup> mutation resulted in a complete loss of function.

In an attempt to explain the molecular basis for such behavior, we carried out binding experiments similar to those described above. As shown in Fig. 5, the mutation of residues Val<sup>390</sup>, Ile<sup>446</sup>, and Trp<sup>452</sup> provoked a substantial decrease in the ability of *Hal3* to bind Ppz1. Changes in Tyr<sup>313</sup> and Ile<sup>480</sup> probably result in a decreased binding capacity, although it is much less evident. The rest of mutations do not seem to significantly alter *Hal3* and Ppz1 interaction *in vitro*. When the capacity of the bacterially expressed mutated forms to inhibit Ppz1 was tested, the forms that had a markedly reduced binding to Ppz1 were, as expected, unable to inhibit its phosphatase activity. Interestingly, the version Val<sup>462</sup> despite its capacity to bind Ppz1 similarly to wild type *Hal3* was less effective in inhibiting the phosphatase. The case for mutation Glu<sup>460</sup> was remarkable as this version acted as an activator of the phosphatase. All of these results indicate that *Hal3* contains residues specific for Ppz1 binding as well as residues specific for Ppz1 inhibition and that the loss of function provoked by mutations in Glu<sup>460</sup> and Val<sup>462</sup> results from its inability to inhibit Ppz1 while retaining the capacity to bind the phosphatase.

*Further Analysis of Residues Important for Ppz1 Binding and/or Inhibition Reveals Possible Ppz1-independent Functions for Hal3*—As mentioned in the Introduction, the *S. cerevisiae* genome contains a gene (*VHS3*) structurally related to *HAL3* and recent work from our laboratory has suggested that the encoded protein could provide some *Hal3* activity (15). We also observed recently that, after tetrad analysis or random spore analysis, it was not possible to recover viable *hal3 vhs3* mutants. Furthermore, plasmid eviction experiments on plates

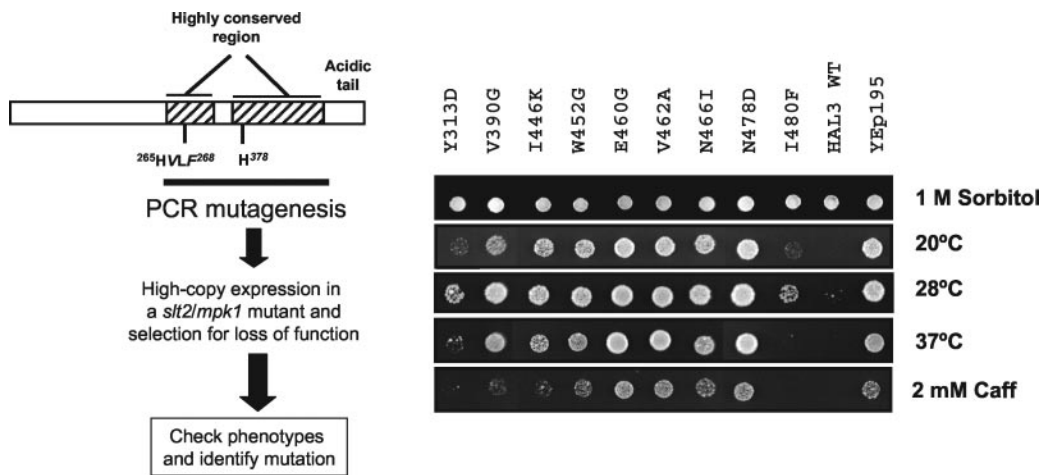


FIG. 3. **Screen for mutations affecting Hal3 function.** *Left panel*, a schematic depiction of the strategy used to identify residues relevant for Hal3 function (see “Materials and Methods” for details). *Right panel*, high-copy number plasmids carrying the indicated versions of Hal3 were introduced into strain JC010 (*slt2*). Cultures spotted in synthetic medium (lacking uracil) plates in the conditions described were grown for 3 days.

TABLE II

*Mutations in the Hal3 protein identified by the loss-of-function screen*

Numbers in parenthesis denote the number of clones identified for a given mutation.

Amino acid change	Codon mutation
<b>Single changes</b>	
Y313D	TAT to GAT (1)
V390G	GTA to GGA (1)
I446K	ATA to AAA (3)
W452G	TGG to GGG (1)
E460G	GAG to GGG (1)
V462A	GTT to GCT (2)
N466I	AAT to ATT (1)
N478D	AAT to GAT (1)
I480F	ATT to TTT (1)
<b>Multiple changes</b>	
D362G	GAC to GGG
E460G	GAG to GGG (2)
S428P	TCC to CCC
W452G	TGG to GGG (2)
S273P	TCG to CCG
I414V	ATT to GTT
S459P	TCT to CCT (1)

containing 5-fluororotic acid showed that the *HAL3* plasmid-born copy could not be lost in these cells (16), indicating again that both mutations were synthetically lethal. We considered interesting the ability to test for several of the mutations described above if they could also compromise the ability of Hal3 to complement the chromosomal mutation in a *vhs3* background. To this end, we selected the His<sup>378</sup> change as well as those mutations within the 446–480 region having the strongest effect on function according to the tests described above (Ile<sup>446</sup>, Trp<sup>452</sup>, Glu<sup>460</sup>, Val<sup>462</sup>, and Asn<sup>478</sup>). The diploid strain MAR6, heterozygotic for the *hal3* and *vhs3* mutations, was transformed with the mentioned versions of *HAL3* as well as with the wild type gene and cloned in a centromeric plasmid, and sporulation was induced. As expected, transformation with wild type *HAL3* allowed growth of all four spores in each tetrad. In contrast, in the case of the version carrying the mutation in His<sup>378</sup>, the distribution of the 27 tetrads analyzed was as follows: 4 non-parental ditype (with two growing colonies); 5 parental ditype (all four colonies grew), and 18 tetra-type (three growing colonies). Thus, we could not recover any spore containing the double mutation plus the plasmid. A similar distribution (4:4:17) was observed when 25 tetrads of the diploid strain containing an empty plasmid were analyzed. Large scale random spore analysis of the diploid containing the H378A version also failed to produce any colony exhibiting the

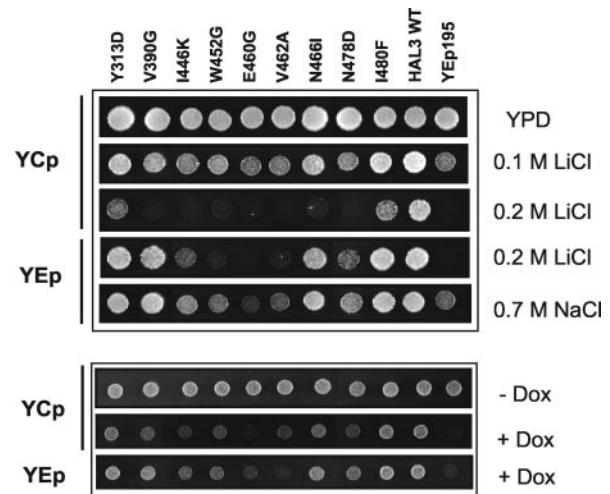


FIG. 4. **Phenotypic effects of the expression of different mutated versions of Hal3.** The indicated versions of Hal3 were introduced as low-copy, centromeric (*YCp*), or high-copy (*YEp*) plasmids in strain JA104 (*hal3*), and the tolerance of the cells to LiCl or NaCl was evaluated after 60 h as in Fig. 1. The same plasmids were used to transform strain JC002 (*sit4 tetO:HAL3*), and growth was monitored after 2 days in the presence or absence of doxycycline (20  $\mu$ g/ml). WT, wild type.

markers associated to the mutations plus the plasmid-born marker gene. These experiments confirm our observation in that the *HAL3* and *VHS3* mutations present synthetic lethality (16) and suggest that the mutation of His<sup>378</sup> affects some function of Hal3, which is required for viability in a *vhs3* background.

The diploid strain carrying any of the five selected mutations within the Hal3 446–480 region was subjected to random spore analysis. Remarkably, in all of the cases we recovered colonies containing the three markers (between 15 and 24% of the total number of spores analyzed), which corresponded to haploid cells in >90% of the cases. In fact, these results were very similar to those obtained in control experiments in which wild type *HAL3* was used. As shown in Fig. 6, these cells grew normally in both synthetic and rich media, indicating that the mutations did not affect the ability of the plasmid-born Hal3 version to allow survival of a *hal3 vhs3* strain. However, when these cells were tested for their tolerance to saline stress, the mutated *HAL3* versions still displayed the loss-of-function phenotype described in a *hal3* background (compare with Fig. 4). These experiments indicate that Hal3 mutations able to abol-



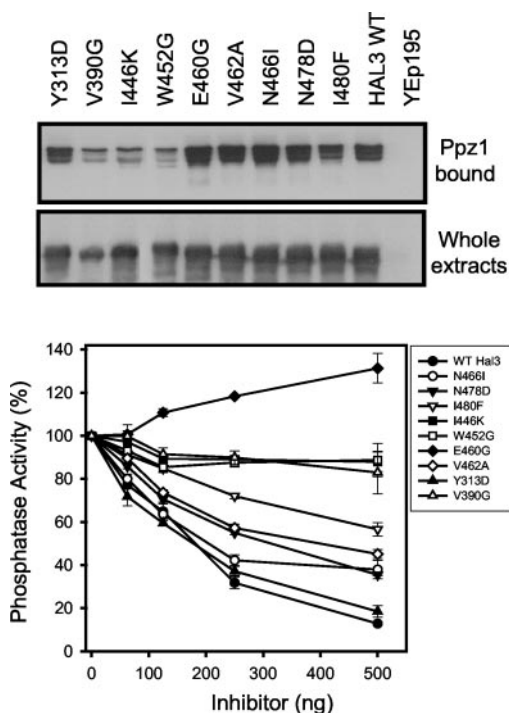


FIG. 5. Ppz1 binding and *in vitro* inhibitory capacity of mutated Hal3 versions identified in the screen. The indicated versions of Hal3 were tested for binding to (upper panel) or inhibitory capacity toward (lower panel) recombinant Ppz1 $\Delta_{1-344}$  as indicated in the legend of Fig. 2.

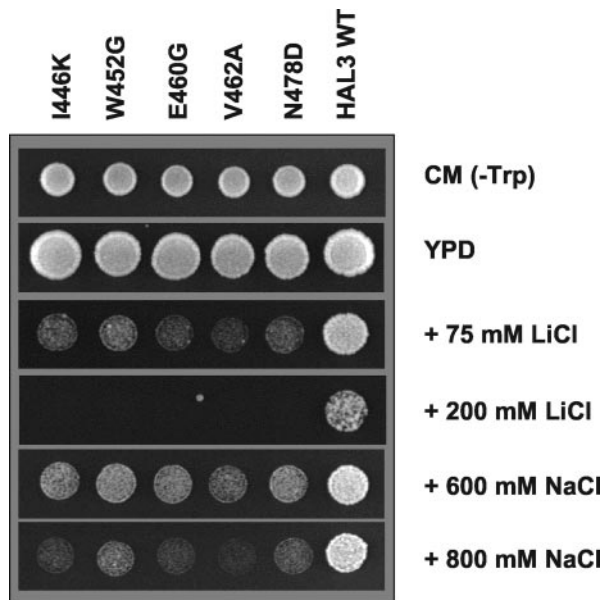


FIG. 6. Complementation of the lethal phenotype of *hal3 vhs3* deletans by Hal3 versions carrying mutations within the 446-478 region. The diploid strain MAR6 was transformed with the indicated versions of Hal3 as a low-copy centromeric plasmid and induced to sporulate. Random spore analysis was performed, and colonies showing markers for both deletions plus the plasmid-born marker gene were selected, recovered, and tested for haploid. Cultures were spotted on the indicated plates and grown for 60 h. WT, wild type.

ish Ppz1 binding or inhibitory capacity do not affect Hal3 functions required in the absence of the *VHS3* gene.

#### DISCUSSION

The biological roles of Hal3 as regulatory subunit of the Ppz1 protein phosphatase have been characterized with some detail in the last few years. However, with the exception of the exist-

ing evidence that Hal3 binds to the catalytic moiety of Ppz1 even more efficiently than to the entire protein (9), suggesting that the amino-terminal half of Ppz1 might play a protective function against inhibition by Hal3, the molecular basis on how this regulatory subunit can bind and inhibit the phosphatase was unknown. Computer analysis of the Hal3 sequence revealed a  $^{263}$ KLHVLV $^{268}$  motif, which resembles the consensus sequence (R/K)X(V/I)X(F/W) defined in many PP1c regulatory subunits (1). In yeast, similar sequences have been identified as relevant for function in several Glc7 regulatory subunits, such as Gac1 (27) or Reg1 (28), providing evidence that the Phe in this motif appears to be crucial for function. Therefore, the existing evidence supported the hypothesis that the Hal3  $^{263}$ KLHVLV $^{268}$  motif could be relevant for Ppz1 interaction. However, we show that mutation of Phe $^{268}$  does not alter the functional properties of Hal3 when tested *in vivo* or significantly affects its capacity to bind and inhibit Ppz1. We find that the change of His $^{265}$  to glycine has some effect on the properties of Hal3, although this is probably due to the drastic modification of the size of the amino acid in this specific position. Therefore, our data do not support the idea that Hal3 and Ppz1 interact through existing Hal3  $^{263}$ KLHVLV $^{268}$  motif.

