

FACULTAT DE VETERINARIA

UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA

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

Antonio Casamayor Gracia

Setiembre 1992

FACULTAT DE VETERINARIA
UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA

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



Antonio Casamayor Gracia

Setiembre 1992

957222 P.

Memoria presentada por el Licenciado
Antonio Casamayor Gracia para optar al
grado de Doctor en Ciencias.

Esta Tesis ha sido realizada bajo la
dirección del Dr. Joaquín Ariño Carmona en
la Unitat de Veterinària del Departament de
Bioquímica i Biologia Molecular de la U.A.B.

Bellaterra, Setiembre 1992

INDICE

1. <u>INTRODUCCION.</u>	1
1. La fosforilación de proteínas y el control de los procesos celulares.	1
1.1. Proteína quinasas.	1
1.2. Proteína fosfatasas.	2
1.2.1. Proteína tirosina fosfatasas.	2
1.2.2. Proteína serina-treonina fosfatasas.	3
2. Estructura de las serina-treonina fosfatasas.	5
2.1. Proteína fosfatasas de tipo 1.	5
2.1.1. Subunidad catalítica.	6
2.1.2. Otras subunidades.	7
2.1.3. Inhibidores 1 y 2 (I-1, I-2).	8
2.2. Proteína fosfatasas de tipo 2A.	9
2.2.1. Subunidad catalítica.	9
2.2.2. Subunidades reguladoras.	10
2.3. Proteína fosfatasas de tipo 2B (calcineurina).	12
2.4. Proteína fosfatasas de tipo 2C.	13
2.5. Otras proteína fosfatasas.	14
3. Funciones de las proteína fosfatasas.	16
3.1. Metabolismo y contracción muscular.	16
3.2. Metabolismo hepático.	17
3.3. Síntesis de proteínas.	18
3.4. División y ciclo celular.	19
3.5. Regulación de receptores.	20
3.6. Funciones en las plantas.	21
4. Proteína fosfatasas en levadura.	21
4.1. El gen <i>DIS2S1</i> .	23
4.2. El gen <i>SIT4</i> .	23
4.3. Los genes <i>PPH21</i> y <i>PPH22</i> .	25
4.4. El gen <i>PPH3</i> .	26
4.5. Los genes <i>CMP1</i> y <i>CMP2</i> (<i>CNA1</i> y <i>CNA2</i>).	26
4.6. Subunidades reguladoras de las proteína fosfatasas de levadura.	28
2. <u>MATERIALES Y METODOS.</u>	30
1. Material utilizado.	30
2. Soluciones utilizadas comunmente.	31
3. Medios de cultivo utilizados.	32
4. Cepas y medios de cultivo.	33
4.1. Cepas bacterianas.	33
4.2. Cepas de levadura.	34
5. Técnicas de DNA recombinante.	35
5.1. Obtención y manipulación de DNA plasmídico.	35
5.2. Marcaje de sondas.	35
5.3. Análisis de DNA genómico por técnicas de Southern blot.	36
5.4. Análisis de DNA mnonocatenario mediante slot-blot.	37

5.5. Construcción y análisis de una biblioteca de DNA.	37
5.6. Análisis de RNA mediante Northern blot.	38
5.7. Localización cromosómica.	40
5.8. Obtención de los marcadores auxotróficos <i>TRP1</i> y <i>URA3</i> .	40
5.9. Identificación de cepas de levadura portadoras de plásmidos.	41
6. Secuenciación de DNA.	42
6.1. Preparación del DNA de cadena sencilla del fago M13.	42
6.2. Secuenciación del DNA.	42
7. Técnicas inmunológicas.	43
7.1. Expresión de la proteína PPZ1 en <i>E. coli</i> .	43
7.2. Aislamiento del inmunógeno.	44
7.3. Purificación parcial del antisuero.	45
7.4. Western blots.	45
7.4.1. Preparación de extractos.	45
7.4.2. Separación electroforética.	46
7.4.3. Electrotransferencia e inmunodetección de las proteínas.	46
8. Análisis de tétradas.	47
9. Análisis fenotípicos.	47
9.1. Determinación de la actividad glucógeno sintasa.	47
9.1.1. Preparación de extractos celulares.	47
9.1.2. Ensayo de actividad glucógeno sintasa.	48
9.2. Sensibilidad a la feromona factor α .	49
9.3. Sensibilidad al choque térmico.	49
10. Otras técnicas.	49
10.1. Determinación de proteínas totales.	49
10.2. Determinación de glucosa.	49
3. <u>RESULTADOS</u> .	50
1. Amplificación de secuencias genómicas relacionadas con proteína fosfatasas.	50
1.1. Selección de los oligonucleótidos.	50
1.2. Amplificación mediante PCR.	52
1.3. Secuenciación de fragmentos de amplificación.	54
2. Clonación del gen <i>PPZ1</i> .	56
2.1. Localización cromosómica.	56
2.2. Análisis genómico mediante Southern blot y construcción de la biblioteca de DNA.	56
2.3. Análisis de la biblioteca e identificación de los clones positivos.	58
3. Secuenciación del ORF correspondiente a <i>PPZ1</i> .	59
4. Expresión del gen <i>PPZ1</i> .	66
4.1. Niveles de mRNA de <i>PPZ1</i> durante el cultivo.	66
4.2. Obtención de anticuerpos anti- <i>PPZ1</i> .	69
4.2.1. Construcciones realizadas.	69
4.2.2. Análisis de la expresión de <i>PPZ1</i> en bacteria.	70
4.2.3. Obtención del producto de expresión.	70
4.3. Construcción de cepas de levadura que sobre-expresan <i>PPZ1</i> .	72
4.3.1. Expresión en multicopia.	72
4.3.2. Expresión bajo promotor inducible.	74

5. Interrupción del gen <i>PPZ1</i> .	79
5.1. Construcciones utilizadas.	79
5.2. Obtención mutantes por interrupción de <i>ppz1</i> .	81
5.3. Fenotipos estudiados.	83
5.3.1. Sensibilidad al factor α .	83
5.3.2. Sensibilidad al choque térmico.	83
5.3.3. Capacidad de crecimiento en diferentes fuentes de carbono.	84
5.3.4. Acumulación de glucógeno.	84
5.3.5. Ensayo de actividad glucógeno sintasa.	84
6. Evidencias de la existencia de un gen similar a <i>PPZ1</i> .	84
6.1. Amplificación y caracterización de un fragmento del gen <i>PPZ2</i> .	86
6.2. Análisis mediante Southern blot de <i>PPZ2</i> .	89
6.3. Análisis mediante Northern blot del gen <i>PPZ2</i> .	90
6.4. Interrupción del gen <i>PPZ2</i> .	92
4. <u>DISCUSION.</u>	94
5. <u>BIBLIOGRAFIA.</u>	102

ABREVIATURAS

AMPC:	Adenosina 3',5'-monofosfato.
AMPPD:	3-(2'-Espiroadamantano)-4-metoxi-4-(3''-fosforiloxi)-fenil-1,2-dioxetano.
BSA:	Albúmina sérica bovina.
°C:	Grado centígrado.
Bisacrilamida:	N,N-dimetilbisacrilamida.
cpm:	Cuentas por minuto.
Da:	Dalton.
DEAE:	Dietilaminoetilcelulosa.
DTT:	Ditiotreitol.
EDTA:	Etilendiaminotetraacetato.
EGTA:	Etilenebis(oxietilenenitrilo)tetraacetato.
g:	Fuerza centrífuga relativa a la gravedad.
GMPC:	Guanosina 3'-5' monofosfato.
IGF-II:	Factor de crecimiento similar a la insulina-II.
MOPS:	Acido 3-morfolino-propanosulfónico.
MPF:	Factor promotor de la maduración.
mRNA:	RNA mensajero.
NBT:	Sal tetrazólica del nitroazul.
ORF:	Marco abierto de lectura.
p:	Peso
pb:	Pares de bases.
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa.
PMSF:	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
PK-A:	Proteína quinasa dependiente de cAMP.
PK-C:	Proteína quinasa dependiente de calcio.
PP-1:	Proteína fosfatasa de tipo 1.
PP-2:	Proteína fosfatasa de tipo 2.
PVP.:	Polivinil pirrolidona
SDS:	Dodecíl sulfato de sodio.
Tris:	Tris (hidroximetil) aminometano.
tRNA:	RNA de transferencia.
ts:	Sensible a la temperatura.
UDP-glucosa:	Uridina difosfoglucosa.
UV:	Ultravioleta.
V:	Voltios
vol:	Volumen.
X-fosfato:	5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato.

1.- INTRODUCCION.

1. LA FOSFORILACION DE PROTEINAS Y EL CONTROL DE LOS PROCESOS CELULARES.

La fosforilación de proteínas es uno de los principales mecanismos de control postraduccional, regulando gran número de funciones celulares. Aunque los estudios iniciales sobre este tipo de regulación se llevaron a cabo en el metabolismo intermediario de músculo, hígado y tejido adiposo, entre las funciones centrales de la fosforilación de proteínas se incluyen el control de la estructura, forma y movilidad celular, el reconocimiento celular y la respuesta a estímulos externos; el tráfico intracelular y el control de los flujos iónicos, así como la determinación del crecimiento y diferenciación celular. La importancia de este mecanismo de regulación se pone de manifiesto si tenemos en cuenta que de entre los diferentes tipos de proteínas en organismos eucariotas pluricelulares una de cada seis puede ser fosforilada [Goldbeter, A. y Koshland, D.E. (1987)]. Por otra parte, la célula dedica más del 20% de su energía a este tipo de regulación celular [Goldbeter, A. y Koshland, D.E. (1987)]. Para cumplir con su carácter de factor de regulación, la fosforilación de proteínas debe ser rápidamente reversible. El estado de fosforilación de una proteína es el resultado del equilibrio entre las actividades de las proteína quinasas y fosfatasa. Tres son, básicamente, los residuos capaces de ser fosforilados: la serina, la treonina y la tirosina. Aunque, en menor grado, también pueden serlo la lisina y la histidina. En función de los residuos que tienen como sustrato, las proteína quinasas y fosfatasa han sido agrupadas en dos categorías. En una de ellas se incluyen aquellos enzimas que actúan sobre residuos de serina y treonina mientras que en la otra los que lo hacen sobre tirosinas. La fosforilación de proteínas en residuos de serina y treonina está relacionada con el control del metabolismo, la respuesta a estímulos externos, la traducción de proteínas y el crecimiento celular [Walsh, D.A. y col. (1991); Cohen, P (1989); Cyert, M.S. y Thorner, J. (1989); Hershey, J.W.B. y col. (1989)], mientras que la fosforilación en tirosinas parece vinculada a la transducción de señales extracelulares [Tonks, N.K. y col. (1989); Alexander, D.R. (1990)].

1.1. PROTEINA QUINASAS.

Las proteína quinasas comprenden la mayor familia conocida de proteínas, cifrada en la actualidad en al menos 175 miembros [Hanks, S.K. y Quinn, A.M. (1991)]. La existencia de

tan elevado número de quinasas parece reflejar la necesidad de las células de responder a gran cantidad de estímulos ambientales mediante mecanismos reguladores de diversos procesos celulares.

Cada tipo de proteína quinasa es capaz de reconocer su(s) sustrato(s) gracias a la identificación de una secuencia local que rodea al residuo susceptible de ser fosforilado [Kennelly, P.J. y Krebs, E.G. (1991)]. Recientes observaciones parecen indicar la existencia de un grupo de proteína quinasas con capacidad de fosforilar tanto serinas y treoninas como tirosinas [Lindberg, R.A. y col.(1992)].

1.2. PROTEINA FOSFATASAS.

En función de los residuos que desfosforilan, se han establecido dos grandes tipos de fosfatasa. En un grupo se incluyen las tirosinas fosfatasa (PTP), de las que se han descrito dos clases en función de su estructura y localización: transmembrana y citoplasmáticas [revisado en Trowbridge, I.S. (1991) y en Fischer, E.H. y col. (1991)]. Por otra parte, las serina y treonina fosfatasa han sido clasificadas en función de criterios enzimológicos como se verá en el apartado 2 [revisado en Cohen, P. (1989); Cohen, P. y Cohen, P.T.W. (1989)].

1.2.1. PROTEINA TIROSINA FOSFATASAS.

Este tipo de proteína fosfatasa comprende dos familias: la de los enzimas transmembrana y la de los enzimas citosólicos.

El grupo de las proteína tirosina fosfatasa transmembrana, está constituido por proteínas receptoras que presentan un dominio extracelular, una región transmembrana y dos dominios catalíticos internos muy conservados [Kaplan, R. y col. (1990); Mathews, R.J. y col. (1990)]. Las características estructurales de las formas transmembrana sugieren que la actividad tirosina fosfatasa de éstas les confiere capacidad para llevar a cabo la transducción de señales externas. Uno de los receptores mejor conocidos es el antígeno común de leucocitos (CD45). La estructura de esta proteína consiste en una región extracelular, altamente glucosilada, de 400 a 500 residuos, una región transmembrana y un dominio intracelular carboxi-terminal, de unos 700 residuos, relacionado estructuralmente con el de otros miembros de la familia. Este último,

posee dos dominios catalíticos de unos 240 residuos separados por una pequeña región espaciadora. En el segundo dominio catalítico se localiza una región ácida de 19 residuos que contiene múltiples centros potenciales de fosforilación en serinas. La función que se le asigna a CD45, en base a los resultados obtenidos con mutantes de células T citotóxicas y helper, es la de proporcionar una señal positiva necesaria para la proliferación en respuesta al antígeno. También parece esencial en el acoplamiento con el sistema de segundo mensajero de los fosfoinositoles.

En cuanto a la familia de las tirosina fosfatasas citosólicas, se han encontrado múltiples formas de masas comprendidas entre 24 y 104 kDa en diferentes tejidos y líneas celulares [Revisado en Lau, K.-H. W. y col. (1989); Fischer, E.H. y col. (1991)]. Esta familia está compuesta por enzimas que son activas como una única subunidad catalítica en la que se localiza un solo dominio con actividad PTP, que se encuentra en la región amino-terminal. Las regiones carboxi-terminales parece que tienen una función en la determinación de la localización intracelular y en la regulación de la actividad enzimática [Cool, D.E. y col. (1989)]. Una de las funciones de estas proteínas es la de revertir la autofosforilación de los receptores con actividad proteína tirosina quinasa, disminuyendo su actividad quinasa y atenuando la respuesta a los factores de crecimiento u hormonas.

1.2.2. PROTEINA SERINA-TREONINA FOSFATASAS.

El otro grupo de fosfatasas lo forman aquellos enzimas capaces de actuar sobre fosfoserinas y/o fosfotreoninas: son las serina-treonina fosfatasas. A diferencia de lo que ocurre con otros enzimas, estas proteína fosfatasas muestran una especificidad de sustrato *in vitro* amplia y solapada, por lo que para su clasificación ha sido necesario tener en cuenta su sensibilidad a ciertos inhibidores y activadores específicos, dependencia de cationes divalentes, etc. Siguiendo estos criterios, las técnicas de enzimología han permitido identificar cuatro tipos principales de serina y treonina fosfatasas, denominadas tipo 1, 2A, 2B y 2C [Cohen, P. (1989); Cohen, P. y Cohen, P.T.W. (1989); Ingebritsen, T.S. y Cohen, P. (1983a); Ingebritsen, T.S y Cohen, P. (1983b)].

Las proteína fosfatasa de tipo 1 (PP-1) desfosforilan preferentemente la subunidad β de la fosforilasa quinasa y son inhibidas por concentraciones nanomolares de dos pequeñas

proteínas termoestables denominadas inhibidor 1 y 2 (I-1 y I-2). Las proteína fosfatasas de tipo 2 (PP-2) desfosforilan preferentemente la subunidad α de la fosforilasa quinasa y su actividad no es afectada por los citados inhibidores.

Las PP-2, a su vez, comprenden tres tipos de actividad enzimática, que pueden diferenciarse por sus requerimientos de cationes divalentes. Así, mientras la PP-2A es activa en ausencia de éstos (como la PP-1), los tipos PP-2B y PP-2C son dependientes de Ca^{2+} y de Mg^{2+} respectivamente. La PP-2B, además, es activada por la calmodulina.

Posteriormente se describieron nuevos procedimientos a la hora de identificar estas enzimas [Cohen, P. y col. (1989a); Cohen, P. y col. (1990)]. Uno de ellos se basa en la concentración de ácido okadaico que se necesita para inhibir su actividad [Takai, A. y col. (1987); Bialojan, C. y Takai, A. (1988)]. Esta molécula es un potente promotor de tumores, aislado inicialmente de la esponja marina *Halichondria okadaei* [Tachibana, K. y col. (1981)], que inhibe completamente la actividad de la PP-2A a concentraciones de 1 nM. También inhibe la actividad PP-1, pero a mayores concentraciones. La PP-2B es mucho menos sensible y la PP-2C es insensible a esta toxina. La toxina hepática microcistina-LR es también utilizada como criterio para diferenciar los diversos tipos de proteína fosfatasas. Este heptapéptido cíclico, aislado de ciertas especies de cianobacterias, es un potente inhibidor de la actividad PP-2A ($\text{IC}_{50}=0,04$ nM). La PP-1 es también sensible a esta toxina pero requiere mayores concentraciones que en el caso de la PP-2A para lograr la misma inactivación ($\text{IC}_{50}=1,7$ nM). La PP-2B es unas 1.000 veces menos sensible y la PP-2C es insensible a la microcistina-LR [Honkanen, R.E. y col. (1990); Da Cruz e Silva, E.F. y Cohen, P.T.W. (1989)]. Las características generales de las serina-treonina fosfatasas se recogen en la tabla I.

Los procedimientos descritos para clasificar las proteína fosfatasas son aplicables a enzimas pertenecientes a organismos tan diversos como mamíferos, *Drosophila* [Orgad, S. y col. (1987)], estrella de mar [Pondaven, P. y Cohen, P. (1987)], plantas superiores [MacKintosh, C. y Cohen, P. (1989)], levaduras [Cohen, P. y col. (1989b)], etc. El hecho de que, en especies tan diversas, sea válida la clasificación descrita se comprende si tenemos en cuenta la existencia de unos rasgos estructurales comunes, como se verá a continuación.

Los procedimientos descritos para clasificar las proteína fosfatasas son aplicables a enzimas pertenecientes a organismos tan diversos como mamíferos, *Drosophila* [Orgad, S. y col. (1987)], estrella de mar [Pondaven, P. y Cohen, P. (1987)], plantas superiores [MacKintosh, C. y Cohen, P. (1989)], levaduras [Cohen, P. y col. (1989b)], etc. El hecho de que, en especies tan diversas, sea válida la clasificación descrita se comprende si tenemos en cuenta la existencia de unos rasgos estructurales comunes, como se verá a continuación.

TABLA I. CARACTERISTICAS DE LAS DIFERENTES PROTEINA FOSFATASAS.

	PP-1	PP2A	PP-2B	PP-2C
Subunidad de la fosforilasa quinasa que defosforila	β	α	α	α
Sensibilidad al I-1 y I-2	SI	NO	NO	NO
Inhibición por ac. okadaiko, IC_{50} (nM)	10	<1	≈ 10000	--
Inhibición por microcistina-LR, IC_{50} (nM)	1,7	0,04	≈ 1000	--
Inhibición por heparina	SI	NO	NO	NO
Activación por poliaminas/policationes	NO	SI	NO	NO
Dependencia de cationes divalentes	NO	NO	Ca^{2+}	Mg^{2+}

2. ESTRUCTURA DE LAS PROTEINA FOSFATASAS.

2.1. PROTEINA FOSFATASAS DE TIPO 1.

Se han caracterizado diversas formas de PP1. Todas ellas contienen una subunidad catalítica (PP1c), indistinguible en cuanto a sus propiedades enzimológicas, difiriendo en los componentes reguladores a los que se asocia. Estos últimos determinan su especificidad de sustrato y localización celular.

2.1.1. SUBUNIDAD CATALITICA.

La subunidad catalítica de la PP-1 (PP-1c) es una proteína con una estructura primaria muy bien conservada, que a la vez presenta varios isotipos. Se han aislado dos clones completos que codifican la subunidad catalítica de la PP-1, en una biblioteca de músculo de conejo. Uno de ellos, denominado PP-1 α , codifica una proteína de 37,5 kDa. [Cohen, P.T.W. (1988a); Bai, G.-E. y col. (1988)] mientras que el segundo (PP-1 β) codifica una proteína de 37,3 kDa. [Dombrádi, V. y col. (1990a)]. Los mismos isotipos se han encontrado en ratón [Ohkura, H. (1990)] y en *Drosophila* [Dombrádi, V. y col. (1990b)]. Los isotipos α y β presentan una serie de variaciones en aminoácidos concretos que se repiten en las diferentes especies. Posteriormente se han identificado, mediante secuenciación de sus cDNA, proteínas muy relacionadas con las PP-1c descritas, tanto en *Drosophila* (2 isotipos) [Dombrádi, V. y col. 1990a)], como en rata, en la que se han aislado 4 tipos de cDNA (PP-1 α , PP-1 τ 2, PP-1 σ y PP-1 τ 1). Las secuencias aminoacídicas codificadas por los tres primeros son idénticas a la PP-1 α de conejo. Los dos clones de cDNA PP-1 τ 1 y PP-1 τ 2 son producto de un diferente procesamiento del transcrito primario [Sasaki, K. y col.(1990)]. Se han descubierto también otras isoformas de la PP-1 en *Drosophila*, pero todavía no ha sido aclarado a que isotipo corresponden [Axton, J.M. y col. (1990)].

Mediante técnicas de PCR se ha demostrado la expresión de diversas formas de PP-1 en dos diferentes líneas celulares [Wadzinski, B.E. y col. (1990)]. De los 3 fragmentos amplificados, las secuencias aminoacídicas deducidas de los denominados PP-1a y PP-1d son idénticas dos de las secuencias identificadas por Sasaki y col. (PP-1 σ y PP-1 α respectivamente), mientras que tanto PP-1 τ 1 como PP-1 τ 2 contienen la secuencia deducida del fragmento PP-1b amplificado por Wadzinski y col.

La estructura de las PP-1 es muy conservada, como lo demuestra el hecho de que las secuencias deducida de *Drosophila* tienen un 92% de identidad con la PP-1 α de músculo esquelético de conejo. Además, el gen *bimG* de *Aspergillus nidulans* codifica una proteína que posee una identidad del 86% con la subunidad catalítica de la PP-1 de mamífero, con la cual es intercambiable funcionalmente [Referencia]. En *Schizosaccharomyces pombe* y *Saccharomyces cerevisiae* también se han encontrado genes que codifican proteínas altamente homólogas a la

PP-1 de mamífero, como se verá más adelante [Ohkura, H. y col. (1989)].

2.1.2. OTRAS SUBUNIDADES.

El 50% de la actividad PP-1 en músculo esquelético se encuentra asociada con las partículas de glucógeno [Ingebritsen, T.S. y col. (1983c)]. Esta actividad, denominada PP-1G, es un complejo 1:1 entre PP-1c y una subunidad G de 161 kDa altamente asimétrica que se asocia al glucógeno [Stralfors, P. y col. (1985); Hubbard, M.J. y Cohen, P. (1989a); Hubbard, M.J. y Cohen, P. (1989b)]. Esta subunidad, aún no bien caracterizada en el hígado, puede ser responsable de limitar la especificidad de sustrato de la PP-1c.

La subunidad G acompañada con PP-1c es fosforilada por la proteína quinasa dependiente de AMPc (PK-A) dando como resultado la liberación de PP-1c del glucógeno [Hiraga, A. y Cohen, P. (1986)]. La fosforilación de la subunidad G se encuentra regulada *in vivo* por hormonas, como la adrenalina, que causa la liberación del 50% de la actividad PP-1 asociada al glucógeno, mientras que la subunidad G permanece unida al polisacárido [MacKintosh, C. y col. (1988)]. Estudios *in vitro* han demostrado la existencia de dos serinas susceptibles de fosforilación por la PK-A (centro 1 y centro 2) [Hubbard, M.J. y Cohen, P. (1989c); Caudwell, F.B. y col. (1986)]. En las proximidades del centro 1 se localizan otras dos serinas sustrato de la GSK-3. Antes de la fosforilación del centro 1 por la PK-A es esencial la previa fosforilación de las dos serinas citadas por la GSK-3 [Dent, P. y col. (1989)]. La disociación de la PP-1c de la subunidad G se correlaciona con la fosforilación del centro 2, y no con la del 1, mientras que la reasociación es promovida por la PP-2A en condiciones que desfosforila el centro 2 y no el 1 [Hubbard, M.J. y Cohen, P. (1989c)]. Sin embargo, la fosforilación del centro 1 por una proteína quinasa presente en el músculo esquelético y estimulada por la insulina incrementa la desfosforilación de la glucógeno sintasa y fosforilasa quinasa por la PP-1G [Dent, P. y col. (1990)].

