

FACULTAT DE VETERINÀRIA DE BARCELONA

DEPT. BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

Nuevos elementos reguladores y
funciones celulares de la proteína
fosfatasa Ppz1 en la levadura
Saccharomyces cerevisiae

TESIS DOCTORAL

Amparo Ruiz Garzón

Marzo 2006



Universitat Autònoma de Barcelona

RESUMEN	1-3
INTRODUCCIÓN	4-35
1. IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE LAS Ser/Thr PROTEÍNAS FOSFATASAS DE TIPO Z EN LA LEVADURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4-16
1.1. Clasificación de las Ser/Thr fosfatasas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4-5
1.2. La fosfatasa PP1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5-6
1.3. Las fosfatasas de tipo Z de la levadura: Ppz1 y Ppz2	6-8
1.4. Subunidades reguladoras de las fosfatasas Ppz	8-16
2. HOMEOSTASIS IÓNICA EN <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17-30
2.1. El transporte de iones en la regulación de la homeostasis salina	17-18
2.2. Sistemas de salida de iones	18-20
2.3. Sistemas de entrada de iones	20-21
2.4. Regulación de la expresión del gen <i>ENA1</i>	22-30
3. FLOCULACIÓN EN LA LEVADURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31-35
3.1. Características generales de la floculación	31-32
3.2. Regulación de la expresión de la floculina Flo11	32-35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36-67
1. LA PROTEÍNA FOSFATASA Ppz1 REGULA LA EXPRESIÓN DE LA ATPasa DE SODIO Ena1 A TRAVÉS DE LA VÍA DE LA CALCINEURINA	36-47
1.1. Hal3 regula la expresión de <i>ENA1</i> a través de las fosfatasas Ppz1 y Ppz2	36-38
1.2. El incremento en la expresión de <i>ENA1</i> que tiene lugar en el mutante <i>ppz1</i> implica al elemento CDRE y requiere la vía de señalización de la calcineurina	38-40
1.3. Análisis de la expresión del gen <i>ENA1</i> y de la tolerancia a cationes de cepas que carecen de las fosfatasas Ppz y de componentes de la vía de la calcineurina	40
1.4. El incremento en la expresión de <i>ENA1</i> que tiene lugar en el mutante <i>ppz1</i> no está causado por la alcalinización intracelular	41-43
1.5. Ppz1 no regula la actividad calcineurina a través de la calcipresina Rcn1	44
1.6. Ppz1 podría controlar la vía de señalización de la calcineurina mediante la regulación de los transportadores de calcio de la membrana plasmática	44-47

2.	LAS PROTEÍNAS FOSFATASAS Ppz REGULAN EL TRANSPORTE DE POTASIO INDEPENDIENTE DE Trk EN LA LEVADURA	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	48-52
2.1.	Cepas que carecen de las fosfatasas Ppz requieren cantidades mayores de potasio en ausencia de los transportadores Trk	48-49
2.2.	Análisis de la tolerancia a cationes tóxicos de células que carecen de las fosfatasas Ppz y los transportadores de potasio Trk.	49-52
3.	CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL GEN <i>VHS3</i> DE <i>S. cerevisiae</i>	53-67
3.1.	El análisis funcional de <i>VHS3</i> revela una notable similitud con <i>HAL3</i>	53-55
3.2.	Vhs3 se une a la fosfatasa Ppz1 <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	55-56
3.3.	Vhs3 inhibe <i>in vitro</i> la actividad de la proteína fosfatasa Ppz1	56-57
3.4.	Las mutaciones <i>hal3</i> y <i>vhs3</i> son sintéticas letales, pero la letalidad no está causada por un exceso de actividad Ppz	57-60
3.5.	Análisis de los efectos de la mutación del residuo histidina 459 en las funciones de Vhs3	61-62
3.6.	El doble mutante condicional <i>vhs3 tetO:HAL3</i> presenta un fenotipo de floculación y un incremento en la expresión del gen <i>FLO11</i>	62-65
3.7.	Estudio de complementación de la letalidad del doble mutante <i>hal3 vhs3</i>	65-67
CONCLUSIONES		68-69
REFERENCIAS		70-83

APÉNDICE

Artículo 1: Ruiz A, Yenush L, Ariño J. **Regulation of *ENA1* Na(+)-ATPase gene expression by the Ppz1 protein phosphatase is mediated by the calcineurin pathway.** Eukaryot. Cell. 2003 Oct. 2(5):937-48.

Artículo 2: Ruiz A, del Carmen Ruiz M, Sanchez-Garrido MA, Ariño J, Ramos J. **The Ppz protein phosphatases regulate Trk-independent potassium influx in yeast.** FEBS Lett. 2004 Dec. 3;578(1-2):58-62.

Artículo 3: Ruiz A, Muñoz I, Serrano R, González A, Simón E, Ariño J. **Functional characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* *VHS3* gene: a regulatory subunit of the Ppz1 protein phosphatase with novel, phosphatase-unrelated functions.** J. Biol. Chem. 2004 Aug. 13;279(33):34421-30.

RESUMEN

La fosforilación/desfosforilación de proteínas es el principal mecanismo de regulación post-transcripcional que presentan todas las células eucariotas. El estado de fosforilación de una proteína determinada depende del balance entre las actividades proteína quinasa y proteína fosfatasa que actúan sobre ella. A su vez, estas proteínas quinasas y fosfatasas se encuentran fuertemente reguladas, convirtiendo la fosforilación en un mecanismo complejo y extremadamente controlado. El hecho de que en las células eucariotas haya un número considerablemente mayor de proteínas quinasas que de proteínas fosfatasas implica que estas fosfatasas participen en múltiples procesos celulares y, por ello, presenten a menudo mecanismos de regulación más complejos, como la existencia de subunidades reguladoras que pueden modular su actividad enzimática, localización intracelular o capacidad para interactuar con otras proteínas. A este respecto, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* representa una herramienta muy útil para estudiar tanto el proceso de fosforilación como su regulación, ya que, aunque es un organismo eucariota, es unicelular. Además, esta levadura presenta ventajas respecto al resto, ya que se conoce su secuencia cromosómica desde hace ya bastante tiempo y se dispone de toda una serie de herramientas que la hacen idónea para la investigación básica de cualquier proceso celular eucariota.

Las proteínas fosfatasas Ppz1 y Ppz2, que desfosforilan residuos serina/treonina de otras proteínas, están relacionadas estructuralmente con la fosfatasa PP1. En *Saccharomyces cerevisiae* esta fosfatasa consta de una única subunidad catalítica (Glc7), que es esencial, y una gran variedad de subunidades reguladoras que le confieren la especificidad de función. A diferencia de Glc7, que se encuentra muy conservada evolutivamente, las fosfatasas Ppz sólo se encuentran en hongos y, en el momento de iniciar este trabajo, únicamente se había descrito una subunidad reguladora que modula su actividad fosfatasa en todos los procesos en los

que éstas están implicadas: la proteína Hal3. Las fosfatasas Ppz participan en la regulación de funciones tales como el mantenimiento de la integridad celular, la transición G1/S del ciclo celular, la homeostasis salina y la fidelidad traduccional. Aunque se conocía poco de los elementos a través de los cuales ejercen estas funciones, durante la realización de este trabajo se describió la existencia de una relación entre las fosfatasas Ppz y los transportadores de potasio Trk1 y Trk2. La defosforilación de estos transportadores por acción de las fosfatasas Ppz daría lugar a una menor entrada de potasio al interior celular, lo cual permite explicar en gran medida las funciones que realizan estas fosfatasas.

En este trabajo presentamos nuevas dianas biológicas de las fosfatasas Ppz, como son la vía de señalización de calcio/calcineurina y el sistema de transporte de potasio de baja afinidad. El análisis de la tolerancia salina de células que carecen de Ppz1 y Ppz2 demuestra que estas células son tolerantes a litio y sodio porque presentan una mayor expresión de la ATPasa Ena1, el principal sistema detoxificador de la levadura *S. cerevisiae*. Este incremento en la expresión de *ENA1* es independiente del sistema de transporte de potasio de alta afinidad (Trks) pero totalmente dependiente de la vía de señalización de la fosfatasa calcineurina. Nuestros resultados sugieren que las fosfatasas Ppz, y específicamente Ppz1, regulan negativamente a los transportadores de calcio de la membrana plasmática, alterando la homeostasis de calcio y, por tanto, inhibiendo la actividad de la fosfatasa calcineurina. Por otro lado, el análisis de los requerimientos de potasio de células que carecen de los transportadores de potasio Trk1 y Trk2 y las fosfatasas Ppz1 y Ppz2, nos ha permitido identificar a estas fosfatasas como reguladores positivos del sistema de transporte de potasio de baja afinidad, denominado NSC1.

Por otra parte, describimos una nueva subunidad reguladora negativa de las fosfatasas Ppz, la proteína Vhs3. A diferencia de las fosfatasas Ppz1 y Ppz2, que son exclusivas de hongos, Hal3 y Vhs3 presentan homólogos en eucariotas superiores. En la levadura las dos proteínas actúan inhibiendo la actividad de Ppz1 y Ppz2 en todas sus funciones descritas, aunque Hal3 parece ser más eficiente que Vhs3. También demostramos la participación de las proteínas Hal3 y Vhs3 en el proceso celular de la floculación. Hal3 y Vhs3 estarían regulando de forma negativa la vía de señalización de la PKA, que regula al factor de transcripción Flo8 y la expresión de la floculina Flo11, de tal manera que un doble mutante condicional *hal3 vhs3* presenta un fenotipo de floculación acompañado de un incremento en la expresión de *FLO11*. Este efecto parece ser dependiente de las fosfatasas Ppz y podría ser explicado por la regulación negativa que ejercen éstas sobre los transportadores de potasio.

Asimismo, demostramos la existencia de una nueva función esencial para las proteínas Hal3 y Vhs3 que no implica a las fosfatasas Ppz, dado que el doble mutante *hal3 vhs3* es letal y ello no es debido a un exceso de actividad fosfatasa Ppz. Para esta nueva función es importante el residuo His90 descrito en AtHal3a de *Arabidopsis thaliana* como imprescindible para catalizar *in vitro* la descarboxilación de 4'-fosfopantotenoilcisteína a fosfopanteteína, un paso clave en la síntesis de coenzima A. Aunque Hal3 y Vhs3 conservan este residuo histidina, no conservan el residuo equivalente a la Cys175, también necesario en eucariotas y eubacterias para que tenga lugar esta reacción *in vitro*. Por tanto, no es evidente que esta nueva función descrita sea participar en la síntesis de coenzima A. Aun así, la letalidad del doble mutante *hal3 vhs3* se suprime por la expresión en la levadura de homólogos de Hal3 de eucariotas superiores, como son los de planta, ratón y humano, por lo que sea cual sea su naturaleza, esta función esencial está conservada a lo largo de la evolución.

INTRODUCCIÓN

1. IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE LAS SER/THR PROTEÍNAS FOSFATASAS DE TIPO Z EN LA LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae*.

La fosforilación reversible de proteínas es el principal mecanismo de regulación de los procesos intracelulares que tienen lugar en las células eucariotas, tales como el metabolismo, el transporte a través de membranas o la división celular. El estado de fosforilación de las proteínas que intervienen en estos procesos es el resultado del equilibrio dinámico que existe entre la acción específica de las proteínas quinasas y las proteínas fosfatasas, que fosforilan y desfosforilan, respectivamente, los residuos aminoacídicos serina, treonina, tirosina o histidina de dichas proteínas.