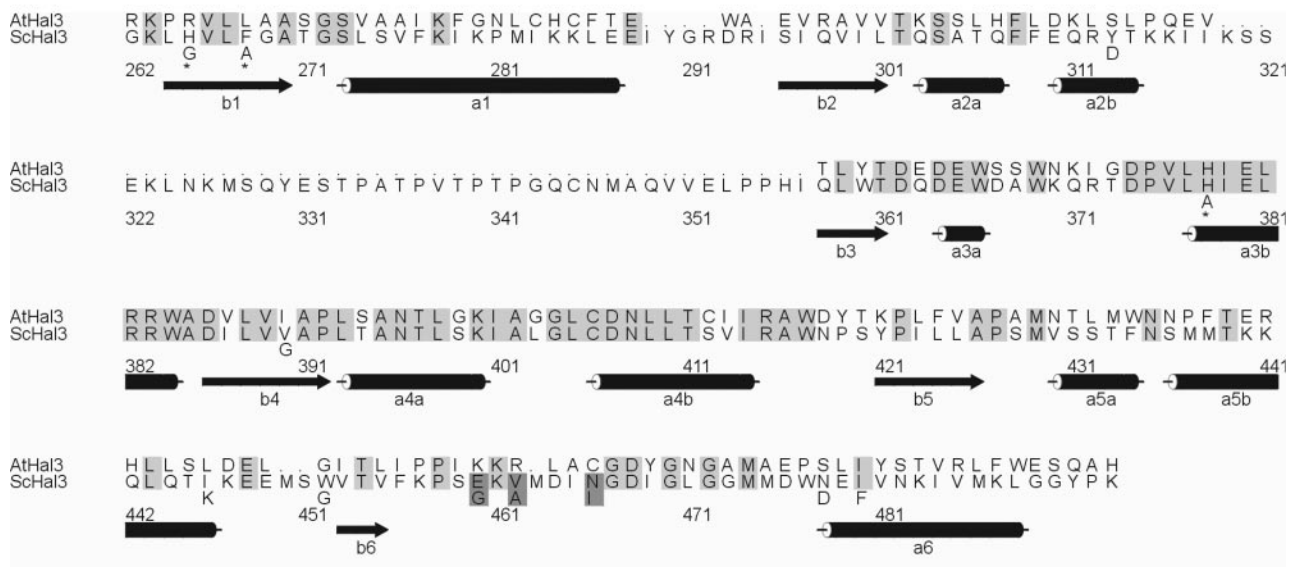
Animals and plants contain proteins related to *S. cerevisiae* Hal3, although they are smaller and lack amino-terminal sequences and the carboxyl-terminal highly acidic tail. The three-dimensional structure of the AtHal3a isoform from *A. thaliana* was solved a few years ago (12), and the protein appears to be a flavoprotein whose structural features allow us to hypothesize that it could catalyze the  $\alpha,\beta$ -dehydrogenation of peptidyl-cysteine and point out His $^{90}$  as a residue potentially important in the reaction. The fact that this His is conserved in *S. cerevisiae* Hal3 (His $^{378}$ ) prompted us to determine whether it was relevant for its cellular function and for interaction with Ppz1. However, our data clearly show that a mutated form of Hal3 lacking His $^{378}$  is indistinguishable from the wild type version in the different test performed and, therefore, it is not relevant for Ppz1 regulation.

Because of the failure to identify relevant regulatory elements in Hal3 by comparison with known PP1c regulatory subunits, we decided to undertake a more direct approach based on a loss-of-function screen of a library of mutagenized Hal3. The region subjected to mutagenesis expanded from Arg $^{256}$  to Ile $^{480}$ , which does not include the acidic tail and corresponds to the region highly conserved between *A. thaliana* and budding yeast Hal3 proteins. It must be noted that we had to establish a control step to check that the expressed versions of Hal3 were full-length proteins, because it was reported that the acidic terminal tail was required for Hal3 function related to halotolerance and cell cycle regulation (7, 8). In fact, our screen uncovered a large number of Hal3 clones unable to provide function that, when sequenced, presented premature stop codons, thus confirming earlier data.

The screen performed on strain JC010 (*slt2/mpk1*) revealed nine residues expanding from Tyr $^{313}$  to Ile $^{480}$  that were relevant for function. Interestingly, the more drastic effects corresponded to changes between Ile $^{446}$  and Asn $^{478}$ , *i.e.* a relatively small region in the vicinity of the acidic tail. A comparison of the functional incidence of these mutations under different phenotypic tests was remarkably consistent, indicating that these effects were mediated through a common mechanism. However, when the effect of these mutations on Ppz1 binding and inhibitory activity was tested, the results were not identical. Some mutations affected binding, and the strongest effects clustered in residues Val $^{360}$ , Ile $^{446}$ , and Trp $^{452}$ . As expected, these mutations also abolished the ability of Hal3 to inhibit Ppz1 *in vitro*. In contrast, mutations affecting Glu $^{460}$  and



A)



B)

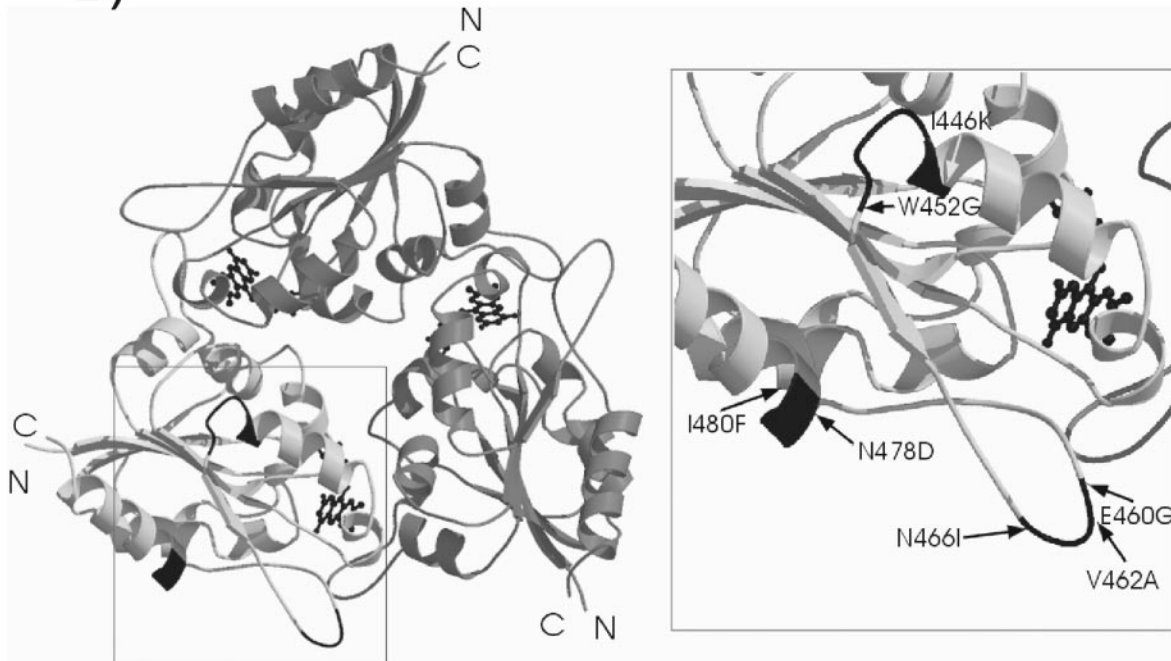


FIG. 7. A, alignment comparing the sequence of AtHal3 and the core domain of yeast Hal3. Residues that are identical are highlighted with a light gray mask. The point mutations are indicated below the Hal3 sequence. Directed mutations are indicated with an asterisk. The predicted secondary structural elements of *S. cerevisiae* Hal3 are also shown. Point mutations not affecting *in vitro* binding to Ppz1 are highlighted with a dark gray mask. B, a ribbon (34) representation of the modeled structure of the core domain of yeast Hal3. Residues from 446 to 452, from 460 to 466, and from 478 to 480 are displayed as a black ribbon. The point mutations are labeled and indicated with arrows in a zoomed area.

Val<sup>462</sup> did not affect Ppz1 binding but resulted in Hal3 proteins fully (Glu<sup>460</sup>) or partially (Val<sup>462</sup>) unable to inhibit Ppz1. It is worth noting the remarkable phenotypes observed for the E460G version. Not only was it unable to complement the absence of wild type Hal3, even in high-copy number, but in some cases it appeared to aggravate the phenotype (see Figs. 3

and 4). A possible explanation for this observation would be that the expression of the E460G Hal3 version may in fact result in increased Ppz1 (and perhaps Ppz2) activity, because although being able to bind endogenous Ppz1 and therefore to displace endogenous Hal3 or the related Vhs3 protein, such binding would not result in effective inhibition of phosphatase

activity. Alternatively, our *in vitro* phosphatase assays support the possibility that interaction of this Hal3 version with Ppz1 might directly result in increased catalytic phosphatase activity. In any case, our results clearly show that the Hal3 structural elements required for Ppz1 binding and inhibition can be independent. This finding allows the understanding of our recently reported observation that the Glc7 inhibitor Ypi1 was able to strongly bind Ppz1 (in this case through a degenerated RVXW-like sequence) with almost negligible effect on its phosphatase activity (21).

It is remarkable that, while the mutagenesis procedure was carried out on a large part of the protein (>220 amino acids), most Hal3 residues necessary for binding and inhibition were restricted to a relatively small region (residues 446–480), indicating that this region has a key role in Hal3 functions involving modulation of Ppz1. Although the three-dimensional structure of *S. cerevisiae* Hal3 has not been solved, modeling calculations for the yeast Hal3 256–480 region against two different libraries for all of the structurally characterized tertiary fold templates (29, 30) suggest with high probability scores that, with the exception of a long insertion of 35 amino acids, the Hal3 256–480 polypeptide would display the three-dimensional structure of the homologous proteins AtHal3 and EpiD (12, 31) (Protein Data Bank codes and sequence identity 1e20 (46%) and 1g63 (26%), respectively). The structure of this group of proteins consists of three protomers, each one folded as a  $\alpha/\beta$  protein. Three FMN groups are located in the interface between those protomers. Fig. 7 shows the alignment of the yeast Hal3 256–480 fragment and AtHal3 and its predicted structure as it is output from the modeling servers. In addition, current analytical ultracentrifugation data using recombinant protein encompassing residues 251–491 (i.e. essentially the same fragment subjected to mutagenesis in this work) support the trimeric structure of the polypeptide (data not shown). As it can be seen in this figure, it is reasonable to use this alignment to predict the position of the point mutations analyzed in this study. As expected, most of the mutations are located in the vicinity of solvent-accessible loop regions; thus, it is likely that they induce a local effect in the surface structure of the protein. On the other hand, V390G is completely buried in the highly conserved hydrophobic core of the protein. Consequently, the observed biochemical properties of this mutant could be caused by an unpredictable effect of several structural changes. Seven of nine single mutants are found in the same area of the macromolecule. This finding suggests a directionality of the interaction between Ppz1 and Hal3. Those seven residues are clustered in three groups. I446K and W452G are located in the loop connecting  $\alpha 5$  and  $\beta 6$ , N478D and I480F are in the  $\text{NH}_2$ -terminal moiety of helix  $\alpha 6$ , and E460G, V462A, and N466I are located around 20 Å apart from the other two groups in an area known as the flap (12, 31). This area has been shown to be unstructured in AtHal3 and EpiD, unless a substrate is bound to the protein (29, 30). Interestingly, the mutations located in the flap do not hinder the interaction with Ppz1, although they inhibit its phosphatase activity. On the other hand, the rest of mutations abolish *in vitro* binding to Ppz1. These findings suggest that yeast Hal3 displays at least two points of interactions with Ppz1 and that regulation of the phosphatase by Hal3 is achieved when both sites are occupied. The Y313D mutation is located close to the above mentioned long insertion of Hal3; thus, it is difficult to predict the effect of the mutation in terms of the modeled structure.