La PP-1G hepática puede sufrir la translocación desde las partículas de glucógeno al citosol por un mecanismo dependiente de hormonas similar al descrito para el músculo esquelético [Toth, B. y col. (1988)].

Se denomina PP-1M a la actividad PP-1 asociada con miofibrillas del músculo

esquelético. El enzima nativo se une específicamente a la actinmiosina purificada [Chisholm, A.A.K. y Cohen, P. (1988b)] y posee una masa molecular aparente de 150 kDa (deducida mediante cromatografía de filtración en gel). Posee alta especificidad por la subunidad β de la fosforilasa quinasa y no contiene el I-2, al cual es insensible. Los resultados obtenidos hasta ahora parecen indicar que la PP-1c interacciona con una subunidad M de 58 kDa, la cual previene la inhibición por el I-2 [Pato, M.D. y col. (1985)]. La subunidad M aumentaría la actividad miosina fosfatasa de la subunidad catalítica.

2.1.3. INHIBIDORES 1 Y 2 (I-1, I-2).

Huang y Glinsmann (1976) identificaron el I-1 y el I-2 como dos proteínas inhibidoras de la actividad fosfatasa en músculo esquelético de conejo.

La masa molecular deducida del I-1 es de 18,7 kDa, mientras que la del I-2 es de 22,8 kDa. Ambas proteínas presentan escasa estructura secundaria, lo que las hace insensibles al calor, al pH ácido, a solventes orgánicos y a detergentes [Nimmo, G.A. y Cohen, P. (1978)]. A pesar de estas características comunes, no existe identidad significativa entre la secuencia primaria del I-1 y del I-2.

La estructura del I-1 podría estar muy conservada como se ha sugerido recientemente a raíz de la clonación de su cDNA a partir de una biblioteca de músculo esquelético de rata [Elbrecht, A. y col. (1990)] y de su comparación con la secuencia primaria de la proteína purificada de músculo esquelético de conejo [Aitken, A. y col. (1982)]. De los 172 residuos que posee el I-1 de músculo esquelético de rata, la identidad con la correspondiente proteína de conejo es completa entre el 3 y el 62. Esto sugiere que el dominio amino-terminal es el que posee una función más importante en la actividad inhibidora como también se ha demostrado mediante proteólisis química y enzimática [Aitken, A. y Cohen, P. (1982)]. El I-1 sólo es efectivo cuando es fosforilado por la PK-A en la Thr-35, ($K_i = 1,6$ nM) constituyendo el único sustrato fisiológico conocido en que la PK-A fosforila un residuo de Thr. En presencia de concentraciones fisiológicas de Ca^{2+} , la PP-2B es la principal I-1 fosfatasa en extractos tisulares [Ingebritsen, T.S. y col. (1983c)].

La activación de la PK-A da como resultado, como se ha visto anteriormente, tanto la

fosforilación de la subunidad G como la del I-1. La primera provoca la translocación de la PP-1c activa desde el glucógeno al citosol, haciéndola más sensible al I-1, el cual es a su vez activado. Como consecuencia, los efectos combinados de la translocación e inhibición coinciden en producir un incremento en el estado de fosforilación de las proteínas sustrato asociadas al glucógeno.

Se ha encontrado una forma citosólica de la PP-1 formada por un complejo 1:1 entre PP-1c y el I-2. El I-2 puede ser modificado por fosforilación. La CK-II fosforila tres residuos de serina del I-2 (Ser-86, Ser-120 y Ser-121) sin afectar su capacidad de inhibir a la PP-1 [Holmes, C.F. y col. (1987)]. Una forma de alta masa molecular de la PP-2A desfosforila estos residuos [Agostinis, P. y col. (1986)]. La acción de la CK-II facilita la fosforilación posterior de la Thr-72 del I-2 por parte de la GSK-3, dando como resultado la inactivación del citado inhibidor [DePaoli Roach, A.A. (1984); Tung, H.Y.L. y col. (1984a)].

2.2. PROTEINA FOSFATASAS DE TIPO 2A.

Los estudios bioquímicos han mostrado que la PP-2A de mamíferos está constituida por una subunidad catalítica (PP-2Ac), asociada a otras subunidades adicionales, denominadas genéricamente reguladoras.

2.2.1. SUBUNIDAD CATALITICA.

La subunidad catalítica de la PP-2A (PP-2Ac) purificada de músculo esquelético de conejo muestra una masa molecular de 36 kDa [Tung, H.Y. y col. (1984)], y aún siendo diferente de la PP-1, sus secuencias se encuentran relacionadas [Johnson, G.L. y col. (1987)].

Se han aislado dos cDNA que codifican dos isoformas (PP-2A α y PP-2A β) de la subunidad catalítica de la PP-2A de músculo esquelético de conejo [Da Cruz e Silva, O.B. y Cohen, P.T.W. (1987); Da Cruz e Silva, O.B. y col. (1987)]. Los dos clones codifican una proteína de 309 residuos y de 35,6 kDa. El grado de identidad de la secuencia de aminoácidos entre ambos es del 97%, y del 82% la de nucleótidos en la región codificante. Estos dos isotipos se han encontrado en múltiples especies [Stone, S.R. y col. (1987); Ariño, J. y col. (1988); Kitagawa, Y. y col (1988a); Kitagawa, Y. y col (1988b); Posas, F y Ariño, J. (1989a); Posas, F.

y Ariño, J. (1989b)]. En todas ellas se observa una gran conservación de la estructura de la proteína, como lo demuestra el hecho de que la PP-2A α de hígado humano tiene la misma secuencia de aminoácidos que la correspondiente proteína de conejo, mientras que entre las PP-2A β hay un único residuo diferente.

El laboratorio de Hemmings ha clonado los genes que codifican los dos isotipos de la PP-2A humana [Khew-Goodall, Y. y col. (1991)] evidenciando que ambos genes se encuentran organizados en siete exones, siendo en el primero donde se localizan siete de las ocho diferencias aminoacídicas entre las dos proteínas. Ninguno de los dos promotores contiene cajas TATA ni CCAAT, pero el del isotipo α posee una secuencia que es idéntica a la secuencia consenso del elemento de respuesta al AMPc y que está ausente en el promotor del isotipo β . También se ha clonado la región promotora del gen de PP-2A α de rata, en la que tampoco se han encontrado las dos cajas mencionadas, lo que hace sugerir que se trate de un gen cuya expresión no sea objeto de regulación [Kitagawa, Y. y col. (1991)].

El mRNA que hibrida con los cDNA de las PP-2A α y β es de 2,0 Kb, aunque se ha detectado en diversos tejidos de rata una especie de mRNA minoritario de 2,8 Kb que también hibrida en condiciones de alta selectividad con la sonda de PP-2A α [Da Cruz e Silva, O.B. y col. (1987), y Kitagawa, Y. y col. (1988b)].

El mRNA de la PP-2A α es, en general, más abundante que el de la PP-2A β , llegando en algunos tejidos de mamífero hasta una relación de 10:1. Ambos se expresan en mayor cantidad en cerebro y corazón que en el resto de órganos [Khew-Goodall, Y. y col. (1988)]. La expresión de los dos isotipos se incrementa en el caso de tumores hepáticos, aunque este aumento es más notable en el caso del isotipo β de la PP-2A [Kitagawa, Y. y col. (1988a)].

2.2.2. SUBUNIDADES REGULADORAS.

Se han identificado diferentes formas oligoméricas de la PP-2A con una masa molecular que varía entre 87 y 260 kDa [Revisado en Shenolikar, S. y Nairn, A.C. (1991) y en Mayer, R.E. y col. (1991b)]. Todas las preparaciones de PP-2A contienen la subunidad catalítica (PP-2Ac o C) con una masa molecular aparente de 35 a 40 kDa dependiendo del tejido y especie. Así, en la forma PP-2A $_2$, se ha identificado también una subunidad A, cuya masa molecular se encuentra

comprendida entre 60 y 70 kDa. La clase PP-2A₁ contiene, además, la subunidad B, de 55 kDa. En la clase PP-2A₀ la subunidad B' de 54 kDa sustituye a la B. Las subunidades B y B' son diferentes a juzgar por sus mapas peptídicos [Tung, H.Y. y col. (1985); Ingebritsen, T.S. y col. (1983b)].

Se han identificado dos nuevas clases de PP-2A, las cuales contienen una nueva subunidad reguladora de 74 kDa denominada B". Los dos holoenzimas parecen diferentes según se desprende de la sensibilidad de sus actividades a policonaciones y a proteasas dependientes de Ca²⁺ [Usui, H. y col. (1988); Waelkens, E. y col. (1987)].

PP2A* Holoenzyme	Subunits*			
	C36	PR65	PR55	PR72
2A ₂ PCS _L				
2A ₁ PCS _{H1}				
2A ₀				
2A ₃ PCS _M				

Una cuestión importante acerca de la estructura de las diversas formas hace referencia al número de subunidades PP-2Ac presentes en cada holoenzima. Mientras que el laboratorio de Cohen ha sugerido que PP-2A₀ y PP-2A₁ contienen dos subunidades PP-2Ac [Tung, H.Y. y col. (1985)], de los resultados de otros investigadores parece deducirse la presencia de una única subunidad catalítica [Waelkens, E. y col. (1987); Usui, H. y col. (1988); Mumby, M.C. y col. (1987)].

El papel de las subunidades reguladoras de la PP-2A es aún desconocido. Sin embargo, experimentos de disociación y reasociación parecen indicar que puedan alterar la especificidad de sustrato de la PP-2A [Imaoka, T. y col. (1983); Tsuiki, S. y col. (1985)]. Experimentos similares han evidenciado que las formas "nativas" de la PP-2A son activadas mediante la disociación de PP-2Ac, indicando que las subunidades reguladoras reducen la actividad enzimática [Chen, S. C. y col. (1989); Di Salvo, J. y col. (1985); Pato, M.D. y Kerc, E. (1985); Kamibayashi, C. y col. (1991)].

El conjunto de datos disponibles hace pensar que las subunidades B, B' y B" tienen diferentes efectos sobre la actividad del complejo AC (PP-2A₂). La asociación de PP-2A₂ con el antígeno t pequeño del virus SV40 también altera la actividad catalítica de PP-2A, indicando que este antígeno funciona de manera análoga a las subunidades B [Yang, S.I., y col. (1991)].

Actualmente ya se han clonado los cDNA de las subunidades de 55, 65 y 72 kDa. En todos los casos, se ha encontrado al menos dos genes que codifican cada subunidad (α y β) [Mayer, R.E. y col (1991a); Hemmings, B. A. y col. (1990)] . Parece, además, que hay mecanismos de control específicos de tejido que regulan la expresión de las diferentes subunidades [Mayer, R.E. y col. (1991a)].

2.3. PROTEINA FOSFATASAS DE TIPO 2B (CALCINEURINA).

La actividad de esta proteína fosfatasa es dependiente de calcio y es estimulada por calmodulina. En el cerebro constituye hasta el 1% de la proteína total, siendo mucho menos abundante en otros tejidos. La PP-2B de este órgano es un heterodímero compuesto de una subunidad A de 61 kDa y una subunidad B de 18-19 kDa. En otros tejidos los pesos moleculares son similares. La subunidad A une calmodulina y contiene el centro catalítico, mientras que la subunidad B es una proteína que une Ca²⁺. La actividad de la proteína es dependiente de la interacción con el complejo Ca²⁺-calmodulina, el cual se une cerca de un dominio inhibitorio en el extremo carboxi-terminal de la subunidad A. Entre los pocos sustratos conocidos de esta fosfatasa se encuentra el I-1, al cual es capaz de inactivar [Ingebritsen, T.S. y Cohen, P. (1983a)].

A partir de la clonación del cDNA correspondiente a la subunidad catalítica de la PP-2B de cerebro de rata, se ha deducido que ésta tiene una masa molecular de 58,6 kDa [Ito, A. y

col. (1989)]. Los estudios posteriores utilizando bibliotecas de cDNA humanas han revelado que existen al menos dos genes que codifican la subunidad catalítica de la PP-2B, los cuales se encuentran muy conservados en otros mamíferos estudiados: *PP-2B α* [Kincaid, R.L. y col. (1988); Ito, A. y col. (1989); Kincaid, R.L. y col. (1990)] y *PP-2B β* [Guerini, D. y Klee, C.B. (1989); Kuno, T. y col. (1989); McPartlin, A.E. y col. (1991)]. La *PP-2B β* posee una masa molecular ligeramente mayor que la de la *PP-2B α* (59,0 frente a 58,6 kDa). Con la excepción del extremo amino-terminal (donde la *PP-2B β* posee un elevado número de residuos de prolina) y de dos regiones cercanas al extremo carboxi-terminal en las que se localizan múltiples sustituciones de aminoácidos, las dos isoformas poseen un alto grado de identidad. De cada uno de los dos genes se han clonado diferentes cDNA, que parecen ser consecuencia de procesamientos alternativos del mRNA. En humanos se conocen los siguientes isotipos: *PP-2B α_1* , *PP-2B α_2* [Kincaid, R.L. y col. (1990)], *PP-2B β_1* , *PP-2B β_2* [Guerini, D. y Klee, C.B. (1989)] y *PP-2B β_3* [McPartlin, A.E. y col. (1991)].

Se ha identificado en una misma línea celular mediante técnicas de PCR, la presencia de tres cDNA diferentes de PP-2B [Wadzinski, B.E. y col. (1990)]. La secuencia aminoacídica parcial que es codificada por uno de ellos (el denominado PP-2Bb) es idéntica a la secuencia de la *PP-2B β_3* humana, mientras que la denominada PP-2Ba se corresponde con la *PP-2B α_1* de rata [Ito, A. y col. (1989)]. Por el contrario, la secuencia codificada en el tercer fragmento amplificado no coincide exactamente con ninguna de las publicadas, aunque presenta algunas de las características propias de las *PP-2B β* .

La PP-2B de mamífero es fosforilada *in vitro* por la PK-C y por la proteína quinasa estimulada por calmodulina de tipo II en un residuo situado en el dominio de unión a la calmodulina (Ser-411), resultando en un incremento de dos veces en la K_M para la cadena ligera de miosina [Hashimoto, Y. y col. (1988); Hashimoto, Y. y col. (1989)].

2.4. PROTEINA FOSFATASAS DE TIPO 2C.

Es una proteína monomérica de 43 kDa de masa molecular. Se han aislado dos formas de PP-2C en músculo esquelético de conejo, denominadas *PP2-C $_1$* y *PP-2C $_2$* [McGowan, C. y col. (1987)] que migran como proteínas de 44 y 42 kDa, respectivamente. No se han encontrado diferencias entre las propiedades enzimológicas de ambas formas. La PP-2C requiere

concentraciones de Mg^{2+} de 10-20 mM para conseguir su máxima actividad, aunque el enzima puede ser también activado por Mn^{2+} . La clonación del cDNA de riñón de rata de esta proteína ha permitido comprobar que su estructura primaria no está relacionada con la de las subunidades catalíticas de la PP-1, PP-2A o PP-2B [Tamura, S. y col (1989)].

El análisis de la estructura primaria de las subunidades catalíticas de los cuatro tipos principales de proteína fosfatasas indica una semejanza estructural sustancial entre PP-1, PP-2A y PP-2B. En la tabla II se especifica el grado de identidad que existe entre las regiones indicadas de cada proteína.

TABLA II. CARACTERISTICAS DE LAS DIFERENTES PROTEINA FOSFATASAS.

	<i>PP-2A</i> (Residuos del 23 al 292)	<i>PP-2B</i> (Residuos del 1 al 111)
<i>PP-1</i>	<i>I=50%</i> <i>C=67%</i>	<i>I=32%</i> <i>C=51%</i> (Residuos del 189 al 300 de PP-1)
<i>PP-2A</i>		<i>I=35%</i> <i>C=45%</i> (Residuos del 183 al 294 de PP-2A)

I: Identidad entre los residuos comparados.

C: Identidad teniendo en cuenta los cambios conservativos.

2.5. OTRAS PROTEINA FOSFATASAS

Recientemente se ha purificado y caracterizado una proteína fosfatasa a partir de un homogenado de cerebro bovino, denominándose PP-3 [Honkanen, R.E. y col. (1991)]. Su subunidad catalítica presenta una masa molecular de 36 kDa. y los estudios sobre su actividad

sugieren que se trata de un nuevo tipo de proteína fosfatasa. A diferencia de la PP-1, es estimulada en lugar de inhibida por concentraciones picomolares de I-2. Pero no se trata de una PP-2A, pues desfosforila preferentemente la subunidad β de la fosforilasa quinasa. Por último, tampoco se trata de una PP-2B o PP-2C puesto que no requiere la presencia de cationes divalentes para ejercer su actividad. Además de esto, la actividad PP-3 es inhibida por el ácido okadaico ($IC_{50} = 5 \text{ nM}$).

Por otra parte, el análisis de bibliotecas de cDNA de mamíferos y de *Drosophila* ha demostrado que existen otras proteínas estrechamente relacionadas desde el punto de vista estructural con las fosfatasas de tipo 1 (PPY) [Cohen, P.T.W. y col. (1990); Dombrádi, V. y col. (1989)] o 2A (PPX y PPV) [Dombrádi, V. y col (1989); Da Cruz e Silva, O.B. y col. (1988)] que aparentemente no han sido caracterizadas aún mediante técnicas enzimológicas. Así, la secuencia deducida para la PPX, obtenida a partir de una biblioteca de hígado de conejo, es 49% idéntica a la de la PP-1 y 69% idéntica a la de la PP-2A [Da Cruz e Silva, O.B. y col. (1988)]. El mismo laboratorio clonó a partir de una biblioteca de *Drosophila* un cDNA que codifica una presunta fosfatasa denominada PPY [Dombrádi, V. y col. (1989)]. La secuencia de PPY posee una identidad del 66% con la de la PP-1, y del 44% con la de la PP-2A. De la misma biblioteca aislaron también un cDNA, posiblemente incompleto, denominado PPV, más similar a la PP-2A que a la PP-1 (57% frente al 45% de identidad).

Recientemente se ha clonado el gen de *Drosophila rdgC*, cuyo producto posee un 30% de identidad con las subunidades catalíticas de las PP-1, 2A y 2B entre los residuos 153 y 353. La proteína rdgC posee en su extremo carboxi-terminal diversos dominios potenciales de unión de Ca^{2+} [Steele, F.R. y col. (1992)].

Los datos precedentes indican la existencia de un alto grado de conservación estructural entre las proteína fosfatasas, que no tiene lugar sólo entre diferentes especies animales, sino que también se extiende al reino vegetal. En este sentido hay que destacar la caracterización de dos clones parciales de cDNA de *Brassica napus* que codifican proteínas cuyas secuencias poseen una identidad del 72% y 79% con la PP-1 y PP-2A respectivamente [MacKintosh, R.W. y col. (1990)]. Asimismo, también se ha clonado recientemente un cDNA de *Arabidopsis thaliana* (PP1-At) cuya secuencia aminoacídica deducida tiene un 62% de identidad con la proteína homóloga de mamífero y levadura. En este caso se ha demostrado que la identidad no se

produce únicamente a nivel de estructura primaria, sino también a nivel funcional, puesto que la proteína codificada por PP1-At es capaz de revertir el fenotipo producido por una mutación en el gen homólogo de *S. pombe* [Nitschke, N. y col. (1992)].

El alto grado de conservación de esta familia de proteínas se pone de manifiesto en el caso del orf 221 del bacteriofago lambda gt10. La proteína en él codificada y responsable de la actividad fosfatasa dependiente de Mn^{2+} detectada sobre la caseína, está formada por 221 residuos y es homóloga a la deducida del cistron *nin* del fago $\phi 80$ [Kroger, M. y Hoborn, G. (1982)]. Las mitades amino-terminales de estas proteínas tienen un 35% de identidad con la PP1 o PP-2A [Cohen, P.T.W. y Cohen, P. (1989)].

3. FUNCIONES DE LAS PROTEINA FOSFATASAS.

3.1. METABOLISMO Y CONTRACCION MUSCULAR.

El control hormonal y neuronal sobre el metabolismo del glucógeno se encuentra mediado directamente por cambios en los estados de fosforilación de la glucógeno fosforilasa, fosforilasa quinasa y glucógeno sintasa. La fosforilación activa los enzimas glucogenolíticos, mientras que la glucógeno sintasa es inactivada cuando es fosforilada.

La PP-1 y la PP-2A son los únicos enzimas en el músculo esquelético con una actividad significativa sobre la glucógeno fosforilasa y sintasa [Tung, H.Y.L. y Cohen, P. (1984); Alemany, S. y col. (1984)]. A pH neutro y concentraciones fisiológicas de Mg^{2+} , la PP-1 posee el 85-90% de la actividad fosforilasa fosfatasa, el 60-75% de la glucógeno sintasa fosfatasa y más del 95% de la actividad fosforilasa quinasa fosfatasa.

En el músculo en reposo (ausencia de calcio), la PP-2A es el principal enzima que actúa sobre la subunidad α de la fosforilasa quinasa, la cual incrementa su actividad dos veces como consecuencia de su fosforilación. Asimismo, en estas condiciones, la PP-2A es la única I-1 fosfatasa, pudiendo controlar el metabolismo del glucógeno mediante la estimulación de la PP-1.

Se han obtenido evidencias que indican que la PP-1M es el enzima que desfosforila la cadena ligera de miosina en músculo esquelético y cardiaco [Chisholm, A.A.K. y Cohen, P. (1988a); Chisholm, A.A.K. y Cohen, P. (1988b)]. La PP-1M cuenta con el 60% de la actividad

fosfatasa hacia la miosina nativa en músculo esquelético (el resto de la actividad es ejercida por PP-1G), mientras que en músculo cardiaco bovino, donde PP-1G está ausente, alcanza el 90% de la actividad. En este último tipo muscular la PP-2A puede ser responsable de la actividad miosina fosfatasa restante [Mumby, M.C. y col. (1987)].

Aunque la PP-1M es la principal fosfatasa *in vivo*, la PP-2A puede tener un papel en la regulación de la contracción muscular. Así, la PP-2A desfosforila eficazmente *in vitro* la proteína quinasa de la cadena ligera de la miosina de músculo liso, la cual es fosforilada por la PK-A reduciendo su afinidad por la calmodulina [Yoshida, M. y Yagi, K. (1986)].

3.2. METABOLISMO HEPATICO.

En el hígado, tanto la PP-1 como la PP-2A desfosforilan la glucógeno sintasa y la glucógeno fosforilasa [Ingebritsen, T.S. y Cohen, P. (1983a); Ingebritsen, T.S. y col. (1983b)]. Aunque no se conocen bien los mecanismos de control de estas fosfatasas, en el caso de la PP-1, las proteínas I-1 e I-2 podrían jugar un importante papel. Las PP-2A pueden, en cambio, ser activadas por compuestos básicos como la histona H1, polilisina o poliaminas [Di Salvo, J. y col. (1983)], pero se duda que este tipo de regulación pueda tener lugar *in vivo*, apuntándose la hipótesis de que más bien serían compuestos que actuarían imitando algún regulador todavía desconocido.

La hidroximetilglutaril CoA (HMG-CoA) reductasa, el enzima clave en la síntesis de colesterol, es inactivado por una proteína quinasa dependiente de AMP (AMP-PK) [Ferrer, A. y col. (1987a); Ferrer, A. y col. (1987b)], la cual se activa a su vez mediante fosforilación [Ingebritsen, T.S. y col. (1981); Carling, D. y col. (1987)]. En este caso, la PP-1, PP-2A y, sobre todo PP-2C, son responsables, en extractos de hígado de rata, de toda la actividad tanto HMG-CoA reductasa fosfatasa como AMP-PK fosfatasa [Ingebritsen, T.S. y col. (1983c); Ingebritsen, T.S. y Cohen, P. (1983a)].