1.1. Clasificación de las Ser/Thr fosfatasas de *Saccharomyces cerevisiae*.

En eucariotas, existen tres tipos principales de proteínas fosfatasas (PPasas), las Ser/Thr fosfatasas (que desfosforilan residuos serina y treonina), las Tyr fosfatasas (residuos tirosina) y proteínas fosfatasas de especificidad dual (que desfosforilan residuos serina, treonina y tirosina de proteínas). Dentro de las serin/treonin PPasas se pueden diferenciar dos familias, la familia PPP que incluye las subfamilias PP1, PP2A y PP2B (también denominada calcineurina o PPasa regulada por Ca^{2+} /calmodulina) y la familia PPM que incluye la subfamilia PP2C (o PPasas dependientes de Mg^{2+}). Las subfamilias PP1, PP2A, PP2B y PP2C se diferencian por la preferencia de sustrato, la necesidad de cationes metálicos y la sensibilidad a diferentes inhibidores (Cohen, 1989).

Las proteínas fosfatasas de tipo 1 (PP1) desfosforilan preferentemente la subunidad β de la fosforilasa quinasa, son inhibidas por la actividad de unos polipéptidos denominados Inhibidor 1 y 2, y necesitan la presencia de determinados iones para ser activas (Mn^{2+}). Las proteínas fosfatasas de tipo 2 (PP2) se diferencian de las anteriores porque defosforilan preferentemente la subunidad α de la fosforilasa quinasa y por no responder a los Inhibidores 1 y 2. Los tres tipos de PP2 se diferencian entre sí por la necesidad diferencial de cationes divalentes. De este modo, la subfamilia PP2A no requiere de estos cationes para ser activa, la PP2B requiere calcio y calmodulina y la PP2C necesita magnesio.

Al comparar las secuencias de las subunidades catalíticas se puede apreciar que todas las PPP comparten entre ellas un alto grado de similitud, especialmente en

la zona del enzima considerada el *core* catalítico (Ingebritsen and Cohen, 1983; Stralfors *et al.*, 1985; Cohen, 1989), mientras que la PP2C es bastante diferente.

Dentro de la familia de las PPP existe un grupo formado por una serie de nuevos miembros que están relacionados estructuralmente con las PP1 y PP2A pero que presentan diferencias en cuanto a su función. Este es el caso de las fosfatasa PPZ de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Cohen, 1997; Arino, 2002) que están relacionadas con la fosfatasa PP1 y de las cuales trataremos extensamente en este trabajo.

1.2. La fosfatasa PP1 de *Saccharomyces cerevisiae*.

A diferencia de lo que ocurre en mamíferos, la subunidad catalítica de la PP1 (PP1c) de la levadura *S. cerevisiae* está codificada por un único gen, *GLC7* (Kinoshita *et al.*, 1990; Clotet *et al.*, 1991; Feng *et al.*, 1991). Este gen es esencial y codifica una proteína de 312 residuos que conserva una identidad superior al 80% con las PP1c de mamíferos.

La proteína fosfatasa de tipo 1 participa en una gran variedad de funciones celulares gracias a su asociación con diferentes subunidades reguladoras, de las que hasta el momento se han descrito 19 en la levadura *S. cerevisiae*, que le confieren especificidad por el sustrato o una localización subcelular específica. Recientemente, se ha identificado un motivo común en la mayoría de las subunidades reguladoras de la PP1, que es esencial para su interacción con la fosfatasa. Este motivo denominado RVxF estaría formado, por la secuencia [R/K]-X_(0,1)-[V/I]-{P}-[F/W] donde Val o Ile están separados de Phe o Trp por cualquier residuo excepto prolina y X puede no existir o ser cualquier residuo excepto un aminoácido hidrofóbico voluminoso (Bollen, 2001; Cohen, 2002; Ceulemans *et al.*, 2002; Ceulemans and Bollen, 2006). Se ha postulado la existencia de un dominio alternativo compuesto por la secuencia F-x-x-R/K-x-R/K que también está presente en muchas de las subunidades reguladoras de la PP1, tanto en eucariotas superiores como en la levadura *S. cerevisiae* (García *et al.*, 2004).

Referente a las funciones que realiza en la levadura, *GLC7* fue identificado como un gen necesario para el acúmulo de glucógeno intracelular (Peng *et al.*, 1990; Clotet *et al.*, 1991; Feng *et al.*, 1991; Hardy and Roach, 1993). También está implicado en el control de la traducción (Wek *et al.*, 1992), el control de la segregación de los cromosomas en la mitosis (Francisco *et al.*, 1994), la transición G2/M del ciclo celular

(Hisamoto *et al.*, 1994; Black *et al.*, 1995), la integridad celular (Andrews and Stark, 2000), el mecanismo de represión por glucosa (Tu and Carlson, 1994; Tu and Carlson, 1995; Huang *et al.*, 1996; Frederick and Tatchell, 1996; Sanz *et al.*, 2000) y en la regulación de la homeostasis iónica (Williams-Hart *et al.*, 2002).

1.3. Las fosfatasas de tipo Z de la levadura: Ppz1 y Ppz2.

Los genes *PPZ1* (Posas *et al.*, 1992) y *PPZ2* (Hughes *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1993) codifican dos Ser/Thr fosfatasas de 692 y 710 aminoácidos, respectivamente, que desde el punto de vista estructural presentan dos mitades claramente diferenciadas. La mitad carboxi-terminal (de aproximadamente 300 aminoácidos) muestra un 93% de identidad a nivel aminoacídico entre Ppz1 y Ppz2 y alrededor de un 60% con el *core* catalítico de PP1c de diferentes especies, mientras que la región amino-terminal no está relacionada con la PP1c y es más variable. Ppz1 y Ppz2 comparten un 43% de identidad en esta región, la cual es rica en residuos serina y treonina y también contiene una secuencia consenso para la N-miristilación en la posición Gly2. De hecho, la miristilación de este residuo ha sido demostrada *in vivo* para Ppz1. Se ha descrito que esta mitad podría jugar un papel como reguladora de la mitad carboxi-terminal, que es donde reside la actividad fosfatasa de la proteína (Clotet *et al.*, 1996). Por otro lado, el hecho de que esta zona sea rica en serinas (que suelen encontrarse en entornos básicos) resulta en un gran número de posibles centros de fosforilación por diferentes proteínas quinasas. De hecho, Ppz1 puede ser fosforilado *in vitro* por diferentes quinasas, como la PKA, la PKC y la CK2 (Posas *et al.*, 1995a), aunque no se ha descrito que el enzima se encuentre fosforilado *in vivo*.

Aunque estas fosfatasas no presentan homólogos en eucariotas superiores, se han encontrado proteínas similares en los hongos *Schizosaccharomyces pombe* (Pzh1) y *Neurospora crassa* (Pzl-1). Estas proteínas presentan características estructurales y funcionales similares a las de las fosfatasas Ppz (Balcells *et al.*, 1997; Balcells *et al.*, 1998; Szoor *et al.*, 1998; Vissi *et al.*, 2001). También existen proteínas similares en otros hongos menos caracterizados, como es el caso de los hongos patógenos *Candida albicans* (Farkas *et al.*, 2005), *Candida glabrata* y *Cryptococcus neoformans*.

Las fosfatasas Ppz participan en la regulación de importantes procesos de la biología de *Saccharomyces cerevisiae*, como son la homeostasis salina, la integridad de la pared celular, la progresión del ciclo celular, la regulación de la traducción proteica y, recientemente, se han relacionado con la regulación de la homeostasis del potasio y el pH (Yenush *et al.*, 2002; Arino, 2002; Yenush *et al.*, 2005). Ppz1 parece ser más relevante que Ppz2 en la regulación de las funciones mencionadas anteriormente (Arino, 2002).

Las fosfatasas Ppz están implicadas en la regulación de la homeostasis salina. Células a las que les falta Ppz1 presentan una fuerte hipertolerancia a cationes sodio y litio, que es incrementada por la delección adicional de *PPZ2* (Posas *et al.*, 1995b). Esto es debido, al menos en parte, al incremento de la expresión del gen *ENA1* (Posas *et al.*, 1995b), que codifica una ATPasa de sodio que representa el principal sistema detoxificador de este catión en *Saccharomyces cerevisiae* (Haro *et al.*, 1991). Durante el desarrollo de este trabajo se han realizado estudios que presentan evidencias bioquímicas y genéticas que apuntarían al hecho de que los transportadores de potasio Trk1 y Trk2, que están implicados en el mantenimiento del potencial de membrana y por tanto de la homeostasis iónica, estarían también regulados por las fosfatasas Ppz. Esta regulación de Ppz sobre este sistema de transporte de potasio, del que hablaremos en profundidad más adelante, explicaría, al menos en parte, el papel de las fosfatasas en la homeostasis salina (Yenush *et al.*, 2002; Yenush *et al.*, 2005).

La primera función descrita para estas fosfatasas está relacionada con el mantenimiento de la integridad celular. Células que carecen de *PPZ1* presentan un fenotipo lítico bajo ciertas condiciones, tales como la presencia de bajas concentraciones de cafeína o altas temperaturas, y este efecto se agrava por la delección de *PPZ2*, mientras que la delección de *PPZ2* en un fondo salvaje no resulta en un fenotipo detectable (Posas *et al.*, 1993). Ppz1 interacciona funcionalmente con la MAP quinasa Slt2/Mpk1, la cual se activa por la proteína quinasa C (PKC) y se encuentra implicada en el mantenimiento de la integridad celular (Heinisch *et al.*, 1999). Ello se pone en evidencia por el hecho de que la sobreexpresión de *PPZ1* o *PPZ2* suprime el fenotipo lítico del mutante *slt2* y la delección del gen *PPZ1* en el mutante *slt2* da lugar a un fenotipo lítico letal (Lee *et al.*, 1993; de Nadal *et al.*, 1998) que sólo puede ser compensado por la adición de un estabilizante osmótico (como el sorbitol) al medio. Estos resultados sugieren una incapacidad en estas células para

mantener la integridad celular, posiblemente debido a deficiencias en la construcción de la pared. Se ha postulado que la causa del fenotípico lítico de células que carecen de las fosfatasas Ppz podría ser un incremento en la turgencia celular como consecuencia de una mayor entrada de potasio al hiperactivar los transportadores de potasio Trk (Merchan *et al.*, 2004), de tal manera que dichas células necesitan reforzar la pared celular, presumiblemente a través de la vía de señalización de la MAP quinasa Sit2.

Las fosfatasas Ppz también participan en la progresión del ciclo celular. La sobreexpresión de *PPZ1* da lugar a un defecto de crecimiento debido al retraso en la transición de la fase G1 a la S del ciclo celular (Clotet *et al.*, 1996; Clotet *et al.*, 1999). Este efecto es contrario al que lleva a cabo una fosfatasa relacionada con la subfamilia de las PP2A, codificada por el gen *SIT4*. La delección de *SIT4* da lugar, en función del fondo genético, a células inviables o células que presentan un crecimiento lento (Sutton *et al.*, 1991). La delección de *PPZ1* rescata parcialmente el defecto de crecimiento del mutante *sit4* (Clotet *et al.*, 1999).

Ppz1 y Ppz2 también están implicadas en la regulación de la traducción de proteínas. Mediante el análisis electroforético bidimensional de extractos celulares marcados con ³²P se ha identificado una fosfoproteína que presenta una movilidad diferente en células *ppz1 ppz2* respecto a las células salvajes. Esta proteína se ha identificado como el factor de elongación de la traducción 1B α (Tef5), el intercambiador de GTP-GDP del factor de elongación 1 (EF1). Tef5 parece estar fosforilada *in vivo* en el residuo Ser86 y la falta de las fosfatasas Ppz incrementa la fosforilación en este residuo (de Nadal *et al.*, 2001). Aunque Ppz1 es capaz de unirse *in vivo* a EF1B α , lo que podría indicar que es sustrato directo de la fosfatasa, ésta es incapaz de defosforilarlo *in vitro*. De todas formas, es evidente que la regulación del estado de fosforilación de Tef5 por Ppz resulta en una modificación de la fidelidad traduccional, hecho que se deduce de la observación de que mutantes *ppz* son tolerantes a ciertos inhibidores traduccionales y presentan una disminución en la fidelidad de la traducción (de Nadal *et al.*, 2001).