A recent observation in our laboratory is that simultaneous mutation of HAL3 and VHS3 results in a lethal phenotype (16). We report here that His<sup>378</sup> is necessary for complementation of the lethal phenotype. Interestingly, we have observed that

mutation of the equivalent His residue in Vhs3 (His<sup>459</sup>) also abolishes the ability of Vhs3 to allow survival of a *hal3 vhs3* strain (16). In contrast, Hal3 His<sup>378</sup> (as well as Vhs3 His<sup>459</sup>) is dispensable for other Ppz1-related functions, whereas Hal3 residues necessary for Ppz1 inhibition can be mutated and these versions still allow viable *hal3 vhs3* cells. All of these results suggest that Hal3 (and probably Vhs3) may have Ppz1-independent functions. An important issue would be to understand why the mutation of His<sup>378</sup> in Hal3 does not allow the protein to provide Hal3 function in a *hal3 vhs3* mutant. Although at this point we do not know at the molecular level the nature of this genetic interaction as mentioned above, His<sup>378</sup> is the residue equivalent to His<sup>90</sup> in AtHal3a (12). In the plant protein, His<sup>90</sup> has been proposed to play a key role in a  $\alpha,\beta$ -dehydrogenation reaction involving peptidylcysteine. Further work provided evidence that AtHal3a catalyzes *in vitro* the decarboxylation of 4'-phosphopantotenoylcysteine to 4'-phosphopantetheine, raising the possibility that this enzyme could be involved in coenzyme A biosynthesis (13). Therefore, an exciting possibility would be that the *S. cerevisiae* Hal3 (and possibly Vhs3) could act in the CoA biosynthetic pathway. However, molecular characterization of the AtHal3a catalytic mechanisms (14, 33) has revealed a key role for Cys<sup>175</sup>, a residue that is not conserved in Hal3 or Vhs3. Therefore, a hypothetical role of Hal3 or Vhs3 in CoA biosynthesis in *S. cerevisiae*, which would explain the requirement for His<sup>378</sup> for function, seems unlikely.

**Acknowledgments**—We thank Ramón Serrano for providing Hal3 antibodies. The excellent technical assistance of Anna Vilalta and María Jesús Álvarez is acknowledged.

#### REFERENCES

- Cohen, P. T. (2002) *J. Cell Sci.* **115**, 241–256
- Bollen, M. (2001) *Trends Biochem. Sci.* **26**, 426–431
- Posas, F., Casamayor, A., Morral, N., and Arino, J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 11734–11740
- Arino, J. (2002) *Eur. J. Biochem.* **269**, 1072–1077
- Yenush, L., Mulet, J. M., Arino, J., and Serrano, R. (2002) *EMBO J.* **21**, 920–929
- Ruiz, A., Yenush, L., and Arino, J. (2003) *Eukaryot. Cell* **2**, 937–948
- Di Como, C. J., Bose, R., and Arndt, K. T. (1995) *Genetics* **139**, 95–107
- Ferrando, A., Kron, S. J., Ríos, G., Fink, G. R., and Serrano, R. (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**, 5470–5481
- de Nadal, E., Clotet, J., Posas, F., Serrano, R., Gomez, N., and Arino, J. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 7357–7362
- Simon, E., Clotet, J., Calero, F., Ramos, J., and Arino, J. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 29740–29747
- Espinosa-Ruiz, A., Belles, J. M., Serrano, R., and Culiñez-Macia, F. A. (1999) *Plant J.* **20**, 529–539
- Albert, A., Martínez-Ripoll, M., Espinosa-Ruiz, A., Yenush, L., Culiñez-Macia, F. A., and Serrano, R. (2000) *Struct. Fold. Des.* **8**, 961–969
- Kupke, T., Hernandez-Acosta, P., Steinbacher, S., and Culiñez-Macia, F. A. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 19190–19196
- Steinbacher, S., Hernandez-Acosta, P., Bieseler, B., Blaesse, M., Huber, R., Culiñez-Macia, F. A., and Kupke, T. (2003) *J. Mol. Biol.* **327**, 193–202
- Munoz, I., Simon, E., Casals, N., Clotet, J., and Arino, J. (2003) *Yeast* **20**, 157–169
- Ruiz, A., Munoz, I., Serrano, R., Gonzalez, A., Simon, E., and Arino, J. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 34421–34430
- Goldberg, J., Huang, H. B., Kwon, Y. G., Greengard, P., Nairn, A. C., and Kuriyan, J. (1995) *Nature* **376**, 745–753
- Egloff, M. P., Cohen, P. T., Reinemer, P., and Barford, D. (1995) *J. Mol. Biol.* **254**, 942–959
- Egloff, M. P., Johnson, D. F., Moorhead, G., Cohen, P. T., Cohen, P., and Barford, D. (1997) *EMBO J.* **16**, 1876–1887
- Zhao, S., and Lee, E. Y. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 28368–28372
- García-Gimeno, M. A., Munoz, I., Arino, J., and Sanz, P. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 47744–47752
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Gietz, R. D., and Sugino, A. (1988) *Gene (Amst.)* **74**, 527–534
- Fromant, M., Blanquet, S., and Plateau, P. (1995) *Anal. Biochem.* **224**, 347–353
- Posas, F., Camps, M., and Arino, J. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 13036–13041
- Treco, D. A., and Winston, F. (1998) in *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K., eds) pp. 13.2.10–13.2.11, John Wiley & Sons, Inc., New York
- Wu, X., Hart, H., Cheng, C., Roach, P. J., and Tatchell, K. (2001) *Mol. Genet. Genomics* **265**, 622–635

28. Dombek, K. M., Voronkova, V., Raney, A., and Young, E. T. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 6029–6040
29. Shi, J., Blundell, T. L., and Mizuguchi, K. (2001) *J. Mol. Biol.* **310**, 243–257
30. Kelley, L. A., MacCallum, R. M., and Sternberg, M. J. (2000) *J. Mol. Biol.* **299**, 499–520
31. Blaesse, M., Kupke, T., Huber, R., and Steinbacher, S. (2000) *EMBO J.* **19**, 6299–6310
32. de Nadal, E., Fadden, R. P., Ruiz, A., Haystead, T., and Arino, J. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 14829–14834
33. Hernandez-Acosta, P., Schmid, D. G., Jung, G., Cullanez-Macia, F. A., and Kupke, T. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 20490–20498
34. Kraulis, P. J. (1991) *J. Appl. Crystallogr.* **24**, 946–950
35. Vissi, E., Clotet, J., de Nadal, E., Barcelo, A., Bako, E., Gergely, P., Dombradi, V., and Arino, J. (2001) *Yeast* **18**, 115–124

## Molecular Characterization of Ypi1, a Novel *Saccharomyces cerevisiae* Type 1 Protein Phosphatase Inhibitor\*

Received for publication, June 11, 2003, and in revised form, September 23, 2003  
Published, JBC Papers in Press, September 23, 2003, DOI 10.1074/jbc.M306157200

Maria Adelaida García-Gimeno‡§, Iván Muñoz¶||, Joaquín Ariño¶, and Pascual Sanz‡\*\*

From the ‡Instituto de Biomedicina de Valencia Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Jaime Roig 11, 46010-Valencia, Spain and ¶Departament Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193-Bellaterra, Barcelona, Spain

**The *Saccharomyces cerevisiae* open reading frame YFR003c encodes a small (155-amino acid) hydrophilic protein that we identified as a novel, heat-stable inhibitor of type 1 protein phosphatase (Ypi1). Ypi1 interacts physically *in vitro* with both Glc7 and Ppz1 phosphatase catalytic subunits, as shown by pull-down assays. Ypi1 inhibits Glc7 but appears to be less effective toward Ppz1 phosphatase activity under the conditions tested. Ypi1 contains a <sup>48</sup>RHNVRW<sup>53</sup> sequence, which resembles the characteristic consensus PP1 phosphatase binding motif. A W53A mutation within this motif abolishes both binding to and inhibition of Glc7 and Ppz1 phosphatases. Deletion of *YPI1* is lethal, suggesting a relevant role of the inhibitor in yeast physiology. Cells overexpressing Ypi1 display a number of phenotypes consistent with an inhibitory role of this protein on Glc7, such as decreased glycogen content and an increased growth defect in a *slt2/mpk1* mitogen-activated protein kinase-deficient background. Taking together, these results define Ypi1 as the first inhibitory subunit of Glc7 identified in budding yeast.**

In eukaryotic organisms, protein phosphatases play a key role in the control and integration of cellular physiology. Among them, type 1 protein phosphatases (PP1)<sup>1</sup> regulate a great variety of physiological processes in the cell such as carbohydrate and lipid metabolism, protein synthesis, and cell cycle progression (1–3).

The PP1 catalytic subunit (PP1c) is highly conserved throughout evolution. In most eukaryotes, several isoforms have been described (*i.e.* four in mammals), although in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* only one PP1c is present, named Glc7, which is essential for cell viability (4, 5). Similar to its mammalian counterpart, Glc7 participates in the regulation of many different cellular processes such as glycogen metabolism, glucose repression, ion homeostasis, mitosis, meiosis, sporulation, vacuole fusion, endocytosis, polyadenylation termination, and cell wall integrity (6–14).

\* This work was supported by Grants BMC2002-00208 (to P. S.) and BMC2002-04011-C05-04 (to J. A.) from the Spanish Ministry of Science and Technology (MCyT) and Fondo Europeo de Desarrollo Regional and by an "Ajut de Suport als Grups de Reserca de Catalunya" (2001SGR00193) (to J. A.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ Supported by a contract from MCyT (Spain).

|| Supported by a fellowship from MCyT (Spain).

\*\* To whom correspondence should be addressed. Tel.: 3496-3391779; Fax: 3496-3690800; E-mail: sanz@ibv.csic.es.

<sup>1</sup> The abbreviations used are: PP1, type 1 protein phosphatase; PP2A, type 2A protein phosphatase; GST, glutathione S-transferase; HA, hemagglutinin epitope; SC, synthetic complete.

PP1c functional versatility can be achieved due to the existence of several regulatory subunits that act either targeting PP1c to different subcellular compartments and/or substrates, conferring substrate specificity or modulating enzymatic activity (15, 16). To date, more than 45 *bona fide* or putative PP1c-regulating subunits have been defined in higher eukaryotes (15–17). These subunits are structurally quite different, but almost all of them present a consensus binding motif (R/K)(V/I)X(F/W) necessary for PP1c regulation, which can also account for the mutually exclusive binding of the different subunits to PP1c (15–20).

PP1c activity is essential but must be tightly controlled, since overexpression or hyperactivation of PP1c phosphatase is also deleterious to the cell. Consequently, a large number of physiological inhibitors of PP1c have been identified in higher eukaryotes (15–17, 21). Among them, inhibitor-1 and inhibitor-2 are of special interest because they represent two different ways of inhibiting PP1c phosphatase activity. Inhibitor-1 and its structural homologue DARPP-32 require phosphorylation by the cAMP-dependent protein kinase A to gain PP1c-inhibitory capacity. In contrast, inhibitor-2 inhibits PP1c only in its dephosphorylated form (16, 21–23). Most of the PP1c inhibitors present the consensus PP1c binding motif described above, but several reports have shown that the association of inhibitory proteins to PP1c may involve additional contacts (23–26).

Mammalian inhibitor-1 and inhibitor-2 can also inhibit the yeast PP1 phosphatase Glc7 (25, 27, 28). However, no yeast homologue of inhibitor-1 has been described yet, and the yeast homologue of mammalian inhibitor-2, Glc8 (29), functions as an activator rather than as an inhibitor of Glc7 (30). Recently, in a two-hybrid screening of a human brain cDNA library searching for potential mammalian PP1c regulatory proteins, a novel PP1 inhibitor, namely inhibitor-3, was identified. This protein shared 21% identity with a protein of unknown function encoded by the yeast *YFR003c* open reading frame (31). It was also demonstrated by two-hybrid analysis that the Yfr003c protein could interact with Glc7 (32–34). Therefore, this protein could be a good candidate for an endogenous inhibitor of Glc7 phosphatase activity.

Ppz1 and Ppz2 are PP1-related phosphatases involved in saline tolerance, cell wall integrity, cell cycle progression, and protein translation regulation, and, very recently, they have also been related to regulation of K<sup>+</sup> and pH homeostasis (35, 36). Among them, Ppz1 appears to be more relevant than Ppz2 in regulating the functions mentioned above (35). Recent results indicate that Ppz phosphatases and Glc7 might have overlapping functions to some extent and that Ppz1 shares a subset of Glc7 regulatory subunits to fulfill its function (37). Interestingly, the Yfr003c protein has also been reported to interact with Ppz1 in a two-hybrid analysis (37). In this sense,



TABLE I  
Strains used in this work

Name of strain	Genotype	Reference
FY250	MAT $\alpha$ <i>his3 leu2 trp1 ura3</i>	45
MCY3000	FY250 <i>glc7-T152K</i>	45
M5	MAT $\alpha$ /MAT $\alpha$ <i>his4+</i> <i>leu2/leu2 trp1/trp1 ura3/ura3</i>	63
JA100	MAT $\alpha$ <i>his4 leu2 trp1 ura3 can-1r</i>	49
JA110	JA100 <i>sit4::TRP1</i>	49
JC002	JA100 <i>sit4::TRP1 tetO:HAL3</i>	55
JC10	JA100 <i>mpk1::LEU2</i>	64

Yfr003c could also be a good candidate for an inhibitor of Ppz1 phosphatase activity in the same way as Hal3, a specific inhibitor of this type of phosphatases (38), which appears to regulate all known functions of Ppz1 (35).