La estimulación de los enzimas que catalizan la glucólisis y síntesis de ácidos grasos, así como la inhibición de los que intervienen en la gluconeogénesis y en la degradación de aminoácidos aromáticos, en extractos de hígado de rata y conejo tiene lugar mediante la PP-1, PP-2C y, principalmente, por la PP-2A [Ingebritsen, T.S. y col. (1983c); Ingebritsen, T.S. y col.

(1983a); Alemany, S. y col. (1984); Pelech, S. y col. (1984)].

No deja de ser interesante la existencia de una proteína de 20 kDa que es capaz de inhibir la actividad PP-2A hepática cuando se utiliza como sustrato hidroximetilglutaril-CoA reductasa pero no cuando se emplea la fosforilasa α [Serra, D. y col. (1989)].

3.3. SINTESIS DE PROTEINAS.

La fosforilación de proteínas también es utilizada por la célula para regular los procesos de traducción, ya sea a nivel de iniciación o de elongación [revisado en Hershey, J.W.B. (1989)].

La principal proteína de la subunidad ribosomal 40S, la proteína S6, puede ser fosforilada en múltiples centros en respuesta a la insulina y otros factores de crecimiento que estimulan la síntesis proteica. La proteína quinasa de S6 es activada a su vez por fosforilación [Ballou, L.M. y col. (1988); Jenó, P. y col. (1988)]. Toda una serie de hechos parecen indicar que la PP-1 se encuentra implicada en la desfosforilación de S6 en oocitos de *Xenopus*, lisado de reticulocito de conejo y músculo esquelético de conejo [Andres, J.L. y col. (1987); Olivier, A.R. y col. (1988); Foulkes, J.G. y col. (1983)]. Sin embargo, la PP-2A posee la principal actividad S6 quinasa fosfatasa en las células de rata 3T3 (Ballou, L.M. y col. (1987); Jenó, P. y col. (1988)]. La maduración de los oocitos inducida por la actividad quinasa del oncogen pp60^{v-src} puede ser debida a la fosforilación, que se ha detectado *in vitro*, de la PP-1, lo cual provoca una disminución de la desfosforilación de S6.

Por otra parte, la subunidad α del factor de iniciación eIF-2 es desfosforilada *in vitro* en una única serina tanto por la PP-1 como por la PP-2A, pero no por la PP-2C (Stewart, A.A. y col. (1980); Ingebritsen, T.S. y Cohen, P. (1983a)]. La fosforilación de eIF-2 y consiguiente inhibición de la síntesis proteica es llevada a cabo por una proteína quinasa, cuya síntesis es regulada por interferón. La quinasa de la subunidad α del eIF-2 es inhibida por la proteína quinasa dependiente de RNA de doble cadena (dsRNA-PK), la cual se activa mediante autofosforilación [revisado en Pain, V.M. (1986)]. La desfosforilación e inactivación de la dsRNA-PK es catalizada, *in vitro*, tanto por la PP-1 [Szyszka, R. y col. (1989)] como por la PP-2A [Ernst, V. y col. (1982)].

3.4. DIVISION Y CICLO CELULAR.

Durante la mitosis, se produce una hiperfosforilación de las láminas nucleares [Gerace, L. y Blobel, G. (1980)], que se ha asociado con la rotura de la membrana del núcleo [Miake-Lye, R. y Kirschner, M. (1985)]. La desfosforilación de estas proteínas es esencial para la formación de la nueva membrana, al final de la mitosis [Lohka, M.J. y col. (1987)]. Del mismo modo, las proteínas asociadas a los microtúbulos implicadas en la formación del huso mitótico también sufren cambios periódicos en su estado de fosforilación [Sato, C. y col. (1988)]. De hecho, se han encontrado fluctuaciones de la actividad proteínica fosfatasa durante el ciclo celular [Karsenti, E. y col. (1987)].

La PP-1 sufre cambios de localización durante el ciclo celular, pasando de ser mayoritariamente citoplasmática en la fase G₁, a acumularse en el núcleo en la fase G₂ y M, donde ha sido detectada en asociación con los cromosomas condensados [Fernandez, A. y col. (1992)]. El I-2, por su parte, también experimenta variaciones en cuanto a su localización celular a lo largo del ciclo, que resultan independientes de las sufridas por la PP-1 [Brautigam, D.L. y col. (1990)].

La importancia de la PP-1 en el ciclo celular ha sido demostrada mediante análisis genéticos de mutantes que afectan a la división celular en levaduras. En *S. pombe*, los procesos mitóticos están controlados por la proteína quinasa de 34 kDa producto del gen *cdc2* [Boher, R. y Beach, D. (1986); Simanis, V. y Nurse, P. (1986)] y por el de *wee1* [Russell, P. y Nurse, P. (1987)]. El producto del gen *wee1* regula negativamente la función de la proteína p34^{cdc2}. Las células conteniendo un gen *wee1* mutado pueden entrar en mitosis sin necesidad de un activador de p34^{cdc2}, denominado *cdc25*. Utilizando un mutante *cdc2* defectivo en *wee1*, se ha identificado un gen que provoca un paro en la fase G₂ e impide la entrada en la mitosis. Este nuevo gen, *bws1*, codifica una proteína con un 81% de identidad con la PP-1c de mamífero [Boher, R. y Beach, D. (1989)]. Así, *bws1* de *S. pombe* contrarresta la actividad de la quinasa p34^{cdc2}, y hace que deje de ser imprescindible el producto de *cdc25* para iniciar la mitosis.

Existen evidencias, en vertebrados, que sugieren que la PP-1 puede ser necesaria antes de iniciarse la mitosis. Tanto el I-1 como el I-2 bloquean la maduración meiótica de los oocitos de *Xenopus laevis* [Foulkes, J.G. y Maller, J.L. (1982); Huchon, D. y col. (1981)]. En cambio, la

microinyección de ácido okadaico en estas células induce la formación del factor promotor de la maduración (MPF, compuesto por un complejo entre p34^{cdc2} y ciclinas) y promueve la continuación de la meiosis. Esto hace suponer que no es sólo la PP-1 la que interviene en el proceso, sino que también es importante la actividad PP-2A.

La PP-1 regula también la actividad del INH (un regulador negativo del MPF) [Cyert, M.S. y Kirschner, M.W. (1988)], inicialmente identificado como una actividad que inhibe la activación postraduccional del pre-MPF en oocitos inmaduros. Recientemente ha sido identificado el INH como una forma de PP-2A [Lee, T.H. y col. (1991)], la cual actúa tanto sobre ciclinas, como sobre p34^{cdc2} durante el curso de la inactivación del MPF [Solomon, M.J. y col. (1990)].

Un interesante descubrimiento que aporta datos a favor de la importancia de las proteínas fosfatasa en la regulación de la proliferación celular es que la subunidad catalítica de la PP-2A y su subunidad reguladora de 61 kDa (PP-2A₂) se asocian específicamente con proteínas que poseen capacidad transformante. El antígeno T mediano del virus del poliovirus y los antígenos pequeños del virus del poliovirus y del SV40 son dos ejemplos [Yang, S.-Y. y col. (1991); Scheidtmann, K.H. y col. (1991)]. La PP-2Ac activa la replicación del DNA de SV40 mediante la modulación del estado de fosforilación de una proteína de iniciación viral, como es el antígeno T [Virshup, D.M. y col (1989)].

3.5. REGULACION DE RECEPTORES.

La fosforilación de receptores está implicada en la regulación de su expresión en la superficie celular, de su afinidad por ligandos y de su capacidad para dar lugar a la producción de segundos mensajeros. Está demostrado que las fosfatasa de tipo 2A actúan sobre fosforeceptores como la cadena gamma del antígeno CD3 en linfocitos T y sobre el receptor β_2 -adrenérgico [Yang, S.D. y col. (1988)]. Así, se puede especular que las proteínas fosfatasa mantienen los receptores en un estado desfosforilado y preparado para la transducción de señales tras la interacción con ligandos.

Uno de los tipos de receptores en los que mejor se ha estudiado el efecto de las proteínas fosfatasa son los fotorreceptores. Tras la recepción de un fotón, la rodopsina activa la

transducina, una proteína G, lo que conduce a la hidrólisis de GMPc y a la regulación del flujo de cationes en los bastones de la retina. La fosforilación de la rodopsina provoca su inactivación [Stryer, L. (1986)]. La fosfatasa causante de la reactivación de la rodopsina es la PP-2A, mientras que la PP-1 no tiene actividad sobre este sustrato [Fowles, C. y col. (1989); Palczewski, K. y col. (1989)].

El receptor de la manosa 6-fosfato/IGFII puede ser desfosforilado *in vitro* por la subunidad catalítica de la PP-2A, aunque la incubación de fibroblastos con ácido okadaico no altera significativamente el estado de fosforilación del mismo. Sin embargo, el tratamiento de estas células con ácido okadaico evita la redistribución del receptor a la membrana plasmática inducida por el IGF, por lo que la PP-1 también debe participar en el proceso [Mieskes, G. y col. (1991)].

3.6. FUNCIONES EN LAS PLANTAS.

También en las plantas existen diversos enzimas reguladores del metabolismo controlados por mecanismos de fosforilación/desfosforilación. Por ejemplo, la PP-2A es la proteína responsable de la activación mediada por la luz de la sacarosa fosfato sintasa en las hojas de espinaca, enzima que cataliza la síntesis de la forma más común de transporte de las reservas de carbono entre diferentes estructuras de la planta [Siegl, G. y col. (1990)]. La PP-2A es también responsable de la inactivación de la quinato deshidrogenasa en células de zanahoria [MacKintosh, C. y col. (1991)].

Se conoce también, que diferentes inhibidores de las actividades PP-1 y PP-2A pueden inducir la respuesta de defensa característica de la soja ante el ataque por hongos [MacKintosh, C. (1991)].

4. PROTEINA FOSFATASAS EN LEVADURA.

La presencia de actividad proteína fosfatasa en levadura se reconoció hace tiempo [revisado por Holzer, H. (1987) y por Sneddon, A.A. y col. (1991)]. Hace ya 10 años, se identificaron en extractos de levadura diferentes actividades fosfatasas, mediante fraccionamiento en cromatografía de DEAE-celulosa [Mishra, C. (1983)]. Las recientes

evidencias apuntan, en base a sus propiedades enzimológicas, que las proteína fosfatasas de levadura y de mamífero son proteínas muy similares [Cohen, P. y col. (1989b)]. Esta similitud ha sido confirmada a raíz de la clonación de genes de levadura que codifican proteínas fuertemente relacionadas con fosfatasas de mamíferos. En el momento de escribir estas líneas han sido identificados y caracterizado no menos de 7 genes en *S. cerevisiae* que codifican proteínas de gran similitud con las subunidades catalíticas de las serina-treonina fosfatasas de mamíferos (Tabla III).

TABLA III. PROTEINA FOSFATASA IDENTIFICADAS EN *S. cerevisiae*.

Genes de proteína fosfatasas identificados en <i>S. cerevisiae</i>	Genes de proteína fosfatasas relacionados en otros organismos e identidad
<i>DIS2S1</i>	PP-1 (81%)
PPH21/PPH22	PP-2A (74%)
SIT4	? (PP-X: 61%)
CMP1/CMP2	PP-2B (52-53%)
PPH3	?

Relación entre los genes de proteína fosfatasas descritos hasta ahora en S. cerevisiae y sus homólogos en mamíferos. Entre paréntesis se indica la identidad entre las secuencias aminoacídicas deducidas de las correspondientes secuencias nucleotídicas.



4.1. EL GEN DIS2S1.

Se han descrito dos genes de *S. pombe* (*dis2* y *sds21*) con una identidad del 82% y 74% respectivamente con la subunidad catalítica de la PP-1, los cuales intervienen en la separación de los cromosomas condensados durante la mitosis [Ohkura, H. y col (1989)]. En los mutantes *dis2* los cromosomas se mueven a lo largo del huso, pero son distribuidos inadecuadamente a los dos polos de la célula. Además, se produce con muy alta frecuencia la pérdida de minicromosomas artificiales. El producto del gen *dis2* se encuentra localizado en mayor cantidad en el núcleo. Ambos genes presentan funciones solapadas y sólo la interrupción conjunta es letal para la célula.

El gen análogo a estos en *S. cerevisiae*, *DIS2S1*, fue clonado por los mismos autores. El gen contiene dos exones y un intrón. El intrón, de 525 pb, está localizado en la misma posición que el segundo (y último) intrón del gen *sds21* de *S. pombe*. *DIS2S1* se encuentra en el cromosoma V y codifica una proteína de 312 residuos muy similar a la subunidad catalítica de la PP-1 de mamífero (más de un 80% de identidad). Esta proteína parece ser esencial para la supervivencia de la célula puesto que las células haploides portadoras del gen interrumpido son inviables [Clotet, J. y col. (1991); Feng, Z. y col. (1991); Sneddon, A.A. y Stark, M.J.R. (1991)]. Hay evidencias que indican que el producto de este gen está implicado en la activación de la glucógeno fosforilasa, ya que las células diploides que contienen una copia del gen interrumpido muestran una gran actividad fosforilasa α [Clotet, J. y col. (1991)]. Asimismo, también parece que el producto del gen *DIS2S1* está involucrado en la activación de la glucógeno sintasa ya que ha sido también identificado como la diana de la mutación *glc7* de *S. cerevisiae*. Las células *glc7* no acumula glucógeno debido a un defecto en la activación de la glucógeno sintasa [Peng, Z. y col. (1990)].

4.2. EL GEN SIT4.

SIT4, también denominado *PPH1*, es un gen cuyo producto proteico está relacionado estructuralmente con la PP-2A y la PPX. Fue aislado como supresor de una mutación que permitía el inicio de transcripción del gen *HIS4* (gen requerido para la biosíntesis de histidina) en ausencia de los factores activadores de la transcripción [Arndt, K.T. y col. (1989)]. Las mutaciones *sit4* permiten la expresión de *HIS4* en ausencia de los activadores de la transcripción

requeridos normalmente, codificados por *GCN4*, *BAS1* y *BAS2*. *GCN4* media la activación de *his4* (y de otros genes) en respuesta a la privación de histidina, mientras que *BAS1* y *BAS2* regulan el control del nivel basal de la expresión de *HIS4* en respuesta a los niveles de fosfato y adenina en el medio de cultivo [Arndt, K.T. y col. (1987)]. Los mutantes *sit4* también tienen afectada la expresión de otros genes (como *URA3* o *LEU4*) y muestran interacciones genéticas con los alelos mutados que codifican la subunidad catalítica de la RNA polimerasa de *rpb1* y *rpb2* (*sit1* y *sit2*). Estos genes codifican diferentes subunidades de la RNA polimerasa II, mientras que el producto de *SIT4* podría codificar un factor que interaccionara con el producto de *RPB1* y *RPB2*.

La secuencia nucleotídica de *SIT4* predice una proteína de 35,5 kDa. que tiene un 61% de identidad con la PPX de músculo de conejo, es 54% idéntica a la subunidad catalítica de la PP-2A bovina y 40% idéntica a la PP-1 de conejo. Como consecuencia, se ha postulado que el producto de *SIT4* fuera una fosfatasa capaz de desfosforilar la forma altamente fosforilada (activa) de *RPB1*, que *in vivo* se encuentra fosforilada en múltiples serinas y treoninas del dominio carboxi-terminal. Sin embargo, estudios de inmunofluorescencia indirecta y de inmunoblot han mostrado que la mayor parte de la proteína se encuentra siempre en el citoplasma, independientemente de la fase del ciclo celular [Sutton, A. y col. (1991)].

Buscando funciones en las que este gen pueda estar implicado se ha observado que las cepas de *S. cerevisiae* que contienen mutaciones ts en *sit4* detienen su crecimiento en la fase G_1 del ciclo celular, a la temperatura restrictiva [Sutton, A. y col. (1991)]. Así, el producto del gen *SIT4* es necesario para la progresión entre G_1 y S. Además, mientras que los niveles de *SIT4* no varían a lo largo del ciclo celular, sí que lo hace su asociación con dos fosfoproteínas de alta masa molecular (155 y 190 kDa). Estas proteínas, p155 y p190, no son detectables cuando se inmunoprecipita *SIT4* a partir de extractos preparados de células en la fase G_1 . Los mismos experimentos de inmunoprecipitación han servido para demostrar que *SIT4* no es fosforilado *in vivo* [Sutton, A. y col. (1991)].

Estos últimos autores han podido evidenciar que mutaciones en *SIT4* interaccionan con mutaciones tanto en *BCY1* (subunidad reguladora de PK-A) como en *CDC28* (proteína quinasa

presente en las células eucariotas que juega un papel central en la regulación del ciclo celular), lo que ha sugerido que *SIT4* puede actuar después de haberlo hecho *BCY1* o en una posible vía paralela cuyas funciones se solapan con las de la vía de la PK-A.

Asimismo, el gen *SIT4* parece que está implicado en el control del estado de activación de los enzimas del metabolismo del glucógeno (glucógeno sintasa y fosforilasa)[Posas, F. y col. (1991)], en la resistencia a la cafeína y en la capacidad de crecer en fuentes de carbono no fermentables. Todo ello es característico de ciertas mutaciones en la vía de la PK-A.

4.3. LOS GENES PPH21 Y PPH22.

Los genes *PPH21* y *PPH22* de *S. cerevisiae* fueron identificados mediante análisis en condiciones de baja selectividad de una biblioteca de levadura utilizando una sonda de cDNA correspondiente a la subunidad catalítica de la PP-2A de conejo [Sneddon, A.A. y col. (1990)]. Ambos genes codifican polipéptidos de 369 y 377 residuos respectivamente. Como puede apreciarse, estas proteínas son mayores que las correspondientes PP-2A de mamífero. Ello se debe a que *PPH21* y *PPH22* poseen sendas extensiones amino terminales (60 y 68 residuos respectivamente), de naturaleza ácida. Mientras que en el resto de la proteína la identidad se eleva al 98%, estas secuencias tienen tan sólo un 48% de identidad entre ellas. La existencia de regiones "leader" de carácter ácido es una característica de diversos genes de levadura implicados en vías reguladoras, como *BCY1* y *TPK*, que codifican las subunidades de la PK-A [Toda y col. (1987a,b)]. Tanto *PPH21* como *PPH22* muestran un 74% de identidad con la PP-2A de mamífero. Estos genes se encuentran en el brazo izquierdo del cromosoma IV, y la interrupción de cualquiera de ellos no tiene efecto en la sensibilidad al choque térmico, a feromonas, o a la capacidad de crecimiento en fuentes de carbono no fermentables. Sin embargo la doble interrupción es letal [Sneddon, A.A y col. (1990)]. Hay datos que indican que las cepas *pph21* y *pph22* poseen un crecimiento levemente más lento, como consecuencia de una fase G_1 algo más larga, lo que sería consistente con el modelo de la PP-2A como inhibidor mitótico [Sneddon, A.A. y col. (1991)]. Todo ello parece indicar que *PPH21* y *PPH22* tienen una función solapada o idéntica y que codifican para polipéptidos con una función esencial en *S. cerevisiae*. Utilizando glucógeno fosforilasa como sustrato, ambas proteínas representan el 84% de la actividad PP-2A en *S. cerevisiae* [Sneddon, A.A. y col. (1990)].

Los genes *PPH21* y *PPH22* han sido clonados independientemente por el grupo de Hans Ronne [Ronne, H. y col. (1991)]. Las disrupciones independientes de *PPH21* y *PPH22* no tienen efecto sobre el proceso de "mating", la esporulación, la germinación de esporas o el crecimiento en diversas fuentes de carbono. En la cepa utilizada por este autor (W303A) las esporas portadoras de la doble disrupción germinan eficientemente, formando alguna tétrada incompleta, pero las colonias dejan de crecer a los 3 días. Por lo tanto, en este fondo genético la doble delección *PPH21*, *PPH22*, no resulta letal, pero sí provoca un retraso en el crecimiento. La sobreexpresión de *PPH22* produce células más alargadas, particularmente en cepas diploides. Los altos niveles de expresión provocan un incremento del volumen celular, quizá como consecuencia de una anomalía en el balance osmótico [Ronne, H. y col. (1991)].

La principal proteína reconocida en un extracto celular de levadura por un anticuerpo anti-péptido carboxi-terminal de la subunidad catalítica de la PP-2A de músculo esquelético de conejo posee una masa molecular de 45 kDa, por lo que es posible que la proteína sea el producto de *PPH21*, *PPH22* o ambos. Aunque en algún caso también se reconoce una proteína de una masa molecular de 37 kDa. [Peng, Z.-Y. y col. (1991)].

4.4. EL GEN *PPH3*.

El gen *PPH3* codifica una proteína relacionada estructuralmente con las PP-2A de mamífero. A pesar de esto, su secuencia difiere de forma considerable de las secuencias de *PPH21* y *PPH22*. [Ronne, H. y col. (1991)]. La máxima similitud se obtiene al compararla con la proteína de conejo PPX. La interrupción de *PPH3* no es letal y, como en el caso de los genes *PPH21* y *PPH22*, se encuentra localizado en el cromosoma IV, pero a diferencia de estos, en su brazo derecho.

En el fondo genético de la cepa W303A, la mutación simultánea de *PPH21*, *PPH22* y *PPH3* da como resultado un fenotipo letal.

4.5. LOS GENES *CMP1* Y *CMP2* (*CNA1* Y *CNA2*).

Durante el desarrollo de este trabajo fueron clonados los genes *CMP1* y *CMP2*, que resultan similares a la PP-2B de mamífero (calcineurina). Han sido aislados mediante análisis

de una biblioteca de expresión de DNA genómico de *S. cerevisiae*, con calmodulina de levadura marcada con ^{125}I . La secuencia de *CMP1* predice una proteína de 553 residuos con una masa molecular de 63 kDa y una identidad del 54% con la PP-2B de cerebro de rata y del 51% con la calcineurina A₁ humana [Cyert, M.S. y col. (1991)]. *CMP2* posee un ORF que codifica 604 residuos, prediciéndose una masa molecular de 68,5 kDa. Mediante hibridación se ha localizado el gen *CMP1* en el cromosoma II [o en cromosoma IV según Ye, R.R. y Bretscher, A. (1992)], mientras que *CMP2* se encuentra en el XVI.

Estos genes han sido identificados y clonados posteriormente por el laboratorio de Miyakawa, denominándolos *CNA1* y *CNA2* [Liu, Y. y col. (1991)]. Recientemente otro grupo ha publicado la clonación de *CMP1* [Ye, R.R. y Bretscher, A. (1992)].

Ninguno de los dos genes parece esencial para la viabilidad de la levadura, puesto que las células haploides conteniendo ambos genes interrumpidos son viables. Pero las cepas mutadas y salvaje difieren en sus respuestas a la feromona factor α . Las cepas conteniendo una mutación en uno de los dos genes son más sensibles a la reanudación del crecimiento después de la parada inducida por el factor α [Cyert, M.S. y col. (1991)], lo que ha hecho sugerir que algún enzima regulado por Ca^{2+} se encuentra implicado en la vía de acción de este factor. Recientemente se ha demostrado que el factor α induce la expresión del producto del gen *CMP1*, al igual que ocurre con otras proteínas que unen calmodulina [Ye, R.R. y Bretscher, A. (1992)]. De hecho, en la región 5' no codificante se han encontrado cuatro cajas con alta similitud con la secuencia consenso del elemento estimulado por el factor α (TGAAACA).

Muchas de las características estructurales de la subunidad catalítica de la PP-2B de mamífero se conservan en *CMP1* y *CMP2*. Así, la PP-2B puede dividirse en un dominio catalítico y otro regulador. El dominio catalítico detectado corresponde a la porción amino-terminal, mientras que el dominio regulador se encuentra en la región carboxi-terminal. Esta última posee el lugar de unión de la calmodulina, un centro de fosforilación y una región inhibidora de la actividad.

Mediante el uso de anticuerpos se ha observado que el producto de los genes *CMP1* y *CMP2* migran electroforéticamente como proteínas de 62 y 64 kDa respectivamente.

4.6. SUBUNIDADES REGULADORAS DE LAS PROTEINA FOSFATASAS DE LEVADURA.

Todos los genes revisados hasta ahora codifican las subunidades catalíticas de proteína fosfatasa. Sin embargo, por analogía con los enzimas de mamífero, es improbable que las formas nativas de la PP-2A y PP-1 de levadura se encuentren formadas únicamente por la subunidad catalítica. Se ha especulado que las interacciones de las proteína fosfatasa de levadura con sus sustratos deben estar controladas por diferentes subunidades reguladoras.