1.4. Subunidades reguladoras de las fosfatasa Ppz.

A diferencia de lo que ocurre con la fosfatasa PP1, para la cual se han identificado diversas subunidades reguladoras relacionadas con diferentes funciones celulares, hasta el inicio de este trabajo sólo se había descrito una única subunidad para las fosfatasas Ppz, que además regula todas las funciones en las cuales intervienen. Esta subunidad reguladora es la proteína Hal3.

El gen *HAL3/SIS2* fue identificado en dos laboratorios, de forma independiente, como un gen capaz de conferir tolerancia salina cuando se sobreexpresa en células salvajes (Ferrando *et al.*, 1995) y como un supresor multicopia del defecto de crecimiento de un mutante *sit4*, ya que su sobreexpresión normaliza la expresión de las ciclinas de fase G1 Cln1 y Cln2 (Di Como *et al.*, 1995).

La sobreexpresión de *HAL3* confiere tolerancia a altas concentraciones de cationes sodio y litio (Ferrando *et al.*, 1995), mientras que la falta de este gen incrementa de forma marcada la halosensibilidad (Ferrando *et al.*, 1995; de Nadal *et al.*, 1998). En relación al mantenimiento de la integridad celular, la sobreexpresión de *HAL3* agrava el fenotipo lítico del mutante *slt2*, de tal manera que sólo es viable en presencia de sorbitol (de Nadal *et al.*, 1998). Por el contrario, la delección de este gen mejora sustancialmente el crecimiento de células que carecen del gen *SLT2* (de Nadal *et al.*, 1998). Por otro lado, un exceso de Hal3 permite eliminar, al menos en parte, el defecto de crecimiento resultante de deleccionar el gen que codifica para la fosfatasa Sit4 e inducir la síntesis de ciclinas (Di Como *et al.*, 1995; Clotet *et al.*, 1999), así como acelerar la salida de una parada en G1 inducida por la feromona α -factor (Ferrando *et al.*, 1995; Di Como *et al.*, 1995) e incrementar la velocidad de gemación del mutante *sit4* (de Nadal *et al.*, 1998). La doble delección de los genes *SIT4* y *HAL3* conduce a un fenotipo de letalidad sintética que resulta de un bloqueo en la fase G1 del ciclo celular (Di Como *et al.*, 1995; Simon *et al.*, 2001). Por último, células que sobreexpresan *HAL3* presentan un incremento en la fosforilación de Tef5 (el factor de elongación traduccional 1B α), de forma similar a lo observado para el doble mutante *ppz1 ppz2* (de Nadal *et al.*, 2001).

Así pues, las funciones atribuidas a Hal3 son perfectamente compatibles con las adjudicadas a las fosfatasas Ppz. De hecho, se ha demostrado que Hal3 actúa como subunidad reguladora negativa de Ppz1, ya que es capaz de unirse e inhibir la fosfatasa *in vivo* e *in vitro*. Esta unión tiene lugar con el dominio carboxi-terminal de

Ppz1, que es donde se localiza el centro catalítico del enzima e inhibe la actividad de la fosfatasa en todas las funciones descritas de ésta (de Nadal *et al.*, 1998; de Nadal *et al.*, 2001). Como es lógico, los fenotipos resultantes de la sobreexpresión y la delección de *HAL3* son opuestos a los observados para las fosfatasas Ppz (ver tabla 1), y además se pierden en células que carecen de Ppz1 y Ppz2, lo que sugiere que para desarrollar todas estas funciones Hal3 depende totalmente de la presencia de ambas fosfatasas (de Nadal *et al.*, 1998) y el papel biológico de Hal3 podría explicarse mediante la inhibición de las mismas. De hecho, hasta el momento de la realización de este trabajo no se habían descrito funciones de Hal3 independientes de estas dos fosfatasas.

Proceso celular	Cepa	Fosfatasa Ppz1		Hal3	
		Sobreexpresión	Delección	Sobreexpresión	Delección
Homeostasis salina	salvaje	NA	tolerancia Na ⁺ /Li ⁺	tolerancia Na ⁺ /Li ⁺	sensibilidad Na ⁺ /Li ⁺
	<i>ppz1</i>	-	-	tolerancia Na ⁺ /Li ⁺	NF
	<i>ppz1,2</i>	-	-	NF	NF
Ciclo celular	salvaje	empeora crecimiento	NF	NF	NF
	<i>sit4</i>	letal	mejora crecimiento	mejora crecimiento	letal
Integridad celular	salvaje	NA	sensibilidad a cafeína y ↑ t ^a	NF	NF
	<i>sit2</i>	mejora crecimiento	letal	letal	mejora crecimiento
Traducción proteica	salvaje	NA	tolerancia a inhibidores traduccionales y ↓ fidelidad traduccional	tolerancia a inhibidores traduccionales y ↓ fidelidad traduccional	NA

Tabla 1. Comparación entre los fenotipos resultantes de la sobreexpresión o la delección de las fosfatasas Ppz y su subunidad reguladora negativa Hal3. Se han agrupado los fenotipos en relación a los procesos celulares en los que participan. NA significa no analizado y NF hace referencia a la ausencia de fenotipo. En los casos analizados los fenotipos obtenidos por la falta de Ppz son similares a los que se obtienen al sobreexpresar Hal3, y viceversa.

El gen *HAL3* codifica una proteína de 562 aminoácidos que presenta una cola carboxi-terminal extremadamente rica en residuos ácidos, sobre todo en ácidos aspárticos. Sorprendentemente, y de forma contraria a lo que sucede con las fosfatasas Ppz que parecen exclusivas de hongos, Hal3 está conservada evolutivamente, con homólogos en hongos, plantas y mamíferos, aunque en general no se conserva la cola ácida (figura 1).

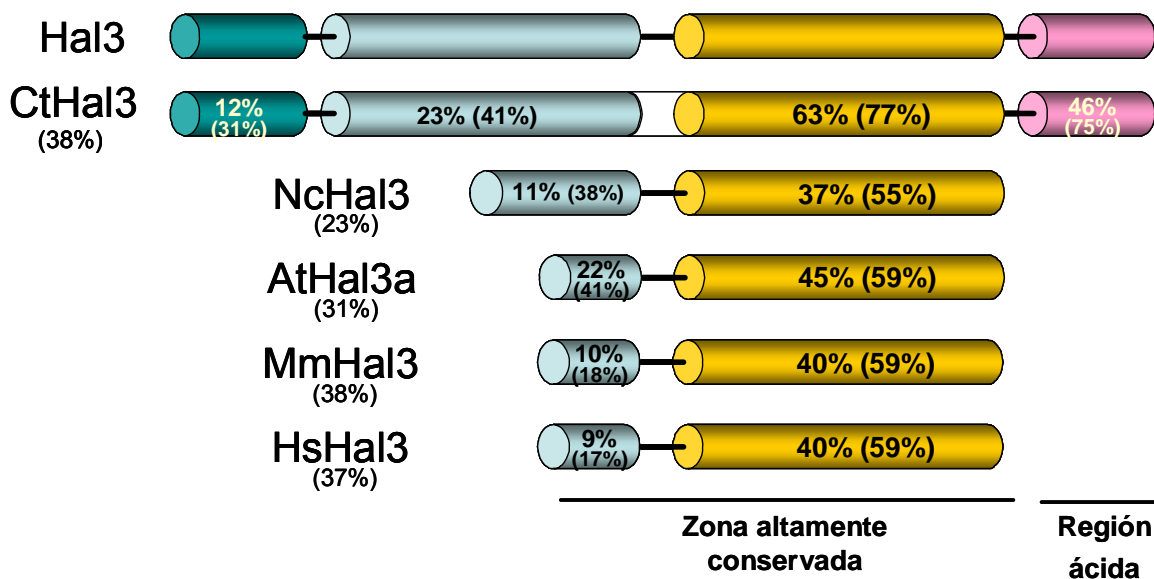


Figura 1. Comparación esquemática de Hal3 con sus homólogos de otros organismos. Se ha comparado la secuencia proteica de Hal3 de *Saccharomyces cerevisiae* con las de homólogos de *Candida tropicalis* (CtHal3), *Neurospora crassa* (NcHal3), *Arabidopsis thaliana* (AtHal3a), *Mus musculus* (MmHal3) y *Homo sapiens* (HsHal3). Los porcentajes indican el grado de identidad y de similitud (entre paréntesis) con Hal3.

Estudios realizados con la isoforma AtHal3a de *Arabidopsis thaliana* sugieren la posible existencia de funciones conservadas entre esta proteína y Hal3 de *Saccharomyces cerevisiae*, ya que la sobreexpresión de AtHal3a complementa parcialmente la sensibilidad salina de células de levadura *hal3* (Espinosa-Ruiz *et al.*, 1999). La purificación de la proteína AtHal3a recombinante de *E. coli* permitió la identificación de la existencia de un grupo cromóforo (FMN), lo que demuestra que AtHal3a es una flavoproteína (Espinosa-Ruiz *et al.*, 1999). Esta proteína se ha cristalizado y se conoce su estructura tridimensional (Albert *et al.*, 2000a). En este trabajo se postula la posibilidad que AtHal3a actúe como una deshidrogenasa, ya que presenta una gran similitud con la proteína EpiD, una flavoproteína bacteriana que reconoce un sustrato peptídico y cataliza la deshidrogenación del residuo cisteína

carboxi-terminal. En esta reacción sería imprescindible la Histidina 90 (que correspondería a la Histidina 378 conservada en Hal3 de *S. cerevisiae*). Trabajos posteriores han definido que AtHal3 sería capaz de catalizar, *in vitro*, la reacción de descarboxilación de 4'-fosfopantotenoilcisteína (PPC) a fosfopanteteína (PP), un paso intermedio en la vía de síntesis de coenzima A. Para este proceso son importantes los residuos Histidina 90 y Cisteína 175, este último no conservado en Hal3 (Kupke *et al.*, 2001; Hernandez-Acosta *et al.*, 2002; Steinbacher *et al.*, 2003; Kupke *et al.*, 2003). Además AtHal3a es capaz de complementar el defecto de crecimiento de un mutante termosensible del gen *dfp* deficiente en síntesis de coenzima A en la bacteria *E. coli* (Yonamine *et al.*, 2004). El gen *dfp* (*coaBC*) codifica una proteína bifuncional que cataliza dos reacciones secuenciales en la vía de síntesis de coenzima A. Las dos actividades que presenta esta proteína bacteriana son fosopantotenato cisteína ligasa y fosopantotenoilcisteína descarboxilasa (Kupke *et al.*, 2000; Kupke, 2001; Strauss *et al.*, 2001), siendo esta última actividad la que se propone para la proteína de plantas. Este hecho sugiere que la proteína AtHal3a debe estar realizando esta función en la planta *Arabidopsis thaliana* (Spitzer and Weiss, 1985; Spitzer *et al.*, 1988; Yonamine *et al.*, 2004). También se han identificado los genes responsables de la síntesis de coenzima A en nuestra especie. La PPC descarboxilasa (PPCDC) humana (denominada HsHal3 en la figura 1) es capaz de catalizar *in vitro* la descarboxilación de PPC (Daugherty *et al.*, 2002) y, como sucede con AtHal3a, esta proteína también requiere la cisteína, en este caso el residuo C173 (Strauss *et al.*, 2004).

Los estudios realizados hasta el momento ponen de manifiesto la conservación de los residuos His y Cys necesarios para que tenga lugar la descarboxilación de la fosfopantotenoilcisteína en eucariotas superiores pero también en eubacterias. Un trabajo reciente demuestra que, por el contrario, en arqueobacterias sólo se conserva el residuo histidina (Kupke and Schwarz, 2006).