In this report, we provide both *in vitro* and *in vivo* evidence demonstrating that the protein encoded by *YFR003c* is an inhibitor of the type 1 protein phosphatase Glc7 and, to some extent, perhaps of Ppz1. Hence, we propose the name Ypi1 (for yeast phosphatase inhibitor 1) for this protein.

#### MATERIALS AND METHODS

**Strains and Culture Conditions**—*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  was used as the recipient cell for all plasmids and constructions. Yeast strains used in this work are listed in Table I. The *ypi1* $\Delta$  heterozygous null mutant was constructed using a diploid strain, M5 (see Table I), by a one-step short flanking kanamycin disruption method (39). The disruption cassette was generated by PCR using as template plasmid pFA6a-kanMX4 and primers YFRdel-1 and YFRdel-2 (see below). In this way, we disrupted by homologous recombination the complete *YPI1* (*YFR003c*) open reading frame (from +1 ATG to the stop codon) in one of the two wild type alleles of the diploid. Mutants were confirmed by genomic PCR analyses using specific nucleotides for the wild type allele (oligonucleotides YFR-1 and YFR-2) and for the disrupted allele (oligonucleotides YFRPR-1, outside the disruption cassette, and YFRdel-2, inside the *KanMX4* selection marker). Tetrad analysis was performed by standard methods, and the presence of the disruption cassette in the viable spore progeny was scored by its associated phenotype (growth in YPD containing 200  $\mu$ g/ml Geneticin plates).

Standard methods for genetic analysis and transformation were used. Yeast cultures were grown in rich medium (YPD) or synthetic complete (SC) medium lacking appropriate supplements to maintain selection for plasmids (40), containing the indicated carbon sources. *slt2/mpk1* $\Delta$  mutants were selected on plates containing 1 M sorbitol.

**Oligonucleotides**—The following oligonucleotides were used in the present study: YFR-1, GTCTGAATTCATGAGTGAAATCAATGG; YFR-2, TTTCGTCGACCAAAGCCTCAGTCCTTC; YFRPR-1, CCGGAATTCCTCGGTACCCGATTGAGGCATC; YFRdel-1, TGCCAGGAGTGTGCGAGCTAAGTCTTCAATTAAGTCTATAAGGATGCGTACGCTGCAGGTCGAC; YFRdel-2, TTGCTGCTCATCGAATATTTTGGCTTTCGTTGTACAAAGCCTCAATCGATGAATTCGAGCTCG; YFRW53A-1, CTACAAGGCACAAATGTAAGAGcctGAAGAAAATGTGATTGACAAATG; YFRW53A-2, CATTGTCAATCACATTTTCTCagcTCTTACATTGTGCCCTGTAG. New restriction sites are underlined. The ATG initiating codon is denoted in boldface type. Mutated codons are in lowercase letters.

**Plasmids**—All plasmids containing the *YPI1* (*YFR003c*) open reading frame were constructed by inserting the PCR-derived open reading frame (from +1 ATG to the stop codon) obtained using primers YFR-1 and YFR-2 and genomic DNA from strain FY250 as template. The PCR product was sequenced to confirm that no modifications were introduced by the *Taq* polymerase. The PCR product was subcloned into the EcoRI and SalI sites of the plasmids used in this work: pWS93 (41), to tag Ypi1 protein with 3 $\times$  HA epitopes (plasmid pWS-Ypi1); pGEX-6P-1 (Amersham Biosciences) to express a GST-Ypi1 fusion protein in *E. coli* (plasmid pGEX-Ypi1); and pUC18 (plasmid pUC-Ypi1).

The *YPI1*(W53A) mutant form was obtained using the QuikChange site-directed mutagenesis kit from Stratagene (La Jolla, CA). Plasmid pUC-Ypi1 was used as template in the PCRs using oligonucleotides YFRW53A-1 and YFRW53A-2 described above. The appearance of a new restriction site, AluI, was used to select the putative mutant, which was fully sequenced to check for the correct introduction of the mutation and the absence of unwanted changes. The plasmid obtained was called

pUC-Ypi1W53A. An EcoRI-SalI fragment from pUC-Ypi1W53A was subcloned into pWS93 and pGEX-6P-1 to express the mutated protein in yeast (plasmid pWS-Ypi1W53A) and *E. coli* (plasmid pGEX-Ypi1W53A), respectively.

The construction of an N-terminally deleted ( $\Delta$ 1–344) form of Ppz1, containing only the catalytic domain, as a GST fusion in plasmid pGEX-KT has been described previously (42). GST-Glc7 was obtained from Dr. C. S. Chan (29). GST-Hal3 was obtained by subcloning an EcoRI-XhoI fragment from plasmid YPGE15 (36) into pGEX6P-1. High copy expression of *HAL3* in yeast (plasmid pHAL3) was accomplished by cloning a 3.2-kbp EcoRI-HindIII genomic fragment containing the entire gene into the same sites of plasmid YEplac195 (43).

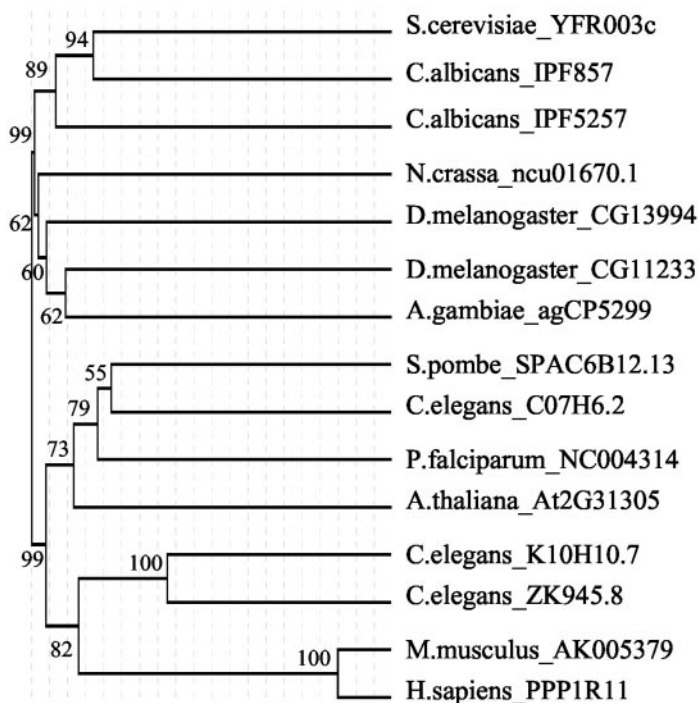
**Expression of Recombinant Proteins in *E. coli***—Purification of the fusion proteins GST-Glc7, GST-Ppz1 $_{\Delta$ 1–344, GST-Ypi1, GST-Ypi1W53A, and GST-Hal3 was carried out as described in Ref. 44, with some modifications. *E. coli* transformants harboring the different GST fusions were grown in 500 ml of LB/ampicillin, supplemented with 0.5 mM MnCl $_2$  only for purification of GST-Glc7 and GST-Ppz1 $_{\Delta$ 1–344. Transformants were grown at 37 °C until the absorbance at 600 nm reached a value of about 0.3. Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside was then added to a concentration of 0.1 mM, and cultures were grown overnight at 25 °C. Cells were harvested and resuspended in 20 ml of sonication buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 0.2 mM EGTA, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 0.1% Triton X-100, 2 mM dithiothreitol, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and complete protease inhibitor mixture (Roche Applied Science)). This buffer was made 2 mM MnCl $_2$  when purifying GST-Glc7 and GST-Ppz1 $_{\Delta$ 1–344 fusion proteins. Cells were disrupted by sonication, and the fusion proteins were purified by passing the extracts through a 1-ml bed volume of glutathione-Sepharose columns (Amersham Biosciences). To remove the GST moiety from GST fusions to Ypi1 and Ypi1W53A, the fusion proteins bound to the glutathione-Sepharose beads were treated with PreScission Protease (Amersham Biosciences) during 4–5 h at 4 °C following the manufacturer's instructions. GST-Glc7, GST-Ppz1 $_{\Delta$ 1–344, GST-Hal3, and GST proteins were eluted from the column with 10 mM glutathione. Samples were stored at –80 °C.

**Pull-down Assays and Immunoblot Analysis**—Preparation of yeast protein extracts for pull-down assays was essentially as described previously (45). Extraction buffer was 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 1 mM dithiothreitol, and 10% glycerol and contained 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and complete protease inhibitor mixture (Roche Applied Science). The *E. coli* protein extracts were prepared as described above. Pull-down assays were carried out as follows. Fusion proteins (GST-Glc7 and GST-Ppz1 $_{\Delta$ 1–344) made in *E. coli* were allowed to bind to glutathione-Sepharose (Amersham Biosciences) affinity matrix for 1 h at 4 °C with gentle shaking. Then the beads were washed four times with extraction buffer (see above). Yeast extracts (500  $\mu$ g) were then incubated with the beads for an additional 1 h at 4 °C and again washed four times with extraction buffer. Proteins retained by the affinity system were detected by SDS-PAGE followed by immunoblot using anti-GST polyclonal (Amersham Biosciences) or anti-HA monoclonal (Roche Applied Science) antibodies and chemiluminescence reagents (ECL; Amersham Biosciences).

**Protein Phosphatase Assays**—Protein phosphatase activity using *p*-nitrophenylphosphate as substrate was determined essentially as described in Ref. 46. The reaction buffer was 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 mM EGTA, 2 mM MnCl $_2$ , and 1 mM dithiothreitol. Samples were incubated for 10 min at 30 °C, and then the reaction was stopped by adding 1% Tris (final concentration). For phosphatase inhibition assays, different amounts of the purified inhibitors were incubated with the purified phosphatases during 5 min at 30 °C, prior to the addition of *p*-nitrophenylphosphate.

Alternatively, we used the N-terminal domain of the Reg1 protein tagged with HA (HA-Reg1 $_{1-443}$ ) as endogenous protein substrate. This protein showed a clear change in electrophoretic mobility after shifting cells from medium containing high (4%) glucose to low (0.05%) glucose, due to phosphorylation of the protein (45). Since Reg1 is dephosphorylated by Glc7 in response to glucose, for these assays we used the mutant allele *glc7-T152K* (strain MCY3000), which is defective in dephosphorylating Reg1 (45). MCY3000 transformants expressing HA-Reg1 $_{1-443}$  were grown until exponential phase ( $A_{600}$  around 0.4–0.7) in SC medium containing 4% glucose as carbon source, and shifted to a medium containing 0.05% glucose during 20 min. Cells were then harvested, and yeast crude extract was obtained as described above. One  $\mu$ g of this extract was incubated for 20 min at 30 °C with 1.8  $\mu$ g of GST-Glc7 or GST-Ppz1 $_{\Delta$ 1–344 in a buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 mM EGTA, 2 mM MnCl $_2$ , and 1 mM dithiothreitol. The reaction was stopped by boiling the samples for 3 min in electrophoresis sample buffer. Then the phosphorylation status of HA-Reg1 $_{1-443}$  was analyzed by SDS-

A)



B)