El gen *TPD3*, que fue aislado por complementación de una mutación ts defectiva en la producción de tRNA funcional [van Zyl, W. y col. (1989)], codifica un polipéptido altamente similar a la subunidad A de la PP-2A de mamífero. Los análisis de los mutantes *tpd3* a la temperatura no permisiva demostraron que el defecto se producía en la transcripción del tRNA más que en la maduración de los transcritos. Además, el fraccionamiento de extractos celulares de la cepa salvaje y del mutante *tpd3* por cromatografía de intercambio iónico reveló la presencia en el primero de un pico de actividad PP-2A, que en el último se encontraba ausente. Así, la proteína *TPD3* parece ser una subunidad reguladora de la actividad PP-2A de *S. cerevisiae*, la cual interviene en la transcripción de los genes de tRNA por parte de la RNA polimerasa III.

Tanto la subunidad A como la B de la PP-2A han sido purificadas de *S. cerevisiae* en asociación con la subunidad catalítica como actividad glucógeno sintasa fosfatasa, con unas masas moleculares similares a las de las correspondientes proteínas de mamíferos (60 kDa y 53 kDa respectivamente)[Peng, Z.-Y. y col (1991)].

Se ha clonado y secuenciado recientemente un gen de *S. cerevisiae* denominado *CDC55* que codifica una proteína con gran identidad con la subunidad B de la PP2A de mamífero (más del 50%). Una mutación ts de este gen provoca un anormal alargamiento de las gemas y un retraso o bloqueo parcial en la septación y/o separación celular [Healy, A.M. y col. (1991)]. *CDC55* se localiza en el brazo izquierdo del cromosoma VII, y de su secuencia se deduce una proteína de 526 residuos (59,7 kDa).

Recientemente han sido aportados datos en favor de la existencia en levadura de subunidades reguladoras de la PP-1. El laboratorio de Tatchell [François, J.M. y col. (1992)] ha clonado el gen *GAC1* de *S. cerevisiae*, que codifica una proteína de 794 residuos (88,6 kDa). La mitad amino terminal de *GAC1* presenta alta identidad con la subunidad reguladora que une glucógeno de la PP-1 de músculo esquelético de conejo (esencial para la producir la activación de la glucógeno sintasa). El nivel de expresión de *GAC1* se correlaciona con la actividad de la glucógeno sintasa, así como con la acumulación de glucógeno. Estos hechos hacen pensar que *GAC1* codifica una proteína necesaria en la conversión entre la forma de la glucógeno sintasa dependiente de glucosa-6 fosfato y su forma independiente mediante la acción de una actividad fosfatasa. Una característica curioso de esta proteína es que su extremo carboxi-terminal es marcadamente ácido (pI=4,2) y contiene gran número de residuos serinas (22%) y glutamina (12%).

Aunque no se ha identificado hasta el momento la presencia de subunidades reguladoras de la PP-1 en asociación con la subunidad catalítica en extractos de *S. cerevisiae*, en *S. pombe* la actividad PP-1 corresponde a proteínas de unos 80 kDa [Kinoshita, N. y col. (1990); Ohkura, H. y col (1989)], valor mucho mayor que el de la masa molecular de los productos de *DIS2* y *SDS21*. Ello sugiere que esta subunidad catalítica debe existir en asociación con otras proteínas. Sin embargo, no puede descartarse la dimerización de las subunidades catalíticas. Por otra parte, en *S. cerevisiae* se han identificado dos formas de la proteína codificada por el gen *DIS2S1* después de fraccionar los extractos en una columna de DEAE-celulosa. Se ha sugerido que, al menos una de ellas, puede corresponder a la asociación de la proteína con alguna subunidad reguladora [Feng, Z. y col. (1991)].

2.- MATERIALES Y METODOS.

1. MATERIALES UTILIZADOS.

AMERSHAM:

[α -³²P]dCTP, [¹²⁵I]-proteína G.

APPLIED BIOSYSTEM:

Taq Dye Primer Cycle Sequencing Kit.

BIORAD:

TEMED, persulfato amónico, Azul de Coomassie, bisacrilamida.

BOEHRINGER MANNHEIM:

Enzimas de restricción, T4 DNA ligasa, fosfatasa alcalina, M13mp18 y M13mp19, lisozima, ampicilina, AMPPD, rifampicina, oligo dT-celulosa, urea, Gluco-Quant, DIG DNA Labeling and Detection Nonradioactive Kit, Random Primed DNA Labeling Kit.

DIFCO:

Peptona, triptona, extracto de levadura, base de nitrógeno de levadura.

DUPONT:

[³⁵S]-metionina, glusulasa.

FLUKA:

Fenol, MOPS, Nonidet-P40.

FMC:

Agarosa SeaKem

KNICKERBOCKER:

Reactivo de biuret.

KOCH-LIGHT LABORATORIES LTD.:

Triton X-100.

MERK:

Sulfato amónico, glucosa, acetato potásico, glicerol, cloruro de calcio, Tris, EDTA, sacarosa, cloroformo, acetato amónico, alcohol isoamílico, etanol, alcohol isopropílico, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, ácido acético, formaldehído, formamida, acetato de sodio, glicina, cloruro potásico, acrilamida, EGTA, 2-mercaptoetanol, azida sódica, fluoruro potásico, fosfato disódico.12 H₂O, fosfato potásico.

PANREAC:

Cloruro sódico, citrato de sodio, metanol, yodo.

PIERCE:

Adjuvante de Freund completo, adjuvante de Freund incompleto.

SERVA:

SDS, ácido láctico.

SIGMA:

N-laurilsarcosina, IPTG, X-fosfato, DTT, Azul de Coomassie, leupeptina, PMSF, UDP-glucosa, glucógeno, [¹⁴C]-glucosa, acetato de litio, PEG 4000, PEG 6000, hidroxiquinoleína, RNasa, t-RNA de levadura, DNA de esperma de salmón, Azul de Bromofenol, Xylene Cyanol, bromuro de etidio, Ficoll 400, PVP, BSA, benzamidina, ácido bórico.

STRATAGENE:

pBluescript SK⁺.

2. SOLUCIONES UTILIZADAS COMUNMENTE.

Soución de Denhardt:

Ficoll 400 al 0,1% (p/vol)

PVP al 0,1% (p/vol)

BSA al 0,1% (p/vol)

SDS al 0,001% (p/vol)

Tampón de electroforesis de proteínas:

Tris 25 mM

Glicina 192 mM

SDS al 0,2% (p/vol).

Tampón de electrotransferencia de proteínas:

Tris 25 mM

Glicina 150 mM

Metanol al 20% (vol/vol)

PBS:

KCl 2,7 mM

KH₂PO₄ 1,47 mM

NaCl 137 mM

Na₂HPO₄ 8 mM, pH 7,2

1x SSC:

Cloruro de sodio 0,15 M

Citrato de sodio 0,015 M, pH 7,0

TBE:

Tris 89 mM, pH 8,3
Acido Bórico 89 mM
EDTA 2 mM

STET:

Sacarosa al 20% (p/vol)
Triton X-100 al 5% (vol/vol)
EDTA 50 mM pH 8,0
Tris-Cl 50 mM pH 8,0

TE:

Tris-Cl 10 mM, pH 7,4
EDTA 1mM

Sol. amortiguadora de MOPS:

MOPS 0,2 M pH 7,0
Acetato de sódio 50 mM
EDTA 10 mM

TBS:

Tris-Cl 50 mM, pH 7,4
NaCl 150 mM

3. MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS.

LB:

Triptona al 1% (p/vol)
Extracto de levadura al 0,5% (p/vol)
Cloruro sódico al 0,5% (p/vol)

YPD:

Extracto de levadura al 1% (p/vol)
Peptona al 2% (p/vol)
Glucosa al 2% (p/vol)

En caso de utilizar otras fuentes de carbono, el medio se prepara del mismo modo, pero en lugar de glucosa se añade el 2% de la correspondiente fuente de carbono.

MEDIO MINIMO:

(p/vol) Base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos y sin sulfato amónico al 0,17%
Sulfato amónico al 0,5% (p/vol)
Glucosa al 2% (p/vol)

MEDIO MINIMO CARENTE DE UNO O MAS AMINOACIDOS:

Se prepara medio mínimo y se añade la mezcla de aminoácidos (conteniendo todos los aminoácidos a excepción de los que no interesen) al 0,13%. La mezcla de aminoácidos utilizada es la descrita por Treco, D.A. (1990).

MEDIO DE ESPORULACION:

Acetato potásico al 1% (p/vol)
Extracto de levadura al 0,1% (p/vol)
Glucosa al 0,005% (p/vol)

PLACAS DE MEDIOS:

Se preparaban igual que los medios y se añadía agar al 2% (p/vol).

4. CEPAS Y MEDIOS DE CULTIVO.

4.1. CEPAS BACTERIANAS.

Se han utilizado las cepas NM522 y JM101 de *E. coli*. La primera como portadora de diferentes construcciones en plásmidos (pUC19, pUC18 y Bluescript SK⁺ básicamente) y la segunda como huésped para el bacteriofago M13, utilizado como fuente de DNA de cadena sencilla. Las células de *E. coli* NM522 se crecieron a 37°C en medio LB conteniendo 50 µg/ml de ampicilina cuando era necesaria para la selección de plásmidos.

Las células de la cepa JM101 se mantenían en placa de medio mínimo, guardada a 4°C, y sólo se crecían en LB durante el tiempo mínimo suficiente para preparar los cultivos en fase exponencial.

Las células de la cepa NM522 de *E. coli* conteniendo las diferentes construcciones se guardaban en LB conteniendo un 20% (vol/vol) de glicerol a -80°C.

2. MATERIALES Y METODOS.

Las células bacterianas de la cepa NM522 se transformaron según el método descrito por Chung, C.T. y col. (1989). Para transformar las células de la cepa JM101 se utilizó el método del cloruro de calcio descrito en Sambrook, J. y col. (1989).

4.2. CEPAS DE LEVADURA.

Se ha utilizado la cepa M5 de *S. cerevisiae* (*MAT α /MAT α* , homocigótica para *leu2-3/112 ura3-52 trp1*) para la preparación de DNA genómico y en los experimentos de interrupción génica. También se ha empleado la cepa W303-1A (*MAT α ade2-2 his3-11,15 leu2-3,112 can1-100 ura3-1 trp1-1 ssd1-d2*) con el mismo objetivo. Las células de levadura crecieron a 30°C en medio YPD o en medio sintético SD [Sherman, F. y col. (1986)]. A lo largo del trabajo se han creado las cepas descritas en la tabla IV.

TABLA IV. CEPAS DE LEVADURA OBTENIDAS EN ESTE TRABAJO.

CEPA	CEPA DE ORIGEN	CARACTERISTICAS
JA-10	M5 (2n)	+ pYepLac181-PPZ1
JA-11	M5 (2n)	+ pEMBLYex4-PPZ1
JA-12	M5 (2n)	+ pEMBLYex4
JA-13	M5 (2n)	PPZ1/ppz1::TRP1
JA-14	M5 (2n)	PPZ1/ppz1::URA3
JA-15	M5 (2n)	ppz1::TRP1/ppz1::URA3
JA-16	M5 (n)	MAT α , ppz1::TRP1
JA-17	M5 (n)	MAT α , ppz1::URA3

Los cultivos de levaduras eran guardados en YPD conteniendo un 15% (vol/vol) de glicerol, a -80°C.

Las células de levadura se transformaron mediante el método del acetato de litio descrito por Schiestl, R.H. y Gietz, R.D.(1989) utilizando DNA de esperma de salmón desnaturalizado como transportador.

5. TECNICAS DE DNA RECOMBINANTE.

5.1. OBTENCION Y MANIPULACION DE DNA PLASMIDICO.

Las reacciones de restricción, desfosforilación, ligación y otras técnicas estándar de DNA recombinante se realizaron esencialmente según se describe en [Sambrook. J. y col. (1989)], utilizando para ello los enzimas suministrados por la casa Boehringer Mannheim.

La obtención de DNA plasmídico se realizó mediante minipreparaciones convencionales a partir de 5 ml de cultivo bacteriano, utilizando lisozima y una posterior ebullición, según se describe en Engebrecht., J. y Brent, R. (1991), con la modificación siguiente: el sobrenadante celular obtenido después de haber tratado las células con lisozima y haberlas hervido, fue desproteinizado mediante dos extracciones sucesivas con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) saturado con Tris pH 8,0. Seguidamente se efectuaba una extracción con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), y el DNA era precipitado mediante la adición de 0,25 vol de acetato amónico 10 M y de 2 vol de etanol al 96% (vol/vol)

La obtención del DNA plasmídico en cantidades superiores al extraído mediante minipreparaciones convencionales se realizaba utilizando el sistema Plasmid-Kit (Quiagen), siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante, a partir de 100 ml de cultivos de las células contenedoras del plásmido.

La purificación de fragmentos de DNA separados electroforéticamente en geles de agarosa se llevaba a cabo utilizando los sistemas GeneClean (BIO 101) o, si los fragmentos a purificar eran menores de 200 pb, el kit MerMaid (BIO 101).

5.2. MARCAJE DE SONDAS.

Las sondas de DNA fueron marcadas por el método de random priming [Feinberg, A.P. y Vogelstein (1983)] utilizando [α -³²P]dCTP o dUTP unido a digoxigenina, mediante el kit de

marcaje comercial de Boehringer Mannheim, siguiendo las instrucciones del fabricante. El volumen final de la reacción era de 20 μ l.

En el caso del marcaje radioactivo, la reacción se finalizaba tras la adición de 1 μ l de EDTA 0,5 M y el DNA era separado de los nucleótidos no incorporados mediante precipitación a -80°C durante al menos 45 minutos con 1 μ l de tRNA de levadura (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 5 μ l de acetato amónico 10 M y 50 μ l de etanol al 99,5% (vol/vol). El DNA marcado se recuperaba por centrifugación a 4°C durante 15 minutos a 13.000 g, y el DNA marcado del sedimento se sometía a varios lavados con etanol al 99,5% (vol/vol) a -20°C . Finalmente, la sonda era resuspendida en 200 μ l de agua. Para medir la radioactividad se tomaban 2 μ l de la solución de DNA y se aplicaban sobre un papel 31 ET (Whatman) de 2 cm x 2 cm. Una vez seco el papel, se sumergía en un vial conteniendo la mezcla de líquido de centelleo "Ready Safe" (Beckman) y la radioactividad se determinaba en un contador de centelleo líquido Rack Beta 1217 (LKB).

5.3. ANALISIS DE DNA GENOMICO POR TECNICAS DE SOUTHERN BLOT.

Para los experimentos de Southern blot el DNA se preparó mediante el método descrito por Sherman, F. y col. (1986). Se digirieron de 5 a 10 μg de DNA con diferentes enzimas de restricción, se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 0,7% y los geles tras ser tratados durante 15 minutos con una solución de HCl 0,25 M para despurinizar el DNA fueron lavados en agua destilada. El DNA era desnaturalizado mediante la incubación del gel en una solución compuesta por NaOH 0,5 M y NaCl 1,5 M. Tras lavar el gel con agua éste era neutralizado en un baño de Tris 1 M pH 8,0 y NaCl 1,5 M antes de proceder a la transferencia del DNA mediante vacío a membranas de nylon GeneScreen Plus (DuPont) o cargadas positivamente (Boehringer Mannheim) en un equipo VacuGene (Pharmacia). En todos los casos el DNA transferido se fijó mediante la irradiación con 120.000 μJ de luz UV (254 nm), utilizando para ello un UV Stratalinker 1800 (Stratagene). Las membranas se bloquearon durante una noche a 65°C en solución de 6x SSC, 5x solución de Denhardt, SDS al 0,5% (p/vol) y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DNA de espermatozoos de salmón desnaturalizado por calor. Las hibridaciones se llevaron a cabo a 65°C durante una noche en la solución bloqueante en presencia de la correspondiente sonda de DNA previamente desnaturalizada por calor. Los filtros ya hibridados se lavaron a 55°C en 0,1x SSC, SDS al 0,1% (p/vol), excepto cuando se

2. MATERIALES Y METODOS.

especificuen otras condiciones. La detección de los fragmentos que hibridaban se consiguió utilizando el sistema de detección basado en el uso de dUTP marcado con digoxigenina o mediante el uso de sondas marcadas con [α - 32 P]dCTP. En el primer caso, la detección se llevó a cabo utilizando las fracciones F_{ab} del anticuerpo antidigoxigenina acoplado a la fosfatasa alcalina, según las instrucciones del "DIG DNA Labeling and Detection Kit" (Boehringer Mannheim). El revelado se efectuaba mediante reacción colorimétrica utilizando 175 ng/ml de X-fosfato y 337 ng/ml de NBT como sustratos de la fosfatasa alcalina. En el caso de emplear sondas marcadas radioactivamente, se utilizaron 10⁶ cpm/ml y la detección se realizó mediante autorradiografía sobre película X-OMAT AR (Kodak) utilizando pantalla intensificadora.

5.4. ANALISIS DE DNA MONOCATENARIO MEDIANTE SLOT-BLOT.

Los experimentos de slot-blot se realizaron como se describe en [Messing, J. (1983)], para analizar la naturaleza de los fragmentos amplificados clonados en el bacteriofago M13. Se utilizaron membranas de nitrocelulosa, que fueron pretratadas durante unos minutos en 2x SSC. Después se aplicaron a las membranas, utilizando un aparato Hybri-Slot™ Manifold (BRL), 25 μ l de un sobrenadante de 3.000 g de cultivos de *E. coli* JM 101 infectados con M13. Los filtros fueron tratados durante 5 min con una mezcla de NaOH 0,1 N y NaCl 1,5 M. Posteriormente fueron neutralizados en una solución de Tris-Cl 0,5 M pH 7,3 conteniendo cloruro de sodio 3 M. Finalmente se dejaron unos minutos sobre papel de filtro humedecido en 2x SSC hasta que se sometieron a 120.000 μ Julios de radiación UV de 254 nm en un Stratalinker 1800 (Stratagene). La detección se realizó mediante el uso de sondas marcadas con digoxigenina.

5.5. CONSTRUCCION Y ANALISIS DE UNA BIBLIOTECA DE DNA.

Para construir la biblioteca utilizada en este trabajo se digirieron 25 μ g de DNA genómico de la cepa M5 de *S. cerevisiae* con *Pst*I y la mezcla resultante fue sometida a electroforesis en gel de agarosa al 0,7%. La región del gel que contenía los fragmentos de DNA de un tamaño comprendido entre 4 y 5 kpb fué recortada y el DNA extraído y ligado al vector pUC19 digerido previamente con *Pst*I y desfosforilado.

Posteriormente se transformó la cepa NM522 de *E. coli* con el producto de la ligación. Las células NM522 portadoras del plásmido se plaquearon en agar al 2% en medio LB con 50

µg/ml de ampicilina. Después de una incubación de una noche a 37°C, las colonias fueron transferidas a membranas de nylon (Colony/Plaque Screen, DuPont) y estas fueron tratadas durante 7 minutos con una solución de cloruro sódico 1,5 M e hidróxido de sodio 0,5 M. Seguidamente se efectuaron dos lavados de 3 minutos cada uno en solución neutralizante compuesta de cloruro de sodio 1,5 M, Tris 1 M pH 7,2 y EDTA 1 mM, para ser incubadas durante unos segundos en etanol al 95% (vol/vol) y efectuar un lavado en cloroformo. Posteriormente se realizaron dos lavados de las membranas en 2x SSC y éstas se sometieron a 120 mJulios de radiación de 254 nm en un Stratalinker (Stratagene). El análisis de las colonias portadoras de los clones de interés se realizó mediante hibridación con una sonda de DNA marcada con digoxigenina, a 68°C en 5x SSC según las instrucciones del "DIG DNA Labeling and Detection Nonradioactive Kit". Los lavados de las membranas se realizaron a 55°C en solución de 0,1x SSC y 0,1% SDS (p/vol).

5.6. ANALISIS DE RNA MEDIANTE NORTHERN BLOT.

El método seguido para la obtención del RNA total de levadura a pequeña escala (<100 µg de RNA total) fue el descrito por Treco, A. D. (1991). La preparación de RNA total en mayor cantidad y de RNA poli (A)⁺ se llevó a cabo según el método descrito por Köhrer y Domdey (1991) utilizando oligo dT-celulosa.

Utilizamos 20 µg de RNA total (excepto cuando se indica lo contrario) que eran sometidos a electroforesis en gel de agarosa-formaldehído. Para ello, a 8 µl de la muestra de RNA total (de 2,5 µg/µl aproximadamente) se le añadían 12,5 µl de formamida desionizada y 4,5 µl de formaldehído y la mezcla era incubada a 60°C durante 5 minutos. Seguidamente se añadían 5 µl de la siguiente solución esterilizada por filtración: glicerol al 20% (vol/vol); EDTA 1 mM; Azul de Bromofenol al 0,2% (p/vol) y Xylene Cyanol al 0,2% (p/vol) y por último, 1 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml).

Los geles de electroforesis contenían agarosa al 0,8% (p/vol) en solución amortiguadora de MOPS y formaldehído 2,2 M. Las electroforesis se realizaban a un voltaje constante no superior a 50 V en solución amortiguadora de MOPS.

2. MATERIALES Y METODOS.

En los casos en los que se utilizaba una sonda marcada radioactivamente, al finalizar la electroforesis los geles se lavaban durante 15 minutos en agua destilada antes de iniciar la transferencia del RNA. Esta se llevaba a cabo sobre las membranas de nylon GeneScreen Plus (DuPont) utilizando el equipo de vacío VacuGene (Pharmacia) con 10x SSC como solución de transferencia. La transferencia se prolongaba durante 1 hora, y una vez finalizada, las membranas se lavaban en 2x SSC durante 15 minutos. El RNA se fijaba mediante la irradiación con 120 mJulios de luz UV (254 nm), en un Stratalinker 1800 (Stratagene). Las membranas eran prehibridadas al menos 4 h a 42°C en solución de hibridación conteniendo 5x SSC, 5x solución de Denhardt, SDS al 0,5% (p/vol), formamida desionizada al 50% (vol/vol), 10 mM Tris pH 7,5 y 150 µg/ml de DNA de espermatozoos de salmón desnaturalizado. La hibridación se realizaba durante 1 noche a 42°C en la solución de hibridación, conteniendo además la correspondiente sonda marcada y desnaturalizada extemporáneamente por ebullición (10⁶ cpm/ml). Tras la hibridación, los filtros eran lavados 2 veces durante 15 minutos en 2x SSC y SDS al 0,1% (p/vol) a temperatura ambiente. Se realizaban 2 lavados más de 15 minutos cada uno en 0,1x SSC y SDS al 0,1% (p/vol) a una temperatura comprendida entre 42°C y 65°C, según los experimentos y por último se realizaba la autorradiografía. Esta tenía lugar a -80°C utilizando película X-OMAT AR (Kodak) a -80°C con pantalla intensificadora.

Cuando se utilizaba sonda marcada con digoxigenina, el RNA del gel se transfería mediante vacío a membranas de nylon cargadas positivamente (Boehringer Mannheim) en 4 fases. En la primera, de 15 minutos de duración, se usaba agua destilada como solución de transferencia. La transferencia se continuaba durante 15 minutos más con NaOH 50 mM y NaCl 10 mM. A continuación esta solución era sustituida por Tris-Cl 100 mM pH 8,0 durante el mismo período y, para finalizar, se volvía a transferir con agua destilada, pero en esta ocasión durante 90 minutos. La membrana era irradiada con 120 mJulios de luz UV y los restos de formaldehído eran eliminados mediante dos lavados de 15 minutos cada uno en 0,1x SSC y SDS al 0,5% (p/vol) a 65°C. El bloqueo de la membrana y la hibridación se realizaron como se describe en las instrucciones del "DIG DNA Labeling and Detection Kit" (Boehringer Mannheim) con la única excepción de la solución de hibridación, la cual estaba compuesta de: formamida desionizada al 50% (vol/vol), 5x SSC, SDS al 7% (p/vol), N-laurilsarcosina al 0,1% (p/vol), agente bloqueante al 2% (p/vol) (vial 11 del DIG DNA Kit) y fosfato monopotásico 50 mM, pH 7,2. La hibridación se realizó a 42°C y los lavados a 55°C en 0,1x SSC y SDS al 0,1% (p/vol). La detección inmunológica se realizó según las instrucciones suministradas con el kit

y como sustrato de la fosfatasa alcalina se utilizó el AMPPD, emisor de fotones cuando es desfosforilado.