En *Saccharomyces cerevisiae*, Hal3 ha sido caracterizada como proteína reguladora negativa de las fosfatasa Ppz. Aunque hace ya tiempo que se sabe que Hal3 interacciona con la mitad carboxi-terminal de la fosfatasa (de Nadal *et al.*, 1998), hasta hace poco se desconocían los residuos implicados en la interacción entre las dos proteínas y los residuos importantes para la inhibición de la fosfatasa. Aunque estructuralmente Hal3 no presenta un grado de similitud significativo con ninguna de las subunidades reguladoras de la PP1 y no interacciona con Glc7 (de Nadal *et al.*, 1998; Garcia-Gimeno *et al.*, 2003), contiene la secuencia ²⁶³KLHVLV²⁶⁸, parecida al

motivo RVxF presente en la mayoría de las subunidades reguladoras de la PP1. Sin embargo, la mutagénesis dirigida de este motivo muestra que este elemento no es importante para la unión e inhibición de Ppz1 por parte de Hal3 (Munoz *et al.*, 2004).

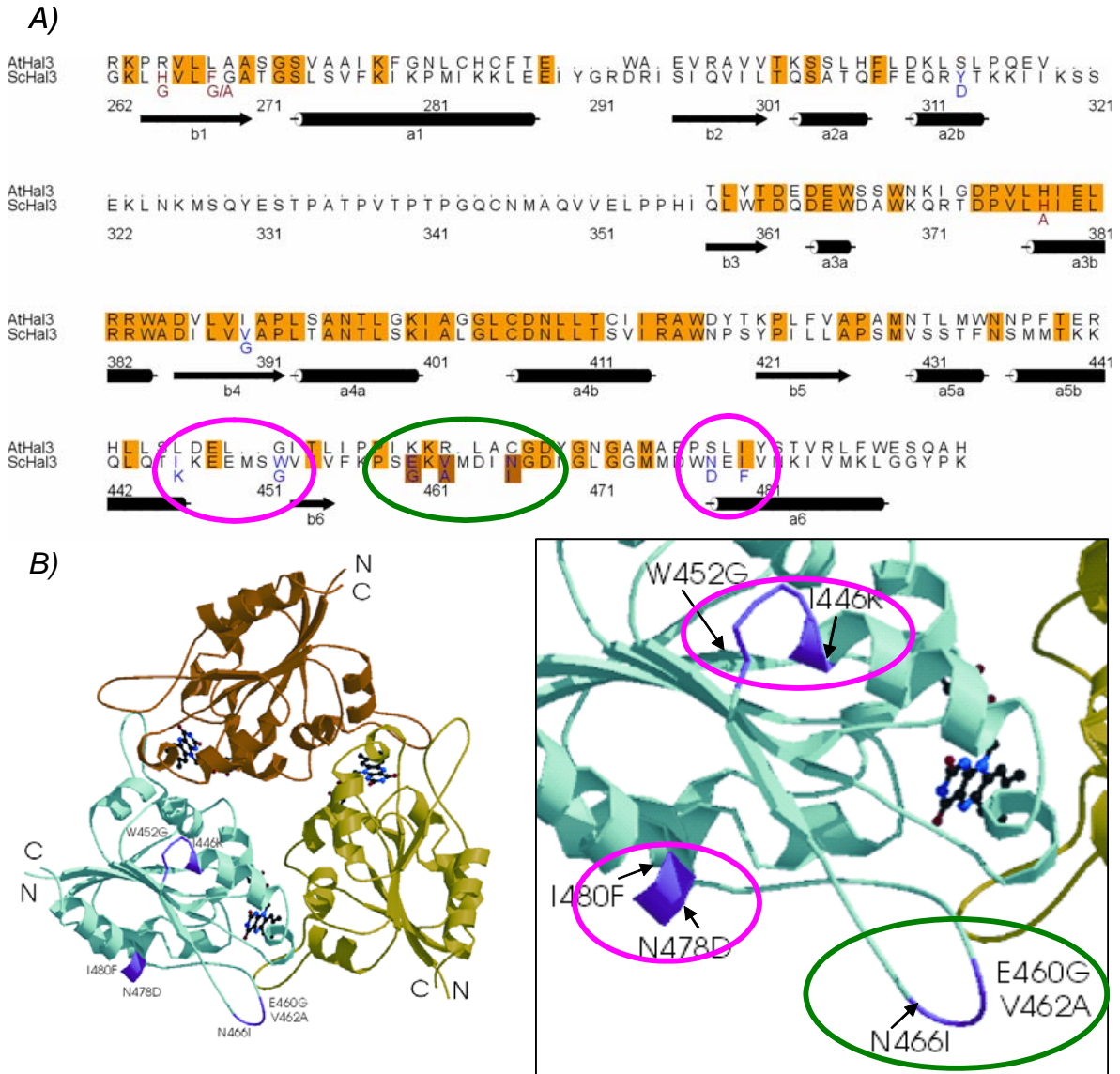


Figura 2. A, alineamiento entre la secuencia de AtHal3 y el dominio central de Hal3 de *S. cerevisiae*. En amarillo están marcados los residuos aminoácidos idénticos entre las dos secuencias. Las mutaciones puntuales analizadas se indican bajo la secuencia de Hal3. **B**, representación de la estructura modelada de la zona central de Hal3 de levadura. En azul se muestran los residuos 446-452, 460-466 y 478-480. Las flechas representan las mutaciones puntuales. Los círculos rosas engloban los residuos importantes para la interacción de Hal3 con Ppz1, mientras que el círculo verde hace referencia a los residuos necesarios para la inhibición de la fosfatasa.

En cambio, un experimento de mutagénesis al azar ha permitido identificar residuos importantes para la unión y la inhibición de Ppz (figura 2). Aunque se desconoce la estructura tridimensional de Hal3, mediante modelización molecular del núcleo conservado se han podido situar éstos en la superficie de la proteína y demostrar que Hal3 y Ppz1 interaccionan al menos en dos puntos diferentes (que implica por un lado los residuos Ile446 y Trp452 y por otro Ile480 y Asn478) y que la inhibición, en la que es importante el denominado *flap* (Albert *et al.*, 2000a), que contiene los residuos Glu460, Val462 y Asn466, tiene lugar cuando los dos puntos están ocupados (Munoz *et al.*, 2004). Estos residuos no se encuentran totalmente conservados en la proteína de *A. thaliana* (figuras 2 y 3).

Recientemente, se ha descrito que la interacción entre Hal3 y Ppz1 está modulada por el pH intracelular, de tal manera que a pH alcalino hay una menor interacción entre estas dos proteínas *in vitro*. En este trabajo proponen al complejo Hal3-Ppz1 como sensor de pH intracelular (Yenush *et al.*, 2005).

El genoma de la levadura *S. cerevisiae* presenta dos ORF, *YOR054c* y *YKL088w*, que codifican dos proteínas estructuralmente similares a Hal3. Las tres comparten un cierto grado de similitud de secuencia, sobretodo en la mitad carboxi-terminal, y presentan una cola extremadamente ácida (figura 3). *YOR054c* fue identificado en nuestro laboratorio como un gen supresor multicopia del bloqueo en G1 del ciclo celular de un mutante condicional *sit4 hal3*, por lo que recibió el nombre de *VHS3* (*v*iable en el mutante *hal3 sit4*) (Munoz *et al.*, 2003). La sobreexpresión de este gen mejora la tolerancia salina del mutante *hal3*, por lo que *VHS3* podría ser un homólogo funcional de *HAL3*. De hecho, en *Vhs3* se encuentran conservados todos los residuos identificados en Hal3 que son importantes tanto para la unión como para la inhibición de la fosfatasa Ppz1 (figura 3). En este trabajo analizaremos en detalle la proteína *Vhs3* y sus funciones.

A diferencia de *HAL3* y *VHS3*, *YKL088w* es un gen esencial, aunque hasta el momento se desconoce su función. De las tres proteínas de *S. cerevisiae*, es la que presenta una mayor similitud con *AtHal3a* y además contiene en su secuencia los residuos His391 y Cys478 (que se corresponden a la His90 y Cys175 de *AtHal3*), mientras que Hal3 y *Vhs3* sólo contienen la His90 (His378 en Hal3 y His459 en *Vhs3*). Aunque *Ykl088w* contiene todos los residuos aminoacídicos necesarios para la unión e inhibición de Ppz1 (figura 3), datos preliminares sugieren que esta proteína podría tener funciones independientes de las fosfatasas Ppz (Ruiz *et al.*, no publicado).

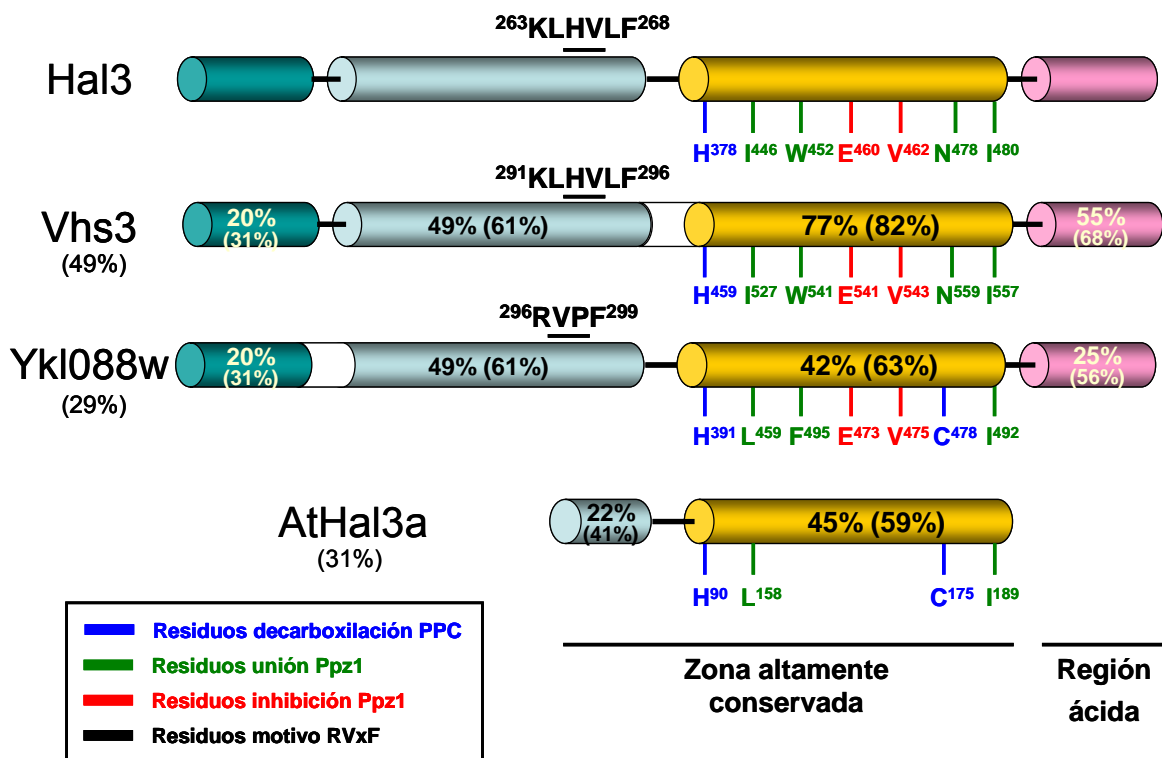


Figura 3. Comparación esquemática de las secuencias de Hal3, Vhs3 (o Yor054c), Yki088w y AtHal3a. Los porcentajes indican el grado de identidad y de homología (entre paréntesis) con Hal3. Se destacan en azul los residuos identificados en la proteína de *Arabidopsis thaliana* que son necesarios para la decarboxilación de la 4'-fosfopantotenilcisteína; en verde aquellos residuos que están implicados en la interacción de Hal3 con la fosfatasa Ppz1; en rojo los residuos necesarios para la inhibición de Ppz1, y en negro los residuos de posibles motivos RVxF definidos para la mayoría de las subunidades reguladoras de la fosfatasa PP1.