Accession Number	Protein name	Sequence	Protein length
BAA09242	Sc YFR003c	45 MPTRHNVR <b>W</b> EENVIDNENMNKKKTKICCFHPQNEDEE	82 (155)
CAB11073	Sp SPAC6B12.13	40 PEPVRRVR <b>W</b> TVSTVDNEHMNKKKSKVCCI FHKQRKFDE	77 (104)
CAB91259	Nc ncu01670.1	41 HSNGRSVQ <b>W</b> RSDDVDNEGLGRKKSKVCCIYHRPKGVD	78 (186)
Ca5351	Ca IPF857	30 ERQARDVS <b>W</b> DANVVDNEHLNKKTKICCFHPSPDRNCD	67 (124)
Ca5368	Ca IPF5257	50 KKKAPKVR <b>W</b> TETGTVDNEHMNKKKTKICCFHPQRSFDE	87 (147)
NP_700784	Pf NC004314	37 LAPQKVV <b>W</b> DENTIDNENAQKKSSKVCCIYHKPKNFGE	74 (96)
AAK85440	Ce C07H6.2	40 TSERRHV <b>W</b> ATEVVDNEGMGKKKSKCCCIYKPKNWQD	77 (107)
CAB05783	Ce K10H10.7	32 PPSPPHVT <b>W</b> AEGVVDNEHMGRLKSNCCCIYVAPRQWDD	69 (132)
CAA88441	Ce ZK945.8	26 PVERPRVT <b>W</b> GAGVIDNEHMGRLKSNCCCIYTPPRVWDD	63 (109)
AAF52335	Dm CG13994	45 PRNERRVA <b>F</b> HAGIIDNEHLNRKSKCCCIYKPLAFGE	82 (163)
AAF50877	Dm CG11233	67 PITERHV <b>F</b> HAGVIDNEHMNRKSKCCCIYRKPFPFGE	104 (210)
EAA02915	Ag agCP5299	70 PRNGKKV <b>W</b> TNGTVDNEHMNKKKSKCCCIYVKPRAFGE	107 (178)
AAM15305	At At2G31305	35 NRKKKVS <b>W</b> KDGTVDNEFMQKKSSKCCIFHRQKPFDE	72 (107)
BAB23986	Mm AK005379	40 RKPEKKV <b>W</b> SSDVTVDNEHMGRRSSKCCCIYEKPRAFGE	77 (131)
CAC16920	Hs PPP1R11	35 RKPEKKV <b>W</b> TSDTVVDNEHMGRRSSKCCCIYEKPRAFGE	72 (126)

Consensus

::\* : :\*\*\*\* : : : :\*\*\*\*: : : :

FIG. 1. **Ypi1 (Yfr003c) is conserved throughout all eukaryotes.** A, phylogenetic tree of Ypi1 protein homologues. Multiple alignments and a phylogenetic tree of all of the Ypi1 homologues was generated using the Genebee service (available on the World Wide Web at www.genebee.msu.su). The name of the corresponding protein is written on the right of the respective organism. The numbers given above the branches indicate the percentages of 100 bootstrap resampled data sets supporting the clade to the right of the branch. B, a BLAST analysis (65) was performed to identify proteins having significant homology with the central domain of Ypi1 protein. GenBank™ accession numbers for the corresponding proteins are shown on the left. Sc, *S. cerevisiae*; Sp, *Schizosaccharomyces pombe*; Nc, *Neurospora crassa*; Ca, *Candida albicans*; Pf, *Plasmodium falciparum*; Ce, *Caenorhabditis elegans*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Ag, *Anopheles gambiae*; At, *Arabidopsis thaliana*; Mm, *Mus musculus*; Hs, *Homo sapiens*. The numbers indicate the positions in the corresponding protein where the homologous sequence begins and ends. Protein length in amino acids is indicated on the right. The Glc7 binding motif is indicated with a solid line, and the tryptophan residue involved in Glc7 binding is denoted in boldface type.

PAGE and immunoblot. When potential phosphatase inhibitors were assayed, different amounts of the purified inhibitors were incubated with the purified phosphatases during 5 min at 30 °C, prior to the addition of the yeast crude extract.

**Measurement of Glycogen Content**—Wild type strain JA100 containing plasmids pWS93 or pWS-Ypi1 were grown on YPD until the indicated absorbance at 660 nm and then ~200 mg (wet weight) of fresh cells were collected by filtration. Cells were disrupted, and glycogen was

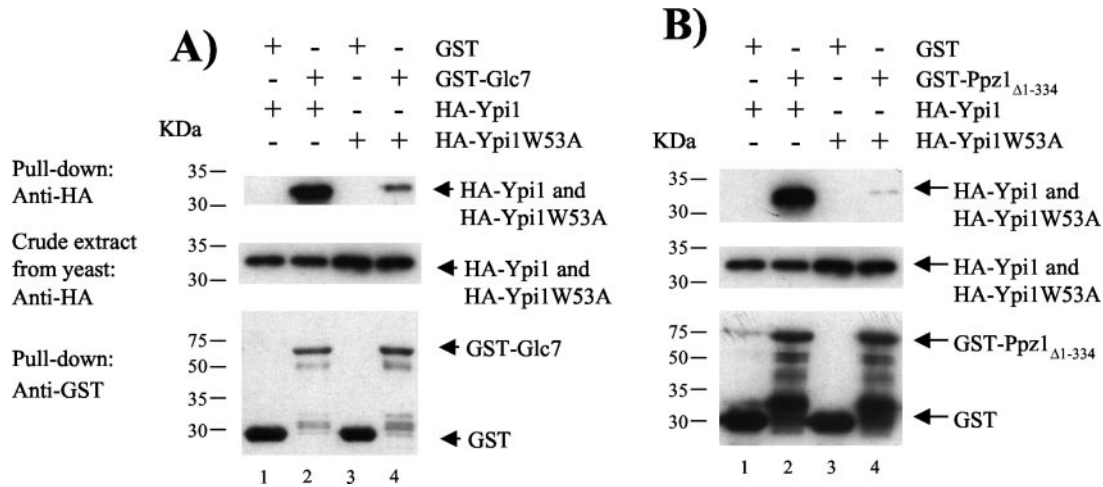


FIG. 2. Ypi1 interacts physically with Glc7 and Ppz1 protein phosphatases. A, pull-down assays between Glc7 phosphatase and different forms of Ypi1. Bacterial crude extracts (500  $\mu$ g) prepared from *E. coli* DH5 $\alpha$  expressing GST-Glc7 or GST were used to purify these proteins with GSH-Sepharose. Yeast crude extracts (500  $\mu$ g), prepared from FY250 cells growing in glucose and expressing HA-Ypi1 (plasmid pWS-Ypi1) or HA-Ypi1W53A (plasmid pWS-Ypi1W53A), were added to the purified GST-Glc7 or GST proteins. Proteins that co-purified with GST-Glc7 and GST were analyzed by SDS-PAGE and immunodetected with anti-HA monoclonal (upper panel) or anti-GST-polyclonal (lower panel) antibodies. Proteins in the yeast crude extracts (1  $\mu$ g) were also immunodetected with anti-HA antibodies (middle panel). Size standards are indicated in kDa. B, pull-down assays between truncated Ppz1 $_{\Delta 1-344}$  phosphatase and different forms of Ypi1. Bacterial crude extracts (500  $\mu$ g) prepared from *E. coli* DH5 $\alpha$  expressing GST-Ppz1 $_{\Delta 1-344}$  were used as described for A.

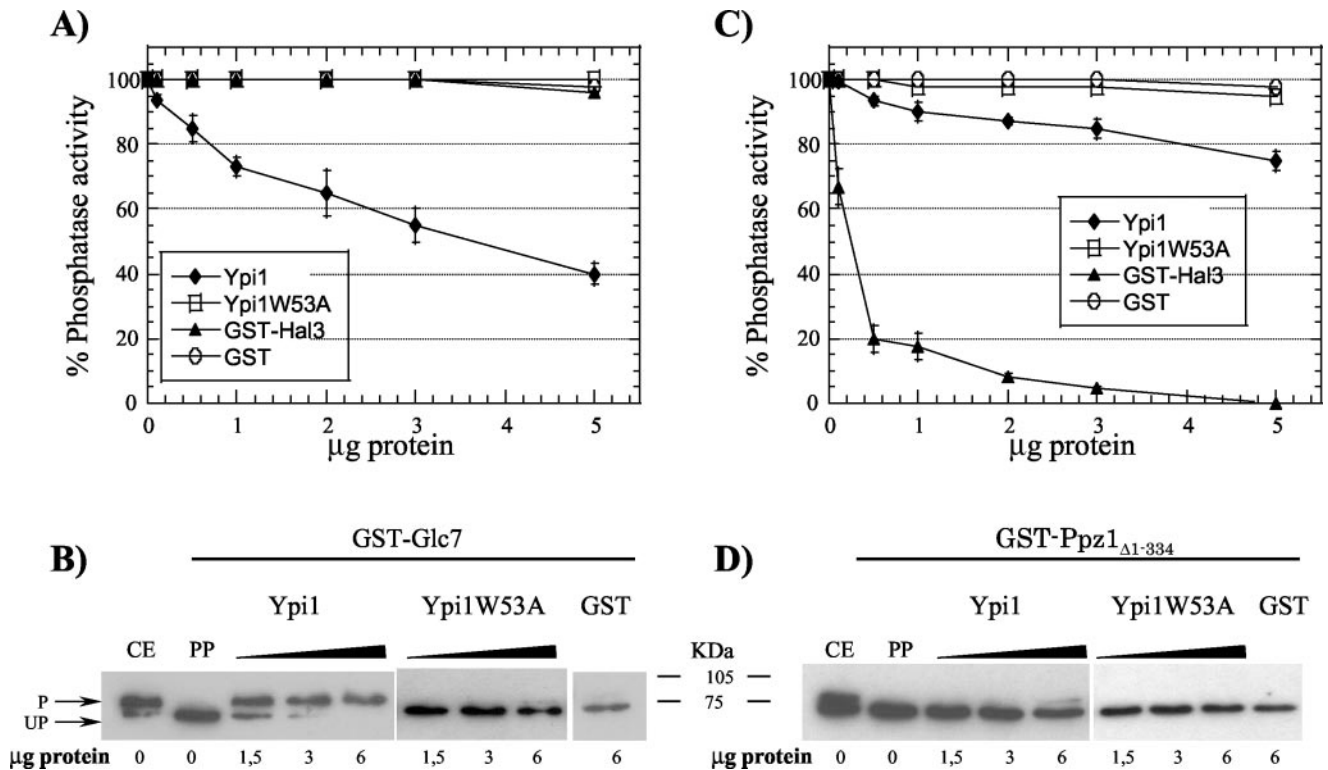


FIG. 3. Inhibition of Glc7 and Ppz1 phosphatase activities by Ypi1. A and C, *p*-nitrophenyl phosphate dephosphorylation assays were carried out as described under "Materials and Methods." 1.8  $\mu$ g of purified GST-Glc7 (A) or GST-Ppz1 $_{\Delta 1-344}$  (C) were incubated in the presence of *p*-nitrophenylphosphate (40 mM) as substrate. Increasing amounts of purified Ypi1 (diamonds), Ypi1W53A (squares), GST-Hal3 (triangles), or GST (circles) proteins were added to the reaction mixture. Values are means  $\pm$  S.D. for at least three different assays, expressed as percentage of phosphatase activity with respect to control without inhibitors. B and D, HA-Reg1 $_{1-443}$  dephosphorylation assays. MCY3000 cells expressing HA-Reg1 $_{1-443}$  were grown in high glucose (4%) medium and shifted 20 min to low glucose medium (0.05%). Crude extracts were then obtained, and 1  $\mu$ g was incubated for 20 min at 30  $^{\circ}$ C in the absence (lane CE) or presence of 1.8  $\mu$ g of purified GST-Glc7 (B) or GST-Ppz1 $_{\Delta 1-344}$  (D) (lanes PP). One  $\mu$ g of this extract was also preincubated for 5 min at 30  $^{\circ}$ C with increasing amounts of purified Ypi1, Ypi1W53A, or GST proteins prior to the addition of the corresponding phosphatases. Reaction mixtures were then incubated for 20 min at 30  $^{\circ}$ C. Samples were analyzed by SDS-PAGE (7%) and immunodetected with anti-HA monoclonal antibody. Size standards are indicated in kDa. Shown are phosphorylated (P) and unphosphorylated (UP) forms of HA-Reg1 $_{1-443}$ .

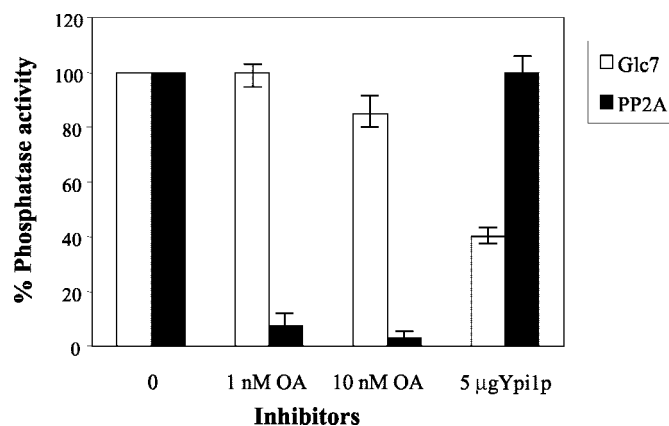
measured essentially as in Ref. 47. Glucose released by glycogen hydrolysis was measured using a glucose-oxidase-based commercial kit.

