



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma
de Barcelona**



La proteína fosfatasa Ppz1 de levadura: estudios estructurales y funcionales en sobreexpresión

Tesis Doctoral presentada por

CARLOS A. CALAFÍ PASCUAL,

graduado en Biotecnología

para el título de Doctor en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina
de la Universidad Autónoma de Barcelona

Tesis Doctoral realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología
Molecular de la Universidad Autónoma de Barcelona y en el Instituto de
Biotecnología y Biomedicina

Tesis dirigida por los Doctores **Antonio Casamayor Gracia y Joaquín
Ariño Carmona**

Dr. Antonio Casamayor Carlos Calafí Pascual

Dr. Joaquín Ariño

Cerdanyola del Vallès, septiembre 2020

“Si puedes mirar, ve. Si puedes ver, repara”

Ensayo sobre la ceguera

José Saramago

The background features a large central yellow circle with diagonal stripes. Surrounding it are various geometric shapes: a green circle with diagonal stripes in the top left, a light blue circle with a black diamond and a blue zigzag in the top right, a purple circle with a red diamond and a pink zigzag in the bottom left, and a purple circle with a red zigzag and a pink triangle in the bottom right. A dark blue horizontal bar is positioned below the text.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Dr. Joaquín Ariño por brindarme la oportunidad de realizar tanto el máster como la tesis en su laboratorio. No olvido su paciencia, su tiempo y su dedicación como jefe del laboratorio y director de la tesis. Al Dr. Antonio Casamayor, por la innumerable cantidad de veces que me ha dejado robarle el tiempo, con miles de preguntas estúpidas e hipótesis improbables. A los dos: gracias por la confianza que depositasteis en mí y por todo lo enseñado. No me olvido de mi “jefe de Sevilla”, Jesús de la Cruz, al que le agradezco dejarme realizar las estancias en su laboratorio y hacerme sentir como en casa durante 3 meses. Gracias por entender los días que no pude estar y los días que tuve que marcharme pronto. Agradezco también a Néstor Gómez, Josep Clotet y David Canadell, miembros de mi comisión de seguimiento, por la implicación y los consejos, muy útiles en más de una ocasión. Quiero hacer una mención especial a David Canadell, por la cercanía y empatía mostradas y el seguimiento de cerca del proyecto.

Gracias a la gente del laboratorio. A todos y cada uno de ellos. Gracias a Laura Tatjer, por llevarse a medio laboratorio a echar humo, por enseñarme a defender una tesis con las piernas temblorosas, pero con la voz impecable. Espero que te sirviera de algo un casi desconocido en un momento de bajón... Gracias a Cristina Molero, por contarnos su vida, que tanta gracia nos hacía, y por las fondues en las que éramos súper colegas. Gracias de nuevo a David Canadell, por ser el “padre” que todo laboratorio necesita, por saberlo TODO, y enseñarme a abrir los tubos como lo hace una persona normal. Gracias a Albert Serra, por dirigirme tan de cerca el máster, por enseñarme a coger una pipeta y los tiempos del laboratorio, pese a estar en el peor momento de la tesis. Quiero agradecer muy fuertemente la aportación de María López a este trabajo ya que, sin ésta, difícilmente se habrían logrado algunos de los resultados que hemos obtenido. Gracias por tantísima ayuda con mis experimentos del máster, eso no se me va a olvidar nunca. Gracias por meterme en el mundo de “Ppz1 y sus amigos”, por la cantidad de horas que me has aguantado (para bien y para mal) y por lo bien que me has hecho sentir durante el tiempo en el que fui tu sombra, que se acabó alargando unos cuantos meses... A Ana, gracias por las clases de inglés que recibí en nuestro primer congreso, por no mandarnos a la mierda con la de barbaridades que soltábamos en el laboratorio, y por la alegría que siempre traías a las conversaciones, más incluso cuando te soltabas y hablabas en castellano. ¡Espero que por China las cosas sigan bien y te sigas emborrachando con un sorbo de sangría!

Por supuesto, gracias a todos los estudiantes de prácticas y máster que han ido pasando por el laboratorio a dejar sus momentos marcados en la historia del laboratorio. A Rebeca, por aguantar a todo un equipo de jefes (María, Antonio, Diego (solo a veces) y yo) explicándole cómo se trabajaba con la doxiciclina y dónde se tiran los geles de agarosa. ¡Ah! Y por no ofenderse por mis “comentarios machistas”. A Paula, por ser la mejor alumna de prácticas que podía tener en el momento que llegó, por sacarme las castañas del fuego en innumerables ocasiones y por enseñarnos a todos que el Pesto no es vegano. A Edu, que, para ir a segundo de carrera, estaba muy espabilado, y más que enseñarle, me enseñó él a mí. Espero que tu tensión haya ido a mejor con los años... A Bernat el de Diego, por contarnos cómo dejó sentado un móvil en una silla en las fiestas de gracia, y por enseñarnos cuál es el mejor momento del día para leer. A Georgina, por ser de lo mejor que ha podido pasar por el laboratorio, pese a ir solo a tercero de carrera y saber más que todos. A Luis, el chico de Perú con contactos en Corea del Norte, que nos proporcionaba risas y miedo a partes iguales. A Bernat el mío, por preguntarse cosas que solo él se preguntaba, pero que siempre me obligaba a pensar en la respuesta. A Antoaneta Balkanska (espero haberlo escrito bien...), la chica farmacéutica de Sofía que vino a España a pasarlo bien y al laboratorio, a dormir. Se echa de menos la locura que transmitías, y la canción de Álvaro Soler nunca fue la misma... A Santi, que ahora estará recorriendo mundo. Gracias por enseñarme a encarar una reunión con Joaquín, y dónde puedes comer bien por Santander, ¡que siempre se agradece! A David Aránega Trancón, del que nunca (espero) voy a olvidar los apellidos, por hacerme cuestionar que las levaduras crecieran en una placa... Gracias por meternos en el Saxo a 4 tiarrones como nosotros, por enseñarnos la existencia de Mr. Jäger y por estar tan dispuesto a participar en el vídeo de la Fondue. A Cristina Ochoa, la invertida, por tener tan centrado a Santo y por la alegría que traías al laboratorio. A Natalia *Tinococos*, la muchacha de prácticas más maja y enrollada de *Viladroga y la Gentuza* que podríamos haber tenido. Espero que tu vecino padre no te haya vuelto a decir cosas extrañas, que el máster haya ido bien y que nos veamos en alguna Fondue para volveros a contar mi vida a ti y a Cristina. Gracias por avisarme de los errores, aunque los acabase cometiendo por estúpido. A Elisa, la mejor persona que ha pasado por el laboratorio. Gracias por enseñarme a usar Excel para calcular las OD, de no ser por ti aún seguiría usando el papel. Gracias por instaurar en el laboratorio los jueves de La Oreja de Van Gogh y por enseñarnos canciones extrañas que hacen bastante gracia.

Por supuesto, quiero agradecer a mis compañeros “actuales” del laboratorio. A toda la gente que vive en el IBB. A Diego que, aunque se haya ido hace muy poco, su risa escandalosa y su voz siguen por los pasillos del IBB. Gracias por no pensar como yo, es lo más positivo que me has dado. Gracias por todas las horas de prácticas como fisioterapeuta que me has dejado hacer gratis con tu espalda y tu rodilla. Y, sin duda, gracias por darle ambiente al laboratorio, sin ti no es lo mismo... A Carol, la nueva postdoc, por fliparse conmigo con la música que poníamos mientras el resto nos miraba con cara rara. Ahora tengo ganas de ponerme a bailar *Suavemente* y *Derroche*... A Chanco, Hugo Santos, Santos, o como sea que llames, gracias por hacer que me acuerde de ti cada vez que miro ese recuerdo que firmaste... Gracias por ser tan bonachón con todos, eres todo bondad. Espero que controles tus problemas con el alcohol la próxima vez que te vea bebiendo. Yo también lo haré. A Marcel, por ser tan buen compañero. Gracias por hacerme todos y cada uno de los favores (nada de “favorcillos”, no, FAVORES) que te he pedido, y no pedir ni la hora a cambio. ¡Te debo demasiados! Gracias por nuestras tardes de miércoles que parecían viernes en las que nuestras cabezas volaban por pura supervivencia, ya fuera cantando un tema de punk rock de Berni o cualquier otra canción idiota a Monchess. Espero que te vayan bien las andanzas de guitarrista... A Monche, Monchimón, Monchess o Mala Pécora, como quiera que te hagas llamar ahora, mil gracias por tantos años aguantando capullos como nosotros y seguir creyendo en las personas. Mereces que la vida te trate mejor, no eres tan mala pécora... Gracias por tantas mañanas de café y charlita, me servían muchísimo y las echo de menos. Espero que las cosas por casa vayan a mejor, algún día. A mis compañeros de poyata intermitentes, Antonio y Joaquín, cuando les ha tocado ponerse el uniforme y levantar el laboratorio. Antonio: el laboratorio ganaba un toque importante de locura cuando salías de la cueva más a menudo para hablar con nosotros, ¿has pensado en volver? Joaquín: espero que nos volvamos a ver en la poyata, y que sigas canturreando mientras trabajas. Siempre se aprende algo de los jefes cuando se ponen el traje, ¿no?

No puedo acabar esta tesis sin agradecer, a los que más, a mis amigos y a mi familia. A mis amigos de Sevilla, por los grandes momentos que me hicisteis vivir en mis dos estancias. A mis amigos de siempre, los del pueblo, que aguantaron muchos ratos malos durante esta larga tesis. A mi familia, los que dan el callo todos los días, los que saben sonreír ante la adversidad, no como yo. Gracias por hacerme ver la vida de otra manera, aunque nunca me sea fácil. Y al que ya no está, que hoy está más presente que nunca...

The background features several overlapping geometric shapes and patterns. In the top left, there is a green semi-circle with diagonal white stripes. To its right is a light blue semi-circle containing a black diamond outline and a blue zigzag line. In the center, a large yellow semi-circle with diagonal white stripes is prominent. Below it, a dark blue horizontal bar spans the width of the page. In the bottom left, there is a purple semi-circle with a red diamond outline and a blue semi-circle with diagonal white stripes. In the bottom right, there is a purple semi-circle with a pink zigzag line and a pink semi-circle with diagonal white stripes.

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS	17
2. RESÚMENES	21
3. INTRODUCCIÓN.....	27
3.1. El organismo modelo <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
3.2. La fosforilación de proteínas como método de regulación	30
3.2.1. Visión general sobre la fosforilación de proteínas	30
3.2.2. Propiedades de las fosfatasas específicas de Ser/Thr.....	31
a. Fosfoproteínas fosfatasas (PPP).....	31
b. Proteínas fosfatasas dependientes de metales (PPM)	32
c. Las fosfatasas basadas en aspartato	33
3.3. Las fosfatasas específicas de Ser/Thr tipo 1	34
3.3.1. Subunidades reguladoras.....	36
3.3.2. Funciones	37
3.4. Las fosfatasas Ppz1 y Ppz2 en <i>S. cerevisiae</i>	42
3.4.1. Las funciones de Ppz1 en <i>S. cerevisiae</i>	43
a. Ppz1 y la regulación de la homeostasis catiónica en <i>S. cerevisiae</i>	44
b. Las fosfatasas Ppz y el mantenimiento de la integridad de la pared celular ..	50
c. La relación entre la fosfatasa Ppz1 y el ciclo celular	52
d. Ppz1 y el proceso de traducción de proteínas	54
e. Otras funciones de las fosfatasas Ppz	55
3.5. Las subunidades reguladoras de las fosfatasas Ppz: Hal3 y Vhs3	55
3.6. El efecto tóxico derivado de la sobreexpresión de Ppz1	59
3.7. Biogénesis de ribosomas y traducción de proteínas en <i>S. cerevisiae</i>	61
3.7.1. Proteínas ribosómicas.....	61
3.7.2. Biogénesis de ribosomas	62
3.7.3. La iniciación de la traducción y su regulación	65
4. MATERIALES Y MÉTODOS	69

4.1. Cepas y medios de levadura	71
4.2. Técnicas de DNA recombinante.....	71
4.3. Cassettes de delección y disrupciones génicas.....	72
4.4. Plásmidos.....	73
4.4.1. Vectores derivados de pCM	73
4.4.2. Vectores derivados del <i>screen</i> de supresores en multicopia	75
4.4.3. Otros vectores.....	76
4.5. Cribado de la colección de mutantes por delección EUROFAN usando pCM190-PPZ1	77
4.6. <i>Screen</i> de la colección de mutantes por delección EUROFAN usando pYES2-PPZ1	78
4.7. Escrutinio de genes supresores de la falta de crecimiento de la cepa MLM04.	79
4.8. Preparaciones para ensayos de perfil polisómico.....	80
4.9. Recolección de muestras y preparación de extractos para inmunodetección....	80
4.10. SDS-PAGE e inmunodetección de proteínas	82
4.11. Microscopía	83
4.12. Ensayos de crecimiento	84
4.13. Análisis bioinformático	85
5. OBJETIVOS.....	87
6. RESULTADOS	91
6.1. El exceso de Ppz1 afecta al proceso de traducción	93
6.1.1. Escrutinio de mutantes por delección usando pYES2-PPZ1	93
6.1.2. Caracterización del set de vectores pCM-PPZ1 y su uso en el escrutinio de mutaciones supresoras de la toxicidad de Ppz1	95
6.1.3. Construcción y caracterización de la cepa regulable por doxiciclina MLM04	98
6.1.4. La sobreexpresión de Ppz1 provoca la desfosforilación de Snf1	100

6.1.5. Escrutinio de genes supresores del defecto de crecimiento de la cepa MLM04	103
6.1.6. El exceso de Ppz1 tiene un impacto en el perfil polisómico.....	109
6.1.7. La hiperfosforilación de eIF2 α en células que sobreexpresan Ppz1 necesita Gcn2	113
6.2. La región N-terminal de Ppz1 es determinante para su toxicidad.....	117
6.2.1. La región N-terminal de las fosfatasas Ppz es importante para la toxicidad.....	117
6.2.2. Evaluación de la toxicidad de Glc7 en relación con la de las fosfatasas Ppz.....	121
6.2.3. Análisis comparativo de las extensiones N-terminal de Ppz1 y Ppz2.....	123
6.3. La relación entre la sobreexpresión de Ppz1 y la homeostasis de cationes monovalentes	126
6.3.1. La mutación G2A en Ppz1 atenúa la toxicidad dependiendo de la disponibilidad de K ⁺	126
6.3.2. La proteína Hog1 es requerida para la toxicidad de Ppz1	129
6.3.3. La delección de <i>PTC1</i> agrava la toxicidad de las variantes de Ppz1	132
6.3.4. Comparación de la respuesta del mutante <i>hog1</i> con la del mutante <i>slt2</i> .	134
7. DISCUSIÓN.....	137
7.1. El exceso de Ppz1 afecta al proceso de traducción	139
7.2. La región N-terminal de Ppz1 es determinante para su toxicidad.....	147
7.3. La relación entre la sobreexpresión de Ppz1 y la homeostasis de cationes monovalentes	152
8. CONCLUSIONES.....	161
9. REFERENCIAS	165
10. APÉNDICES	185

The background features several overlapping geometric shapes and patterns. In the top left, there is a green semi-circle with diagonal white stripes. To its right is a light blue semi-circle containing a black diamond outline and a blue zigzag line. In the center, a large yellow semi-circle with diagonal white stripes is the focal point. Below it, a dark blue horizontal bar spans the width of the page. In the bottom left, there is a purple semi-circle with a red diamond outline and a blue semi-circle with diagonal white stripes. In the bottom right, there is a purple semi-circle with a pink zigzag line and a red semi-circle with diagonal white stripes.

ABREVIATURAS

4E-BP	Proteína de unión a 4E
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
cDNA	DNA complementario
CDK	Quinasa dependiente de ciclina
CWI	Integridad de la pared celular
C-terminal	Carboxilo terminal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
eIF	Factor de inicio eucariota
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ER	Retículo endoplasmático
GAAC	<i>General amino acid control</i>
GDP	Guanosina difosfato
GEF	<i>Guanine-nucleotide Exchange Factor</i>
GFP	Proteína verde fluorescente
GST	Glutación S-transferasa
GTP	Guanosina trifosfato
HA	Antígeno Hemaglutinina
HOG	<i>High osmolarity glycerol</i>
IDR	Región intrínsecamente desestructurada
IgG	Inmunoglobulina G
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LEU	Leucina
LSU	Subunidad grande
mRNA	RNA mensajero
MAP	Proteína activada por mitógeno
MAPK	MAP quinasa

MEK	Quinasa de MAP quinasa
N-terminal	Amino terminal
OD	Densidad óptica
ORF	Marco abierto de lectura
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIC	Complejo de preinicio
PKA	Proteína quinasa A
PPCDC	Fosfopantotenoilcisteína descarboxilasa
PPM	Proteína fosfatasa dependiente de metales
PPP	Fosfoproteína fosfatasa
PVDF	Difluoruro de polivinilo
rDNA	DNA ribosómico
rRNA	RNA ribosómico
RNA	Ácido ribonucleico
RP	Proteína ribosómica
SC	Medio sintético completo
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS
SSU	Subunidad pequeña
tRNA	RNA de transferencia
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TCA	Ácido tricloroacético
TOR	Diana de la rapamicina
URA	Uracilo
WT	Cepa silvestre
YNB	Base nitrogenada para levadura
YPD	Extracto de levadura peptona dextrosa

The background is a light cream color with several abstract geometric elements. In the top left, there is a green semi-circle with diagonal white stripes. To its right, a light blue semi-circle contains a black diamond outline and a blue zigzag line. In the center, a large yellow semi-circle with diagonal white stripes is the focal point. Below it, a dark blue horizontal bar spans the width of the page. In the bottom left, a purple semi-circle contains a red diamond outline and a blue and white striped semi-circle. In the bottom right, a purple semi-circle contains a pink zigzag line and a pink and white striped semi-circle.

RESÚMENES

The Ppz enzymes are Ser/Thr protein phosphatases present only in fungi that are characterized by a highly conserved C-terminal catalytic region, related to PP1c phosphatases, and a more divergent N-terminal extension. In *Saccharomyces cerevisiae*, Ppz phosphatases are encoded by two paralog genes, *PPZ1* and *PPZ2*. Ppz1 is the most toxic protein when overexpressed in budding yeast, halting cell proliferation, and this effect requires its phosphatase activity. However, the reasons for such toxicity have not been elucidated. In this study, we tried to unveil the mechanisms behind the toxicity of Ppz1. We have identified several genes encoding ribosomal proteins and ribosome assembly factors as mild high-copy suppressors of the toxic Ppz1 effect. This phosphatase binds to ribosomes engaged in translation, and the Ppz1 excess leads to a decrease in the polysome content. The absence of the Gcn2 kinase (a translation initiation negative regulator) partially suppresses the growth defect of a Ppz1 overexpressing strain, consistently with an impact in the initiation process. We propose that the deleterious effects of Ppz1 overexpression are in part due to alteration in normal protein synthesis.

Despite its conserved catalytic domain, we report that Ppz2 was not toxic when overexpressed in the same conditions that Ppz1, albeit Ppz2 levels were somewhat lower. Remarkably, a hybrid protein composed of the N-terminal extension of Ppz1 and the catalytic domain of Ppz2 was as toxic as Ppz1 even if its expression level was comparable to that of Ppz2. Thus, the N-terminal extension of Ppz1 plays a key role in defining Ppz1 toxicity.

The toxic effect of two Ppz1 versions was also analyzed. The G2A mutation generates a non-myristoylable Ppz1 and the R451L version is catalytically inactive. The G2A change slightly attenuated the toxicity of Ppz1, while the R451L mutation strongly reduced the growth defect associated with the excess of Ppz1. Ppz1 is capable to inhibit K^+ uptake via the Trk1 transporter. The addition of external potassium ameliorated the growth of cells carrying the native Ppz1 and G2A version. We also analyzed the growth of mutants related to the HOG pathway containing these Ppz1 versions. The deletion of *HOG1*, which encodes the central MAPK of the HOG pathway, notably reduced the toxicity associated with the 2 Ppz1 versions. The absence of Nha1, a $Na^+, K^+/H^+$ antiporter, led to a strong reduction of the toxic effect of the G2A variant. Finally, we hypothesize a model in which overexpression of Ppz1 might alter the function of both Nha1 and Trk1 transporters, thus explaining the behavior of the G2A version of Ppz1.

Los enzimas Ppz son proteínas fosfatasa que se encuentran solo en hongos y se caracterizan por un dominio catalítico C-terminal muy conservado, parecido al de las fosfatasas PP1c, y una región N-terminal poco conservada. En *Saccharomyces cerevisiae*, las fosfatasas Ppz están codificadas en los genes parálogos *PPZ1* y *PPZ2*. Ppz1 es la proteína más tóxica en sobreexpresión en levadura, alterando la proliferación celular de manera dependiente de su actividad fosfatasa, aunque los mecanismos que recaen sobre esta toxicidad aún no han sido descubiertos. En este estudio intentamos conocer estos mecanismos. Hemos identificado varios genes que codifican proteínas ribosómicas, así como factores implicados en la biogénesis de ribosomas como supresores en multicopia del efecto tóxico de Ppz1. Esta fosfatasa se une a los ribosomas que empiezan a traducir, y el exceso de Ppz1 produce una caída en la cantidad de polisomas. La ausencia de la quinasa Gcn2 (regulador negativo del inicio de traducción) parcialmente suprime el defecto de crecimiento de una cepa que sobreexpresa Ppz1. Por todo esto, proponemos que parte de los efectos de la sobreexpresión de Ppz1 se deben a la alteración de la síntesis de proteínas.

A pesar de su dominio catalítico conservado, describimos que Ppz2 no es tóxica cuando se sobreexpresa en las mismas condiciones que Ppz1, aunque los niveles de Ppz2 son menores. Sorprendentemente, una versión híbrida compuesta por el segmento N-terminal de Ppz1 y el dominio catalítico de Ppz2 presentó la misma toxicidad que Ppz1, incluso mostrando niveles de expresión comparables a los de Ppz2. Por tanto, creemos que la extensión N-terminal es importante para la toxicidad de Ppz1.

También analizamos el nivel de toxicidad de dos versiones de Ppz1: G2A (no miristilable) y R451L (catalíticamente inactiva). El cambio G2A atenuó solo levemente la toxicidad de Ppz1, mientras que la versión R451L eliminó gran parte de la toxicidad. Es sabido que Ppz1 es capaz de inhibir la entrada de K^+ vía Trk1. La adición de K^+ logró mejorar el crecimiento de las células que portaban las versiones tanto de la Ppz1 nativa como de la versión G2A. Analizamos también el crecimiento de varios mutantes de la vía de respuesta a estrés osmótico (HOG) al sobreexpresar estas versiones de Ppz1. La delección de *HOG1* (que codifica la MAPK central de la vía HOG) redujo visiblemente la toxicidad de las 2 versiones. La ausencia de Nha1, un antiportador $Na^+, K^+/H^+$, produjo una reducción muy drástica de la toxicidad de la versión G2A. Por último, hipotetizamos un modelo en el que la sobreexpresión de Ppz1 podría alterar el funcionamiento de los transportadores Nha1 y Trk1, explicando el comportamiento de la versión G2A de Ppz1.

Els enzims Ppz són proteïnes fosfatases que es troben només en fongs i es caracteritzen per un domini catalític C-terminal molt conservat, semblant al de les fosfatases PP1c, i una regió N-terminal poc conservada. En *Saccharomyces cerevisiae*, les fosfatases Ppz estan codificades en els gens paràlegs *PPZ1* i *PPZ2*. Ppz1 és la proteïna més tòxica en sobreexpressió en llevat, alterant la proliferació cel·lular de manera dependent de la seva activitat fosfatasa, tot i que els mecanismes darrers d'aquesta toxicitat encara no han estat establerts. En aquest estudi intentem conèixer aquests mecanismes. Hem identificat alguns gens que codifiquen proteïnes ribosòmiques, així com factors implicats en la biogènesi de ribosomes com a supressors en multicòpia de l'efecte tòxic de Ppz1. Aquesta fosfatasa s'uneix als ribosomes que comencen a traduir, i l'excés de Ppz1 produeix una disminució en el contingut de polisomes. L'absència de la quinasa Gcn2 (regulador negatiu de l'inici de la traducció) parcialment suprimeix el defecte de creixement d'una soca que sobreexpressa Ppz1. Per tot això, proposem que part dels efectes de la sobreexpressió de Ppz1 es deuen a l'alteració de la síntesi de proteïnes.

Malgrat el seu domini catalític conservat, descrivim que Ppz2 no és tòxica quan se sobreexpressa en les mateixes condicions que Ppz1, tot i que els nivells de Ppz2 són més baixos. Sorprenentment, una versió híbrida composta pel segment N-terminal de Ppz1 i el domini catalític de Ppz2 va presentar la mateixa toxicitat que Ppz1, tot i mostrar nivells de proteïna comparables a Ppz2. Per tant, creiem que la extensió N-terminal és important per a la toxicitat de Ppz1.

També vam analitzar el grau de toxicitat de dos versions de Ppz1: G2A (no miristilable) i R451L (catalíticament inactiva). El canvi G2A va atenuar lleument la toxicitat de Ppz1, mentre que la versió R451L va eliminar gran part de la toxicitat. És conegut que Ppz1 és capaç d'inhibir l'entrada de K^+ via Trk1. L'addició de K^+ va millorar el creixement de les cèl·lules que portaven les versions tant de la Ppz1 nativa com de la versió G2A. Vam analitzar també el creixement d'alguns mutants de la via de resposta a l'estrès osmòtic (HOG) quan se sobreexpressaven aquestes versions de Ppz1. La deleció de *HOG1* (que codifica la MAPK central de la via HOG) va reduir de manera notable la toxicitat de les 2 versions. L'absència de Nha1, un antiportador $Na^+, K^+/H^+$, va produir una reducció molt dràstica de la toxicitat de la versió G2A. Per últim, hipotetitzem un model on la sobreexpressió de Ppz1 podria alterar el funcionament dels transportadors Nha1 y Trk1, explicant el comportament de la versió G2A de Ppz1.

The background features a large central circle with yellow diagonal stripes. Surrounding it are several other geometric elements: a green circle with diagonal stripes in the top-left; a light blue circle with a black diamond and a blue zigzag line in the top-right; a purple circle with a red diamond and a pink zigzag line in the bottom-left; and a purple circle with a red zigzag line and a red diamond in the bottom-right. A dark blue horizontal bar is positioned below the main title.

INTRODUCCIÓN

3.1. El organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un hongo unicelular del filo Ascomycota, perteneciente a la familia de los *Saccharomycetaceae*. En la naturaleza, se puede encontrar en la piel de la fruta y tiene una temperatura de crecimiento óptima de 28-30°C. Las cepas de laboratorio pueden existir en dos formas estables: haploide y diploide. Las células haploides proliferan mediante mitosis y son diferenciadas por sexo: tipo *a* o tipo *α*. Dos tipos opuestos de apareamiento pueden generar una célula diploide que, a su vez, puede: i) proliferar mediante mitosis o ii) llevar a cabo la meiosis, en condiciones de falta de nutrientes, produciendo 4 esporas haploides. *S. cerevisiae* puede crecer de manera aeróbica y anaeróbica utilizando como fuente de carbono diferentes azúcares, siendo la glucosa el preferido. Su genoma está compuesto por 16 cromosomas que contienen 12,1 Mpb y 6.604 presuntos genes, de los cuales un 79% ha sido verificado, un 11% están aún por caracterizar y un 10% son dudosos (<https://www.yeastgenome.org/genomesnapshot>; visitado el 17/08/2020).

La levadura *S. cerevisiae* se emplea en la industria alimentaria para realizar la fermentación alcohólica necesaria para la producción del pan, la cerveza o el vino. Además, se usa para la producción de diferentes compuestos de interés comercial y para la expresión heteróloga de proteínas. Debido a la sencillez de su cultivo y manipulación y al hecho de no ser un patógeno para humanos, *S. cerevisiae* se empezó a usar como organismo modelo para estudios metabólicos y genéticos. Fue el primer genoma eucariota en ser secuenciado (Goffeau *et al.*, 1996), y se ha convertido en una herramienta muy potente en genética molecular y metabólica. Dado que los mecanismos celulares que controlan las funciones básicas, como la replicación o la división celular, están muy conservados entre las levaduras y eucariotas superiores, *S. cerevisiae* es un modelo perfecto para revelar los misterios que la vida eucariótica esconde.

3.2. La fosforilación de proteínas como método de regulación

3.2.1. Visión general sobre la fosforilación de proteínas

La fosforilación de proteínas es uno de los mecanismos de regulación más importantes y extendidos en procesos biológicos como el metabolismo, la regulación génica, el ciclo celular y la respuesta a estímulos intra- y extracelulares. Se considera la modificación postraduccional más común: el 50% del proteoma de *S. cerevisiae* puede ser fosforilado (Oughtred *et al.*, 2019). Las proteínas se pueden fosforilar en nueve residuos: serina, treonina, tirosina, cisteína, arginina, lisina, aspartato, glutamato e histidina. La fosforilación de serina, treonina y tirosina es la predominante en células eucariotas, donde juega un papel regulador clave (Moorhead, 2009). Estudios realizados en el proteoma humano demuestran que la fosforilación de serina, treonina y tirosina representa aproximadamente el 86,4, 11,8 y 1,8%, respectivamente, del total de residuos fosforilados (Olsen *et al.*, 2006). El estado de fosforilación de una proteína depende de la acción opuesta de las proteínas quinasas (PK) y las proteínas fosfatasas (PP). La fosforilación cambia la carga neta de la proteína, alterando sus propiedades funcionales como, por ejemplo: i) su actividad biológica (ya sea aumento o disminución), ii) su localización subcelular (*i.e.* de citosol a núcleo), iii) su vida media o iv) las posibles interacciones con otras proteínas (creando o destruyendo éstas) (Cohen, 2002).

Un eucariota tipo dedica entre un 2 y un 4% de su genoma a codificar quinasas y fosfatasas (Manning *et al.*, 2002), y el número de quinasas suele ser mucho mayor que el de fosfatasas. En *S. cerevisiae* existen 127 quinasas y solo se han identificado 43 fosfatasas (Offley and Schmidt, 2019), y esta proporción se mantiene en eucariotas superiores. El genoma humano se cree que codifica 518 potenciales quinasas (Johnson and Hunter, 2005), de las cuales 428 son Ser/Thr quinasas, mientras que solo contiene *ca.* 150 genes que codifiquen fosfatasas, de los cuales alrededor de 30 serían Ser/Thr

fosfatasas. En el caso de *Drosophila melanogaster*, la relación quinasas / fosfatasas específicas de Ser/Thr es mayor que 6:1 (Morrison *et al.*, 2000).

Las fosfatasas han sido agrupadas según el residuo desfosforilado y clasificadas en tres familias: i) el grupo de las proteínas fosfatasas específicas de Ser/Thr, ii) la superfamilia de las proteínas fosfatasas de tirosina (PTP) y iii) el conjunto de las fosfatasas duales, capaces de desfosforilar tanto serina y treonina como tirosina.

3.2.2. Propiedades de las fosfatasas específicas de Ser/Thr

Las fosfatasas específicas de Ser/Thr conforman el grupo de fosfatasas más abundante. En un primer momento, las fosfatasas específicas de Ser/Thr fueron clasificadas mediante ensayos bioquímicos y divididas en tipo 1 (PP1) o tipo 2 (PP2). Una clasificación basada en ensayos bioquímicos y funcionales estableció criterios para subdividir las en 4 categorías principales: PP1, PP2A, PP2B y PP2C (Cohen, 1989).

En la actualidad, las fosfatasas específicas de Ser/Thr se dividen en función de su secuencia, estructura y propiedades enzimáticas en 2 grandes familias: fosfoproteínas fosfatasas (PPP) y proteínas fosfatasas dependientes de metales (PPM) (Figura A), aunque también se han descrito fosfatasas basadas en aspartato (Cohen, 1997).

a. Fosfoproteínas fosfatasas (PPP)

La familia de PPP la componen: PP1, PP2A, PP2B, PP4, PP5, PP6 y PP7. La caracterización bioquímica de las primeras fosfatasas purificadas indicó que PP1 desfosforila preferiblemente la subunidad β de la fosforilasa quinasa, mientras que las PP2 actúan sobre la subunidad α . Además, las PPP tienen distintas subunidades reguladoras. La actividad de la PP1 es sensible a los polipéptidos llamados Inhibidor-1 y -2, pero las PP2 no responden a éstos. La PP1 depende de iones de Mn^{2+} para catalizar la reacción de desfosforilación *in vitro*, mientras que la PP2A, no; la PP2B requiere iones

Ca²⁺ para realizar su función (Ingebritsen and Cohen, 1983). Estructuralmente, todas las PPP comparten un elevado grado de similitud, especialmente en el que se considera el *core* catalítico (compuesto por unos 150 residuos) (Cohen, 1991). Además de las fosfatasas tipo 1 y 2A, la familia de las PPP incluye un conjunto de enzimas estructuralmente relacionados, pero funcionalmente diferentes a éstas. Como se muestra en la Figura A, en *S. cerevisiae* podemos identificar ejemplos del tipo PP4 (Pph3), PP5 (Ppt1) y PP6 (Sit4) (Stark, 1996), mientras que no hay equivalentes del tipo PP7.

b. Proteínas fosfatasas dependientes de metales (PPM)

Esta familia está compuesta por la PP2C y las fosfatasas del enzima piruvato deshidrogenasa. La PP2C comparte las características típicas de PP2 (actuar sobre la subunidad α de la fosforilasa quinasa y no responder a los Inhibidor-1 y -2), pero no está relacionada por secuencia con las PPP y se caracteriza por su dependencia de iones Mg²⁺ y Mn²⁺. En contraste con la familia de las PPP, las PPM no disponen de subunidades reguladoras, sino que funcionan como enzimas monoméricos. De hecho, la cantidad de funciones realizadas por las PP2C posiblemente sea fruto de las diversas isoformas que existen. Por ejemplo, se han identificado al menos 14 genes en humanos, que darían lugar a más de 20 polipéptidos distintos debido a mecanismos de *splicing*. En *S. cerevisiae*, existen 7 isoformas de PPM (Ptc1-7, Figura A) que comparten un dominio PP2C conservado, que puede venir acompañado de extensiones amino-terminales (Ptc5 y Ptc7) o carboxilo-terminales (Ptc2 y Ptc3). De las 7 PPM, Ptc1 es la mejor caracterizada en levadura (Ariño *et al.*, 2011).

c. Las fosfatasas basadas en aspartato

Este grupo lo conforman las proteínas FCP/SCP (*TFIIF-associated component of RNA polymerase II CTD phosphatase/small CTD phosphatase*), que usan un mecanismo de catálisis basado en aspartato. Únicamente se ha encontrado como sustrato el dominio C-terminal (CTD) de la RNA polimerasa II, que contiene repeticiones en tándem de un heptapéptido rico en serinas (Shi, 2009). Estas fosfatasas dependen de magnesio para realizar sus funciones.

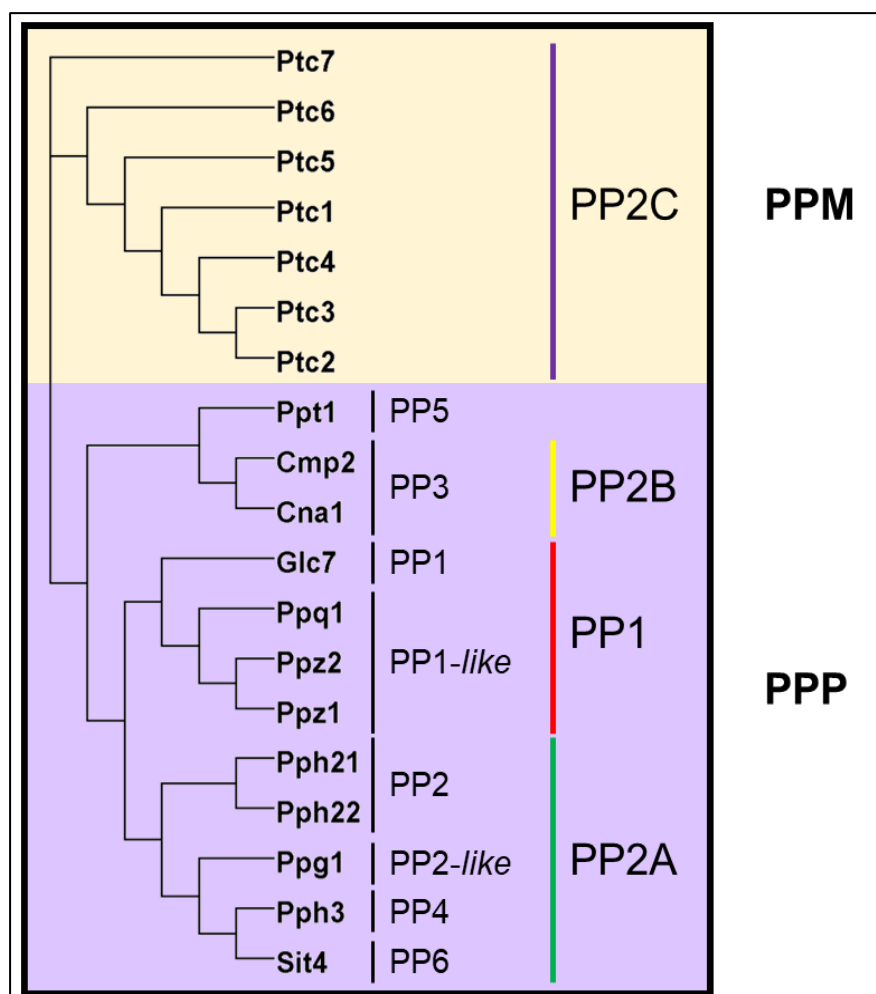


Figura A: Análisis filogenético de las subunidades catalíticas de las proteínas fosfatasas de *S. cerevisiae* S288C. El árbol fue obtenido a través de la función ETE3 del portal GenomeNet según los parámetros estándar (por defecto) (<https://www.genome.jp/tools-bin/ete>). Se empleó el programa libre Dendroscope (versión 3.7.2) para dar formato a los datos proporcionados por el portal web. El fondo está coloreado de acuerdo con la familia a la que pertenecen (PPP o PPM). Las secuencias de las proteínas mencionadas han sido extraídas de UniProt (<https://www.uniprot.org/>), con los códigos P32598 (Glc7), P26570 (Ppz1), P33329 (Ppz2), P32945 (Ppq1), P23594 (Pph21), P23595 (Pph22), P32345 (Pph3), P32838 (Ppg1), P20604 (Sit4), P23287 (Cna1), P14747 (Cmp2), P35182 (Ptc1), P39966 (Ptc2), P34221 (Ptc3), P38089 (Ptc4), Q12511 (Ptc5), P25646 (Ptc6), P38797 (Ptc7) y P53043 (Ppt1).

3.3. Las fosfatasas específicas de Ser/Thr tipo 1

Dentro de la familia de las PPP, la proteína fosfatasa 1 (PP1) fue uno de los primeros miembros en ser caracterizado bioquímicamente y es, probablemente, el más estudiado. En células eucariotas, la PP1 está involucrada en una gran variedad de funciones, a saber: la regulación del metabolismo del glucógeno, la contracción muscular, el procesamiento del RNA, la síntesis de proteína, la transmisión de los impulsos nerviosos, la inducción de la apoptosis y el control de los diferentes *checkpoints* presentes a lo largo del ciclo celular (Cannon, 2010; Verbinnen *et al.*, 2017). Para llevar a cabo dichas funciones cada enzima PP1 funcional se compone de una subunidad catalítica (PP1c) que se une a diversas subunidades reguladoras, necesarias para situar la PP1c en una localización subcelular concreta, modificar la especificidad de sustrato o la actividad enzimática.

La subunidad catalítica PP1c está muy conservada en todos los eucariotas, compartiendo una identidad de secuencia del 70% o superior. El número de genes que codifican la PP1 varía desde 1 gen presente en el genoma del protozoo parasitario *Giardia lamblia* o en el del mismo *S. cerevisiae* hasta 9 isoformas encontradas en la planta *Arabidopsis thaliana*.

En mamíferos, tres genes codifican la PP1c: PP1 α , PP1 β/δ y PP1 γ . Esta última da lugar a dos isoformas producidas por *splicing* alternativo (PP1 γ 1 y PP1 γ 2). En *S. cerevisiae*, el enzima PP1c está codificado en el gen esencial *GLC7* (Ohkura *et al.*, 1989; Feng *et al.*, 1991; Clotet *et al.*, 1991). El gen *GLC7*, así como todos los genes *GLC*, fue aislado en el estudio de mutantes que presentan una reducción del contenido de glucógeno (Feng *et al.*, 1991; Cannon *et al.*, 1994).

El gen *GLC7* codifica una proteína de 312 aminoácidos (36 kDa) idéntica en un 85% a las cuatro proteínas PP1 humanas. La región central de *Glc7* es también similar a las PP2A, PP2B y las fosfatasas Ppz de levadura. Se ha verificado la ortología de *Glc7* con

los isoenzimas humanos de PP1 por ensayos de complementación del mutante *glc7* con los 4 cDNAs de PP1c (Gibbons *et al.*, 2007).

Están disponibles múltiples estructuras tridimensionales de las diversas PP1c de mamíferos. La estructura de estas PP1 es prácticamente idéntica, a pesar de las diferencias entre sus secuencias y las condiciones necesarias para la cristalización. La subunidad catalítica PP1c adopta una estructura de plegamiento α/β compacto (Figura B), con un sándwich β entre dos dominios en hélice α , que son los extremos N- y C-terminal de la proteína (Egloff *et al.*, 1995). El sándwich β y los dos dominios en hélice α conforman un hueco en forma de Y en el centro del cual se encuentra el centro activo, compuesto por tres histidinas, dos aspartatos y una asparagina. Estos residuos son necesarios para la reacción, catalizada por un ión Mn^{2+} y un ión Fe^{2+} , y están muy conservados en todos los miembros de la familia PPP, sugiriendo un mecanismo común de la reacción catalizada por metales (Shi, 2009). La estructura en forma de Y dibuja tres surcos: el hidrofóbico, el ácido y el C-terminal.

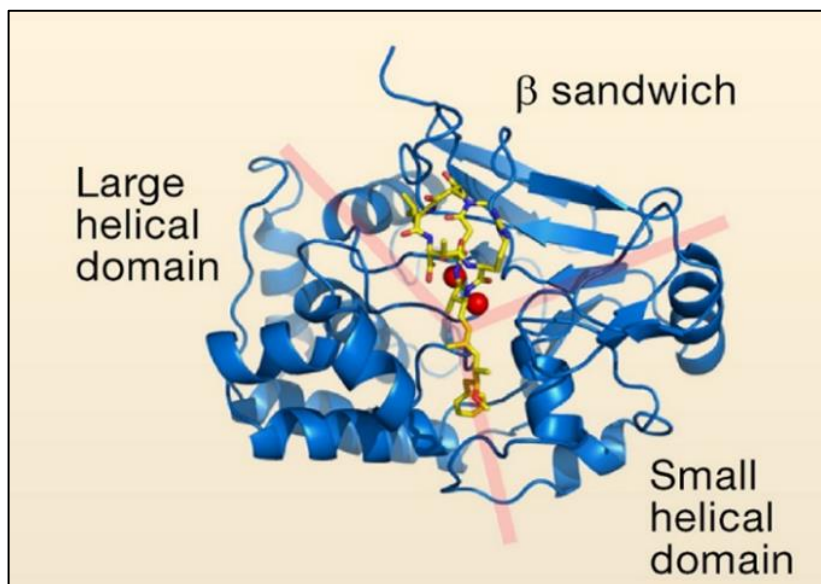


Figura B: Estructura de la subunidad catalítica de la proteína fosfatasa 1 (PP1c) de músculo de conejo. En azul, la estructura de la PP1c unida al ácido okadaico (en amarillo). La superficie en forma de Y está resaltada en rosa, y se define por tres dominios claramente diferenciados. Los iones Mn^{2+} y Fe^{2+} están representados por esferas rojas (Shi, 2009).

3.3.1. Subunidades reguladoras

La subunidad catalítica de la PP1 nunca se encuentra libre en la célula, sino asociada al menos a una de las más de 100 posibles subunidades reguladoras descritas en mamíferos (Moorhead *et al.*, 2007) o de las 30 presentes en *S. cerevisiae* (Cannon, 2010; Offley and Schmidt, 2019). Éstas dotan a la PP1c, que es relativamente pequeña, de gran diversidad funcional, modificando su actividad, localización subcelular o afinidad por el sustrato.

La mayoría de las subunidades reguladoras de PP1 se unen a ésta de la misma manera. A pesar de las diferencias en su secuencia, todas ellas contienen secuencias cortas de 4-8 residuos que proporcionan una superficie de interacción con la PP1c. Si bien estos motivos están conservados a lo largo de la evolución, han degenerado: se encuentran hasta 10 motivos diferentes en mamíferos, aunque no todos han sido descritos en levadura. En *S. cerevisiae*, la mayoría de las subunidades reguladoras interactúan con el surco hidrofóbico de Glc7 mediante la secuencia consenso identificable RVxF. De hecho, mutaciones en algunos residuos de este surco hidrofóbico reducen la afinidad por algunas subunidades reguladoras, causando defectos fenotípicos compatibles con una reducción de la actividad PP1c (Wu and Tatchell, 2001). Las subunidades reguladoras Afr1, Bni4, Bud14, Gac1, Gip2, Ref2, Reg1, Reg2 y Sla1 presentan un motivo RVxF necesario para la interacción con Glc7. Hay casos en los que la proteína reguladora contiene más de un motivo RVxF posible, aunque no necesariamente todos son requeridos para la interacción. También existen subunidades reguladoras que interactúan con Glc7 sin necesidad de motivo RVxF: i) Sds22 interactúa, mediante sus repeticiones ricas en leucina, con una región cercana al *core* catalítico de Glc7 (Ceulemans and Bollen, 2004) y ii) Pti1, componente necesario del *cleavage and polyadenylation factor* (CPF) que, aunque se desconoce el método de interacción con Glc7, se cree que no es basado en la secuencia RVxF. Por último, ha sido descrito el complejo en forma de trímero formado

por las subunidades Sds22 e Ypi1 con Glc7 como necesario para la translocación de la PP1c al núcleo (Pedelini *et al.*, 2007).

3.3.2. Funciones

La fosfatasa Glc7 puede jugar papeles diversos en diferentes compartimentos celulares. En el citosol, Glc7 se encarga de la síntesis de quitina, la regulación de las septinas, la endocitosis, la organización de la actina y la localización de la gema. En el núcleo, se encarga de la regulación transcripcional, la unión de los microtúbulos al cinetocoro y de diversos *checkpoints* de ciclo celular (revisión en Cannon, 2010 y en Figura D).

Glc7 está también involucrado en el metabolismo de carbohidratos. La PP1 se encarga de desfosforilar y activar la glucógeno sintasa, tanto en mamíferos como en levadura. En *S. cerevisiae*, se cree que Gac1 es la subunidad de Glc7 que regula el proceso de activación, ya que contiene un motivo RVxF de unión a la fosfatasa y una región de unión a la glucógeno sintasa (Wu and Tatchell, 2001).

La fosfatasa Glc7 juega un papel crucial en la vía de represión por glucosa. Las subunidades parálogas Reg1 y Reg2, con la colaboración de Sip5, regulan la desfosforilación e inactivación de la proteína quinasa Snf1 en presencia de elevadas concentraciones de glucosa (Sanz *et al.*, 2000; Maziarz *et al.*, 2016). La quinasa Snf1 forma parte del complejo SNF1, y es la homóloga en levadura de la AMPK de mamíferos. El complejo SNF1 está compuesto por: i) la subunidad α catalítica Snf1, ii) las tres subunidades β reguladoras Sip1, Sip2 y Gal83, y iii) la subunidad γ Snf4. La subunidad Snf1 contiene un dominio quinasa en la región N-terminal y un dominio regulador en el extremo C-terminal (Celenza and Carlson, 1986; Celenza and Carlson, 1989). El principal elemento regulador de la actividad catalítica de Snf1 es la fosforilación del residuo Thr210, situado en su dominio catalítico, por parte de las tres quinasas redundantes

upstream: Sak1, Elm1 y Tos3 (McCartney and Schmidt, 2001). Inicialmente, se describió que la presencia de las subunidades β era necesaria para la interacción entre Snf1 y Snf4 para formar el complejo (Jiang and Carlson, 1997). Poco después, se descubrió que las diferentes subunidades β regulan la localización subcelular del complejo SNF1: bajo condiciones de escasez de glucosa, las subunidades β se translocan a distintos compartimentos celulares, dirigiendo así la actividad quinasa hacia sustratos específicos (Vincent *et al.*, 2001). Gal83 es la subunidad β más abundante, la única que dirige al complejo al núcleo (Hedbacker and Carlson, 2006) y la responsable en mayor medida de la respuesta del complejo SNF1 a la limitación de glucosa (Hedbacker *et al.*, 2004). El holoenzima Reg1-Glc7 se une preferentemente a la isoforma que contiene Gal83, desfosforilando Snf1 y promoviendo su inactivación. Aunque Reg1-Glc7 es el principal regulador de la señalización mediante la ruta Snf1, otras fosfatasas como Ptc1 o Sit4 contribuyen a mantener Snf1 en su forma desfosforilada mientras la célula crece en presencia de glucosa (Ruiz *et al.*, 2011; Ruiz *et al.*, 2013). Una de las principales dianas de Snf1 es el represor transcripcional Mig1, encargado de silenciar la expresión de genes relacionados con la adaptación al crecimiento en condiciones de escasez de glucosa, y cuya fosforilación promueve su salida del núcleo (Figura C). Recientemente, se ha descrito la desfosforilación de Mig1 por parte de Reg1-Glc7, aparentemente de manera dependiente de glucosa, pero también se ha postulado la posible existencia de un mecanismo de regulación independiente de la PP1 y de la glucosa, que involucraría la fosforilación de un residuo de tirosina (Shashkova *et al.*, 2017).

Glc7 está relacionada también con la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR). La falta de Reg1 provoca hipersensibilidad a inductores de UPR, a la vez que se observa un aumento en la respuesta transcripcional dependiente de elementos UPR. Estos efectos son

compatibles con un estado de activación anómalo de Snf1 (Ferrer-Dalmau *et al.*, 2015; Kimura *et al.*, 2017).

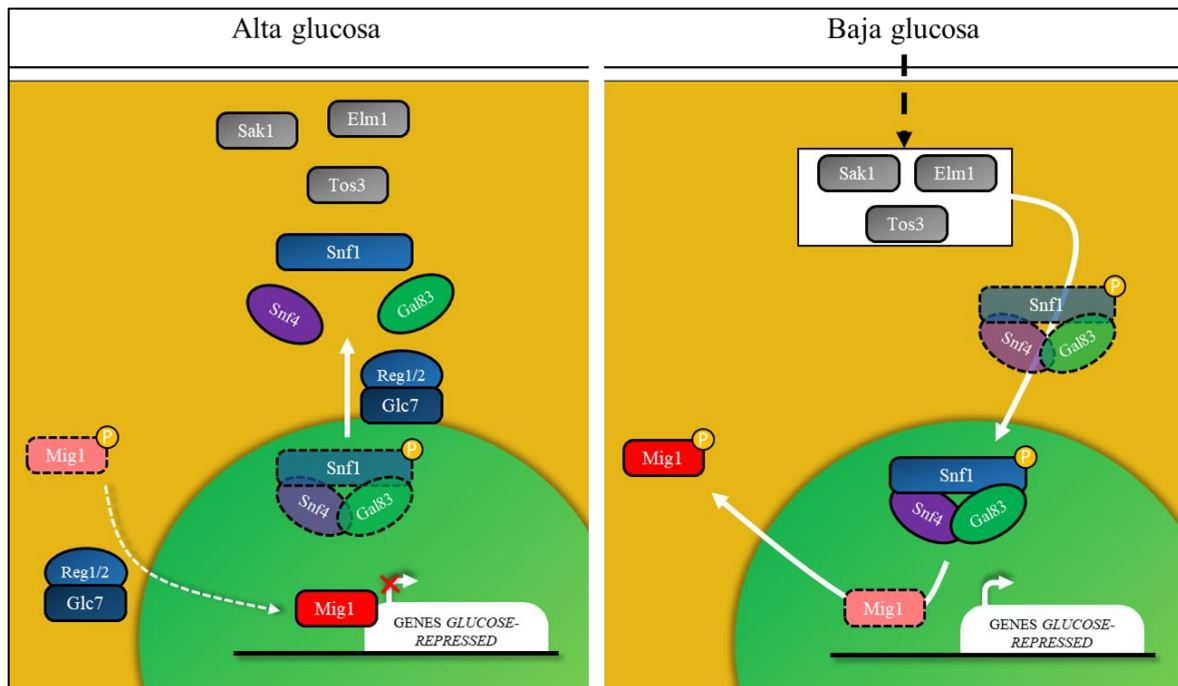


Figura C: Esquema del mecanismo de respuesta a baja disponibilidad de glucosa. La quinasa Snf1 se fosforila en condiciones de baja glucosa a través de una cascada de señalización (panel derecho), entra en el núcleo y desfosforila el represor transcripcional Mig1, promoviendo su salida hacia el citosol. En condiciones de alta glucosa (panel izquierdo), el tándem Reg1-Glc7 desfosforila Snf1, forzando su salida del núcleo. Se ha postulado la posible desfosforilación de Mig1 por parte del complejo Reg1-Glc7 (flecha discontinua).