Hace algún tiempo se demostró que las fosfatasas Glc7 y Ppz1 pueden desempeñar funciones comunes, como sería el caso de la tolerancia salina (Williams-Hart *et al.*, 2002). Por otra parte, se ha demostrado por análisis de doble híbrido que Ppz1 es capaz de interactuar con la proteína Ypi1 (Venturi *et al.*, 2000), una proteína esencial de 155 aminoácidos codificada por el ORF *YFR003c*. Ypi1 puede también interactuar con Glc7, lo que ha llevado a postular que Glc7 y Ppz1 podrían compartir diversas subunidades reguladoras en el desarrollo de sus funciones comunes. (Venturi *et al.*, 2000). En un trabajo reciente (García-Gimeno *et al.*, 2003) se ha confirmado de forma definitiva Ypi1 como la primera subunidad reguladora negativa de Glc7, aunque los fenotipos asociados a la sobreexpresión de este gen no descartan por completo la

posibilidad de que también lo sea de Ppz1. En cualquier caso, si así fuera, este papel será seguramente poco relevante. Estudios en esta dirección se llevan a cabo actualmente en nuestro laboratorio en colaboración con el grupo del Dr. Pascual Sanz.

2. HOMEOSTASIS IÓNICA EN *Saccharomyces cerevisiae*.

Una cualidad esencial de la fisiología de las células vivas es el mantenimiento de la homeostasis iónica, ya que afecta a toda una serie de procesos que determinan su supervivencia, como son la turgencia celular, el potencial de membrana, el contenido iónico y el pH intracelular. Las membranas celulares contienen diversos transportadores de cationes que aseguran que la composición iónica intracelular sea correcta. A su vez, la regulación de estos transportadores permite a las células la adaptación frente a cambios en las condiciones del entorno.

2.1. El transporte de iones en la regulación de la homeostasis salina.

Las células eucariotas y, por tanto, la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se ven afectadas en su biología por la presencia o ausencia de iones como el sodio, el litio, el potasio, el magnesio y el calcio. Por ello, la concentración intracelular de estos iones se regula fuertemente con la finalidad de evitar un exceso o una carencia que resulte perjudicial para la célula (Serrano, 1996). Las células acumulan grandes cantidades de potasio en el interior, lo que contribuye al mantenimiento de la turgencia celular y del potencial de membrana, y, en cambio, intentan expulsar el sodio (o su análogo litio) del interior celular. Este hecho puede ser explicado, en parte, por la capacidad que tiene el sodio de desplazar el Mg^{2+} que es esencial en el centro catalítico de algunas enzimas, como es el caso de la fosfatasa Hal2 (Murguía *et al.*, 1996; Albert *et al.*, 2000b). Por ello, las células han desarrollado diferentes estrategias para evitar la presencia de altas concentraciones de sodio (o litio) en su interior. Tales estrategias pueden basarse en la discriminación en la entrada de cationes (los transportadores presentan mayor afinidad por potasio que por sodio), la eliminación eficiente de los cationes tóxicos o la compartimentación selectiva de cationes en los orgánulos (como la vacuola).

La levadura es un organismo con una gran capacidad adaptativa a cambios en la concentración de nutrientes o sales que tengan lugar en el medio en el que se encuentra. Esta respuesta depende de toda una serie de transportadores de membrana y de las vías de transmisión de señales involucradas en la regulación de estos transportadores. Aunque se han descrito más de 200 transportadores de

membrana posibles (Van Belle and Andre, 2001) es poco lo que se conoce en la actualidad sobre su regulación.

A continuación analizaremos los transportadores relevantes en el control de la homeostasis iónica (diferenciando entre sistemas de entrada y salida de iones), así como los reguladores que se les conocen (figura 4).

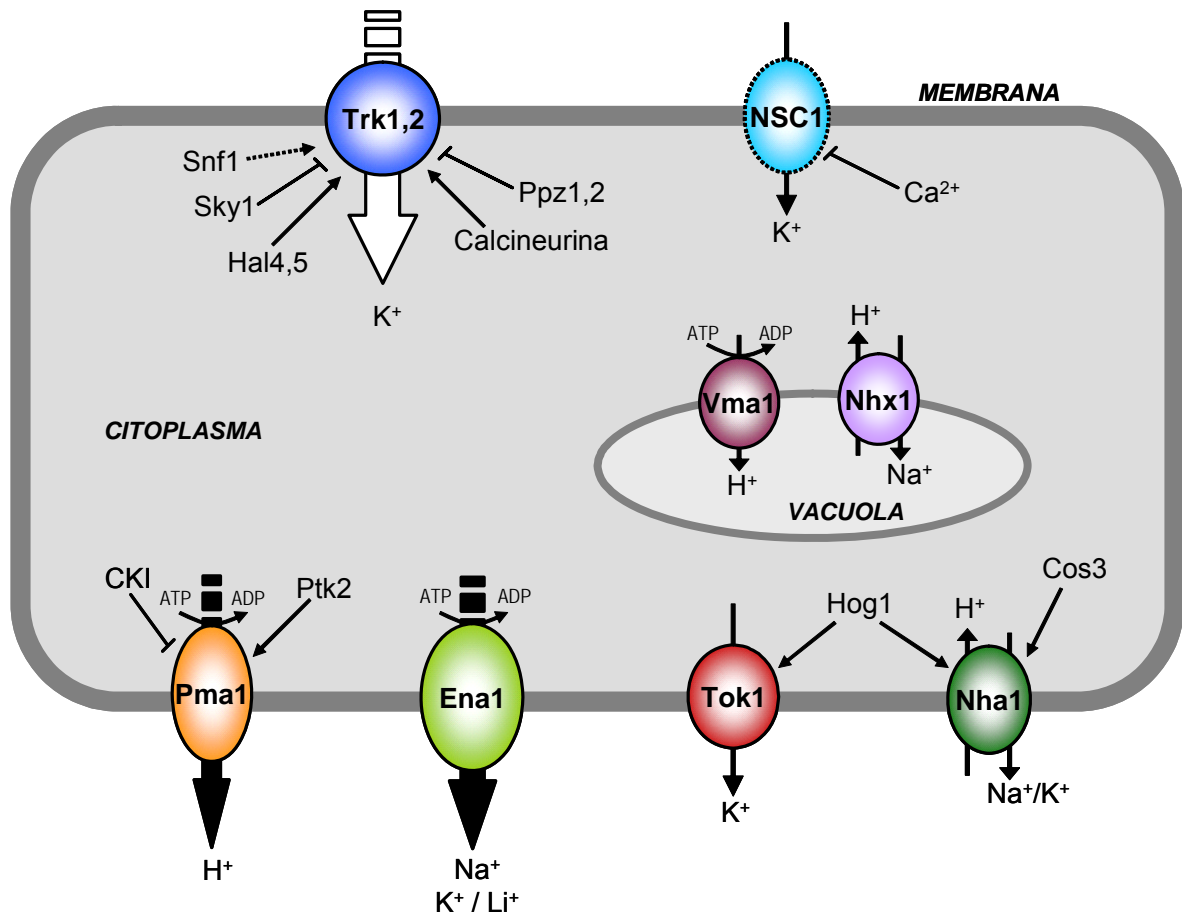


Figura 4. Principales sistemas de transporte implicados en la homeostasis de iones monovalentes de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Se muestran transportadores localizados en la membrana plasmática y en la membrana de la vacuola, así como los reguladores descritos para éstos. La línea discontinua en NSC1 denota la falta de identidad molecular de este sistema de transporte.

2.2. Sistemas de salida de iones.

El gen *PMA1* codifica la ATPasa de H^+ responsable de generar el potencial de membrana en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Serrano *et al.*, 1986). Esta ATPasa está implicada en el transporte activo y la regulación del pH intracelular y, además, es esencial para la viabilidad de la célula (Serrano, 1988). El potencial de

membrana creado por Pma1 es el motor que alimenta el transporte de iones y el de otras sustancias (como nutrientes) que se lleva a cabo por transportadores específicos. La ATPasa Pma1 es activada a nivel post-transcripcional por el metabolismo de glucosa (Portillo, 2000). Esta activación tiene lugar cuando se inhibe la proteína casein quinasa I (CKI) (Estrada *et al.*, 1996) o cuando se activa la proteína quinasa Ptk2 (Goossens *et al.*, 2000).

El principal sistema de salida de iones sodio y litio en la levadura es la ATPasa codificada por el gen *ENA1/PMR2* (Haro *et al.*, 1991). Este gen forma parte de un conjunto de cuatro o cinco genes, en función de la cepa, que se encuentran en tandem en el cromosoma IV, denominados *ENA1-ENA4* o *ENA5*. Los genes *ENA2*, *ENA3*, *ENA4* y *ENA5* se expresan poco y de manera constitutiva, mientras que *ENA1*, aunque presenta niveles basales bajos, se induce transcripcionalmente en respuesta a altas concentraciones de sodio y litio, pH alcalino o una elevada presión osmótica (Garcia-deblas *et al.*, 1993; Wieland *et al.*, 1995; Marquez and Serrano, 1996; Mendizabal *et al.*, 2001). Esta inducción de la expresión de *ENA1* en respuesta a diferentes condiciones de estrés implica vías de transducción de señales de las que hablaremos detalladamente en el apartado 2.4.

Además de Ena1 existe un antiportador Na^+/H^+ de membrana plasmática codificado por el gen *NHA1* (Prior *et al.*, 1996). Este transportador utiliza el potencial de membrana generado por Pma1 y el exceso de protones que hay en el medio a pH ácido para entrar protones y expulsar cationes como sodio, potasio y litio a favor de gradiente (Banuelos *et al.*, 1998; Kinclova *et al.*, 2001). Aunque Nha1 jugaría un papel en la tolerancia salina, parece ser menos importante para la extrusión de sodio que la ATPasa de sodio, lo cual se deduce del hecho de que la delección de *NHA1* solamente conduce a una hipersensibilidad de las células a sodio o litio cuando no están presentes los genes *ENA1-ENA4* (Prior *et al.*, 1996; Banuelos *et al.*, 1998). Además de su papel en la homeostasis iónica, se ha descrito una posible función en la regulación del ciclo celular, concretamente su sobreexpresión acelera el paso de la fase G1 a la S del ciclo en un mutante condicional *sit4 hal3* (Simon *et al.*, 2001; Simon *et al.*, 2003). Recientemente se ha descrito la proteína Cos3 como un posible activador de la función salina de Nha1 (Mitsui *et al.*, 2004), ya que se une *in vitro* al transportador y, mientras que la delección de *COS3* da lugar a células halosensibles, la sobreexpresión les confiere tolerancia aunque de manera dependiente de la presencia de *NHA1*.

También ha sido descrita la activación del transportador Nha1 en respuesta a estrés osmótico mediante la acción directa de la MAPK Hog1 (Proft and Struhl, 2004)

Existe también un gen denominado *TOK1/YKC1/YORK/DUK1* que codifica un canal de expulsión de potasio (Ketchum *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1995; Lesage *et al.*, 1996). Tok1 es un canal dependiente de voltaje que se abre sólo en determinadas condiciones (Fairman *et al.*, 1999), y cuya función sería la de rectificar la concentración de potasio intracelular. Recientemente se ha identificado la MAPK Hog1 como un posible regulador positivo de la actividad de este canal (Proft *et al.*, 2004)

Otra manera eficaz de eliminar los cationes tóxicos del citoplasma y mejorar así la tolerancia salina consiste en secuestrar el sodio en compartimentos intracelulares. A este respecto, es necesario tener en cuenta el antiportador de vacuola Nhx1 que utiliza el gradiente de protones generado por la ATPasa vacuolar (Vma1) para introducir el sodio en la vacuola (Nass *et al.*, 1997; Nass and Rao, 1998). Recientemente, también se ha demostrado en plantas el papel de Nhx1 en la homeostasis del potasio intracelular (Fukuda *et al.*, 2004).

2.3. Sistemas de entrada de iones.

Mediante la captación de potasio la célula disminuye el potencial de membrana generado por Pma1 evitando así la entrada de cationes tóxicos, como el sodio y el litio, que tiene lugar a través de transportadores inespecíficos de baja afinidad. De esta manera existen diferentes transportadores de potasio que aseguran la entrada de este catión en la levadura.