**Phenotypic Analyses and Other Techniques**—The effect of the overexpression of Ypi1 was monitored on plates by "drop tests" as previously described (48). Briefly, cells were grown on SC medium lacking uracil

for ~48 h, and absorbance at 660 nm was measured and adjusted to 0.05. Serial dilutions (1:5) were made, and 3  $\mu$ l of each dilution was deposited on the indicated culture media.

To monitor recovery from  $\alpha$ -factor arrest, strain JA110 (*sit4*) was transformed with plasmid pWS93 or pWS-Ypi1, and cells were grown





**FIG. 4. PP2A phosphatase activity is not inhibited by Ypi1.** *p*-Nitrophenyl phosphate dephosphorylation assays were carried out as described under "Materials and Methods." 1.8 µg of GST-Glc7 (empty bars) or 30 ng of PP2A (solid bars) were incubated in the presence of *p*-nitrophenylphosphate (40 mM) as substrate. The indicated amounts of Ypi1 or okadaic acid were added prior to the incubation with the phosphatases. Values are means ± S.D. for at least three different assays, expressed as a percentage of phosphatase activity with respect to control without inhibitors.

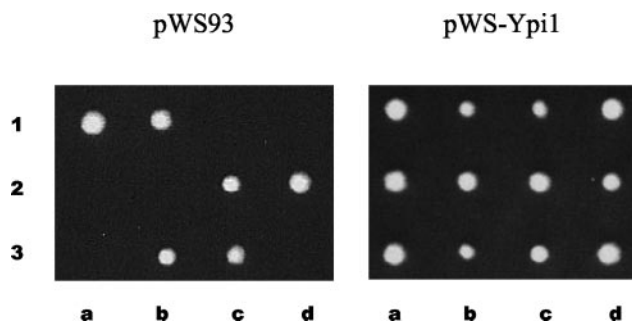
until an absorbance at 660 nm of 0.6 was reached. Recovery from a factor arrest was performed as in Ref. 49. Budding index was monitored as in Ref. 49, and DNA content was determined by flow cytometry as in Ref. 50.

## RESULTS

*Yfr003c* Belongs to a Highly Conserved Family of Proteins Including a PP1 Protein Phosphatase Inhibitor—*YFR003c* encodes a small protein (155 residues; 18 kDa, estimated molecular mass) very rich in hydrophilic residues (Asp + Glu content 19.4%; Ser + Thr content 14.8%; Lys + Arg content 16.8%) that shows an aberrant mobility in SDS-PAGE (it runs as a protein of around 30 kDa) and that is heat-stable (see below). All of these properties make this protein very similar to PP1 phosphatase inhibitors described in mammalian cells (16, 17). A protein BLAST analysis revealed that *Yfr003c* was highly homologous to a family of small proteins, one of which has been described as PP1 phosphatase inhibitor (Fig. 1). In fact, *Yfr003c* was previously postulated as the putative yeast homologue of mammalian PP1 inhibitor-3 (31). It is also important to notice that *Yfr003c* was strongly conserved throughout all eukaryotes, with homologues in yeast, insects, plants, worms, and mammals. Fig. 1A shows a phylogenetic tree of all of the *Yfr003c* homologues using the Genebee service (available on the World Wide Web at [www.genebee.msu.su](http://www.genebee.msu.su)).

*The Yfr003c Gene Product Interacts Physically with Glc7 and the PP1-related Phosphatase Ppz1*—The yeast protein encoded by *YFR003c* (hereafter referred to *YPI1*, for yeast phosphatase inhibitor 1) was initially identified in a two-hybrid screening searching for Glc7-interacting proteins using LexA-Glc7 as bait (32). Yeast two-hybrid global analyses have also shown protein-protein interaction between Ypi1 and Glc7 (33, 34). To verify this interaction by an alternative experimental approach, we used an affinity pull-down assay system based on the expression of a GST-Glc7 fusion protein in bacteria. Purified GST-Glc7 was then used to bind HA-tagged-Ypi1 expressed in yeast cells. As shown in Fig. 2A (lane 2), HA-Ypi1 was detected in the fraction retained by GST-Glc7, corroborating the specific interaction between Glc7 and Ypi1. These results were in agreement with those presented recently on the interaction of *Yfr003c* (Ypi1) and Glc7 by affinity precipitation (51).

It has also been described that Ypi1 interacted in a two-hybrid analysis with the PP1-related phosphatase Ppz1 (37). To confirm this interaction, we performed a pull-down assay



**FIG. 5. Ypi1 is essential for cell viability.** Heterozygous M5 diploids containing one copy of the *ypi1::KanMX4* disrupted allele were transformed with either an empty plasmid (pWS93) or with pWS-Ypi1, which allowed overexpression of Ypi1. Transformants were sporulated, and at least 10 tetrads were dissected for each transformant. Spore progeny was allowed to grow on YPD-rich medium. Viable spores were grown also in YPD plus 200 µg/ml Geneticin and SC medium lacking uracil to score for the presence of the *KanMX4* and *URA3* selection markers in each spore. The progeny of three representative tetrads from each transformant growing in YPD is shown.

using a GST-Ppz1<sub>Δ1-344</sub> fusion protein expressed in *E. coli*. This carboxyl-terminal domain of Ppz1 phosphatase expressed in bacteria has similar catalytic properties to the full-length protein (38). Yeast crude extracts expressing HA-Ypi1 were incubated with GST-Ppz1<sub>Δ1-344</sub> bound to GSH-Sepharose and immunoblot analysis of the retained fraction indicated that Ypi1 was also able to interact physically with the Ppz1 phosphatase (Fig. 2B, lane 2).

*Ypi1 Displays PP1 Phosphatase-inhibitory Activity*—Since Ypi1 was able to bind both Glc7 and Ppz1 phosphatases, we investigated the possibility that Ypi1 might inhibit their phosphatase activity. Phosphatase activity was initially tested using *p*-nitrophenylphosphate as substrate. We incubated GST-Glc7 and GST-Ppz1<sub>Δ1-344</sub> fusion proteins in the presence of different amounts of purified Ypi1 and determined the phosphatase activity of the mixture. As shown in Fig. 3, A and C, purified Ypi1 inhibited Glc7 phosphatase activity (up to 60% inhibition) in a dose-dependent manner. However, the addition of Ypi1 had a more modest effect on the Ppz1 phosphatase (up to 25% inhibition). On the contrary, the addition of Hal3, a specific inhibitor of Ppz1 phosphatase (38), did not affect Glc7 phosphatase activity but drastically reduced Ppz1 phosphatase activity (Fig. 3, A and C). The addition of GST alone did not alter the enzymatic activity of the corresponding phosphatases (Fig. 3, A and C). Since it has been described that some mammalian PP1 inhibitors are heat-stable (16, 17), we were interested in determining whether Ypi1 shares this characteristic. We found that Ypi1 was also heat-stable; treatment at 95 °C for 5 min did not abolish its inhibitory effect on Glc7 phosphatase activity (data not shown).

We extended our studies of the phosphatase inhibitory capacity of Ypi1 on Glc7 and Ppz1 phosphatase activities using Reg1 as a protein substrate. Reg1, a Glc7 regulatory subunit, is itself a physiological substrate of Glc7. Reg1 is phosphorylated by Snf1 protein kinase in response to a low glucose signal, and if glucose is added back to the medium, Reg1 undergoes dephosphorylation mediated by Glc7 (45). The phosphorylation status of Reg1 can be easily followed by changes in SDS-PAGE electrophoretic mobility when expressing an amino-terminal domain of the protein, Reg1<sub>1-443</sub> (Fig. 3B, lane CE) (45). We observed that after incubating the yeast extract expressing HA-Reg1<sub>1-443</sub> with purified GST-Glc7, the upper band, corresponding to the phosphorylated form of HA-Reg1<sub>1-443</sub>, disappeared, indicating that Glc7 was able to dephosphorylate Reg1 protein *in vitro* (Fig. 3B, lane PP). The addition of increasing amounts of purified Ypi1 to the reaction mixture inhibited Glc7



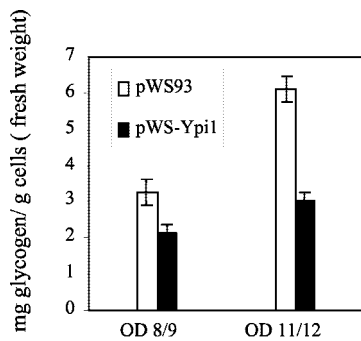


FIG. 6. **Overexpression of Ypi1 reduces cellular glycogen content.** Wild type yeast JA100 transformants containing plasmids pWS93 or pWS-Ypi1 were grown on YPD until the indicated absorbance at 660 nm. Then the amount of cellular glycogen was measured as described under "Materials and Methods."

phosphatase activity, confirming the inhibitory capacity of Ypi1. The addition of GST protein alone did not affect Glc7 phosphatase activity (Fig. 3B). We also tested whether purified GST-Ppz1 $_{\Delta 1-344}$  was able to dephosphorylate HA-Reg1 $_{1-443}$ . As shown in Fig. 3D, upon the addition of GST-Ppz1 $_{\Delta 1-344}$  to a yeast crude extract, the phosphorylated HA-Reg1 $_{1-443}$  form disappeared, indicating that Ppz1 $_{\Delta 1-344}$  could also dephosphorylate HA-Reg1 $_{1-443}$  *in vitro* (Fig. 3D, lane PP). However, the addition of increasing amounts of Ypi1 to the reaction mixture did not inhibit Ppz1 phosphatase activity significantly; we could observe only a very weak inhibition of the phosphatase activity at the highest concentration used (Fig. 3D).

To test whether Ypi1 was a specific inhibitor of PP1 phosphatases, we used commercial PP2A $_1$  phosphatase from bovine kidney (Calbiochem) and added different amounts of okadaic acid (a specific PP2A phosphatase inhibitor) or purified Ypi1 to check whether PP2A activity was inhibited. As expected, PP2A phosphatase activity was almost completely inhibited by 1 nM okadaic acid, whereas this compound inhibited only partially (15% reduction) GST-Glc7 phosphatase activity at the highest concentration (10 nM). However, when purified Ypi1 was added to the phosphatase reaction mixture, it did not affect PP2A phosphatase activity (Fig. 4).

Taking all of these results together, we propose that Ypi1 is a rather specific inhibitor of the Glc7 protein phosphatase, because Ppz1 phosphatase is less sensitive to this inhibitor under the conditions tested.

**Tryptophan 53 in Ypi1 Is Responsible for Binding and Inhibition of Glc7 Phosphatase**—The level of sequence identity among all of the sequences described in Fig. 1 was even higher in the central domain of the Ypi1 protein, where we identified a putative PP1 binding motif,  $^{48}$ RHNV $^{55}$ WEE $^{55}$ , which contains the characteristic VXW motif preceded by basic residues and followed by acidic ones (19) (Fig. 1B). To determine the importance of the tryptophan residue present in Ypi1 in the binding capacity to Glc7 and Ppz1 phosphatases, we carried out a pull-down assay expressing an HA-Ypi1 mutated version where the tryptophan residue at position 53 was changed to alanine (HA-Ypi1W53A). The mutated protein interacted very poorly with the GST-Glc7 fusion as compared with the wild type (Fig. 2A, compare lanes 2 and 4) and was essentially unable to interact with GST-Ppz1 $_{\Delta 1-344}$  (Fig. 2B, lane 4).