Las autorradiografías se cuantificaban con un densitómetro Hoefer GS300 a una longitud de onda de 585 nm utilizando el "software" GS-365W Data System 2.0 (Hoeffer).

5.7. LOCALIZACION CROMOSOMICA.

Los cromosomas de la cepa de *S. cerevisiae* YNN295 (comercializados por Pharmacia) fueron separados en gel de agarosa al 1% (p/vol). La electroforesis se realizó en campo pulsátil utilizando para ello el aparato Pulsaphor (Pharmacia). El DNA fué transferido a membranas de nylon Hybond N (Amersham) y posteriormente hibridado con la sonda de DNA marcada con α -[³²P]dCTP. Los lavados se realizaron a 65°C en 0,1x SSC y SDS al 0,1% (p/vol) antes de realizar la autorradiografía.

5.8. OBTENCION DE LOS MARCADORES AUXOTROFICOS *TRP1* Y *URA3*.

El fragmento de DNA conteniendo el gen *TRP1* se preparó a partir del plásmido YRp7 [Sherman, F. y col. (1986)]. Este fue digerido con *EcoRI*, y el fragmento de 1,45 kpb que contenía el gen *TRP1* y la secuencia *ARS* se clonó en Bluescript SK(+). El plásmido resultante fué cortado con *BglII* y *BamHI*, y el fragmento de 0,85 kpb portador de la región que codifica el gen *TRP1* pero no la secuencia *ARS*, fue purificado y utilizado posteriormente para realizar las disrupciones génicas.

El gen *URA3* se preparó a partir del plásmido YEp24 [Sherman, F. y col. (1986)]. Para ello, se digirió con *XbaI* y *BamHI*, liberando un fragmento de 3,1 kpb portador del gen *URA3*, que se purificó y clonó en Bluescript SK(+). La digestión de este constructo con *ClaI* produjo un fragmento *ClaI-ClaI* de 1,5 kpb que contiene el gen completo *URA3*.

Los fragmentos de DNA conteniendo los genes mencionados fueron utilizados para realizar los experimentos de interrupción génica en un único paso [Rothstein, R.J. (1983)].

5.9. IDENTIFICACION DE CEPAS DE LEVADURA PORTADORAS DE PLASMIDOS.

Al no conocerse ningún sistema rutinario de minipreparaciones plasmídicas a partir de células de levadura, la verificación de los clones presuntamente positivos se realizó mediante un sistema alternativo. Este sistema se basaba en la extracción del DNA total del clon de levadura que se quería analizar, empleándose éste DNA para transformar células de *E. coli* (cepa NM522). A continuación el plásmido era recuperado de las bacterias mediante métodos convencionales y posteriormente identificado mediante las digestiones con los enzimas de restricción más apropiados en cada caso.

Para obtener el DNA total de *S. cerevisiae* se siguió el siguiente método: las células de 10 ml de cultivo se recogían y resuspendían en 1 ml de TE. De nuevo eran sedimentadas mediante centrifugación durante 5 segundos en microfuge y se resuspendían en 250 µl de la solución de extracción compuesta por Tris-Cl 50 mM, pH 8,0; EDTA 50 mM; NaCl 0,2 M; Triton X-100 al 0,2% (vol/vol). A los tubos Eppendorf conteniendo la suspensión de células se les añadía la cantidad de bolas de vidrio (0,5 mm de diámetro) necesaria para que éstas lleguen hasta 2 mm por debajo de la superficie del líquido. Los tubos conteniendo las células y las bolas eran mezclados enérgicamente durante 90 segundos. Inmediatamente los extractos eran centrifugados durante 5 segundos para recoger el sobrenadante al que se le añadía 200 µl de TE. Este era extraído 3 veces con 1 vol de fenol-cloroformo, incubado durante 30 minutos a 37 °C con 30 µg de RNasa A y extraído de nuevo 2 veces sucesivas con fenol-cloroformo antes de efectuar una extracción con cloroformo. El DNA era precipitado mediante la adición de 2 vol de etanol absoluto en presencia de acetato de amonio 2 M, durante 1 hora a -80°C. La sedimentación del DNA plasmídico se conseguía tras centrifugación a 15.000 g durante 15 minutos. Este era lavado con etanol al 70% (vol/vol), secado al vacío y resuspendido en 20 µl de agua. Los plásmidos así obtenidos eran utilizados para transformar las células bacterianas mediante el método del cloruro de calcio descrito en Sambrook, J. y col. (1989). Estas se plaquearon en LB con ampicilina y se preparó DNA plasmídico de las colonias que crecieron (mediante el método descrito en el apartado 2.1 de esta sección). Las digestiones del DNA plasmídico de las células procariotas con los enzimas de restricción apropiados servía para comprobar que las células de levadura eran realmente portadoras del plásmido con el que se habían transformado.

6. SECUENCIACION DE DNA.

6.1. PREPARACION DEL DNA DE CADENA SENCILLA DEL FAGO M13.

Las formas de cadena sencilla de M13 conteniendo los diferentes clones de DNA eran conservadas en forma de suspensiones de las partículas fágicas, libres de células, a 4°C. Cuando se requería obtener nuevas partículas fágicas, se infectaban 5 ml de un cultivo en fase exponencial de células JM101 con 200 µl de la suspensión de las correspondientes partículas víricas. El cultivo se mantenía una noche a 37°C con agitación y posteriormente se separaban las células de los fagos mediante centrifugación a 2.500 g durante 10 minutos a 4°C. La preparación del DNA de cadena sencilla de M13 se llevó a cabo según se describe en Messing, J. (1983), con las modificaciones indicadas en el manual suministrado con el equipo de secuenciación automática. Los fagos presentes en el sobrenadante de un cultivo de 5 ml eran precipitados por adición de 1 ml de una solución de cloruro de sodio 2,5 M y PEG 6000 al 20% (p/vol). Después de 30 minutos a 4°C, la sedimentación de las partículas víricas se realizaba por centrifugación a 12.000 g durante 10 minutos a 4°C. La completa eliminación de los restos de PEG y NaCl del sedimento se conseguía mediante dos nuevas breves centrifugaciones y eliminación de todo líquido mediante aspiración. El sedimento era resuspendido en 400 µl de tampón TE pH 8,0 y el DNA del fago era extraído por tratamiento con fenol saturado con Tris pH 8,0 por dos veces consecutivas seguido por dos extracciones con éter saturado con agua. Posteriormente el DNA era precipitado con 40 µl de acetato de sodio 3 M pH 5,2 y 1 ml de etanol absoluto durante 20 min. a -80°C, tras lo cual era sedimentado mediante centrifugación durante 15 min a 15.000 g a 4°C. El DNA precipitado, lavado con etanol al 70% (vol/vol) frío y secado era resuspendido en 10 µl de Tris 10 mM pH 8,0. De esta solución de DNA de cadena sencilla se tomaba 1 µl para efectuar la cuantificación espectrofotométrica a 260 nm, y 1 µl para someterlo a una electroforesis en gel de agarosa al 0,7% y comprobar su estado. El resto se guardaba a -20°C hasta proceder a su secuenciación.

6.2 SECUENCIACION DEL DNA.

La secuencia nucleotídica completa del DNA clonado se obtuvo por secuenciación de la doble cadena insertada en el plásmido Bluescript o, más comunmente, de la cadena sencilla producida por el fago M13. Para ello se empleó un secuenciador automático de DNA Applied Biosystem 373A utilizando *Taq* polimerasa y los cebadores -21 universal, siguiendo estrictamente

las instrucciones del fabricante.

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo utilizando el sistema *Taq Dye Primer Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystem). Las muestras secas producto de las reacciones se resuspendía en 5 μ l de formamida desionizada y 1 μ l de EDTA 10 mM, eran hervidas durante 2 minutos y conservadas en hielo hasta que se sometían a electroforesis.

Las electroforesis se realizaban en geles de poliacrilamida (19:1) al 6% (p/vol) en presencia de urea 8 M, en la solución amortiguadora TBE. Después de una pre-electroforesis de 30-60 minutos, las muestras eran sometidas a electroforesis a una potencia fija de 28 watos (aproximadamente 1.200-1.300 V) durante 14 horas a 40°C.

7. TECNICAS INMUNOLOGICAS.

7.1. EXPRESION DE LA PROTEINA PPZ1 EN *E. coli*.

Con la intención de producir anticuerpos contra la proteína PPZ1, se expresaron en *E. coli* dos fragmentos correspondientes a la región codificante de PPZ1, que fueron utilizados como inmunógenos. Para ello se utilizó el vector pT7-7 [Tabor, S. (1991)] en la cepa BL21(DE3). Esta cepa contiene el gen de la RNA polimerasa del fago T7 bajo control del promotor *lac*, por lo que es inducible mediante adición de IPTG al medio de cultivo [Tabor, S. (1991)].

Las células conteniendo el plásmido se crecieron en medio LB al que se le añadía 1/500 vol de una solución de ampicilina 50 mg/ml disuelta en etanol al 50% (vol/vol). La inducción de la proteína heteróloga se llevaba a cabo en un cultivo exponencial ($OD_{600}=0,6$) mediante la adición del IPTG disuelto en dimetilformamida necesario para obtener una concentración final en el cultivo de 0,4 mM. Después de 30 minutos de incubación a 37°C se añadía 1/100 vol. de rifampicina (20 mg/ml en metanol) para inhibir la actividad de la RNA polimerasa de la propia célula. El cultivo se mantenía ahora a 30°C con agitación durante dos horas. Las células correspondientes a 10 ml de cultivo eran recogidas y lisadas en 1 ml de la siguiente solución amortiguadora de lisis: Tris-Cl 50 mM, pH 6,8; SDS al 2% (p/vol), Azul de Bromofenol al 0,1% (p/vol); glicerol al 10% (vol/vol) y DTT 100mM. Inmediatamente después las muestras se sometían a ebullición durante 5 minutos.

2. MATERIALES Y METODOS.

La comprobación de la solubilidad de la proteína se realizó según es siguiente método. Se tomaban 500 µl del cultivo y se sometían a centrifugación en tubo Eppendorf durante 1 minuto. El sedimento celular era resuspendido en 100 µl de la solución formada por Tris 50 mM pH 8,0 y EDTA 2 mM y seguidamente se añadía lisozima hasta obtener una concentración de 100 µg/ml. Tras 15 minutos de incubación a 30°C el tubo era centrifugado durante 2 minutos y el sedimento y sobrenadante resuspendidos en la solución amortiguadora de lisis (1x y 2x respectivamente) y sometidos a ebullición durante 5 minutos.

El análisis de las proteínas se realizaba mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 10%. La proteína de expresión era fácilmente identificada mediante tinción con Azul de Coomassie.

En los experimentos en que la proteína heteróloga se identificó mediante marcaje con [³⁵S]-metionina se procedió de igual modo, excepto que después de añadir la rifampicina, se incubaba el cultivo a 30°C durante el período que duraba el experimento. A diferentes tiempos se tomaban muestras de 60 µl del cultivo. Estas se incubaban con 1,2 µCi de [³⁵S]-metionina durante 5 minutos a 30 °C. Las células se recogían mediante centrifugación a 15.000 g y se resuspendían en 10 µl de la solución de lisis indicada anteriormente. En este caso, el gel de poliactilamida conteniendo las proteínas sintetizadas era fijado en una solución compuesta por isopropanol al 25% (vol/vol) y acético al 10% (vol/vol) durante 30 minutos. La detección de la señal radioactiva se realizó por fluorografía. Para ello el gel era bañado en una solución intensificadora de la señal (Amplify, Amersham) durante 30 minutos y se secaba al vacío durante 2 horas a 75°C. La exposición se realizaba con película X-OMAT AR (Kodak) durante unas 12 horas.

7.2. AISLAMIENTO DEL INMUNOGENO.

Unos 6-8 mg de proteína total bacteriana eran sometidos a electroforesis en geles de poliactilamida (19:1) al 10% (p/vol) en presencia de SDS. Los geles eran lavados 2 ó 3 veces con agua y teñidos durante 1 hora en solución de Azul de Coomassie R-250 al 0,25% (p/vol) en agua. Seguidamente los geles eran desteñidos con sucesivos lavados en agua, hasta la visualización de la banda correspondiente a la proteína que se había sobreexpresado. La porción de gel conteniendo esta banda (unos 200-300 µg de proteína) era recortada y la poliactilamida

2. MATERIALES Y METODOS.

era troceada finamente. Una vez deshidratada por liofilización durante 2 días, era reducida a polvo en un mortero y finalmente hidratada con 500 µl de PBS. La homogenización de la masa se efectuaba mediante sucesivos pases a través de agujas de 0,8 mm de diámetro. Finalmente se añadían 500 µl de adjuvante de Freund completo (Pierce), se mezclaba y se inyectaba subcutáneamente a conejos hembra de raza New Zeland de 6 meses de edad. Las inyecciones se repetían siguiendo intervalos de 20 días, utilizando en estos casos adjuvante de Freund incompleto.

7.3. PURIFICACION PARCIAL DEL ANTISUERO.

10 días después de cada inyección los conejos eran sangrados mediante un corte en la vena marginal de la oreja. La sangre recogida se dejaba coagular durante 2 horas a 30°C, y el suero era obtenido después de una centrifugación a 3.000 g durante 10 minutos.

La eliminación de buena parte de la albúmina del suero se conseguía tras la precipitación de las globulinas al añadir al suero un volumen de sulfato amónico al 90% de saturación y agitar durante 30 minutos a 4°C. La albúmina se separaba por centrifugación a 10.000 g durante 20 minutos y el sedimento era resuspendido en la mitad del volumen inicial de suero de la solución amortiguadora TBS. El sulfato amónico era eliminado mediante sucesivas diálisis frente a TBS a 4°C. Posteriormente los antisueros eran distribuidos en alícuotas y guardados a -20°C.

7.4. WESTERN BLOTS.

7.4.1. PREPARACION DE EXTRACTOS.

Las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas eran crecidas en medio YPD o SD sin leucina hasta la fase exponencial. Un volumen de cultivo conteniendo aproximadamente 150 mg de células era centrifugado a 3.000 g a 4°C durante 10 minutos. Las células se lavaban en solución amortiguadora A fría (Tris 50 mM, pH 7,2; EDTA 5mM; EGTA 2 mM; sacarosa 0,6 M). Posteriormente eran resuspendidas en 500 µl de la solución A conteniendo leupeptina 0,2 µg/ml, DTT 2 mM y PMSF 0,5 mM. A esta suspensión se le añadía un volumen de bolas de vidrio de 0,5 mm de diámetro frías y las células eran fragmentadas mediante 5 series de agitación mecánica vigorosa de 60 segundos de duración cada una, separados por el mismo

2. MATERIALES Y METODOS.

período de tiempo de permanencia en hielo. Las muestras eran centrifugadas a 3.000 g durante 15 minutos a 4°C y los sobrenadantes repartidos en dos fracciones. Una de ellas, destinada a la determinación de proteínas totales, era inmediatamente congelada a -20°C. El resto del extracto era diluido al 50% con un volumen del siguiente tampón: Tris-Cl 42mM, pH 6,8; β -mercaptoetanol al 1% (vol/vol) y SDS al 2% (p/vol), y sometido a ebullición durante 5 minutos antes de ser cargado en el gel de electroforesis.

7.4.2. SEPARACION ELECTROFORETICA.

Las electroforesis se realizaron en geles al 8% (p/vol) de poliacrilamida (19:1) en presencia de SDS [Laemmli, U.K. (1970)]. A las muestras se les añadía 1/3 vol. de la solución acuosa compuesta por Azul de Bromofenol al 0,05% (p/vol) y sacarosa al 20% (p/vol). Seguidamente eran hervidas durante 5 minutos y cargadas en el gel de poliacrilamida. Las electroforesis se realizaban a intensidad constante (30 mA mientras las muestras están en el gel empilador y 40 mA cuando entran en el gel separador). Una vez finalizada la electroforesis, la sección del gel correspondiente a los marcadores se teñía durante 30 minutos en un baño de Azul de Coomassie R-250 al 0,25% (p/vol), ácido acético glacial al 10% (vol/vol) y alcohol isopropílico al 25% (vol/vol). Posteriormente el gel era desteñido en una solución idéntica a la anterior pero en ausencia del colorante. El resto del gel era procesado según se describe en el apartado siguiente.

7.4.3. ELECTROTRANSFERENCIA E INMUNODETECCION DE LAS PROTEINAS.

La electrotransferencia de las proteínas del gel se realizaba sobre membranas Immobilon-P (Millipore) en un aparato Trans Blot modelo 2051 (LKB). La transferencia se realizaba a 250 mA durante unas 3 horas en tampón de electrotransferencia.

Posteriormente la membrana era saturada durante al menos 1 hora con una solución bloqueante compuesta por Tris 50 mM, pH 8,5; CaCl₂ 4mM; NaCl 150 mM; leche en polvo desnatada Molico (Nestlé) al 5% (p/v); Nonidet-P 40 al 0,2% (v/v) y azida sódica al 0,01% (p/v). Transcurrido este tiempo se incubaba una noche a 4°C en una dilución 1:50 del antisuero anti-PPZ1. Tras esta incubación las membranas eran lavadas con la solución bloqueante y posteriormente incubadas con 0,1 μ Ci/ml de [¹²⁵I]-proteína G (15-20 mCi/mg de proteína),

(Amersham) en la misma solución durante 1 hora. Posteriormente las membranas eran lavadas en la solución bloqueante y finalmente lavadas en la solución amortiguadora TBS, para después secarlas a temperatura ambiente y proceder a su autorradiografía.

8. ANALISIS DE TETRADAS.

La esporulación de las células diploides de levadura se conseguía después de al menos cuatro días de incubación a temperatura ambiente en placa de medio de esporulación. Se tomaban las células mediante Asa de Kolle y se resuspendían en 500 µl de agua destilada estéril, a la que se añadía 20 µl de Glusulasa (DuPont) y se dejaba incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Pasado este tiempo, se añadían 10 ml de agua destilada estéril muy lentamente y se centrifugaba a 1.000 g durante 10 minutos. El sobrenadante era desechado y utilizábamos la última gota de éste para resuspender las células. Inmediatamente se procedía a la separación de las esporas de cada tétrada sobre placa de agar al 3% (p/vol) en YPD. Para ello se empleaban microagujas de unos 40 µm de diámetro obtenidas mediante estiramiento en caliente de una varilla de vidrio de 2 mm de diámetro. La disección de las esporas se realizaba utilizando un micromanipulador Narishige modelo MN-151 acoplado a un microscopio Nikon TMS a 400 aumentos. La germinación de las esporas tenía lugar a 30°C.

9. ANALISIS FENOTIPICOS.

9.1. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD GLUCOGENO SINTASA.

9.1.1. PREPARACION DE EXTRACTOS CELULARES.

Un volumen de cultivo conteniendo aproximadamente 150 mg de peso seco de células de levadura era recogido por filtración al vacío en filtros de nitrocelulosa de 0,45 µm (Millipore), lavado con agua fría e inmediatamente resuspendido en 500 µl del tampón de homogenizar frío descrito en el apartado 4.1.1 de este capítulo conteniendo fluoruro potásico 100 mM, PMSF 0,5 mM, benzamidina 0,5 mM y DTT 2 mM. Se añadía un volumen de bolas de vidrio frías y las células eran homogeneizadas mediante agitación vigorosa (5 pulsos de un minuto seguidos de un minuto en hielo). Las muestras eran centrifugadas a 3.000 g durante 10 minutos a 4°C y los sobrenadantes eran inmediatamente utilizados para la realización del ensayo.

9.1.2. ENSAYO DE ACTIVIDAD GLUCOGENO SINTASA.

El estado de activación de la glucógeno sintasa se determinó por el cociente de sus actividades en ausencia y en presencia de glucosa 6-fosfato. Para ello se medía la incorporación de [¹⁴C]glucosa al glucógeno, utilizando como sustrato UDP-[¹⁴C]glucosa según el método descrito por Thomas, J.A. y col. (1968).

La solución empleada en los ensayos de actividad independiente de glucosa 6-fosfato estaba formada por UDP-glucosa 6,7 mM, glucógeno 10 mg/ml, fluoruro potásico 25 mM, EDTA 20 mM y Tris-Cl 50 mM ajustada a pH 7,8 con HCl. La solución empleada para la determinación de la actividad glucógeno sintasa total contenía además el efector alostérico glucosa 6-fosfato a la concentración de 10 mM. La radiactividad específica era de 110.000 cpm/nmol de UDP-glucosa en los ensayos en presencia de glucosa 6-P, y de 220.000 cpm/nmol de UDP-glucosa en los que estaba ausente. El glucógeno empleado era purificado previamente empleando la resina intercambiadora de iones AG 501-X8 (Bio-Rad Lab.), tras lo cual se precipitaba con etanol al 66% (vol/vol) y se secaba a 37°C.

La reacción enzimática se iniciaba al adicionar 20 µl del extracto celular a 40 µl de la solución de ensayo descrita atemperada a 30°C y se prolongaba durante 15 minutos. Para parar la reacción se tomaban 50 µl de la mezcla y se depositaban sobre un cuadrado de papel Whatman 31 ET (2 x 2 cm) que se sumergía en etanol al 66% (vol/vol) frío. El glucógeno precipitado sobre la malla del papel era separado del sustrato no transformado mediante sucesivos lavados de 10, 20 y 30 minutos de duración con etanol al 66% (vol/vol). Finalizados los lavados, el papel conteniendo el glucógeno radioactivo era secado en una estufa e introducido en un vial que contenía la mezcla de líquido de centelleo "Ready Safe" (Beckman) y su actividad medida en un contador de centelleo líquido 1217 Rackbeta (LKB).

El UDP-[¹⁴C]glucosa se sintetizó según el procedimiento descrito por Thomas, J. A. y col. (1968) a partir de α-D-[U-¹⁴C] glucosa con las modificaciones realizadas por Tan, A.W.H. (1979).

9.2. SENSIBILIDAD A LA FEROMONA FACTOR α .

Para comprobar si el factor α es capaz de inducir la inhibición del crecimiento de las células haploides *MAT a* portadoras de la interrupción del gen *PPZ1*, se utilizó el método descrito por Elion, E.A. y col. (1990) en el que se utiliza la aparición de un halo de ausencia de crecimiento sobre una placa. Para ello se preparaba un cultivo durante una noche en medio YPD o medio sintético y se mezclaban 0,1 ml de éste cultivo con 3,7 ml de agar al 0,7% (p/vol) en YPD (pH 4,0) antes de verterlo sobre una placa de agar al 2% (p/vol) en YPD. Una vez solidificado el agar, se colocaban discos estériles de antibiograma (Difco) conteniendo 8 μ l del factor α diluido en metanol (0,6-2,5 μ g/ μ l) y se incubaba a 30°C.

9.3. SENSIBILIDAD AL CHOQUE TERMICO.

La sensibilidad al choque térmico se examinó inoculando las células en placas de agar al 2% (p/vol) en YPD precalentadas a 55°C. Seguidamente se incubaban durante 45 minutos a 55°C y entonces se incubaban durante dos días a 30°C antes de calcular el crecimiento. Puesto que este tratamiento reduce la viabilidad de las cepas *bcy1* en las que la hiperfosforilación por la PK-A conduce a la sensibilidad al choque térmico, se utilizó una cepa *bcy1* como control positivo.

10. OTRAS TECNICAS.

10.1. DETERMINACION DE PROTEINAS TOTALES.

La determinación de proteínas totales presentes en los extractos celulares se realizó mediante el método del Biuret, descrito por Layne, E. (1957) y basado en el de Gornall y col. (1949), utilizando BSA como patrón.

10.2. DETERMINACION DE GLUCOSA.

Para la determinación de la glucosa presente en el medio de cultivo se utilizó una variante de la técnica de la hexoquinasa glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, descrita por Bergmeyer, H.U. y col. (1974) y que se obtiene ya de forma comercializada (Gluco-Quant, Boehringer Mannheim) en adaptación para un autoanalizador de tipo Cobas Bio (Roche).

3.- RESULTADOS.

1. AMPLIFICACION DE SECUENCIAS GENOMICAS RELACIONADAS CON PROTEINA FOSFATASAS.

1.1. SELECCION DE LOS OLIGONUCLEOTIDOS.

Con el objetivo de clonar nuevas proteína fosfatasas de levadura se utilizó la técnica de PCR para amplificar, a partir de DNA genómico de *S. cerevisiae*, fragmentos pertenecientes a presuntos genes de proteína fosfatasas.