La fosfatasa Glc7 es importante para muchos *checkpoints* de ciclo celular. La falta de la subunidad reguladora esencial Ypi1, el homólogo en levadura del Inhibidor-3 de mamíferos, activa el *checkpoint* morfogénico. Tras la pérdida de Ypi1 se observa una estabilización de Pds1, indicando la activación del *checkpoint* G₂/M (Marquina *et al.*, 2012). En condiciones normales, la mayoría de Glc7 se encuentra en el núcleo, así que es posible que los defectos observados puedan deberse a una alteración en la localización nuclear de la fosfatasa descrita en células sin Ypi1 (Pedelini *et al.*, 2007). La proteína Shp1, relacionada con la formación del *shmoo* y la localización de la gema, también podría ser un regulador de Glc7, trabajando de manera conjunta con la AAA-ATPasa Cdc48 y promoviendo la progresión del ciclo celular (Böhm and Buchberger, 2013). El complejo Cdc48-Shp1 funcionaría como una chaperona del complejo PP1,

específicamente promoviendo el ensamblaje de Glc7-Sds22-Ypi1 para la entrada a núcleo (Cheng and Chen, 2015). Recientemente, Shp1 ha sido descrita como necesaria para la desfosforilación de Rps6 (una proteína ribosómica relacionada con la activación de la vía TOR) por parte de Glc7 (Yerlikaya *et al.*, 2016).

Las subunidades reguladoras Afr1, Bni4 y Gip1 están relacionadas con la localización de diferentes septinas. El holoenzima Glc7-Bni4 es necesario para encontrar Chs3 (quitina sintasa III) en las gemas incipientes cuando Pho85-Pcl1,2 fosforila Bni4 (Kozubowski *et al.*, 2003; Zou *et al.*, 2009). Cabe destacar que la pérdida de Ypi1 causa también una caída en los niveles de la septina Cdc11 que podría explicar el defecto en el correcto ensamblaje de los anillos de septinas en el cuello de la gema (Marquina *et al.*, 2012). Recientemente, se ha propuesto a Ref2 como la subunidad reguladora de Glc7 necesaria para la desfosforilación de la formina Bnr1, permitiendo así la formación del anillo de actina y miosina previo a la citocinesis (Orii *et al.*, 2016).

La fosfatasa Glc7 está también implicada en la homeostasis de cationes monovalentes (Williams-Hart *et al.*, 2002). La ausencia de la subunidad reguladora Ref2 produce una sensibilidad a estrés salino que no se normaliza con la expresión de la variante F374A, incapaz de unirse a Glc7. Esto se explica por la incapacidad del mutante *ref2* de inducir completamente la expresión de *ENAI* (Ferrer-Dalmau *et al.*, 2010).

El factor de inicio de la traducción eIF2 es clave para el desarrollo del proceso de traducción. El complejo eIF2 está compuesto por tres subunidades: eIF2 α , eIF2 β y eIF2 γ , y el inicio de traducción requiere un eIF2 α desfosforilado en el residuo Ser51. La PP1 fue identificada como la fosfatasa de eIF2 α hace muchos años (Wek *et al.*, 1992). En mamíferos, se conocen dos subunidades de la PP1 necesarias para esta desfosforilación: GADD34 (Novoa *et al.*, 2001) y CReP (Jousse *et al.*, 2003), aunque no parecen tener

homólogos en levadura. En *S. cerevisiae*, Glc7 desfosforila eIF2 α interaccionando con un dominio NTD (*amino terminal domain*) presente en eIF2 γ (KKVAF) parecido al motivo RVxF que contienen muchas de sus subunidades reguladoras (Rojas *et al.*, 2014).

Por último, el gen *GLC7* es deletéreo para la célula cuando se sobreexpresa (Liu *et al.*, 1992), ya que provoca un mayor número de errores en la segregación cromosómica, parecido al que presenta un mutante *ipl1* (Francisco *et al.*, 1994). La letalidad que provoca el exceso de Glc7 precisa la función de Glc8, Reg2 y Sds22, indicando una correlación entre la importación al núcleo y la toxicidad de Glc7 (Ghosh and Cannon, 2013).

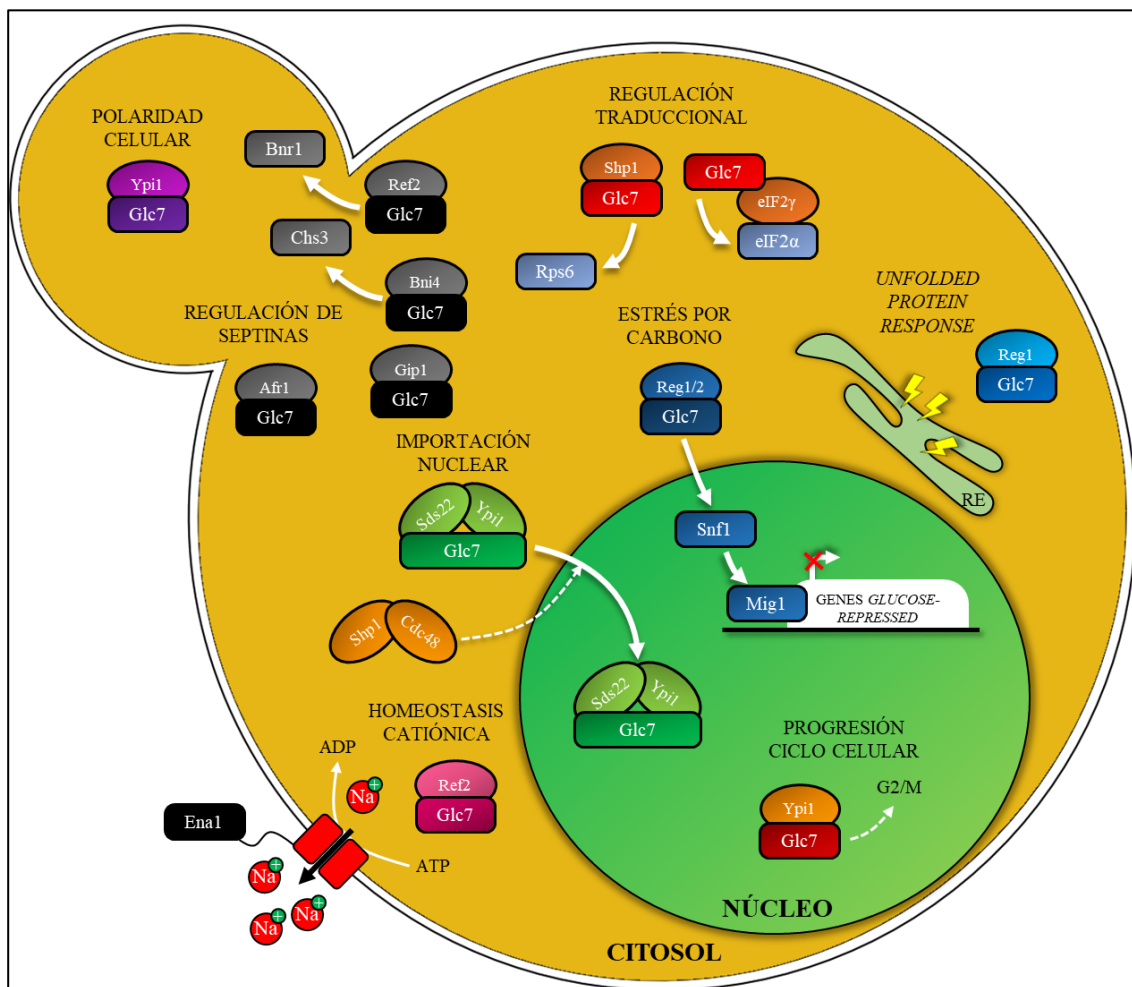


Figura D: Representación de las funciones realizadas por la PP1c en conjunto con sus subunidades reguladoras en *S. cerevisiae*. RE, Retículo endoplasmático.

3.4. Las fosfatasas Ppz1 y Ppz2 en *S. cerevisiae*

Las fosfatasas Ppz son enzimas parecidas a las PP1, pero mientras que éstas son ubicuas, las Ppz aparentemente están restringidas a hongos. Estas enzimas fueron identificados por primera vez en *S. cerevisiae*, donde encontramos los dos parálogos *PPZ1* y *PPZ2*. Se caracterizan por un dominio catalítico C-terminal muy bien conservado y parecido al de la fosfatasa PP1c (Glc7 guarda un 60,4% de identidad con el dominio catalítico de Ppz2 y un 57,1% con el de Ppz1), y una región N-terminal ampliamente desestructurada, rica en Ser, Thr y Asn, y muy variable en secuencia y tamaño entre hongos. Los genes *PPZ1* y *PPZ2* codifican proteínas de 692 y 710 aminoácidos, respectivamente, presentando un 32% de identidad en sus regiones N-terminales y un 86% en sus dominios C-terminales. *PPZ1* y *PPZ2* no son esenciales, mientras que *GLC7* sí lo es, por lo que las funciones que llevan a cabo las fosfatasas Ppz no deben coincidir por completo con las de la PP1c.

En su extensión N-terminal, las Ppz incluyen una Gly conservada en la posición 2 dentro de una secuencia consenso de N-miristilación. Se ha demostrado la miristilación *in vivo* de Ppz1 (Clotet *et al.*, 1996), y se ha descrito la miristilación *in vitro* de los octapéptidos iniciales de las fosfatasas Ppz por parte de la N-miristiloil transferasa Nmt1 (Johnson *et al.*, 1994). Esta modificación postraducciona confiere una localización subcelular concreta, mediando la interacción de la proteína con la membrana o favoreciendo su estabilidad (Yonemoto *et al.*, 1993). Recientemente, se ha descrito como residuo necesario para la localización de Ppz1 en la periferia celular (Lee *et al.*, 2019). Además, la región N-terminal de Ppz1 y Ppz2 contiene una secuencia relativamente conservada (⁴³SSRSRRSLPS⁵² y ⁴³SSRSLRSLRS⁵², respectivamente) en varios hongos bajo la forma consenso SxRSxRxxS, importante para la regulación de la homeostasis catiónica (Minhas *et al.*, 2012) (ver más abajo). Por otro lado, se han caracterizado fosfatasas Ppz en otros hongos, como *Schizosaccharomyces pombe* (Pzh1), *Neurospora crassa* (Pzl-1),

Aspergillus nidulans (PpzA), *Candida albicans* (CaPpz1), *Ustilago maydis* (UmPpz1) y *Cryptococcus neoformans* (CnPpz1) (Balcells *et al.*, 1997; Vissi *et al.*, 2001; Ádám *et al.*, 2012; Leiter *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2019a; Zhang *et al.*, 2019b). Estructuralmente, estas fosfatasa disponen de extensiones N-terminales más cortas que la Ppz1 de *S. cerevisiae*. En cuanto a funcionalidad, todas normalizan el fenotipo de sensibilidad a cafeína (ver más abajo) que presenta la delección del gen *PPZ1*, mientras que solo Ppz1 y CnPpz1 normalizan también la tolerancia a litio por completo.

3.4.1. Las funciones de Ppz1 en *S. cerevisiae*

Las propiedades catalíticas de la Ppz1 recombinante son reminiscentes a las de PP1. El dominio C-terminal es catalíticamente activo contra multitud de sustratos, como la proteína básica de la mielina, la histona 2A, la caseína (Posas *et al.*, 1995a) o la cadena ligera de la miosina (Petrényi *et al.*, 2016). Esta actividad fosfatasa, como en el caso de la PP1, depende de la presencia de iones Mn^{2+} . Ppz1 es sensible también a algunas toxinas que se unen al sitio activo de PP1c (ácido okadaico, microcistina-LR). Se cree que esto se debe a la secuencia GEFD presente en la región C-terminal de PP1c, que se encuentra representada también en los residuos 629-632 de Ppz1 (Posas *et al.*, 1995a). La principal diferencia con PP1 y PP2A es que Ppz1 es incapaz de desfosforilar *in vitro* la glucógeno fosforilasa (Posas *et al.*, 1995a). La actividad fosfatasa de Ppz1 es necesaria para su función y la actividad catalítica se pierde prácticamente por completo con la mutación en Arg451, un residuo altamente conservado en varias fosfatasas específicas de Ser/Thr de eucariotas que corresponde a la Arg95 de la PP1c (Clotet *et al.*, 1996).

Ppz1 fue descrita inicialmente en *S. cerevisiae* como una fosfatasa involucrada en el mantenimiento de la integridad de la pared celular (Posas *et al.*, 1993). No obstante, hace bastantes años se postuló que la actividad de Ppz1 es determinante en la homeostasis

catiónica (Posas *et al.*, 1995b; Yenush *et al.*, 2002). Cabe destacar que alteraciones en la homeostasis de Na^+ , K^+ y pH pueden tener un impacto notable en otros procesos celulares, como la regulación del ciclo celular, la traducción de proteínas, el establecimiento del potencial de membrana y la integridad de la pared celular.

En *S. cerevisiae*, la delección de *PPZ1* causa varios fenotipos, mientras que la delección de *PPZ2* no tiene ningún efecto observable, indicando la predominancia de la primera en las funciones celulares. Sin embargo, la delección de *PPZ2* sobre una cepa *ppz1* normalmente potencia la intensidad de los fenotipos de ésta.

a. Ppz1 y la regulación de la homeostasis catiónica en *S. cerevisiae*

Una característica importante de la fisiología de las células es el mantenimiento de la homeostasis iónica, que se consigue mediante mecanismos que regulan el tamaño de la célula, la concentración de cationes intracelulares, la turgencia, el pH interno y el potencial de membrana. Las células regulan cuidadosamente el flujo de iones a través de la membrana para llegar a un equilibrio interno, sobre todo en situaciones de cambios en el entorno. En particular, la concentración intracelular de los principales cationes monovalentes (H^+ , Na^+ y K^+) debe estar estrictamente regulada para evitar que se produzca un daño en la célula (Serrano, 1996).

Las levaduras son microorganismos que presentan una adaptación rápida a las continuas variaciones en el medio externo al que están expuestas. Estas células mantienen la homeostasis iónica mediante el uso que hacen de transportadores de membrana, en algunos casos diferentes a los de mamíferos. En *S. cerevisiae*, han sido identificados y caracterizados varios transportadores de iones y sus reguladores. Sus diferencias con los de mamíferos han promovido su estudio como posibles dianas antifúngicas (Ariño *et al.*, 2010).

El catión Na^+ puede ser abundante en la naturaleza y puede entrar en la célula a través de multitud de sistemas de baja afinidad de transporte de cationes. *S. cerevisiae* es capaz de mantener una baja concentración intracelular de Na^+ , incluso en presencia de concentraciones extracelulares elevadas de este catión, mediante la regulación coordinada de los sistemas de entrada y salida. Se han descrito dos importantes clases de transportadores para mediar la salida de sodio en *S. cerevisiae*: el antiportador $\text{Na}^+, \text{K}^+/\text{H}^+$ Nha1 y la familia de ATPasas Ena.

El descubrimiento de la relación entre Nha1 y la tolerancia a concentraciones tóxicas de sodio deriva de un escrutinio en el que se identificó *NHA1* como un gen que, en sobreexpresión, mejoraba el crecimiento de una cepa sensible a sal (Prior *et al.*, 1996). El gen *NHA1* codifica una proteína de 985 aminoácidos, con predicción de contener 12 segmentos transmembrana y una región citosólica C-terminal muy extensa (550 residuos). Nha1 está localizada en la membrana y actúa como antiportador de protones electrogénico que actúa en forma dimérica, con similar afinidad por Na^+ y K^+ , pero capaz de transportar también Rb^+ y Li^+ (Bañuelos *et al.*, 1998; Ohgaki *et al.*, 2005; Mitsui *et al.*, 2005). Por tanto, bajo condiciones de pH ácido, Nha1 puede transportar sodio fuera de la célula, aunque podría no ser su función fisiológica más relevante. De acuerdo con esto, el defecto o el exceso de Nha1 tienen un impacto en el pH citosólico, el potencial de membrana, la captación de potasio mediante el sistema Trk (ver más abajo) y en la adaptación temprana al estrés osmótico y por pH alcalino (Prior *et al.*, 1996; Sychrová *et al.*, 1999; Bañuelos *et al.*, 2002; Proft and Struhl, 2004; Kinclova-Zimmermannova and Sychrova, 2006; Kinclova-Zimmermannova *et al.*, 2006).

NHA1 está considerado un gen *housekeeping* que se expresa de manera constitutiva, ya que se ha descrito que su expresión no está regulada por condiciones de estrés osmótico o de pH (Bañuelos *et al.*, 1998). Han sido identificados varios residuos necesarios para la

actividad y para la especificidad de sustrato (Ariño *et al.*, 2010). Una secuencia corta de 16 residuos situada entre el último dominio transmembrana y el principio de la región citosólica es necesaria para su función y para su correcta localización en la membrana, mientras que la región 920-930 está relacionada con el transporte de Li^+ (Kinclová *et al.*, 2001; Mitsui *et al.*, 2004). La cola citosólica C-terminal se ha relacionado con la progresión del ciclo celular (ver sección 3.5). Como se ha mencionado arriba, Nha1 está relacionada con la adaptación inicial al estrés hiperosmótico. Se ha descrito que la MAPK Hog1 fosforila rápidamente los residuos Thr765 y Thr876 de Nha1 ante un estrés salino, lo que se postula que provoca la activación del antiportador (Proft and Struhl, 2004). La proteína quinasa Hog1 es el regulador central de la vía de respuesta al estrés hiperosmótico (HOG). La exposición de las células a elevadas concentraciones de sal activa toda una cascada de señalización que termina activando Hog1 (Brewster *et al.*, 1993; Maeda *et al.*, 1994). La actividad de Hog1 depende absolutamente de la doble fosforilación de su motivo TGY por parte de su MEK Pbs2. Por lo que respecta a la homeostasis catiónica, una vez activado Hog1, se activa un programa de adaptación celular basado en: i) la acumulación de glicerol (Albertyn *et al.*, 1994; Hohmann *et al.*, 2007) y ii) la restauración del balance iónico (Proft and Struhl, 2004).

Hog1 se inactiva a los 30 minutos del choque osmótico mediante la desfosforilación de uno de sus dos residuos fosforilados. Las fosfatasas Ptc1, Ptc2 y Ptc3 desfosforilan el residuo Thr174, mientras que Ptp2 y Ptp3 se encargan de la Tyr176. Sin embargo, Ptc1 y Ptp2 son las principales reguladoras del estado de fosforilación de Hog1. De hecho, la doble mutación *ptc1 ptp2* es sintética letal debido a la hiperactivación de Hog1 (Maeda *et al.*, 1993). La delección de *PTC1* produce una actividad basal de Hog1 elevada y una activación de Hog1 que permanece más en el tiempo tras un choque osmótico (Warmka *et al.*, 2001). Cabe resaltar que la desfosforilación de Hog1 por parte de Ptc1 requiere la

presencia de Nbp2, que facilita la interacción entre la fosfatasa y el sustrato (Mapes and Ota, 2004).

En condiciones de pH extracelular ácido, Nha1 permite la exportación de sodio, mientras que a pH más elevados, el transportador Ena1 es el principal responsable de la salida de este catión (Bañuelos *et al.*, 1998). El cromosoma IV de muchos genomas de levadura contienen 3-5 copias de *ENA* en tándem que codifican proteínas prácticamente idénticas (Ariño *et al.*, 2010), compuestas por 1091 residuos y cuya estructura predicha contiene 10 segmentos transmembrana y un dominio de unión a nucleótidos entre la cuarta y la quinta hélices transmembrana. Los transportadores Ena se localizan en la membrana, y utilizan la energía generada por la hidrólisis del ATP para transportar K^+ , Na^+ y Li^+ (con distintas afinidades) en contra de gradiente (Haro *et al.*, 1991; Benito *et al.*, 1997). La ausencia de todos los genes *ENA* produce una marcada sensibilidad a sal y a pH alcalino, confirmando la implicación de estos genes en la exportación de sodio y litio (Haro *et al.*, 1991). *ENAI* fue el primer miembro del grupo en ser identificado y es ampliamente aceptado como el componente funcionalmente relevante del *cluster ENA* (Haro *et al.*, 1991; Wieland *et al.*, 1995; Yenush *et al.*, 2005).

En condiciones normales de crecimiento, la expresión de los genes *ENA* es muy baja, pero cuando las células son expuestas a una elevada concentración de sodio o litio, o a un pH alcalino, la expresión de *ENAI*, pero no la del resto de genes del tándem, se induce de manera potente (Garcia de Blas *et al.*, 1993; Mendoza *et al.*, 1994). Además, se ha observado una respuesta transcripcional de *ENAI* bajo condiciones de escasez de glucosa (Alepez *et al.*, 1997), mostrando una represión de la expresión en presencia de glucosa en el medio. La regulación transcripcional de *ENAI* requiere la intervención de múltiples rutas (calcineurina, Snf1, PKA, Hog1...) que transmiten las señales a su promotor, el cual contiene diversos elementos de regulación reconocidos específicamente por factores de

transcripción (*Crz1*, *Mig1*, *Nrg1*, *Sko1*...) que activan o silencian la transcripción de acuerdo con la señal.

Las fosfatasa Ppz de *S. cerevisiae* juegan un papel importante en la homeostasis catiónica (Figura E), en parte, porque afectan al nivel de expresión de *ENAI* (Posas *et al.*, 1995b; Ariño, 2002). Ppz1 juega un rol en la tolerancia a sal, y cepas carentes de *PPZ1* presentan un fenotipo fuerte de hipertolerancia a iones litio y sodio, exacerbado por la delección adicional de *PPZ2* (Posas *et al.*, 1995b). Por tanto, el efecto de Ppz1 sobre la expresión de *ENAI* es opuesto al descrito para la Ser/Thr fosfatasa calcineurina, un efector positivo del gen de la ATPasa (Mendoza *et al.*, 1994). Se ha descrito que el efecto de la ausencia de Ppz1 en la expresión de *ENAI* requiere la integridad funcional de la vía de la calcineurina (Ruiz *et al.*, 2003), sugiriendo que Ppz1 regula negativamente la actividad de la calcineurina. Sin embargo, Ppz1 también impacta en la tolerancia a sal de manera independiente de *ENAI*. La primera evidencia fue la observación de que la sobreexpresión de la proteína quinasa Sky1 incrementa la sensibilidad a LiCl de manera dependiente de Ppz1, pero no de Ena1 (Erez and Kahana, 2001).

Las fosfatasa Ppz también están implicadas en la regulación de la concentración del potasio intracelular (Figura E). Dicha regulación es importante, ya que el K^+ es el catión intracelular responsable en mayor medida del volumen celular, la turgencia, el potencial de membrana y la fuerza iónica. La captación de potasio es necesaria para reducir el potencial de membrana, previniendo así la entrada de cationes tóxicos, como el sodio o el litio (Gómez *et al.*, 1994). La levadura *S. cerevisiae* dispone de un sistema de alta afinidad y un sistema de baja afinidad para el transporte de potasio (Rodríguez-Navarro and Ramos, 1984). El sistema de alta afinidad se compone de los transportadores Trk1 y Trk2 (Gaber *et al.*, 1988; Ko *et al.*, 1990; Ko and Gaber, 1991), donde Trk1 es el transportador fisiológicamente más relevante. Trk1 es una proteína de membrana de 180

kDa, cuya estructura predicha se compone de 12 dominios transmembrana, presente exclusivamente en los llamados *lipid rafts* (Yenush *et al.*, 2005). La delección de los dos genes *TRK* resulta en un defecto notable en el transporte de potasio y un fenotipo de crecimiento lento en condiciones de escasez de potasio, que se normaliza con la adición de este catión al medio.

Los transportadores Trk son regulados mediante modificaciones postraduccionales, como por ejemplo la fosforilación. Varias proteínas quinasas y fosfatasas controlan la actividad y/o la estabilidad de Trk1 y Trk2. Por ejemplo, las quinasas Hal4 y Hal5 son necesarias para mantener las proteínas Trk en la membrana plasmática, especialmente bajo condiciones de escasez de potasio. No obstante, no se ha demostrado la fosforilación directa de los Trk por parte de Hal4 ni de Hal5, aunque la fosforilación de Trk1 por parte de quinasas ha sido demostrada *in vivo* e *in vitro* (Mulet *et al.*, 1999; Yenush *et al.*, 2005; Swaney *et al.*, 2013).

Las fosfatasas Ppz1 y Ppz2 están implicadas en la regulación de la actividad Trk. Se desconoce cómo se regula el transporte de K^+ por parte de las Ppz, pero se ha descrito que Trk1 interacciona físicamente con Ppz1, y que el nivel de fosforilación de Trk1 incrementa en una cepa carente de los genes *PPZ* (Yenush *et al.*, 2005). Sin embargo, no se ha demostrado la desfosforilación directa de Trk1 por parte de Ppz1. Aun así, cabe destacar que la aportación a la entrada de K^+ por parte de HvHak1 (un transportador de K^+ de cebada presente también en algunas especies de hongos, pero no en *S. cerevisiae*) expresado de manera heteróloga en *S. cerevisiae*, aumentó en ausencia de *PPZ1* (Fulgenzi *et al.*, 2008). Esto sugiere que los mecanismos de regulación que controlan la homeostasis de K^+ en los hongos podría estar conservada.

Una regulación apropiada del sistema Trk por parte de las fosfatasa Ppz es esencial para el mantenimiento de la homeostasis del pH y del K^+ . El defecto o el exceso de los genes *PPZ* produce diversos efectos que dependen de Trk causados por alteraciones en las concentraciones intracelulares de potasio. Un aumento en la concentración de potasio provoca la salida masiva de protones para mantener el balance eléctrico y, por tanto, una alcalinización del citosol. El incremento del pH intracelular podría señalar el promotor de *ENA1*, que responde a pH alcalino. Además, el incremento en la turgencia causa un estrés constante en la pared celular activando así la ruta Slt2/Mpk1, como se detalla más abajo.

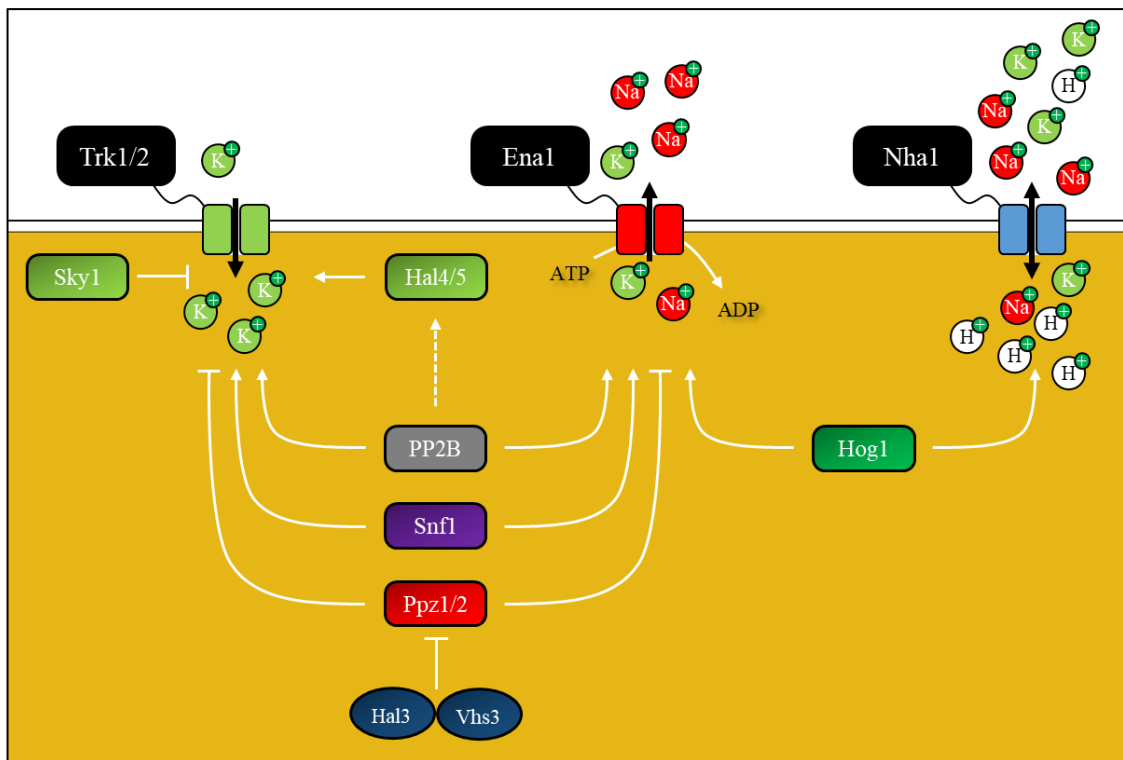


Figura E: Esquema en el que se resumen los diferentes mecanismos de regulación de los transportadores Trk, Ena1 y Nha1. Modificado a partir de Ariño *et al.*, 2010.

b. Las fosfatasas Ppz y el mantenimiento de la integridad de la pared celular

La levadura *S. cerevisiae* consume una cantidad considerable de su energía en la construcción de la pared celular, cuya masa puede llegar a ser el 10-25% del total de la masa celular (peso seco), dependiendo de las condiciones de crecimiento (Aguilar-

Uscanga and François, 2003). La principal función de la pared es mantener la forma celular y actuar como barrera de protección contra agentes externos físicos o químicos (Klis *et al.*, 2006). Dada la importancia de esta estructura, su formación y mantenimiento está bajo el control estricto de un mecanismo de regulación conocido como la vía de la integridad de la pared celular (CWI). Esta ruta está compuesta por varias proteínas de membrana, como Wsc1 y Mid2, que actúan como sensores de la vía de señalización. Su señal activa una GTPasa pequeña (Rho1), que transduce la señal y activa la proteína quinasa C (Pkc1). La quinasa Pkc1 es un miembro de una vía de MAPK, que consiste en varias proteínas quinasas (Bck1, Mkk1, Mkk2 y Slk2) que, en respuesta a ciertos estímulos y mediante una cascada de fosforilación, termina activando la MAPK Slk2. Esta activación provoca la fosforilación de multitud de proteínas diana nucleares (como el factor transcripcional Rlm1) y citosólicas que activan la transcripción específica de genes para responder a un daño en la pared celular (Levin, 2005).

La ruta CWI está activa durante el crecimiento vegetativo y la morfogénesis inducida por feromonas en las células de levadura. De hecho, Wsc1 actúa como un sensor en el primer caso, mientras que Mid2 lo hace en el segundo. La vía de señalización CWI también interviene en la respuesta a agentes (Rojo Congo, blanco de Calcoflúor, zimoliasa o cafeína) o condiciones ambientales (choque térmico, hipoosmótico o pH alcalino) que dañan la pared celular (Levin, 2005). Mutaciones en determinados elementos que componen esta vía, como la delección de *SLT2*, da lugar a células que se lisan ante condiciones que comprometen la integridad de la pared celular, como elevadas temperaturas o concentraciones de sal. Además, las células carentes de Slk2 son particularmente sensibles a la cafeína o al blanco de Calcoflúor. El fenotipo lítico de este mutante se puede evitar con la adición de sorbitol 1 M al medio, que actúa como estabilizador osmótico.

Las fosfatasas Ppz se relacionaron inicialmente con el mantenimiento de la integridad de la pared celular en *S. cerevisiae*, ya que el gen *PPZ2* fue identificado como un supresor en multicopia del fenotipo lítico asociado con la delección de *SLT2* (Lee *et al.*, 1993). Defectos líticos similares a los observados en cepas que carecen de componentes de la vía Slt2 (mutantes *bck1*, *mkk1/mkk2* o *slt2*) se han descrito también en los mutantes *PPZ*, como mayor tamaño celular (morfología alargada), y sensibilidad a cafeína o temperaturas altas, que provocan la lisis celular. Como en el caso del mutante *slt2*, los defectos de los mutantes *ppz* se suprimen con la presencia de sorbitol 1 M (Hughes *et al.*, 1993; Posas *et al.*, 1993). Además, los efectos causados por las delecciones de los genes *PPZ* son aditivos a los causados por la falta de Slt2. La relación entre la vía Slt2 y las fosfatasas Ppz se explica por el nexo existente entre estas fosfatasas y la regulación de la captación de potasio. Así, el incremento en la turgencia intracelular causado por la mayor captación de potasio de la cepa doble mutante *ppz1 ppz2* provocaría un aumento en la presión sobre la pared, que produciría una activación de la vía. De hecho, en el doble mutante *ppz1 ppz2* se observa una mayor actividad Slt2 (Yenush *et al.*, 2002; Merchan *et al.*, 2004).

c. La relación entre la fosfatasa Ppz1 y el ciclo celular

En cualquier célula eucariota, y por tanto en *S. cerevisiae*, el ciclo celular consiste en una sucesión de etapas: la replicación del DNA (conocida como fase S) y su partición en dos genomas completos (fase M), separadas entre sí por dos intervalos llamados G₁ (previo a la fase S) y G₂ (previo a la fase M). El ciclo celular está estrictamente regulado a través de dos *checkpoints* principales: i) G₁/S, que determina la replicación del DNA, ya que controla la adecuación de las condiciones para llevar a cabo un nuevo ciclo de división (condiciones externas apropiadas, tamaño de la célula...), y ii) G₂/M, que regula la entrada a mitosis tras la verificación de que el DNA se ha duplicado correctamente en la

fase S (Tyson *et al.*, 2002). En *S. cerevisiae*, un nuevo ciclo de duplicación está regulado por un punto de control llamado START en la transición G₁/S (Johnson and Skotheim, 2013). Para entrar en el ciclo celular, la célula precisa unos niveles de actividad del complejo formado por la quinasa dependiente de ciclinas (CDK) Cdc28 y las ciclinas de G₁ suficientes para proceder con la síntesis de DNA, la formación de la gema y la replicación del *spindle pole body*.

En mamíferos, existen varias CDK que regulan el ciclo celular, mientras que *S. cerevisiae* solo dispone de Cdc28 (Mendenhall and Hodge, 1998; Miller and Cross, 2001). Hacia el final de la mitosis, el complejo formado por Cdc28 y la ciclina Cln3 se encarga del control del tamaño de la célula. Cuando la célula alcanza las dimensiones apropiadas, Cdc28-Cln3 activa factores de transcripción que inducen la expresión de genes específicos de la fase G₁, que incluyen las ciclinas *CLN1*, *CLN2*, *CLB5* y *CLB6* (Koch *et al.*, 1996). La transcripción de genes específicos para la transición G₁/S también requiere la actividad de algunas fosfatasa, como Glc7 y Sit4 (Fernandez-Sarabia *et al.*, 1992; Hisamoto *et al.*, 1994).

En *S. cerevisiae*, el gen *SIT4* codifica una fosfatasa de 311 residuos que fue identificada inicialmente en un *screen* como supresor de un defecto transcripcional en *HIS4* (Arndt *et al.*, 1989). Más tarde, se describió como necesario para la transición G₁/S (Sutton *et al.*, 1991). La fosfatasa Sit4 se requiere para la expresión de las ciclinas de G₁ Cln1 y Cln2, y del factor de transcripción Swi4, y células carentes de *SIT4* presentan defectos en la formación de la gema (Fernandez-Sarabia *et al.*, 1992; Di Como *et al.*, 1995). La delección de *SIT4* en algunos fondos genéticos (células carentes de *SSD1* o que contienen alelos *ssd1-d*) es letal, mientras que en otros solo presenta un fenotipo notable de crecimiento lento (Sutton *et al.*, 1991; Doseff and Arndt, 1995).

La fosfatasa Ppz1 también ha sido postulada como un elemento regulador de la transición G₁/S (Figura F). La sobreexpresión de *HAL3*, que codifica la subunidad reguladora de Ppz1 (ver sección 3.5), mejoró considerablemente el defecto de crecimiento del mutante *sit4*, de manera dependiente de *PPZ1* (Di Como *et al.*, 1995; Clotet *et al.*, 1999).

De acuerdo con esto, la sobreexpresión de *PPZ1* causa un bloqueo del crecimiento, una caída en la expresión de las ciclinas *CLN2* y *CLB5*, y un mayor número de células sin gema, todas ellas características de un retraso en la transición G₁/S (Clotet *et al.*, 1999; Merchan *et al.*, 2004). Por el contrario, la delección de *PPZ1* atenúa el defecto de crecimiento lento del mutante *sit4* y adelanta la expresión de *CLN2* y *CLB5*, favoreciendo la entrada en la fase S. La conexión entre las fosfatasas Sit4 y Ppz1 muestra que Ppz1 afecta la transición G₁/S de manera opuesta a como lo hace Sit4. Además, Ppz1 regula negativamente ciertos procesos que afectan el proceso de gemación, y este efecto es independiente de Sit4, Bck2 o Cln3 (Clotet *et al.*, 1999).

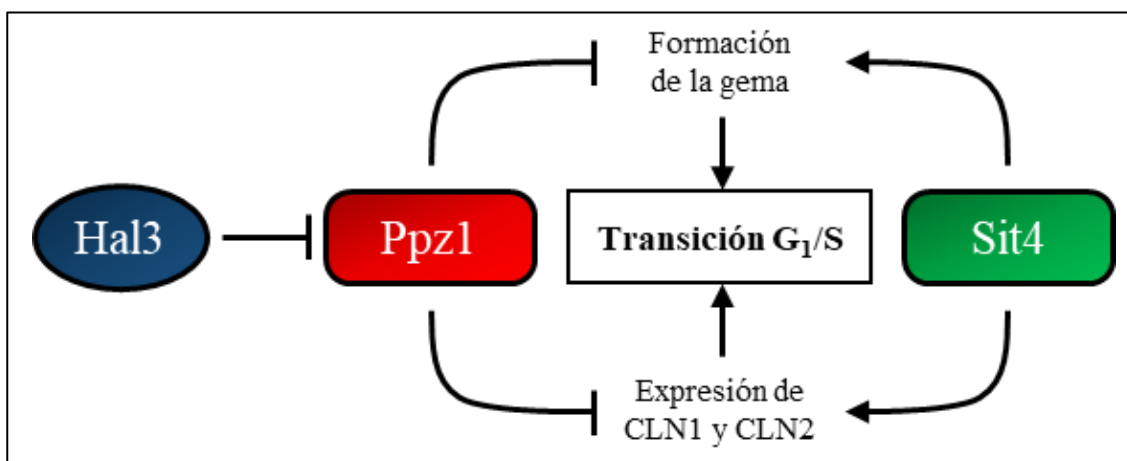


Figura F: Representación simplificada de la regulación del ciclo celular por parte de las fosfatasas Ppz1 y Sit4. Adaptado de Clotet *et al.*, 1999.

d. Ppz1 y el proceso de traducción de proteínas

La traducción de proteínas se conoce como el proceso por el cual la información contenida en un RNA mensajero es descodificada por los ribosomas y, a su vez, estos generan polipéptidos específicos. Este proceso se compone de las fases de iniciación,

elongación y terminación, y se cree que las fosfatasa Ppz podrían estar influenciando la elongación. Así, se ha descrito la interacción *in vivo* entre Ppz1 y el factor de elongación 1B α (Tef5), que es el factor de intercambio de GDP por GTP (GEF) del factor de elongación 1, y que el residuo conservado Ser86 de Tef5 está hiperfosforilado en la cepa doble mutante *ppz1 ppz2*. De hecho, la falta de las fosfatasa Ppz resulta en un aumento del *readthrough* en los tres codones STOP, sugiriendo que la fidelidad de traducción podría estar afectada (De Nadal *et al.*, 2001). Esta relación se ha visto reforzada por la influencia de Ppz1 en la eficiencia del *readthrough* y la manifestación del determinante antisupresor no Mendeliano [ISP(+)] (Aksenova *et al.*, 2007).

e. Otras funciones de las fosfatasa Ppz

Se ha descrito la implicación de las fosfatasa Ppz en la homeostasis de ubiquitina. La delección de *PPZ1* y *PPZ2* provoca una caída en los niveles de ubiquitina que se debe, en parte, a un aumento en la fosforilación de la Ser57 (Lee *et al.*, 2017). Poco después, se ha descrito que Ppz1 regula mediante fosforilación la endocitosis del transportador de metionina Mup1 (Lee *et al.*, 2019). La disponibilidad de metionina externa provoca la endocitosis de Mup1 de manera dependiente de Art1, una proteína adaptadora de la ubiquitina ligasa Rsp5. La fosfatasa Ppz1 desfosforila Art1, y es necesaria para facilitar la unión entre Art1 y Mup1.

3.5. Las subunidades reguladoras de las fosfatasa Ppz: Hal3 y Vhs3

En *S. cerevisiae*, se han descrito más de 30 subunidades reguladoras para PP1c, mientras que solo dos han sido identificadas para las fosfatasa Ppz. Estas subunidades funcionan como reguladores negativos y se llaman Hal3 y Vhs3.

En 1995, el gen *HAL3* fue aislado en dos laboratorios de manera independiente. Por un lado, Di Como y colaboradores caracterizaron *HAL3* (llamado entonces *SIS2*) como un

supresor en multicopia del defecto de crecimiento del mutante *sit4* (Di Como *et al.*, 1995). Por otro lado, Ferrando y colaboradores mostraron un fenotipo de tolerancia a sodio cuando una cepa silvestre sobreexpresaba el gen *HAL3* (Ferrando *et al.*, 1995). *HAL3* se expresa constitutivamente y codifica una proteína de 562 aminoácidos localizada en el citosol (Ferrando *et al.*, 1995). La proteína Hal3 contiene una cola C-terminal de unos 80 residuos caracterizada por un elevado número de residuos ácidos, sobre todo aspárticos. Se ha descrito que la expresión de *ENA1* es mayor en células que sobreexpresan *HAL3*, sugiriendo un mecanismo que explica la tolerancia observada a elevadas concentraciones de sal (Ferrando *et al.*, 1995; De Nadal *et al.*, 1998; Ruiz *et al.*, 2003). Además, la sobreexpresión de *HAL3* incrementa la captación de potasio en una cepa silvestre mediante la regulación de los transportadores Trk (Ferrando *et al.*, 1995; Yenush *et al.*, 2002) e induce la lisis celular en un mutante *slt2*, que puede ser rescatado con un estabilizador osmótico (De Nadal *et al.*, 1998). Todos estos fenotipos se explicarían mediante una regulación de Ppz1 por parte de Hal3. Efectivamente, Hal3 interacciona con el dominio catalítico C-terminal y la Ppz1 entera, inhibiendo así su actividad (De Nadal *et al.*, 1998).

Como se ha mencionado más arriba, la sobreexpresión de *HAL3* mejora el crecimiento del mutante *sit4*, debido a la restauración de los niveles de expresión de las ciclinas de G₁ (Di Como *et al.*, 1995; Clotet *et al.*, 1999). Además, se ha demostrado que la doble mutación *sit4 hal3* es sintética letal, y que esta letalidad se puede suprimir con: i) la delección de *PPZ1* (Clotet *et al.*, 1999), lo cual sugiere que la hiperactivación de Ppz1 podría bloquear el ciclo, y ii) la sobreexpresión de *NHA1*, que podría sugerir un rol de Nha1 en la progresión del ciclo celular, aunque se desconocen los mecanismos (Simon *et al.*, 2001). Cabe destacar que el efecto positivo de Nha1 no depende de su capacidad para transportar iones, y que no se observó el efecto supresor sobreexpresando *Ena1* o el

antiportador Sod2 de *Schizosaccharomyces pombe*. Se ha descrito que la sobreexpresión de Hal3 produce un aumento en el nivel de fosforilación de Tef5, de acuerdo con su papel como regulador negativo de Ppz1 (De Nadal *et al.*, 2001). Por todo esto, Hal3 ha sido caracterizado como regulador negativo de Ppz1 en todos los roles conocidos de la fosfatasa.

La proteína Hal3 no guarda similitud con ninguna de las subunidades reguladoras de PP1c, y tampoco es capaz de interactuar con Glc7 (De Nadal *et al.*, 1998; García-Gimeno *et al.*, 2003), pese a que contiene una secuencia parecida (²⁶³KLHVLF²⁶⁸) al motivo RVxF que contiene la mayoría de subunidades de PP1c (Bollen *et al.*, 2010). En nuestro laboratorio se había demostrado previamente que la sustitución del residuo His265, que forma parte de esta secuencia, por Gly, no afectaba a la capacidad de unión e inhibición de Ppz1, sugiriendo que el mecanismo de interacción entre Hal3 y Ppz1 no es similar al de PP1c con sus subunidades reguladoras (Muñoz *et al.*, 2004). Un estudio de mutagénesis al azar reveló residuos de Hal3 relevantes para su función sobre Ppz1. Se identificaron 2 residuos (Glu460 y Val462) cuyas mutaciones generaron versiones de Hal3 incapaces de inhibir a Ppz1, pero sin afectar su capacidad de unión a la fosfatasa. Por tanto, se cree que existen elementos estructurales de Hal3 diferenciales para la unión y para la inhibición de Ppz1 (Muñoz *et al.*, 2004).

Vhs3 está relacionada estructuralmente con Hal3 y también regula negativamente Ppz1 (Ruiz *et al.*, 2004). El gen *VHS3* fue identificado como supresor en multicopia de la letalidad de la cepa doble mutante condicional *sit4 hal3* (Muñoz *et al.*, 2003). La proteína Vhs3 consta de 674 residuos, comparte un 49% de identidad de secuencia con Hal3, y mantiene su cola ácida C-terminal característica (Ruiz *et al.*, 2004). Se ha demostrado que el exceso de *VHS3* produce una variedad de fenotipos semejantes a los que provoca la sobreexpresión de *HAL3* (Ruiz *et al.*, 2004). Por ejemplo, la sobreexpresión de *VHS3*:

i) rescata el bloqueo de la transición en G₁/S del mutante *sit4*, ii) agrava el fenotipo lítico del mutante *slt2* y iii) mejora la tolerancia a sal en una cepa silvestre e incrementa los niveles de expresión de *ENAI*, aunque los efectos son menos notables que en el caso de *HAL3*. Vhs3 se une al dominio catalítico y a la Ppz1 entera e inhibe su actividad fosfatasa *in vitro* con eficiencia prácticamente idéntica a Hal3. Sin embargo, la delección de *VHS3* no reduce la tolerancia a sal, fenotipo observado en un mutante *hal3*. Por eso, Vhs3 se considera un regulador negativo de Ppz1 con un rol biológico menos relevante que Hal3. De hecho, esta menor relevancia se podría explicar porque los niveles de proteína *VHS3* son inferiores a los de *HAL3* (Ho *et al.*, 2018). Cabe destacar que el doble mutante *hal3 vhs3* es sintético letal, pero este fenotipo no mejoró al deleccionar *PPZ1*, *PPZ2*, o ambos genes. Esto sugirió que Vhs3 y/o Hal3 debían tener alguna función independiente de las fosfatasas Ppz pero necesaria para la supervivencia de la célula (Ruiz *et al.*, 2004).

En *S. cerevisiae* encontramos también *CAB3*, que codifica una proteína esencial relacionada estructuralmente con Hal3, con la que comparte una identidad de secuencia del 28%. Además, contiene una cola ácida C-terminal de longitud similar a la de Hal3. Sin embargo, se ha demostrado que Cab3 no es capaz de inhibir la actividad fosfatasa de Ppz1 (Ruiz *et al.*, 2009).

Se ha descrito que Hal3 y Vhs3 son proteínas *moonlighting* que se asocian con Cab3 para formar un enzima heterotrimérico con actividad PPCDC (Ruiz *et al.*, 2009). En la mayoría de los organismos eucariotas, la actividad PPCDC recae sobre un homotrímero con tres centros catalíticos (ver más abajo), cada uno situado en la zona de unión entre dos monómeros, mientras que en *S. cerevisiae* se forma un solo centro catalítico, en la zona de interacción de Cab3 con Hal3 o Vhs3. Esto explica la necesidad del gen *CAB3* para la supervivencia de la célula y el fenotipo sintético letal de la doble mutación *hal3 vhs3* (Ruiz *et al.*, 2009). Se ha propuesto que Vhs3 tendría una mayor tendencia a formar

heterotrómeros, de manera que Hal3 tendría más facilidad para estar en forma monomérica, interaccionar con Ppz1 e inhibir su actividad (Abrie *et al.*, 2015).

Como se ha mencionado previamente, la condición heterotrimérica del complejo PPCDC de *S. cerevisiae* es bastante sorprendente ya que, en la mayoría de los organismos eucariotas, éste funciona como un homotrómero. Por ejemplo, la proteína Hal3 de *Arabidopsis thaliana* es capaz de conformar un homotrómero con función PPCDC. Sin embargo, este Hal3 es mucho más pequeño, carece de la extensión N-terminal y de la cola ácida presente en algunos de sus ortólogos fúngicos, como el de *C. albicans* (Petrényi *et al.*, 2016). Esta región central conservada conforma el llamado dominio PD. En *S. cerevisiae*, el dominio PD es necesario para la unión y regulación de Ppz1, aunque la cola ácida C-terminal es necesaria para su inhibición (Muñoz *et al.*, 2004; Abrie *et al.*, 2012). Además, se ha descrito que, tanto la versión nativa de Hal3 como una versión que solo contiene la región PD, es capaz de formar homotrómeros. La variante L405E no presenta esta capacidad, y se cree que la mutación podría disrumpir un posible *core* hidrofóbico del trímero. Sin embargo, esta versión de Hal3 mantiene intacta su capacidad de interacción con Cab3, lo que explica que la función PPCDC no se vea alterada *in vivo*. Cabe destacar que esta mutación también disminuyó la capacidad de unión a Ppz1 *in vitro* y supuso una pérdida parcial de la regulación de Ppz1 *in vivo* (Santolaria *et al.*, 2018).

3.6. El efecto tóxico derivado de la sobreexpresión de Ppz1

La actividad de Ppz1, igual que la de Glc7, debe estar sometida a una constante regulación, ya que la sobreexpresión de esta fosfatasa se ha descrito como deletérea para la célula (Clotet *et al.*, 1996; De Nadal *et al.*, 1998). La expresión de *PPZ1* bajo el control de su propio promotor en un vector episomal produce ya un defecto de crecimiento significativo, exacerbado cuando la Ppz1 se sobreexpresa desde un promotor fuerte, como

GALI-10. También se ha demostrado que la sobreexpresión de la mitad C-terminal de Ppz1 causa un fenotipo similar, mientras que en el caso de la mitad N-terminal no se observa ningún efecto (Clotet *et al.*, 1996). El defecto de crecimiento causado por la sobreexpresión de *PPZ1* se contrarresta notablemente cuando se sobreexpresa *HAL3* (De Nadal *et al.*, 1998).

De acuerdo con estos resultados, un estudio a gran escala en *S. cerevisiae*, en el que se analizaron cuántas copias de un gen bajo el control de su propio promotor tolera la célula, identificó Ppz1 como la proteína más tóxica en sobreexpresión (Makanae *et al.*, 2013).

Un trabajo paralelo realizado en nuestro laboratorio ha demostrado que el efecto tóxico del exceso de Ppz1 se debe al incremento de la actividad fosfatasa (Chunyi Zhang, Tesis Doctoral; Calafí *et al.*, 2020). La sobreexpresión de la versión nativa bloqueó el crecimiento, mientras que la versión catalíticamente defectiva R451L permitió un crecimiento sustancial de las células. Cabe destacar que esta mutación no altera la unión de Ppz1 con su subunidad reguladora Hal3 (De Nadal *et al.*, 1998). Por último, el defecto de crecimiento provocado por el exceso de Ppz1 no se atenuó con la sobreexpresión de la PPCDC de humanos (Chunyi Zhang, Tesis Doctoral). Estos resultados indican que la toxicidad no se debería a un posible secuestro de las subunidades reguladoras Hal3 y Vhs3, esenciales en la vía de la biosíntesis de coenzima A.

Por otro lado, se ha postulado que las fosfatasas Ppz podrían compartir funciones con Glc7. Por ejemplo, la doble mutación *ppz1 ppz2* presenta interacción genética negativa con algunos alelos de *GLC7* (Venturi *et al.*, 2000). De hecho, se ha descrito, mediante ensayos de doble híbrido, una interacción física entre Ppz1 y Glc8 (subunidad reguladora de Glc7 homóloga al Inhibidor-2 de mamíferos) más potente que entre Glc8 y la propia

Glc7 (Venturi *et al.*, 2000). Estas evidencias sugieren que Ppz1 y Glc7 podrían compartir ciertas subunidades, y que podría existir un solapamiento en sus funciones.