Las proteínas Trk1 y Trk2 constituyen el principal sistema de entrada de potasio en las células y, por tanto, debido a las grandes cantidades de potasio que transportan son los principales consumidores del potencial de membrana generado por la ATPasa Pma1. Trk1 es un transportador de alta afinidad para potasio (Ramos *et al.*, 1985; Gaber *et al.*, 1988). Células que carecen de *TRK1* presentan un defecto significativo en el transporte de K^+ y son incapaces de crecer en condiciones limitantes de este catión (Ramos *et al.*, 1985; Gaber *et al.*, 1988; Ko and Gaber, 1991). La mutación de *TRK2* (que es un gen que se expresa poco) agrava las necesidades de

potasio del mutante *trk1* (Ko *et al.*, 1990; Ramos *et al.*, 1994). El defecto de transporte de potasio que presenta el mutante *trk1 trk2* resulta en un incremento en la sensibilidad a cationes sodio y litio (Haro *et al.*, 1993; Gomez *et al.*, 1994; Mendoza *et al.*, 1994; Bertl *et al.*, 2003) y en una hiperpolarización de la membrana plasmática, siendo más sensibles a compuestos como higromicina B, espermina y TMA (Madrid *et al.*, 1998).

Debido a su importancia en la regulación del potencial de membrana y de la homeostasis salina, los transportadores de K⁺ Trk se encuentran finamente regulados a nivel post-transcripcional. De este modo son activados por las proteína quinasas Hal4 y Hal5 en respuesta a la privación de K⁺ (Mulet *et al.*, 1999) e inhibidos por la proteína quinasa Sky1 (Forment *et al.*, 2002; Erez and Kahana, 2002). En respuesta a estrés por sodio el sistema Trk es activado por la proteína fosfatasa dependiente de calcio/calcineurina (Mendoza *et al.*, 1994) e inhibido por las proteína fosfatasas Ppz1 y Ppz2 (Yenush *et al.*, 2002; Yenush *et al.*, 2005). Al igual que Pma1, el transporte de K⁺ es activado por el metabolismo de glucosa, aunque en este caso se desconoce el mecanismo (Ramos *et al.*, 1992). A este respecto, se ha descrito otra proteína reguladora del sistema de transporte Trk, la proteína quinasa Snf1 (Portillo *et al.*, 2005). En este trabajo se postula la posibilidad que Snf1 activaría Trk1-Trk2 de manera indirecta a través del activador transcripcional Sip4, pero que esta regulación se daría a nivel post-traducciona.

El hecho de que células que carecen de los transportadores Trk1 y Trk2 sean viables pone de manifiesto la existencia de un sistema de transporte de potasio de baja afinidad. Hoy día se desconoce la naturaleza del transportador o transportadores encargados de este transporte aunque se han postulado dos alternativas. La primera consiste en la existencia de un transporte inespecífico de potasio que tendría lugar a través de las permeasas de azúcares y/o aminoácidos (Wright *et al.*, 1997; Madrid *et al.*, 1998). La segunda alternativa se denomina NSC1 (*'non-specific cation channel 1'*) (Bihler *et al.*, 1998), que consiste en una corriente de potasio que es inhibida por cationes divalentes como el calcio (Bihler *et al.*, 1998; Roberts *et al.*, 1999). Aunque se ha demostrado que NSC1 es el principal componente del transporte de potasio de baja afinidad en la levadura (Bihler *et al.*, 2002), no se ha identificado el gen o genes responsables.

2.4. Regulación de la expresión del gen *ENA1*.

Como ya hemos mencionado anteriormente, Ena1 constituye el principal sistema detoxificador de sodio y litio en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, de tal manera que células que carecen de esta proteína presentan un incremento drástico en su sensibilidad a sodio, litio y pH alcalino (Haro *et al.*, 1991). La regulación de Ena1 tiene lugar, principalmente, a nivel transcripcional y está afectada por señales tales como estrés salino, estrés osmótico, alcalinización del entorno o presencia de glucosa, señales que implican diferentes vías reguladoras de la célula (ver figura 5).

Motivo	Secuencia	Posición	TF	Referencia
GATA	5'-GATAA-3'	-1370/-1366	Gln3	(Crespo <i>et al.</i> , 2001)
GATA	5'-GATAAG-3'	-1107/-1102	Gln3, Gat1	(Crespo <i>et al.</i> , 2001)
GATA	5'-GATAAG-3'	-1075/-1070	Gln3, Gat1	(Crespo <i>et al.</i> , 2001)
GATA	5'-GATAA-3'	-972/-969	Gln3	(Crespo <i>et al.</i> , 2001)
CDRE	5'-GAATGGCTG-3'	-813/-821	Crz1	(Mendizabal <i>et al.</i> , 2001)
NRG	5'-CCCTC-3'	-725/-729	Nrg1	(Lamb and Mitchell, 2003)
CDRE	5'-GGGTGGCTG-3'	-727/-719	Crz1	(Mendizabal <i>et al.</i> , 2001)
STRE	5'-AGGGG-3'	-651/-647	NF	(Proft and Serrano, 1999)
NRG	5'-CCCCT-3'	-651/-647	Nrg1	(Lamb <i>et al.</i> , 2003)
GATA	5'-GATAA-3'	-636/-632	Gln3	(Crespo <i>et al.</i> , 2001)
MIG	5'-ATTTTGC GGGG-3'	-544/-534	Mig1, Mig2	(Proft <i>et al.</i> , 1999)
CRE	5'-TGACGTTT-3'	-509/-502	Sko1	(Proft <i>et al.</i> , 1999)
GATA	5'-GATAA-3'	-243/-239	Gln3	(Crespo <i>et al.</i> , 2001)

Tabla 2. Lista de los principales motivos identificados en el promotor del gen *ENA1*. De cada motivo se muestra la secuencia, la posición en el promotor de *ENA1* respecto al ATG, el factor de transcripción (TF) que interacciona o podría interaccionar con la secuencia y la referencia del trabajo donde se describe. El elemento STRE de respuesta a estrés general identificado en este promotor no es funcional (NF). La región ARR2 (en gris), comprende la secuencia -573/-490 (Serrano *et al.*, 2002) y contiene los elementos MIG y CRE.

2.4.1. Represión por glucosa: vía de la quinasa Snf1.

La expresión del gen *ENA1* se reprime en presencia de glucosa gracias a la acción de los represores Mig1 y Ssn6/Tup1 (Alepuz *et al.*, 1997). Este proceso tiene lugar a través de la proteína quinasa Snf1. Cuando la glucosa es limitante, Snf1 se fosforila y activa por la acción de las quinasas Pak1 (también denominada Sak1), Elm1 o Tos3 (Kim *et al.*, 2005; Elbing *et al.*, 2006), regulando la transcripción de toda una serie de genes involucrados en la utilización de fuentes de carbono alternativas y en gluconeogénesis, mediante la fosforilación de Mig1, entre otros (Carlson, 1999). La adición de glucosa inactiva la quinasa Snf1 gracias a la acción de la proteína fosfatasa Glc7-Reg1 (Ludin *et al.*, 1998; Sanz *et al.*, 2000). La fosforilación de Mig1 comporta su cambio de localización desde el núcleo, donde reprime la expresión de diversos genes (Klein *et al.*, 1998) mediante la captación del complejo represor Ssn6-Tup1 (Treitel and Carlson, 1995; Tzamarias and Struhl, 1995), al citosol donde permanece inactivo.

La relación entre Snf1-Mig1 y *Ena1* se conoce desde hace tiempo. El mutante *snf1*, que es sensible a sodio y litio, no presenta el incremento en la expresión de *ENA1* que tiene lugar en condiciones limitantes de glucosa (Alepuz *et al.*, 1997). Además se ha identificado un elemento MIG funcional en el promotor del gen *ENA1* responsable de la represión del gen en presencia de abundante glucosa (ver tabla 2) (Proft *et al.*, 1999).

2.4.2. Estrés osmótico: vía de la MAPK Hog1.

La transcripción del gen *ENA1* se induce en respuesta a estrés salino a través de dos vías de señalización diferentes (Marquez *et al.*, 1996): la vía de Hog1, que media la inducción osmótica a bajas concentraciones de sal, y la vía de la calcineurina, que es responsable de la inducción a altas concentraciones de sal.

Hog1 es una MAPK que regula al represor Sko1, el cual se une al elemento CRE del promotor de *ENA1* (tabla 2) e inhibe la transcripción de este gen mediante la captación del complejo represor Ssn6-Tup1 (Proft *et al.*, 1999). En respuesta a estrés osmótico, esta represión se contrarresta por la activación de Hog1 que migra al núcleo y fosforila Sko1 en múltiples sitios. La fosforilación de Sko1 evita su interacción con Ssn6-Tup1, desreprimiendo la expresión del gen *ENA1*.

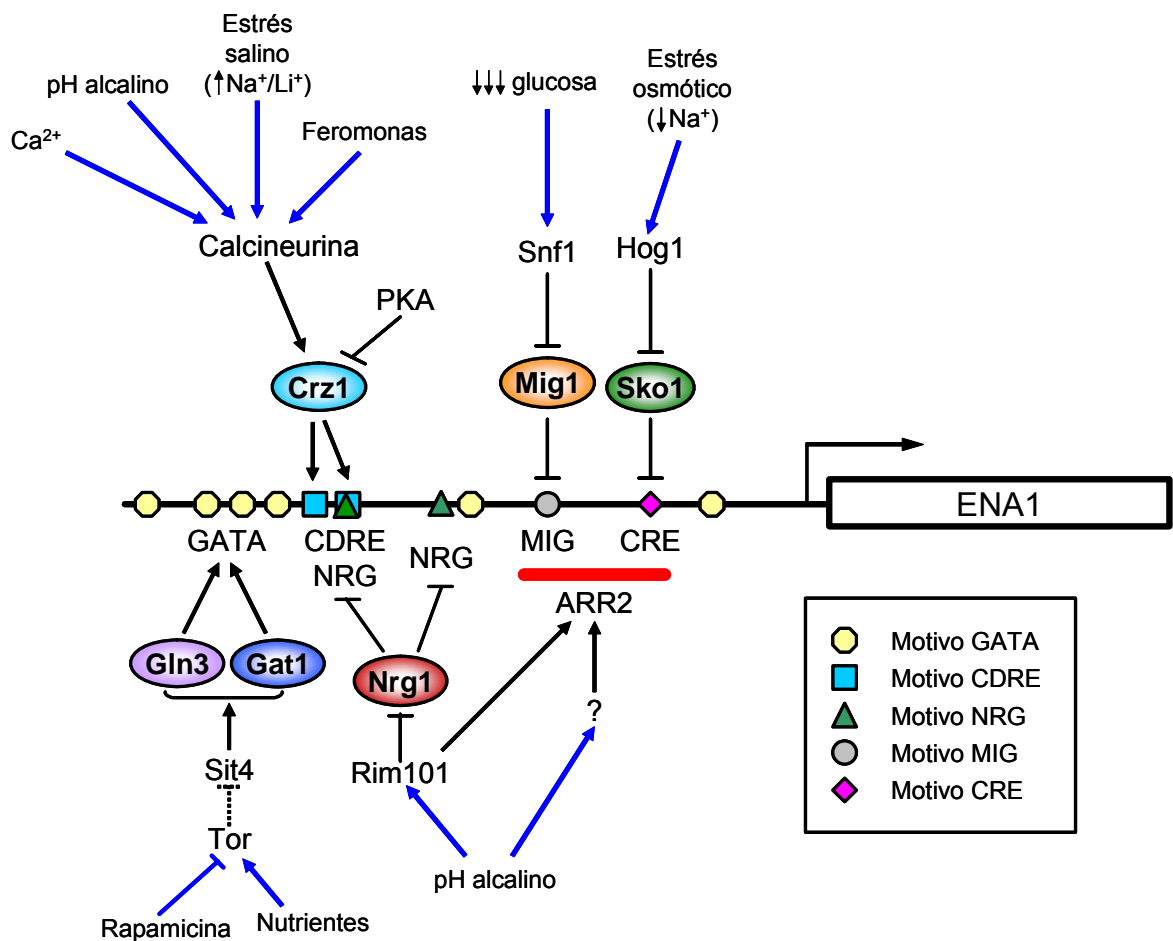


Figura 5. Esquema de la regulación de la expresión del gen *ENA1*. Se representan las principales vías de señalización identificadas así como las señales a las que responden.