En la elección de los cebadores se tuvo en cuenta la presencia de secuencias aminoacídicas extremadamente conservadas no sólo entre las proteína fosfatasas de mamífero tipo 1, 2A y 2B, sino también entre las nuevas fosfatasas de mamíferos (*PPY*, *PPX*) o de *Drosophila* (*PPV*) recientemente clonadas. Las secuencias de las proteína fosfatasas de *S. cerevisiae* conocidas al inicio de este trabajo (*SIT4*, *DIS2S1*, y poco tiempo tiempo después, *PPH21* y *PPH22*) también contienen las regiones conservadas. En la figura 1 se muestran las secuencias de proteína fosfatasas de mamífero, señalándose mediante recuadros las regiones comunes entre ellas.

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en la amplificación (MP-1s y MP-3as) son los mismos con los que el laboratorio de G.L. Johnson (Natl. Jewish Center, Denver CO) logró amplificar fragmentos de DNA correspondientes a diversos isotipos de PP-1, PP-2A y PP-2B de dos diferentes líneas celulares [Wadzinski, B.E. y col. (1990)]. Los oligonucleótidos fueron sintetizados en un sintetizador Applied Biosystems y gentilmente cedidos por el Dr. Johnson. Las secuencias de los oligonucleótidos se encuentran en la figura 2. A sus extremos 5' se les ha añadido las secuencias de reconocimiento de los enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*, para facilitar la clonación de los fragmentos amplificados.

```

PrP-2B : MSEPKAIDPKLSTDRVVKAVPFPPSHRLTAKEVFDNDGKPRVDILKAHLMKEGRLEESV
PrP-1a : .....msdse-lnl-siiqrlLEVggsrpg-nvq-t-ne
PrP-2Aa : .....mdEkvftkeL-qwieq-neckq-s-q
PrP-2C : -gafldkpkmekhnaqqgnglryglssmqgwrvmemahta-ig-psg-etwsffavdy

PrP-2B : ALRIITEGASILRQEKNLDDIDA           I           FFDLMKLF.EVGGSPA...NTRVLF
PrP-1a : : irgLclksre-flsqpl--ELE-   LKI           YY--LR--.-Y--F-P...ESN--
PrP-2Aa : : vkslcekake--tkeanvqEVrc           V           -H---E---RI--KSP...D-N--
PrP-2C : : ghagsqvakyceh...---hitnnqdfkgsa-apsavenv-ngirt-fleidehmrvmse

PrP-2B :           II                     III           LGDYVDRGQYFSIECVLYLWALKILYPKTLFLLRGNHECHLTEYFTFKQECKIKY..SER
PrP-1a : : -----KQ-L-TICL-L-Y--K--ENF-----SINRIYG-YD---RR-.NIK
PrP-2Aa : : M-----Y-V-T-TL-V---VR-RERTI-----S-QI-QVYG-YD--LR-g.NaM
PrP-2C : : kkhga-  sgstavq--IspqhtYfIncgdS.   -ll-  nrkvhFftqDhkpsNpleK--

PrP-2B :           IV           VYDA.....CMAFDCLPLAALMNOQFLVHGGLSP*EINTLDDIR.KLDRFKEPPA..
PrP-1a : : LWKT.....FT-C-N---I--IVDEKIF-C-----DLQSMEQ---RIM-PTDV-D..
PrP-2Aa : : VWKy.....FT-L-Y---T--VDG-IF-L-----S-D---H---A---LQ-V-H..
PrP-2C : : IIQnagqsvmIqrVngsLavsraLgDfdYK           kgpt-qlvspepevhdiers-edDqf

PrP-2B :           V           YGPM*  EDILWSDHLEDFGNEKTQEHFTHNTVRCGSYFYSPAVCDFLQHNLLSILRAHEA
PrP-1a : : Q-LL-L-  DK-VggvgenD.....-V-FTFGAEV-AK--HKHD-DL-C---QV
PrP-2Aa : : E-  -L-  DDrg-wgisprgagytfgqdi-eTFnhangltlvrsrahq-vmegynwc
PrP-2C : : iila-  -g-  HvmgnEELcdfvrsrlevtddleKvcneVvdtcLykgsrd-mSv--icfpn

PrP-2B :           VI           QDAGYRMYRKSQTGFPSLITIFSAPNVLDVYNNKAAVLKYENNVNINRQFNCSHPYWL
PrP-1a : : VED--EFFA-R.....-V-L-----Cgefd-ag-MMSVDEtL-csf-ilk.-AdKnk
PrP-2Aa : : hdrnvv.....          Cyrcg-qa-IMeLDDtIkysflqfd.-ApRrg
PrP-2C : : apkvsaeav-kealdky-enrveeilkqgegvpdLVhvHrtlasenisp.-ggela

PrP-2B : PNFMDVFTWSLPPFVGEKVTEMLVNVLNICSDDELGSEEDGFDGATAAARKEVIRNKIRAI
PrP-1a : : gkygqlsglnpggrpitpprnsakakk.....
PrP-2Aa : : ephvtrrtptyfl.....
PrP-2C : : skrnvieavynrlnpyknddtsastdmw.....

PrP-2B : GKMARVFSVLREESESVLTLKGLTPGMPLPSGVLGGKQTLQSATVEAIEADEAIKGFSP
PrP-1a : : .....
PrP-2Aa : : .....
PrP-2C : : .....

PrP-2B : QHKITSFEEAKGLDRINERMPPRRDAMPSDANLNSINKALASETNGTDSNGSNSNIQ
PrP-1a : : .....
PrP-2Aa : : .....
PrP-2C : : .....

```

Figura 1. Comparación de secuencias de serina-treonina proteína fosfatasa. En la alineación se han utilizado las secuencias de mamífero correspondientes a las subunidades catalíticas de la PP-2B [Kinkaid, R.L. y col. (1990)], PP-1B [Berndt, N. y col. (1987)], PP-2AB [Ariño, J. y col. (1988)] y PP-2C [Tamura, S. y col. (1989)]. Las regiones con mayor identidad entre los diferentes tipos de proteína fosfatasa han sido incluidas en bloques. De éstos, los bloques V y VI han sido utilizados para diseñar los oligonucleótidos empleados.

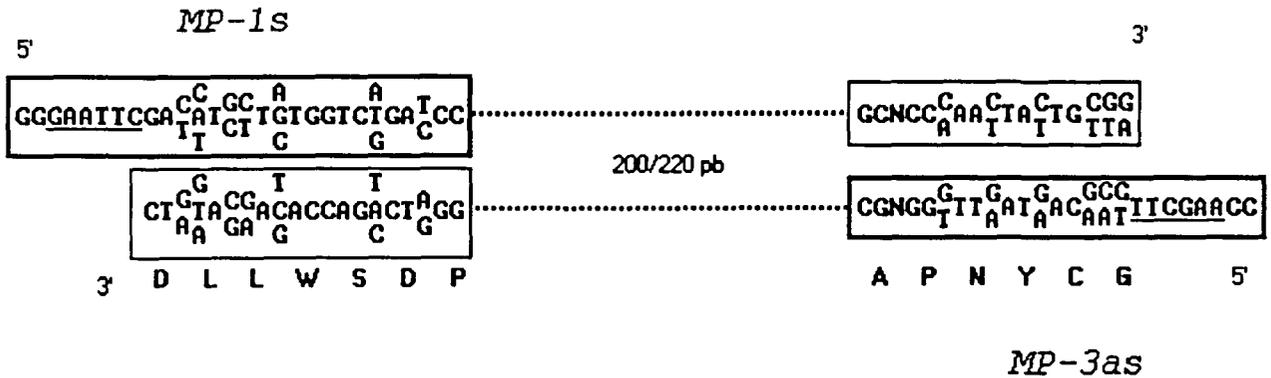


Figura 2. Las cajas gruesas contienen las secuencias de los oligonucleótidos empleados mientras que en las finas se representan las secuencias complementarias. Las dianas de restricción para *EcoRI* (en el MP-1s) y *HindIII* (en el MP-3as) se encuentran subrayadas. En el exterior de las cajas se representan los aminoácidos codificados conservados en diversas proteína fosfatasas.

1.2. AMPLIFICACION MEDIANTE PCR.

Para la amplificación se utilizaron 0,2 µg de DNA genómico preparado a partir de la cepa M5. En una mezcla conteniendo Tris-Cl 10 mM (pH 8,4), cloruro potásico 50 mM, gelatina 0,1 mg/ml, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada oligonucleótido y 2,5 unidades de *Taq* polimerasa, se ensayaron cuatro concentraciones diferentes de magnesio (1, 2, 5 y 6,5 mM). Las condiciones de la amplificación fueron: 94°C durante 2 min, 50°C durante 2 min y 72°C durante 2 min. Después de 30 ciclos, un volumen equivalente a 1/10 de la mezcla de amplificación fue sometido a electroforesis en gel de agarosa. La fotografía del gel (Figura 3) muestra que a concentraciones de magnesio menores de 5 mM, se lograron amplificar fragmentos de DNA de aproximadamente 225 y 250 pb. Cuando se utilizó magnesio 5 mM se amplificaron además fragmentos de 140 y 320 pb aproximadamente.

Además de la temperatura de renaturalización mencionada (50°C), la amplificación se realizó también a 45 y 55°C. En el caso de mayor permisibilidad, además de los fragmentos de DNA esperados de 220-260 pb, se encontraron también fragmentos de aproximadamente 320 y 140 pb cuando la amplificación se realizó a concentraciones de magnesio de 2 ó de 5 mM.

3. RESULTADOS.

Estas dos últimas bandas eran las que mostraban mayor interés, puesto que se encontraban comprendidas dentro del rango de tamaño donde deberían estar las secuencias que codifican proteínas fosfatasas y, por ello, son las estudiadas en este trabajo. Cuando la amplificación se realizó a 55°C, únicamente se detectó una doble banda de fragmentos de 225 y 250 pb, siendo la concentración óptima de magnesio de 2 mM.

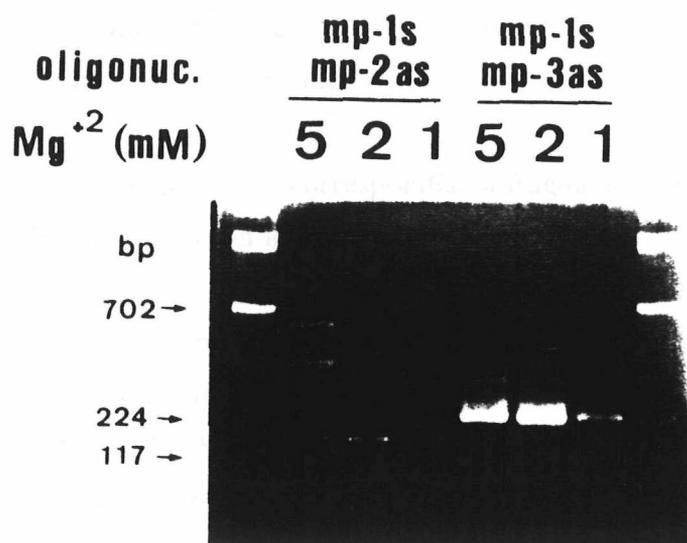


Figura 3. Una fracción del volumen total de la mezcla de amplificación se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% (p/vol). En la fotografía se muestran los fragmentos amplificados a concentraciones de Mg²⁺ de 5, 2 y 1 mM y a una temperatura de renaturalización de 50°C.

1.3. SECUENCIACION DE LOS FRAGMENTOS DE AMPLIFICACION.

La mezcla de amplificación (9/10 del volumen) fue purificada con fenol-cloroformo, precipitada con etanol y digerida con los enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*. Los fragmentos amplificados por PCR se sometieron a electroforesis y se extrajeron de la agarosa, y el DNA purificado se ligó con los vectores Bluescript SK+, M13mp18 o M13mp19 digeridos previamente con *EcoRI* y con *HindIII*.

Los clones así obtenidos fueron analizados mediante secuenciación del DNA, revelando cuatro diferentes secuencias relacionadas con serina/treonina fosfatasas. El número total de clones investigados fue de 74, de los que se secuenciaron 23. La identidad de los restantes se estableció por hibridación en slot-blot (ver 2.5.4) en condiciones de alta selectividad, utilizando como sonda los clones previamente secuenciados.

Dos tipos de las secuencias amplificadas correspondían a fragmentos de proteína fosfatasas de *S. cerevisiae* ya identificados como son los genes *SIT4* y *PPH22*.

Además de los clones conteniendo secuencias de las dos fosfatasas de levadura ya conocidas, se identificaron otras dos secuencias claramente relacionadas con fosfatasas. Una de estas secuencias, procedente del clon ST13-2 y de la que se identificaron 9 clones, codificaba un fragmento de proteína de 60 aminoácidos, que resultó ser idéntico a un fragmento de la secuencia de la proteína denominada PPZ1 y cuya secuencia se refleja en la figura 4.

PPZ1 había sido descrito en el laboratorio de Cohen [Cohen, P.T.W. y col. (1990)] como una presunta serina/treonina fosfatasa de 348 aminoácidos a partir de la secuencia obtenida de un cDNA de cerebro de conejo. Sin embargo, los autores no llegaron a publicar la secuencia nucleotídica de este gen.

<u>GAT CTT TTG TGG TCC GAT CCC</u> ACA GAT TCA CCC AAC	36
D L L W S D P T D S P N	
GAA TGG GAG GAT AAC GAA CGT GGT GTA AGT TAC TGT	72
E W E D N E R G V S Y C	
TAT AAT AAG GTG GCA ATT AAC AAA TTC TTG AAC AAG	118
Y N K V A I N K F L N K	
TTT GGG TTT GAT TTG GTT TGT AGA GCT CAC ATG GTT	154
F G F D L V C R A H M V	
GTG GAA GAC GGT TAT GAA TTT TTC AAT GAT AGA AGT	190
V E D G Y E F F N D R S	
CTC GTT ACG GTG TTT TCC <u>GCG CCA AAT TAT TGT GG</u>	226
L V T V F S A P N Y C	

Figura 4. Secuencia nucleotídica y predicción de aminoácidos del clon ST13-2. Las bases subrayadas corresponden a la región que corresponde con los oligonucleótidos empleados.

La total identidad de secuencia aminoacídica entre el clon ST13-2 de levadura y la PPZ1, y el hecho de encontrar que ST13-2 hibridaba con un mRNA de mayor tamaño del esperado (como se verá en 3.4.1), indujo a la clonación e identificación del gen completo de *S. cerevisiae*, el cual es objeto de estudio en este trabajo.

Conviene advertir a partir de este momento que el presunto cDNA de cerebro de conejo resultó ser una contaminación por secuencias de DNA de levadura de la biblioteca empleada y que, por tanto, la secuencia publicada era la de un fragmento parcial del gen objeto de este

trabajo. Sin embargo, nosotros decidimos mantener el nombre original de *PPZ1* para designar esta secuencia, aún después de que el laboratorio de Cohen rectificara la información errónea [Da Cruz e Silva, E.F. y col. (1991)].

2. CLONACION DEL GEN *PPZ1*.

2.1. LOCALIZACION CROMOSOMICA.

El experimento de Southern blot realizado con los cromosomas de *S. cerevisiae* evidenció que el gen *PPZ1* se encuentra en el cromosoma XIII, como se puede apreciar en la figura 5-B. La identificación del cromosoma se realizó por comparación de la banda de la autorradiografía con el patrón de los cromosomas visibles mediante bromuro de etidio.

2.2. ANALISIS GENOMICO MEDIANTE SOUTHERN BLOT Y CONSTRUCCION DE LA BIBLIOTECA DE DNA.

El DNA genómico de levadura fue digerido con diferentes enzimas de restricción, sometido a electroforesis en geles de agarosa y transferido. En la figura 5-B se muestra el resultado obtenido después de hibridar la sonda ST13-2 con el DNA genómico digerido.

Los experimentos de Southern blot indican que la sonda ST13-2 se encuentra situada dentro de un fragmento *PstI-PstI* de DNA genómico de unas 4,5 Kpb.

La información obtenida a partir de los experimentos de Southern blot fue utilizada para diseñar una estrategia de clonación basada en el análisis de una biblioteca de DNA de tamaño seleccionado.

Para digerir el DNA genómico con el que construir la biblioteca se eligió el enzima *PstI*, en la confianza de que la sonda ST13-2 hibridaba con un único fragmento de DNA que era lo suficientemente grande (unas 4,5 kpb) como para tener razonables posibilidades de contener el gen completo y, a la vez, de un tamaño no excesivo, lo que podría simplificar el aislamiento del gen.

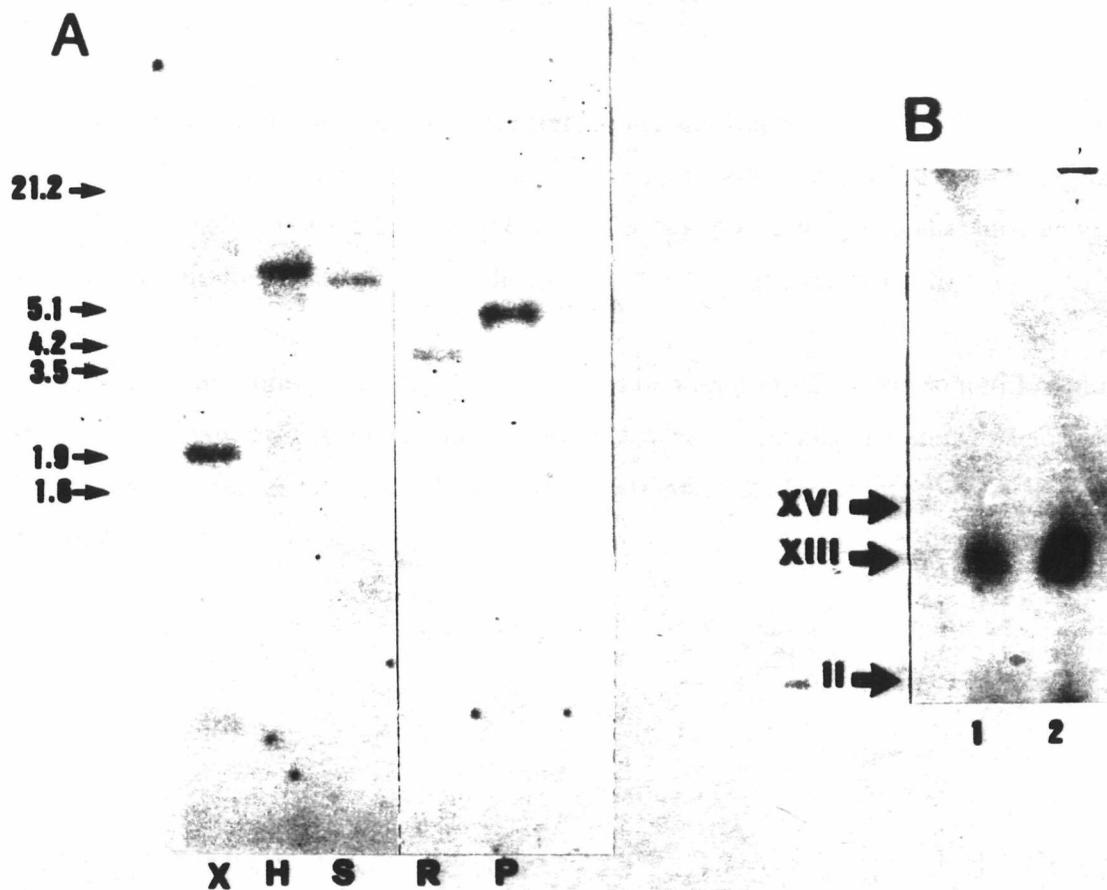


Figura 5. A) El DNA de levadura se digirió con diferentes enzimas de restricción. Los productos de las reacciones se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0,7% (p/vol) y se transfirieron a membranas de nylon, las cuales fueron hibridadas con el fragmento ST13-2 marcado con digoxigenina. Los lavados se realizaron a 60°C en 0,1x SSC y 0,1% SDS (p/vol) y el revelado se llevó a cabo utilizando X-fosfato y NBT como sustratos de la fosfatasa alcalina. Los numeros de la izquierda indican la migración de los marcadores de DNA y se expresan en kpb. X: *Xba*I, H: *Hind*III, S: *Sac*I, R: *Eco*RI, P: *Pst*I. B) Los cromosomas de levadura fueron separados en PFGE, transferidos a membranas de nylon e hibridados con el fragmento ST13-2 marcado con [³²P]dCTP. Los filtros se lavaron en 0,1 x SSC y SDS al 0,1% (p/vol) a 65°C. La migración de tres cromosomas se muestra a la izquierda. Los carriles 1 y 2 contienen diferente cantidad de DNA cromosómico.

De este modo, la transformación y plaqueo de la biblioteca produjo unos 1.400 clones independientes. La biblioteca se manejó sin amplificación posterior.

2.3. ANALISIS DE LA BIBLIOTECA E IDENTIFICACION DE LOS CLONES POSITIVOS.

Esta biblioteca fue plaqueada y transferida a membranas de nylon. El fragmento de amplificación ST13-2 marcado con digoxigenina fué hibridado con los filtros y estos fueron lavados a 55°C en solución de 0,1 x SSC y SDS al 0,1%. De este modo se encontró una única colonia positiva, que fué aislada y analizada como se describe a continuación.

El inserto contenido en el clon positivo, que se denominó PPZ-A, fué sometido a análisis de restricción mediante digestiones con diferentes enzimas y posterior determinación de los tamaños de los fragmentos liberados. El mapa de restricción del fragmento PPZ-A se muestra en la figura 6.

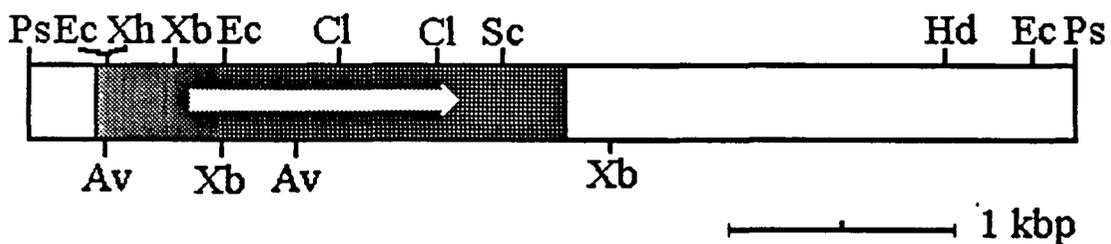


Figura 6. Mapa de restricción del clon PPZ-A. La región sombreada corresponde al ORF de PPZ1. Ps: *PstI*, Ec: *EcoRI*, Xh: *XhoI*, Xb: *XbaI*, Cl: *ClaI*, Hd: *HindIII*, Sc: *SacI* y Av: *AvaI*.

3. RESULTADOS.

Con el producto de las digestiones separado electroforéticamente se realizó un experimento de Southern blot, utilizando el fragmento ST13-2 como sonda, para verificar que el clon PPZ-A contiene la mencionada secuencia amplificada por PCR, y situarla en el mapa de restricción. La sonda ST13-2 hibridó un el fragmento *BglIII/XbaI* de 0,79 kpb y por lo tanto se situó a 2,2 kpb del extremo 5' del clon PPZ-A.

3. SECUENCIACION DEL ORF CORRESPONDIENTE A PPZ1.

A partir del mapa de restricción del clon PPZ-A y una vez conocida la situación aproximada de la secuencia ST13-2, se elaboró la estrategia de subclonación en M13mp18 y M13mp19 que se esquematiza en la figura 7 con el fin de proceder a la secuenciación del gen.

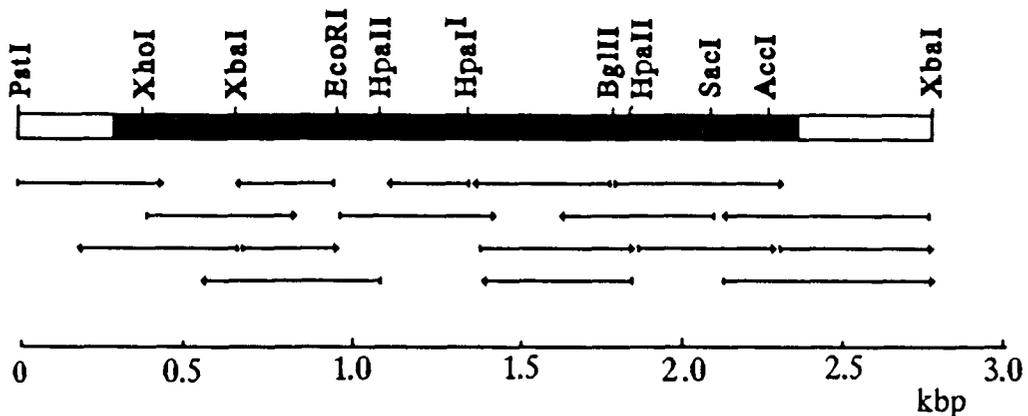


Figura 7. Esquema de la estrategia de secuenciación. El segmento oscuro corresponde al ORF de 2.076 pb. El clon PPZ-A se extiende 1,5 kpb hacia el extremo 3' desde la segunda diana *XbaI* representada antes de encontrar la siguiente secuencia *PstI*. Únicamente se indican las dianas de restricción relevantes en el proceso de subclonación.