3.7. Biogénesis de ribosomas y traducción de proteínas en *S. cerevisiae*

Los ribosomas son los orgánulos celulares que catalizan la síntesis de proteínas, conocida universalmente como traducción. En el proceso de traducción, los ribosomas descodifican el código genético del mRNA y sintetizan las proteínas (Wool, 1979). Los ribosomas maduros están compuestos por dos subunidades: una grande (LSU) y una pequeña (SSU), ambas formadas por RNA ribosómico (rRNA) y proteínas ribosómicas (RP) asociados por uniones intermoleculares. Ambas subunidades ribosómicas realizan funciones distintas en la síntesis de proteínas: la LSU cataliza la formación del enlace peptídico y la SSU es la responsable de la descodificación (Schmeing and Ramakrishnan, 2009). En eucariotas, los ribosomas maduros son conocidos como 80S, y se componen de la subunidad grande 60S y de la subunidad pequeña 40S. En *S. cerevisiae*, la LSU está formada por 46 RP y los rRNA 25S, 5,8S y 5S, mientras que la SSU consiste en 33 RP y el rRNA 18S (Ben-Shem *et al.*, 2011).

3.7.1. Proteínas ribosómicas

Las proteínas ribosómicas comparten ciertas características: la mayoría son pequeñas, ricas en residuos básicos (excepto las proteínas del tallo del ribosoma, que son ácidas) y tienen dominios intrínsecamente desestructurados. Su naturaleza básica es importante para neutralizar las cargas negativas de los rRNA, ya que prácticamente todas las RP interaccionan directamente con el rRNA. En general, las RP están distribuidas por la superficie de las subunidades del ribosoma (Ben-Shem *et al.*, 2011).

Como se menciona más arriba, existen 79 RP en *S. cerevisiae*, 59 de las cuales están codificadas en parejas de genes parálogos (Kellis *et al.*, 2004). Las secuencias

aminoacídicas de los parálogos son muy similares, pero no idénticas, y los efectos causados por la ausencia de uno u otro gen son diferentes, sugiriendo la posibilidad de funciones específicas para cada parólogo (Chaillou, 2019). El ensamblaje del ribosoma conteniendo una u otra RP resulta en poblaciones ribosómicas heterogéneas, y se especula con la posibilidad de que cada población pueda llevar a cabo roles fisiológicos distintos. Los cambios en la composición ribosómica ocurren también a otros niveles: modificaciones postraduccionales de RP, formas alternativas de rRNA y modificaciones postranscripcionales de rRNA, así como la unión a otras proteínas (Genuth and Barna, 2018). Dada esta heterogeneidad, ha surgido la idea de ribosomas especializados (Chaillou, 2019).

3.7.2. Biogénesis de ribosomas

La síntesis de ribosomas es un proceso muy importante. Las células producen 2000 ribosomas por minuto en la fase de crecimiento exponencial (Warner, 1999). Esto consume muchos recursos celulares, ya que requiere la síntesis de rRNA y de RP, y la presencia de 76 RNA nucleolares pequeños (snoRNA) y más de 200 proteínas no ribosómicas, también conocidas como factores de ensamblaje del ribosoma (para una revisión, véase Woolford and Baserga, 2013). Estos factores aportan velocidad, eficiencia y direccionalidad al proceso de la síntesis de ribosomas y participan en su regulación.

La biogénesis de ribosomas empieza en el nucleolo, donde se producen los pre-rRNA y se forman las partículas pre-ribosómicas (Figura G). Estas partículas pre-ribosómicas viajan a través del nucleoplasma hasta el citosol, donde se realizan los últimos pasos de maduración (Woolford and Baserga, 2013). Este proceso es extremadamente dinámico: muchos factores se tienen que asociar, realizar su función y disociarse para permitir el siguiente paso. Por tanto, la biogénesis ribosómica debe estar bajo una regulación

rigurosa, ya que defectos en el ensamblaje del ribosoma tienen consecuencias deletéreas. De hecho, la desregulación del proceso de biogénesis del ribosoma se ha relacionado con varias enfermedades humanas (Teng *et al.*, 2013).

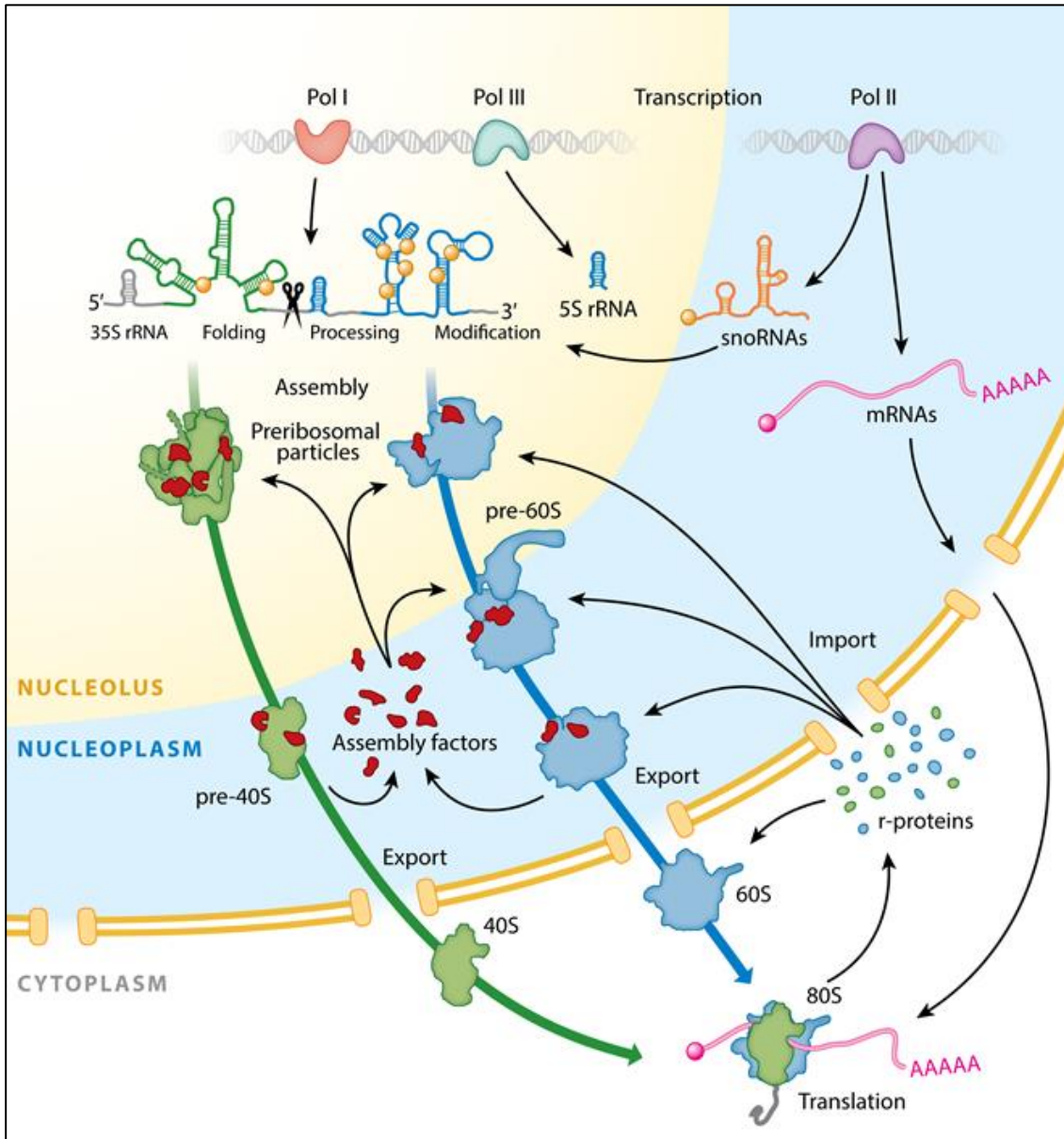


Figura G: Esquema de la vía de maduración del ribosoma. Durante la transcripción, el pre-rRNA se pliega, se procesa y sufre modificaciones postranscripcionales. En este punto, los factores de ensamblaje del ribosoma y las proteínas ribosómicas se van uniendo a los pre-rRNA nacientes para formar las partículas pre-ribosómicas, que van madurando a lo largo de su paso por el nucleoplasma y, finalmente, el citosol. Una vez allí, las subunidades 40S y 60S maduras se unen formando un ribosoma 80S competente. Imagen extraída de Baßler and Hurt, 2019.

La producción de ribosomas depende de la disponibilidad de nutrientes, de la adaptación al estrés y de la capacidad de progresar a través del ciclo celular. Las vías de señalización de TORC1 y de la proteína quinasa A (PKA) regulan este proceso, controlando los niveles

de pre-rRNA y de RP de manera transcripcional y postranscripcional (de la Cruz *et al.*, 2018).

El primer paso en la biogénesis de ribosomas es la transcripción del DNA ribosómico (rDNA). En *S. cerevisiae*, existen unas 150 repeticiones en tándem de la unidad transcripcional de rDNA localizadas en el cromosoma XII. Cada unidad transcripcional contiene los pre-rDNA 35S (que será procesado para dar lugar a los rRNA maduros 18S, 5.8S y 25S) y 5S (Woolford and Baserga, 2013). A pesar del elevado número de copias del rDNA, solo la mitad se transcribe simultáneamente bajo condiciones de crecimiento exponencial, mientras que la otra mitad se mantiene inactiva. Las condiciones de crecimiento pueden modular esta proporción, ya que ciertos estreses ambientales como una depleción de nutrientes provoca una caída en los niveles de traducción del rDNA. Se ha postulado que el elevado número de repeticiones de la unidad transcripcional de rDNA podría servir como una defensa contra las mutaciones, manteniendo la integridad genómica (Ide *et al.*, 2010).

En levadura, la RNA polimerasa (RNAP) III transcribe el pre-rRNA 5S, mientras que la RNAP I transcribe el 35S. Ambos transcritos son procesados (mediante un proceso llamado maduración) de manera post- o cotranscripcional, aunque esta última se observa con mayor frecuencia. El procesamiento de los pre-rRNA comienza en el nucleolo, en el contexto de partículas pre-ribosómicas y es un proceso que consta de múltiples pasos (para una revisión, véase Woolford and Baserga, 2013). Mediante sucesivos cortes en los pre-rRNA, los transcritos iniciales son divididos en segmentos de distinta longitud, en un proceso donde participan los ya mencionados factores de ensamblaje. A medida que los rRNA van madurando, nuevas proteínas ribosómicas van interaccionando con éstos, formando las partículas pre-ribosómicas llamadas pre-40S y pre-60S, que son translocadas al citosol, donde se llevan a cabo los últimos pasos de maduración.

Finalmente, la célula dispone de subunidades ribosómicas maduras capaces de realizar el proceso de traducción.

3.7.3. La iniciación de la traducción y su regulación

El proceso de traducción se divide en tres etapas: iniciación, elongación y terminación. El inicio de la traducción es el proceso por el cual las dos subunidades del ribosoma se ensamblan correctamente para dar lugar a un ribosoma 80S funcional, en el que el codón de inicio está emparejado con el anticodón del tRNA iniciador ($\text{tRNA}_i^{\text{Met}}$) en el sitio P del ribosoma (Jackson *et al.*, 2010).

El mecanismo de inicio de traducción está regulado por un grupo de proteínas altamente conservado llamados factores de inicio (eIF, e por eucariotas) y proteínas asociadas. Este proceso se compone de dos pasos: i) la formación del complejo de inicio 48S, en el que la interacción codón-anticodón se da correctamente en el sitio P de la subunidad 40S, y ii) la unión del complejo 48S con la subunidad 60S, para formar el ribosoma 80S (Figura H).

Para la formación del complejo 48S, se necesita previamente el ensamblaje del complejo de preinicio (PIC) 43S, compuesto por la subunidad ribosómica 40S, el complejo ternario ($\text{eIF2}^{\text{GTP}}\text{-Met-tRNA}_i^{\text{Met}}$), eIF1A, eIF3 y eIF5 (Hinnebusch, 2005). Además, se requiere la correcta formación del llamado *closed loop complex*, compuesto por un *loop* entre la caperuza 5' y la cola poli-A del mRNA, y las proteínas eIF4G, eIF4A, eIF4E y Pab1 (Tomek and Wollenhaupt, 2012). Una vez ensamblados, el PIC 43S y el *closed loop complex* forman el complejo 48S, que juntamente con la subunidad ribosómica 60S y el eIF5B constituyen el complejo de inicio 80S (Jackson *et al.*, 2010).

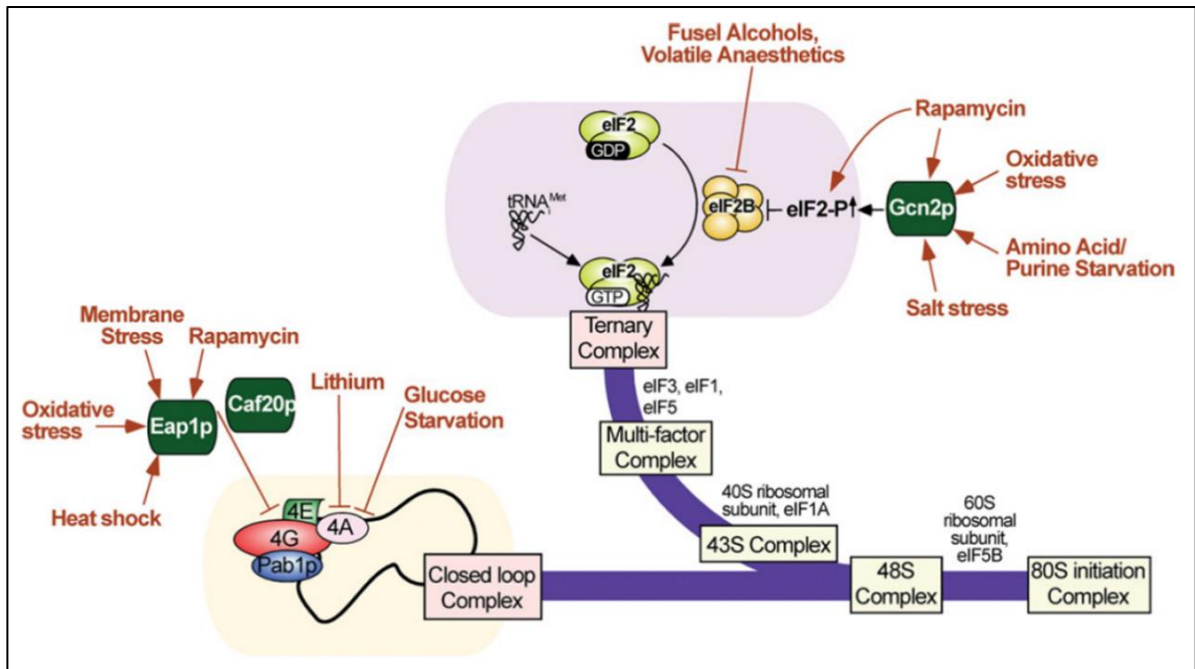


Figura H: Mecanismos de regulación del inicio de traducción en *S. cerevisiae*. El inicio de la traducción está regulado mediante dos vías: i) la formación del complejo ternario y ii) la formación del *closed loop complex*. Por un lado, la quinasa Gcn2 se activa en respuesta a varios estreses y fosforila la subunidad α del factor de inicio 2 (eIF2 α), que impide el correcto funcionamiento de eIF2B (proteína GEF). eIF2B se encarga de realizar el intercambio de GDP por GTP en el eIF2, de manera que la fosforilación de eIF2 α inhibe la formación del complejo ternario. Por otro lado, la formación del *closed loop complex* requiere la unión de eIF4E con eIF4G. Las 4E-BP (en levadura, Eap1 y Caf20) se unen a eIF4E e impiden esta unión, inhibiendo la formación del complejo y el inicio de la traducción. Imagen extraída de Simpson and Ashe, 2012.

El proceso de inicio de la traducción está estrictamente regulado, y esto es totalmente necesario para la célula, ya que le permite adaptarse a cambios ambientales. Las rutas de señalización GAAC y TOR juegan un papel clave en la regulación del inicio de la traducción frente a diferentes estreses (Sonenberg and Hinnebusch, 2009; Simpson and Ashe, 2012). Esta regulación afecta la formación tanto del *closed loop complex* como del complejo ternario.

Tras una depleción de aminoácidos, hay un incremento de los tRNA descargados. Esto activa la proteína quinasa Gcn2, responsable de la fosforilación en el residuo Ser51 de la subunidad α del factor de inicio eIF2 (Dever *et al.*, 1992; Dey *et al.*, 2011), codificado en el gen *SUI2* de *S. cerevisiae*. El eIF2 α fosforilado en la Ser51 actúa como un inhibidor competitivo de eIF2B (que tiene función GEF), provocando una acumulación de la forma

inactiva de eIF2 (eIF2^{GDP}), disminuyendo la cantidad de complejos ternarios y, por tanto, reduciendo la velocidad de inicio de la traducción (Gordiyenko *et al.*, 2019). Además, la inhibición del inicio de la traducción se puede producir a causa de otros estreses, como la exposición a concentraciones elevadas de sal, estrés oxidativo o rapamicina, un inhibidor de TORC1 (Hinnebusch, 2005; Simpson and Ashe, 2012).

La asociación entre el factor de inicio 4F (eIF4F) y la estructura de la caperuza 5' del mRNA es esencial para la traducción de la mayoría de genes. eIF4F es un complejo heterotrimérico formado por eIF4E, que es la proteína de unión a la caperuza, eIF4A, la RNA helicasa, y eIF4G, la subunidad *scaffold*. Esta última se encarga de permitir la interacción entre eIF4A y eIF4E. El ensamblaje del complejo eIF4F está regulado por una familia de proteínas conocidas como proteínas de unión a 4E (4E-BP), que compiten con eIF4G por la unión de eIF4E, inhibiendo así el inicio de la traducción (Mader *et al.*, 1995; Haghghat *et al.*, 1995). *S. cerevisiae* codifica dos 4E-BP, llamadas Caf20 (también conocida como p20) y Eap1, que no guardan homología ni entre sí ni con las 4E-BP de metazoos, excepto por el motivo canónico YxxxxLΦ (Altmann *et al.*, 1989; Lanker *et al.*, 1992; Altmann *et al.*, 1997; Cosentino *et al.*, 2000). Estas proteínas son capaces de inhibir el inicio de traducción *in vitro* compitiendo con eIF4G y están implicadas en distintos procesos celulares mediante la regulación de la traducción de mRNA específicos (Altmann *et al.*, 1997; Cosentino *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2018). Se ha descrito que estreses como el choque térmico o la exposición a rapamicina son capaces de afectar el inicio de la traducción vía Eap1 (Cosentino *et al.*, 2000; Deloche *et al.*, 2004).

The background features several overlapping geometric shapes and patterns. In the top left, there is a green semi-circle with diagonal white stripes. To its right is a light blue semi-circle containing a black diamond outline and a blue zigzag line. In the center, a large yellow semi-circle with diagonal white stripes is the focal point. Below it, a dark blue horizontal bar spans the width of the page. In the bottom left, there is a purple semi-circle with a red diamond outline and a blue semi-circle with diagonal white stripes. In the bottom right, there is a purple semi-circle with a pink zigzag line and a red semi-circle with diagonal white stripes.

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Cepas y medios de levadura

Las células *S. cerevisiae* fueron cultivadas a 28°C (si no se estipula lo contrario) en medio YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona y 2% dextrosa). En caso de albergar plásmidos, las células fueron cultivadas en medio sintético (SC) (0,17% YNB sin sulfato amónico ni aminoácidos, 0,5% sulfato amónico, 2% glucosa y 0,13% mezcla *drop-out* carente de leucina (-LEU) o uracilo (-URA), según necesidad). En algunos casos, se empleó menor cantidad de glucosa (Glu), o ésta fue sustituida por otra fuente de carbono especificada en el texto, como rafinosa (Raf) o galactosa (Gal) al 2%. Las placas se prepararon con un 2% de agar. Las cepas de levadura utilizadas en este estudio se presentan en la Tabla A1 (véase sección 10). Las cepas que contenían el gen *PPZI* bajo el control de un promotor reprimible por doxiciclina (sea integrado o en un vector) se crecieron siempre en presencia de 100 µg/mL de doxiciclina, si no se especifica lo contrario.

4.2. Técnicas de DNA recombinante

La bacteria *Escherichia coli* DH5α fue empleada como hospedadora de DNA plasmídico y se creció a 37°C en medio LB suplementado con 50 µg/mL de ampicilina. Las técnicas de DNA recombinante se realizaron como está descrito en Green and Sambrook, 2012.

Las purificaciones de fragmentos de DNA, ya sean productos de PCR o digestiones usando enzimas de restricción, se realizaron por electroforesis en gel de agarosa. El DNA presente en las zonas de interés fue purificado usando el kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up (Macherey-Nagel).

Las transformaciones de *S. cerevisiae* y *E. coli* se realizaron según los métodos estándar (Green and Sambrook, 2012). En el caso de *S. cerevisiae*, cuando se empleó un *cassette* de interrupción kanMX4, tras el choque térmico las células fueron resuspendidas en 500

μL de YPD e incubadas con agitación a 28°C durante 3 horas para permitir la expresión del gen de resistencia, y sembradas en placas YPD suplementadas con G418 (200 μg/mL).

La inserción de los *cassettes* de delección fue comprobada por PCR de colonia. Brevemente, una pequeña porción de la colonia se resuspendió en 10 μL de agua y se hirvió durante 5 min en un bloque térmico a 95°C. Inmediatamente después, se congeló a -20°C durante un mínimo de 10 min. Para llevar a cabo la PCR se utilizó 1 μL de esa muestra como DNA molde.

4.3. Cassettes de delección y disrupciones génicas

Los *cassettes* kanMX4-Tta-TetO2 (3,8 kpb) y kanMX4-Tta-TetO7 (4,0 kpb) se amplificaron por PCR empleando los vectores pCM224 y pCM225, respectivamente, y los oligonucleótidos OMLM1 y OMLM2 (Tabla A2, véase sección 10), y se introdujeron en la cepa silvestre BY4741 para dar lugar a las cepas MLM03 y MLM04, respectivamente. La inserción de los *cassettes* entre los nucleótidos -51 y -5 (relativos al codón ATG iniciador de *PPZI*) fue verificada por PCR usando los oligonucleótidos OMLM5, OMLM6 y K2.

Para generar la cepa CCP05, se transformó la cepa BY4741 con el *cassette gal4::kanMX4* (2,7 kpb), amplificado por PCR a partir del DNA de la cepa *gal4* (EUROFAN) usando los oligonucleótidos GAL4_Fw y GAL4_Rv. La inserción se verificó por PCR usando los oligonucleótidos GAL4_Comp y K2 (1,0 kpb). La cepa CCP06 se generó usando los oligonucleótidos GAL11_Fw y GAL11_Rv (2,7 kpb) y se verificó la inserción del *cassette* de disrupción empleando GAL11_Comp y K2 (0,8 kpb). La cepa CCP08 se construyó empleando los oligonucleótidos PGD1_Fw y PGD1_Rv (2,9 kpb) y se verificó la inserción del *cassette* de disrupción empleando PGD1_Comp y K2 (0,9 kpb). La cepa CCP09 se generó usando los oligonucleótidos MED2_Fw y MED2_Rv (3,2 kpb) y se

verificó la inserción del *cassette* de disrupción empleando MED2_Comp y K2 (1,1 kpb). En todas las cepas mencionadas en este párrafo, se empleó DNA extraído de la cepa mutante de la colección EUROFAN de mismo genotipo.

Las deleciones en *NHA1* se introdujeron en los fondos BY4741 silvestre, la cepa MLM04 y *hog1* (EUROFAN) de la siguiente manera. El *cassette* de disrupción *nha1::LEU2* fue obtenido por digestión con XbaI/SacI del vector pCRII-NHA::LEU2. Los clones que pudieron crecer en ausencia de leucina se analizaron por PCR usando los oligonucleótidos LEU2_3' y NHA-900/925R (que producen un fragmento de 1,7 kpb en los casos positivos). Las cepas resultantes se llamaron CCP011, CCP013 y CCP014, respectivamente.

4.4. Plásmidos

4.4.1. Vectores derivados de pCM

- Vectores pCM188, pCM189 y pCM190-PPZ1. Estos vectores contienen 2 (pCM188) y 7 copias (pCM189 y pCM190) del operador reprimible por doxiciclina *tetO* (Garí *et al.*, 1997). pCM188 y pCM189 son centroméricos, mientras que pCM190 es el único episomal. El gen *PPZ1* fue amplificado del DNA genómico de la cepa silvestre BY4741 por PCR usando los oligonucleótidos OMLM3 y OMLM4, generando un producto de 2,1 kpb. Este producto fue clonado en las dianas BamHI/PstI en los tres vectores pCM188, pCM189 y pCM190. La versión mutada G2A fue generada empleando el oligonucleótido OMLM9 en lugar del OMLM3. La versión R451L fue construida insertando el fragmento Kpn2I/PacI (625 pb) del vector YCp111-PPZ1^{R451L} (Clotet *et al.*, 1996) en las mismas dianas de restricción del vector pCM190-PPZ1.

- Vectores pCM190-PPZ2 y pCM190-HA-PPZ2: El gen *PPZ2* fue amplificado por PCR a partir de la cepa BY4741 usando los oligonucleótidos OMLM7 y OMLM8 y el producto (2,1 kpb) fue clonado en las dianas KpnI/PstI en el vector pCM190, generando pCM190-PPZ2. La versión pCM190-HA-PPZ2 se hizo de manera idéntica, pero empleando HA_PPZ2_Fw_KpnI en lugar de OMLM7.
- Vector pCM190-HA-GLC7: El gen *GLC7* fue amplificado a partir de DNA genómico por PCR usando los oligonucleótidos HA_GLC7_Fw_BamHI y OMLM11 y el producto (1,5 kpb) fue clonado en los sitios de restricción BamHI/PstI en el vector pCM190.
- Plásmidos pCM190-PPZ-HA: Para la construcción del vector pCM190-PPZ1-HA se amplificó *PPZ1* del DNA genómico de la cepa silvestre BY4741 por PCR usando los oligonucleótidos OMLM3 y OCCP1. El producto (2,1 kpb) fue clonado en las dianas BamHI/PstI en el vector pCM190. Para la construcción del vector pCM190-PPZ2-HA se amplificó *PPZ2* de manera similar usando los oligonucleótidos OMLM7 y OCCP2 y el producto (2,2 kpb) se clonó tras digestión con KpnI/PstI en el vector pCM190. El vector pCM190-PPZ1:2-HA se construyó de la siguiente manera. Se amplificó por PCR la región C-terminal de *PPZ2* (desde el residuo 1153 hasta la etiqueta HA) a partir del vector pCM190-PPZ2-HA con los oligonucleótidos PPZ2-Cter-BspEI-Fw y OCCP2. El producto de PCR (1,0 kpb) se clonó en las dianas BspEI/PstI en pCM190-PPZ1-1-HA. Para generar el vector pCM190-PPZ2:1-HA se amplificó por PCR la región N-terminal de *PPZ2* (desde el ATG iniciador hasta el residuo 1152) a partir del vector pCM190-PPZ2-HA

con los oligonucleótidos OMLM7 y PPZ2_Nter_BspEI_Rv. El producto de PCR (1,2 kpb) se clonó como KpnI/BspEI en pCM190-PPZ1-HA.

4.4.2. Vectores derivados del *screen* de supresores en multicopia

En la Tabla 2 se recogen los clones identificados en el *screen* (ver sección 4.6), a partir de los cuales se clonaron los genes supresores en los vectores empleados en este trabajo.

- Plásmido YEp195-DOT6. Contiene el gen *DOT6* bajo su propio promotor. Fue obtenido clonando el fragmento PstI/XbaI de 4,14 kpb del clon 13.2.10 en YEplac195 (Gietz and Akio, 1988).
- Plásmido YEp195-SPO20. Vector YEplac195 que contiene el fragmento SphI/SphI de 3,23 kpb del clon 24.2.20.
- Plásmido YEp195-RPS15. Vector YEplac195 que contiene el fragmento HindIII/HindIII de 1,55 kpb del clon 24.1.43.
- Plásmido YEp195-RPP2A. Vector YEplac195 que contiene el fragmento EcoRI/EcoRI de 2,4 kpb del clon 24.1.43.
- Plásmido YEp195-RPL37B. Vector YEplac195 que contiene el fragmento PstI/BamHI de 2,68 kpb del clon 24.3.7.
- Plásmido YEp195-RPS6A. El gen *RPS6A* fue amplificado del clon 13.2.19 mediante PCR usando los cebadores RPS6A_Fw_SalI y RPS6A_Rv_SacI (2,18 kpb) y clonado en las dianas SalI/SacI en YEplac195.
- Plásmido YEp195-SWM1. El gen *SWM1* fue amplificado del clon 13.2.3 mediante PCR usando los cebadores SWM1_Fw_PstI y SWM1_Rv_SalI (1,59 kpb) y clonado en los sitios PstI/SalI en YEplac195.

- Plásmido YEp195-RPL37A. El gen *RPL37A* fue amplificado del clon c2-13d-D4 mediante PCR usando los cebadores RPL37A_Fw_BamHI y RPL37A_Rv_PstI (2,00 kpb) y clonado como BamHI/PstI en YEplac195.
- Plásmido YEp195-NOC2. El gen *NOC2* fue amplificado del clon c2-13-C-3d mediante PCR usando los cebadores NOC2_Fw_PstI y NOC2_Rv_SacI (3,45 kpb) y clonado en las dianas PstI/SacI en YEplac195.
- Plásmido YEp195-HAL3. Vector YEplac195 que contiene *HAL3* bajo el control de su propio promotor, descrito en de Nadal *et al.*, 1998.

4.4.3. Otros vectores

- Plásmido YEp195-PPZ1. Vector YEplac195 que contiene el gen *PPZ1* bajo el control de su propio promotor (Clotet *et al.*, 1999).
- Plásmido YEp352-PPZ2. Vector YEplac352 que contiene el gen *PPZ2* bajo el control de su propio promotor (Lee *et al.*, 1993).
- Vector pYES2-PPZ1. Vector pYES2 (Invitrogen) que contiene el gen *PPZ1* bajo el control del promotor inducible por galactosa *GAL1-10*, descrito en Clotet *et al.*, 1996.
- Plásmido pRS315-RFP-NOP1-RPS3-GFP. Vector pRS315 que contiene las fusiones RPS3-yEGFP y mRFP-NOP1 descrito en Ulbrich *et al.*, 2009.
- Plásmido pRS315-RFP-NOP1-RPL25-GFP. Vector pRS315 que contiene las fusiones RPL25-yEGFP y mRFP-NOP1 descrito en Ulbrich *et al.*, 2009.
- Plásmido pCRII-NHA::LEU2. Vector que contiene el *cassette* de disrupción *nha1::LEU2*, empleado para la delección de *NHA1*, obtenido del laboratorio del Dr. Alonso Rodríguez-Navarro.

- Genotecas YEp13 (American Type Culture Collection 37415) y YEp24 (regalo generoso del Dr. Ramón Serrano).

4.5. Cribado de la colección de mutantes por delección EUROFAN usando pCM190-PPZ1

Para realizar este escrutinio, se prepararon *pools* de hasta 480 mutantes simples (el equivalente a 5 placas de la colección EUROFAN) que fueron transformados con el vector pCM190-PPZ1. En este vector, la expresión de *PPZ1* está bajo el control del promotor *tetO*, cuya expresión se reprime en presencia de doxiciclina. Se transformó el equivalente a 30 OD₆₀₀ empleando 500 ng del plásmido pCM190-PPZ1, y la mezcla transformación se resuspendió en un volumen final de 500 µL de medio sintético sin uracilo (SC-URA). Las células se sembraron en medio SC-URA conteniendo 2% de glucosa: i) con 100 µg/mL de doxiciclina (se sembró un 4% del volumen y se estimó el total de transformantes) y ii) sin doxiciclina, para permitir la sobreexpresión de *PPZ1* y obtener los posibles positivos del experimento (se depositó en la placa el 96% de volumen restante). Todas las colonias que crecieron en la placa sin doxiciclina entre los 3 y los 6 días después de la siembra se crecieron en una nueva placa de medio SC-URA con doxiciclina. Cuando hubieron crecido, se realizó una extracción de DNA genómico para analizarlo por PCR usando los oligonucleótidos U1 y K2, que amplifican el fragmento que contiene el código de barras específico de cada mutante (UPTAG) (Kelly *et al.*, 2001). Este producto de PCR se secuenció empleando el oligonucleótido K2, y se identificó el mutante en cada caso mediante el código de barras. Una vez identificados los mutantes, se consideraron positivos aquellos mutantes repetidos al menos una vez. Se sacaron los mutantes considerados positivos individualmente de la colección EUROFAN, se transformaron de nuevo con el vector pCM190-PPZ1 y se sembraron en placas con

doxiciclina. Por último, se realizó un ensayo de crecimiento en placas con medio SC-URA sin y con doxiciclina (100 µg/mL).

4.6. Screen de la colección de mutantes por delección EUROFAN usando pYES2-PPZ1

Se transformaron *pools* de hasta 96 mutantes simples (una placa de la colección EUROFAN) con el plásmido pYES2-PPZ1, en el cual el gen *PPZ1* está bajo el control del promotor *GALI-10*, inducible por galactosa. Se emplearon 200 ng del vector para transformar 30 OD₆₀₀ de cultivo, la mezcla de transformación se resuspendió en 100 µL de medio SC-URA y se sembró en placas de medio SC-URA con 2 fuentes de carbono distintas. Por un lado, 2% rafinosa para contar el número total de transformantes (se plaquéó una décima parte de la transformación y se estimó el total). Por otro lado, 2% rafinosa + 2% galactosa para inducir la expresión de *PPZ1* a niveles tóxicos y obtener los posibles positivos del experimento. En pruebas previas a pequeña escala transformando la cepa silvestre BY4741 con pYES2-PPZ1 se observó el crecimiento de algunas colonias en la placa (un 0,16% del total de transformantes). Debido a esto, solo aquellos *pools* que dieron como resultado un porcentaje 3 veces superior al de la cepa silvestre fueron considerados positivos. Aproximadamente, se analizaron un total de 2,5 millones de clones. De estos presuntos *pools* positivos se seleccionó un número de clones equivalente, al menos, al 1,5% de las colonias que crecieron en cada placa, de las cuales se extrajo el DNA genómico y se prosiguió como en la sección 4.5. Cuando se conocieron las delecciones de los mutantes considerados positivos, éstas fueron construidas *de novo* sobre una cepa silvestre BY4741. A continuación, se introdujo en estos mutantes el vector pYES2-PPZ1 y se analizó de nuevo su crecimiento.

4.7. Escrutinio de genes supresores de la falta de crecimiento de la cepa MLM04

La cepa MLM04 fue transformada con genotecas derivadas de YEp13 o YEp24. Las células ya transformadas se dividieron en tres fracciones: 1) un 45% fue sembrado en placas de medio sintético con 0,25% de glucosa sin doxiciclina, 2) un 45% fue sembrado en placas con 0,5% de glucosa sin doxiciclina y 3) un 10% fue sembrado en placas con 0,5% de glucosa con 100 µg/mL doxiciclina. En función de si se empleó YEp13 o YEp24, las placas carecían de uracilo o leucina, respectivamente. De esta manera, la fracción sembrada con doxiciclina nos permitió conocer el número total de transformantes y el resto de transformación se empleó para aislar los clones inicialmente positivos (colonias que crecieron en las placas sin doxiciclina). Fueron analizados, aproximadamente, un total de 100.000 transformantes usando la genoteca YEp13 y 315.000 transformantes usando la genoteca YEp24. Los plásmidos de los clones potencialmente positivos fueron extraídos, sometidos a restricción enzimática para descartar aquellos vacíos o que albergaran *HAL3* y empleados para transformar de nuevo la cepa MLM04. Solo aquellos plásmidos que permitían de nuevo un crecimiento de la cepa MLM04 mejor que un plásmido vacío fueron considerados positivos. En estos casos, el fragmento de DNA específico de cada clon se identificó por secuenciación de los extremos del inserto usando los oligonucleótidos YEp13_seq_5' y YEp13_seq_3'. Cada gen presente en cada uno de los insertos fue clonado, de manera individual y con su propio promotor, en el vector YEplac195 (ver sección 4.4.2). Por último, cada nuevo constructo conteniendo un único gen fue empleado para transformar de nuevo la cepa MLM04 y fue analizado mediante ensayo de crecimiento. Únicamente aquellos capaces de conferir a la cepa MLM04 un crecimiento mejor que un vector vacío fueron considerados finalmente positivos.

4.8. Preparaciones para ensayos de perfil polisómico

Las cepas BY4741 y MLM04 fueron cultivadas *overnight* en medio SC-URA con 100 $\mu\text{g/mL}$ de doxiciclina. Se realizaron dos lavados con medio sin doxiciclina, se inocularon en 10 mL de medio fresco SC-URA a $\text{OD}_{600}=0,01$ y se incubaron a 28°C durante 24 horas. Se diluyó el nuevo cultivo hasta $\text{OD}_{600}=0,2$ en 200 mL de medio SC-URA y se dejaron crecer hasta $\text{OD}_{600}=0,8$. Se añadió cicloheximida (0,1 mg/mL, concentración final) al cultivo y se dejó en hielo durante 10 min. Las preparaciones de las muestras se realizaron de manera idéntica a lo descrito en Kressler *et al.*, 1997. En resumen, 10 unidades A_{260} se depositaron sobre gradientes lineales de 7 a 50% de sacarosa y se centrifugaron a 39.000 rpm en un rotor Beckman SW41 durante 2 h 45 min a 4°C . Se utilizó un aparato Isco UV-6 gradient collector (Teledyne Isco, Lincoln, NE) con lectura continua a A_{254} para captar los datos. En algunos casos, se recogieron fracciones de 500 μL de los gradientes de sacarosa y se extrajeron las proteínas (ver más abajo).

4.9. Recolección de muestras y preparación de extractos para inmunodetección

Los extractos crudos de proteínas para inmunoblot se prepararon de la siguiente manera. Para la detección de Ppz1 empleando un plásmido pYES2-PPZ1, las células fueron incubadas en medio SC-URA con rafinosa como única fuente de carbono hasta llegar a $\text{OD}_{600}=0,6$. Se recogieron muestras de 10 mL antes de la inducción con galactosa al 2% (tiempo 0) y en los tiempos especificados en el texto. Para la detección de Ppz1 en la cepa MLM04 y en cepas que contengan los plásmidos derivados de pCM, las células fueron cultivadas como se detalla a continuación. Tras un cultivo *overnight* en medio SC-URA con doxiciclina (100 $\mu\text{g/mL}$), se realizaron dos lavados con medio sin doxiciclina, se inocularon en medio SC-URA fresco a $\text{OD}_{600}=0,2$ y se colectaron las células a los tiempos indicados. Los extractos de proteínas fueron preparados como se describe a continuación.

Una vez centrifugadas las células, éstas fueron resuspendidas en 125 μ L de tampón de lisis A (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Triton X-100, 10% glicerol), suplementado con EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche) y DTT 1 mM frescos. Tras añadir 125 μ L de bolas de Zirconia ($\varnothing=0,5$ mm), las células fueron lisadas a una potencia de 5,5 durante 45 segundos (3 ciclos, con 3 min de hielo entre cada uno) en un equipo FastPrep (MP Biomedicals). Las muestras se centrifugaron a 500xg durante 10 min a 4°C y la proteína total presente en el sobrenadante fue cuantificada mediante el método de Bradford (Sigma-Aldrich). Salvo si se indica lo contrario, se sometieron a electroforesis 40 μ g de proteína total. Para las versiones de Ppz etiquetadas con el epítipo HA en el extremo C-terminal, se centrifugaron 650 μ g del sobrenadante a 25.000xg durante 30 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante, y los pellets fueron resuspendidos en 25 μ L de tampón de carga SDS-PAGE 1x (50 mM Tris (pH 6,8), 10% glicerol, 2% SDS, 0,1% azul de bromofenol).

Para monitorizar los niveles de eIF2 α , las cepas BY4741 y *gcn2* fueron crecidas, recogidas y procesadas como para la detección de Ppz1, excepto que se empleó el tampón de lisis B (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 15% glicerol, 0,5% Tween-20), suplementado con Phosphatase Inhibitor Cocktail Set V (Millipore), EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche) y DTT 1 mM.

Para detectar Snf1, las células BY4741 y MLM04 crecieron en YPD *overnight* en presencia de doxiciclina (100 μ g/mL). Al día siguiente, se realizaron dos lavados con medio sin doxiciclina, se inocularon 10 mL de medio YPD sin doxiciclina a OD₆₀₀=0,01 y se dejaron crecer durante 24 horas a 28 °C. Se diluyó el cultivo hasta OD₆₀₀=0,2 en 50 mL de YPD y las células crecieron hasta OD₆₀₀=0,6-0,8. Tras recoger una alícuota correspondiente al tiempo 0, el cultivo restante se recolectó por filtración (con filtros Metrical GN-6, PALL), se resuspendió en el mismo volumen (para no alterar la OD) de

YP 0,05% de glucosa y se recogieron distintas muestras a los tiempos mencionados en el texto. Para cada punto, se recogió el volumen correspondiente a 4,5 OD₆₀₀ y se mezcló con TCA 100% (concentración final 6%), se dejó enfriar en hielo durante 15 min y se centrifugó a 1.200xg durante 2 min a 4°C. Se realizaron dos lavados con 1 mL de acetona fría (previamente a -20°C), se dejaron secar a temperatura ambiente y se congelaron a -80°C. Los pellets se resuspendieron en 150 µL de tampón 10 mM Tris (pH 7,5)-1 mM EDTA y se añadieron 150 µL de NaOH 0,2 M. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min, se centrifugaron a 10.000xg durante 1 min y, tras descartar el sobrenadante, se resuspendieron los pellets con tampón de carga SDS-PAGE 1x.

Los extractos de las fracciones del gradiente de sacarosa fueron obtenidos de manera similar, mediante el método de TCA/Acetona. Para ello, 100 µL de TCA 100% se añadieron a cada fracción (500 µL), se enfrió en hielo durante 10 min y se centrifugó a 13.000xg durante 10 min a 4°C. El sobrenadante fue descartado y los pellets se lavaron dos veces con 1 mL de acetona fría, secados y resuspendidos en 25 µL de tampón de carga SDS-PAGE 1x.

4.10. SDS-PAGE e inmunodetección de proteínas

Salvo si se indica otra cosa, los extractos de proteínas fueron mezclados con tampón de carga SDS-PAGE 4x hasta tener una concentración final 1x, hervidos a 95°C durante 5 min y resueltos por SDS-PAGE. Una vez acabada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (Immobilon-P, Millipore) mediante transferencia en semi-seco (equipo TE77XP, Hoefer; 1,1 mA/cm² membrana, 1 h 30 min). Las proteínas Ppz1 y Hal3 fueron detectadas usando anticuerpos policlonales anti-GST-Ppz1 (Posas *et al.*, 1992) y anti-Hal3 (Ferrando *et al.*, 1995) a una dilución de 1:250 y 1:500, respectivamente, en TBST (TBS con 0,1% Tween-20) suplementado con un 5% de leche

desnatada (Régilait). Los niveles de las proteínas ribosómicas Rps8 y Rpl14 fueron monitorizados empleando anticuerpos específicos (un regalo de G. Dieci (Dieci *et al.*, 2005)) a una dilución 1:5000 en TBST más un 5% de leche. La fracción fosforilada de eIF2 α fue detectada usando el anticuerpo anti-phospho-eIF2 α (Ser51; Cell Signaling Technology) a una dilución 1:1000 en TBST más un 5% de BSA (TBST-BSA). Se monitorizó la versión fosforilada de Snf1 con el anticuerpo anti-phospho-Thr172-AMPK (Cell Signaling Technology) a una dilución 1:1000 en TBST-BSA. Para todos estos casos se empleó el anticuerpo secundario anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase (GE Healthcare) a una dilución de 1:20.000. Los niveles de las versiones de Glc7, Ppz1, Ppz2 y las versiones híbridas Ppz etiquetadas con HA fueron monitorizados usando anticuerpos anti-HA (Roche y BioLegend) a una dilución 1:1000. La proteína Snf1 total se identificó con anticuerpos anti-polyHis (Merck, #H1029). En estos casos se empleó un anticuerpo secundario anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (GE Healthcare) a una dilución 1:10.000. En el caso de inmunodetectar dos proteínas distintas en la misma membrana, se realizó un *stripping* de la membrana de la siguiente manera. Se realizaron 2 lavados de 5-10 min con una solución que contiene 15 g/L glicina, 1 g/L SDS, 0,1% Tween-20 (pH 2,2), seguidos de dos lavados de 10 min con PBS y dos lavados de 5 min con TBST. Las proteínas inmunorreactivas fueron visualizadas mediante el kit ECL Prime Western Blotting System (GE Healthcare) y la quimioluminiscencia fue detectada en un sistema Molecular Imager VersaDoc MP 4000 (BioRad). La tinción de las membranas con Ponceau Red (AMRESCO) se usó como control de carga y transferencia.

4.11. Microscopía

Para conocer la localización subcelular de Rps3-yEGFP, Rpl25-yEGFP y mRFP-Nop1, las cepas BY4741, MLM04 y *ppz1* fueron transformadas con los vectores pRS315-RFP-NOP1-RPS3-GFP y pRS315-RFP-NOP1-RPL25-GFP. Las células fueron cultivadas de

manera idéntica al ensayo de perfil polisómico hasta $OD_{600}=0,6-0,8$. Las células ($0,6 OD_{600}$) fueron fijadas con formaldehído al 2% a temperatura ambiente durante 5 min con agitación suave. Las muestras fueron centrifugadas a $1.000 \times g$ durante 2 min, lavadas dos veces con PBS y resuspendidas en $30-50 \mu L$ de PBS. Se depositaron $4 \mu L$ de la preparación sobre un portaobjetos, se cubrió con un cubreobjetos y se selló con esmalte de uñas. La visualización se llevó a cabo con el objetivo 100x en un microscopio Nikon Eclipse E-800, utilizando los filtros FITC (excitación: 480/30 nm, emisión: 535/45 nm) y G-2A (excitación: 435/50 nm, emisión: 580 nm) para detectar GFP y RFP, respectivamente.

4.12. Ensayos de crecimiento

Los ensayos de crecimiento en sólido fueron realizados de la siguiente manera. En general, los cultivos saturados durante una noche fueron diluidos hasta $OD_{600}=0,05$, y se realizaron hasta dos diluciones 1/5 seriadas, que fueron sembradas ($3 \mu L$) en las placas correspondientes. En el caso de cepas que expresan proteínas de manera regulada por doxiciclina, el cultivo *overnight* (que contenía doxiciclina) fue lavado dos veces con medio sin doxiciclina e incubado a $28^{\circ}C$ con agitación durante 5 horas antes de realizar la siembra. Las placas con doxiciclina se emplean como control positivo de carga. Se monitorizó diariamente el crecimiento de las cepas y se tomaron imágenes entre 2 y 6 días después de la siembra. Los ensayos de crecimiento en líquido se llevaron a cabo como se detalla a continuación. Los cultivos *overnight* crecidos en medio SC-URA con doxiciclina ($100 \mu g/mL$) se lavaron con medio sin doxiciclina dos veces y se reanudó su crecimiento a $28^{\circ}C$ durante 8 horas. Después, se diluyeron los cultivos hasta $OD_{600}=0,004$ en medio SC-URA, y se depositaron $300 \mu L$ en placas Honeycomb 2. Para seguir el crecimiento de los cultivos, las placas se incubaron $28^{\circ}C$ y se registró la OD_{600} cada 30

min (con agitación previa de 7 min) durante un total de 26 horas en un BioScreenC (ThermoFisher Scientific).

4.13. Análisis bioinformático

El porcentaje de identidad entre Glc7, Ppz1 y Ppz2 se calculó usando la herramienta EMBOSS Needle (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/) basada en el algoritmo de alineamiento Needleman-Wunsch (Squizzato *et al.*, 2015). La composición de aminoácidos y el punto isoeléctrico (pI) de las secuencias polipeptídicas fue calculado en la web de ExPASy (https://web.expasy.org/compute_pi/). La predicción de las regiones intrínsecamente desordenadas (IDR) se llevó a cabo con el *software* IUPred2A, un modelo basado en parámetros biofísicos (con la opción *short disordered regions*), y las potenciales regiones desestructuradas con capacidad de unión se identificaron usando el algoritmo de predicción ANCHOR2 (Erdős and Dosztányi, 2020). La distribución de aminoácidos en el proteoma de levadura se calculó empleando un algoritmo implementado por J. Ariño en Visual Basic usando el fichero “orf_trans.fasta.gz” (25/10/2019) del portal *Saccharomyces Genome Database* (http://sgd-archive.yeastgenome.org/sequence/S288C_reference/orf_protein/). Este archivo contiene las secuencias de proteína codificadas en todos los ORFs, excepto los ‘*Dubious ORF*’ y los pseudogenes.

The background features several overlapping geometric shapes and patterns. In the top left, there is a green semi-circle with diagonal white stripes. To its right is a light blue semi-circle containing a black diamond outline and a dark blue zigzag line. In the center, a large yellow semi-circle with diagonal white stripes is prominent. Below it, a dark blue horizontal bar spans the width of the page. In the bottom left, there is a purple semi-circle with a red diamond outline and a blue semi-circle with diagonal white stripes. In the bottom right, there is a purple semi-circle with a pink zigzag line and a pink semi-circle with diagonal white stripes.

OBJETIVOS

Los objetivos que nos hemos marcado para este estudio son:

1. Encontrar genes cuya delección o sobreexpresión atenúen el defecto de crecimiento derivado de un exceso de la fosfatasa Ppz1, como un medio de identificar las bases moleculares de esta toxicidad
2. Estudiar los posibles elementos estructurales que determinan la toxicidad de Ppz1, en comparación con Ppz2
3. Estudiar el posible nexo entre la sobreexpresión de Ppz1 y la homeostasis de cationes monovalentes

The background features several overlapping geometric shapes and patterns. In the top left, there is a green semi-circle with diagonal white stripes. To its right is a light blue semi-circle containing a black-outlined diamond and a blue zigzag line. In the center, a large yellow semi-circle with diagonal white stripes is the most prominent element. Below it, a dark blue horizontal bar spans the width of the page. In the bottom left, there is a purple semi-circle with a red-outlined diamond and a blue semi-circle with diagonal white stripes. In the bottom right, there is a purple semi-circle with a pink zigzag line and a pink-outlined triangle, and a red semi-circle with diagonal white stripes.

RESULTADOS

6.1. El exceso de Ppz1 afecta al proceso de traducción

En esta sección del trabajo nos centraremos en la búsqueda de genes que, sea por carencia o exceso, logren atenuar el defecto de crecimiento causado por la sobreexpresión de Ppz1.

6.1.1. Escrutinio de mutantes por delección usando pYES2-PPZ1

Como primera aproximación en busca de genes cuya delección aliviase la toxicidad derivada de Ppz1, se transformó la colección de mutantes por delección EUROFAN con el vector pYES2-PPZ1. Éste contiene el gen *PPZ1* bajo el control del promotor inducible por galactosa *GAL1-10*, que es capaz de expresar niveles elevados de proteína de manera muy rápida si el cultivo se lleva a cabo en una fuente de carbono no represora. La hipótesis de trabajo era: si la causa de la toxicidad fuese una única proteína desregulada -directa o indirectamente- por Ppz1, la ausencia del gen que codifica esa proteína eliminaría la toxicidad. Las posibilidades esperables eran que las cepas mutantes aisladas usando esta estrategia estuvieran relacionadas con: i) el mecanismo de inducción de *GAL1-10* o ii) la supresión directa de la toxicidad causada por la sobreexpresión de Ppz1. Identificamos 6 mutantes que fueron capaces de crecer en condiciones de sobreexpresión después de la transformación con pYES2-PPZ1 (Tabla 1 y Figura 1).

Cuando construimos las cepas *de novo*, el mutante *tcm62* no fue capaz de mantener la condición supresora. Por tanto, finalmente solo encontramos 5 genes cuya delección alivió la toxicidad derivada del exceso de Ppz1. Dos de éstos fueron los mutantes simples que presentan delecciones en los genes *GAL3* y *GAL4*, involucrados directamente en la activación del promotor *GAL1-10* y, por tanto, estas cepas posiblemente no fueran capaces de inducir la expresión de Ppz1. Los otros tres positivos aislados fueron *gal11*, *pgd1* y *med2*, todos ellos con delecciones en genes relacionados con el complejo *Mediator*. Aunque estos genes no parecen directamente relacionados con la regulación del promotor

Tabla 1. Resumen de resultados obtenidos en el escrutinio empleando pYES2-PPZ1. Se muestra el *pool* de BY4741 silvestre como control representativo. El *pool* Chr 2.1 fue considerado negativo, y se muestra como ejemplo. CFU representa las unidades formadoras de colonias. La columna ‘%’ indica la razón entre ‘CFU RAF + GAL’ y ‘CFU RAF’. El fondo de color salmón señala el control negativo y un ejemplo de *pool* considerado negativo. El fondo de color verde resalta los *pools* considerados positivos (valor al menos tres veces superior a 0,16%).