2.4.3. Disponibilidad de nutrientes: vía de la quinasa TOR.

TOR es una quinasa, codificada por los genes *TOR1* y *TOR2*, cuya acción es inhibida por el antibiótico rapamicina y por la falta de nutrientes desencadenando una serie de procesos que permiten coordinar el crecimiento celular en relación a la disponibilidad de nutrientes (Crespo and Hall, 2002).

Se ha demostrado la existencia de relación entre la vía de la quinasa TOR y la ATPasa Ena1 (Crespo *et al.*, 2001). En respuesta a estrés salino TOR se inhibiría, dejando así de retener en el citoplasma a los factores de transcripción Gln3 y Gat1, que se translocarían al núcleo donde activarían la expresión de *ENA1*. En este proceso interviene la fosfatasa de tipo 2A Sit4 que se activa con la inhibición de TOR y libera a Gln3 y Gat1 para que puedan entrar en el núcleo (Beck and Hall, 1999).

Crespo y colaboradores demuestran que la expresión del gen *ENA1* se induce en presencia de rapamicina y que esta inducción no tiene lugar en el doble mutante *gln3 gat1* (Crespo *et al.*, 2001). Además este mutante muestra un fenotipo de sensibilidad a litio y sodio y una menor expresión de *ENA1*. Resultados similares se obtienen con los mutantes *tor1* y *sit4*. En el promotor de *ENA1* se han localizado 6 posibles motivos GATA a los que podría unirse Gln3, dos de los cuales también serían buenas dianas del factor de transcripción Gat1 (tabla 2).

2.4.4. Estrés salino y alcalino: importancia de la vía de señalización de la calcineurina.

La calcineurina es la Ser/Thr fosfatasa de tipo 2B regulada por Ca^{2+} /calmodulina. Esta fosfatasa es un heterodímero compuesto por una subunidad catalítica (A) y una subunidad reguladora (B). En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* la subunidad catalítica está codificada por dos genes redundantes, *CNA1* y *CNA2*, mientras que la reguladora está codificada por un único gen, *CNB1* (Cyert *et al.*, 1991; Kuno *et al.*, 1991; Cyert and Thorner, 1992). La calcineurina es inhibida específicamente por los inmunosupresores FK506 y ciclosporina A (Nakamura *et al.*, 1993). Estudios realizados con células que carecen del gen *CNB1* o con células tratadas con el inhibidor FK506 han demostrado que la calcineurina es necesaria en diversas situaciones ambientales, tales como la exposición a iones (OH^- , Mn^{2+} y Na^+/Li^+) o la incubación prolongada con la feromona del mating (α -factor) (Cyert *et al.*, 1992; Nakamura *et al.*, 1993; Mendoza *et al.*, 1994; Farcasanu *et al.*, 1995; Moser *et al.*, 1996; Withee *et al.*, 1997). Además la calcineurina es esencial en mutantes con defectos de pared celular, como *mpk1/slt2* o *fks1* (Eng *et al.*, 1994; Garrett-Engle *et al.*, 1995). Por tanto, la vía de señalización de la calcineurina se activa en respuesta a estrés ambiental. En condiciones de crecimiento normales, los niveles de calcio citosólicos son bajos y la calcineurina permanece inactiva. En cambio, en respuesta a estrés, los niveles de calcio citosólicos incrementan provocando la activación de la calcineurina, lo que desencadena una serie de respuestas que permiten a la célula sobrevivir frente a la condición de estrés.

El mecanismo por el cual se produce el incremento de calcio citosólico en respuesta a estrés no está totalmente claro y está siendo estudiado en la actualidad. En la figura 6 puede observarse la representación esquemática de las proteínas involucradas en la homeostasis de calcio. El calcio externo entra a la célula a través de un complejo formado por los canales Cch1 y Mid1 (Iida *et al.*, 1994; Paidhungat and

Garrett, 1997). Estos canales están implicados en la entrada de calcio que tiene lugar en respuesta a feromonas, estrés en el retículo endoplásmico, estrés salino y pH alcalino (Bonilla *et al.*, 2002; Matsumoto *et al.*, 2002; Viladevall *et al.*, 2004). Este flujo de calcio es inhibido por la activación de la calcineurina, como mecanismo de retroinhibición (Matheos *et al.*, 1997; Locke *et al.*, 2000; Muller *et al.*, 2001; Bonilla *et al.*, 2002), y esta inhibición pasa por la desfosforilación directa de Cch1 (Bonilla and Cunningham, 2003). En la levadura la vacuola representa la principal reserva de calcio.

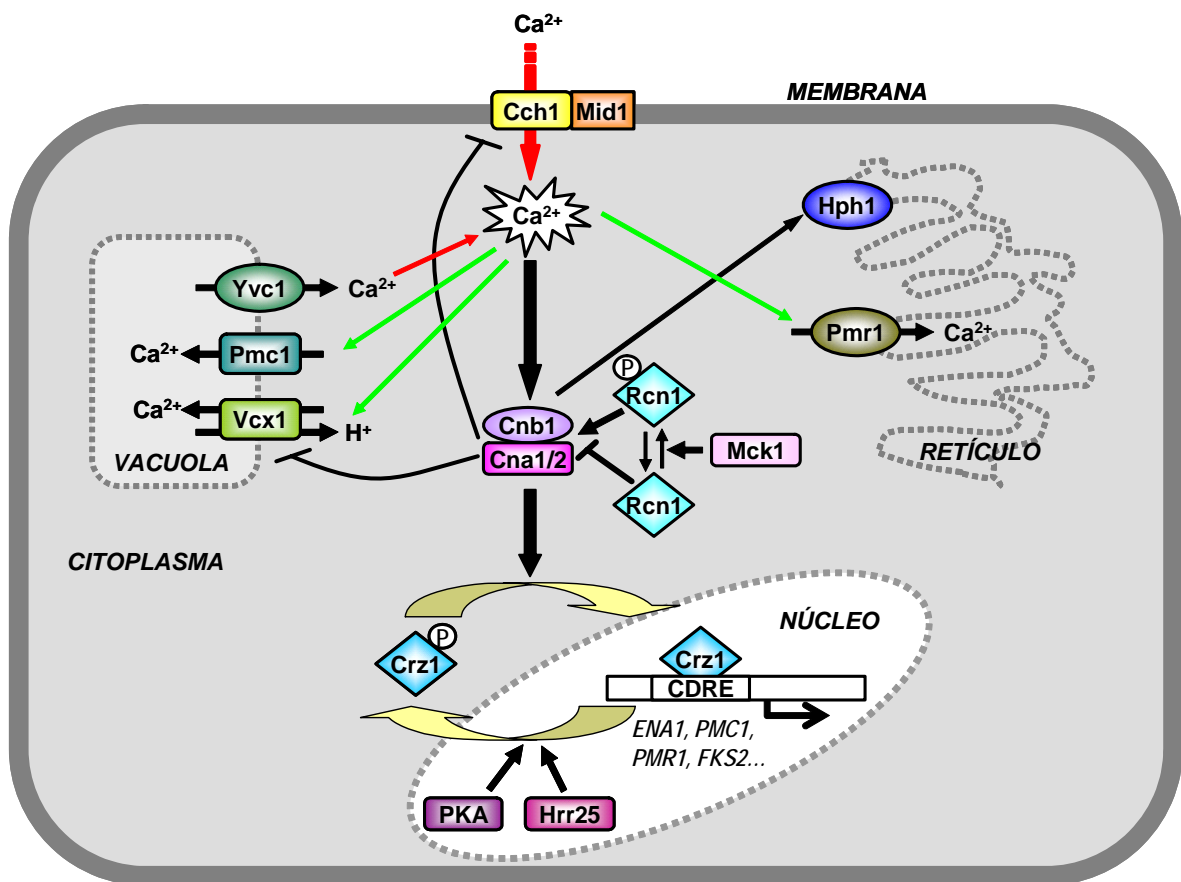


Figura 6. Vía de señalización de la calcineurina. Se muestran los principales transportadores responsables de la regulación de la homeostasis del calcio: Cch1-Mid1 (en la membrana plasmática), Pmr1 (en la membrana del retículo endoplásmico) y Yvc1, Vcx1 y Pmc1 (en la membrana de la vacuola). También se representan algunos de los sustratos directos de la fosfatasa calcineurina: los transportadores Cch1 y Vcx1, el factor de transcripción Crz1, la proteína de RE Hph1 y la calcipresina Rcn1 y su regulador, la quinasa Mck1. Las flechas de color rojo indican los transportadores que están implicados en el incremento de la concentración de calcio citosólico. En cambio, en verde se simbolizan los transportadores que sequestran el calcio del citosol.

Yvc1 ha sido identificado como un canal relacionado con los canales iónicos de la familia TRP (Palmer *et al.*, 2001; Denis and Cyert, 2002), que libera calcio de la vacuola al citosol en respuesta a estrés salino (Denis *et al.*, 2002). Los niveles de calcio citosólicos son restablecidos por la acción de diversas bombas presentes en el retículo endoplasmático (RE) y en la vacuola. Pmr1 es una ATPasa de calcio que se localiza en la membrana del RE y presenta gran afinidad para calcio (y Mn^{2+}), lo cual sirve tanto para regular la homeostasis del calcio como para aportar el Ca^{2+} y el Mn^{2+} necesarios para el procesamiento proteico (Rudolph *et al.*, 1989; Durr *et al.*, 1998). La detoxificación de calcio mediante el secuestro de este catión en la vacuola se lleva a cabo por la acción de dos transportadores, Pmc1, que es una ATPasa de Ca^{2+} , y Vcx1, que es un intercambiador de Ca^{2+}/H^+ . La calcineurina activa Pmr1 y Pmc1 a nivel transcripcional (Stathopoulos and Cyert, 1997; Matheos *et al.*, 1997; Stathopoulos-Gerontides *et al.*, 1999). En cambio, la actividad Vcx1 se inhibe post-transcripcionalmente por acción de la calcineurina (Cunningham and Fink, 1996).

La calcineurina controla la expresión de una gran variedad de genes a través de la activación del factor de transcripción Crz1/Tcn1/Hal8 (Stathopoulos *et al.*, 1997; Matheos *et al.*, 1997; Mendizabal *et al.*, 1998). Crz1 se une específicamente al elemento de respuesta dependiente de calcineurina (CDRE) que se encuentra presente en el promotor de todos aquellos genes cuya expresión regula la calcineurina. Mediante microarrays se han identificado más de 160 genes que incrementan su expresión en respuesta a la activación de la calcineurina (Yoshimoto *et al.*, 2002). La defosforilación de Crz1 por acción de la calcineurina afecta a su localización, trasladándose al núcleo cuando la calcineurina se activa. La salida de Crz1 del núcleo también está regulada por su estado de fosforilación. Recientemente se han identificado las quinasas Hrr25 y PKA como responsables de la fosforilación del factor de transcripción Crz1. Esta fosforilación promueve el traslado de Crz1 del núcleo al citosol; por tanto, Hrr25 y PKA regulan negativamente la vía de señalización de la calcineurina (Kafadar *et al.*, 2003; Kafadar and Cyert, 2004).