3. RESULTADOS.

La secuencia nucleotídica completa del gen *PPZ1* y la aminoacídica prevista se muestran en la figura 8.

	CGACAACAGTTCCTCTAATTCTGTTAATCAGCTTTCTCTT	40
	GTGAACCATTGGCAGGTGGGTAAACATAAAAGCACATAACAATAGCTTCCATTATTAGTTTTGTTGTTTTGGCAATACATGTTAAATCCTT	130
	TTTCTTTCAAGTTAAATATAAAAGATTATATAAAAAGTACTTCTTTGGAATACATTTGATTATACTTTCTTTATCGTTTTATTTTTATT	220
	TCATCGTTATAGTCGCTTCTTTTCCCTAGAGGCTTTGTCAATAAAACAACAAATCAACCACCTCTCTGCTTATCTTTCTCTCTCTTTTCAAA	310
	ATGGTAAATCAAGTTCAAAATCTCGAAAAAGGATTCACATTCGAATTCCTCCTCGAGAAATCCTCGTCTCAAGTGTGAGAACCAG	400
1	M G N S S S K S S K K D S H S N S S S R N P R P Q V S R T E	
	ACTTCCCATTCTGTGAAGTCTGCAAAATCAAATAAATCTTCAAGATCAAGGGCATCTTCTCTTCTCGTCCACTACGAATACTAATTC	490
31	T S H S V K S A K S N K S S R S R R S L P S S S T T N T N S	
	AACGTCCTGATCCCTCCATCCATCAAAGCCCAATCTTGAGTTAATCACCAACGACATAGCTCTCACACGAATCGTTACCATTTCCCA	580
61	N V P D P S T P S K P N L E V N H Q R H S S H T N R R Y H F P	
	TCTAGCTCACACTCGCATTCAAATCTCAAACGAATGTTAACTACTCCTTCATCATCCTCTACTAAGAGGCCCTTCTACTCTAGAAGA	670
91	S S S H S H S N S Q N E L L T T P S S S S T K R P S T S R R	
	TCAAGTTATAACTAAGGCTGCTGATTTACCACCTTCAATGATCCAAATGGAACCCAAAGTCACCCATTTAAAAACAACAATAGT	760
121	S S Y N T K A A A D L P P S M I Q M E P K S P I L K T N N S	
	AGCACACAGTATCCAAGCATAAATCTTACTACTCATCTACCTATTATGAGAAGCCCTTAACCGATGATGACAATGATGATAAAGACAAC	850
151	S T H V S K H K S S Y S S T Y Y E N A L T D D D D N D D K D N	
	GACATCTCGCACACTAAAAGGTTTTCTAGATCTTCAATCTCGTCCGTCAGTATAAGAAGCGGATCAGTGTCAAGAAGGAAATCAGAT	940
181	D I S H T K A R F S R S N S R P A K R S I R S G S V C L K N N S	
	GTGACCCATGAAGAGCCTAACAAATGGATCATACTCCTCTAACAAATCAGGAGAATTATCTCGTTCAGGCATTAACCCGGTCAAATCTCAT	1030
211	V T H E E P N N G S Y S S N N Q E N Y L V Q A L T R S N S H	
	GCATCTCGTACACAGTAGGAAATCTCGTTGGATCAGATGGTAATACCGCATACAGCACCCCATTAACCTCTCCAGGCTTGCCAAH	1120
241	A S S L H S R K S S F G S D G N T A Y S T P L N S P G L S K	
	CTAACAGATCACTCTGGTGAATACTTTACTCTAATCAACCTCCTCATTGAATCACCATCAAGTCGGATATTTACCCGAGCAAACAC	1230
271	L T D H S G E Y F T S N S T S S L N H H S S R D I Y P S K H	
	ATCAGCATGATGATGACATGAAAATTCATCTCAATGAGTAAATCCATGCATCAATGGAATAATGTAATGATAAAAAATAATAATA	1320
301	I S N D D D I E N S S Q L S N I H A S M E N V N C L K N N E I	
	ACAGATAGCAAAAAAGATCCGAATGAGGATTAATGATATAATGCAATCTCCGGGAACAAAAACGCTCAAAAAAATCAAAAAAGCCT	1410
331	T D S K K D P N E G F N D I M Q S S G N K N A P K K F K K P	
	ATCGATTTGATGAAACTATCAAAAAATCTGGATGCGGGCTACGCTGCTAAGAGAACAACAAAAATGTTGTTGAAGAACAATGAAAT	1500
361	I D I D E T I Q K L L D A G Y A A K R T K N V C L K N N E I	
	TTACAGATTTGCATCAAGGCTCGTGAATCTTTCTTCTCAACCTCCTTATTAGAATTATCACCTCTGAAAAATGTAGGCGACGTT	1590
391	L Q I C I K A R E I F L S Q P S L L E L S P P V K I V G D V	
	CATGGCCAATGGGGATCTCTTAAGGCTTTTACCAATGTGGGTCCCACCATCTCGAACTATTTATTCCTAGGTGATTATGTGGAC	1680
421	H G Q Y G D L L R L F T K C G F P P S S N Y L F L G D Y V D	
	CGTGGTAAACAGTCACTGGAGACTATTTACTATTGTTTTGTACAAAAATAAATACCCTGAAAATTTCTTTTTATTGAGAGGCAACCAT	1770
451	R G K Q S L E T I L L L F C Y K I K Y P E N F F L L R G N H	
	GAATGTGCTAACGTCACAAGGGTTATGGATTTTATGATGAATGTAACGTCGTTGTAACATCAAGATCTGGAAGACATTCATCGTACT	1860
481	E C A N V T R V Y G F Y D E C K R R C M I K I W K T F I D T	
	TTTAATACATTACCATTAGCTGCTACTGCTAGCCGGAAGATTTTTGTGTTTCATGGTGGATGTGCGCCAGTTTTAAATCTATGGATGAA	1950
511	F N T L P L A A I V A G K I F C V H G G L S P V L N S M D E	
	ATCAGACATGATGTTAGGCTACTGATGTACCAGATTTTGGCTAATTAATGATCTTTTGGTCCGATCCACAGATTCACCCAACGAA	2040
541	I R H V V R P T D V P D F G L I N D L L W S D P T D S P N E	
	<u>TGGGAGGATAACGAACGTTGTAAGTTACTGTTATAATAAGGTGGCAATTAACAAATCTTGAACAAGTTGGGTTGATTTGGTTTTGT</u>	2130
571	<u>W E D M E R G V S Y C Y N K V A I N K F L N K F G F D L V C</u>	
	<u>AGAGCTCACATGGTTGTGGAAGACGGTTATGAATTTTTCAATGATAGAAGTCTCGTTACCGTGTTTTCCGCGCCAAATATTGTGGTGAA</u>	2220
601	R A H M V V E D G Y E F F N D R S L V T V F S A P N Y C G E	
	TTTGATAATGGGGGCTGTAATGAGCGTCAGCGAAGGTTTATTGTGCTCTTTGAAATGTTAGATCCACTAGTATGTCAGCTTTGAAG	2310
631	F D N W G A V M S V S E G L L C S F E L L D P L D S A A L K	
	CAAGTTATGAAGAAAGGTAGACAGGAAAGAAAAGTGGCTAATCAACAACAGCAAAATGATGGAACAAGCATCACAAATGATAACGAATCT	2400
661	Q V M K K G R Q E R K L A N Q Q Q Q M H E T S I T N D N E S	
	CAACAGTAAATTTACTGACTAAAAATCCAGAAGTATTATATTATTTCATGAACAACCTCAACGATGTCATATGCACATATATATA	2490
691	Q Q *	
	TATATATATATATATATATATAAAGACAGGAAATAGAAGTCCCTATCTTTTTCTTAATCACATTAAAAACTTCTTTTCATCGCCT	2580
	ACTGCCTTCGGTGTGATTGAATGCTCATT,CGCTCTATACAATCTAGA	2629

Figura 8. Secuencia completa nucleotídica y aminoacídica deducida del gen *PPZ1*. El codón de stop se ha marcado con un asterisco. La secuencia amplificada por PCR (fragmento ST13-2) ha sido subrayada. Los elementos TATA encontrados han sido doblemente subrayados.

El fragmento clonado y secuenciado contiene un ORF de 2.076 pb, que codifica un polipéptido de 692 aminoácidos, con una masa molecular de 77.418 kDa. El punto isoeléctrico de esta proteína es de 8,4. El codón de inicio ATG está precedido en esta secuencia en la posición -3 por un residuo de adenina. Dos elementos TATA canónicos se encuentran en las posiciones -151 y -164.

La proteína codificada por este gen presenta diferentes características de interés. En primer lugar posee un tamaño muy elevado cuando se compara con el de las subunidades catalíticas de las serina/treonina fosfatasas de levadura, plantas y mamíferos. La mitad carboxi-terminal de la proteína muestra clara semejanza con la proteína DIS2S1. La identidad entre ambas es del 62%, y alcanza el 74% cuando se consideran los cambios conservativos. Esta mitad carboxi-terminal de la PPZ1 también presenta similitudes con la fosfatasa de *Drosophila* PPY (49% cuando se compara una secuencia de 314 aminoácidos). La relación entre la secuencia de aminoácidos de la mitad carboxi-terminal de la proteína PPZ1 y la de otras fosfatasas conocidas de levadura se muestra en la figura 9.

La región amino-terminal de PPZ1, en cambio, no muestra similitudes con ninguna secuencia de fosfatasa conocida. La secuencia correspondiente a los 319 primeros aminoácidos es muy rica en aminoácidos polares. Concretamente, posee 88 residuos serina, que representan el 80% de las serinas de la proteína total. En la figura 10 se representa la proporción de serinas y treoninas presentes en PPZ1.

Numerosos de los residuos de serina y treonina de PPZ1 son centros potenciales de fosforilación por algunas proteínas quinasas. En la figura 11 se representa la localización de las secuencias consenso de reconocimiento por parte de 4 proteína quinasas diferentes.

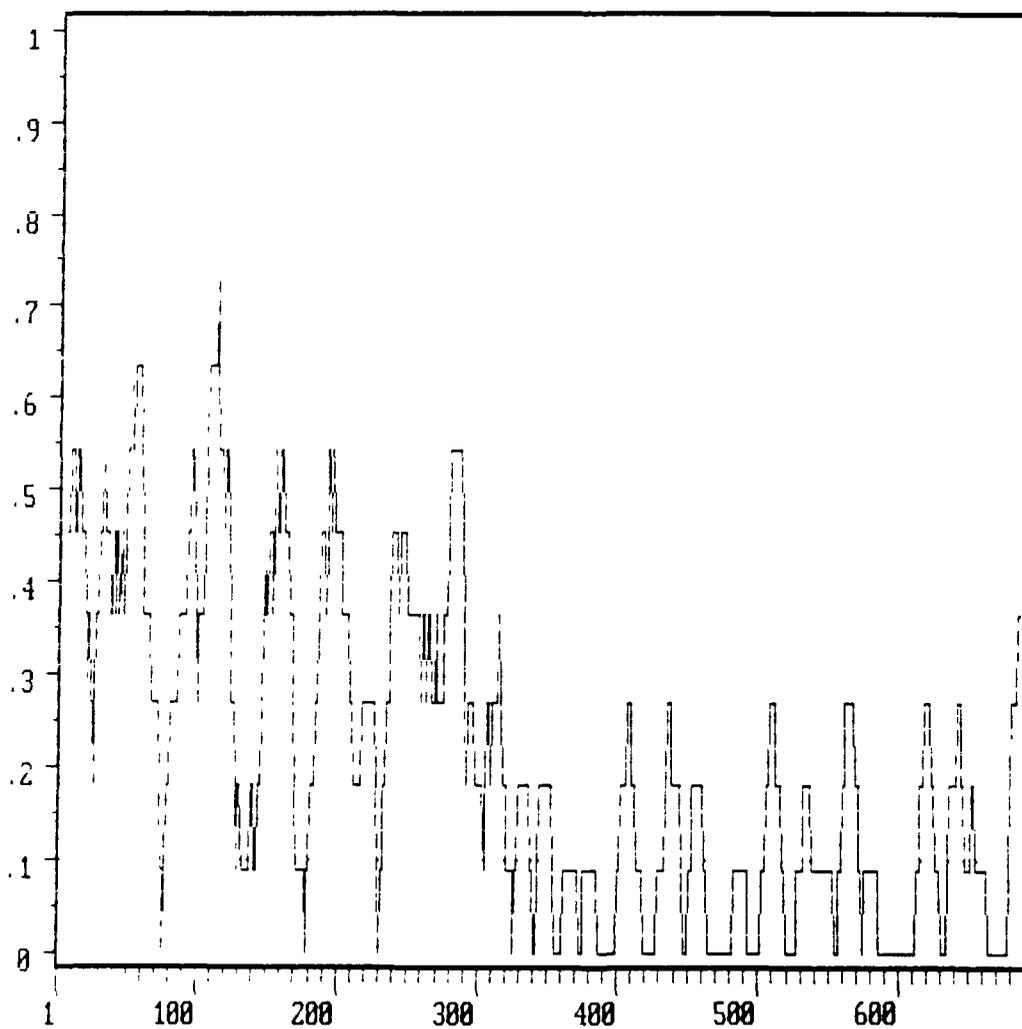
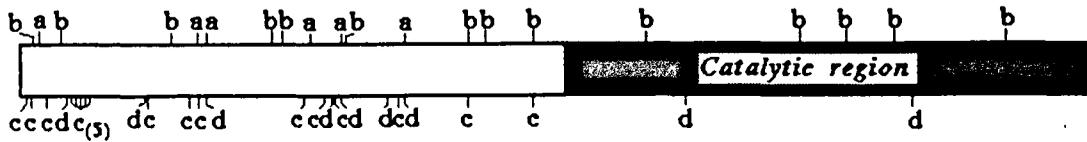


Figura 10. Proporción de residuos de serina y treonina presentes en PPZ1 tomando intervalos de 11 aminoácidos.



- a) cAMP-PK/cGMP-PK, R/K-R/K-X-S/T*
 b) CK-II, S/T*-X-X-E/D
 c) PK-C, *S/T-X-R/K
 d) CaM kinase II, R-X-X-S/T*

Figura 11. Situación de las secuencias consenso de fosforilación en PPZ1 por parte de AMPc-PK y GMPc-PK [Fremisco, J.R. y col. (1980); Glass, D.B. y Smith, S.B. (1983); Glass, D.B. y col. (1986)], CK-II [Marin, O. y col. (1986); Kuenzel, E.A. y col. (1987)], PK-C [Woodget, J.R. y col. (1986); Kishimoto, A. y col. (1985)] y calmodulina quinasa II [Payne, M. y col. (1985); Pearson, R.B., y col. (1985)].

Otra característica interesante de la mitad amino-terminal del producto del gen es que contiene un alto número de residuos básicos. En consecuencia, el punto isoeléctrico previsto de esta región es de 10,3. Este hecho contrasta fuertemente con la predicción del punto isoeléctrico de la mitad carboxi-terminal de la molécula (5,6).

Las dos mitades de la proteína PPZ1 también presentan un comportamiento diferencial desde el punto de vista del perfil hidropático (figura 12). La región amino-terminal es claramente más hidrofílica que la mitad carboxi-terminal.

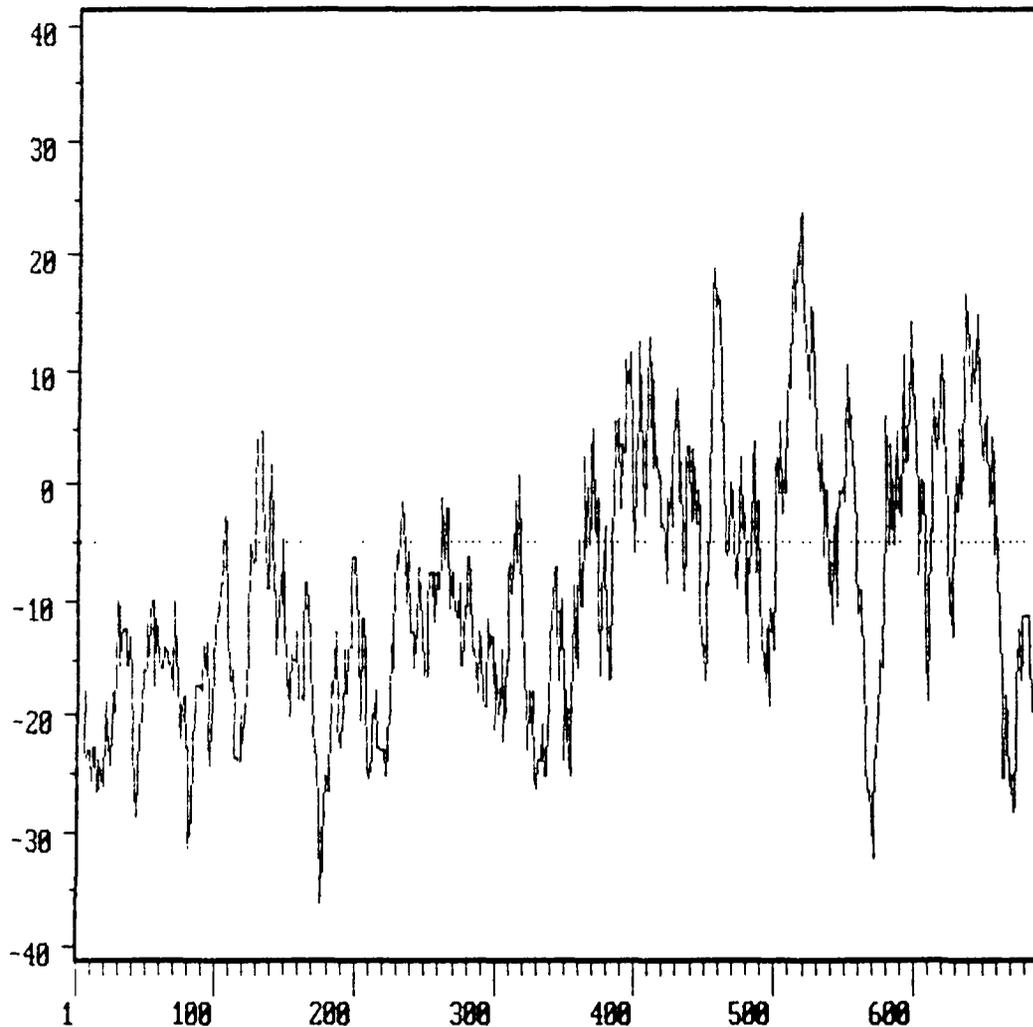


Figura 12. Representación del índice hidropático de PPZ1 según el método de Kyte, J. y Dolittle, R.F. (1982), utilizando intervalos de 11 residuos.

3. RESULTADOS.

Tras obtener los primeros resultados de la secuenciación se hizo evidente que el extremo 3' de PPZ-A correspondía posiblemente a otro ORF, del que se secuenció unos 332 pb (figura 13). La secuencia de este ORF no ha sido encontrada cuando se ha buscado en el EMBL Data Bank. En la composición del fragmento de la supuesta proteína codificada por éste ORF destaca el relativamente elevado número de residuos de treoninas y serinas.

```
TTTAAGGATTACAGCACGAAGGTGAAATTATTAACAGACCCTAAAGACGATGCTGGCAA 60
F K D Y S T K V K L L T D P K D D A G K

CCATTCATTACTAAGACTCAGCGGTCAAATCCAATCCTTTTGGAAGTGCTAAACCGGTT 120
P F I T K T Q R S K S N P F G S A K P V

GATACGCAATCGAAGATTTTGGACATTGAAGAAAAATGGAAAATTTACACGTGGAAGAT 180
D T Q S K I L D I E E K M E N L H V E D

ACAACAACCCTGAGGGCATCATTAATCCCTAGTAGTGATTCTATGGCAACCACTGCAACA 240
T T T L R A S L I P S S D S M A T T A T

GGCAGCAAGATCACAATCTTGAAAAAGCAGACACCTACAGAGGAGGAATCACATTCTGCA 300
G S K I T I L K K Q T P T E E E S H S A

ACCCCAACTCCCAAACCTTTANGTTACACTGAAGTAGTTGAGAGATCTGTGGTCAATGG 360
T P T P K T F X L H - S S - E I C G Q W

ACACTCCAAGG 372
T L P R
```

Figura 13. Secuencia nucleotídica del ORF encontrado y secuencia deducida de aminoácidos.

4. EXPRESION DEL GEN *PPZ1*.

4.1. NIVELES DE mRNA DE *PPZ1* DURANTE EL CULTIVO.

El análisis inicial de mRNA de *PPZ1* proporcionó resultados inesperados porque, como se muestra en el figura 14-B, este gen se expresa como un mRNA de unas 2,7 kb, tamaño éste

3. RESULTADOS.

mucho mayor que el esperado para una típica subunidad catalítica de una proteína fosfatasa. Sin embargo, este resultado es normal si tenemos en cuenta la longitud del ORF de *PPZ1* (2.08 kpb).

Con el propósito de verificar si los niveles de mRNA varían a lo largo del cultivo, se crecieron levaduras de la cepa M5 en YPD y se tomaron muestras a diferentes tiempos. Se preparó RNA total de cada muestra y se analizó mediante Northern blot, empleando la sonda *EcoRI-SacI* de 1,23 kpb (ver figura 6). Los resultados se muestran en la figura 14-B.

Como se observa en esta figura, la cantidad de mensajero es más abundante a partir de la mitad de la fase exponencial, para descender cuando el cultivo llega a la fase estacionaria. Mediante la cuantificación de la intensidad de las señales por densitometría, se observa que el mRNA de *PPZ1* es 3 ó 4 veces mayor hacia la mitad-final de la fase exponencial que en su inicio, para decaer en la fase estacionaria.

Una vez comprobado que la cantidad de mRNA de *PPZ1* no es constante en un cultivo, se planteaba la pregunta de si el gen *PPZ1* se expresaba en células diploides que estaban en proceso de esporulación. Para comprobarlo se preparó RNA total de células esporuladas y se hibridó con el fragmento perteneciente a la región codificante *EcoRI-SacI* de 1,23 kpb. Los resultados indicaron que en esta fase del ciclo biológico también era expresado el gen *PPZ1*. En nivel de éste mRNA en las esporas resultó ser unas 3,1 veces menor que en cultivos de células vegetativas al inicio de la fase exponencial ($OD_{660} = 2,3$).

3.2. OBTENCIÓN DE ANTICUEROS ANTI-PPZ1

3.2.1. CONSTRUCCIONES REALIZADAS

Con la intención de producir anticuerpos contra la proteína PPZ1, se expresaron en *S. cerevisiae* dos fragmentos correspondientes a la región C-terminal de PPZ1. Uno de ellos, de 500 aminoácidos, incluyó toda la región carboxi-terminal y una porción de la amino-terminal (14 aminoácidos). El otro, comparado exclusivamente con el primero, tenía una longitud de 200 aminoácidos.