POOL	CFU RAF	CFU RAF + GAL	%	DELECCIÓN
BY4741	81600	131	0,16	
Chr 2.1	40000	38	0,10	
Chr 2.2	54200	258	0,48	<i>tcm62</i>
Chr 4.3	13600	293	2,15	<i>gal3</i>
Chr 7.1	48400	1600	3,31	<i>pgd1</i>
Chr 15.5	24100	339	1,41	<i>gal11</i>
Chr 16.1	13800	293	2,12	<i>gal4</i>
BCN2	22100	1494	6,76	<i>med2</i>

GAL1-10, descubrimos que estos tres mutantes habían sido reportados previamente como deficientes en la inducción por galactosa del promotor *GAL1-10* (Piruat *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2000; Liu and Myers, 2015). Por tanto, todos los posibles supresores estarían relacionados con la inducción del promotor, más que con el mecanismo de acción de la fosfatasa Ppz1. Esto se comprobó mediante inmunoblot (Figura 2), donde se observa que

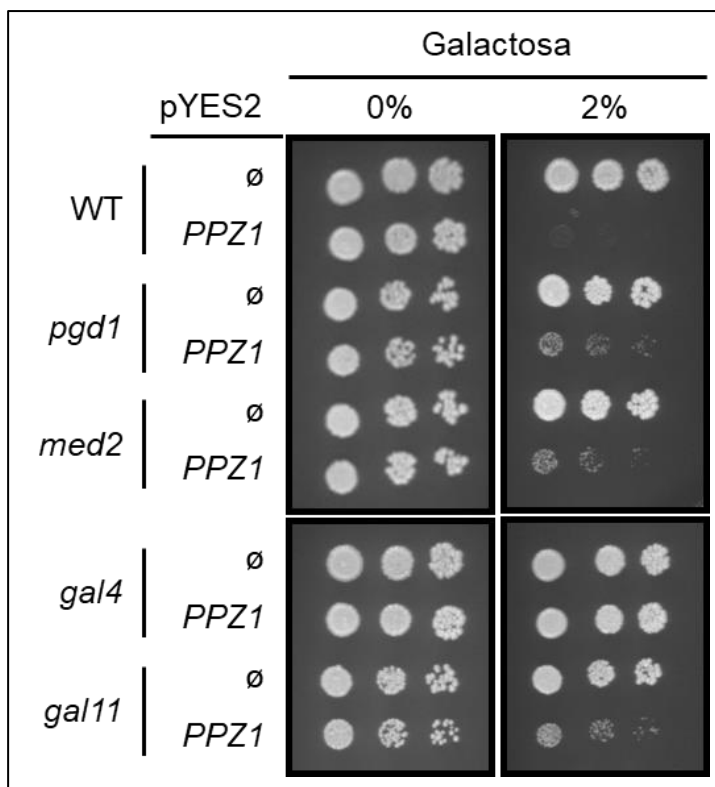


Figura 1. Determinación de la toxicidad de Ppz1 en los mutantes obtenidos en el escrutinio. Las cepas BY4741 (WT) y sus derivadas *gal4* (CCP05), *gal11* (CCP06), *pgd1* (CCP08) y *med2* (CCP09) se transformaron con los plásmidos pYES2 (∅) y pYES2-PPZ1. Se sembraron las células a OD₆₀₀=0,05 y dos diluciones 1/5 seriadas en placas SC-URA conteniendo rafinosa con (2%) y sin (0%) galactosa. Las placas fueron incubadas a 28°C y las imágenes fueron tomadas a los 6 días.

en estas cepas los niveles de Ppz1 en presencia de galactosa son similares a los de las condiciones de no inducción.

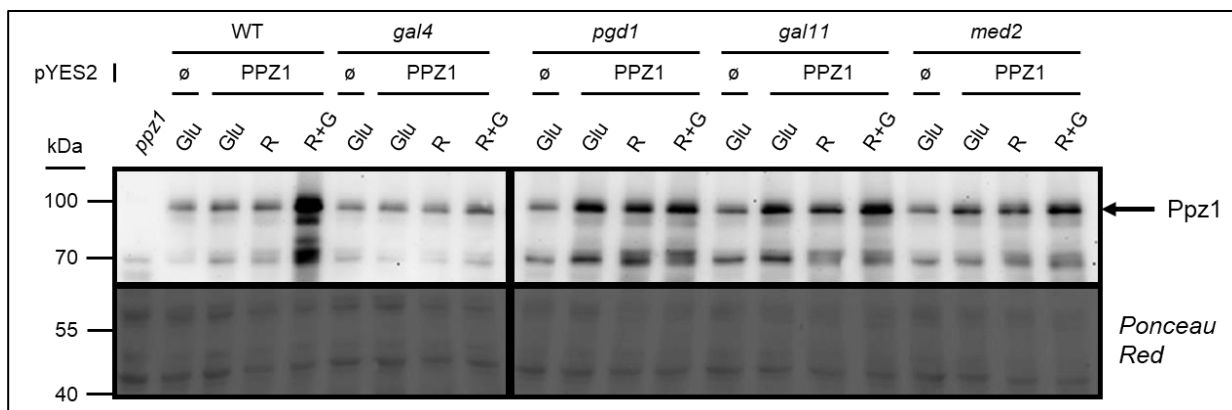


Figura 2. Análisis de la inducción de la expresión de Ppz1 en los mutantes obtenidos en el escrutinio. Las cepas BY4741 (WT) y sus derivadas *gal4* (CCP05), *gal11* (CCP06), *pgd1* (CCP08) y *med2* (CCP09) se transformaron con los plásmidos pYES2 (∅) y pYES2-PPZ1. Los cultivos fueron inoculados a OD₆₀₀=0,2 en medio SC-URA con glucosa (Glu) o rafinosa (R), según se indique. A las 4 horas de crecimiento, se añadió un 2% de galactosa en la mitad del cultivo crecido en rafinosa (R) para inducir la expresión de Ppz1 (R+G). Tras 2 horas de inducción, se recogieron las muestras y se trataron como se detalla en Materiales y Métodos. Las muestras fueron sometidas a electroforesis (gel 10% poliacrilamida) y transferidas a una membrana de PVDF. Se inmunodetectó Ppz1 usando anticuerpos policlonales. La tinción con Ponceau Red se empleó como control de carga y de transferencia.

6.1.2. Caracterización del set de vectores pCM-PPZ1 y su uso en el escrutinio de mutaciones supresoras de la toxicidad de Ppz1

Dado que la aproximación descrita no permitió identificar ningún supresor real de la toxicidad de Ppz1, planteamos un segundo *screen* cambiando el sistema de expresión. Basándonos en los resultados obtenidos con el promotor *GALI-10*, pensamos que para tratar de encontrar mutaciones supresoras sería mejor llevar a cabo la sobreexpresión de Ppz1 empleando un promotor menos potente. Para ello, empleamos el sistema de expresión regulable por doxiciclina *tetO*, descrito por Garí y colaboradores (Garí *et al.*, 1997), que dispone de dos versiones: *tetO*₂ (promotor débil) y *tetO*₇ (promotor fuerte). Recurrimos a un set de 3 vectores que contiene este sistema de expresión para sobreexpresar Ppz1, de manera que disponemos de 3 potencias de expresión (de menor a mayor): pCM188 (centromérico, *tetO*₂), pCM189 (centromérico, *tetO*₇) y pCM190 (episomal, *tetO*₇).

El crecimiento de la cepa silvestre albergando los vectores pCM se muestra en la Figura 3A. Se observó un bloqueo del crecimiento en glucosa al 2% en las células con el vector pCM190-PPZ1, mientras que pCM188-PPZ1 y pCM189-PPZ1 solo consiguieron provocar un pequeño defecto de crecimiento. Sin embargo, el crecimiento se vio afectado por la disponibilidad de glucosa, de manera que empeoraba a medida que disminuía la concentración del azúcar. El defecto se observó ya en células que contenían los plásmidos pCM188-PPZ1 y pCM189-PPZ1 en la placa con glucosa al 1%. También se observó un efecto muy drástico al cambiar la fuente de carbono: en galactosa al 2% el crecimiento fue nulo en todas las cepas que sobreexpresaban Ppz1. El efecto tóxico de la sobreexpresión de Ppz1 se observó también en otros fondos genéticos. Como se observa en la Figura 3B, las cepas BY4741 y KT1112 que albergaban pCM190-PPZ1 crecieron algo mejor que el resto. En la Figura 3C se muestra la cinética de expresión de Ppz1 desde los vectores pCM189 y pCM190 en ausencia de doxiciclina. En el caso del primero, la expresión de Ppz1 fue relativamente lenta y llegó a unos niveles de sobreexpresión moderados comparados con el promotor *GALI-10* (Figura 2, carril WT R+G). En el caso del pCM190-PPZ1, la expresión fue mucho más potente, de manera coherente con el número de copias de cada vector.

La estrategia que se empleó para llevar a cabo este escrutinio fue similar a la que se usó para el *screen* con pYES2-PPZ1. Brevemente, se usó pCM190-PPZ1 para transformar la colección de mutantes por delección EUROFAN y se intentó aislar mutantes que fueran capaces de crecer en condiciones de sobreexpresión de Ppz1. De esta manera, solo serían capaces de crecer aquellas cepas carentes de un gen implicado en la toxicidad derivada de la sobreexpresión de Ppz1. Desgraciadamente, el cribado genético se abandonó por un excesivo número de falsos positivos, ya que ninguno de los mutantes presuntamente

positivos mantuvo su capacidad atenuante de la toxicidad después de ser transformado de nuevo con el vector pCM190-PPZ1.

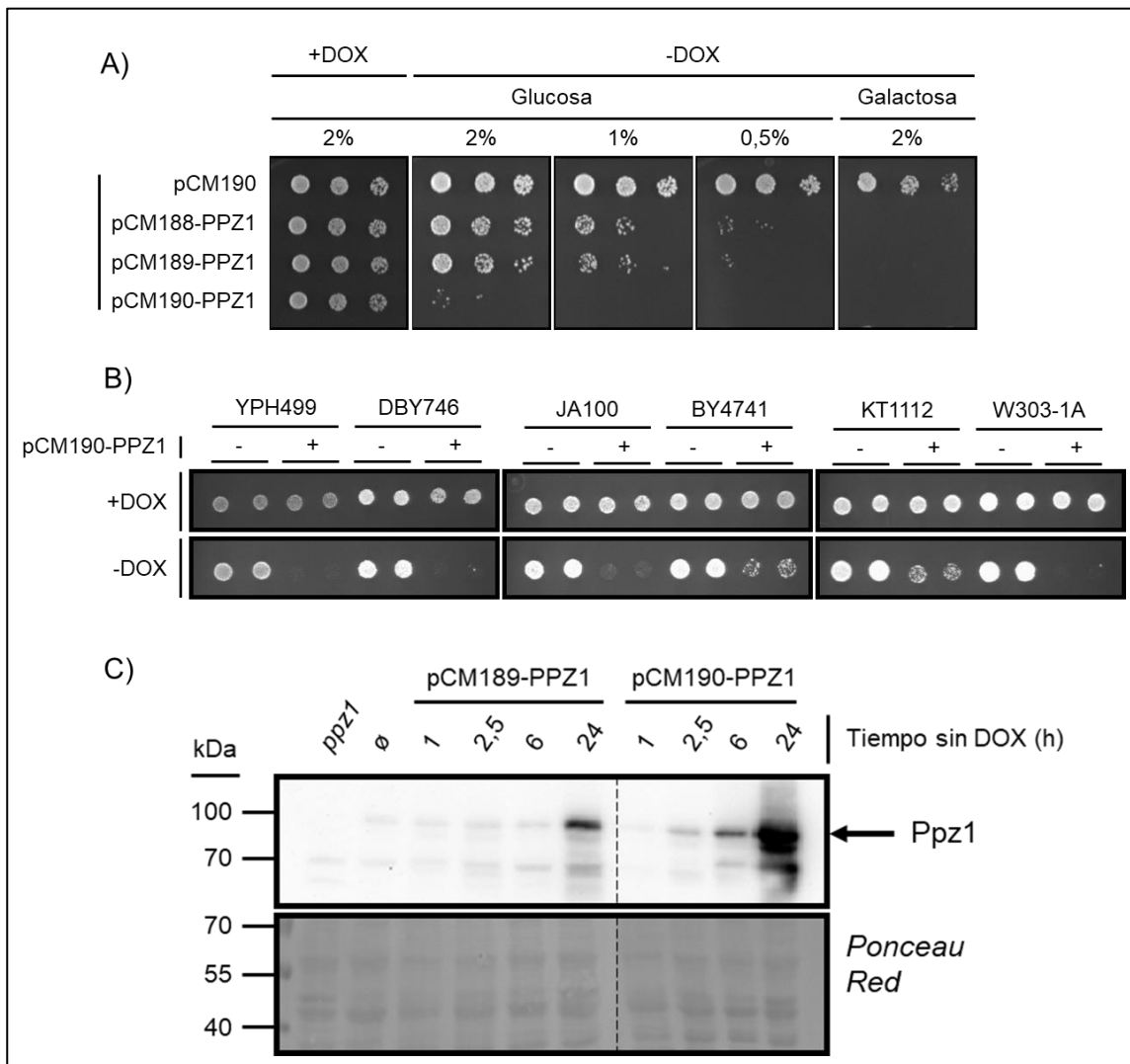


Figura 3. Caracterización del set de vectores pCM-PPZ1. A) La cepa BY4741 fue transformada con el pCM190 vacío (\emptyset) y los 3 vectores pCM-PPZ1. Las células crecieron *overnight* en medio SC-URA con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de doxiciclina. Se realizaron dos lavados con medio fresco sin doxiciclina y se dejaron crecer a 28°C durante 5 horas. Después, se sembraron los cultivos a $\text{OD}_{600}=0,05$, más dos diluciones seriadas 1/5, en placas sin (-DOX) y con (+DOX) doxiciclina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), en presencia de las fuentes de carbono mencionadas. Las placas fueron incubadas a 28°C y las imágenes fueron tomadas a los 3 días. B) Las cepas mencionadas fueron transformadas con pCM190 (-) y pCM190-PPZ1 (+), se cultivaron como en A y se sembraron las células a $\text{OD}_{600}=0,05$ en placas de medio SC-URA conteniendo 2% de glucosa sin (-DOX) y con (+DOX) doxiciclina. Las placas fueron incubadas a 28°C durante 6 días. C) La cepa BY4741 se transformó con los vectores pCM190, pCM189-PPZ1 y pCM190-PPZ1. Las células se crecieron como se detalla en Materiales y Métodos y se prepararon extractos de proteínas a los tiempos indicados después de retirar la doxiciclina. Las muestras fueron sometidas a electroforesis (gel 10% poliacrilamida) y transferidas a una membrana de PVDF.

6.1.3. Construcción y caracterización de la cepa regulable por doxyciclina MLM04

Ya que el segundo escrutinio no permitió identificar ningún supresor real de la toxicidad de Ppz1, planteamos un tercer *screen* para encontrar genes cuya sobreexpresión pudiera contrarrestar el defecto de crecimiento causado por la sobreexpresión de Ppz1. A pesar de que el *screen* anterior no nos dio buenos resultados, nos sirvió para caracterizar la sobreexpresión de *PPZ1* a partir del promotor *tetO*. Pudimos observar que esta expresión era moderada, y que la toxicidad de Ppz1 podía ser modulada por la disponibilidad de glucosa y agravada en presencia de galactosa. Estos resultados sugirieron que el sistema de expresión *tetO* sería más apropiado para esta aproximación. Sin embargo, el uso de los vectores pCM para sobreexpresar *PPZ1* implicaba una cotransformación poco deseable, por tanto, decidimos poner bajo el control del promotor *tetO* la copia de *PPZ1* presente en el genoma de *S. cerevisiae*. Para ello generamos dos cepas nuevas, llamadas MLM03 (*tetO₂*) y MLM04 (*tetO₇*) (Tabla A1, véase sección 10).

El crecimiento de las cepas MLM03 y MLM04 en medio sintético se muestra en la Figura 4A. No se observó prácticamente ningún efecto en el crecimiento en glucosa al 2% en ausencia o presencia de doxyciclina. Como hemos destacado en el caso de los vectores derivados de pCM (Figura 3A), el crecimiento estuvo relacionado directamente con la cantidad de glucosa disponible. El defecto de crecimiento se observó en ambas cepas, siendo más notorio en MLM04 que en MLM03, como se puede apreciar en la placa de glucosa al 0,25%, consistente con la mayor potencia del promotor de la primera (*tetO₇*). Se observó un crecimiento normalizado cuando ambas cepas sobreexpresaban Hal3, incluso en la placa de galactosa al 2%, de acuerdo con el conocido papel que juega Hal3 como regulador negativo de Ppz1. La sobreexpresión de Ppz1 tampoco les permitió crecer en otras fuentes de carbono, como galactosa, rafinosa o glicerol (Figura 4B). La Figura

4C muestra la cinética de expresión de Ppz1 en la cepa MLM04 al retirar la doxiciclina.

En esta cepa observamos una cinética similar a la que vemos en pCM189-PPZ1 (Figura

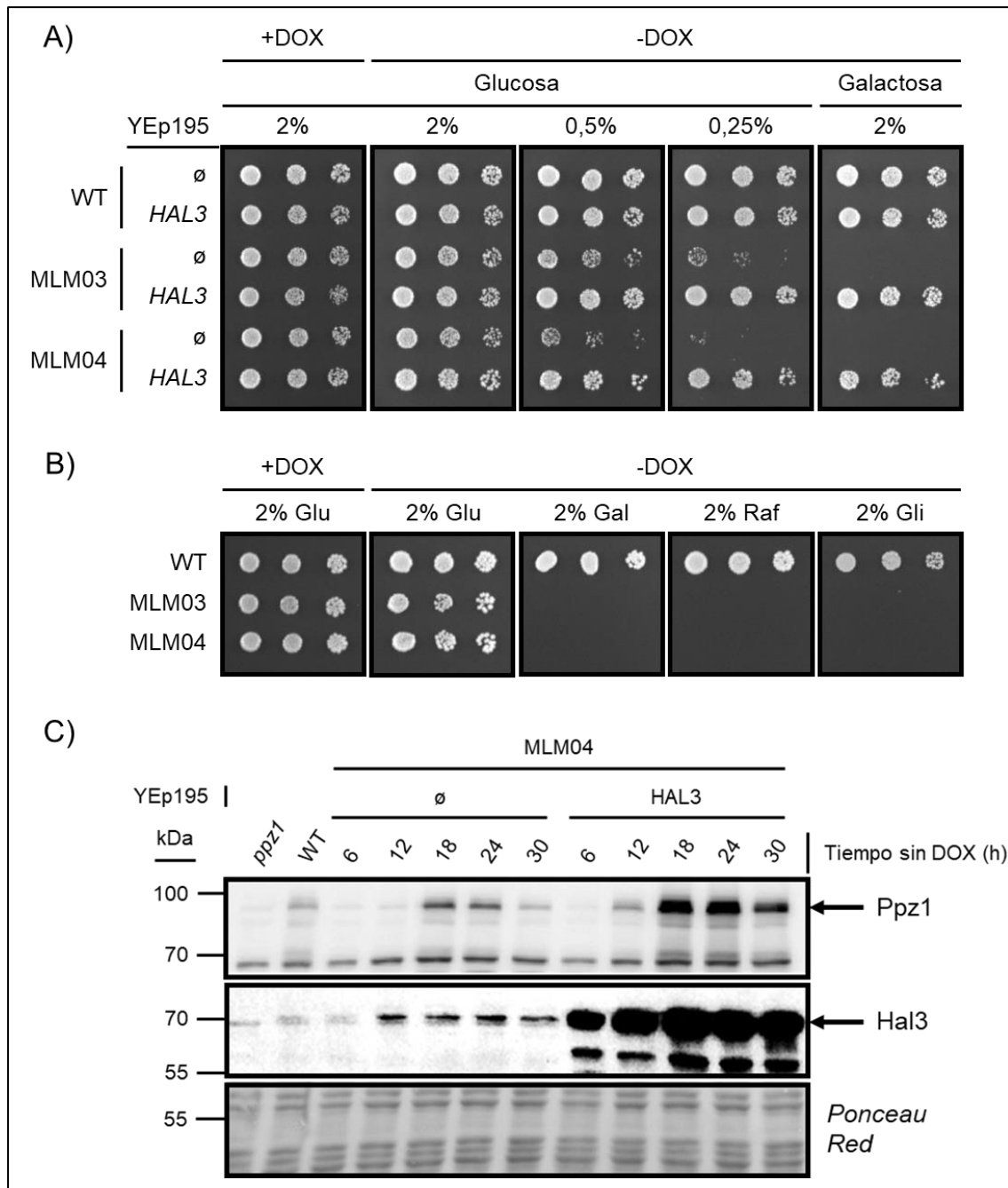


Figura 4. Expresión cromosómica de Ppz1 a partir de los promotores *tetO*. A) La cepa BY4741 (WT) y sus derivadas MLM03 y MLM04 (*tetO₂* y *tetO₇*, respectivamente) fueron transformadas con el plásmido YEp195 (∅) y YEp195-HAL3 y tratadas como se especifica en la Figura 3A. Las placas fueron incubadas a 28°C y las imágenes fueron tomadas a los 3 días. B) Las cepas BY4741 (WT), MLM03 y MLM04 se trataron como en la Figura 3A y se sembraron en placas de medio SC que contenían las fuentes de carbono señaladas (Glu, Glucosa; Gal, Galactosa; Raf, Rafinosa; Gli, Glicerol). Las placas fueron incubadas a 28°C durante 5 días. C) Las cepas BY4741 (WT) y sus derivadas *ppz1* y MLM04 se crecieron y se trataron como en la Figura 3C. Las muestras fueron sometidas a electroforesis (gel 8% poliacrilamida) y transferidas a una membrana de PVDF. Se inmunodetectaron Ppz1 y Hal3 en la misma membrana.

3C), logrando unos niveles de Ppz1 mayores que en la cepa silvestre 18 horas después de retirar la doxiciclina. Sin embargo, la presencia del inhibidor Hal3 permitió llegar a unos niveles de Ppz1 más elevados, compatible con el bloqueo de la actividad fosfatasa.

6.1.4. La sobreexpresión de Ppz1 provoca la desfosforilación de Snf1

Una vez caracterizada la cepa MLM04 y observado el fenotipo relacionado con las fuentes de carbono, decidimos explorar este fenómeno. La quinasa Snf1 es el homólogo en levadura de la AMPK de mamíferos, y está relacionada con la disponibilidad de glucosa: cuando hay falta de glucosa, Snf1 se activa rápidamente por fosforilación. Nosotros nos preguntamos si el exceso de Ppz1 provocaría algún defecto en la activación de Snf1. Como se muestra en la Figura 5A, la transición desde un medio con un 2% de

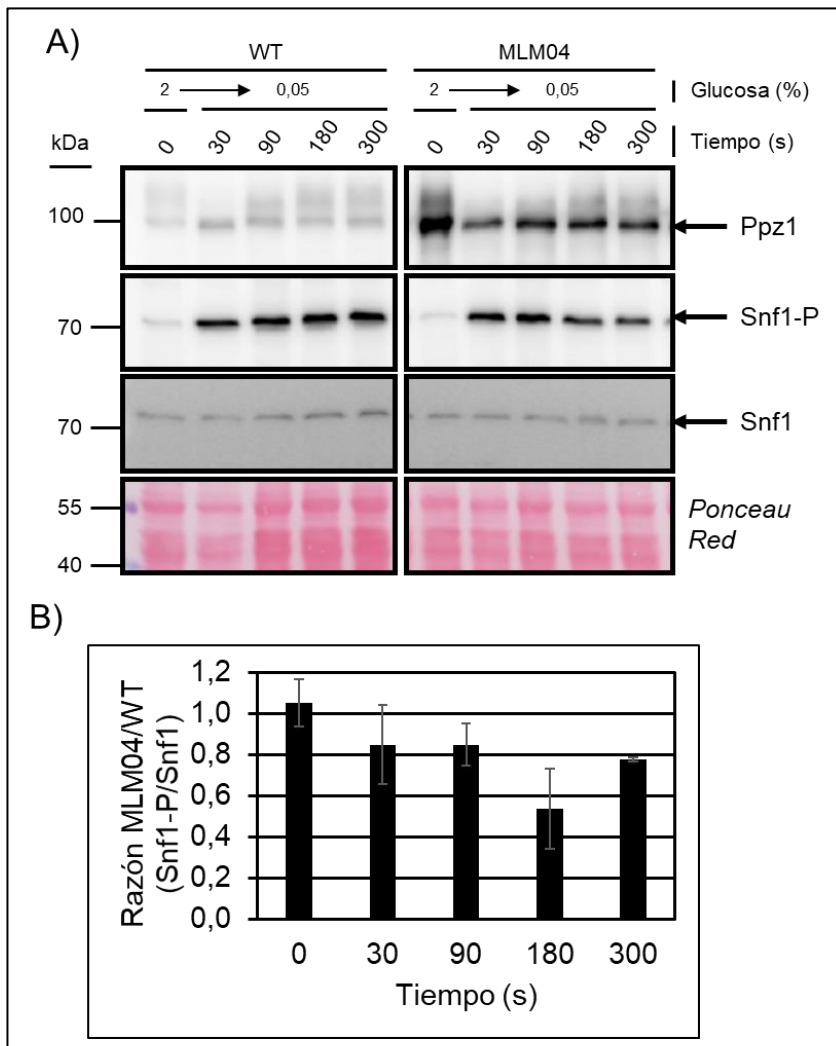


Figura 5. Efecto del exceso de Ppz1 en la fosforilación de Snf1. A) Las cepas BY4741 (WT) y su derivada MLM04 se crecieron, se recogieron y los extractos de proteínas se realizaron como se detalla en Materiales y Métodos. El volumen correspondiente a 0,5 OD₆₀₀ se sometió a electroforesis (gel 10% poliacrilamida) y las proteínas fueron transferidas a una membrana PVDF. B) Gráfico de barras donde se muestra la razón Snf1-P/Snf1 en MLM04 respecto a la de la cepa silvestre. Se cuantificó la intensidad de cada banda usando el software GelAnalyzer. Los datos corresponden a la media ± SEM calculada a partir de 3 experimentos independientes.

glucosa a un medio con un 0,05% de glucosa dio lugar a la fosforilación de Snf1 (Snf1-P) tanto en la cepa BY4741 como en la MLM04. Sin embargo, los niveles de fosforilación que se observaron fueron algo menores en la cepa MLM04, sobre todo a los 180 segundos (Figura 5A), con una reducción que casi alcanzó el 50% (Figura 5B). Estos resultados sugieren que el exceso de Ppz1 no produce un defecto en la activación inicial de Snf1, pero sí provoca una desfosforilación de Snf1 en pocos minutos. Una de las proteínas diana de Snf1 es Mig1, represor de los genes necesarios para la adaptación al crecimiento en ausencia de glucosa. Cuando no hay glucosa, Snf1 fosforila Mig1, forzando su salida del núcleo y la activación transcripcional de dichos genes. En un resultado obtenido en el laboratorio, hemos observado una mayor cantidad de Mig1 nuclear, en condiciones de baja glucosa, en células que sobreexpresan Ppz1 (Velázquez *et al.*, 2020). El hecho de que Mig1 permanezca en el núcleo, reprimiendo la expresión de genes relevantes para la adaptación, podría explicar el defecto de crecimiento que produce el exceso de Ppz1 cuando baja la disponibilidad de glucosa. Por ello, analizamos el crecimiento de las cepas *mig1* y *mig1 mig2* en condiciones de sobreexpresión de Ppz1. Como se observa en la Figura 6, la mutación simple *mig1* y la doble mutación *mig1 mig2* empeoraron el crecimiento de las células portadoras de los vectores pCM-PPZ1. En el caso del mutante simple *mig1*, el crecimiento empeoró de manera moderada, mientras que en *mig1 mig2*, el efecto se observó ya en la placa con un 2% de glucosa. Estos resultados sugieren que la retención nuclear de Mig1 no es la causa principal de la toxicidad de Ppz1.

La fosfatasa Glc7 regula multitud de procesos celulares, por lo que nos preguntamos si existía la posibilidad de que Ppz1 estuviese realizando funciones de la PP1. Decidimos evaluar la respuesta al exceso de Ppz1 de cepas carentes de alguna de las subunidades reguladoras de Glc7. Hace unos años, se describió que Sds22, Reg2 y Glc8 eran las subunidades necesarias para la toxicidad de Glc7 (Ghosh and Cannon, 2013). Como se

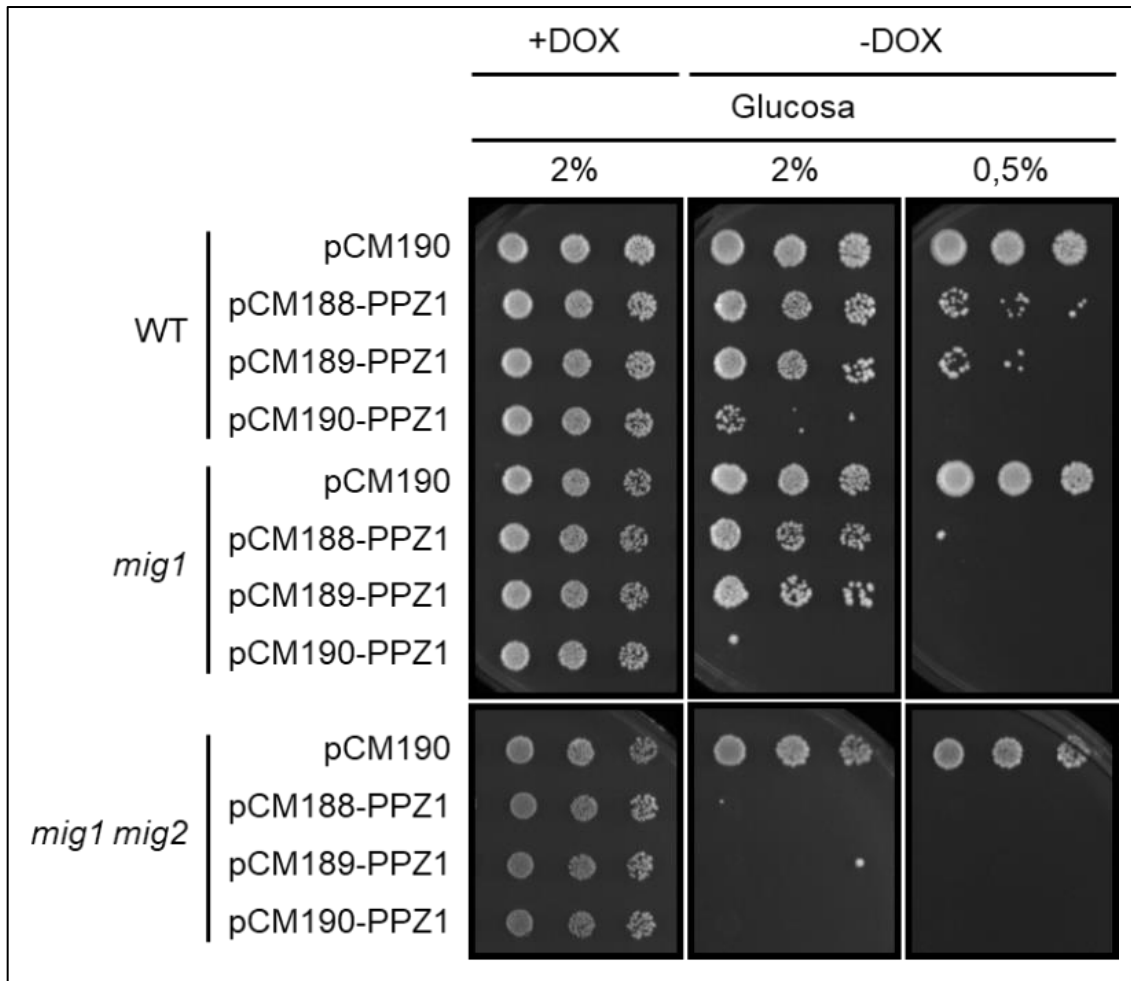


Figura 6. Efecto de la sobreexpresión de Ppz1 en el crecimiento de mutantes *mig*. Las cepas BY4741 silvestre y sus derivadas *mig1* (SP038) y *mig1 mig2* (SP010) fueron transformadas con el pCM190 vacío y los 3 vectores pCM-PPZ1, cultivadas y tratadas igual que en la Figura 3A. Las placas fueron incubadas a 28°C y las imágenes fueron captadas a los 6 días.

observa en la Figura 7, ni la delección de *REG2*, ni la falta de *GLC8* mejoraron el crecimiento de las células que sobreexpresan Ppz1. Tampoco observamos una mejoría en ausencia de Gac1, otra subunidad de PP1 relacionada con el glucógeno. Estos resultados apuntan a que el efecto tóxico de Ppz1 no está relacionado con funciones de Glc7.

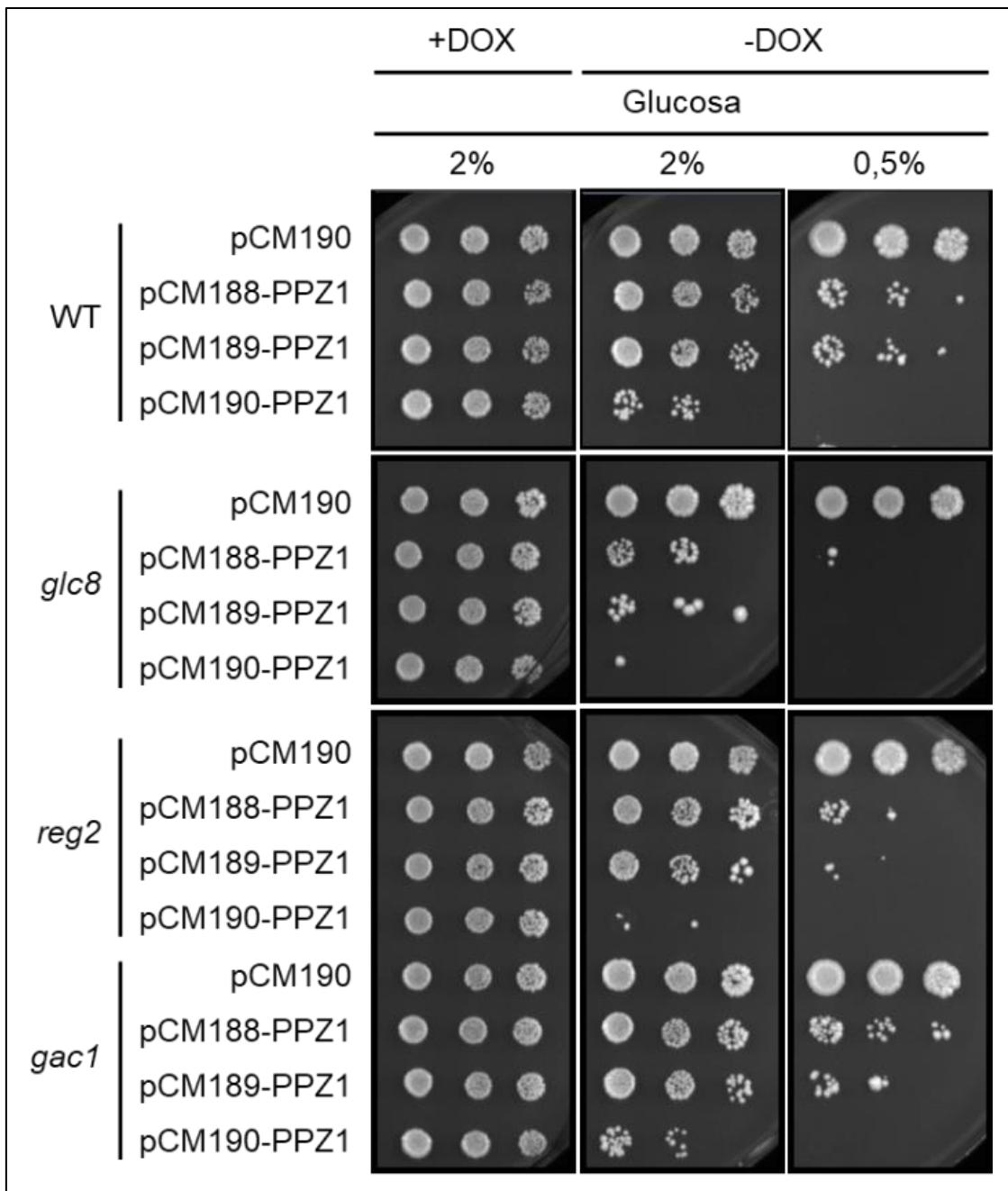


Figura 7. Efecto de la sobreexpresión de Ppz1 en el crecimiento de mutantes relacionados con la función de Glc7. Se transformaron las cepas mencionadas con el vector pCM190 vacío y los 3 vectores pCM-PPZ1, cultivadas y tratadas igual que en la Figura 3A. Las placas fueron incubadas a 28°C y las imágenes fueron captadas a los 6 días.

6.1.5. Escrutinio de genes supresores del defecto de crecimiento de la cepa MLM04

Tras los resultados obtenidos con la cepa MLM04, pensamos que ésta sería mucho más apropiada que los vectores pCM para llevar a cabo un escrutinio de genes supresores, por tres motivos: i) al tratarse de una integración cromosómica del promotor, el sistema de

expresión tiene mayor estabilidad, ii) la expresión cromosómica de Ppz1 asegura 1 sola copia del gen, mientras que con los vectores puede haber una variación del número de copias y iii) empleando esta cepa, podemos evitar cotransformar para realizar el *screen*. Este escrutinio se realizó en placas que contenían un 0,25 y un 0,5% de glucosa, es decir, en condiciones en las que el crecimiento de MLM04 se ve ya perceptiblemente afectado. Conseguimos aislar 8 clones capaces de mejorar el crecimiento de la cepa MLM04 en condiciones de sobreexpresión. El fragmento del genoma presente en cada clon se muestra en la Figura 8. Se construyeron 12 vectores clonando algunos de los genes presentes en los clones considerados positivos, y se analizó su capacidad atenuante de la toxicidad de Ppz1. Del total de construcciones, nueve fueron capaces de mejorar el crecimiento de la cepa MLM04 en condiciones de 0,25% glucosa (Figura 9A y Tabla 2). Curiosamente, el clon 24.1.43 contenía dos genes supresores: *RPS15* y *RPP2A*. Dado que en el escrutinio previo obtuvimos como resultado únicamente genes involucrados en la expresión de Ppz1, en este quisimos verificar de inmediato si los supresores afectaban la expresión de Ppz1. Como muestra la Figura 9B, la sobreexpresión de estos genes no causó ningún defecto en la expresión de Ppz1 a partir del vector episomal pCM190, que contiene el mismo promotor (*tetO7*) que la cepa MLM04, confirmando que su efecto beneficioso sobre el crecimiento podría deberse a una neutralización parcial de la toxicidad causada por la sobreexpresión de Ppz1.

Desde un punto de vista funcional, dos de los genes supresores están relacionados con el proceso de esporulación (*SPO20* y *SWM1*), otros dos con la biogénesis de ribosomas (*DOT6* y *NOC2*), y los cinco restantes codifican proteínas ribosómicas (*RPS6A*, *RPS15*, *RPP2A*, *RPL37A* y *RPL37B*). Todos ellos fueron capaces de mejorar el crecimiento de la cepa MLM04 (en mayor o menor medida) en 0,25% de glucosa, siendo *NOC2* y *SPO20* los más potentes y *DOT6* el peor de los supresores. No obstante, ninguno de ellos fue

capaz de permitir el crecimiento en galactosa, excepto *NOC2*, que presentó un

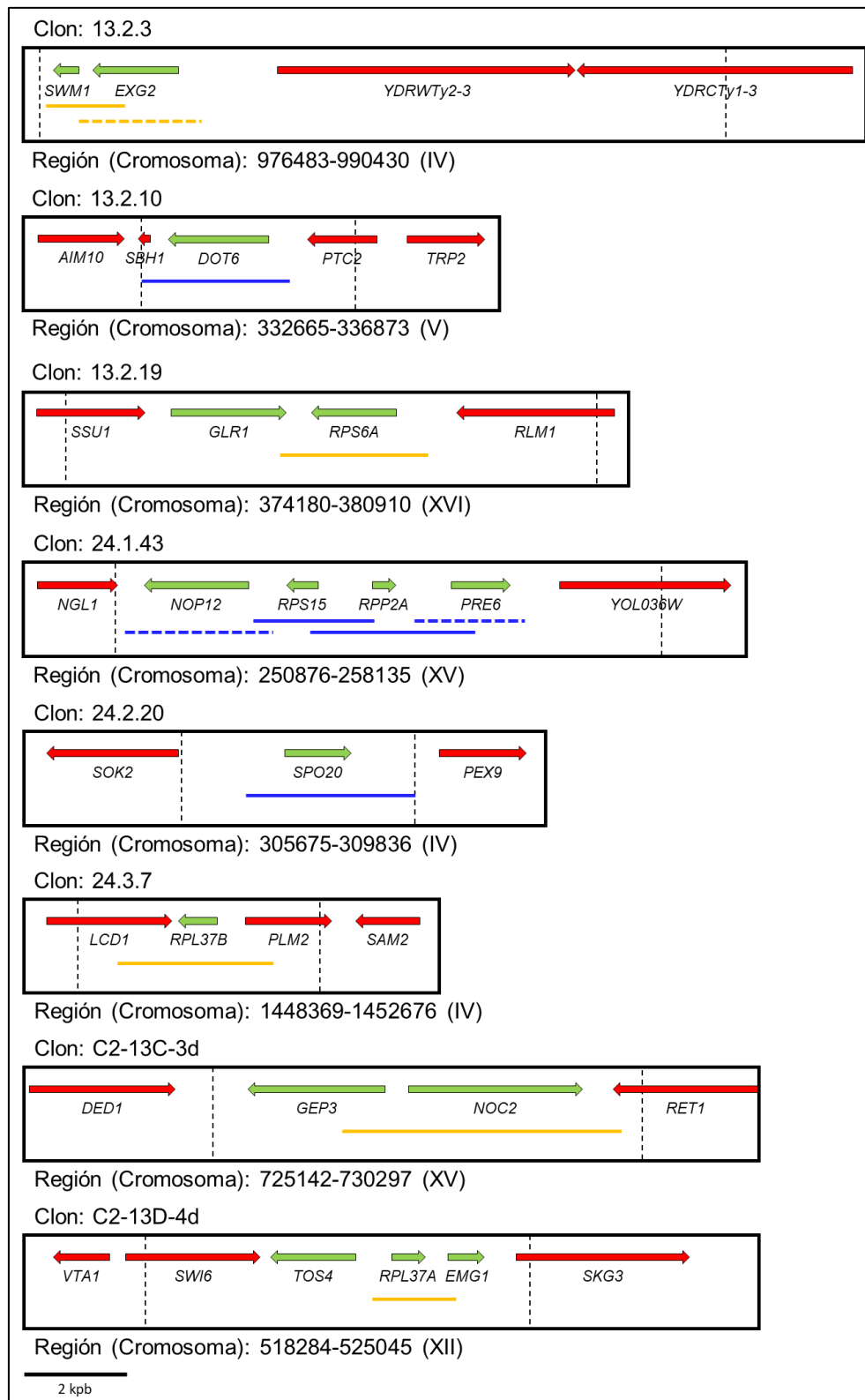


Figura 8. Resumen de los clones obtenidos en el escrutinio de supresores en multicopia de la toxicidad de Ppz1. La región comprendida entre las líneas discontinuas negras corresponde al segmento de DNA cromosómico de cada clon. Las líneas azules denotan la zona del inserto clonada en el vector YEplac195 mediante técnicas de subclonación. Las líneas naranjas representan la zona amplificada mediante PCR y clonada en el vector YEplac195. Las líneas continuas y discontinuas corresponden a los genes analizados y considerados positivos y negativos, respectivamente.

crecimiento sutil al 6° día de incubación (Figura 10A, panel derecho). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de Ppz1 podría tener alguna relación con el funcionamiento del ribosoma.

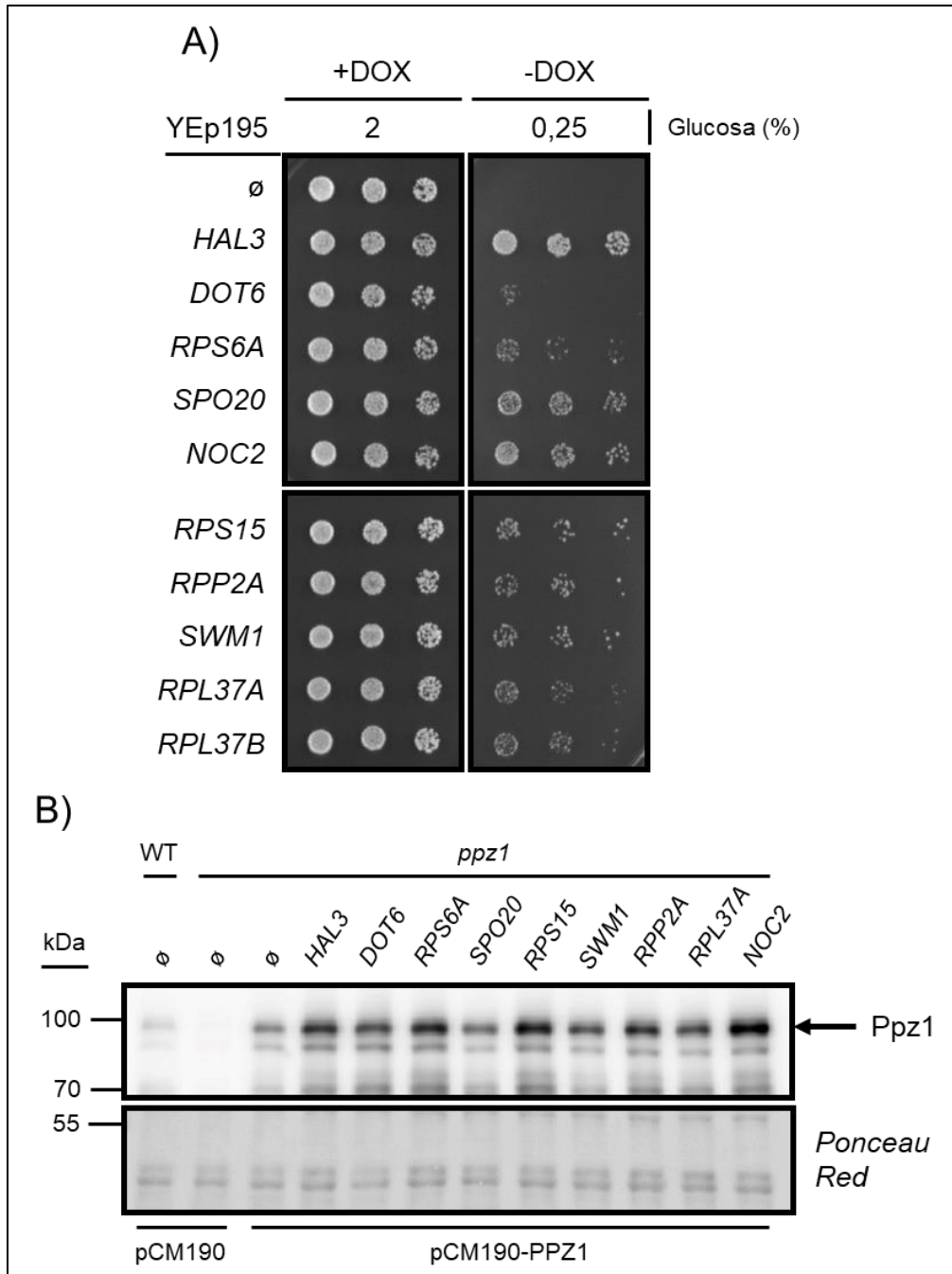


Figura 9. Caracterización de los genes supresores obtenidos en el escrutinio de supresores en multicopia. A) Las construcciones creadas *de novo* en YEp195 con todos los genes obtenidos en el *screen* se utilizaron para transformar la cepa MLM04. Estos cultivos se crecieron y se trataron como en la Figura 3A. Las placas fueron incubadas a 28°C y las imágenes fueron tomadas a los 3 días. B) Las cepas BY4741 silvestre y su derivada *ppz1* fueron cotransformadas con las mismas construcciones de A, pero en YEp181, y con los vectores pCM190 o pCM190-PPZ1, según se indica en la figura, y crecidas como se detalla en Materiales y Métodos. Se prepararon extractos de proteínas 6 horas después de retirar la doxiciclina. Las muestras fueron sometidas a electroforesis (gel 8% poliacrilamida) y transferidas a una membrana de PVDF. ∅ denota plásmido YEp195 (panel A) o YEp181 (panel B) vacío.

Tabla 2. Resumen de los genes identificados en el escrutinio de supresores en multicopia. El asterisco corresponde a la genoteca YEp24.

Gen	Descripción	Función
<i>SPO20*</i>	Forma parte del complejo t-SNARE, subunidad específica de meiosis. Necesaria para la formación de la membrana de la pro-espora durante la fase de esporulación.	Meiosis Esporulación
<i>SWM1</i>	Forma parte del anaphase-promoting complex (APC). Regula la transición metafase-anafase y la salida de mitosis. Necesaria para la maduración de la pared de la espora.	Ciclo celular Esporulación
<i>DOT6</i>	Biogénesis ribosómica	Biogénesis del ribosoma
<i>NOC2</i>	Forma parte de complejos nucleolares. Involucrada en el transporte intranuclear de precursores ribosómicos. Se asocia con pre-rRNA.	
<i>RPS6A</i>	Componente de la subunidad ribosómica pequeña (40S). Gen ortólogo de la proteína ribosómica S6 de mamíferos.	Proteínas ribosómicas
<i>RPS15*</i>	Componente de la subunidad ribosómica pequeña (40S). Gen ortólogo de la proteína ribosómica S15 de mamíferos.	
<i>RPP2A*</i>	Componente del tallo del ribosoma. Involucrada en la interacción entre factores traduccionales de elongación y el ribosoma. Fracciones libres de P2 α estimulan la fosforilación de eIF2 α mediante Gcn2.	
<i>RPL37A</i>	Componente de la subunidad ribosómica grande (60S). Gen ortólogo de la proteína ribosómica L37 de mamíferos.	
<i>RPL37B*</i>	Gen parálogo de <i>RPL37A</i> .	