We also measured the inhibitory capacity of purified Ypi1W53A toward Glc7 or Ppz1 phosphatase activities using either the *p*-nitrophenyl phosphate dephosphorylation assay (Fig. 3, A and C, respectively) or the HA-Reg1 $_{1-443}$  dephosphorylation assay (Fig. 3, B and D, respectively) and found that the mutated protein was not able to inhibit either Glc7 or Ppz1 phosphatase activities. Therefore, the presence of this con-

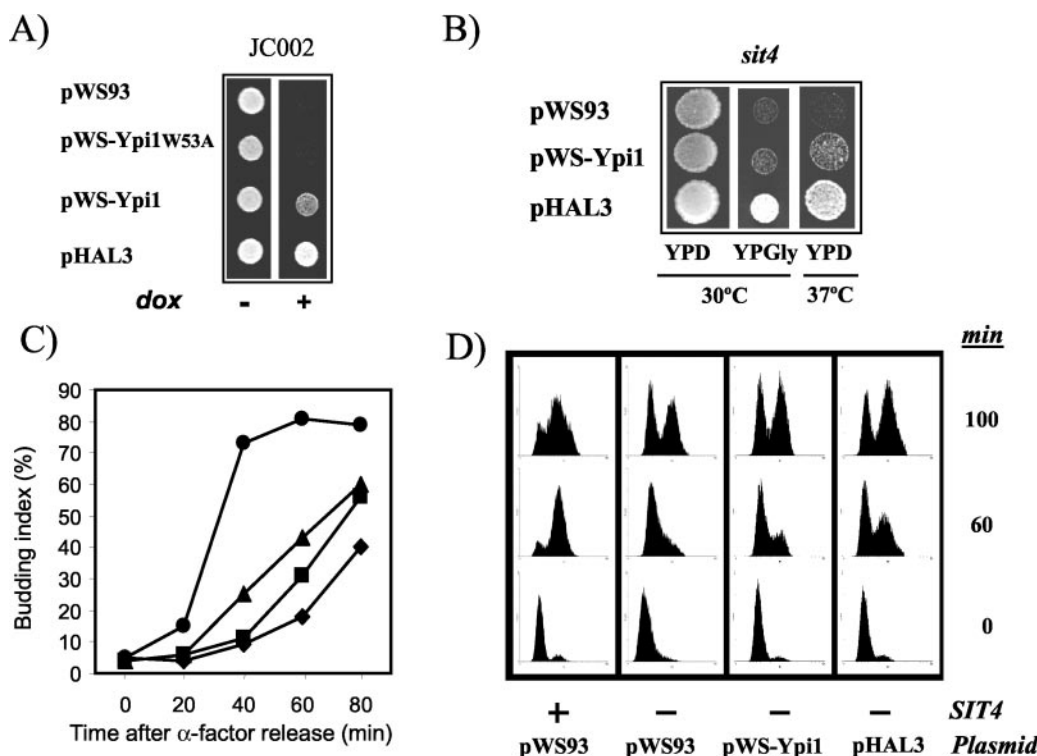
served tryptophan residue was essential for both binding and inhibitory capacity on Glc7 and Ppz1 phosphatases.

**Ypi1 Is Essential for Cell Viability**—The systematic analysis of yeast deletion mutants indicates that a *YFR003c* null strain, in which the entire open reading frame has been deleted, is unviable (52). However, the *YPI1* (*YFR003c*) open reading frame lies in the near vicinity of two well known essential genes, *RPN11*, which codes for a proteasome endopeptidase, and *NIC96*, which codes for a nucleoporin (53). The *YPI1* coding sequence was on the Crick strand only 269 bp away from the *RPN11* start codon (ATG) and 122 bp away from the *NIC96* stop codon, both in the opposite strand. To confirm that lethality was strictly due to the elimination of *YPI1*, we disrupted the gene in a diploid strain and overexpressed wild type Ypi1 protein in the heterozygous diploid mutant. Then we sporulated the diploid and performed tetrad analysis. In cells carrying an empty vector, we observed a 2:2 segregation of the lethal phenotype, and none of the viable spores contained the disrupted allele. On the other hand, the expression of Ypi1 from the plasmid allowed the growth of all four spores from a tetrad, two of them containing the *ypi1 $\Delta$ ::KanMX4* disrupted allele (Fig. 5). These results indicated that the lack of Ypi1 was the direct cause for the lethality and suggested a relevant function for Ypi1 in yeast physiology.

**Phenotypic Analyses of the Function of Ypi1 in Yeast**—Since deletion of *YPI1* was lethal, we studied the possible function of Ypi1 by overexpressing the protein. Since we have demonstrated that Ypi1 could function as a Glc7 phosphatase inhibitor, we tested whether some of the physiological processes regulated by Glc7 phosphatase were affected by the overexpression of Ypi1. First, we monitored growth rate in cells overexpressing Ypi1 and did not find significant differences with those carrying an empty plasmid. Then we investigated the role of Ypi1 in glycogen accumulation. It is known that in the absence of some specific regulatory subunits that recruit Glc7 phosphatase to the glycogen biosynthesis pathway (*i.e.* in *gac1* mutants) or in *glc7* partially defective mutants (deletion of *GLC7* is lethal), the amount of cellular glycogen is low (54). We found that cells overexpressing Ypi1 contained lower levels of glycogen in comparison with cells carrying an empty plasmid (Fig. 6), suggesting an *in vivo* inhibition of Glc7 phosphatase activity by Ypi1.

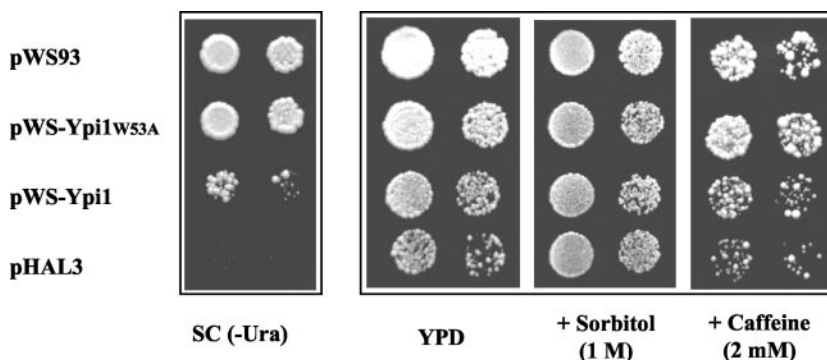
Both Glc7 and Ppz1 phosphatases are known to play distinct roles in cell cycle regulation. We used the strain JC002, a *sit4 $\Delta$*  deletion mutant in which the *HAL3* gene is under the control of the *tetO* promoter and, therefore, cells can be blocked at the G $_1$ /S transition phase in the presence of doxycycline (55). As shown in Fig. 7A, when we tested whether high levels of Ypi1 could relieve such blockage, it could be observed that overexpression of Ypi1 allowed growth of strain JC002 under nonpermissive conditions, although much less vigorously than high copy expression of *HAL3* from its own promoter. We also found that the ability to resume growth of the JC002 strain was lost when the W53A mutated version of Yip1p was tested (Fig. 7A).

Mutation of the *SIT4* phosphatase gene is able by itself to produce a significant defect in growth under a number of different conditions. We show (Fig. 7B) that overexpression of Ypi1 improved growth of a *sit4 $\Delta$*  strain at 37 °C, but it was ineffective to sustain vigorous growth in the presence of glycerol as the only carbon source. The growth defect of a *sit4 $\Delta$*  mutant results from an expanded transition from G $_1$  to S phase, which can be easily monitored after G $_1$  blockage with the  $\alpha$ -factor pheromone. As shown in Fig. 7, C and D, we determined budding index and DNA content of *sit4 $\Delta$* -arrested cells and demonstrated that high levels of Ypi1 accelerated recovery of *sit4 $\Delta$*  cells from G $_1$  blockage, albeit to a lesser extent



**FIG. 7. Effect of overexpression of native and W53A mutated forms of Ypi1 on cell cycle.** *A*, strain JC002 (*sit4Δ tetO:HAL3*) was transformed with the indicated plasmids and spotted on plates in the absence (–) or the presence of 20  $\mu$ g/ml doxycycline (*dox*). Growth was monitored after 72 h at 30 °C. *B*, strain JA110 (*sit4Δ*) was transformed with plasmids, and growth was tested at 30 °C on rich medium with glucose (YPD) or glycerol (YPGly) as the carbon source and at 37 °C on YPD. Growth was documented after 120 h of incubation. *C* and *D*, strain JA100 (*SIT4*, circles) was transformed with empty plasmid pWS93, and strain JA110 (*sit4Δ*) was transformed with plasmids pWS93 (diamonds), pWS-Ypi1 (squares), or pHAL3 (triangles). Cells were grown to an  $A_{660}$  of 0.6 and arrested at G<sub>1</sub> phase with  $\alpha$ -factor as described under “Materials and Methods.” After removal of the pheromone, samples were taken at the indicated times and processed for determination of the percentage of budded cells by microscopic observation (*C*) or for monitoring DNA content by propidium iodide staining and flow cytometry (*D*).

**FIG. 8. Overexpression of Ypi1 negatively affects growth of a *slt2/mpk1Δ* mitogen-activated protein kinase mutant.** Strain JC10 (*mpk1Δ*) was transformed with the indicated plasmids, and growth was tested at 30 °C on SC medium lacking uracil and in rich medium (YPD) containing 1 M sorbitol or 2 mM caffeine. Growth was monitored in all cases after 60 h of incubation at 30 °C. Two dilutions of the cultures (1:5) are shown.



than that achieved by high copy expression of *HAL3*. Expression of the W53A mutated version resulted in a phenotype equivalent to that of cells carrying an empty plasmid.

Both Glc7 and Ppz1 have been implicated in the maintenance of cell wall integrity, and cells defective for Glc7 or Ppz1 function aggravate the lytic phenotype of a *slt2/mpk1Δ* mitogen-activated protein kinase mutant. As shown in Fig. 8, overexpression of Ypi1 has a negative effect on growth of a *slt2/mpk1Δ* strain, although not as dramatic as high copy number expression of Hal3. This effect is particularly evident in synthetic medium, although it was also detectable in rich medium in the presence of relatively low concentrations of caffeine.

#### DISCUSSION

Type 1 protein phosphatase inhibitors represent a collection of modulators that maintain protein phosphatase activity under strict control. Some of these inhibitors are also regulated by different signaling pathways, representing alternative mechanisms for modulating phosphatase activity. For example, mam-

malian inhibitor-1 and DARPP-32 are converted to PP1 inhibitors only after phosphorylation driven by protein kinase A. In other cases, as in mammalian inhibitor-2, phosphorylation prevents the inhibitory capacity of the protein. Type 1 protein phosphatases are very well conserved throughout evolution. As in mammalian cells, the binding of specific regulatory subunits, which target the phosphatase to the corresponding substrates, modulates the action of yeast Glc7 protein phosphatase. However, until now, no Glc7 inhibitory proteins have been described in yeast. *In silico* analysis aimed to identify yeast homologues of mammalian inhibitor-1 or other related proteins has been unsuccessful, and the yeast homologue of mammalian inhibitor-2 (named Glc8) turned out to be an activator of Glc7 rather than an inhibitor (30). In this work, we describe the first endogenous Glc7 phosphatase inhibitor, which we named Ypi1. We show direct evidence that this protein, which possesses the VXXW motif, physically interacts with Glc7 and inhibits its phosphatase activity in a manner that involves residue Trp<sup>53</sup>,

within this motif. We also show that mutation of this residue to alanine abolishes the phenotypic traits associated with overexpression of Ypi1, stressing the notion that this interaction is required for regulation of Glc7 function. It is interesting to notice that Ypi1 protein has the characteristic properties observed in mammalian PP1 inhibitors; it is heat-stable, small (155 amino acids), and very rich in hydrophilic residues. In addition, the Ypi1 sequence contains two putative protein kinase A phosphorylation sites, KKKT<sup>68</sup> and KKRS<sup>131</sup>, and our preliminary results indicate that Ypi1 may be a phosphoprotein (data not shown), perhaps suggesting a possible role of this type of modification in regulating its inhibitory capacity.

Ypi1 is the yeast homologue of mammalian PP1 inhibitor-3 (31). Interestingly, when we performed a protein BLAST analysis on Ypi1, we found that Ypi1 and mammalian inhibitor-3 are members of a very well conserved family of proteins, all of them small in size, rich in hydrophilic residues, and harboring the characteristic PP1 binding motif VX(W/F). Members of this family are present in all eukaryotes, from yeast, insects, plants, and worms to mammals, suggesting that the function performed by yeast Ypi1 and mammalian inhibitor-3 is very well conserved throughout evolution. We confirm here that deletion of the *YPI1* gene is lethal, suggesting a relevant function of this protein in the yeast physiology. Unfortunately, this fact prevents direct investigation of the function(s) of Ypi1 by simple deletion of the gene and evaluation of the associated phenotypes. Alternative approaches include the generation of conditional mutants or monitoring the phenotype of cells overexpressing the protein. Whereas the former approach is in progress in our laboratory, here we present evidence that cells overexpressing Ypi1 aggravate the lytic defect of an *slt2/mpk1* mitogen-activated protein kinase mutant. This trait is compatible with a negative function *in vivo* of Ypi1 on Glc7 activity, since this phosphatase is required for maintenance of cell wall integrity (56), which is compromised in *SlT2/Mpk1*-deficient cells. It must be noted, however, that this phenotype would be also compatible with Ypi1 acting as a Ppz1 inhibitor. Certainly, cells lacking Ppz1 or overexpressing Hal3, an inhibitory subunit of Ppz1 (38), display synthetic lethality with the *slt2/mpk1* mutation (38, 57). It should be noted, however, that overexpression of *YPI1* is less effective than high copy number expression of *HAL3* in improving growth of the *mpk1* mutant, which would be compatible with the relative capabilities of Hal3 and Ypi1 to inhibit Ppz1 *in vitro*.