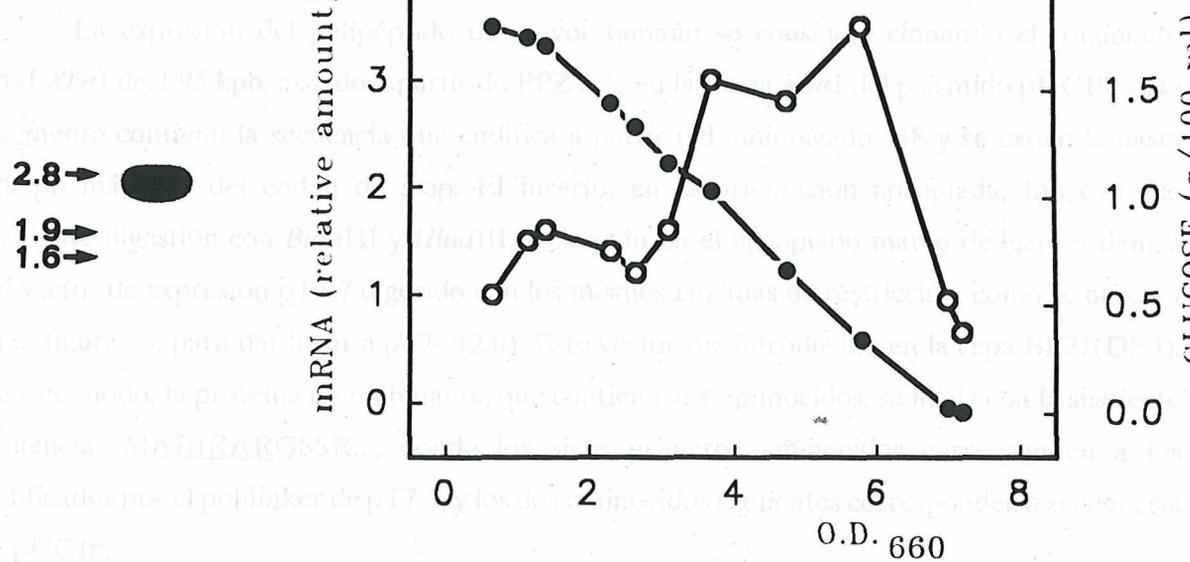


Figura 14. A) Los experimentos previos de Northern blot se realizaron con 5 μ g de RNA poli(A)⁺ de la cepa de levadura M5, que fueron sometidos a electroforesis, transferidos e hibridados con el fragmento *EcoRI-SacI* de 1,23 kpb. Las membranas se lavaron en 0,1 x SSC y SDS al 0,1% (p/vol) a 55°C. Estos experimentos muestran que el gen *PPZ1* se expresa como un mRNA de 2,7 kb aproximadamente. B) 20 μ g de RNA total de la cepa M5 preparado en diferentes fases del cultivo se separó electroforéticamente y se transfirió, para ser hibridado con la sonda *EcoRI-SacI* de 1,23 kpb. (o-o) Cantidad relativa de mRNA estimada mediante densitometría de las autorradiografías. (●-●) Concentración de glucosa en el medio de cultivo.

4.2. OBTENCION DE ANTICUERPOS ANTI-PPZ1.

4.2.1. CONSTRUCCIONES REALIZADAS.

Con la intención de producir anticuerpos contra la proteína PPZ1, se expresaron en *E. coli* dos fragmentos correspondientes a la región codificante de *PPZ1*. Uno de ellos, de 584 residuos, incluía toda la mitad carboxi-terminal y gran porción de la amino-terminal. El otro, de 404 residuos, comprendía exclusivamente la región carboxi-terminal.

La expresión del polipéptido de mayor tamaño se consiguió clonando el fragmento *XbaI-XbaI* de 1,95 kpb, aislado a partir de PPZ1-A, en la diana *XbaI* del plásmido pUC18. Este fragmento contiene la secuencia que codifica a partir del aminoácido 118 y se extiende hasta 220 pb más allá del codón de stop. El inserto, en la orientación apropiada, fué extraído mediante digestión con *BamHI* y *HindIII*, y clonado en el apropiado marco de lectura dentro del vector de expresión pT7-7 digerido con los mismos enzimas de restricción, como se observa en la figura 15, para dar lugar a pT7-7(2,0). Este vector fue introducido en la cepa BL21(DE3). De este modo, la proteína recombinante, que contiene 584 aminocidos, se inicia con la siguiente secuencia: MARIRARGSSR..., donde los siete primeros aminocidos corresponden a los codificados por el polilinker de pT7-7, y los dos aminocidos siguientes corresponden a secuencias de pUC18.

El fragmento de menor tamaño se obtuvo aislando la secuencia *EcoRI-XbaI* de 1,21 kpb de PPZ-F (PPZ-F contiene el fragmento *AvaI-PstI* de unas 3,2 kpb de PPZ-A en pUC19). El fragmento *EcoRI-XbaI* se ligó al vector pUC18 digerido previamente con los mismos enzimas y se extrajo mediante cortes en las dianas *EcoRI-HindIII*. Este nuevo fragmento se clonó en el marco de lectura apropiado en el vector pT7-7, dando lugar a pT7-7(1,3). En éste caso la proteína recombinante contiene en su extremo amino-terminal la siguiente secuencia: MARIRARYPSK..., donde los tres primeros residuos son codificados por el polilinker de pT7-7 y los siete siguientes por el de pUC19.

4.2.2. ANALISIS DE LA EXPRESION DE *PPZI* EN BACTERIA.

Para comprobar si las construcciones realizadas eran capaces de expresar los polipéptidos en la cepa bacteriana BL21(DE3), se realizó un experimento de marcaje metabólico *in vivo*. Para ello se tomaron 60 µl de volumen de cada cultivo en diferentes momentos. Una primera muestra se tomó cuando el cultivo estaba a $OD_{600}=0,6$, antes de inducir la expresión mediante la adición de IPTG. A los 30 minutos se tomó otra, antes de inhibir, mediante la adición de rifampicina, la actividad de la RNA polimerasa de la propia célula. A partir de este momento se tomaron muestras a, 1 hora y 2 horas de incubación con rifampicina. Todas las muestras de cultivo tomadas fueron sometidas a 5 minutos de marcaje a 30°C con [³⁵S]-metionina, tras los cuales las células fueron sedimentadas y procesadas para separar electroforéticamente las proteínas. La posterior fluorografía permite evidenciar que los productos proteicos de los fragmentos de DNA insertados en el plásmido pT7-7 son prácticamente las únicas proteínas sintetizadas por la célula a partir de 1 ó 2 horas de inducción, como se muestra en la figura 15.

4.2.3. OBTENCION DEL PRODUCTO DE EXPRESION.

Los primeros resultados obtenidos indicaban que la proteína producto de expresión no era soluble. Por tanto, inmediatamente se iniciaron pruebas con el fin de intentar solubilizarla. En primer lugar se procedió a incubar los cultivos de células que expresaban la proteína a temperaturas menores, probando un rango que oscilaba entre 15°C y 37°C y rompiendo las células mediante digestión enzimática con lisozima. Como de este modo no se consiguió el producto soluble, se realizó la purificación de cuerpos de inclusión según el método descrito por Marson, F.A.O. (1987) y modificado por Sambrook, J. y col. (1989), y se intentó su solubilización [Sambrook, J. y col. (1989)] con resultados negativos.

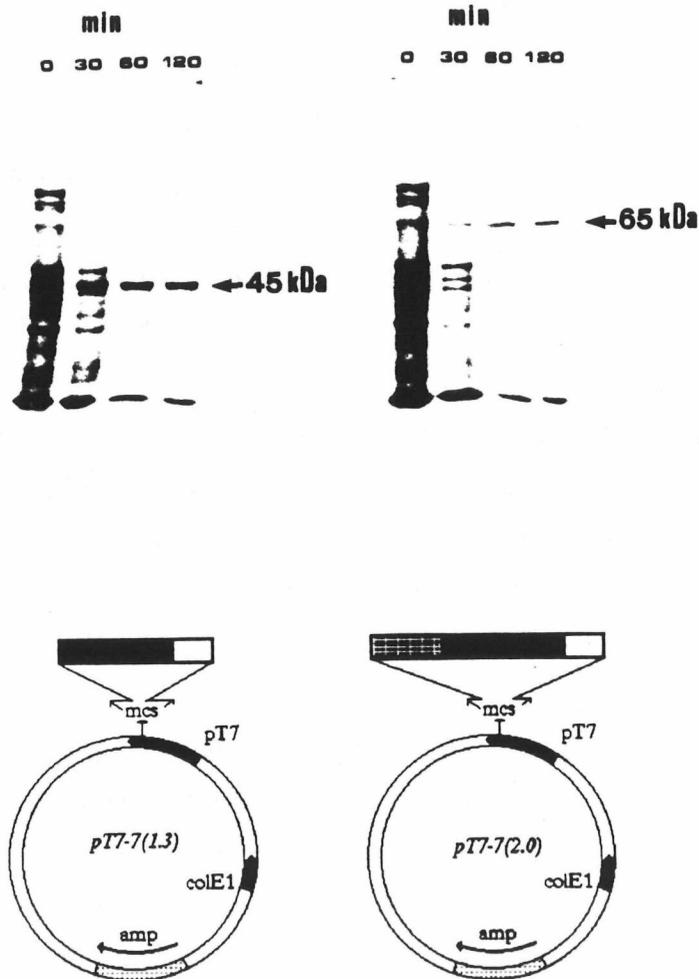


Figura 15. A) Fluorografía de los extractos de células *E. coli* transformadas con pT7-7(1,3) y pT7-7(2,0) antes de la adición de IPTG (0), antes de la adición de rifampicina (a los 30 minutos) y a los 60 y 120 minutos de la inducción. El marcaje se realizó durante 5 minutos con 1,2 μ Ci de [35 S]-metionina por cada 60 μ l de cultivo. **B)** Construcciones realizadas para expresar las formas truncadas de la proteína PPZ1. La barra oscura del inserto en pT7-7 corresponde a secuencia de la mitad carboxi-terminal de PPZ1, mientras que la barra sombreada contiene parte de la región amino-terminal.

Una vez comprobado que no era posible recuperar el producto de expresión de forma soluble, se consideró que la manera más idónea de obtener el antígeno era aislarlo del resto de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Para ello, se cargaron en cada pocillo unos 50 µl de extracto de células (10 µg/µl aproximadamente), obtenido según el apartado 2.7.1.

El producto de expresión, visible como una banda intensa que no aparece en los extractos de células anteriores a la inducción con IPTG, era recortado y recuperado como se describe en 3.4.2, para ser inyectado a conejos.

4.3. CONSTRUCCION DE CEPAS DE LEVADURA QUE SOBREEXPRESAN PPZ1.

4.3.1. EXPRESION EN MULTICOPIA.

La construcción utilizada para producir una sobreexpresión constitutiva de la proteína PPZ1 en levadura (pYEpLac181-PPZ1) se creó introduciendo en el plásmido multicopia YepLac-181 el fragmento *PstI-HindIII* de 4,1 kpb de PPZ-A. Este fragmento contiene 310 pb de la zona 5' no traducida. El plásmido lanzadera YEpLac181 posee el marcador auxotrófico *LEU2* y el origen de replicación del plásmido 2 µm [Gietz, R.D. y Sugino, A. (1988)].

Esta construcción se transformó en la cepa M5. La selección de los transformantes se realizó en placas de medio mínimo con aminoácidos excepto leucina, puesto que el plásmido pYEPLac 181 confiere la capacidad de crecer en ausencia de leucina a la célula que lo contiene, ya que es portador del gen *LEU2* (defectivo en la cepa utilizada). La cepa portadora del plásmido se denominó JA-10.

Se realizaron experimentos de Northern blot para verificar si existía un incremento en la cantidad de mRNA correspondiente a *PPZ1* en la cepa JA-10. Como se observa en la figura 16, la cepa portadora del plásmido multicopia únicamente incrementa la cantidad de mRNA de *PPZ1* en 1,95 veces respecto a la cepa control.

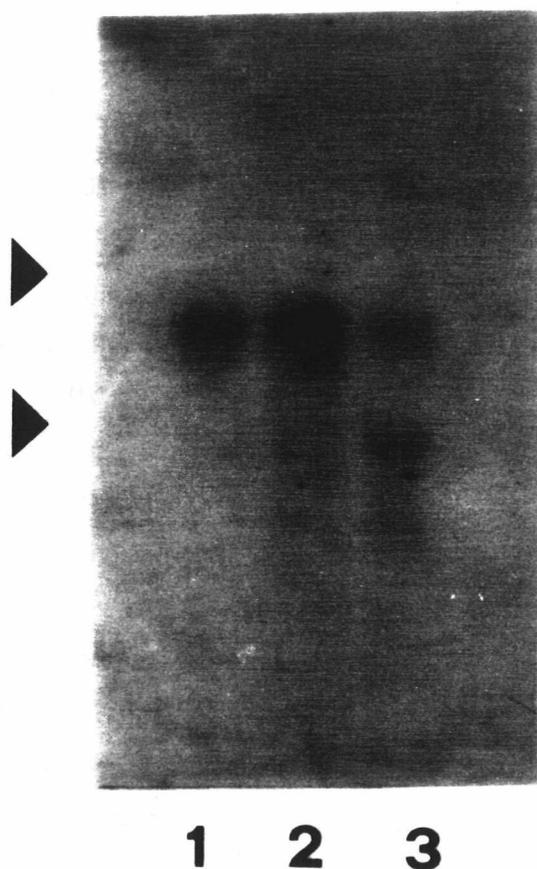


Figura 16. Nivel de mRNA de *PPZ1*. En el carril 1 se ha separado RNA total de la cepa M5. En el carril 2 se encuentra el RNA de la cepa JA-10. El carril 3 corresponde a RNA de una cepa diploide *ppz1* (JA-15). Se sometieron a electroforesis 20 μ g de RNA total y se hibridaron con el fragmento de 2,3 kpb *Pst*I-*Acc*I de *PPZ1* como sonda en solución conteniendo formamida al 50% (vol/vol) a 42°C. Los lavados se realizaron a 55°C en 0,1 x SSC y SDS al 0,1% (p/vol). Las flechas de la izquierda indican la migración de los rRNA.

Los experimentos de Western blot utilizando extractos de células M5 revelan la presencia de una proteína con una masa molecular de 75 Kda, como se observa en la figura 17. Este tamaño está en concordancia con el de la previsión para PPZ1, que corresponde a 77,4 kDa.

Además, la cantidad de esta proteína resultó ser unas 2,5 veces mayor en el carril paralelo en el que se había cargado la misma cantidad de proteína total procedente de células de la cepa JA-10.

4.3.2. EXPRESION BAJO PROMOTOR INDUCIBLE.

Con la finalidad de poder purificar la proteína PPZ1 para utilizarla en estudios enzimológicos se planteó la posibilidad de introducir únicamente la secuencia de DNA que la codifica en el plásmido pEMBLYex4 [Murray, J. y col. (1987)]. A diferencia de pYEpLac181, donde es necesario introducir un elemento promotor asociado al gen que se desea expresar, pEMBLYex4 posee un promotor híbrido regulable GAL-CYC1 [Guarente, L. y col. (1982)] inducible por galactosa y reprimible por glucosa. Este plásmido presenta un alto número de copias por célula y es de tipo lanzadera, con un origen de replicación bacteriano y una resistencia a la ampicilina como marcador bacteriano. También presenta un origen de replicación para levadura (ori STB), proveniente del plásmido natural de levadura 2 μ , y el gen *URA3*, que codifica un enzima necesario para la vía de síntesis del uracilo y que se utiliza como marcador auxotrófico en *S. cerevisiae*.

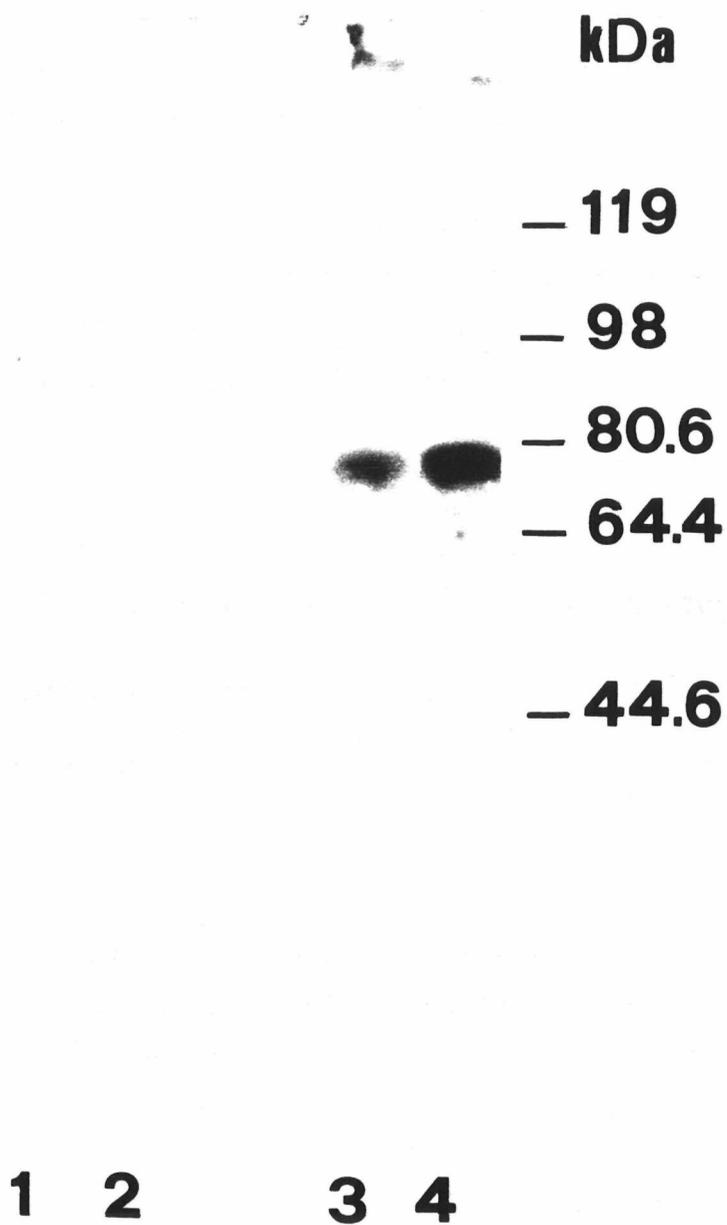


Figura 17. Identificación de la proteína PPZ1 mediante Western blot. Los carriles 1 y 2 han sido incubados con el suero preinmune, mientras que el 3 y 4 lo han sido con el antisuero anti-PPZ1. Las muestras 1 y 3 corresponden a la cepa M5 y las 2 y 4 a la cepa JA-10.

Para clonar en pEMBLyex4 la secuencia codificante del gen *PPZ1*, se procedió a su obtención mediante la amplificación por PCR. Se diseñaron dos oligonucleótidos que correspondían a los extremos de la región codificante (ver figura 18), los cuales poseían en sus extremos 5' las secuencias de reconocimiento para los enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III. La elección de estos enzimas para clonar la secuencia de *PPZ1* se debe a que son dos dianas que se encuentran ausentes en el fragmento a amplificar.

Las condiciones en las que se efectuó la amplificación fueron: 30 ciclos de 90 segundos a 94°C, 120 segundos a 48°C y 180 segundos a 72°C. con 40 segundos iniciales a 94°C y 180 segundos después del último ciclo a 72°C. Las concentraciones de Mg²⁺ a las que se consiguió una amplificación apreciable fueron entre 1,5 y 6 mM.

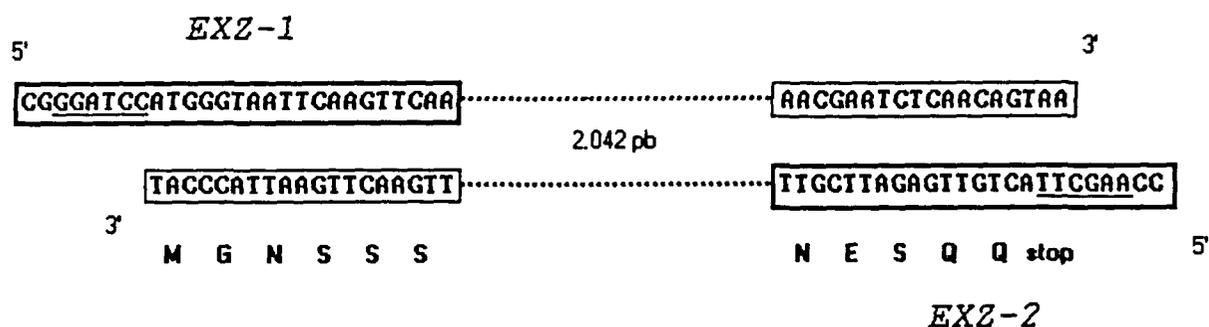


Figura 18. Secuencias de los oligonucleótidos empleados como cebadores en la amplificación de la secuencia que codifica *PPZ1* a partir del vector pUC19 conteniendo el clon *PPZ1*-A. Las dianas de restricción para los enzimas *Bam*HI y *Hind* se encuentran subrayadas en EXZ-1 y EXZ-2 respectivamente.

La mezcla de reacción fué extraída con fenol/cloroformo y precipitada con etanol, y el DNA amplificado se digirió con los enzimas *Bam*HI y *Hind*III. El producto de la digestión se separó electroforéticamente en un gel de agarosa al 1,0 (p/vol) en el que se comprobó que el DNA amplificado poseía el tamaño esperado de unas 2,1 kpb. La banda de agarosa conteniendo el DNA se recortó y se purificó el DNA que contenía. Este se ligó al vector pBluescript SK(+) previamente digerido con *Hind*III y *Bam*HI.

3. RESULTADOS.

Con la construcción pEMBLYex4-*PPZ1* se transformó la cepa haploide de *S. cerevisiae* W303-1A dando lugar a la cepa JA-11. Asimismo, como control, también se transformó la misma cepa con el plásmido pEMBLYex4 sin ningún inserto (JA-12).

Tanto en el caso de la cepa JA-11 como en el de la JA-12, se inocularon cultivos de 100 ml de medio sintético carente de uracilo y con lactato al 2% como única fuente de carbono. Cuando los cultivos alcanzaron una OD₆₆₀ de 2, se extrajo una muestra de cada cultivo conteniendo 2×10^8 células para purificar su RNA, y se indujo el promotor mediante la adición de 1/9 vol de galactosa al 20% (p/vol). A diferentes tiempos después de la inducción se extrajeron muestras de los dos cultivos y se purificó el RNA total con el que se realizó un experimento de Northern blot.

Como se puede observar en el Northern blot de la figura 19, la cantidad de mRNA correspondiente a *PPZ1* sufre un notable incremento en la cepa portadora de pEMBLYex4-*PPZ1* que no se produce en la cepa control, llegando, dos horas después de la inducción, a ser 25 veces el de la cepa control.

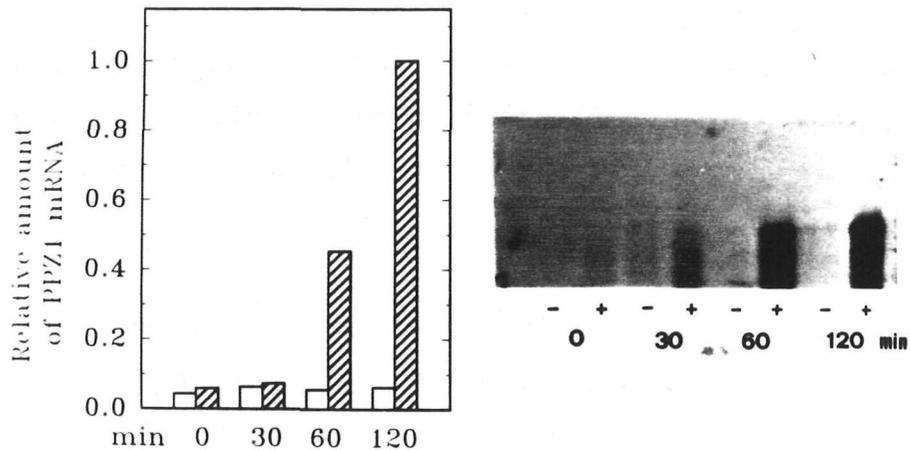


Figura 19. Northern blot realizado con 20 μg de RNA total que se hibridó con la sonda de 2,3 kpb correspondiente al fragmento *Pst*I-*Acc*I de pPPZ1-A marcado con digoxigenina. El lavado se realizó en 0,1x SSC y SDS al 0,1% (p/vol) a 55°C. El revelado del Northern se realizó mediante el sustrato quimioluminiscente de la fosfatasa alcalina AMPPD. El tiempo 0 corresponde al momento de inducir la transcripción mediante galactosa. "+" corresponde al RNA procedente de la cepa JA-11. Con "-" se indica el RNA extraído de la cepa JA-12. A la izquierda se ha representación mediante diagrama de barras de la cantidad de mRNA que hibrida con la sonda de *PPZ1* en células portadoras de este gen en pEMBLYex4 respecto a la cepa control en el momento de la inducción.