Para identificar el posible efecto aditivo al sobreexpresar dos de los supresores a la vez, la cepa MLM04 fue transformada con cada combinación posible de genes supresores, uno clonado en el vector YEplac195 (marcador *URA3*) y el otro en el vector YEplac181 (marcador *LEU2*). Estudiamos la posible aditividad en dos condiciones: i) 0,25% glucosa y ii) 2% galactosa; la segunda (a juzgar por los resultados mostrados en la Figura 9A) más restrictiva que la primera. En presencia de glucosa al 0,25%, el efecto más fuerte se observó cuando se sobreexpresó *SWM1* junto con *DOT6*, *RPS6A* o *RPL37A* (Figura 10A). Una interacción genética algo menos fuerte se dio entre *RPS15* y el resto de los genes que codifican proteínas ribosómicas. No se observó aditividad entre genes pertenecientes al mismo grupo funcional: ni entre *SPO20* y *SWM1*, ni entre *DOT6* y *NOC2* (de hecho, ningún supresor mejoró el rendimiento dado por *NOC2*). En presencia de galactosa al 2%,

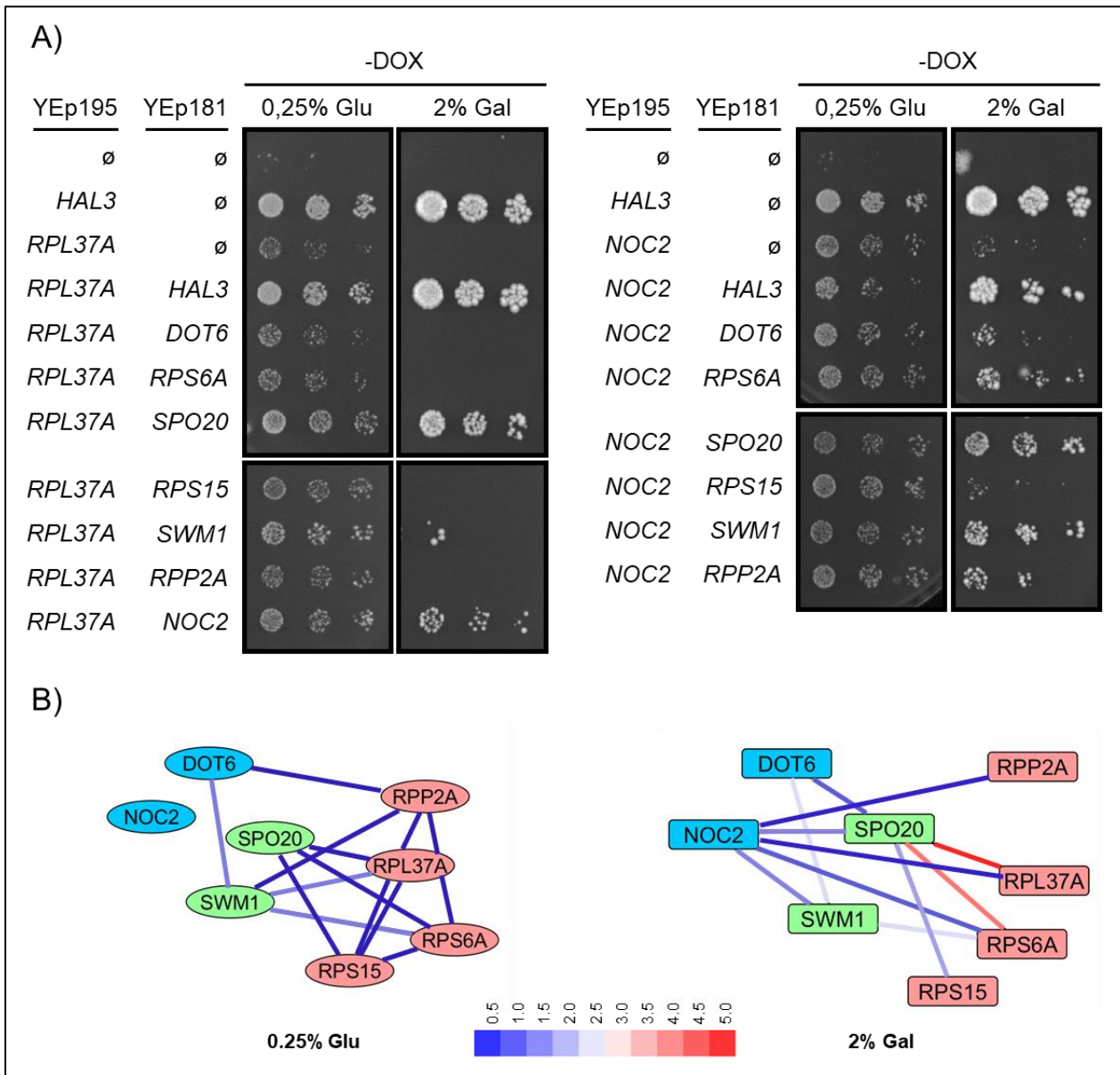


Figura 10. Ensayos de crecimiento para estudiar la posible aditividad entre genes supresores. A) Se transformó la cepa MLM04 con las construcciones mencionadas en la imagen. Estos cultivos se crecieron y se trataron como en la Figura 3A, excepto que el medio utilizado fue SC-URA-LEU. Las placas fueron incubadas a 28°C durante 6 días antes de tomar las fotografías. B) Red que muestra las interacciones genéticas observadas entre los genes supresores en cada condición (0,25% Glu y 2% Gal). Los datos empleados han sido extraídos de las Tablas 3 y 4. Los nodos están coloreados según sus funciones, descritas en la Tabla 2. Las líneas de unión están coloreadas según la intensidad de la mejora de crecimiento producida respecto al supresor más efectivo de ese par, siendo la azul la más baja y la roja, la más alta.

no se observó interacción alguna entre proteínas ribosómicas. La coexpresión de *NOC2* junto con *RPS6A*, *RPP2A* y *RPL37A*, así como con *SPO20* y *SWM1*, resultó aditiva (Figura 10B y Tablas 3 y 4). De la misma manera que en la condición de glucosa al 0,25%, en 2% de galactosa no se observó aditividad entre genes de la misma categoría funcional: ni entre *SPO20* y *SWM1*, ni entre *DOT6* y *NOC2*. Es interesante resaltar que la mayoría

de las interacciones positivas se dan entre genes que pertenecen a categorías funcionales distintas (Figura 10B y Tablas 3 y 4).

Tabla 3. Valores de crecimiento de la cepa MLM04 sobreexpresando combinaciones de genes supresores en medio sintético con 0,25% de glucosa. Los valores van de 0 (crecimiento nulo) a 5 (el crecimiento de la cepa MLM04 sobreexpresando Hal3).

		YEp181									
YEp195	∅	∅	HAL3	DOT6	RPS6A	SPO20	RPS15	SWM1	RPP2A	RPL37A	
	∅	0									
	HAL3	5									
	DOT6	2	4,5								
	RPS6A	3	4,5	3							
	SPO20	4	4,5	4	4,5						
	RPS15	3	4,5	3	3,5	4,5					
	SWM1	3	4,5	4	4	4	3				
	RPP2A	3,5	4,5	4	4	3,5	4	4			
	RPL37A	3	5	3	3	4,5	3,5	4	3,5		
	NOC2	4	5	4	4	4	4	4	4	4	

Tabla 4. Valores de crecimiento de la cepa MLM04 sobreexpresando combinaciones de genes supresores en medio sintético con 2% de galactosa. Los valores van de 0 (crecimiento nulo) a 5 (el crecimiento de la cepa MLM04 sobreexpresando Hal3).

		YEp181									
YEp195	∅	∅	HAL3	DOT6	RPS6A	SPO20	RPS15	SWM1	RPP2A	RPL37A	
	∅	0									
	HAL3	5									
	DOT6	0	5								
	RPS6A	0	5	0							
	SPO20	0	5	1	4,5						
	RPS15	0	5	0	0	2					
	SWM1	0	4,5	2,5	2,5	0	0				
	RPP2A	0	5	0	0	0	0	0			
	RPL37A	0	5	0	0	4	0	0	0		
	NOC2	2	5	2	3	3,5	2	3,5	2,5	2,5	

6.1.6. El exceso de Ppz1 tiene un impacto en el perfil polisómico

Las proteínas Dot6 y Noc2 están relacionadas con la maduración del RNA ribosómico (rRNA). Este proceso está vinculado con la biogénesis del ribosoma y su trasiego nucleocitoplasmático, por lo que decidimos monitorizar el transporte de las partículas pre-ribosómicas desde el núcleo hacia el citosol empleando dos proteínas ribosómicas etiquetadas con un fluorocromo. Utilizamos Rps3-yEGFP (subunidad pequeña) y Rpl25-yEGFP (subunidad grande) porque es conocida la incorporación temprana de ambas al pre-ribosoma. Como marcador nucleolar, que es donde se inicia la formación del pre-

ribosoma, se empleó mRFP-Nop1. La localización subcelular de estas proteínas en una cepa silvestre fue generalmente citosólica, y no se observó colocalización con el nucleolo (Figura 11). No se observaron diferencias con la cepa silvestre ni en el caso de sobreexpresar Ppz1 durante 28 h (cepa MLM04) ni en el caso de carecer de Ppz1 (cepa

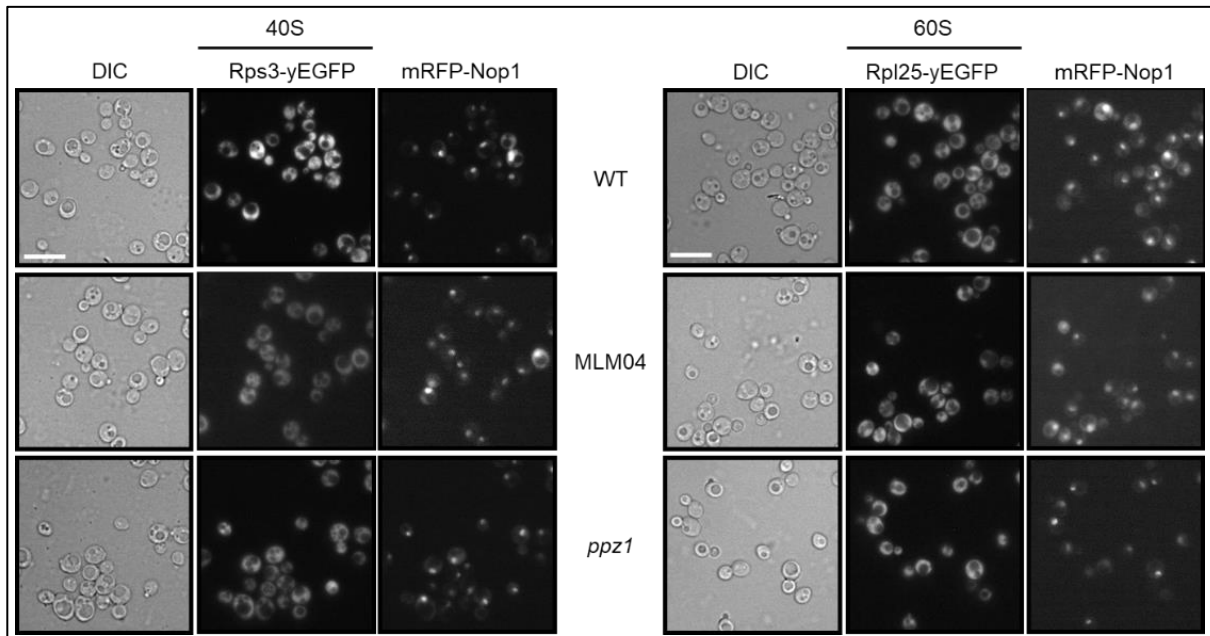


Figura 11. El exceso de Ppz1 no produce un defecto en el trasiego nucleocitoplasmático del ribosoma. Las cepas BY4741 silvestre, y sus derivadas MLM04 y *ppz1* fueron transformadas con los vectores mencionados y se crecieron como se describe en la sección 4.11. Se tomaron las imágenes 28 h después de retirar la doxiciclina. La proteína de fusión Rps3-yEGFP muestra la localización de la subunidad ribosómica pequeña, Rpl25-yEGFP muestra la localización de la subunidad ribosómica grande y mRFP-Nop1 marca la localización del nucleolo. La barra blanca de escala corresponde a 10 μ m.

ppz1). Llegados a este punto, los resultados apuntan a que el exceso de Ppz1 no afecta el trasiego nucleocitoplasmático de las partículas pre-ribosómicas.

El siguiente paso fue investigar si la sobreexpresión de Ppz1 tiene un impacto en el proceso de traducción de proteínas. Para ello, analizamos y comparamos el perfil polisómico de la cepa MLM04 creciendo sin doxiciclina durante 28 h (como en el caso del trasiego nucleocitoplasmático) con el perfil de la cepa silvestre creciendo en las mismas condiciones. Como se muestra en la Figura 12A, la cepa MLM04 presentó una clara reducción del contenido polisómico comparado con la cepa silvestre (WT), disminuyendo así la razón polisoma/monosoma desde 1,5 en la cepa silvestre hasta un

1,1 en la cepa MLM04. Este resultado es compatible con un defecto moderado en el inicio de la traducción derivado de la sobreexpresión de Ppz1. Esta misma reducción del contenido polisómico se observó cuando se empleó el vector episomal pCM190-PPZ1 (no se muestra), apuntando a que el exceso de Ppz1 es perjudicial para el correcto inicio

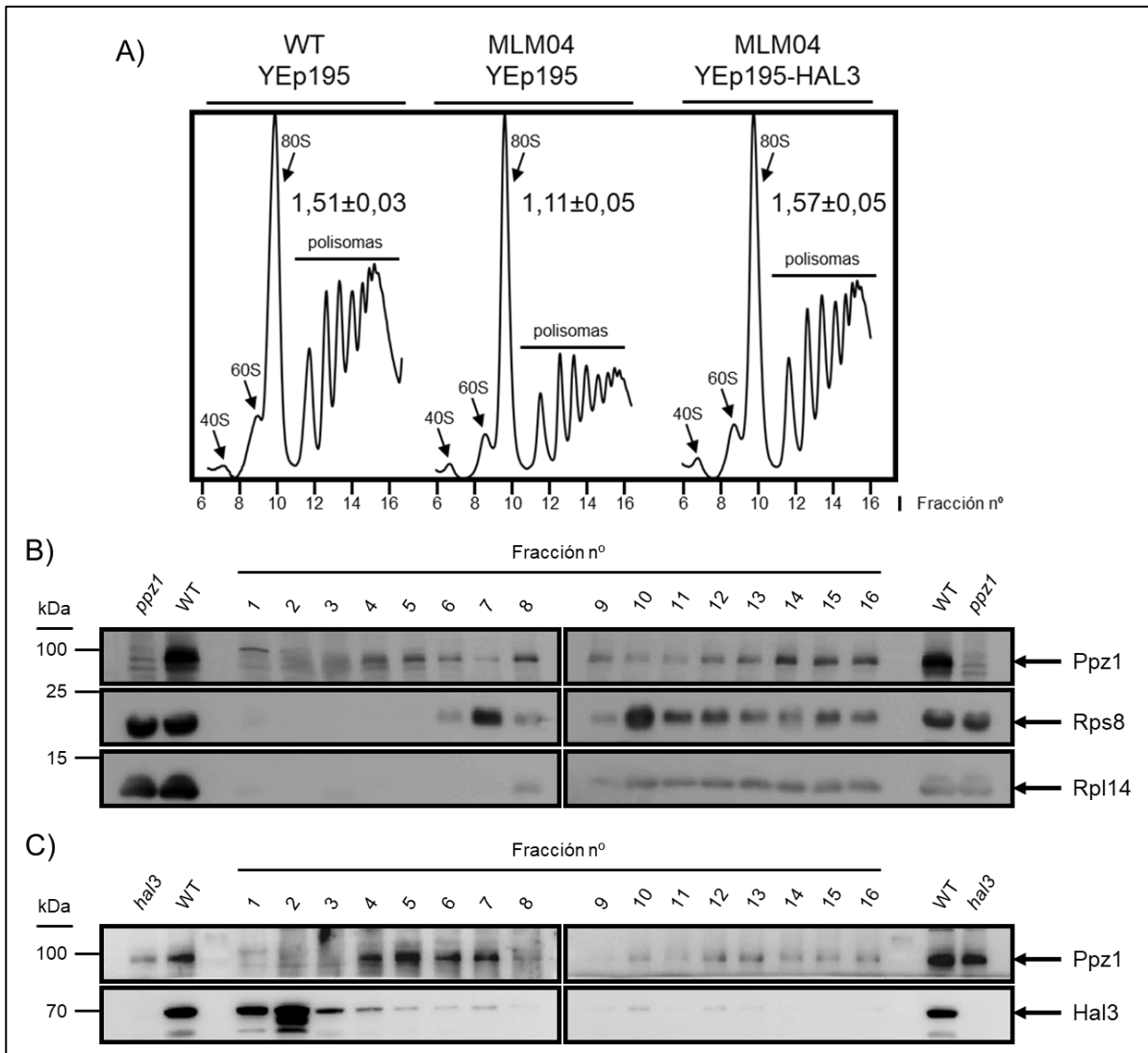


Figura 12. Ppz1 se asocia con fracciones ribosómicas y su sobreexpresión provoca una caída de la cantidad de polisomas. A) Perfiles normalizados de los diferentes componentes ribosómicos de las cepas BY4741 y MLM04 albergando un plásmido vacío y de células MLM04 con el vector YEp195-HAL3. Los cultivos se crecieron y las muestras se prepararon como se describe en Materiales y Métodos. Los valores corresponden a la razón polisoma/monosoma (P/M) calculada a partir de tres experimentos (media ± SEM). B) La cepa silvestre albergando un plásmido pCM190 se cultivó, se prepararon los extractos y se sometieron a electroforesis. La Ppz1 endógena (en este caso no hay sobreexpresión) se detectó mediante inmunoblot. Se incluyen extractos totales de la cepa BY4741 y del mutante simple *ppz1* como referencia. Se inmunodetectaron también las proteínas Rps8 y Rpl14 como marcadores de las subunidades ribosómicas 40S y 60S, respectivamente. C) Las fracciones indicadas de la muestra a la derecha del panel A (MLM04 + YEp195-HAL3) se sometieron a electroforesis y fueron transferidas a membranas y ensayadas con los anticuerpos anti-Ppz1 y anti-Hal3. Se incluyen extractos totales de la cepa BY4741 y del mutante *hal3* como control.

de la traducción. Para comprobar la implicación directa de la actividad fosfatasa de Ppz1, se transformó la cepa MLM04 con el plásmido YEp195-HAL3, que contiene el gen que codifica el inhibidor de Ppz1 en elevado número de copias. La sobreexpresión de Hal3 normalizó el patrón del perfil polisómico de la cepa MLM04 hasta convertirlo en el perfil de la cepa silvestre (Figura 12A), confirmando así el papel de la fosfatasa Ppz1 en este defecto.

Se recogieron fracciones de los gradientes de la cepa silvestre, y de la cepa MLM04 (en condiciones de sobreexpresión de Ppz1) portando el plásmido YEp195-HAL3. Se realizó una extracción de proteínas y se estudió la presencia de Ppz1 y Hal3 en las diferentes fracciones mediante *western blot*. Como se puede observar en la Figura 12B, la cepa BY4741, que albergaba un plásmido vacío, presenta Ppz1 en numerosas fracciones polisómicas. La presencia de Ppz1 se detectó también en todas las fracciones que contienen partículas ribosómicas en células BY4741 transformadas con pCM190-PPZ1 en condiciones de sobreexpresión (no se muestra). En la Figura 12C se muestra la distribución de Ppz1 en las diferentes fracciones polisómicas en el caso de una cepa MLM04 sobreexpresando Hal3. En esta figura también se aprecia que el patrón de Hal3 y Ppz1 son muy distintos, ya que Hal3 aparece fundamentalmente en las fracciones 1-3, que corresponden a las fracciones libres de ribosomas. Esta distribución diferencial de Ppz1 y Hal3 sugiere que la Ppz1 asociada al ribosoma no estaría siendo inhibida por Hal3 y, por tanto, estaría exhibiendo su actividad fosfatasa. Por lo tanto, la sobreexpresión de Hal3 no evita la presencia de Ppz1 en los ribosomas, pero parece que favorece la acumulación de Ppz1 en las fracciones no polisómicas (comparado con la cepa silvestre en la Figura 12B).

6.1.7. La hiperfosforilación de eIF2 α en células que sobreexpresan Ppz1 necesita Gcn2

La regulación del inicio de la traducción depende principalmente de dos vías: i) la regeneración del eIF2 unido a GTP, impedida por la fosforilación de eIF2 α en el residuo Ser51 y ii) el secuestro del factor eIF4E (necesario para el inicio) por parte de las proteínas de unión a eIF4E (en adelante 4E-BP). En levadura, la quinasa no esencial Gcn2 es la única descrita encargada de fosforilar la Ser51 de eIF2 α , mientras que las proteínas no esenciales Eap1 y Caf20 son las únicas 4E-BP conocidas. Diego Velázquez había demostrado recientemente en nuestro laboratorio que el exceso de Ppz1 provoca una hiperfosforilación en eIF2 α , por lo que nos propusimos monitorizar en estas circunstancias el estado de fosforilación de eIF2 α en ausencia de Gcn2, empleando un anticuerpo fosfoespecífico para el residuo Ser51. Como se muestra en la Figura 13A, al sobreexpresar Ppz1 en una cepa silvestre se observó una fuerte fosforilación en eIF2 α , resultado consistente con los datos previos. La delección de *GCN2* eliminó completamente la fosforilación de eIF2 α , apoyando su rol de quinasa única de eIF2 α . Por tanto, podemos concluir que la sobreexpresión de Ppz1 causa una fosforilación de eIF2 α de manera dependiente de Gcn2.

Llegados a este punto, nos preguntamos si la fosforilación de eIF2 α podría explicar el defecto de crecimiento derivado del exceso de Ppz1. En primera instancia, se sobreexpresó la fosfatasa a partir del vector pYES2-PPZ1, sin que se observara ninguna mejora de crecimiento debida a la carencia de *GCN2* (Figura 13B). A continuación, recurrimos al set de tres vectores derivados de pCM para sobreexpresar Ppz1. Como se observa en la Figura 14A, en todos los casos, se observó una mejora de crecimiento debida a la delección de *GCN2*, dando a entender que la fosforilación de eIF2 α , en estas condiciones, contribuye -aunque parcialmente- al defecto de crecimiento. Como se

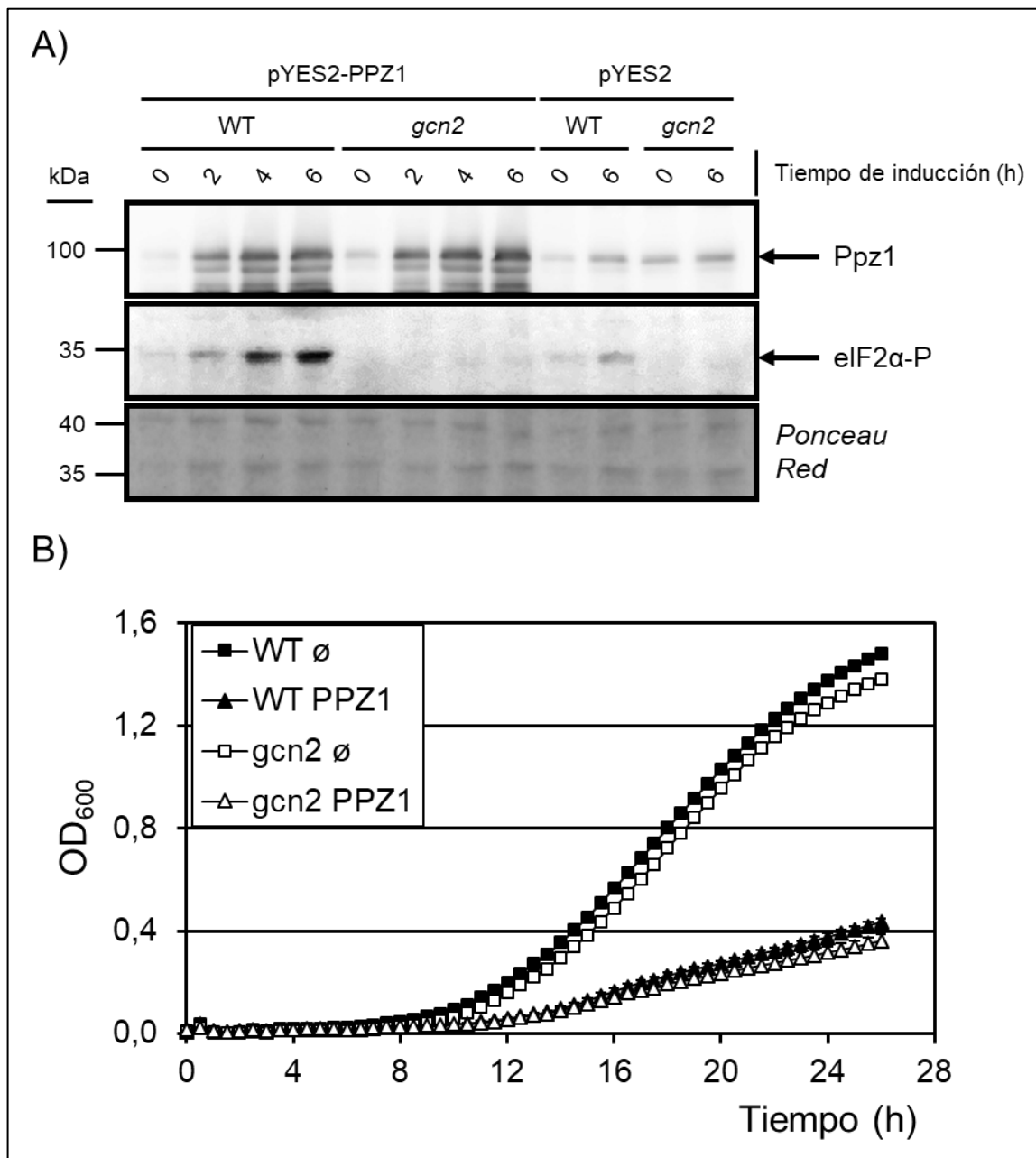


Figura 13. La fosforilación de eIF2 α depende de *Gcn2*. A) Las cepas BY4741 (WT) y *gcn2* fueron transformadas con los vectores pYES2 y pYES2-PPZ1 y se crecieron según lo especificado en Materiales y Métodos. Se prepararon extractos de proteínas que se resolvieron por SDS-PAGE (gel 10% poliacrilamida) y se transfirieron a una membrana de PVDF. Ésta se ensayó con los anticuerpos anti-Ppz1 y anti-eIF2 α -P. B) Las cepas transformadas en el panel A se emplearon para realizar una curva de crecimiento en medio SC-URA conteniendo rafinosa y 2% de Galactosa. Los datos representados corresponden al promedio de 3 cultivos independientes y las barras de error corresponden a la SEM. \emptyset se refiere a pYES2 vacío.

muestra en la Figura 14B, la mejora observada por la delección de *GCN2* no se debió a un defecto en la expresión de Ppz1, ya que el análisis por inmunoblot de los niveles de la fosfatasa no permitió observar diferencias entre la cepa silvestre y la defectiva en la quinasa.

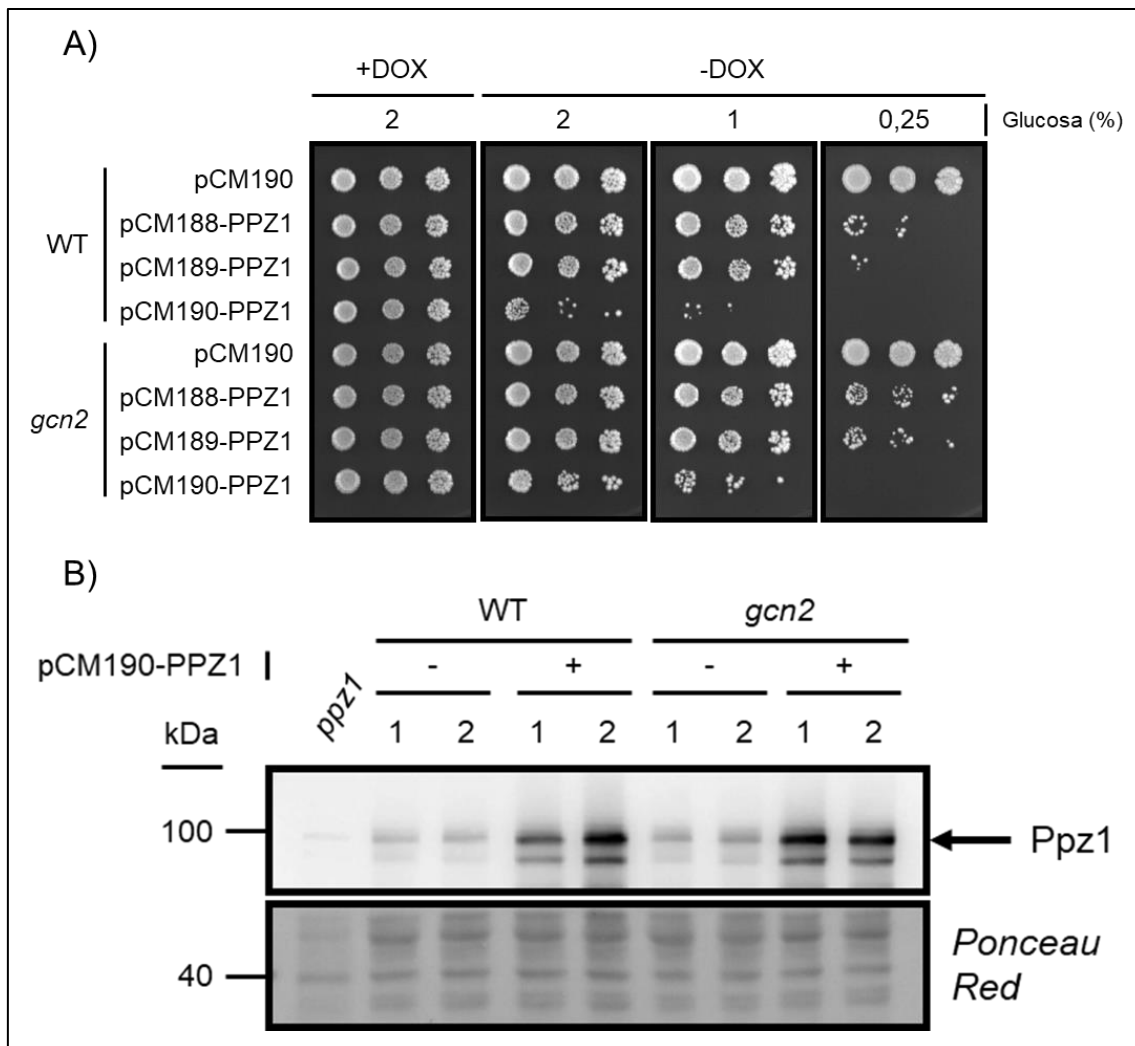


Figura 14. La falta de GCN2 mejora el crecimiento de células que sobreexpresan Ppz1. A) Las cepas BY4741 (WT) y *gcn2* fueron transformadas con los vectores indicados. Los cultivos se trataron como en la Figura 3A. Las placas fueron incubadas a 28°C y las imágenes fueron obtenidas a los 6 días. B) Las cepas BY4741 y *gcn2* se transformaron con el vector pCM190 vacío y pCM190-PPZ1 y se crecieron como está descrito en Materiales y Métodos. Se colectaron las muestras tras 8 horas sin doxiciclina y se realizó una extracción de proteínas. Las diferentes muestras (25 µg de proteína total) se sometieron a electroforesis (gel 8% poliacrilamida) y se transfirieron a una membrana de PVDF que se incubó con el anticuerpo anti-Ppz1. 1 y 2 se refieren a dos clones independientes.

De la misma manera, nos preguntamos si las deleciones de los genes que codifican las 4E-BP, responsables de la otra vía de regulación de la traducción, podrían mejorar el crecimiento de células que sobreexpresan Ppz1. En la Figura 15 se observa que ni las mutaciones simples (*eap1* y *caf20*) ni la doble mutación son capaces de mejorar el crecimiento de la cepa silvestre cuando se sobreexpresa Ppz1 a partir de construcciones derivadas de vectores pCM (de hecho, la mutación de *EAP1* agrava el defecto en el

crecimiento). Todos estos resultados sugieren que el exceso de Ppz1 afecta la fosforilación de eIF2 α , pero no parece afectar la interacción entre eIF4E y Eap1/Caf20.

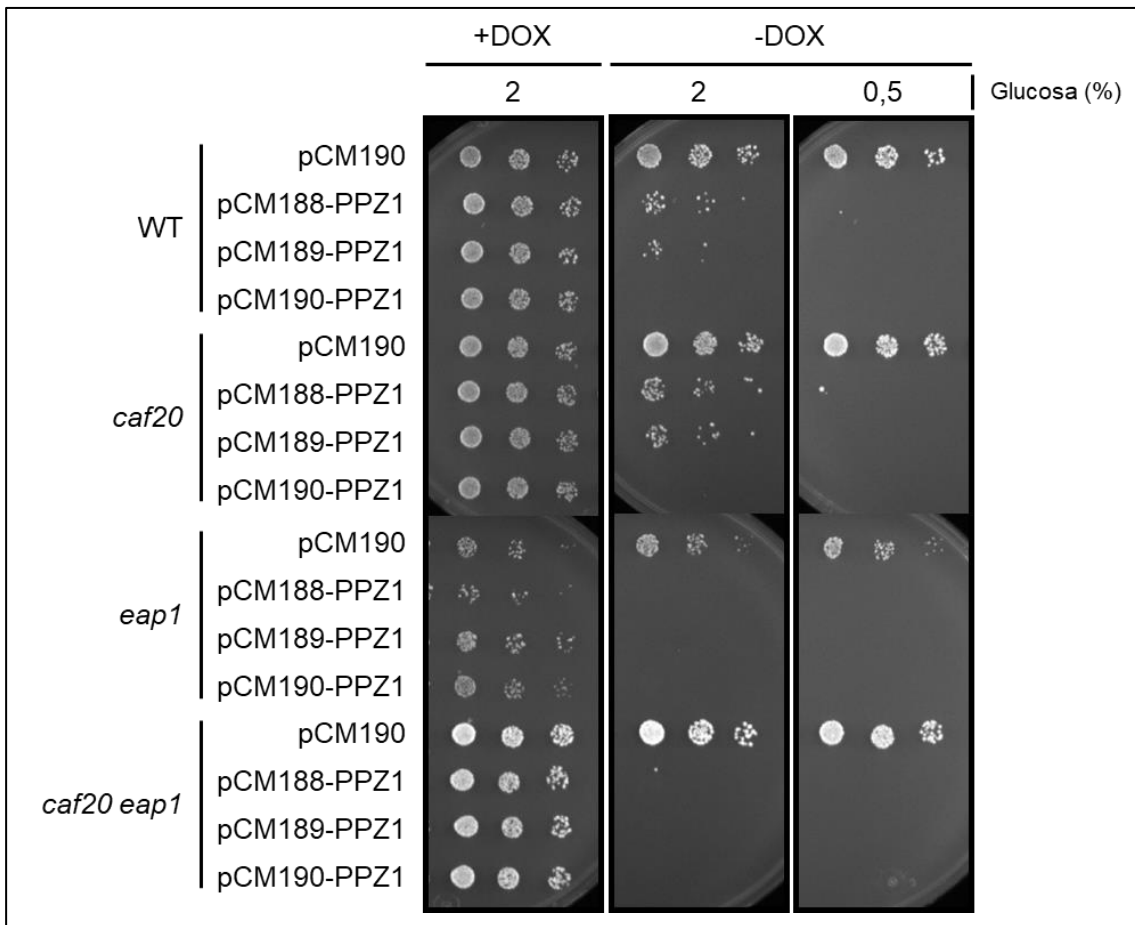


Figura 15. Efecto de la delección de los genes que codifican 4E-BP en el crecimiento de las células que sobreexpresan Ppz1. Las cepas BY4742 y sus derivadas *caf20* (Y17334), *eap1* (Y17036) y la doble mutante *caf20 eap1* (GP6967) fueron transformadas con el plásmido pCM190 vacío y el set de vectores pCM-PPZ1. Los cultivos fueron tratados como en la Figura 3A. Las placas fueron incubadas a 28°C durante 3 días.

6.2. La región N-terminal de Ppz1 es determinante para su toxicidad

En este capítulo vamos a detallar los resultados obtenidos en relación con la toxicidad de las fosfatasas Ppz2 y Glc7, comparadas con Ppz1 y con versiones híbridas de Ppz1 y Ppz2.

6.2.1. La región N-terminal de las fosfatasas Ppz es importante para la toxicidad

Las fosfatasas Ppz pertenecen a la familia de fosfatasas PPP, cuyo representante principal en levadura es Glc7 (Figura 16). Dado que la actividad fosfatasa de Ppz1 es necesaria para su toxicidad (Calafí *et al.*, 2020), y teniendo en cuenta la estrecha relación entre los dominios catalíticos de Ppz1 y Ppz2, y la poca similitud entre sus segmentos N-terminales, nos preguntamos si la sobreexpresión de Ppz2 tendría el mismo efecto fenotípico en la célula. Para dar respuesta a ello, empleamos dos vectores episomales que contienen *PPZ2* bajo el control: i) de su propio promotor (YEp352-PPZ2) y ii) del promotor *tetO₇*, regulable por doxiciclina (pCM190-PPZ2). Además, construimos versiones de las dos fosfatasas en el vector pCM190 que contenían un epítipo HA en su extremo C-terminal. Como podemos observar en la Figura 17A, la expresión de Ppz2 no afectó el crecimiento, independientemente de la construcción empleada y de la presencia










Construcción	Región N-terminal	Dominio catalítico	Tamaño (aa)
Ppz1			692
Ppz2			710
Ppz1:2			675
Ppz2:1			729
Glc7			312

Figura 16. Esquema de la estructura de Ppz1, Ppz2, las proteínas híbridas Ppz y Glc7. Ppz1:2 está compuesto por el N-terminal de Ppz1 y el dominio catalítico de Ppz2. Ppz2:1 se refiere al constructo contrario. El tamaño de las proteínas nativas y de las quimeras se indica en la columna de la derecha y no tiene en cuenta la etiqueta HA que puedan tener algunas proteínas.

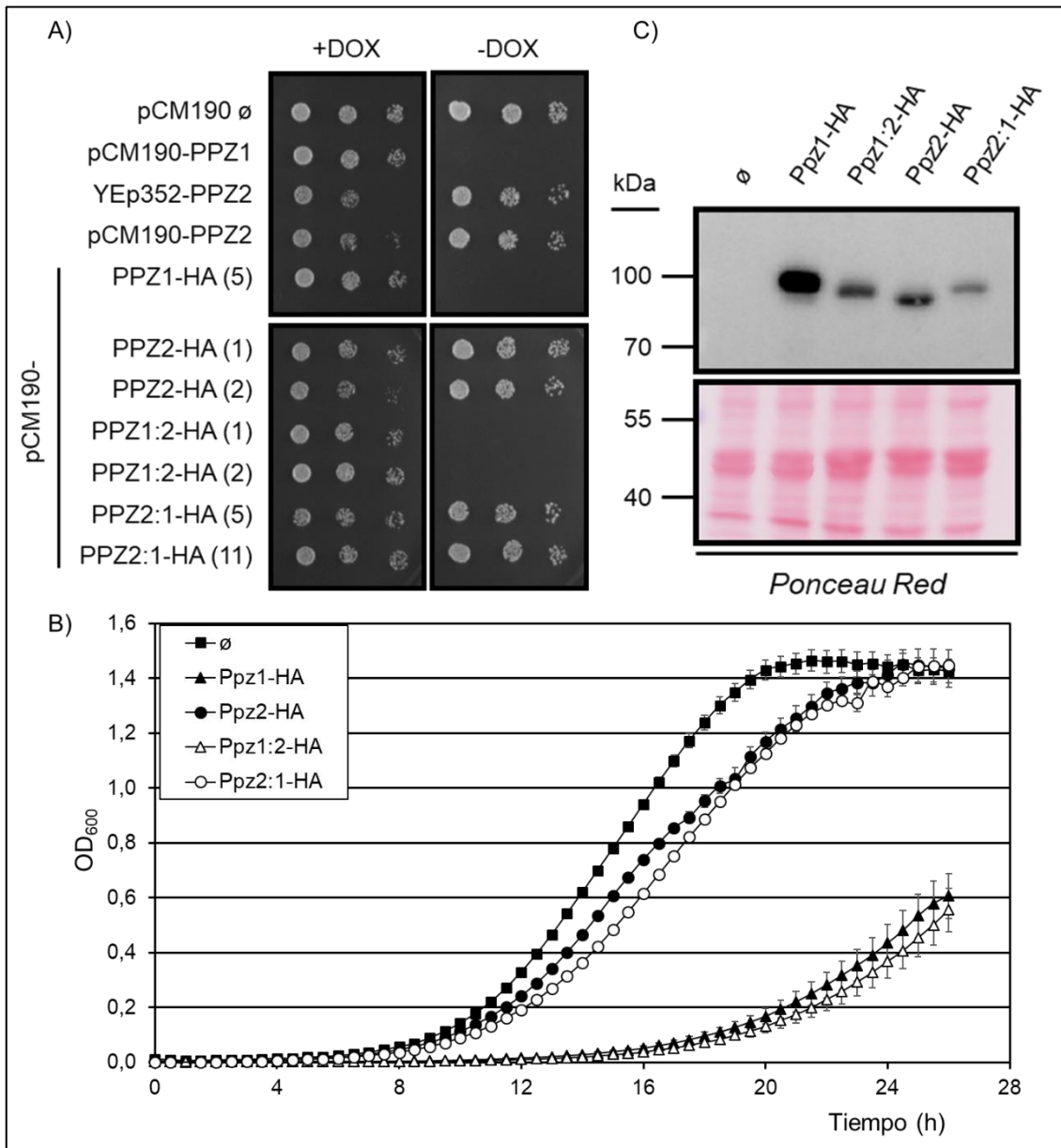


Figura 17. Análisis del crecimiento de las células que sobreexpresan las proteínas Ppz1, Ppz2, Ppz1:2 y Ppz2:1. A) La cepa BY4741 fue transformada con los vectores indicados. Los cultivos se crecieron según se detalla en Materiales y Métodos y fueron tratados como en la Figura 3A. Todos los cultivos se depositaron en la misma placa. Los números entre paréntesis indican los clones específicos empleados en el ensayo. Las imágenes fueron capturadas tras 2 días de crecimiento. B) Las células BY4741 transformadas con los vectores derivados de pCM190 usados en el panel A se crecieron en medio líquido como se detalla en Materiales y Métodos, y la OD_{600} fue medida cada 30 minutos. Los datos se presentan como promedio \pm SEM de al menos tres experimentos hechos por triplicado. Para los paneles B y C, los clones empleados fueron: Ppz1 (5), Ppz2 (1), Ppz1:2 (1) y Ppz2:1 (5). C) Se colectaron cultivos de células albergando las construcciones indicadas y se prepararon extractos de proteínas como se detalla en Materiales y Métodos. Las muestras se sometieron a electroforesis (gel 8% poliacrilamida) y las proteínas se transfirieron a la membrana. \emptyset denota el plásmido pCM190 vacío.

de la etiqueta HA en su extremo C-terminal. Este comportamiento se demostró también cuando las versiones etiquetadas crecieron en cultivo líquido (Figura 17B), donde las

células que expresan Ppz2 crecieron de manera bastante similar a las que albergaban un plásmido vacío.

Al inmunodetectar los niveles de Ppz1 y Ppz2 etiquetados con HA, observamos que los niveles de Ppz2-HA son claramente inferiores a los de Ppz1-HA (Figura 17C). Nos preguntamos si estos niveles de expresión de Ppz2 serían suficientes para llevar a cabo las funciones biológicas propias de este enzima. Para ello, transformamos la cepa *ppz1 ppz2*, sensible a 37°C, con las distintas construcciones de *PPZ2*. En la Figura 18 se aprecia cómo, independientemente de la presencia de la etiqueta, las tres construcciones portadoras de *PPZ2* normalizaron la tolerancia a una temperatura elevada, indicando que la proteína es funcional.

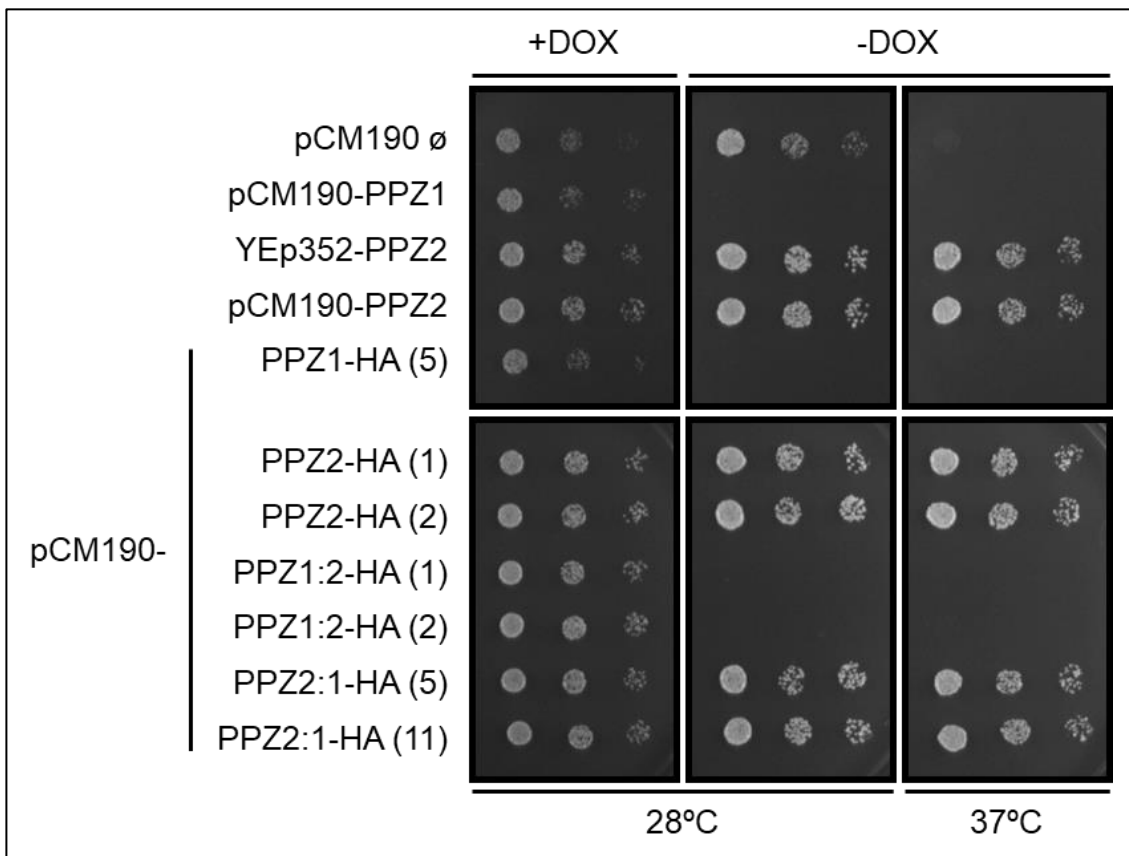


Figura 18. La expresión de Ppz2 y Ppz2:1 rescata el crecimiento del doble mutante termosensible *ppz1 ppz2*. La cepa *ppz1 ppz2* (AGS19) fue transformada con los vectores indicados. Los cultivos se trataron como en la Figura 3A y las placas se incubaron durante 2 días a las temperaturas indicadas.

Con la idea de estudiar qué zonas de las fosfatasa Ppz son importantes para esta toxicidad, creamos dos versiones híbridas etiquetadas también en el extremo C-terminal (Figura 16). La primera (Ppz1:2) está compuesta por la región N-terminal de Ppz1 seguida por el dominio catalítico de Ppz2. En la segunda (Ppz2:1), el segmento N-terminal de Ppz2 precede al dominio catalítico de Ppz1. Sorprendentemente, mientras la expresión de Ppz2:1 no afectó el crecimiento, la de Ppz1:2 bloqueó el crecimiento a niveles comparables a Ppz1 (Figuras 17A y 17B). Cuando monitorizamos la expresión de las versiones híbridas, observamos que en ningún caso alcanzan el nivel de Ppz1, pero mientras que la expresión de Ppz2:1 fue muy baja, la de Ppz1:2 fue similar a la de Ppz2 (Figura 17C). Este resultado manifiesta que la expresión de Ppz1:2 es tóxica incluso con niveles notablemente inferiores a los de Ppz1, y mucho más parecidos a los de Ppz2. Pese a los bajos niveles de expresión observados para Ppz2:1, cabe destacar que Ppz2:1 normalizó la tolerancia a la temperatura elevada de la cepa *ppz1 ppz2*, confirmando la funcionalidad de la proteína (Figura 18). Esta cepa, además de ser termosensible, presenta una elevada tolerancia a iones de litio, y es hipersensible a cafeína, fenotipos ya visibles en un mutante simple *ppz1* (Figura 19). La expresión de *PPZ2* a partir del vector YEp352

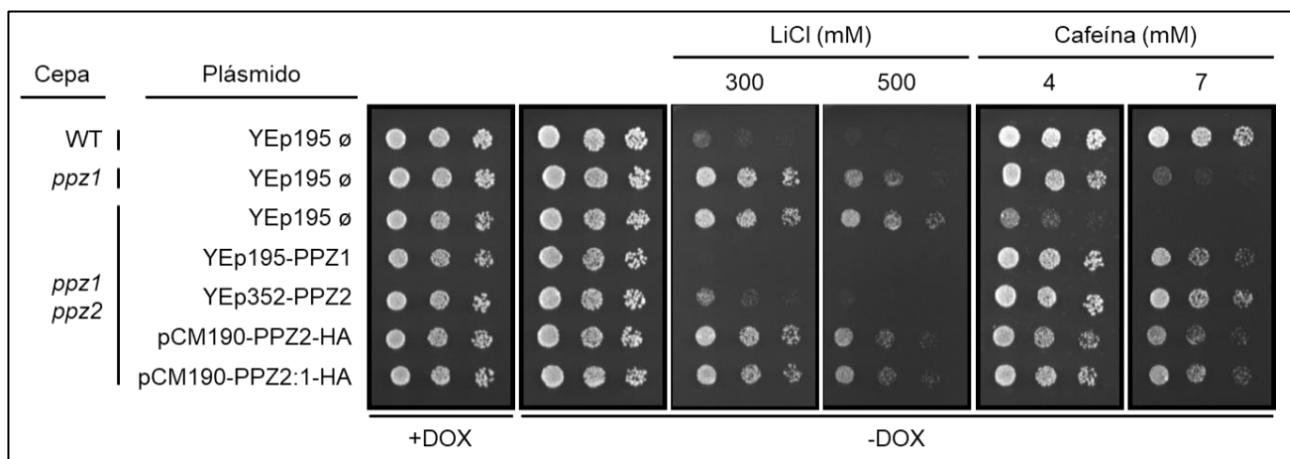


Figura 19. Efecto de la expresión de Ppz2 y Ppz2:1 en los fenotipos de tolerancia a litio y de sensibilidad a cafeína que presentan los mutantes *ppz*. La cepa silvestre BY4741 (WT) y sus derivadas *ppz1* y *ppz1 ppz2* (AGS19) fueron transformadas con los plásmidos indicados, tratadas como en la Figura 3A y sembradas sobre placas SC-URA, con 2% glucosa, conteniendo las cantidades de LiCl y de cafeína indicadas en cada caso. Las imágenes fueron capturadas tras 3 días de incubación. Se usaron los siguientes clones: Ppz2 (1) y Ppz2:1 (5).

fue capaz de normalizar la tolerancia a litio y cafeína del doble mutante *ppz1 ppz2*. Por otro lado, las versiones etiquetadas fueron igual de eficaces que la *PPZ2* nativa (YEp352-*PPZ2*) en normalizar la tolerancia a cafeína, mientras que fueron incapaces de hacerlo en presencia de litio, donde solo se apreció un efecto sutil.