We also describe here that overexpression of Ypi1 rescues growth of a *sit4Δ tetO:HAL3* mutant in the presence of doxycycline, improves growth of a *sit4Δ* strain at 37 °C, and accelerates recovery of *sit4Δ* cells from G<sub>1</sub> blockage. All of these effects would suggest that Ypi1 plays a positive role in cell cycle progression at the G<sub>1</sub>/S transition. In this regard, a recent report has established that Sit4 is required for proper modulation of the biological functions mediated by the Pkc1-mediated pathways (58) and that the characteristic delay in G<sub>1</sub>/S transition of *sit4* mutants is mediated by up-regulation of the Pkc1 activity. Since genetic interactions between *GLC7* and *PKC1* (and upstream components of the kinase pathway) have been documented (56), our results would be compatible with an inhibitory action of Ypi1 on Glc7 at the G<sub>1</sub>/S transition and would point to a possible role of Glc7 at this important regulatory step of the cell cycle.

In addition, cells overexpressing Ypi1 display a lower than normal glycogen content. Glc7 is recognized as a major phosphatase-regulating glycogen metabolism, and a decrease in Glc7 activity would lead to hyperphosphorylation and inhibition of glycogen synthase (4, 59–61). Therefore, inhibition of Glc7 would be compatible with less accumulation of glycogen.

This phenotype seems to be specific to Glc7 inhibition, since glycogen levels in cells lacking Ppz1, Ppz2, or both phosphatases are equivalent to that of wild type cells (37, 62). In the same way, our assays (Fig. 3) indicate that Ypi1 substantially inhibits Glc7 activity *in vitro* and has a lesser effect on Ppz1 activity.

All these results are compatible with a direct *in vivo* inhibitory role of Ypi1 on Glc7. A role as inhibitor of Ppz1, although possible, appears less likely under the conditions tested. However, it must be stressed that as Glc7 and Ppz1 catalytic subunits may interact with specific regulatory subunits in each biological process and this binding occurs in a mutually exclusive manner, overexpression of Ypi1 might interfere with the function of the catalytic subunit by displacing other regulators, regardless of whether Ypi1 itself has a physiological role in the pathway being assessed. A project being carried out in our laboratories, based on the characterization of phenotypes derived from the controlled loss of function of *YPI1*, will provide further insight into the physiological properties of this protein phosphatase inhibitor.

**Acknowledgments**—We thank Dr. C. S. Chan, Dr. A. Ruiz, and Dr. M. Carlson for strains and plasmids. We also thank Dr. L. Yenush for strains, plasmids, and critical reading of the manuscript.

#### REFERENCES

1. Wera, S., and Hemmings, B. A. (1995) *Biochem. J.* **311**, 17–29
2. Stark, M. J. (1996) *Yeast* **12**, 1647–1675
3. Zolnierowicz, S., and Bollen, M. (2000) *EMBO J.* **19**, 483–488
4. Feng, Z. H., Wilson, S. E., Peng, Z. Y., Schlender, K. K., Reimann, E. M., and Trumbly, R. J. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 23796–23801
5. Clotet, J., Posas, F., Casamayor, A., Schaaff-Gerstenschlager, I., and Arino, J. (1991) *Curr. Genet.* **19**, 339–342
6. Cannon, J., Pringle, J. R., Fiechter, A., and Khalil, M. (1994) *Genetics* **136**, 485–503
7. Francisco, L., Wang, W., and Chan, C. S. M. (1994) *Mol. Cell. Biol.* **14**, 4731–4740
8. Hisamoto, N., Sugimoto, K., and Matsumoto, K. (1994) *Mol. Cell. Biol.* **14**, 3158–3165
9. Tu, J., and Carlson, M. (1994) *Mol. Cell. Biol.* **14**, 6789–6796
10. Wek, R. C., Cannon, J. F., Dever, T. E., and Hinnebusch, A. G. (1992) *Mol. Cell. Biol.* **12**, 5700–5710
11. Tachikawa, H., Bloecher, A., Tatchell, K., and Neiman, A. M. (2001) *J. Cell Biol.* **155**, 797–808
12. Chang, J. S., Henry, K., Wolf, B. L., Geli, M., and Lemmon, S. K. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 48002–48008
13. Peggie, M. W., MacKelvie, S. H., Bloecher, A., Knatko, E. V., Tatchell, K., and Stark, M. J. (2002) *J. Cell Sci.* **115**, 195–206
14. Williams-Hart, T., Wu, X., and Tatchell, K. (2002) *Genetics* **160**, 1423–1437
15. Bollen, M. (2001) *Trends Biochem. Sci.* **26**, 426–431
16. Cohen, P. T. (2002) *J. Cell Sci.* **115**, 241–256
17. Aggen, J. B., Nairn, A. C., and Chamberlin, R. (2000) *Chem. Biol.* **7**, R13–23
18. Egloff, M. P., Johnson, D. F., Moorhead, G., Cohen, P. T. W., Cohen, P., and Barford, D. (1997) *EMBO J.* **16**, 1876–1887
19. Zhao, S., and Lee, E. Y. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 28368–28372
20. Wakula, P., Beullens, M., Ceulemans, H., Stalmans, W., and Bollen, M. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 18817–18823
21. Eto, M., Karginov, A., and Brautigan, D. L. (1999) *Biochemistry* **38**, 16952–16957
22. Oliver, C. J., and Shenolikar, S. (1998) *Front. Biosci.* **3**, D961–D972
23. Connor, J. H., Frederick, D., Huang, H. B., Yang, J., Helps, N. R., Cohen, P. T. W., Nairn, A. C., DePaoli-Roach, A., Tatchell, K., and Shenolikar, S. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 18670–18675
24. Kwon, Y. G., Huang, H. B., Desdoutis, F., Girault, J. A., Greengard, P., and Nairn, A. C. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 3536–3541
25. Connor, J. H., Quan, H. N., Ramaswamy, N. T., Zhang, L., Barik, S., Zheng, J., Cannon, J. F., Lee, E. Y., and Shenolikar, S. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 27716–27724
26. Huang, H. B., Horiuchi, A., Watanabe, T., Shih, S. R., Tsay, H. J., Li, H. C., Greengard, P., and Nairn, A. C. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 7870–7878
27. Dignam, S. S., Koushik, J. S., Wang, J., Trumbly, R. J., Schlender, K. K., Lee, E. Y., and Reimann, E. M. (1998) *Arch. Biochem. Biophys.* **357**, 58–66
28. Zheng, J., Khalil, M., and Cannon, J. F. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 18070–18078
29. Tung, H. Y., Wang, W., and Chan, C. S. (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**, 6064–6074
30. Nigavekar, S. S., Tan, Y. S., and Cannon, J. F. (2002) *Arch. Biochem. Biophys.* **404**, 71–79
31. Zhang, J., Zhang, L., Zhao, S., and Lee, E. Y. (1998) *Biochemistry* **37**, 16728–16734
32. Tu, J., Song, W., and Carlson, M. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4199–4206
33. Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T. A., Judson, R. S., Knight, J. R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadmodar, G., Yang, M., Johnston, M., Fields, S., and Rothberg, J. M. (2000) *Nature* **403**, 623–627
34. Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M., and Sakaki, Y. (2001)



- Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 4569–4574
35. Arino, J. (2002) *Eur. J. Biochem.* **269**, 1072–1077
  36. Yenush, L., Mulet, J. M., Arino, J., and Serrano, R. (2002) *EMBO J.* **21**, 920–929
  37. Venturi, G. M., Bloecher, A., Williams-Hart, T., and Tatchell, K. (2000) *Genetics* **155**, 69–83
  38. de Nadal, E., Clotet, J., Posas, F., Serrano, R., Gomez, N., and Arino, J. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 7357–7362
  39. Wach, A., Brachet, A., Pöhlmann, R., and Philippsen, P. (1994) *Yeast* **10**, 1793–1808
  40. Rose, M. D., Winston, F., and Hieter, P. (1990) *Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual*, pp. 164–165, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
  41. Song, W., and Carlson, M. (1998) *EMBO J.* **17**, 5757–5765
  42. Clotet, J., Posas, F., de Nadal, E., and Arino, J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 26349–26355
  43. Gietz, R. D., and Sugino, A. (1988) *Gene (Amst.)* **74**, 527–534
  44. Zhang, A. J., Bai, G., Deans-Zirattu, S., Browner, M. F., and Lee, E. Y. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 1484–1490
  45. Sanz, P., Alms, G. R., Haystead, T. A. J., and Carlson, M. (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20**, 1321–1328
  46. Silberman, S. R., Speth, M., Nemani, R., Ganapathi, M. K., Dombradi, V., Paris, H., and Lee, E. Y. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 2913–2922
  47. Arino, J., Posas, F., and Clotet, J. (1998) *Methods Mol. Biol.* **93**, 305–313
  48. Posas, F., Camps, M., and Arino, J. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 13036–13041
  49. Clotet, J., Gari, E., Aldea, M., and Arino, J. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2408–2415
  50. Gallego, C., Gari, E., Colomina, N., Herrero, E., and Aldea, M. (1997) *EMBO J.* **16**, 7196–7206
  51. Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G. D., Moore, L., Adams, S. L., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutilier, K., Yang, L., Wolting, C., Donaldson, L., Schandorff, S., Shewnarane, J., Vo, M., Taggart, J., Goudreault, M., Muskat, B., Alfarano, C., Dewar, D., Lin, Z., Michalickova, K., Willems, A. R., Sassi, H., Nielsen, P. A., Rasmussen, K. J., Andersen, J. R., Johansen, L. E., Hansen, L. H., Jespersen, H., Podtelejnikov, A., Nielsen, E., Crawford, J., Poulsen, V., Sorensen, B. D., Matthiesen, J., Hendrickson, R. C., Gleeson, F., Pawson, T., Moran, M. F., Durocher, D., Mann, M., Hogue, C. W., Figeyes, D., and Tyers, M. (2002) *Nature* **415**, 180–183
  52. Giaever, G., Chu, A. M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., Andre, B., Arkin, A. P., Astromoff, A., El-Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Brachat, S., Campanaro, S., Curtiss, M., Davis, K., Deutschbauer, A., Entian, K. D., Flaherty, P., Foury, F., Garfinkel, D. J., Gerstein, M., Gotte, D., Guldener, U., Hegemann, J. H., Hempel, S., Herman, Z., Jaramillo, D. F., Kelly, D. E., Kelly, S. L., Kotter, P., LaBonte, D., Lamb, D. C., Lan, N., Liang, H., Liao, H., Liu, L., Luo, C., Lussier, M., Mao, R., Menard, P., Ooi, S. L., Revuelta, J. L., Roberts, C. J., Rose, M., Ross-Macdonald, P., Scherens, B., Schimmack, G., Shafer, B., Shoemaker, D. D., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R. K., Strathern, J. N., Valle, G., Voet, M., Volckaert, G., Wang, C. Y., Ward, T. R., Wilhelm, J., Winzler, E. A., Yang, Y., Yen, G., Youngman, E., Yu, K., Bussey, H., Boeke, J. D., Snyder, M., Philippsen, P., Davis, R. W., and Johnston, M. (2002) *Nature* **418**, 387–391
  53. Cherry, J. M., Adler, C., Ball, C., Chervitz, S. A., Dwight, S. S., Hester, E. T., Jia, Y., Juvik, G., Roe, T., Schroeder, M., Weng, S., and Botstein, D. (1998) *Nucleic Acids Res.* **26**, 73–79
  54. Ramaswamy, N. T., Li, L., Khalil, M., and Cannon, J. F. (1998) *Genetics* **149**, 57–72
  55. Simon, E., Clotet, J., Calero, F., Ramos, J., and Arino, J. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 29740–29747
  56. Andrews, P. D., and Stark, M. J. (2000) *J. Cell Sci.* **113**, 507–520
  57. Lee, K. S., Hines, L. K., and Levin, D. E. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 5843–5853
  58. de la Torre-Ruiz, M. A., Torres, J., Arino, J., and Herrero, E. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 33468–33476
  59. Peng, Z. Y., Trumbly, R. J., and Reimann, E. M. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 13871–13877
  60. Francois, J. M., Thompson-Jaeger, S., Skroch, J., Zellenka, U., Spevak, W., and Tatchell, K. (1992) *EMBO J.* **11**, 87–96
  61. Hardy, T. A., and Roach, P. J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 23799–23805
  62. Hughes, V., Muller, A., Stark, M. J., and Cohen, P. T. (1993) *Eur. J. Biochem.* **216**, 269–279
  63. van Heusden, G. P., Griffiths, D. J., Ford, J. C., Chin, A. W. T. F., Schrader, P. A., Carr, A. M., and Steensma, H. Y. (1995) *Eur. J. Biochem.* **229**, 45–53
  64. Vissi, E., Clotet, J., de Nadal, E., Barcelo, A., Bako, E., Gergely, P., Dombradi, V., and Arino, J. (2001) *Yeast* **18**, 115–124
  65. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997) *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402