6.2.2. Evaluación de la toxicidad de Glc7 en relación con la de las fosfatasas Ppz

Como se describe en la Introducción, ha sido descrito que el exceso de Glc7 es tóxico para las células. Nosotros quisimos comparar los efectos de la expresión de Glc7, Ppz1 y Ppz2 a partir del mismo vector pCM190. En el laboratorio disponíamos de una versión en la que Glc7 estaba etiquetada con un epítipo HA en el extremo N-terminal, por lo que pensamos crear versiones de Ppz1 y Ppz2 etiquetadas en el N-terminal para mejor comparación. Sin embargo, ambas Ppz disponen de una secuencia consenso de miristilación, por lo que añadir cualquier polipéptido en el N-terminal disrumiría la modificación postraducciona. Como se describe en el siguiente capítulo (véase Figura 22A), la expresión de una versión no miristilable de Ppz1 presenta una ligera pérdida de toxicidad respecto a la versión nativa. Ya que la sobreexpresión de Ppz2, como hemos observado en el apartado anterior, no es tóxica prácticamente, creemos que la posible pérdida de miristilación no debería afectar de manera perceptible a la toxicidad de la fosfatasa. Por ello, decidimos crear solo una nueva versión de Ppz2 con una etiqueta en su N-terminal. Como mostramos en la Figura 20A, la sobreexpresión de HA-Ppz2 no tuvo ningún efecto en el crecimiento de las células, ni en glucosa ni en galactosa. La expresión de HA-Glc7 redujo el crecimiento en glucosa, aunque no llegó a los niveles de toxicidad de Ppz1, e impidió por completo el crecimiento en presencia de galactosa. Se obtuvieron resultados similares cuando estas cepas se emplearon en cultivos líquidos en presencia de glucosa (Figura 20B). Para comparar los niveles de proteína de ambas versiones de Ppz2

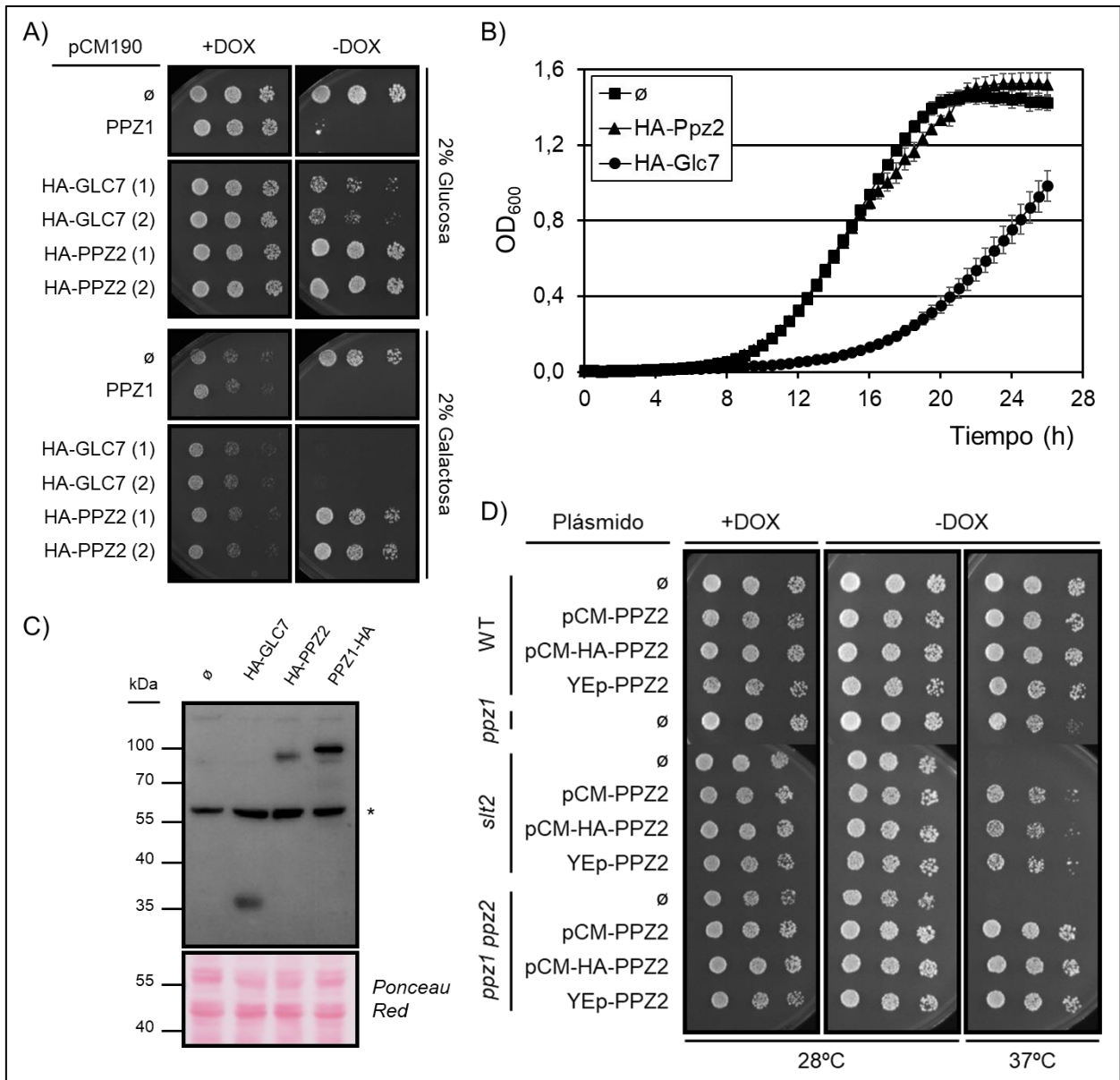


Figura 20. Efecto sobre el crecimiento de la expresión de las versiones de Glc7 y Ppz2 etiquetadas en el extremo N-terminal. A) La cepa BY4741 fue transformada con las construcciones indicadas, tratada como en la Figura 3A y sembrada sobre placas SC-URA conteniendo glucosa o galactosa al 2%. Todos los cultivos fueron sembrados en la misma placa. Las imágenes fueron tomadas tras 3 días de incubación. Los números entre paréntesis se refieren al clon empleado. PPZ1 se refiere a la Ppz1 nativa sin etiqueta. B) Células BY4741 fueron transformadas con las construcciones indicadas y procesadas como en la Figura 17B. Los datos representan el promedio \pm SEM de 4-6 cultivos independientes. C) Se recogieron los cultivos de células BY4741 transformadas con los vectores indicados (en el caso de Glc7 y Ppz2, se empleó el clon 1) y se realizó la extracción de proteínas como se detalla en Materiales y Métodos. Las muestras fueron sometidas a SDS-PAGE (gel 10% poliacrilamida). Las proteínas se transfirieron a la membrana y fueron inmunodetectadas usando anticuerpos anti-HA. Se empleó una muestra de Ppz1-HA como referencia, tratada se manera idéntica. El asterisco indica una banda inespecífica reconocida por nuestro anticuerpo. D) Los vectores indicados se usaron para transformar las cepas BY4741 y sus derivadas *ppz1*, *slt2* y *ppz1 ppz2* (AGS19). Los cultivos fueron tratados como en la Figura 3A y sembrados en placas SC-URA, incubadas a las temperaturas indicadas durante 3 días. pCM es pCM190. YEp se refiere a YEp352.

y Glc7 con Ppz1, empleamos la versión Ppz1-HA. Como se muestra en la Figura 20C, observamos niveles inferiores de HA-Glc7 respecto a Ppz1-HA, ambas expresadas desde

el vector pCM190. Por el contrario, los niveles de Glc7 y Ppz2 etiquetados en el N-terminal fueron comparables.

Como se aprecia en la Figura 20D, la expresión de la versión etiquetada HA-Ppz2 rescató el crecimiento del doble mutante *ppz1 ppz2* a 37°C a niveles de la cepa silvestre (estas células crecen mejor que el mutante simple *ppz1*). Además, la expresión de HA-Ppz2 también fue capaz de permitir el crecimiento de la cepa *slt2*, mutante termosensible por su defecto en la construcción de pared celular, a 37°C. Por tanto, los resultados indican que la versión etiquetada HA-Ppz2 es capaz de llevar a cabo las funciones de la Ppz2 nativa.

6.2.3. Análisis comparativo de las extensiones N-terminal de Ppz1 y Ppz2

Dada la diferencia tan drástica en el efecto de la sobreexpresión de Ppz1 y el híbrido Ppz1:2 en comparación con Ppz2, nos hemos centrado en las diferencias estructurales de las regiones N-terminales de ambas fosfatasa. Los fragmentos intercambiados tenían una longitud de 349 (N-Ppz1) y 383 (N-Ppz2) residuos (Figura 16 y Figura A1, en sección 10). El estudio de la composición aminoacídica de estas regiones (Figura 21A) reveló en ambos casos un gran número de serinas (26,1% en N-Ppz1 y 22,7% en N-Ppz2), que representa una presencia de 2 a 3 veces mayor que la media del proteoma de levadura, una prevalencia de residuos básicos, sobre todo argininas (12% Lys+Arg en N-Ppz1 y 14,1% en N-Ppz2), y una relativa escasez de residuos ácidos (principalmente glutamato). Todo ello resulta en un pI elevado (9,44 para N-Ppz1 y 10,28 para N-Ppz2). Se compararon también las secuencias de ambas proteínas empleando el *software* IUPred2A en busca de regiones desordenadas, y se obtuvieron perfiles similares (Figura 21B): los dominios C-terminales estaban fuertemente estructurados, mientras que la extensión N-terminal de ambas proteínas mostraban los rasgos típicos de una región intrínsecamente

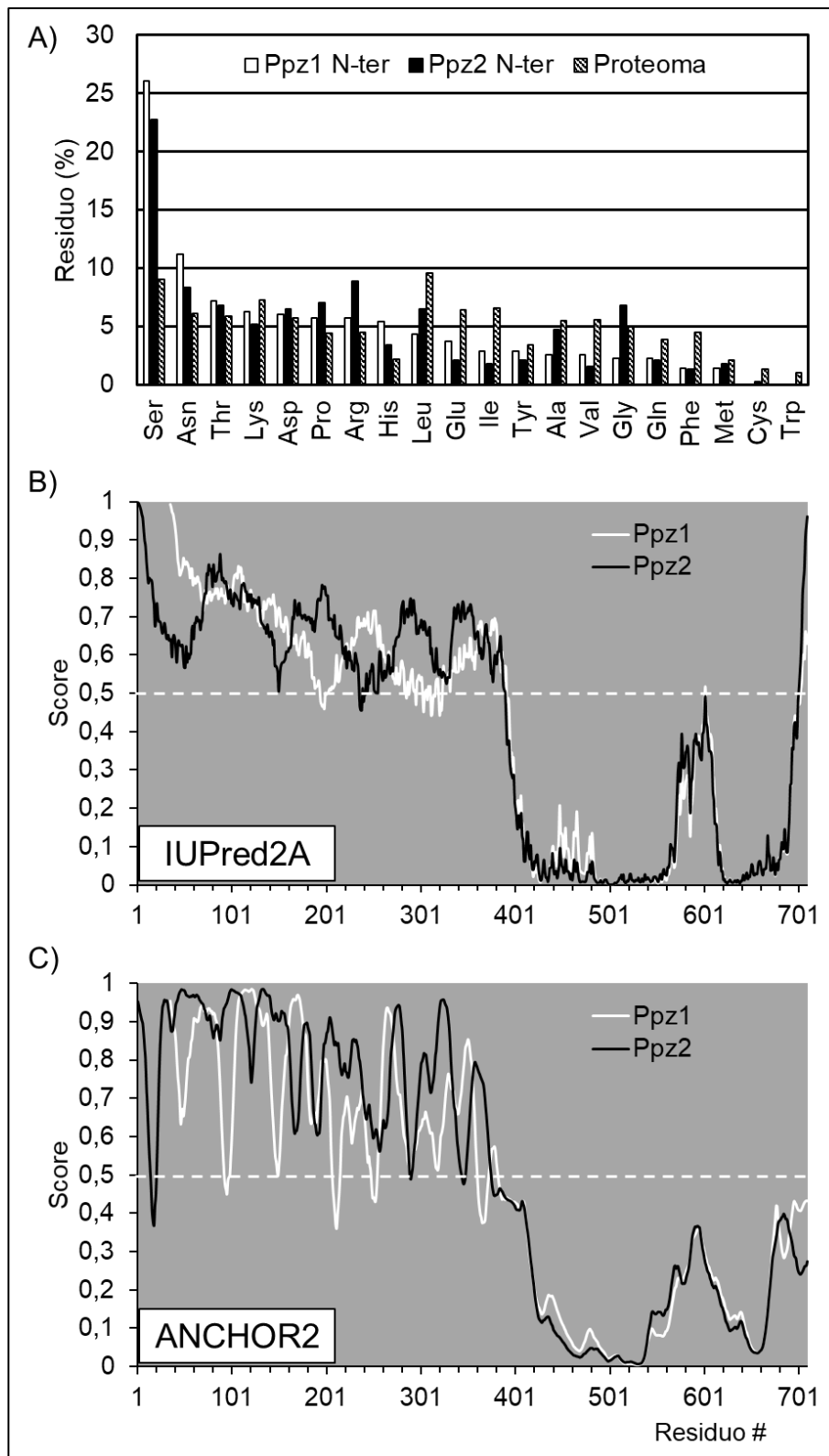


Figura 21. Análisis bioinformático de las secuencias de Ppz1 y Ppz2. A) Composición de aminoácidos de las regiones N-terminales de Ppz1 (349 residuos) y de Ppz2 (383 residuos), comparadas con la composición promedio del proteoma de levadura. B) Predicción de los IDR según el *software* IUPred2A. Nótese que en los paneles B y C la secuencia de Ppz1 ha sido desplazada 35 residuos para alinear los perfiles de los dominios catalíticos de ambas fosfatasas. C) Predicción de las regiones desordenadas con capacidad de unión según el *software* ANCHOR2. El umbral de 0,5 (línea discontinua) corresponde a una predicción de falsos positivos del 5% en IDR.

desestructurada con prácticamente toda la mitad N-terminal de las proteínas por encima de la puntuación de 0,5 (umbral estándar). Por lo tanto, al menos con lo visto hasta ahora, podemos decir que ambas regiones comparten características similares. Sin embargo, cuando se buscaron regiones capaces de adoptar una estructura tras interactuar con otra proteína (este proceso se conoce como *foldinɡ upon binding*) usando el algoritmo ANCHOR2 (Figura 21C), el perfil entre ambas proteínas fue algo distinto, mostrando cuatro regiones en Ppz1 entre los residuos 50 y 225 con un valor por debajo de 0,5 (umbral estándar) que no fueron detectadas en Ppz2.

6.3. La relación entre la sobreexpresión de Ppz1 y la homeostasis de cationes monovalentes

Resultados previos obtenidos en el laboratorio apuntaban a una posible vinculación de Ppz1 con la vía HOG, de respuesta a estrés osmótico. La proteína Hog1 es la MAPK de la ruta HOG y se encarga de regular mediante fosforilación otras proteínas para dar una respuesta a una situación de estrés. En el laboratorio, se realizó un ensayo de fosfoproteómica en el que se comparó una cepa que sobreexpresa Ppz1 contra la cepa silvestre. Entre muchos otros resultados, se observó un aumento en la fosforilación de Hog1 al sobreexpresar Ppz1 (Velázquez *et al.*, 2020). Después de obtener este resultado, nos propusimos estudiar la posible implicación de la vía HOG en la toxicidad de Ppz1. Para ello, seleccionamos una batería de mutantes relacionados con la proteína Hog1 y estudiamos su comportamiento ante la sobreexpresión de la Ppz1 nativa y de dos versiones de ésta: G2A y R451L. La mutación G2A impide la adición de un grupo miristilo (miristilación) a la proteína, necesario para la localización de la proteína en la periferia celular (Lee *et al.*, 2019). La mutación R451L reduce drásticamente la actividad fosfatasa y se ha demostrado recientemente en el laboratorio que la versión R451L es mucho menos tóxica que la nativa (Calafí *et al.*, 2020).

6.3.1. La mutación G2A en Ppz1 atenúa la toxicidad dependiendo de la disponibilidad de K⁺

Ppz1 se puede miristilar *in vivo* en su Gly2. Debido a la importancia que tienen este tipo de modificaciones postraduccionales en la localización -y por tanto función- de las proteínas, nos propusimos investigar si la mutación alteraba la toxicidad derivada del exceso de fosfatasa. Para ello, empleamos construcciones que expresaban las proteínas no etiquetadas desde el vector pCM190. Como se muestra en la Figura 22A, la expresión de la versión G2A, en la que el residuo Gly2 se sustituye por Ala, permitió un crecimiento

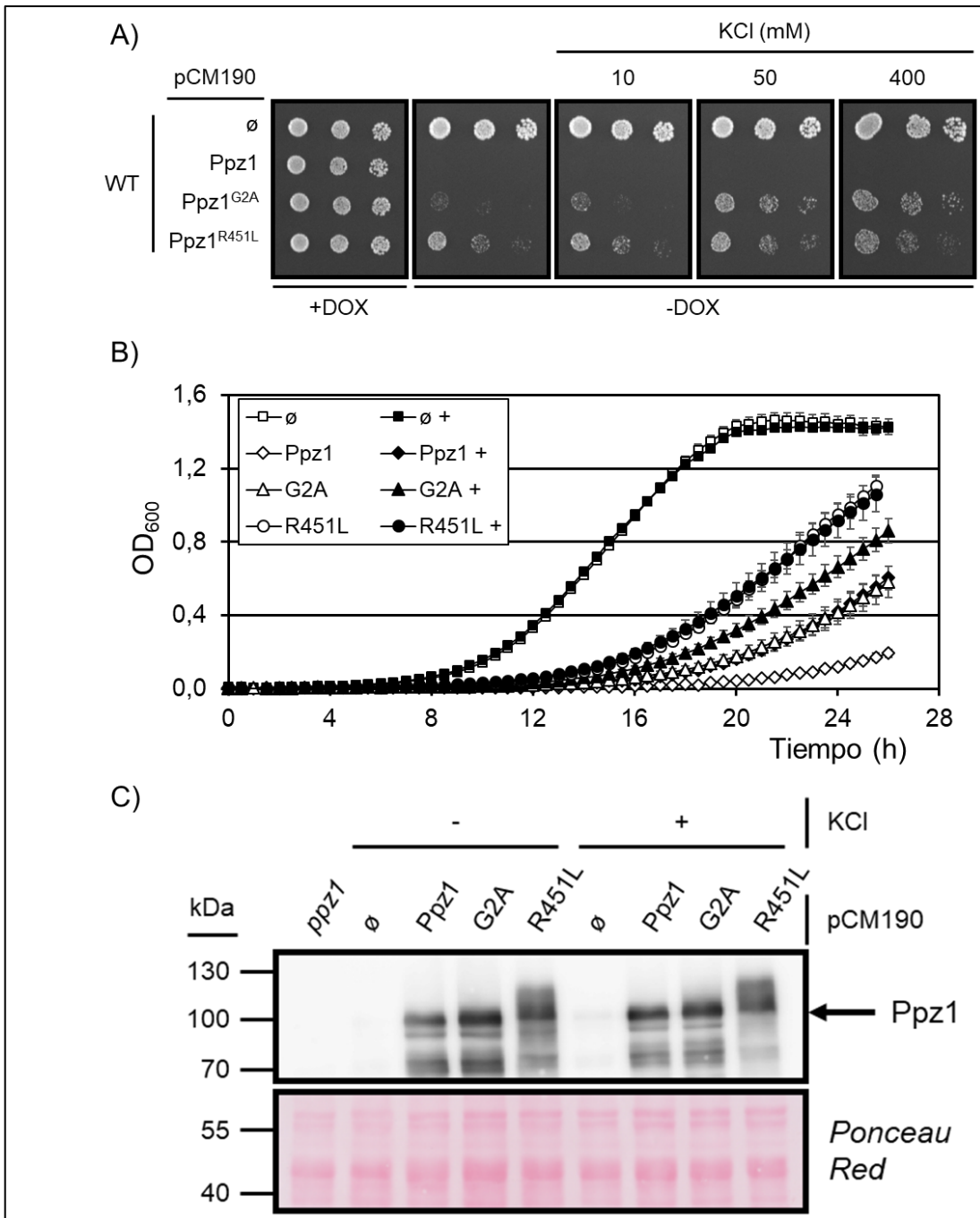


Figura 22. Efecto de la sobreexpresión de las versiones nativa, G2A y R451L de Ppz1 en presencia y ausencia de KCl exógeno. La cepa silvestre fue transformada con los vectores indicados derivados de pCM190. A) Los cultivos se crecieron y se trataron como en la Figura 3A, y se depositaron en placas SC-URA con doxiciclina (+DOX) o sin doxiciclina (-DOX) suplementadas con concentraciones ascendentes de KCl. Las placas se incubaron a 28°C durante 3 días y se capturaron las imágenes. B) Se cultivaron las cepas como se detalla en Materiales y Métodos, y se crecieron en medio líquido SC-URA sin (-) y con (+) KCl 50 mM. Los datos corresponden al promedio \pm SEM de 4-6 cultivos independientes. C) Las cepas crecieron *overnight* en medio SC-URA en presencia de doxiciclina (100 μ g/mL). Tras dos lavados, se inocularon 10 mL de medio SC-URA sin (-) y con (+) KCl 50 mM a $OD_{600}=0,04$ y se dejaron crecer durante 16 horas. Los cultivos se centrifugaron y se realizaron extracciones de proteína como se explica en Materiales y Métodos. Las muestras fueron sometidas a electroforesis (gel 8% poliacrilamida) y transferidas a las membranas. La tinción con Ponceau Red se empleó como control de carga y transferencia y se muestra en el panel inferior. \emptyset denota el plásmido pCM190 vacío.

moderado pero visible, mientras que el crecimiento de las células que expresaban la Ppz1 nativa no fue detectable. El crecimiento de las células portadoras de la versión R451L fue mucho más potente que el observado con la versión G2A. Estos mismos resultados se obtuvieron también en cultivos líquidos (Figura 22B): una pequeña mejora en el crecimiento de aquellas células que expresan la versión G2A, y una mejora notable en el caso de R451L. Para descartar cualquier variación de crecimiento debida a una diferencia en la expresión de las versiones, se evaluaron mediante inmunoblot los niveles de Ppz1. La Figura 22C muestra que las dos versiones presentaron niveles de proteína comparables a la Ppz1 nativa. Cabe destacar las bandas de mayor tamaño obtenidas en la versión R451L, que se observaron también en el resto de mutantes analizados en este estudio (ver más abajo). Los resultados obtenidos con la variante G2A, que no se encuentra en la periferia celular, sugieren que, en su mayor parte, el impacto tóxico de Ppz1 no requiere de su presencia en la membrana.

Se ha descrito que la sobreexpresión de Ppz1 está relacionada con una caída en la captación de Rb^+ , compatible con una inhibición del transportador Trk1 (Yenush *et al.*, 2002). Por eso, decidimos estudiar si la adición de K^+ al medio mejoraba el crecimiento de alguna de las versiones de Ppz1. Como se observa en la Figura 22A, la adición de K^+ a las placas no fue capaz de mejorar el crecimiento de cepas sobreexpresando las versiones nativa y R451L de Ppz1. Sin embargo, observamos una reducción notable de la toxicidad en el caso de la variante G2A, perceptible ya en la placa de KCl 50 mM, donde alcanzó un crecimiento comparable al de la versión R451L. Realizamos un ensayo similar en cultivo líquido, añadiendo KCl 50 mM y los resultados obtenidos se muestran en la Figura 22B. En este caso, las células que sobreexpresaban las Ppz1 nativa crecieron mejor cuando se añadió KCl al medio. También observamos un alivio de la toxicidad provocada por la versión G2A en estas condiciones. En el caso de la versión R451L, la

adición de potasio no mejoró ni empeoró el crecimiento. Cabe destacar que al añadir KCl a las células que expresaban la Ppz1 nativa, éstas crecieron de manera muy similar a las células que portaban una versión G2A y crecieron sin suplemento de KCl. Por último, analizamos si la disponibilidad de K^+ afectaba la expresión de Ppz1. Como se muestra en la Figura 22C, los niveles de expresión de las tres versiones de Ppz1 en un medio suplementado con KCl fueron similares a los que se obtuvieron sin añadir KCl. Estos resultados sugieren que, si bien la falta de K^+ no parece el principal motivo de la toxicidad de Ppz1, es posible que juegue algún papel en ésta.

6.3.2. La proteína Hog1 es requerida para la toxicidad de Ppz1

La quinasa Hog1 regula por fosforilación una serie de proteínas diana, entre las cuales se encuentran factores de transcripción, en respuesta a estrés osmótico. Como se observa en la Figura 23A, la mutación de *HOG1* mejoró marcadamente el crecimiento de las células portadoras de cualquiera de las tres versiones de Ppz1. La delección de *HOG1* permitió un crecimiento sustancial de las células que sobreexpresaban la versión nativa de Ppz1. La sobreexpresión de la variante G2A resultó menos tóxica en el mutante *hog1* que en la cepa silvestre. La delección de *HOG1* provocó una pequeña mejora en el crecimiento de las células portadoras de la versión R451L. Al analizar mediante *western blot* los niveles de proteína, la cepa mutante *hog1* presentó una ligera reducción tanto en la Ppz1 nativa como en las dos versiones mutadas respecto a la cepa silvestre (Figura 23B). Si bien la cantidad de Ppz1 nativa fue menor en el mutante *hog1* (2,0 contra 1,2), esta disminución no resultó estadísticamente significativa. Por ello, creemos que una reducción tan sutil de los niveles de Ppz1 no sería suficiente para explicar la mejora en el crecimiento que observamos en el mutante *hog1*, aunque no podemos descartarlo.

Una de las proteínas diana de Hog1 no implicada directamente en la transcripción es el antiportador de $\text{Na}^+, \text{K}^+/\text{H}^+$ *Nha1*, que se encarga de la respuesta temprana al choque

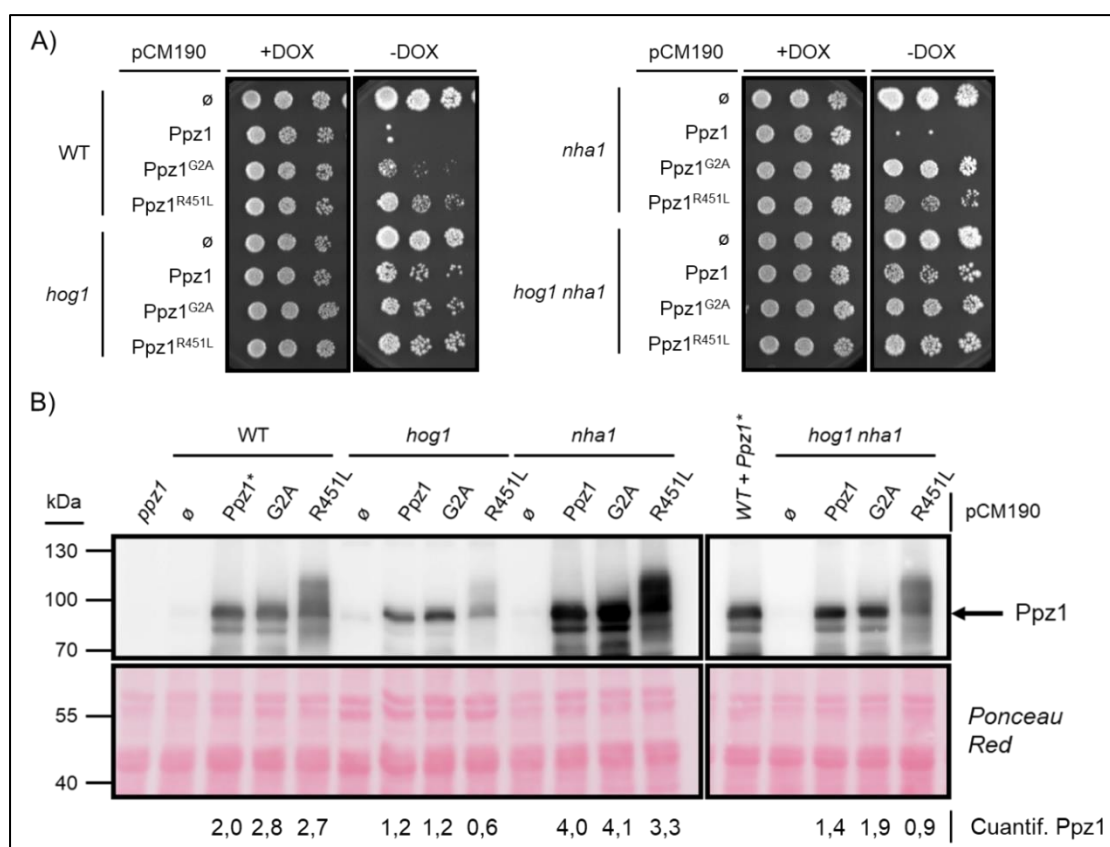


Figura 23. Efecto de la sobreexpresión de las versiones de Ppz1 en las cepas *hog1*, *nha1* y *hog1 nha1*. La cepa silvestre y sus derivadas *hog1*, *nha1* (CCP011) y *hog1 nha1* (CCP014) fueron transformadas con los vectores indicados. A) Los cultivos se crecieron y se trataron como en la Figura 3A. Todos los cultivos se depositaron en la misma placa. Las placas se incubaron a 28°C durante 6 días y se capturaron las imágenes. B) Las cepas fueron crecidas y tratadas como en la Figura 22C, pero sin añadir KCl al medio. El panel de la derecha corresponde a una membrana distinta, que comparte la muestra marcada con un asterisco (*) con el panel de la izquierda para mejor comparación. La tinción con Ponceau Red se empleó como control de carga y transferencia y se muestra en el panel inferior. Se empleó el *software* GelAnalyzer para cuantificar la señal de la banda de Ppz1 y la de las dos bandas solapantes que aparecen en la tinción con Ponceau Red con un peso aproximado de 45 kDa. El número mostrado debajo del panel del Ponceau es la razón entre la señal de Ppz1 y la señal de las bandas mencionadas del Ponceau.

osmótico extrayendo cationes sodio y potasio fuera de la célula. Como se observa en la Figura 23A, en la cepa carente de *NHA1* observamos un comportamiento similar al silvestre para las versiones WT y R451L. No obstante, la delección de *NHA1* redujo notablemente la toxicidad derivada de la sobreexpresión de la variante G2A. De hecho, esta versión resultó incluso menos tóxica que la versión R451L en el fondo *nha1*. Los niveles de Ppz1 que presentó la cepa *nha1* fueron algo mayores que los de un silvestre,

tanto en la Ppz1 nativa (2,0 contra 4,0) como en las versiones mutadas (2,8 contra 4,1 en G2A y 2,7 contra 3,3 en R451L) (Figura 23B). Este aumento en los niveles de Ppz1 solo fue significativo en el caso de la versión G2A ($p=0,0001$). Por tanto, estos resultados indican un efecto aditivo entre la delección de *NHA1* y el cambio G2A de Ppz1, apuntando a mecanismos subyacentes distintos.

Para investigar una posible dependencia genética entre Hog1 y Nha1 en el fenotipo observado, estudiamos la respuesta del doble mutante *hog1 nha1* a la sobreexpresión de Ppz1. Como se observa en la Figura 23A, en el caso de la Ppz1 nativa, el doble mutante *hog1 nha1* presentó un comportamiento similar al del mutante *hog1*. La delección de *NHA1* adicional sobre la mutación *hog1* redujo la toxicidad de la versión G2A a niveles parecidos a los del mutante simple *nha1*. No se observaron grandes cambios en la cepa *hog1 nha1* respecto a sus mutantes simples en el caso de la variante R451L. Al inmunodetectar Ppz1 en el doble mutante *hog1 nha1*, se observaron niveles de Ppz1 algo menores (pero estadísticamente no significativos) a los de la cepa silvestre (Figura 23B). Estos resultados sugieren que el efecto que vemos en el mutante *hog1* es, en gran medida, independiente de Nha1.

En el laboratorio se obtuvieron resultados en los que la delección de *NHA1* mejoraba notablemente el crecimiento de células que sobreexpresan Ppz1 bajo el control del promotor *GALI-10* (Chunyi Zhang, Tesis Doctoral). Ya que en el caso presentado no obtuvimos este mismo resultado con el mutante *nha1*, decidimos utilizar dos aproximaciones distintas para intentar dar respuesta a esta diferencia: i) emplear vectores pCM menos potentes para sobreexpresar Ppz1 en el mutante *nha1* y ii) deleccionar *NHA1* directamente en la cepa MLM04. Como se muestra en la Figura 24A, no observamos un alivio de la toxicidad en el mutante *nha1* con ninguno de los 3 vectores pCM-PPZ1. Sorprendentemente, logramos advertir cierto efecto de mejora al deleccionar *NHA1* en la

cepa MLM04, aunque esta mejora solo se observó empleando placas de medio rico (Figura 24B). Estos resultados sugieren que la presencia de *NHA1* podría contribuir a la toxicidad de Ppz1, aunque solo en algunas condiciones.

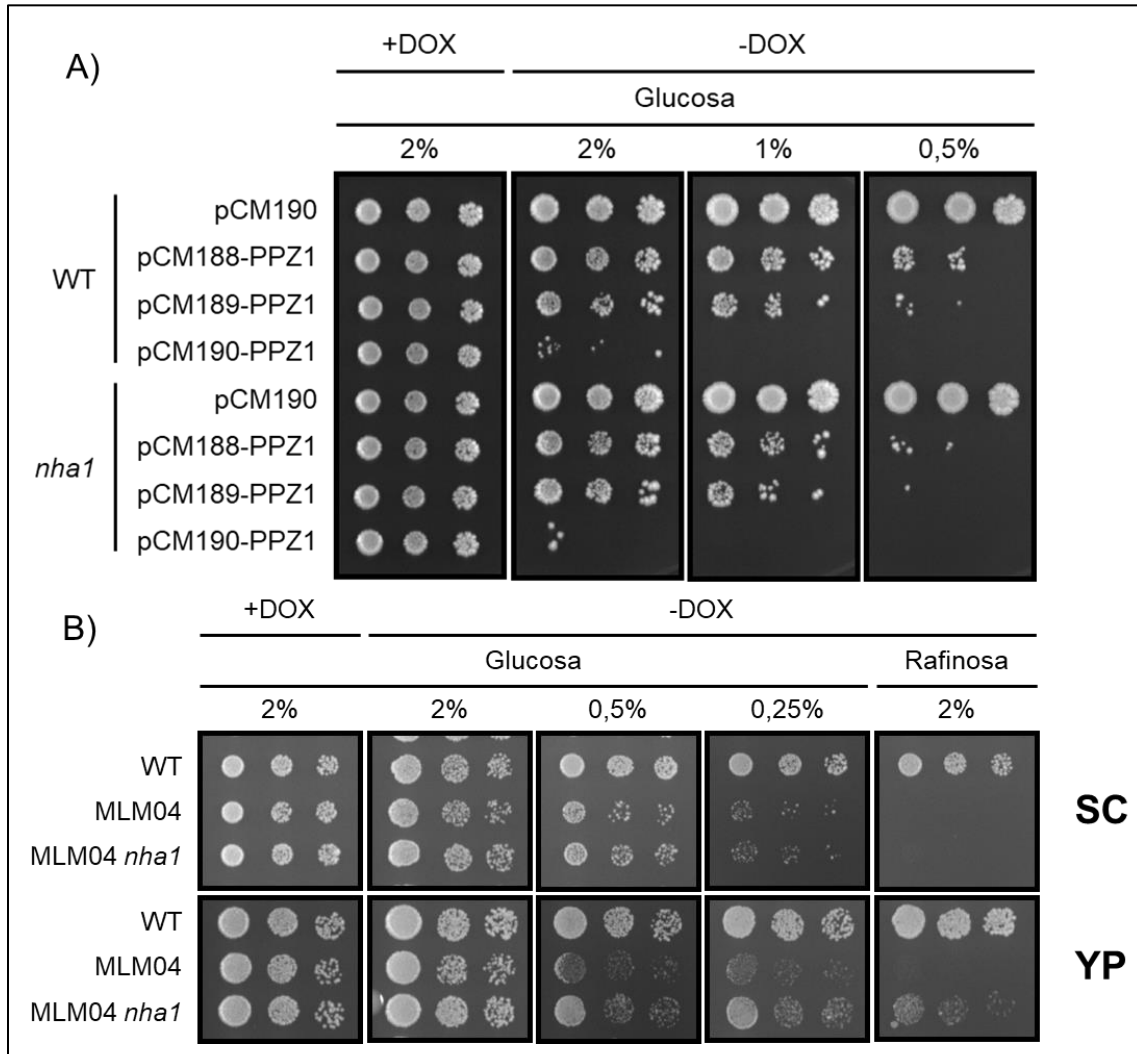


Figura 24. Efecto de la delección de *NHA1* bajo distintos niveles de sobreexpresión de Ppz1. Las cepas BY4741 silvestre y *nha1* (CCP011) fueron transformadas con el set de vectores pCM-PPZ1 y tratadas como se especifica en la Figura 3A. Las placas se incubaron a 28°C durante 6 días antes de capturar las imágenes. B) Las células de BY4741, MLM04 y MLM04 *nha1* (CCP013) se crecieron y se trataron como en la Figura 3A, excepto que se empleó el medio SC en lugar de SC-URA. Los cultivos se sembraron en placas de medio SC (panel superior) o YP (panel inferior) conteniendo las concentraciones de los azúcares señalados. Las placas se incubaron a 28°C y a los 3 días se tomaron las imágenes.

6.3.3. La delección de *PTC1* agrava la toxicidad de las variantes de Ppz1

La actividad de la quinasa Hog1 depende de su estado de fosforilación. La MEK Pbs2 y las fosfatasa Ptp2, Ptp3 y Ptc1 se encargan de activar e inactivar la quinasa en respuesta al estrés osmótico, respectivamente. La fosfatasa Ptc1, una de las PP2C de *S. cerevisiae*,

se encarga de mantener un bajo nivel de fosforilación basal de Hog1 en condiciones normales (Warmka *et al.*, 2001). Nos preguntamos si la sobreexpresión de Ppz1 junto con una vía HOG más activa plantearía un escenario más perjudicial aún para las células. Para ello, sometimos al mutante *ptc1* a un exceso de Ppz1 nativa y de sus dos versiones mutadas y examinamos su comportamiento. La sobreexpresión de la Ppz1 nativa provocó un bloqueo en el crecimiento del mutante simple *ptc1*, tal y como pasó en una cepa silvestre (Figura 25A). También observamos un bloqueo del crecimiento en células *ptc1* expresando la versión no miristilable G2A. Sorprendentemente, obtuvimos el mismo

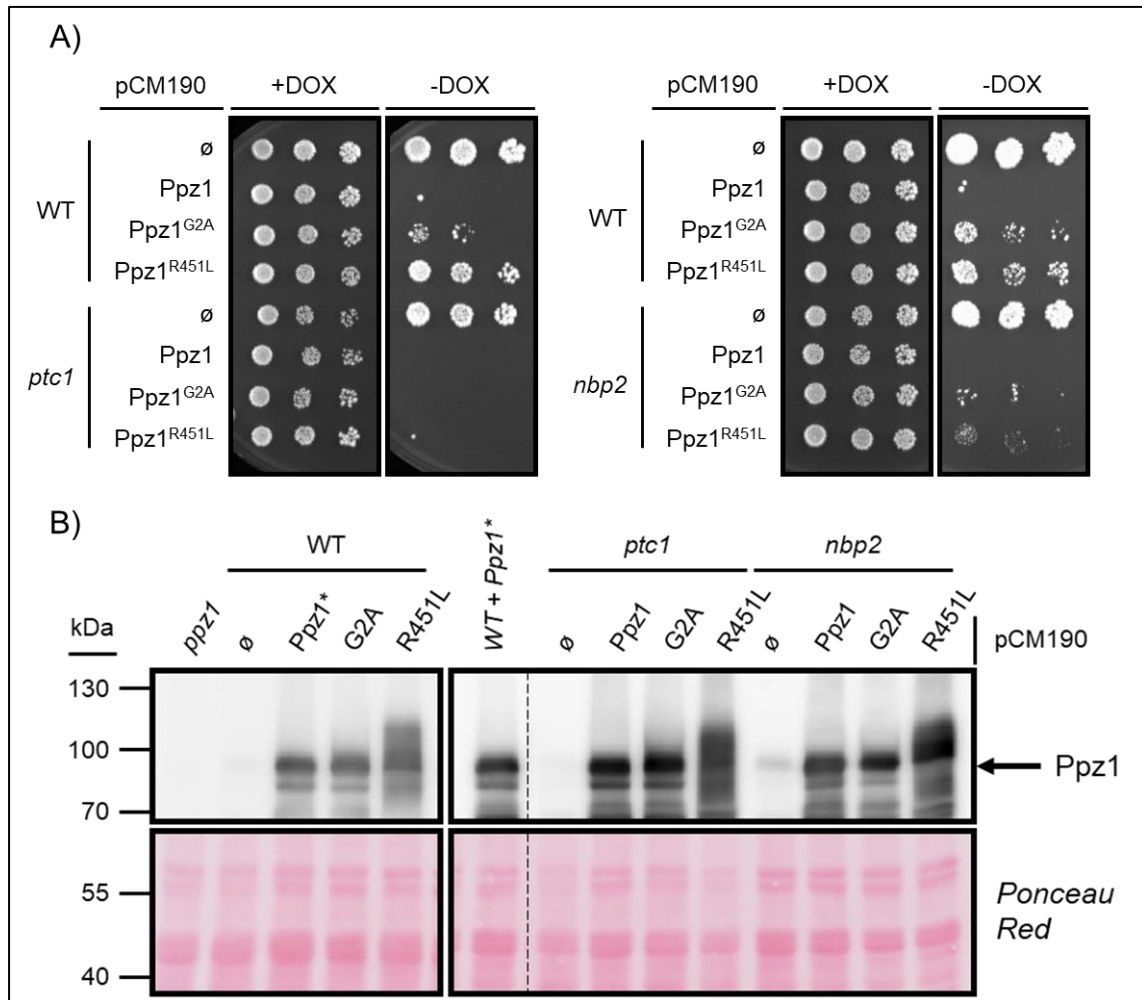


Figura 25. Efecto de la expresión de las variantes mutadas de Ppz1 en las cepas *ptc1* y *nbp2*. A) La cepa silvestre BY4741 y sus derivadas *ptc1* (MAR143) y *nbp2* (CCV017) fueron transformadas con los vectores indicados y tratadas como en la Figura 3A. Las imágenes se capturaron tras 6 días de incubación. B) Las mismas cepas que en el panel A fueron crecidas y tratadas como en la Figura 22C. El panel de la derecha corresponde a una membrana distinta, que comparte la muestra marcada con un asterisco (*) con el panel de la izquierda para mejor comparación. La línea discontinua separa regiones no contiguas de la misma membrana.

resultado con la variante R451L, que daría lugar a una fosfatasa no funcional. Además, los niveles de Ppz1 nativa, G2A y R451L que presentó el mutante *ptc1* (Figura 25B) fueron muy similares a los que obtuvimos en una cepa silvestre, por lo que la falta de crecimiento observada no se debería a un posible aumento en la cantidad de Ppz1 en la célula. Estos resultados sugieren que la presencia de Ptc1 podría ser beneficiosa para una célula con exceso de Ppz1, especialmente en el caso de la versión catalíticamente inactiva, aunque no podemos confirmar si ello es debido o no al papel de Ptc1 sobre Hog1.

Dado que la fosfatasa Ptc1 está involucrada en múltiples procesos celulares (para una revisión, véase Ariño *et al.*, 2011), decidimos llevar a cabo alguna aproximación más focalizada hacia Hog1. Nbp2 es una proteína adaptadora necesaria para la interacción de Ptc1 y Hog1. Como se muestra en la Figura 25A, la sobreexpresión de la Ppz1 nativa consiguió bloquear el crecimiento de las células carentes de *NBP2*. No obstante, la cepa *nbp2* presentó un ligero crecimiento sobreexpresando las versiones G2A y R451L. Si bien agravó la toxicidad de estas 2 variantes, los efectos de la delección de *NBP2* no fueron tan drásticos como los de la mutación *ptc1*. En la Figura 25B podemos observar que la cantidad de proteína Ppz1 en células *nbp2* fue comparable a la observada en una cepa silvestre. Estos resultados no nos ayudan a confirmar ni desmentir la hipótesis de que la activación de Hog1 está involucrada en los mecanismos de toxicidad derivada del exceso de Ppz1.

6.3.4. Comparación de la respuesta del mutante *hog1* con la del mutante *slt2*

Por último, quisimos analizar si la implicación de la vía HOG en la toxicidad de Ppz1 es específica para esta MAPK. Se han descrito *crossstalk* entre la ruta HOG y algunas rutas de MAPK, como la de *mating* o la de la integridad de la pared celular (CWI) (Rodríguez-Pena *et al.*, 2010; Vaga *et al.*, 2014). Dado que disponíamos de la cepa mutante *slt2*, que

carece de la MAPK responsable de la vía CWI, la sometimos a la sobredosificación de *PPZ1* y sus dos versiones. El exceso de Ppz1 nativa resultó igual de tóxico en el mutante *slt2* que en la cepa silvestre (Figura 26A). La expresión de las versiones G2A y R451L también fue capaz de bloquear el crecimiento de las células *slt2*. No fuimos capaces de observar una mayor cantidad de Ppz1 en el mutante *slt2* -comparando con la cepa silvestre- que consiga explicar las diferencias fenotípicas entre ambas cepas (Figura 26B). Estos resultados sugieren que la presencia de Slt2 alivia la toxicidad causada por el exceso de, al menos, las variantes mutadas de Ppz1. Además, esta observación respalda la implicación específica de la MAPK Hog1 como agravante de la toxicidad relacionada con el exceso de Ppz1.

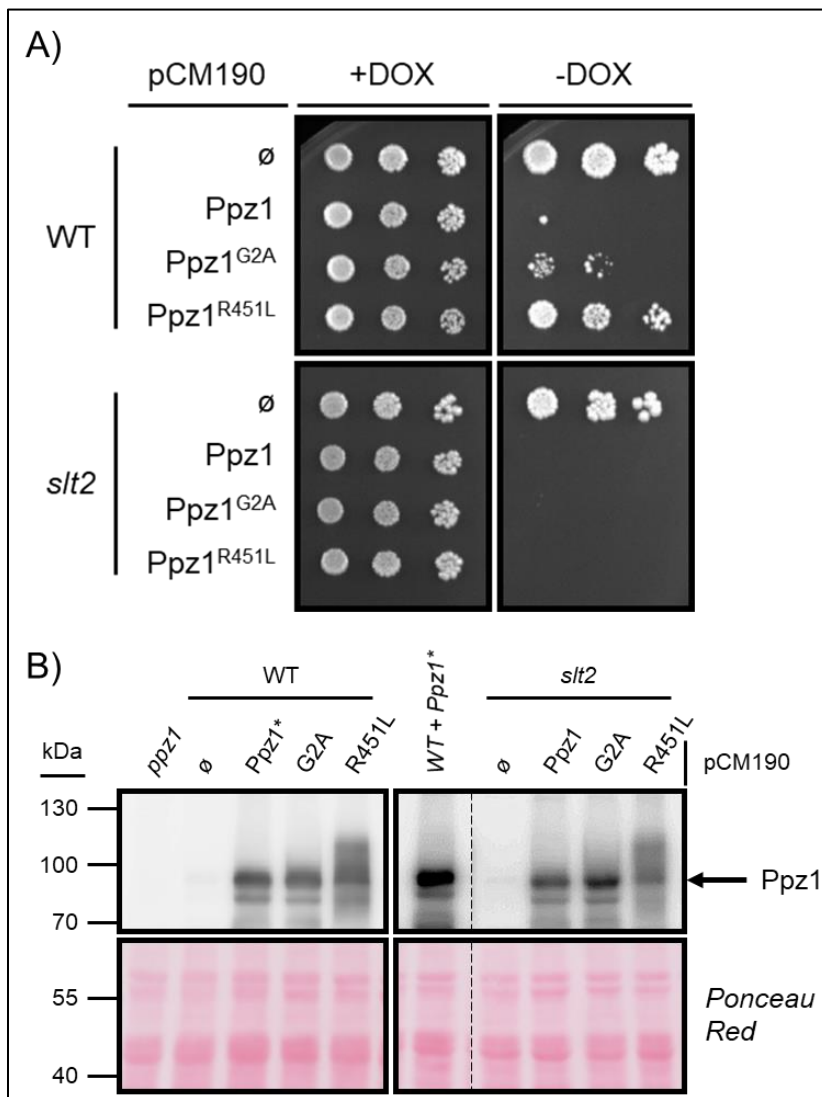


Figura 26. Efecto de la expresión de las versiones de Ppz1 en el mutante *slt2*.

A) La cepa silvestre BY4741 y su derivada *slt2* fueron transformadas con los vectores indicados y tratadas como en la Figura 3A. Las imágenes se capturaron tras 6 días de incubación. B) Los mismos cultivos que en A fueron crecidos y tratados como en la Figura 22C. El panel de la derecha corresponde a una membrana distinta, que comparte la muestra marcada con un asterisco (*) con el panel de la izquierda para mejor comparación. La línea discontinua separa regiones alejadas de la misma membrana.

The background features several overlapping geometric shapes and patterns. In the top left, there is a green semi-circle with diagonal white stripes. To its right is a light blue semi-circle containing a black diamond outline and a blue zigzag line. In the center, a large yellow semi-circle with diagonal white stripes is prominent. Below it, a dark blue horizontal bar spans the width of the page. In the bottom left, there is a purple semi-circle with a red diamond outline and a blue semi-circle with diagonal white stripes. In the bottom right, there is a purple semi-circle with a pink zigzag line and a pink semi-circle with diagonal white stripes.

DISCUSIÓN

7.1. El exceso de Ppz1 afecta al proceso de traducción

Ppz1 es una fosfatasa específica de hongos descrita como la proteína de levadura que, en exceso, resulta más tóxica para la célula (Makanae *et al.*, 2013). Hipotetizamos que, si la desfosforilación excesiva de un sustrato específico causada por la sobreexpresión de Ppz1 provocaba la toxicidad, células con una delección en el gen que codificase ese sustrato podrían crecer mejor. Para ello, empleamos un promotor *GALI-10* para expresar *PPZ1* desde un vector en multicopia para transformar una colección de mutantes por delección y aislar aquellos que fueran capaces de crecer en condiciones de exceso de Ppz1. Esta aproximación no resultó eficaz, ya que solo fuimos capaces de identificar genes implicados en la activación transcripcional del promotor *GALI-10*, y por tanto mutantes simples incapaces de sobreexpresar Ppz1 (Figura 2). Creemos que el fracaso de esta estrategia podría deberse a dos factores: i) el uso de galactosa, que ya hemos visto que empeora el defecto de crecimiento provocado por el exceso de Ppz1, y ii) una expresión demasiado fuerte de Ppz1, que podría provocar un escenario celular en el que la ausencia de un único gen fuera insuficiente para producir una mejora detectable. De hecho, en este estudio solo hemos obtenido dos genes cuya delección mejora el defecto de crecimiento provocado por el exceso de Ppz1: *GCN2* (Figura 14A) y *HOG1* (Figura 23A). Además, en ambos casos se empleó el promotor *tetO* para sobreexpresar Ppz1, mientras que no se observó dicha mejora en la cepa *gcn2* albergando pYES2-PPZ1. Estos resultados respaldan la hipótesis de que las condiciones del *screen* podrían haber sido demasiado restrictivas para identificar supresores, y sugeriría que las dianas de toxicidad de Ppz1 podrían ser múltiples.

El efecto nocivo en el crecimiento celular derivado de la expresión de Ppz1 a partir del promotor *tetO₇* se observó en 6 fondos genéticos distintos, aunque la intensidad dependía del fondo genético en cuestión, siendo más drástica en YPH499, DBY746, JA100 y

W303-1A que en las cepas BY4741 y KT1112 (Figura 3B). De hecho, hemos observado un bloqueo total del crecimiento en la cepa DBY746 incluso expresando *PPZ1* a partir del vector pCM188, centromérico y con promotor *tetO₂* (no se muestra), que no observamos en el caso de BY4741. Estas diferencias en los crecimientos podrían deberse a niveles de expresión de Ppz1 diferentes o a un mayor o menor grado de sensibilidad a la sobreexpresión de Ppz1 en cada cepa. Un descubrimiento inesperado que obtuvimos empleando el sistema de expresión *tetO* es que el defecto de crecimiento derivado del exceso de Ppz1 depende inversamente de la disponibilidad de glucosa y es muy severo cuando las células crecen en otras fuentes de carbono (Figuras 3A, 4A-4B). Estos datos sugieren que elevados niveles de Ppz1 podrían afectar a los sistemas de detección de glucosa o a la correcta respuesta celular ante la falta de este azúcar (ver más abajo). Este es un hallazgo relevante que creemos debería tenerse en cuenta a la hora de interpretar artículos previos en los que se ha utilizado el promotor *GALI-10* para sobreexpresar no solo Ppz1 (Clotet *et al.*, 1996), sino para identificar otros genes tóxicos en sobreexpresión (Ramer *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1992).

Múltiples factores podrían afectar negativamente al crecimiento cuando Ppz1 se sobreexpresa en condiciones de baja glucosa. Por un lado, un exceso de Ppz1 podría suplantar el rol del complejo Reg1-Glc7, que desfosforila la quinasa Snf1 y el represor transcripcional *downstream*, Mig1, interfiriendo con el mecanismo celular principal de adaptación a la falta de glucosa (Cannon, 2010). En consonancia con esta posibilidad, en la Figura 5, mostramos una desfosforilación de Snf1 en condiciones de exceso de Ppz1 y baja glucosa. Resultados similares han sido obtenidos en el laboratorio expresando Ppz1 desde un promotor *GALI-10* y en presencia de galactosa, observándose una desfosforilación aún más drástica de Snf1, que era ya aparente al cabo de 1 h de inducción (Velázquez *et al.*, 2020). Cabe destacar que tras 1 hora de inducción por galactosa, los

niveles de Ppz1 están aún lejos de su máximo (Calafí *et al.*, 2020), lo que sugiere que el efecto de Ppz1 sobre la fosforilación de Snf1 no requeriría un gran exceso de la fosfatasa. El perfil de Snf1-P que observamos en la Figura 5A no se debería a un defecto en la activación de Snf1, ya que el cambio a baja glucosa provocó una rápida fosforilación de Snf1. El resultado observado encaja mejor con un escenario en el que Ppz1 estuviera actuando en la desfosforilación de Snf1, ya sea directa o indirectamente.

En cualquier caso, la desfosforilación de Snf1 y, por tanto, un menor grado de activación de esta quinasa, debería provocar un incremento en la localización nuclear de Mig1, el cual reprime la expresión de los genes necesarios para la asimilación de fuentes de carbono diferentes a la glucosa. En nuestro laboratorio hemos obtenido resultados que confirman la estabilización de Mig1 en el núcleo en condiciones de exceso de Ppz1, expresada tanto desde el promotor *tetO* como *GALI-10*, en condiciones en que este represor es mayoritariamente citosólico en una cepa salvaje. Además, demostramos que la mayor presencia de Mig1 en el núcleo se correlacionaba con una mayor cantidad de la forma desfosforilada de Mig1 (Velázquez *et al.*, 2020). Todos estos resultados permitirían postular que la incapacidad de las cepas MLM03 y MLM04 para crecer en fuentes de carbono que no sean glucosa deriva de un bloqueo del mecanismo de respuesta a falta de glucosa basado en el represor Mig1. Sin embargo, al delecionar *MIG1* y *MIG2* no conseguimos aliviar la toxicidad provocada por el exceso de Ppz1 (Figura 6). Esto sugiere que, si bien Mig1 podría estar relacionado con el defecto de crecimiento que provoca el exceso de Ppz1, no sería el elemento principal. Por otro lado, el exceso de la actividad Ppz1 podría también interferir con las rutas PKA o Sch9, que actúan de manera conjunta respondiendo a la disponibilidad de glucosa, siendo la segunda además un regulador de la biogénesis de ribosomas (Yin *et al.*, 2003; Urban *et al.*, 2007; Deprez *et al.*, 2018). Esta posibilidad debería investigarse en mayor profundidad.

Se ha descrito que Ppz1 co-purifica con varias proteínas ribosómicas de la subunidad grande (60S), así como con los factores de elongación traduccionales EF-1A (Tef1/2) y EF-3 (Yef3) (Calafí *et al.*, 2020). Además, en la base de datos de BioGrid (Oughtred *et al.*, 2019) existen interacciones de Ppz1 con proteínas directa o indirectamente involucradas en varias funciones relacionadas con el proceso de la traducción, como el procesamiento de mRNA (Mud1, Pat1, Snp1, Snu66 y Dhh1) y el trasiego de núcleo a citosol de mRNA y subunidades ribosómicas (Crm1 y Nab2). Las proteínas EF-3 y EF-1A están relacionadas por un rol biológico común, ya que EF-3 estimula la función de EF-1A en la unión del aminoacil-tRNA con el sitio A del ribosoma. Un estudio proteómico reciente mostró que la delección del ortólogo de Ppz1 en *C. albicans* afecta los niveles de proteína y de fosforilación de algunas proteínas ribosómicas y de factores de inicio y elongación de la traducción (Márkus *et al.*, 2017). Toda esta información soporta la implicación de Ppz1 en la regulación del proceso de traducción.

La idea de que la alteración del proceso de traducción podría ser una de las causas de la toxicidad de Ppz1, se reafirma con: i) el resultado del cribado genético, donde la sobreexpresión de proteínas implicadas en la biogénesis ribosómica (Dot6 y Noc2) y de múltiples proteínas ribosómicas mejoraron el crecimiento, ii) el hecho de que parte de Ppz1 se encuentre en fracciones polisómicas, y que un exceso de Ppz1 provoque una caída en el contenido de polisomas, iii) que la sobreexpresión de Hal3 desplace parte de la población de Ppz1 de las fracciones polisómicas a las no-polisómicas, y iv) la hiperfosforilación de eIF2 α en condiciones de exceso de Ppz1, descrito en (Calafí *et al.*, 2020). No se detectaron cambios ni en la maduración del rRNA ni en el trasiego nucleocitoplasmático de las subunidades ribosómicas (este trabajo y Calafí *et al.*, 2020). Se han descrito perfiles polisómicos similares a los observados en células sobreexpresoras de Ppz1, por ejemplo los que presentan cepas con pérdida de función

parcial y delección de los genes *TIF1* y *TIF3*, que codifican los factores de inicio de traducción eIF4A y eIF4B, respectivamente (Coppolecchia *et al.*, 1993; Kressler *et al.*, 1997). Sin embargo, los defectos de crecimiento de estos mutantes no son comparables a la reducción drástica del crecimiento que observamos cuando sobreexpresamos Ppz1 y, por tanto, concluimos que el proceso de inicio de traducción no debe de ser el único elemento implicado en la toxicidad de Ppz1. Además, como se observa en las Figuras 12B-C, la sobreexpresión de Hal3 cambia la distribución de Ppz1 en el perfil polisómico. Este efecto debe ser beneficioso, pero si consideramos la drástica mejora en el crecimiento que confiere la sobreexpresión de Hal3, no puede ser el único.

La fosforilación de eIF2 α por parte de la quinasa Gcn2 es un evento clave en la regulación negativa del inicio de la traducción, interfiriendo en la formación del complejo ternario. Se ha descrito que la activación de Gcn2 se produce en respuesta a los tRNA descargados, pero también se da en células sujetas a varios tipos de estrés (Simpson and Ashe, 2012; Anda *et al.*, 2017). Por el contrario, las 4E-BP Caf20 y Eap1 son reguladores negativos de la formación del *closed loop complex* (Simpson and Ashe, 2012; Crawford and Pavitt, 2019). El hecho de que la delección de *GCN2* mejore, en mayor o menor medida, el crecimiento de células sobreexpresadoras de Ppz1, pero la ausencia de *CAF20* y/o *EAP1* no lo haga, sugiere que el exceso de Ppz1 altera la formación del complejo ternario sin afectar la del *closed loop complex*.

Basándonos en los resultados presentados, nos preguntamos si el exceso de Ppz1 podría actuar sobre eIF2 α . Se conoce el papel de Glc7 como fosfatasa de eIF2 α desde hace muchos años (Wek *et al.*, 1992), y recientemente se ha descrito la necesidad de la región N-terminal del eIF2 γ para que se dé la interacción entre la fosfatasa Glc7 y eIF2 α (Rojas *et al.*, 2014). Parece evidente que el efecto del exceso de Ppz1 sobre eIF2 α debe ser indirecto, ya que en estas condiciones detectamos una hiperfosforilación en el factor de

inicio. El hecho de que la fosforilación de eIF2 α se produzca 4 horas después de la inducción de Ppz1, apoya la idea de que sea un efecto secundario (Calafí *et al.*, 2020). Podríamos pensar que Gcn2, la quinasa de eIF2 α , sea un sustrato directo de Ppz1. Aunque la autofosforilación de Gcn2 en su *loop* de activación (Thr882) es necesaria para su activación, han sido identificados hasta 9 residuos fosforilables en esta proteína, y la desfosforilación de alguno de ellos, como la Ser577 (García-Barrio *et al.*, 2002), parece necesaria para su activación. Cabe la posibilidad de que alguno de estos residuos sea una diana para el exceso de Ppz1. Otra posibilidad es que el exceso de Ppz1 pudiera afectar alguna proteína o ruta *upstream* de Gcn2, provocando alguno de los estreses que dan lugar a la activación de Gcn2. Sin embargo, cabe destacar que ha sido descrita una fuerte interacción genética negativa entre las mutaciones *ppz1* y *gcn2* (Costanzo *et al.*, 2010; Sharifpoor *et al.*, 2012; Costanzo *et al.*, 2016), lo que sugiere que Ppz1 y Gcn2 podrían estar actuando a través de vías distintas. En cualquier caso, no tenemos datos suficientes para confirmar o desmentir cualquiera de las posibilidades, por lo que se debería seguir investigando.

Como se ha mencionado en la Introducción, se ha descrito un papel de Ppz1 en la fidelidad de la traducción mediante la regulación del factor de elongación Tef5 (De Nadal *et al.*, 2001). La sobreexpresión de Ppz1 podría estar afectando no solo el inicio de la traducción, sino también otras fases del mismo proceso. No obstante, resultados preliminares (no se muestran) sugieren que el exceso de Ppz1 no provoca errores de lectura en la traducción, apuntando a un impacto de Ppz1 en traducción independiente de la regulación de la fidelidad.

Se ha descrito que la expresión en multicopia del gen *PPZI* provoca una expresión tardía de las ciclinas Cln2 y Clb5 y el bloqueo del ciclo celular en fase G₁ (Clotet *et al.*, 1999). Glc7 está implicada en diferentes fases del ciclo celular, incluyendo la desfosforilación

de dianas del complejo *Dbf4-dependent kinase* (DDK) a través de la asociación con su subunidad reguladora Rif1, previniendo así la entrada en fase S (ver Larasati and Duncker, 2017 para una revisión). Vale la pena señalar que Ppz1 y Glc7 podrían compartir algunas funciones, y que se ha reportado la interacción de Ppz1 con Glc8 e Ypi1, subunidades reguladoras de Glc7 (Venturi *et al.*, 2000; García-Gimeno *et al.*, 2003). Esto podría llevarnos a pensar que el efecto nocivo del exceso de Ppz1 es similar al de Glc7, y podría deberse a la desfosforilación de dianas de Glc7. No obstante, disponemos de varios ejemplos que no sostienen esa asunción: i) se ha descrito que la sobreexpresión de *GLC7* a partir del promotor *GALI-10* provoca la muerte celular (Liu *et al.*, 1992; Ghosh and Cannon, 2013); por el contrario, la expresión de Ppz1 desde el mismo promotor, al menos a corto-medio plazo, no redujo la viabilidad celular (Calafí *et al.*, 2020); ii) el retraso en la transición G₁/S que se observó al sobreexpresar Ppz1 (Calafí *et al.*, 2020) difiere de los defectos en la salida de mitosis observados ante un exceso de Glc7 (Black *et al.*, 1995; Pinsky *et al.*, 2009); iii) la sobreexpresión de Glc7 provoca una morfología anormal en las células (Zhang *et al.*, 1995; Black *et al.*, 1995), que no observamos en respuesta a un exceso de Ppz1 (cepa MLM04 en Figura 11), e inestabilidad cromosómica, un fenotipo que no se observa en ese mismo estudio en células sobreexpresadoras de Ppz1 (Zhu *et al.*, 2015; Duffy *et al.*, 2016); iiiii) el perfil de supresores en multicopia identificados en este trabajo es muy distinto al obtenido por Ghosh y Cannon (Ghosh and Cannon, 2013) y, además, las delecciones de *GLC8* y *REG2* no lograron suprimir la toxicidad de Ppz1 (Figura 7), mientras que sí lo hicieron con Glc7.

En resumen, en este capítulo mostramos cómo el exceso de Ppz1 altera el inicio de la traducción. Sin embargo, aunque este efecto pudiera contribuir al defecto de crecimiento de células sobreexpresadoras de Ppz1, basándonos en el impacto positivo que produce la delección de *GCN2*, no creemos que este impacto en la traducción sea la razón principal.

Por un lado, la delección de *GCN2* no normaliza en ningún caso el crecimiento, solo provoca una mejora muy moderada. Por otro lado, el efecto aditivo mostrado por los supresores con funciones aparentemente distintas (Figuras 10A-B y Tabla 2), sugiere que el defecto de crecimiento producido por el exceso de Ppz1 no tiene una única causa. Por lo tanto, nuestros resultados apuntan a una situación en la que la sobreexpresión de Ppz1 afectaría a múltiples proteínas diana implicadas en distintas funciones celulares, entre las que encontramos el proceso de traducción.

7.2. La región N-terminal de Ppz1 es determinante para su toxicidad

En este capítulo hemos descrito que la sobreexpresión de Ppz2 produce un efecto muy leve en el crecimiento de la levadura. Este efecto no depende del promotor (hemos empleado su propio promotor y el promotor *tetO7*) y es mucho más suave que el previamente observado para Ppz1, donde vemos un efecto muy nocivo sobre el crecimiento (Figura 17A). Esta diferencia concuerda con los resultados publicados por Makanae y colaboradores (Makanae *et al.*, 2013) donde, basándose en un cribado genético *tug of war*, asignaron un límite de número de copias 30 veces mayor a *PPZ2* que a *PPZ1*. La elevada toxicidad que presenta el exceso de *PPZ1* respecto a *PPZ2* podría explicar también por qué no se identificó el primero como supresor del fenotipo lítico del mutante *slt2* pero sí se aisló *PPZ2* (Lee *et al.*, 1993).

Nuestros resultados muestran que, usando las mismas condiciones de expresión, los niveles de Ppz2 son menores que los de Ppz1, tanto en la versión etiquetada en el extremo N- como C-terminal de Ppz2 (Figuras 17C y 20C). Existía la posibilidad de que los niveles de proteína Ppz2 alcanzados no llegasen a ser suficientes no solo para provocar un efecto nocivo en la célula, sino para llevar a cabo las funciones nativas. No obstante, demostramos que todas las construcciones eran funcionales y capaces de suprimir el fenotipo termosensible del doble mutante *ppz1 ppz2* (Figuras 18 y 20D). Además, la expresión de las Ppz2 nativas (desde ambos promotores) y de la Ppz2-HA fue suficiente para restaurar la tolerancia a cafeína en la cepa *ppz1 ppz2*. Cabe destacar que, mientras la Ppz2 nativa fue capaz de devolver la tolerancia a LiCl, el efecto de la versión etiquetada en el C-terminal fue muy leve (Figura 19). Aunque esta disociación de efectos pueda parecer sorprendente, hay que recalcar que no es la primera ocasión en la que se observa, sino que se han descrito versiones de Ppz1 mutadas en la región N-terminal que presentan este comportamiento (ver más abajo). Una posible explicación para la falta de efecto en

la tolerancia a litio podría ser una mayor expresión de Ppz2 desde el plásmido YEp352 que desde pCM190. En primer lugar, la cantidad de Ppz2 es bastante menor que la de Ppz1 cuando se expresan desde sus promotores nativos (Ho *et al.*, 2018), lo cual sugiere que el promotor nativo de *PPZ2* es más débil que el de *PPZ1*. En segundo lugar, como hemos mostrado en la Figura 3C, los niveles de Ppz1 son más elevados cuando su expresión se regula por el promotor *tetO₇* desde un vector centromérico (pCM189-PPZ1) que cuando depende de la copia cromosómica del promotor propio. Por último, hay que remarcar que tanto el YEp352 como el pCM190 son vectores episomales. Todas estas observaciones sugieren que es improbable que la falta de efecto en litio se deba a una menor expresión de Ppz2. Por lo tanto, podríamos pensar que la presencia de la etiqueta en el C-terminal podría estar afectando la capacidad de Ppz2 de regular la tolerancia a los cationes de Li⁺ mediante un mecanismo desconocido. De hecho, también observamos una atenuación de la toxicidad en la versión etiquetada de Ppz1 (comparar Figuras 17B y 22B), apuntando a que la presencia de estas etiquetas podría no ser totalmente inocua.

La evidencia de que la falta de efecto tóxico de Ppz2 no puede explicarse por la presencia de niveles bajos de proteína se puede deducir de la observación de que la quimera Ppz1:2 es igual de tóxica que la Ppz1 nativa cuando su nivel de expresión es parecido al de Ppz2 (Figura 17). También mostramos que la expresión de Glc7 tiene un impacto negativo en el crecimiento celular, a diferencia de Ppz2, pese a expresarse ambas a niveles muy parecidos (Figura 20A-C). La sobreexpresión del híbrido Ppz2:1, que contiene la región N-terminal de Ppz2, no resulta tóxica para la célula. Si bien es cierto que los niveles de Ppz2:1 son menores que los de Ppz1:2 (Figura 17C), parece difícil sostener que tal diferencia sea suficiente para justificar un cambio tan drástico en el crecimiento. De hecho, queremos resaltar que Ppz2:1 normalizó el crecimiento a elevadas temperaturas de la cepa *ppz1 ppz2*, confirmando la funcionalidad de la proteína (Figura 18). Por todo

esto, pese a la pequeña diferencia en los niveles de Ppz2:1 con Ppz1:2, asumimos que el híbrido Ppz2:1 no sería tóxico o lo sería en mucha menor medida.

Por tanto, disponemos de datos suficientes para confirmar que la extensión N-terminal de Ppz1 juega un rol fundamental en el efecto nocivo sobre el crecimiento provocado por el exceso de fosfatasa. Varios resultados sugieren que este efecto no se debe al incremento en la cantidad del polipéptido N-terminal *per se*, sino a la capacidad de éste para regular la función y/o la actividad del dominio fosfatasa de Ppz1. Estos resultados son: i) la actividad fosfatasa es necesaria para la toxicidad (Calafí *et al.*, 2020), mientras que la sobreexpresión de la mitad N-terminal por sí sola no tiene ningún efecto en el crecimiento, incluso cuando se emplea galactosa como fuente de carbono (Clotet *et al.*, 1996); ii) hay muchos ejemplos de modificaciones en el segmento N-terminal de Ppz1 que provocan efectos específicos en las funciones de Ppz1. Por ejemplo, una delección de los residuos 17-193 en la Ppz1 de *S. cerevisiae* (ScPpz1) pudo complementar el fenotipo de tolerancia a LiCl pero fue incapaz de restaurar la sensibilidad a cafeína. Dos pequeñas delecciones en el extremo N-terminal de la Ppz1 de *Debaryomyces hansenii* (DhPpz1), que comprendían las zonas 27-36 y 106-120, suprimieron la habilidad de complementación de la tolerancia a cationes Li⁺ sin afectar la restauración de la tolerancia a cafeína (Minhas *et al.*, 2012). Por el contrario, al deleccionar 3 zonas pequeñas (25-43, 67-108 y 120-142) de la fosfatasa de *Candida albicans*, no se observaron diferencias con la CaPpz1 nativa (Szabó *et al.*, 2019).

La sobreexpresión de Glc7, como la de Ppz1, ha sido descrita como deletérea para la célula (Liu *et al.*, 1992; Ghosh and Cannon, 2013). Sin embargo, un conjunto de evidencias sugiere que los mecanismos que regulan la toxicidad son distintos en cada caso (discutido previamente en la sección 7.1). En este capítulo mostramos que la expresión de Glc7 desde un vector pCM190 afecta negativamente el crecimiento, aunque de manera

menos potente que Ppz1. Sin embargo, en este caso, la diferencia entre los niveles de expresión de Ppz1 y Glc7 podría explicar, al menos en parte, la menor toxicidad observada atribuible a Glc7. En cualquier caso, resulta interesante destacar que el defecto en el crecimiento es mucho más grave cuando la fuente de carbono empleada es galactosa (Figura 20A, donde no se observó crecimiento en la cepa que sobreexpresaba Glc7 ni siquiera tras 6 días de incubación, no mostrado). Esto podría deberse al papel que juega Glc7 en la desfosforilación e inactivación de Snf1 y Mig1, interfiriendo en los mecanismos de adaptación a la falta de glucosa y fuentes de carbono alternativas (Cannon, 2010).

Nuestro descubrimiento de que la extensión N-terminal de Ppz1 es determinante para la toxicidad hace más compleja la comprensión del mecanismo de regulación de estas fosfatasas y apunta hacia diferencias sustanciales entre Ppz1 y Ppz2 en esta región. Como mostramos en la Figura 21, los extremos N-terminales de ambas fosfatasas presentan un marcado perfil de regiones intrínsecamente desordenadas (IDR). Está extendida la idea de que las proteínas implicadas en señalización y funciones reguladoras están enriquecidas en IDR (Yang *et al.*, 2019), las cuales son capaces de mediar las interacciones proteína-proteína. Generalmente, esto ocurre mediante lo que se denomina *molecular recognition features* (MoRF), pequeñas secuencias presentes en el IDR que pueden llevar a cabo una transición de desorden a orden tras un contacto con otra proteína. El estudio de las extensiones N-terminal de Ppz1 y Ppz2 con el *software* ANCHOR2 revela que Ppz1 contiene varias regiones cortas con previsible capacidad de interactuar con otras proteínas que no se detectan en Ppz2. Esto nos lleva a pensar que el efecto tóxico de Ppz1 podría deberse a la asociación de Ppz1, a través de su región N-terminal, con determinadas proteínas que podrían ser entonces desfosforiladas por la fosfatasa. También hemos analizado el extremo N-terminal de proteínas homólogas a Ppz1 en otras

especies de hongos. En general, gran parte de las regiones N-terminal evaluadas serían consideradas IDR, pero no todas presentan regiones de *folding upon binding* (Figura A2, véase sección 10). Concretamente, los extremos N-terminales de las dos isoformas de *C. neoformans*, y el de la Ppz1 de *A. nidulans*, carecen de estos motivos. Esto resulta interesante, ya que recientemente se ha publicado en nuestro laboratorio que ninguna de estas proteínas presenta un efecto nocivo al ser sobreexpresadas desde el promotor *GALI-10* en *S. cerevisiae* (Zhang *et al.*, 2019a; Zhang *et al.*, 2019b). Con las evidencias existentes en el momento de la publicación, se postulaba que las causas de la falta de toxicidad de la Ppz1 de *C. neoformans* podrían deberse a una actividad específica menor y/o a la ausencia en este hongo de los sustratos celulares cuya alteración sería responsables de la toxicidad en *S. cerevisiae*. Los resultados mostrados en este trabajo nos permiten ofrecer una tercera explicación, basada en la profunda divergencia entre sus extremos N-terminales. En cualquier caso, creemos que se necesita una investigación más profunda de los residuos implicados en esta toxicidad, y de las posibles proteínas, posibles responsables de este efecto nocivo, que pudieran interactuar con el segmento N-terminal de Ppz1.

7.3. La relación entre la sobreexpresión de Ppz1 y la homeostasis de cationes monovalentes

En este estudio hemos analizado el crecimiento de la cepa silvestre, así como de una serie de mutantes, ante la sobreexpresión de tres versiones de Ppz1: la nativa y las variantes G2A y R451L. Recientemente, nuestro laboratorio ha publicado que la actividad fosfatasa es necesaria para la toxicidad de Ppz1 (Calafí *et al.*, 2020). En el artículo se empleó un promotor *GAL1-10* para sobreexpresar Ppz1, mientras que en este trabajo mostramos el mismo resultado empleando un promotor regulable por doxiciclina *tetO7*. El hecho de haber obtenido el mismo resultado con dos sistemas de expresión distintos sugiere que la actividad fosfatasa es necesaria para la toxicidad de manera independiente de la naturaleza del promotor y del método empleado para su inducción. La actividad fosfatasa de esta versión R451L es muy baja comparada con la de la Ppz1 nativa (Clotet *et al.*, 1996), y el cambio equivalente (R262L) de la Ppz1 de *C. albicans* también produjo una caída importante en la actividad (Szabó *et al.*, 2019). Nosotros hemos observado una menor toxicidad por parte de la versión catalíticamente inactiva en la cepa silvestre (Figura 22A), esperable según los resultados previos. Sin embargo, la expresión de esta variante de Ppz1 no permite llegar al crecimiento observado en células que contienen un plásmido vacío (Figura 22A-B y Calafí *et al.*, 2020). Estos resultados sugieren que, si bien la actividad fosfatasa es importante para la toxicidad en condiciones normales, la proteína podría presentar otras características que generan un efecto nocivo. Por ejemplo, en el caso de los mutantes *ptc1* y *slt2*, la versión R451L bloqueó el crecimiento celular tanto como la Ppz1 nativa (Figuras 25A y 26A), sugiriendo que en estos fondos la actividad fosfatasa puede no ser relevante para la toxicidad. En conjunto, estos resultados apuntan, en este escenario, a dos posibles explicaciones: i) la Ppz1 catalíticamente defectiva podría seguir interaccionando con cualquier otra proteína, y evitar que ésta realice sus funciones nativas, y/o ii) la actividad residual que tenga la versión R451L, en

condiciones de sobreexpresión, podría ser suficiente para producir algún efecto. En resumen, la actividad fosfatasa de Ppz1 es necesaria para la toxicidad en condiciones de crecimiento normales, pero existen otros aspectos pendientes de determinar que también tendrían un peso importante y que deberían ser investigados.

Nos parece importante destacar la presencia de unas bandas difusas de tamaño superior a la banda de Ppz1 en los inmunoblots de la versión R451L. Este resultado no lo observamos en las otras dos versiones, y parece independiente del fondo genético que se analice (Comparar Figuras 22C, 23B, 25B y 26B). También se ha identificado una migración anómala de Ppz1 en otras ocasiones. Por ejemplo, en la Figura 5A observamos una banda por encima de la banda habitual de Ppz1 tanto en la cepa silvestre como en la cepa MLM04 en condiciones de sobreexpresión. Curiosamente, la presencia de esta banda depende de la disponibilidad de glucosa (véanse carriles 0 contra 30 segundos en WT y en MLM04). Creemos que la banda que observamos en este resultado podría corresponder a la que se observó cuando se sobreexpresó Ppz1 desde el promotor *GALI-10* para analizar el estado de fosforilación de Snf1 (Velázquez *et al.*, 2020). Es de notar que, en estos dos últimos casos, la extracción de proteínas se realizó mediante un método químico basado en el uso de TCA/Acetona, mientras que en el resto de inmunoblots que se muestran en este trabajo se empleó un método de ruptura física con bolas de Zirconia (ambos métodos de extracción están detallados en la sección 4.9). Podría especularse que, si la proteína sufriera alguna modificación postraduccional lábil, responsable de la movilidad anómala, es probable que ésta se pierda empleando el método físico de extracción, y por eso no se observe esta banda en todos los casos. Es sugerente que, en el caso de las bandas difusas que observamos en la versión R451L, donde se empleó el método físico para extraer las proteínas, solo se observe la movilidad alterada en la versión R451L, catalíticamente defectiva, pero no en las otras dos versiones de Ppz1,

catalíticamente activas. Esto podría indicar que la actividad fosfatasa de Ppz1 sería responsable de la desaparición de estas bandas. Es bien sabido que Ppz1 se encuentra en la célula fuertemente fosforilada, y tenemos evidencias en el laboratorio de que Ppz1 es capaz de autodesfosforilar *in vitro* algunos de sus residuos fosforilados (Diego Velázquez, Tesis Doctoral). Dado que en el método físico de extracción los tampones no incluyen rutinariamente ningún componente que pueda actuar como inhibidor de fosfatasas, es evidente que, a diferencia del método que emplea TCA, Ppz1 puede seguir siendo activa en el extracto. Por otro lado, se ha descrito que Ppz1 se ubiquitina en respuesta a choque térmico (Ng *et al.*, 2013), y que el segmento N-terminal es necesario para que la modificación postraduccional tenga lugar. En nuestras preparaciones por el método físico tampoco se incluye ningún componente que evite una hipotética eliminación de ubiquitinas. Estas observaciones abren una nueva vía de estudio en la regulación de Ppz1, y creemos que se deberían tener en cuenta en futuros estudios.

Como ya hemos visto en el capítulo 2 de este trabajo, varios resultados apuntan a la importancia de la extensión N-terminal de Ppz1 en la toxicidad provocada por el exceso de la fosfatasa. La Gly2 presente en el N-terminal de Ppz1 es necesaria para la miristilación de la proteína (Clotet *et al.*, 1996), y su mutación por Ala afecta ciertas funciones, pero no todas. Por ejemplo, se ha publicado recientemente que, mientras que la versión G2A fue incapaz de complementar el defecto en el tráfico endocítico presente en las células *ppz1*, o el fenotipo de sensibilidad a la canavanina en el doble mutante *ppz1 ppz2* (Lee *et al.*, 2019), esta variante complementó totalmente la caída en los niveles de ubiquitina descrita previamente en células carentes de *PPZ1* (Lee *et al.*, 2017). De manera similar, ha sido descrito que la mutación apenas afecta la capacidad para complementar el fenotipo de sensibilidad a cafeína de un mutante *ppz1* en *S. cerevisiae*, pero no permite

restaurar la tolerancia normal a los cationes de Li^+ , ni en el caso de la Ppz1 de *S. cerevisiae* (Clotet *et al.*, 1996), ni en el de la de *C. albicans* (Szabó *et al.*, 2019).

Se cree que la hipertolerancia a cationes de Na^+ y Li^+ característica del mutante *ppz1* se debe principalmente a dos fenómenos: i) la ausencia de actividad Ppz1 resulta en un aumento de actividad de los transportadores Trk, que provoca una despolarización de la membrana plasmática, reduciendo la entrada de cationes tóxicos y ii) el mutante *ppz1* presenta una mayor tasa de transcripción de *ENAI*, que codifica la bomba Na^+ /ATPasa encargada de exportar los iones Na^+ y Li^+ fuera de la célula. La observación de que la versión G2A no complementa el fenotipo de tolerancia a Li^+ del mutante *ppz1* sugiere que esta versión no es capaz de realizar las funciones de Ppz1 como mínimo en alguno de estos dos casos. En este sentido, el hecho de que la mutación G2A no permita la localización de Ppz1 en la periferia celular (ver más abajo), sugiere que la pérdida de capacidad reguladora podría involucrar al transportador de membrana Trk1.

Por otro lado, es comúnmente aceptado que la miristilación permite la localización de ciertas proteínas en la membrana. En nuestro laboratorio hemos observado, en la línea de informes previos (Yenush *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2019), que la Ppz1 nativa se encuentra en la periferia celular, compatible con una ubicación en la membrana plasmática (Marcel Albacar, no se muestra). También hemos confirmado que la versión G2A no se encuentra en la zona externa, sino que la encontramos distribuida por toda la célula (Lee *et al.*, 2019). Por lo tanto, dado que la no miristilación de Ppz1 altera su localización subcelular, pero esta proteína sigue siendo efectiva para llevar a cabo ciertas funciones, podemos concluir que la localización en la membrana plasmática solo se requiere para algunas de las funciones de Ppz1. Además, demostramos en este trabajo que la versión G2A mantiene una toxicidad levemente inferior a la de la Ppz1 nativa (Figura 22A-B). Esto sugiere que la mayoría de sustratos clave para la toxicidad de Ppz1 no están localizados

en la membrana, una idea que va en la línea de la implicación de Ppz1 en el proceso de traducción (Calafí *et al.*, 2020), y en la alteración del estado de fosforilación de las quinasas Snf1 (Figura 5) y de Hog1 (Velázquez *et al.*, 2020).

Hemos obtenido varios resultados que apuntan a una implicación de la vía HOG en la toxicidad de Ppz1. Primeramente, hemos observado que la delección de *HOG1* disminuye la toxicidad de cualquiera de las tres versiones de Ppz1 (Figura 23A). La mejora sustancial observada tanto con la Ppz1 nativa como con la versión G2A sugiere que el posible efecto de la ausencia de Hog1 no requiere la presencia de Ppz1 en la membrana. No obstante, con este resultado no podemos saber cuál es el motivo de la mejora, dando lugar a dos posibles escenarios: i) la quinasa Hog1 fosforila Ppz1 en ciertos residuos necesarios para generar la toxicidad derivada del exceso de fosfatasa, o bien, ii) el exceso de Ppz1 produce una sobreactivación de la vía Hog1, siendo ésta el motivo de la toxicidad. Tenemos resultados que demuestran que Hog1 es capaz de fosforilar *in vitro* a Ppz1 en el residuo Ser265 (Diego Velázquez, Tesis Doctoral), lo cual apoyaría la primera hipótesis. Recientemente, hemos descrito que la sobreexpresión de Ppz1 produce una hiperfosforilación transitoria de Hog1 (Velázquez *et al.*, 2020), lo que iría a favor del segundo postulado. Esta hiperactivación de la vía HOG podría ser una de las causas de la toxicidad que observamos al sobreexpresar Ppz1. Se ha descrito que el doble mutante *ptc1 ptp2* (que carece de las dos fosfatasas principales de Hog1) es sintético letal, posiblemente debido a una sobreactivación de la vía Hog1 (Maeda *et al.*, 1993). Además, la sobreexpresión de *PTC1* mejoró el crecimiento de la cepa MLM04 en condiciones de sobreexpresión de Ppz1 (Diego Velázquez, Tesis Doctoral), lo cual sugiere que desfosforilar Hog1 atenúa la toxicidad. Si el exceso de Ptc1 mejora el crecimiento de una cepa que sobreexpresa Ppz1, deberíamos obtener un agravamiento de la toxicidad en los mutantes *ptc1* y *nbp2* (Nbp2 hace de nexo físico entre Ptc1 y Hog1, descrito en Mapes

and Ota, 2004). Desgraciadamente, empleamos un sistema de expresión demasiado potente, que no nos permitió comprobar un posible empeoramiento de la toxicidad que causa la Ppz1 nativa ocurre en los mutantes *ptc1* y *nbp2* (aunque, desde luego, tampoco observamos una mejora (Figura 25A)). En cualquier caso, creemos que es necesario realizar este experimento en el futuro con niveles de expresión de Ppz1 más suaves, que permitan un cierto grado de crecimiento, de manera que se pueda estudiar un posible agravamiento de la toxicidad en estos mutantes.

Creemos necesario destacar el resultado obtenido con la cepa *nha1*. Resultados previos en el laboratorio (Chunyi Zhang, Tesis Doctoral) demostraron que la delección de *NHAI* mejoraba el defecto de crecimiento en células que sobreexpresan Ppz1 a partir de un promotor *GALI-10*. Nosotros hemos observado el mismo efecto supresor empleando una cepa MLM04 (promotor *tetO7*) en condiciones de sobreexpresión de Ppz1, aunque solo se observó el efecto en medio rico (Figura 24B, comparar SC e YP). Sin embargo, el crecimiento que observamos empleando cualquiera de los tres vectores pCM-PPZ1 en el mutante *nha1* fue similar al que experimentó la cepa silvestre (Figura 24A). Una posibilidad sería que el medio empleado (SC en el caso de los vectores pCM) afecte a la supresión, de manera que el efecto de mejora por la delección de *NHAI* solo se pudiera observar creciendo las células que porten los vectores pCM-PPZ1 en un medio YPD. Sin embargo, el uso del medio YPD no nos permite seleccionar las células que portan el vector necesario para sobreexpresar Ppz1, y esto podría dar lugar a un resultado dudoso, poco deseable. Para intentar dar una respuesta a este resultado contradictorio, creemos importante destacar la relevancia que pueda tener la disponibilidad de K^+ . Se ha descrito una menor captación de Rb^+ en células con mayor actividad Ppz1, compatible con un bloqueo de la entrada de potasio mediante fosforilación de Trk1 (Yenush *et al.*, 2002). De hecho, se ha observado una mejora en el crecimiento de células que sobreexpresan

Ppz1 añadiendo KCl al medio (Figura 22B y Yenush *et al.*, 2002). Ello sugiere que la disponibilidad de K^+ en situaciones de sobreexpresión de Ppz1 podría ser limitante, en la línea de lo que se observaría en un mutante defectivo en el transporte de K^+ de alta afinidad. La ausencia del antiportador $Na^+,K^+/H^+$ Nha1 podría disminuir la salida del potasio intracelular, y esto podría explicar la mejora en el crecimiento que observamos. Sin embargo, esta mejora solo la observamos en YPD, cuya concentración de K^+ está alrededor de 20 mM (en el rango de la K_m del sistema de baja afinidad que se manifiesta en mutantes *trk1 trk2*), mientras que en el medio sintético es de unos 7-8 mM, concentración que impide el crecimiento del doble mutante *trk1 trk2* (Ko and Gaber, 1991). También debemos mencionar que normalmente el medio SC es algo más ácido que el YPD, y que esto puede ser muy relevante en una situación de inhibición del sistema Trk, ya que el doble mutante *trk1 trk2* es notablemente sensible al pH ácido (Ko and Gaber, 1991). Estas observaciones podrían explicar, al menos en parte, el efecto de mejora debido a la delección de *NHA1* de manera dependiente del medio.

Los resultados obtenidos indican que la versión G2A es prácticamente igual de tóxica que la versión nativa en una cepa salvaje. Sin embargo, observamos una reducción drástica de esta toxicidad cuando la variante G2A se expresó en el mutante *nha1* (Figura 23A). Para tratar de explicar los resultados obtenidos, hemos generado una hipótesis, que se presenta en la Figura 27. Por un lado, como hemos discutido más arriba, no sería improbable que el cambio G2A pudiera reducir la eficiencia de Ppz1 en el bloqueo de Trk1 (Figura 22A-B). En una cepa silvestre, esta posible afectación de la entrada de potasio no sería el principal causante de la toxicidad de Ppz1, dado que la mutación G2A mejora el crecimiento de manera muy leve. Aun así, hemos observado cierta mejora del crecimiento añadiendo KCl al medio en el caso de células portadoras de Ppz1 (solo en líquido, Figura 22B) y de la versión G2A (Figuras 22A-B), por lo que creemos que la

disponibilidad de K^+ debe tener alguna implicación en la toxicidad. Por otro lado, algunos datos experimentales permiten considerar una hipotética hiperactivación de Nha1 derivada del exceso de Ppz1. Por un lado, hemos publicado recientemente un ensayo de fosfoproteómica realizado en una cepa que sobreexpresa Ppz1 desde el promotor *GALI-10* en el que se observan tres residuos de Nha1 hiperfosforilados (Velázquez *et al.*, 2020). Uno de ellos fue la Thr765, cuya fosforilación por la quinasa Hog1 se relaciona con la activación de la proteína (Proft and Struhl, 2004). Por otro lado, se ha descrito la interacción de Ppz1 con Nha1 mediante un ensayo a gran escala de complementación de fragmentos de proteínas (Tarassov *et al.*, 2008). Además, como hemos mencionado anteriormente, la delección de *NHAI* produce una mejora sutil en el crecimiento de células que sobreexpresan Ppz1, al menos en algunas circunstancias (Figura 24B y Chunyi Zhang, Tesis Doctoral). Estos resultados apoyarían una posible hiperactivación de Nha1, dependiente o no de la hiperactivación de Hog1 (Velázquez *et al.*, 2020), provocada por el exceso de Ppz1. En este contexto, el hecho de que la versión G2A resulte mucho menos tóxica en un fondo *nha1* que en la cepa silvestre, sería resultado de dos factores favorables: i) una menor capacidad para inhibir la entrada de K^+ vía transportadores Trk, y ii) la disminución en la pérdida de K^+ debida a la ausencia del antiportador Nha1. Este modelo asume que la versión G2A seguiría siendo capaz de activar Nha1 (Figura 27).

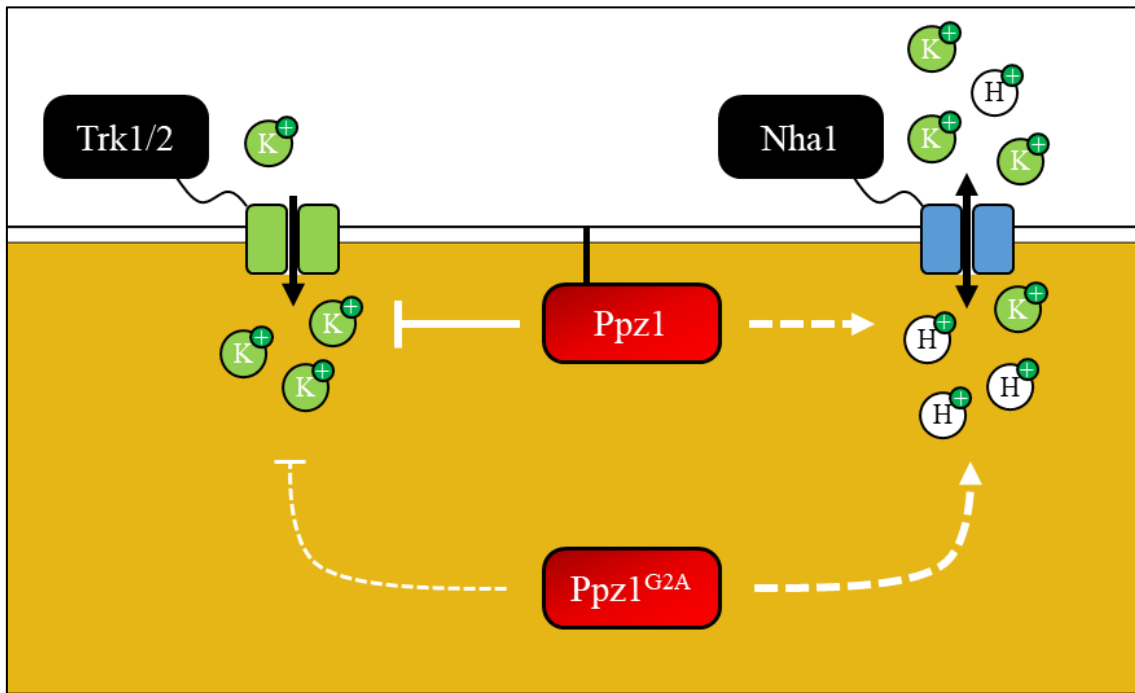


Figura 27. Modelo de la posible vinculación de la sobreexpresión de Ppz1 con los transportadores Trk y Nha1. La fosfatasa Ppz1 en sobreexpresión sería capaz de: i) disminuir la entrada de K^+ mediante inhibición de la actividad Trk, y ii) provocar la salida de K^+ vía hiperactivación, directa o indirecta, del antiportador Nha1. La versión G2A de Ppz1, que no es capaz de estar en la membrana, podría: i) desbloquear la inhibición, al menos en parte, de los Trk, permitiendo una mayor captación de K^+ , y ii) mantener Nha1 hiperactivo, de manera similar a la versión nativa Ppz1.

The background features a large central circle with yellow and white diagonal stripes. Surrounding it are various geometric shapes: a green circle with diagonal stripes in the top-left, a light blue circle with a black diamond and a blue zigzag in the top-right, a purple circle with a red diamond in the bottom-left, and a purple circle with a pink zigzag and a pink triangle in the bottom-right. A dark blue horizontal bar is positioned below the word 'CONCLUSIONES'.

CONCLUSIONES

1. La sobreexpresión de Ppz1 produce un defecto de crecimiento que se agrava: i) al incrementar la potencia del promotor, ii) con la baja disponibilidad de glucosa y iii) empleando azúcares diferentes de la glucosa como única fuente de carbono. Se observa, además, una desfosforilación de la quinasa Snf1, que podría explicar la falta de crecimiento en condiciones de baja glucosa o fuentes de carbono alternativas
2. La sobreexpresión de ciertos genes relacionados con la biogénesis de ribosomas y el proceso de traducción mejora ligeramente el defecto de crecimiento producido por el exceso de Ppz1
3. El exceso de Ppz1 no provoca ningún defecto en el trasiego nucleocitoplasmático de los ribosomas, sin embargo, Ppz1 se asocia con el ribosoma y su sobreexpresión reduce la razón polisoma/monosoma. Por otro lado, la ausencia de la quinasa Gcn2 atenúa ligeramente la toxicidad derivada del exceso de Ppz1. Todos estos resultados sugieren que, al menos en parte, la toxicidad derivada de la sobreexpresión de Ppz1 implica un bloqueo del inicio de la traducción.
4. La sobreexpresión de Ppz2 no provocó ningún defecto en el crecimiento, si bien sus niveles de expresión fueron claramente inferiores a los de Ppz1. En cambio, la sobreexpresión de la versión híbrida Ppz1:2 produjo una toxicidad comparable a la de la Ppz1 nativa, pese a expresarse como Ppz2. Estos resultados indican que el extremo N-terminal de Ppz1 es un determinante de su toxicidad.
5. La sobreexpresión de la fosfatasa PP1c de levadura, llamada Glc7, produjo un defecto de crecimiento intermedio entre Ppz1 y Ppz2, aunque los niveles de proteína fueron similares a los de Ppz2
6. El cambio G2A, que no permite la miristilación de Ppz1, apenas atenúa el defecto de crecimiento derivado de la sobreexpresión de la fosfatasa

7. La delección de *HOG1*, gen que codifica el regulador principal de la ruta de respuesta a estrés osmótico HOG, reduce la toxicidad provocada por las tres versiones de Ppz1. Este efecto podría ser específico, ya que no es extensivo a la MAP quinasa Slt2, y está reforzado por el comportamiento de las cepas mutantes *ptc1* y *nbp2*
8. La ausencia del antiportador $\text{Na}^+, \text{K}^+/\text{H}^+$ Nha1 mejora el crecimiento de las células que sobreexpresan Ppz1, aunque sólo en medio rico. La delección de *NHA1* también provoca una mejora muy destacable en el caso de la versión G2A. Estos y otros resultados son compatibles con una hipotética hiperactivación de Nha1 en células que sobreexpresan Ppz1

The background features several overlapping geometric shapes and patterns. In the top left, there is a green semi-circle with diagonal white stripes. To its right is a light blue semi-circle containing a black diamond outline and a blue zigzag line. In the center, a large yellow semi-circle with diagonal white stripes is prominent. Below it, a dark blue horizontal bar spans the width of the page. In the bottom left, there is a purple semi-circle with a red diamond outline and a blue semi-circle with diagonal white stripes. In the bottom right, there is a purple semi-circle with a pink zigzag line and a pink semi-circle with diagonal white stripes.

REFERENCIAS

- Abrie, J.A., González, A., Strauss, E., and Ariño, J. (2012) Functional mapping of the disparate activities of the yeast moonlighting protein Hal3. *Biochem J* **442**:357–368. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22124281/>
- Abrie, J.A., Molero, C., Ariño, J., and Strauss, E. (2015) Complex stability and dynamic subunit interchange modulates the disparate activities of the yeast moonlighting proteins Hal3 and Vhs3. *Sci Rep* **5**:15774. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26514574/>
- Ádám, C., Erdei, É., Casado, C., Kovács, L., González, A., Majoros, L., *et al.* (2012) Protein phosphatase CaPpz1 is involved in cation homeostasis, cell wall integrity and virulence of *Candida albicans*. *Microbiology* **158**:1258–1267. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22343349/>
- Aguilar-Uscanga, B., and François, J.M. (2003) A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett Appl Microbiol* **37**:268–274. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12904232/>
- Aksenova, A., Muñoz, I., Volkov, K., Ariño, J., and Mironova, L. (2007) The HAL3-PPZ1 dependent regulation of nonsense suppression efficiency in yeast and its influence on manifestation of the yeast prion-like determinant [ISP+]. *Genes to Cells* **12**:435–445. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17397392/>
- Albertyn, J., Hohmann, S., Thevelein, J.M., and Prior, B.A. (1994) GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol Cell Biol* **14**:4135–4144. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8196651/>
- Alepuz, P.M., Cunningham, K.W., and Estruch, F. (1997) Glucose repression affects ion homeostasis in yeast through the regulation of the stress-activated ENA1 gene. *Mol Microbiol* **26**:91–98. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9383192/>
- Altmann, M., Krieger, M., and Trachsel, H. (1989) Nucleotide sequence of the gene encoding a 20 kDa protein associated with the cap binding protein eIF-4E from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **17**. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2678000/>
- Altmann, M., Schmitz, N., Berset, C., and Trachsel, H. (1997) A novel inhibitor of cap-dependent translation initiation in yeast: p20 competes with eIF4G for binding to eIF4E. *EMBO J* **16**:1114–1121. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9118949/>
- Anda, S., Zach, R., and Grallert, B. (2017) Activation of Gcn2 in response to different stresses. *PLoS One* **12**. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28771613/>
- Ariño, J. (2002) Novel protein phosphatases in yeast: An update. *Eur J Biochem* **269**:1072–1077. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11856338/>
- Ariño, J., Casamayor, A., and González, A. (2011) Type 2C protein phosphatases in fungi. *Eukaryot Cell* **10**:21–33. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21076010/>
- Ariño, J., Ramos, J., and Sychrová, H. (2010) Alkali Metal Cation Transport and Homeostasis in Yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **74**:95–120. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20197501/>
- 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. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2537149/>

Balcells, L., Gómez, N., Casamayor, A., Clotet, J., and Ariño, J. (1997) Regulation of salt tolerance in fission yeast by a protein-phosphatase-2-like Ser/Thr protein phosphatase. *Eur J Biochem* **250**:476–483. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9428701/>

Bañuelos, M.A., Ruiz, M.C., Jiménez, A., Souciet, J.L., Potier, S., and Ramos, J. (2002) Role of the Nha1 antiporter in regulating K⁺ influx in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **19**:9–15. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11754478/>

Bañuelos, M.A., Sychrová, H., Bleykasten-Grosshans, C., Souciet, J.L., and Potier, S. (1998) The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology* **144**:2749–2758. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9802016/>

Baßler, J., and Hurt, E. (2019) Eukaryotic Ribosome Assembly. *Annu Rev Biochem* **88**:281–306. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30566372/>

Ben-Shem, A., Loubresse, N.G. De, Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2011) The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science* **334**:1524–1529. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22096102/>

Benito, B., Quintero, F.J., and Rodríguez-Navarro, A. (1997) Overexpression of the sodium ATPase of *saccharomyces cerevisiae*: Conditions for phosphorylation from ATP and p(i). *Biochim Biophys Acta - Biomembr* **1328**:214–225. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9315618/>

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

Böhm, S., and Buchberger, A. (2013) The Budding Yeast Cdc48Shp1 Complex Promotes Cell Cycle Progression by Positive Regulation of Protein Phosphatase 1 (Glc7). *PLoS One* **8**. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23418575/>

Bollen, M., Peti, W., Ragusa, M.J., and Beullens, M. (2010) The extended PP1 toolkit: Designed to create specificity. *Trends Biochem Sci* **35**:450–458. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20399103/>

Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., and Boeke, J.D. (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: A useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* **14**:115–132. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9483801/>

Brewster, J.L., Valoir, T. De, Dwyer, N.D., Winter, E., and Gustin, M.C. (1993) An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* **259**:1760–1763. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7681220/>

Calafí, C., López-Malo, M., Velázquez, D., Zhang, C., Fernández-Fernández, J., Rodríguez-Galán, O., *et al.* (2020) Overexpression of budding yeast protein phosphatase Ppz1 impairs translation. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* **1867**. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32339526/>

Cannon, J.F. (2010) Function of Protein Phosphatase-1, Glc7, in *Saccharomyces cerevisiae*. In *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press Inc., pp. 27–59. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20800758/>

- Cannon, J.F., Pringle, J.R., Fietcher, A., and Khalil, M. (1994) Characterization of glycogen-deficient glc mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **136**:485-503. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8150278/>
- Celenza, J.L., and Carlson, M. (1986) A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase. *Science* **233**:1175–1180. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3526554/>
- Celenza, J.L., and Carlson, M. (1989) Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 protein kinase and evidence for functional interaction with the SNF4 protein. *Mol Cell Biol* **9**:5034–5044. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2557546/>
- Ceulemans, H., and Bollen, M. (2004) Functional Diversity of Protein Phosphatase-1, a Cellular Economizer and Reset Button. *Physiol Rev* **84**:1–39. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14715909/>
- Chaillou, T. (2019) Ribosome specialization and its potential role in the control of protein translation and skeletal muscle size. *J Appl Physiol* **127**:599–607. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30605395/>
- Cheng, Y.L., and Chen, R.H. (2015) Assembly and quality control of the protein phosphatase 1 holoenzyme involves the Cdc48-Shp1 chaperone. *J Cell Sci* **128**:1180–1192. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25616896/>
- Clotet, J., Garí, E., Aldea, M., and 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. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10022927/>
- Clotet, J., Posas, F., Casamayor, A., Schaaff-Gerstenschläger, I., and Ariño, J. (1991) The gene DIS2S1 is essential in *Saccharomyces cerevisiae* and is involved in glycogen phosphorylase activation. *Curr Genet* **19**:339–342. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1913873/>
- Clotet, J., Posas, F., Nadal, E. De, and Ariño, J. (1996) The NH₂-terminal extension of protein phosphatase PPZ1 has an essential functional role. *J Biol Chem* **271**:26349–26355. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8824289/>
- Cohen, P. (1989) The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem* **58**:453–508. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2549856/>
- Cohen, P. (1991) Classification of Protein- Serine/Threonine Phosphatases: Identification and Quantitation in Cell Extracts. *Methods Enzymol* **201**:389–398. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1658556/>
- Cohen, P.T.W. (1997) Novel protein serine/threonine phosphatases: Variety is the spice of life. *Trends Biochem Sci* **22**:245–251. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9255065/>
- Cohen, P.T.W. (2002) Protein phosphatase 1 – targeted in many directions. *J Cell Sci* **115**:241-256.
- Como, C.J. Di, Bose, R., and Arndt, K.T. (1995) Overexpression of SIS2, which contains an extremely acidic region, increases the expression of SWI4, CLN1 and CLN2 in sit4 mutants. *Genetics* **139**:95–107.
- Coppolecchia, R., Buser, P., Stotz, A., and Linder, P. (1993) A new yeast translation initiation factor suppresses a mutation in the eIF-4A RNA helicase. *EMBO J* **12**:4005–

4011. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8404866/>

Cosentino, G.P., Schmelzle, T., Haghghat, A., Helliwell, S.B., Hall, M.N., and Sonenberg, N. (2000) Eap1p, a Novel Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E-Associated Protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **20**:4604–4613. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10848587/>

Crawford, R.A., and Pavitt, G.D. (2019) Translational regulation in response to stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **36**:5–21.

Cridge, A.G., Castelli, L.M., Smirnova, J.B., Selley, J.N., Rowe, W., Hubbard, S.J., *et al.* (2010) Identifying eIF4E-binding protein translationally-controlled transcripts reveals links to mRNAs bound by specific PUF proteins. *Nucleic Acids Res* **38**:8039–8050. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20705650/>

Deloche, O., La Cruz, J. De, Kressler, D., Doère, M., and Linder, P. (2004) A Membrane Transport Defect Leads to a Rapid Attenuation of Translation Initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* **13**:357–366. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14967143/>

Deprez, M.A., Eskes, E., Wilms, T., Ludovico, P., and Winderickx, J. (2018) ph homeostasis links the nutrient sensing PKA/TORC1/Sch9 ménage-à-trois to stress tolerance and longevity. *Microb Cell* **5**:119–136. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29487859/>

Dever, T.E., Feng, L., Wek, R.C., Cigan, A.M., Donahue, T.F., and Hinnebusch, A.G. (1992) Phosphorylation of initiation factor 2 α by protein kinase GCN2 mediates gene-specific translational control of GCN4 in yeast. *Cell* **68**:585–596. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1739968/>

Dey, M., Velyvis, A., Li, J.J., Chiu, E., Chiovitti, D., Kay, L.E., *et al.* (2011) Requirement for kinase-induced conformational change in eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α) restricts phosphorylation of Ser51. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:4316–4321. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21368187/>

Dieci, G., Bottarelli, L., and Ottonello, S. (2005) A General Procedure for the Production of Antibody Reagents Against Eukaryotic Ribosomal Proteins. *Protein Pept Lett* **12**:555–560. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16101395/>

Doseff, A.I., and Arndt, K.T. (1995) LAS1 is an essential nuclear protein involved in cell morphogenesis and cell surface growth. *Genetics* **141**:857–871.

Duffy, S., Fam, H.K., Wang, Y.K., Styles, E.B., Kim, J.H., Ang, J.S., *et al.* (2016) Overexpression screens identify conserved dosage chromosome instability genes in yeast and human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**:9967–9976. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27551064/>

Egloff, M.P., Cohen, P.T.W., Reinemer, P., and Barford, D. (1995) Crystal structure of the catalytic subunit of human protein phosphatase 1 and its complex with tungstate. *J Mol Biol* **254**:942–959. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7500362/>

Erdős, G., and Dosztányi, Z. (2020) Analyzing Protein Disorder with IUPred2A. *Curr Protoc Bioinforma* **70**. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32237272/>

Erez, O., and Kahana, C. (2001) Screening for Modulators of Spermine Tolerance Identifies Sky1, the SR Protein Kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, as a Regulator of

- Polyamine Transport and Ion Homeostasis. *Mol Cell Biol* **21**:175–184.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11113192/>
- Feng, Z., 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. *J Biol Chem* **266**:23796–23801.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1660885/>
- 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.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1334024/>
- 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. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7565698/>
- Ferrer-Dalmau, J., González, A., Platara, M., Navarrete, C., Martínez, J.L., Barreto, L., et al. (2010) Ref2, a regulatory subunit of the yeast protein phosphatase 1, is a novel component of cation homeostasis. *Biochem J* **426**:355–364.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20028335/>
- Ferrer-Dalmau, J., Rande-Gil, F., Marquina, M., Prieto, J.A., and Casamayor, A. (2015) Protein kinase Snf1 is involved in the proper regulation of the unfolded protein response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* **468**:33–47.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25730376/>
- 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. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8007975/>
- Fulgenzi, F.R., Peralta, M.L., Mangano, S., Danna, C.H., Vallejo, A.J., Puigdomenech, P., and Santa-María, G.E. (2008) The ionic environment controls the contribution of the barley HvHAK1 transporter to potassium acquisition. *Plant Physiol* **147**:252–262.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18359846/>
- Gaber, R.F., Styles, C.A., and Fink, G.R. (1988) TRK1 encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **8**:2848–2859. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3043197/>
- García-Gimeno, M.A., Muñoz, I., Ariño, J., and Sanz, P. (2003) Molecular Characterization of Ypi1, a Novel *Saccharomyces cerevisiae* Type 1 Protein Phosphatase Inhibitor. *J Biol Chem* **278**:47744–47752.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14506263/>
- Garcia-deblas, B., Rubio, F., Quintero, F.J., Bañuelos, M.A., Haro, R., and Rodríguez-Navarro, A. (1993) Differential expression of two genes encoding isoforms of the ATPase involved in sodium efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *MGG Mol Gen Genet* **236**:363–368. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8437581/>
- Garí, E., Piedrafita, L., Aldea, M., and Herrero, E. (1997) A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**:837–848. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9234672/>
- Genuth, N.R., and Barna, M. (2018) The Discovery of Ribosome Heterogeneity and Its

- Implications for Gene Regulation and Organismal Life. *Mol Cell* **71**:364–374. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30075139/>
- Ghosh, A., and Cannon, J.F. (2013) Analysis of Protein Phosphatase-1 and Aurora Protein Kinase Suppressors Reveals New Aspects of Regulatory Protein Function in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* **8**. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23894419/>
- Gibbons, J.A., Kozubowski, L., Tatchell, K., and Shenolikar, S. (2007) Expression of human protein phosphatase-1 in *Saccharomyces cerevisiae* highlights the role of phosphatase isoforms in regulating eukaryotic functions. *J Biol Chem* **282**:21838–21847. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17545157/>
- Gietz, R.D., and Akio, S. (1988) New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **74**:527–534. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3073106/>
- Goffeau, A., Barrell, G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., *et al.* (1996) Life with 6000 genes. *Science* **274**:546–567. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8849441/>
- Gómez, M.J., Luyten, K., Onuhoa, C.N., and Ramos, J. (1994) Sodium tolerance depends on the capacity to transport potassium in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiol Off J Inst Microbiol Acad Sci Czech Repub* **39**:519–520. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8550009/>
- Gordiyenko, Y., Llácer, J.L., and Ramakrishnan, V. (2019) Structural basis for the inhibition of translation through eIF2 α phosphorylation. *Nat Commun* **10**. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31201334/>
- Green, M.R., and Sambrook, J. (2012) *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, New York.
- Haghighat, A., Mader, S., Pause, A., and Sonenberg, N. (1995) Repression of cap-dependent translation by 4E-binding protein 1: competition with p220 for binding to eukaryotic initiation factor-4E. *EMBO J* **14**:5701–5709.
- Haro, R., Garcíadeblas, B., and Rodríguez-Navarro, A. (1991) A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett* **291**:189–191. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1657642/>
- Hedbacker, K., and Carlson, M. (2006) Regulation of the nucleocytoplasmic distribution of Snf1-Gal83 protein kinase. *Eukaryot Cell* **5**:1950–1956. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17071825/>
- Hedbacker, K., Hong, S.-P., and Carlson, M. (2004) Pak1 Protein Kinase Regulates Activation and Nuclear Localization of Snf1-Gal83 Protein Kinase. *Mol Cell Biol* **24**:8255–8263. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15340085/>
- Hinnebusch, A.G. (2005) Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu Rev Microbiol* **59**:407–450. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16153175/>
- 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. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8164671/>

- Ho, B., Baryshnikova, A., and Brown, G.W. (2018) Unification of Protein Abundance Datasets Yields a Quantitative *Saccharomyces cerevisiae* Proteome. *Cell Syst* **6**:192–205.e3. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29361465/>
- Hohmann, S., Krantz, M., and Nordlander, B. (2007) Yeast Osmoregulation. In *Methods in Enzymology*. Academic Press Inc., pp. 29–45. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17875410/>
- Hughes, V., Müller, A., Stark, M.J.R., and Cohen, P.T.W. (1993) Both isoforms of protein phosphatase Z are essential for the maintenance of cell size and integrity in *Saccharomyces cerevisiae* in response to osmotic stress. *Eur J Biochem* **216**:269–279. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8396031/>
- Ide, S., Miyazaki, T., Maki, H., and Kobayashi, T. (2010) Abundance of ribosomal RNA gene copies maintains genome integrity. *Science* **327**:693–696. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20133573/>
- Ingebritsen, T.S., and Cohen, P. (1983) The Protein Phosphatases Involved in Cellular Regulation: 1. Classification and Substrate Specificities. *Eur J Biochem* **132**:255–261. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6301824/>
- Jackson, R.J., Hellen, C.U.T., and Pestova, T. V. (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**:113–127. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20094052/>
- Jiang, R., and Carlson, M. (1997) The Snf1 protein kinase and its activating subunit, Snf4, interact with distinct domains of the Sip1/Sip2/Gal83 component in the kinase complex. *Mol Cell Biol* **17**:2099–2106. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9121458/>
- Johnson, A., and Skotheim, J.M. (2013) Start and the restriction point. *Curr Opin Cell Biol* **25**:717–723. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23916770/>
- Johnson, D.R., Cok, S.J., Feldmann, H., and Gordon, J.I. (1994) Suppressors of nmt1-181, a conditional lethal allele of the *Saccharomyces cerevisiae* myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase gene, reveal proteins involved in regulating protein N-myristoylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:10158–62.
- Johnson, S.A., and Hunter, T. (2005) Kinomics: Methods for deciphering the kinome. *Nat Methods* **2**:17–25. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15789031/>
- Jousse, C., Oyadomari, S., Novoa, I., Lu, P., Zhang, Y., Harding, H.P., and Ron, D. (2003) Inhibition of a constitutive translation initiation factor 2 α phosphatase, CREP, promotes survival of stressed cells. *J Cell Biol* **163**:767–775. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14638860/>
- Kellis, M., Birren, B.W., and Lander, E.S. (2004) Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **428**:617–624. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15004568/>
- Kelly, D.E., Lamb, D.C., and Kelly, S.L. (2001) Genome-wide generation of yeast gene deletion strains. *Comp Funct Genomics* **2**:236–242. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18628917/>
- Kimura, Y., Irie, K., and Mizuno, T. (2017) Expression control of the AMPK regulatory subunit and its functional significance in yeast ER stress response. *Sci Rep* **7**. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28429799/>

- Kinclova-Zimmermannova, O., Gaskova, D., and Sychrova, H. (2006) The Na⁺,K⁺/H⁺-antiporter Nha1 influences the plasma membrane potential of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **6**:792–800.
- Kinclova-Zimmermannova, O., and Sychrova, H. (2006) Functional study of the Nha1p C-terminus: Involvement in cell response to changes in external osmolarity. *Curr Genet* **49**:229–236. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16402204/>
- Kinclová, O., Ramos, J., Potier, S., and Sychrová, H. (2001) Functional study of the *Saccharomyces cerevisiae* Nha1p C-terminus. *Mol Microbiol* **40**:656–668. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11359571/>
- Klis, F.M., Boorsma, A., and Groot, P.W.J. De (2006) Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**:185–202. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16498706/>
- Ko, C.H., Buckley, A.M., and Gaber, R.F. (1990) TRK2 is required for low affinity K⁺ transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **125**:305–312. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2199312/>
- Ko, C.H., and Gaber, R.F. (1991) TRK1 and TRK2 encode structurally related K⁺ transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **11**:4266–4273. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2072919/>
- Koch, C., Schleiffer, A., Ammerer, G., and Nasmyth, K. (1996) Switching transcription on and off during the yeast cell cycle: Cln/Cdc28 kinases activate bound transcription factor SBF (Swi4/Swi6) at Start, whereas Clb/Cdc28 kinases displace it from the promoter in G2. *Genes Dev* **10**:129–141. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8566747/>
- 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. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12529424/>
- Kressler, D., la Cruz, J. de, Rojo, M., and Linder, P. (1997) Fal1p is an essential DEAD-box protein involved in 40S-ribosomal-subunit biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **17**:7283–7294. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9372960/>
- la Cruz, J. de, Gómez-Herreros, F., Rodríguez-Galán, O., Begley, V., la Cruz Muñoz-Centeno, M. de, and Chávez, S. (2018) Feedback regulation of ribosome assembly. *Curr Genet* **64**:393–404. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29022131/>
- Lanker, S., Muller, P.P., Altmann, M., Goyer, C., Sonenberg, N., and Trachsel, H. (1992) Interactions of the eIF-4F subunits in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **267**:21167–21171. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1400427/>
- Larasati, and Duncker, B.P. (2017) Mechanisms governing DDK regulation of the initiation of DNA replication. *Genes (Basel)* **8**. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28025497/>
- Lee, K.S., Hines, L.K., and Levin, D.E. (1993) 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. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8395014/>
- Lee, S., Ho, H.C., Tumolo, J.M., Hsu, P.C., and MacGurn, J.A. (2019) Methionine triggers Ppz-mediated dephosphorylation of Art1 to promote cargo-specific endocytosis.

- J Cell Biol* **218**:977–992. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30610170/>
- Lee, S., Tumolo, J.M., Ehlinger, A.C., Jernigan, K.K., Qualls-Histed, S.J., Hsu, P.C., *et al.* (2017) Ubiquitin turnover and endocytic trafficking in yeast are regulated by ser57 phosphorylation of ubiquitin. *Elife* **6**. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29130884/>
- Leiter, É., González, A., Erdei, É., Casado, C., Kovács, L., Ádám, C., *et al.* (2012) Protein phosphatase Z modulates oxidative stress response in fungi. *Fungal Genet Biol* **49**:708–716. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22750657/>
- Levin, D.E. (2005) Cell Wall Integrity Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**:262–291. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15944456/>
- Liu, H., Krizek, J., and Bretscher, A. (1992) Construction of a GAL1-regulated yeast cDNA expression library and its application to the identification of genes whose overexpression causes lethality in yeast. *Genetics* **132**:665–73.
- Liu, Z., and Myers, L.C. (2015) Fungal Mediator Tail Subunits Contain Classical Transcriptional Activation Domains. *Mol Cell Biol* **35**:1363–1375. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25645928/>
- Mader, S., Lee, H., Pause, A., and Sonenberg, N. (1995) The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins. *Mol Cell Biol* **15**:4990–4997. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7651417/>
- Maeda, T., Tsai, A.Y., and Saito, H. (1993) Mutations in a protein tyrosine phosphatase gene (PTP2) and a protein serine/threonine phosphatase gene (PTC1) cause a synthetic growth defect in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **13**:5408–5417. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8395005/>
- Maeda, T., Wurgler-Murphy, S.M., and Saito, H. (1994) A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* **369**:242–245. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8183345/>
- Makanae, K., Kintaka, R., Makino, T., Kitano, H., and Moriya, H. (2013) Identification of dosage-sensitive genes in *Saccharomyces cerevisiae* using the genetic tug-of-war method. *Genome Res* **23**:300–311. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23275495/>
- Manning, G., Plowman, G.D., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002) Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem Sci* **27**:514–520. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12368087/>
- Mapes, J., and Ota, I.M. (2004) Nbp2 targets the Ptc1-type 2C Ser/Thr phosphatase to the HOG MAPK pathway. *EMBO J* **23**:302–311. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14685261/>
- Márkus, B., Szabó, K., Pfliegler, W.P., Petrényi, K., Boros, E., Pócsi, I., *et al.* (2017) Proteomic analysis of protein phosphatase Z1 from *Candida albicans*. *PLoS One* **12**. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28837603/>
- Marquina, M., Queralt, E., Casamayor, A., and Ariño, J. (2012) Lack of the Glc7 phosphatase regulatory subunit Ypi1 activates the morphogenetic checkpoint. *Int J Biochem Cell Biol* **44**:1862–1871. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22750472/>
- Maziarz, M., Shevade, A., Barrett, L.K., and Kuchin, S. (2016) Springing into action:

Reg2 negatively regulates Snf1 protein kinase and facilitates recovery from prolonged glucose starvation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **82**:3875–3885. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27107116/>

McCartney, R.R., and Schmidt, M.C. (2001) Regulation of Snf1 Kinase. Activation requires phosphorylation of threonine 210 by an upstream kinase as well as a distinct step mediated by the Snf4 subunit. *J Biol Chem* **276**:36460–36466. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11486005/>

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.

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. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8132612/>

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. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14871941/>

Miller, M.E., and Cross, F.R. (2001) Cyclin specificity: How many wheels do you need on a unicycle? *J Cell Sci* **114**:1811–1820. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11329367/>

Minhas, A., Sharma, A., Kaur, H., Fnu, Y., Ganesan, K., and Mondal, A.K. (2012) A conserved Ser/Arg rich motif in PPZ orthologs from fungi is important for its role in cation tolerance. *J Biol Chem* **287**:7301–7312.

Mitsui, K., Kamauchi, S., Nakamura, N., Inoue, H., and Kanazawa, H. (2004) A Conserved Domain in the Tail Region of the *Saccharomyces cerevisiae* Na⁺/H⁺ Antiporter (Nha1p) Plays Important Roles in Localization and Salinity-Resistant Cell-Growth. *J Biochem* **135**:139–148. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14999019/>

Mitsui, K., Yasui, H., Nakamura, N., and Kanazawa, H. (2005) Oligomerization of the *Saccharomyces cerevisiae* Na⁺/H⁺ antiporter Nha1p: Implications for its antiporter activity. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* **1720**:125–136. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16360116/>

Moorhead, G.B.G., Trinkle-Mulcahy, L., and Ulke-Lemée, A. (2007) Emerging roles of nuclear protein phosphatases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**:234–244. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17318227/>

Morrison, D.K., Murakami, M.S., and Cleghon, V. (2000) Analysis Protein Kinases and Phosphatases in the *Drosophila* Genome Identification and Classification of *Drosophila* Protein Kinases and Phosphatases. *J Cell Biol* **150**:57–62.

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. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10207057/>

Muñoz, I., Ruiz, A., Marquina, M., Barceló, A., Albert, A., and Ariño, J. (2004) Functional characterization of the yeast Ppz1 phosphatase inhibitory subunit Hal3: A mutagenesis study. *J Biol Chem* **279**:42619–42627.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15292171/>

Muñoz, I., Simón, E., Casals, N., Clotet, J., and Ariño, J. (2003) Identification of multicopy suppressors of cell cycle arrest at the G1 - S transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **20**:157–169. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12518319/>

Nadal, E. De, Clotet, J., Posas, F., Serrano, R., Gomez, N., and Ariño, 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. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9636153/>

Nadal, E. De, Fadden, R.P., Ruiz, A., Haystead, T., and Ariño, J. (2001) A role for the Ppz Ser/Thr protein phosphatases in the regulation of translation elongation factor 1 β . *J Biol Chem* **276**:14829–14834.

Ng, A.H.M., Fang, N.N., Comyn, S.A., Gsponer, J., and Mayor, T. (2013) System-wide analysis reveals intrinsically disordered proteins are prone to ubiquitylation after misfolding stress. *Mol Cell Proteomics* **12**:2456–2467. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23716602/>

Novoa, I., Zeng, H., Harding, H.P., and Ron, D. (2001) Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2 α . *J Cell Biol* **153**:1011–1022.

Offley, S.R., and Schmidt, M.C. (2019) Protein phosphatases of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **65**:41–55. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30225534/>

Ohgaki, R., Nakamura, N., Mitsui, K., and Kanazawa, H. (2005) Characterization of the ion transport activity of the budding yeast Na⁺/H⁺ antiporter, Nha1p, using isolated secretory vesicles. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* **1712**:185–196. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15950597/>

Ohkura, H., Kinoshita, N., Miyatani, S., Toda, T., and Yanagida, M. (1989) The fission yeast *dis2⁺* gene required for chromosome disjoining encodes one of two putative type 1 protein phosphatases. *Cell* **57**:997–1007. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2544298/>

Olsen, B.B., Boldyreff, B., Niefind, K., and Issinger, O.G. (2006) Purification and characterization of the CK2 α' -based holoenzyme, an isozyme of CK2 α : A comparative analysis. *Protein Expr Purif* **47**:651–661. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16442308/>

Orii, M., Kono, K., Wen, H.I., and Nakanishi, M. (2016) PP1-dependent formin bnr1 dephosphorylation and delocalization from a cell division site. *PLoS One* **11**. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26771880/>

Oughtred, R., Stark, C., Breitkreutz, B.J., Rust, J., Boucher, L., Chang, C., *et al.* (2019) The BioGRID interaction database: 2019 update. *Nucleic Acids Res* **47**:D529–D541. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30476227/>

Park, J.M., Kim, H.-S., Han, S.J., Hwang, M.-S., Lee, Y.C., and Kim, Y.-J. (2000) In Vivo Requirement of Activator-Specific Binding Targets of Mediator. *Mol Cell Biol* **20**:8709–8719. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11073972/>

Park, K., Lee, Y.S., Jung, D., and Kim, J. (2018) Roles of eIF4E-binding protein Caf20 in Ste12 translation and P-body formation in yeast. *J Microbiol* **56**:744–747. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30136257/>

- Pedelini, L., Marquina, M., Ariño, J., Casamayor, A., Sanz, L., Bollen, M., *et al.* (2007) YPI1 and SDS22 proteins regulate the nuclear localization and function of yeast type 1 phosphatase Glc7. *J Biol Chem* **282**:3282–3292. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17142459/>
- Petrényi, K., Molero, C., Kónya, Z., Erdodi, F., Ariño, J., and Dombrádi, V. (2016) Analysis of two putative *Candida albicans* phosphopantothienoylcysteine decarboxylase / protein phosphatase Z regulatory subunits reveals an unexpected distribution of functional roles. *PLoS One* **11**. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27504636/>
- Pinsky, B.A., Nelson, C.R., and Biggins, S. (2009) Protein Phosphatase 1 Regulates Exit from the Spindle Checkpoint in Budding Yeast. *Curr Biol* **19**:1182–1187. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19592248/>
- Piruat, J.I., Chávez, S., and Aguilera, A. (1997) The yeast HRS1 gene is involved in positive and negative regulation of transcription and shows genetic characteristics similar to SIN4 and GAL11. *Genetics* **147**:1585–1594.
- Posas, F., Bollen, M., Stalmans, W., and Ariño, J. (1995a) Biochemical characterization of recombinant yeast PPZ1, a protein phosphatase involved in salt tolerance. *FEBS Lett* **368**:39–44. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7615085/>
- Posas, F., Camps, M., and Arino, J. (1995b) The PPZ protein phosphatases are important determinants of salt tolerance in yeast cells. *J Biol Chem* **270**:13036–13041. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7768897/>
- Posas, F., Casamayor, A., and Ariño, J. (1993) The PPZ protein phosphatases are involved in the maintenance of osmotic stability of yeast cells. *FEBS Lett* **318**:282–286. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8382634/>
- Posas, F., Casamayor, A., Morral, N., and Ariño, J. (1992) Molecular cloning and analysis of a yeast protein phosphatase with an unusual amino-terminal region. *J Biol Chem* **267**:11734–11740.
- Prior, C., Potier, S., Souciet, J.L., and Sychrova, H. (1996) Characterization of the NHA1 gene encoding a Na⁺/H⁺-antiporter of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **387**:89–93. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8654575/>
- Proft, M., and Struhl, K. (2004) MAP kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction. *Cell* **118**:351–361. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15294160/>
- Ramer, S.W., Elledge, S.J., and Davis, R.W. (1992) Dominant genetics using a yeast genomic library under the control of a strong inducible promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:11589–11593. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1454852/>
- Rodriguez-Navarro, A., and Ramos, J. (1984) Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **159**:940–945. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6384187/>
- Rodríguez-Pena, J.M., García, R., Nombela, C., and Arroyo, J. (2010) The high-osmolarity glycerol (HOG) and cell wall integrity (CWI) signalling pathways interplay: A yeast dialogue between MAPK routes. *Yeast* **27**:495–502. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20641030/>
- Rojas, M., Gingras, A.-C., and Dever, T.E. (2014) Protein phosphatase PP1/GLC7

- interaction domain in yeast eIF2 γ bypasses targeting subunit requirement for eIF2 α dephosphorylation. *Proc Natl Acad Sci* **111**:E1344–E1353.
- Ruiz, A., González, A., García-Salcedo, R., Ramos, J., and Ariño, J. (2006) Role of protein phosphatases 2C on tolerance to lithium toxicity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **62**:263–277. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16956380/>
- Ruiz, A., González, A., Muñoz, I., Serrano, R., Abrie, J.A., Strauss, E., and Ariño, J. (2009) Moonlighting proteins Hal3 and Vhs3 form a heteromeric PPCDC with Ykl088w in yeast CoA biosynthesis. *Nat Chem Biol* **5**:920–928. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19915539/>
- Ruiz, A., Muñoz, I., Serrano, R., González, A., Simón, E., and Ariño, J. (2004) Functional characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* VHS3 gene: A regulatory subunit of the Ppz1 protein phosphatase with novel, phosphatase-unrelated functions. *J Biol Chem* **279**:34421–34430. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15192104/>
- Ruiz, A., Xu, X., and Carlson, M. (2011) Roles of two protein phosphatases, Reg1-Glc7 and Sit4, and glycogen synthesis in regulation of SNF1 protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:6349–6354. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21464305/>
- Ruiz, A., Xu, X., and Carlson, M. (2013) Ptc1 protein phosphatase 2C contributes to glucose regulation of SNF1/AMP-activated protein kinase (AMPK) in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **288**:31052–31058. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24019512/>
- Ruiz, A., Yenush, L., and Ariño, J. (2003) Regulation of ENA1 Na⁺-ATPase gene expression by the Ppz1 protein phosphatase is mediated by the calcineurin pathway. *Eukaryot Cell* **2**:937–948. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14555476/>
- Santolaria, C., Velázquez, D., Strauss, E., and Ariño, J. (2018) Mutations at the hydrophobic core affect Hal3 trimer stability, reducing its Ppz1 inhibitory capacity but not its PPCDC moonlighting function. *Sci Rep* **8**. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30279472/>
- Sanz, P., Alms, G.R., Haystead, T.A.J., and Carlson, M. (2000) Regulatory Interactions between the Reg1-Glc7 Protein Phosphatase and the Snf1 Protein Kinase. *Mol Cell Biol* **20**:1321–1328. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10648618/>
- Schmeing, T.M., and Ramakrishnan, V. (2009) What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature* **461**:1234–1242. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19838167/>
- Serrano, R. (1996) Salt tolerance in plants and microorganisms: Toxicity targets and defense responses. *Int Rev Cytol* **165**:1–52. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8900956/>
- Shashkova, S., Wollman, A.J.M., Leake, M.C., and Hohmann, S. (2017) The yeast Mig1 transcriptional repressor is dephosphorylated by glucose-dependent and -independent mechanisms. *FEMS Microbiol Lett* **364**. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28854669/>
- Shi, Y. (2009) Serine/Threonine Phosphatases: Mechanism through Structure. *Cell* **139**:468–484. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19879837/>
- Sikorski, R.S., and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**:19–27.

- 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.
- Simpson, C.E., and Ashe, M.P. (2012) Adaptation to stress in yeast: To translate or not? In *Biochemical Society Transactions*. Biochem Soc Trans, pp. 794–799. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22817736/>
- Sonenberg, N., and Hinnebusch, A.G. (2009) Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. *Cell* **136**:731–745. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19239892/>
- Squizzato, S., Park, Y.M., Buso, N., Gur, T., Cowley, A., Li, W., *et al.* (2015) The EBI Search engine: Providing search and retrieval functionality for biological data from EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res* **43**:W585–W588. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25855807/>
- Stark, M.J.R. (1996) Yeast protein serine/threonine phosphatases: Multiple roles and diverse regulation. *Yeast* **12**:1647–1675. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9123967/>
- Stuart, J.S., Frederick, D.L., Varner, C.M., and Tatchell, K. (1994) The mutant type 1 protein phosphatase encoded by *glc7-1* from *Saccharomyces cerevisiae* fails to interact productively with the GAC1-encoded regulatory subunit. *Mol Cell Biol* **14**:896–905. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8289829/>
- Sutton, A., Immanuel, D., and Arndt, K.T. (1991) The SIT4 protein phosphatase functions in late G1 for progression into S phase. *Mol Cell Biol* **11**:2133–2148. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1848673/>
- Swaney, D.L., Beltrao, P., Starita, L., Guo, A., Rush, J., Fields, S., *et al.* (2013) Global analysis of phosphorylation and ubiquitylation cross-talk in protein degradation. *Nat Methods* **10**:676–682. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23749301/>
- Sychrová, H., Ramírez, J., and Peña, A. (1999) Involvement of Nha1 antiporter in regulation of intracellular pH in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* **171**:167–172. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10077841/>
- Szabó, K., Kónya, Z., Erdődi, F., Farkas, I., and Dombrádi, V. (2019) Dissection of the regulatory role for the N-terminal domain in *Candida albicans* protein phosphatase Z1. *PLoS One* **14**. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30707732/>
- Tarassov, K., Messier, V., Landry, C.R., Radinovic, S., Serna Molina, M.M., Shames, I., *et al.* (2008) An in vivo map of the yeast protein interactome. *Science* **320**:1465–1470. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18467557/>
- Teng, T., Thomas, G., and Mercer, C.A. (2013) Growth control and ribosomopathies. *Curr Opin Genet Dev* **23**:63–71. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23490481/>
- Tomek, W., and Wollenhaupt, K. (2012) The “closed loop model” in controlling mRNA translation during development. *Anim Reprod Sci* **134**:2–8. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22917874/>
- Tyson, J.J., Csikasz-Nagy, A., and Novak, B. (2002) The dynamics of cell cycle regulation. *BioEssays* **24**:1095–1109. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12447975/>
- Ulbrich, C., Diepholz, M., Baßler, J., Kressler, D., Pertschy, B., Galani, K., *et al.* (2009)

- Mechanochemical Removal of Ribosome Biogenesis Factors from Nascent 60S Ribosomal Subunits. *Cell* **138**:911–922. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19737519/>
- Urban, J., Soulard, A., Huber, A., Lippman, S., Mukhopadhyay, D., Deloche, O., *et al.* (2007) Sch9 Is a Major Target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* **26**:663–674. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17560372/>
- Vaga, S., Bernardo-Faura, M., Cokelaer, T., Maiolica, A., Barnes, C.A., Gillet, L.C., *et al.* (2014) Phosphoproteomic analyses reveal novel cross-modulation mechanisms between two signaling pathways in yeast. *Mol Syst Biol* **10**:767. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25492886/>
- Velázquez, D., Albarca, M., Zhang, C., Calafí, C., López-Malo, M., Torres-Torronteras, J., *et al.* (2020) Yeast Ppz1 protein phosphatase toxicity involves the alteration of multiple cellular targets. *Sci Rep in press*.
- Venturi, G.M., Bloecher, A., Williams-Hart, T., Tatchell, K., Bloecher, T., Williams-Hart, T., *et al.* (2000) Genetic interactions between GLC7, PPZ1 and PPZ2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **155**:69–83.
- Verbinnen, I., Ferreira, M., and Bollen, M. (2017) Biogenesis and activity regulation of protein phosphatase 1. *Biochem Soc Trans* **45**:89–99. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28202662/>
- Vincent, O., Townley, R., Kuchin, S., and Carlson, M. (2001) Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific β subunits and a novel glucose signaling mechanism. *Genes Dev* **15**:1104–1114. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11331606/>
- Vissi, E., Clotet, J., Nadal, E. de, Barceló, A., Bakó, É., Gergely, P., *et al.* (2001) Functional analysis of the *Neurospora crassa* PZL-1 protein phosphatase by expression in budding and fission yeast. *Yeast* **18**:115–124. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11169754/>
- 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. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11113180/>
- Warner, J.R. (1999) The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci* **24**:437–440. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10542411/>
- Wek, R.C., Cannon, J.F., Dever, T.E., and Hinnebusch, A.G. (1992) Truncated protein phosphatase GLC7 restores translational activation of GCN4 expression in yeast mutants defective for the eIF-2 alpha kinase GCN2. *Mol Cell Biol* **12**:5700–5710. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1333044/>
- 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⁺ pump in the yeast plasma membrane. *EMBO J* **14**:3870–3882.
- Williams-Hart, T., Wu, X., and Tatchell, K. (2002) Protein phosphatase type 1 regulates ion homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **160**:1423–1437. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11973298/>
- Wool, I.G. (1979) The structure and function of eukaryotic ribosomes. *Annu Rev Biochem* **48**:719–754. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/382996/>

- Woolford, J.L., and Baserga, S.J. (2013) Ribosome biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **195**:643–681. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24190922/>
- Wu, X., and Tatchell, K. (2001) Mutations in yeast protein phosphatase type 1 that affect targeting subunit binding. *Biochemistry* **40**:7410–7420. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11412094/>
- Yang, J., Gao, M., Xiong, J., Su, Z., and Huang, Y. (2019) Features of molecular recognition of intrinsically disordered proteins via coupled folding and binding. *Protein Sci* **28**:1952–1965. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31441158/>
- Yenush, L., Merchan, S., Holmes, J., and Serrano, R. (2005) pH-Responsive, Posttranslational Regulation of the Trk1 Potassium Transporter by the Type 1-Related Ppz1 Phosphatase. *Mol Cell Biol* **25**:8683–8692. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16166647/>
- Yenush, L., Mulet, J.M., Ariño, J., and Serrano, R. (2002) The Ppz protein phosphatases are key regulators of K⁺ and pH homeostasis: Implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression. *EMBO J* **21**:920–929. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11867520/>
- Yerlikaya, S., Meusburger, M., Kumari, R., Huber, A., Anrather, D., Costanzo, M., *et al.* (2016) TORC1 and TORC2 work together to regulate ribosomal protein S6 phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **27**:397–409. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26582391/>
- Yin, Z., Wilson, S., Hauser, N.C., Tournu, H., Hoheisel, J.D., and Brown, A.J.P. (2003) Glucose triggers different global responses in yeast, depending on the strength of the signal, and transiently stabilizes ribosomal protein mRNAs. *Mol Microbiol* **48**:713–724. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12694616/>
- Yonemoto, W., McGlone, M., and Taylor, S. (1993) N-Myristylation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase conveys structural stability. *J Biol Chem* **268**:2348–2352.
- Zhang, C., García-Rodas, R., Molero, C., Oliveira, H.C. de, Taberner, L., Reverter, D., *et al.* (2019a) Characterization of the atypical Ppz/Hal3 phosphatase system from the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* **111**:898–917. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30536975/>
- Zhang, C., la Torre, A. de, Pérez-Martín, J., and Ariño, J. (2019b) Protein phosphatase Ppz1 is not regulated by a hal3-like protein in plant pathogen *Ustilago maydis*. *Int J Mol Sci* **20**. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31387236/>
- 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. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7891699/>
- Zhu, J., Heinecke, D., Mulla, W.A., Bradford, W.D., Rubinstein, B., Box, A., *et al.* (2015) Single-cell based quantitative assay of chromosome transmission fidelity. *G3 Genes, Genomes, Genet* **5**:1043–1056. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25823586/>
- Zou, J., Friesen, H., Larson, J., Huang, D., Cox, M., Tatchell, K., and Andrews, B.

(2009) Regulation of cell polarity through phosphorylation of Bni4 by Pho85 G1 cyclin-dependent kinases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **20**:3239–3250.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19458192/>

The background features several overlapping geometric shapes and patterns. In the top left, there is a semi-circle with green diagonal stripes. To its right, a light blue circle overlaps a light purple circle, with a black diamond shape inside the blue circle and a blue zigzag line below it. A large yellow circle with diagonal stripes is centered on the page. Below it, a dark blue horizontal bar spans the width of the page. In the bottom left, a light purple circle overlaps a dark blue circle with diagonal stripes, with a red diamond shape above the purple circle. In the bottom right, a light purple circle overlaps a red circle with diagonal stripes, with a pink zigzag line above the purple circle and a pink triangle below it.

APÉNDICES

Figura A1. Secuencias de las proteínas descritas en la Figura 16. El código de colores es el mismo que el empleado para la Figura 16 para mejor comprensión. Los dominios catalíticos se muestran en negrita, y el epítipo HA se denota con fuente de color blanco resaltada en azul.

Ppz1-HA

MGNSSSKSSKKDSHSNSSSRNPRPQVSRTE^TSHSVKSAKSNKSSRRSLPSSSTTNTN
 SNVPDPSTPSKPNLEVNHQRHSSHTNRYHFPSSSHSHSNSQNE^LLLTPSSSSTKRPSTS
 RRSSYNTKAAADLPPSMIQMEPKSPILKTNNSSTHVS^KHKSSYSSTYYENALTDDNDND
 KDNDISHTKFRSSNSRPSSIRSGSVSRRKSDVTHEEPNNGSYSSNNQENYLVQALTR
 SNSHASSLHSRKSSFGSDGNTAYSTPLNSPGLSKLTDHSGEYFTSNSTSSLNHHSSRDI
 YPSKHISNDDDIENSQLSNIHASMENVNDKNNNITDSK^KKDPNEEFNDIMQSSG**NKNAP**
KKFKKPIDIDE^TIQKLLDAGYAAKRTKNVCLKNNEILQICIKAREIFLSQPSLLELSPP
VKIVGDVHGQYGDLLRLFTKCGFPSSNYLFLGDYVDRGKQSLETILLLLFCYKIKYPEN
FLLRGNHECANVTRVYGFYDECKRRCNIKIWKTFIDTFNTLPLAAIVAGKIFCVHGGL
SPVLNSMDEIRHVSRPTDVPDFGLINDLLWSDPTDSSPNEWEDNERGVSYCYNKVAINKF
LNKFGFDLVCRAHMVEDGYEFFNDRSLVTVFSAPNYCGEFDNWGAVMSVSEGLLCSFE
LLDPLDSAALKQVMKGRQERKLANQQQQMMETSITNDNESQQYPYDVPDYA*

Ppz2-HA

MGNSSGSKQHTKHNSKKDDHDGDRKKTLDLPPLTKSDTTHSLKSSRSLRSLRSKRSEASL
 ASNVQAQTQPLSRSSSTLGNGNRNHRRSNNAPITPPNNHYLTSHPSSSRRLSSSSRRSS
 MGNNNSELPPSMIQMEPKSPILKNSTSMHSTSSFN^SYENALTDDDDDRGDDGGESPSM
 AKVTRINTSSADRGSKRTPLRRHNSLQPEKGVTFSSSTSKLRRRSDNTLPASYPLNA
 EAGNGSDYFSNRNSHASSRKSSFGSTGNTAYSTPLHSPALRKMSRDNDSDGNVNG
 RGTSPIPNLNIDKPSPASASSASKREYLSAYPTLAHRDSSSSLSPRGKGRSSSSSSSSSQ
 RIYVSPSPPTGDFVHGSCADGDNRSRTNTM**VEMKRKKPVRPVDIDE^TIQRLLDAGYAAK**
RTKNVCLKNSEI^TIQICHKARELFLAQPALLELSPSVKIVGDVHGQYADLLRLFTKCGFP
PANYLFLGDYVDRGKQSLETILLLLCYKIKYPENFLLRGNHECANVTRVYGFYDECK
RRCNIKIWKTFVDTFNTLPLAAIVTGKIFCVHGGLSPVLNSMDEIRHVS^RPTDVPDFGL
INDLLWSDPTDSSNEWEDNERGVSF^CYNKVAINKFLNKFGFDLVCRAHMVEDGYEFFN
DRSLVTVFSAPNYCGEFDNWGAVMTVSEGLLCSFELLDPLDSTALKQVMKGRQERKLA
NRYPYDVPDYA*

Ppz1:2-HA

MGNSSSKSSKKDSHSNSSSRNPRPQVSRTE^TSHSVKSAKSNKSSRRSLPSSSTTNTN
 SNVPDPSTPSKPNLEVNHQRHSSHTNRYHFPSSSHSHSNSQNE^LLLTPSSSSTKRPSTS
 RRSSYNTKAAADLPPSMIQMEPKSPILKTNNSSTHVS^KHKSSYSSTYYENALTDDNDND
 KDNDISHTKFRSSNSRPSSIRSGSVSRRKSDVTHEEPNNGSYSSNNQENYLVQALTR
 SNSHASSLHSRKSSFGSDGNTAYSTPLNSPGLSKLTDHSGEYFTSNSTSSLNHHSSRDI
 YPSKHISNDDDIENSQLSNIHASMENVNDKNNNITDSK^KKDPNEEFNDIMQSSG**VEMKR**
KKPVRPVDIDE^TIQRLLDAGYAAKRTKNVCLKNSEI^TIQICHKARELFLAQPALLELSPS
VKIVGDVHGQYADLLRLFTKCGFPMPANYLFLGDYVDRGKQSLETILLLLCYKIKYPEN
FLLRGNHECANVTRVYGFYDECKRRCNIKIWKTFVDTFNTLPLAAIVTGKIFCVHGGL
SPVLNSMDEIRHVS^RPTDVPDFGLINDLLWSDPTDSSNEWEDNERGVSF^CYNKVAINKF

LNKFGFDLVCRAHMVVEDGYEFFNDRSLVTVFSAPNYCGEFDNKGAVMTVSEGLLCSFE
LLDPLDSTALKQVMKKGRQERKLANRYPYDVPDYA*

Ppz2:1

MGNSSGSKQHTKHNSKKDDHDGDRKKTLDLPPLTKSDTTHSLKSSRSLRSLRSKRSEASL
ASNVQAQTQPLSRSSSTLGNNGNRNHRRSNNAPITPPNNHYLTSHPSSSRRLSSSSRRSS
MGNNNNSELPPSMIQMEPKSPILKNSTSMHSTSSFNSEYENALTDDEDRGDDGGESPSM
AKVTRINTSSSADRGSKRTPLRRHNSLQPEKGVTFSSSTSSKLRRRSDNTLPASYPLNA
EAGNGSDYFSNRNSNHASSRKSSFGSTGNTAYSTPLHSPALRKMSSRDNDSDGDNVNG
RGTSPIPNLNIDKPSPSASSASKREYLSAYPTLAHRDSSSSLSPRGKGQRSSSSSSSSSQ
RIYVSPSPPTGDFVHGSCADGNGSRTNTM**SGNKNAPKKFKKPIDIDETIQKLLDAGYA**
AKRTRNVCLKNEILQICIKAREIFLSQPSLLELSPVKIVGDVHGQYGDLLRLFTKCG
FPPSSNYLFLGDYVDRGKQSLETILLFCYKIKYPENFFLLRGNHECANVTRVYGFYDE
CKRRCNIKIWKTFIDTFNTLPLAAIVAGKIFCVHGGLSPVLNSMDEIRHVVRPTDVPDF
GLINDLLWSDPTDSPNEWEDNERGVSYCYNKVAINKFLNKFGFDLVCRAHMVVEDGYEF
FNDRSLVTVFSAPNYCGEFDNKGAVMSVSEGLLCSFELLDPLDSAALKQVMKKGRQERK
LANQQQMMETSITNDNESQQYPYDVPDYA*

Figura A2. Predicción de las regiones intrínsecamente desordenadas (IDR) y de *folding upon binding* de las fosfatasas Ppz de diversos hongos. Predicción de los IDR de acuerdo con el *software* IUPred2A. Predicción de las regiones *folding upon binding* basada en el *software* ANCHOR2. La línea discontinua representa el umbral de 0,5, que corresponde al 5% de predicción de falsos positivos en IDR o segmentos que presentan *folding upon binding*.

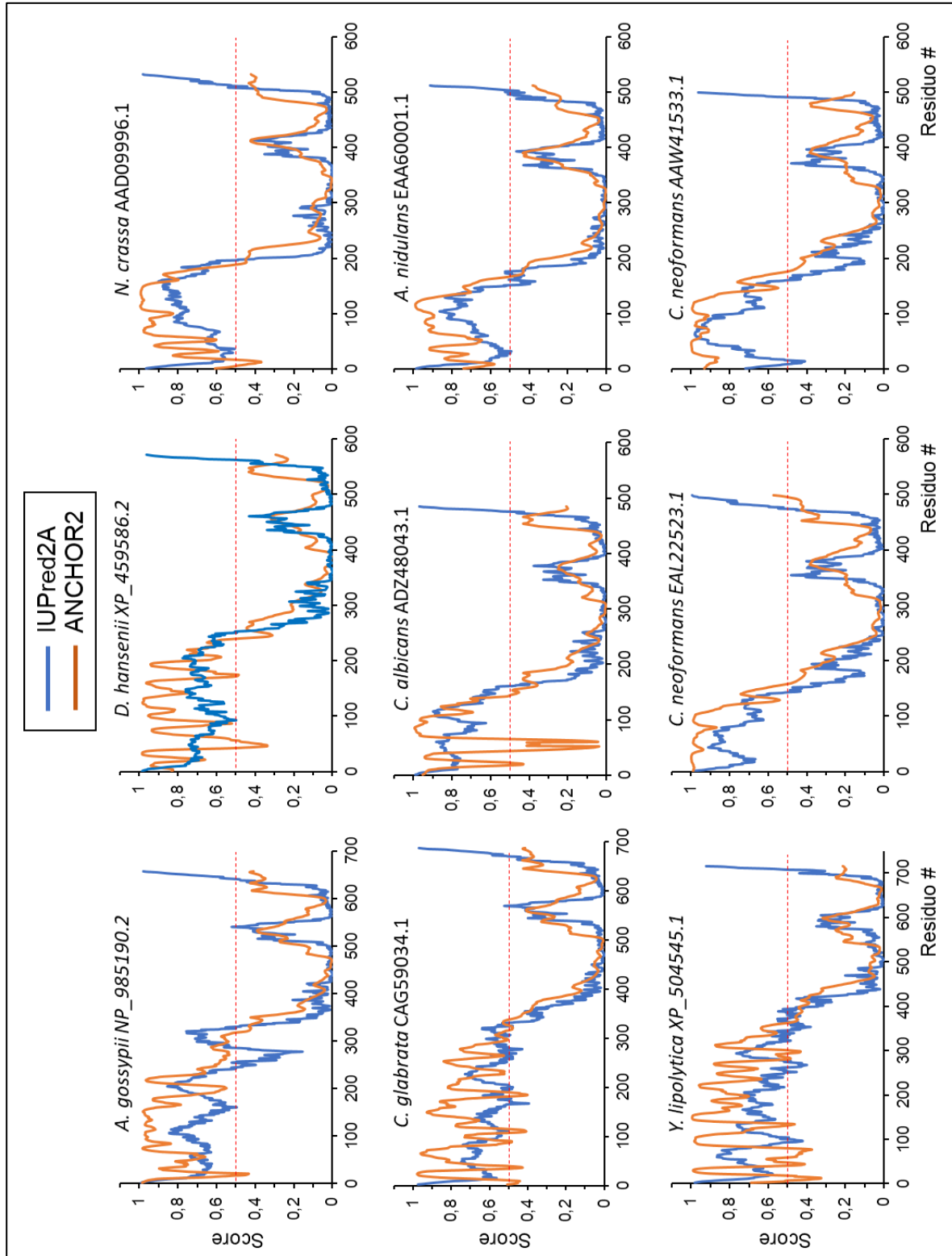


Tabla A1. Cepas de levadura empleadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo	Referencia
BY4741	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ met15Δ ura3Δ</i>	(Brachmann <i>et al.</i> , 1998)
<i>gac1</i>	BY4741 <i>gac1::kanMX4</i>	EUROFAN
<i>gcn2</i>	BY4741 <i>gcn2::kanMX4</i>	(Calafí <i>et al.</i> , 2020)
<i>glc8</i>	BY4741 <i>glc8::kanMX4</i>	EUROFAN
<i>hog1</i>	BY4741 <i>hog1::kanMX4</i>	EUROFAN
<i>ppz1</i>	BY4741 <i>ppz1::kanMX4</i>	EUROFAN
<i>reg2</i>	BY4741 <i>reg2::kanMX4</i>	EUROFAN
<i>slt2</i>	BY4741 <i>slt2::kanMX4</i>	EUROFAN
AGS19	BY4741 <i>ppz1::kanMX4 ppz2::HIS3</i>	(Leiter <i>et al.</i> , 2012)
CCP05	BY4741 <i>gal4::kanMX4</i>	Este trabajo
CCP06	BY4741 <i>gal11::kanMX4</i>	Este trabajo
CCP08	BY4741 <i>pgd1::kanMX4</i>	Este trabajo
CCP09	BY4741 <i>med2::kanMX4</i>	Este trabajo
CCP011	BY4741 <i>nha1::LEU2</i>	Este trabajo
CCP013	BY4741 ^{prom} <i>tetO₇:PPZ1 nha1::LEU2</i>	Este trabajo
CCP014	BY4741 <i>hog1::kanMX4 nha1::LEU2</i>	Este trabajo
CCV017	BY4741 <i>nbp2::kanMX4</i>	Colección del laboratorio
MAR143	BY4741 <i>ptc1::natMX4</i>	(Ruiz <i>et al.</i> , 2006)
MLM03	BY4741 ^{prom} <i>tetO₂:PPZ1</i>	Este trabajo
MLM04	BY4741 ^{prom} <i>tetO₇:PPZ1</i>	Este trabajo
SP010	BY4741 <i>mig1::kanMX4 mig2::kanMX4</i>	(Velázquez <i>et al.</i> , 2020)
SP038	BY4741 <i>mig1::kanMX4</i>	(Velázquez <i>et al.</i> , 2020)
BY4742	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ lys2Δ ura3Δ</i>	(Brachmann <i>et al.</i> , 1998)
Y17334	BY4742 <i>caf20::kanMX4</i>	(Cridge <i>et al.</i> , 2010)
Y17036	BY4742 <i>eap1::kanMX4</i>	(Cridge <i>et al.</i> , 2010)
GP6967	BY4742 <i>caf20::kanMX4 eap1::kanMX4</i>	G. D. Pavitt
DBY746	MAT α <i>ura3-52, leu2-3, leu2-112, his3delta1 trp1-289</i>	David Botstein
JA100	MAT α <i>ura3-52 leu2-3,112 trp1-1 his4 can-1'</i>	(De Nadal <i>et al.</i> , 1998)
KT1112	MAT α <i>ura3-52 leu2 his3</i>	(Stuart <i>et al.</i> , 1994)
W303-1A	MAT α <i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100</i>	Rodney Rothstein
YPH499	MAT α <i>ura3-52, leu2delta1, ade2-101, lys2-801, his3delta200, trp1delta63</i>	(Sikorski and Hieter, 1989)

Tabla A2. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia (5' → 3')
OMLM1	TCATCGTTATAGTCGCTTCTTTTCCCCTAGAGGCTTTGTCCAGCTGAAGCTTCGTACGC
OMLM2	TCCTTTTTTCGAAGATTTTGAACCTGAATTACCCATTTTGAAAATAGGCCACTAGTGGATCTG
OMLM3	CGGGATCCAAAATGGGTAATTCAAGTTCAAAATC
OMLM4	TGCACTGCAGTTACTGTTGAGATTCGTTATCATTG
OMLM7	GGTACCATGGGTAATTCCGG
OMLM8	CTCCTGCAGCGATTGGCTAATTTACG
OMLM9	CGGGATCCAAAATGGCTAATTCAAGTTCAAAATCTTCGAAA
OMLM11	TGACTGCAGTTATTTTTTCTTTCTACCCCCAGC
OCCP1	TGCACTGCAGTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGATACTGTTGAGATTCTTATCATTG
OCCP2	TGCACTGCAGTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGATAGCGATTGGCTAATTACG
HA_GLC7_Fw_BamHI	CGGGATCCATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTGACTCACAACCAAGTTGACG
HA_PPZ2_Fw_KpnI	CTCGGTACCATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTGGTAATTCGGGTTCAAACAAC
PPZ2_Nter_BspEI_Rv	AGTCCGGACATAGTATTAGTCCTAGATCCATTATC
PPZ2_Cter_BspEI_Fw	AGTCCGGAGTCGAAATGAAAAGGAAAAAACC
U1	GATGTCCACGAGGTCTCT
K2	CACGTCAAGACTGTCAAGGA
GAL4_Fw	CGGAGATGACTGCCAGGTGC
GAL4_Rv	TGTCCGAATGGAGGGGCTCAG
GAL4_Comp	CTTCCTCAGTGTCTGGAGCC
GAL11_Fw	GAAGCGGCGAGGCAGCC
GAL11_Rv	GTTACTGGTGACACCGATGC
GAL11_Comp	AGTACCCTCATGCTTTGGCG
PGD1_Fw	CTGTACCTGGACTCGCAGGC
PGD1_Rv	TAGCACCAGCCTTGGCAGC
PGD1_Comp	TAAGCCTTTTACCCTGTGGG
MED2_Fw	GCAGTGTGTGTACGATACCT
MED2_Rv	ATAGTGGATGTACTGCTGCTG
MED2_Comp	GTTCAACGGTGGGAACATGG
BCK2_Fw	TCCGATGGAAAAC TGACGCC
BCK2_Rv	AATGAAGCCAGGTCCATGGC
BCK2_Comp	CATAGCTGATGGAAC TCCGC
RPS6A_Fw_SalI	CACGTGCACTCGAACAATCAGTCCAAC TCAAG
RPS6A_Rv_SacI	CGAGCTCGCTTGGATATTCAGTTGAGG
SWM1_Fw_PstI	ACACTGCAGTCTAGTCTCAACGGCTG
SWM1_Rv_SalI	TTGGTCGACCATCATCATTATG
RPL37A_Fw_BamHI	ACGGATCCACTGTCTGTAGGG
RPL37A_Rv_PstI	GACCTGCAGCTTTCCGGC
NOC2_Fw_PstI	GCACTGCAGCCTCTGGGGACGTAGTTC
NOC2_Rv_SacI	CGAGCTCTAGAGATGGTGGTCTGAGG
YEp13_seq_5'	ATCGACTACGCGATCATGGC
YEp13_seq_3'	GCGATATAGGCGCCAGCAAC