Aunque la diana principal de la calcineurina es el factor de transcripción Crz1 se conocen otros sustratos de esta fosfatasa (figura 6). Como hemos comentado, la calcineurina regula positivamente la actividad de los transportadores de potasio Trk, aunque se desconoce el mecanismo por el cual ejerce esta acción (Mendoza *et al.*, 1994). Por otro lado, la defosforilación de Cch1 y Vcx1 por parte de la calcineurina conlleva la inhibición de estos transportadores (Cunningham *et al.*, 1996; Bonilla *et al.*, 2002). Recientemente se han identificado dos nuevas dianas de la fosfatasa

calcineurina. La primera de ellas es una proteína de RE, Hph1, que parece jugar un papel en la adaptación de las células al estrés provocado por la presencia de pH alcalino (Heath *et al.*, 2004). La otra proteína es Rcn1, que pertenece a una familia de proteínas conservadas que se denominan calcipresinas (Kingsbury and Cunningham, 2000; Gorlach *et al.*, 2000). Rcn1 es a su vez un regulador de la actividad calcineurina, ya que la activa cuando es fosforilado por la proteína quinasa Mck1, un miembro de la familia de proteínas quinasas GSK-3. La defosforilación de Rcn1, que se llevaría a cabo por la propia calcineurina en condiciones de elevada concentración de calcio citosólico, conllevaría una inhibición de la actividad de la fosfatasa (Hilioti *et al.*, 2004).

La relación entre la vía de señalización de la calcineurina y el estrés salino se estableció tiempo atrás. El mutante *cnb1* acumula cantidades anormales de litio como resultado de una disminución de la expresión del gen *ENA1* y una menor actividad del sistema de transporte Trk1-Trk2 (Mendoza *et al.*, 1994). Calcineurina regula la transcripción de *ENA1* a través del factor de transcripción Crz1. En el promotor de *ENA1* se han identificado dos elementos CDRE (tabla 2), aunque el que se localiza en las posiciones -727/-719 es el más relevante para la respuesta transcripcional bajo condiciones de estrés (Mendizabal *et al.*, 2001). Trabajos anteriores sugerían la existencia de una regulación antagónica de la expresión del gen *ENA1* por parte de la PKA y la calcineurina (Hirata *et al.*, 1995). Actualmente, esta regulación puede ser explicada por el hecho de que la calcineurina desfosforila Crz1 activando así la expresión de *ENA1* (entre otros) y, por el contrario, la quinasa PKA fosforila Crz1, obteniéndose el resultado opuesto (Kafadar *et al.*, 2004).

La inducción de la expresión del gen *ENA1* en respuesta a pH alcalino también está mediada, al menos en parte, por la activación de la vía de señalización de la calcineurina (Serrano *et al.*, 2002). El estrés por pH alcalino provoca un incremento en la concentración de calcio citosólico de forma dependiente de los canales Cch1-Mid1, lo que conlleva una activación de la calcineurina y Crz1 (Viladevall *et al.*, 2004). La región del promotor de *ENA1* responsable de este efecto es el elemento CDRE (-727/-719). Nuestro grupo ha identificado también otra región responsable de la respuesta transcripcional de este promotor a pH alcalino a la que denominamos ARR2 (por 'alkaline response region'), que se localiza en la región -573/-490, y que contiene los elementos MIG y CRE. Actualmente estamos tratando de identificar los elementos implicados en esta respuesta, siendo la proteína Rim101 parcialmente responsable (Serrano *et al.*, 2002).

En un estudio previo se ha demostrado la existencia de otros genes cuya expresión se induce en presencia de pH alcalino de manera dependiente de calcineurina (Serrano *et al.*, 2002). Este es el caso del gen *PHO89* que codifica un co-transportador de Pi/Na^+ . Se ha descrito también que la expresión del gen *PHO89* se incrementa en respuesta a calcio y estrés salino, y que este incremento se pierde en células que carecen de calcineurina (Yoshimoto *et al.*, 2002). Estos resultados están de acuerdo con el hecho de que exista un elemento CDRE en el promotor de *PHO89* en las posiciones -515 a -504 respecto al ATG. Además de *PHO89*, en respuesta a pH alcalino se induce la expresión de otros genes relacionados con el metabolismo y transporte de fosfato, como son *PHO84*, que codifica un cotransportador de Pi/H^+ de alta afinidad, y *PHO12*, que codifica una fosfatasa ácida (para una revisión de estos genes ver Persson *et al.*, 1999). En el caso de estos dos genes su expresión se induce por pH alcalino de manera independiente de la calcineurina (Serrano *et al.*, 2002).

2.4.5. Estrés por pH alcalino: la proteína Rim101.

Aunque acabamos de ver que parte de la inducción de *ENA1* en respuesta a estrés por pH alcalino está mediada por la activación de la vía de señalización de la calcineurina, se desconoce qué vía de señalización participa en la regulación del resto de la respuesta. Como se ha mencionado anteriormente la región responsable de esta respuesta se denomina ARR2 (Serrano *et al.*, 2002).

Se ha postulado la posibilidad de que Rim101 sea el responsable de mediar parcialmente la inducción del gen *ENA1* por estrés alcalino (Lamb *et al.*, 2001; Serrano *et al.*, 2002). Rim101 fue identificado como un regulador positivo de la expresión de genes implicados en meiosis y esporulación (Su and Mitchell, 1993). La posibilidad de que esta proteína actúe en la vía de respuesta a pH viene dada por la similitud que presenta con el regulador de la respuesta a pH del hongo *Aspergillus nidulans*, PacC (Tilburn *et al.*, 1995). Aunque se desconoce como actúa Rim101 sobre la expresión de *ENA1*, se ha propuesto que esta proteína inhibiría la expresión del regulador transcripcional *NRG1*. Nrg1 reprime la transcripción de diversos genes reprimidos por glucosa y, junto con su homólogo Nrg2, regula negativamente el crecimiento invasivo (Park *et al.*, 1999; Vyas *et al.*, 2001; Zhou and Winston, 2001; Kuchin *et al.*, 2002), procesos en los cuales su acción viene mediada por la quinasa Snf1, de la que hemos hablado anteriormente. Aunque se han descrito dos posibles sitios de unión para el represor Nrg1 en el promotor de *ENA1* (tabla 2), uno de ellos solapa con el elemento CDRE sobre el que actúa la vía de la calcineurina, y el otro se localiza en una región

del promotor que no se induce en presencia de pH alcalino (Serrano *et al.*, 2002; Lamb *et al.*, 2003). Serán necesarios más estudios para clarificar el papel de Rim101 y Nrg1 en la regulación de la expresión del gen *ENA1* en respuesta a pH alcalino.

2.4.6. Otros elementos reguladores de la expresión del gen *ENA1*.

A lo largo de los años se han ido identificando otras proteínas que afectan al nivel de transcripción del gen *ENA1*. Entre ellas cabe destacar a las proteínas fosfatasas Ppz y su subunidad reguladora Hal3 (Posas *et al.*, 1995b). Los mutantes *ppz1* y *ppz1 ppz2* son hipertolerantes a sodio y litio porque presentan incrementada la expresión del gen *ENA1* y la actividad del sistema de transporte Trk (Posas *et al.*, 1995b; Yenush *et al.*, 2002; Yenush *et al.*, 2005). Uno de los objetivos principales de este trabajo consiste en elucidar el mecanismo o mecanismos a través de los cuales estas fosfatasas regulan la expresión del gen *ENA1*.

3. FLOCULACIÓN EN LA LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae*.

La adhesión de células a otras células o a superficies es un requisito para la formación de estructuras multicelulares. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la adhesión célula-célula y célula-superficie es imprescindible en muchas circunstancias, incluyendo la conjugación (Roy *et al.*, 1991; Cappellaro *et al.*, 1994), el crecimiento invasivo en haploides (Roberts and Fink, 1994; Guo *et al.*, 2000), la formación de biofilms (Reynolds and Fink, 2001) y el crecimiento pseudohifal en diploides (Gimeno *et al.*, 1992; Mosch and Fink, 1997). Cada uno de estos eventos es iniciado por diferentes señales que se transmiten a través de la vía de señalización correspondiente resultando en la expresión de proteínas específicas de superficie celular (Banuett, 1998; Lengeler *et al.*, 2000).

3.1. Características generales de la floculación.

La floculación es un proceso reversible en el cual las células se adhieren formando estructuras multicelulares (denominadas flóculos) que pueden apreciarse a simple vista y que sedimentan rápidamente en cultivo líquido. En la levadura *S. cerevisiae*, este proceso implica la existencia de unas proteínas tipo lectinas que se denominan floculinas. Estas proteínas se localizan en la pared de las células y se unen selectivamente a los residuos manosa presentes en las paredes de células adyacentes (figura 7), siendo necesaria la presencia de iones calcio para que tenga lugar dicha interacción (Verstrepen *et al.*, 2003).

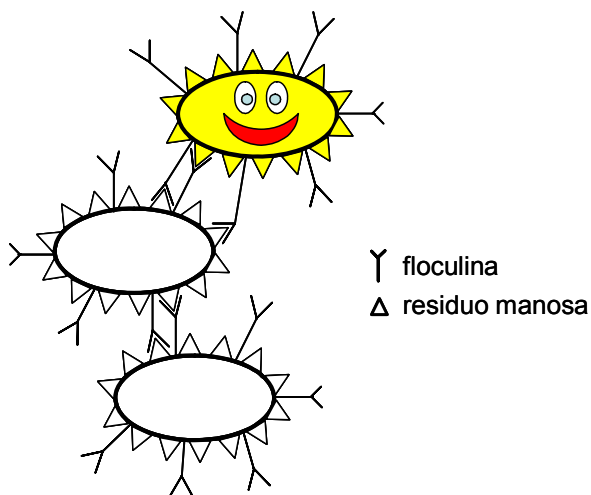


Figura 7. Modelo de floculación. Las floculinas (que son proteínas tipo lectina) se unen, de forma calcio dependiente, a residuos de manosa de células adyacentes

La floculación se inhibe por la presencia de manosa en el medio de cultivo, presumiblemente porque la manosa libre ocupa los sitios de unión de las floculinas que, por tanto, no pueden unirse a los residuos de manosa de células adyacentes. En algunos casos, el proceso de floculación también se inhibe en presencia de glucosa, sacarosa y maltosa. Este último fenotipo de floculación se ha denominado 'NewFlo' para diferenciarlo del fenotipo más habitual, el fenotipo Flo1, inhibible únicamente por manosa.

Las floculinas son proteínas codificadas por los denominados genes FLO. *S. cerevisiae* tiene cinco miembros conocidos de la familia génica FLO: *FLO1*, *FLO5*, *FLO9*, *FLO10* y *FLO11/MUC1*. Los cuatro primeros genes comparten una elevada identidad de secuencia y además se localizan en regiones subtelómericas del genoma (Teunissen *et al.*, 1993; Bidard *et al.*, 1994; Teunissen and Steensma, 1995). En la mayoría de las cepas de levadura de laboratorio los genes *FLO1*, 5, 9 y 10 están silenciados. Cuando se expresan ectópicamente dan lugar a diferentes fenotipos adhesivos, como son floculación o crecimiento pseudohifal (Guo *et al.*, 2000). De esta familia el gen *FLO11* es el único que se localiza cerca del centrómero en el genoma y, a diferencia del resto, se expresa (Lo and Dranginis, 1996). Aunque la secuencia aminoacídica de Flo11 difiere bastante de la del resto de floculinas, su estructura general, que consiste en un dominio N-terminal, un dominio central rico en Ser/Thr y un dominio C-terminal que contiene secuencias de anclaje GPI (glicosilfosfatidilinositol), es idéntica a la de todas las floculinas.

3.2. Regulación de la expresión de la floculina Flo11.

La expresión de *FLO11* es necesaria para que tengan lugar diversos procesos, como son la adhesión a agar o superficies de plástico (Reynolds *et al.*, 2001) y el crecimiento filamentoso de las levaduras (Lo and Dranginis, 1998; Gagiano *et al.*, 1999a). La regulación de la expresión de este gen es compleja e integra, a través de diversas vías de señalización, múltiples señales.

Se han estudiado con detalle los mecanismos de regulación del gen *FLO11* en el proceso de crecimiento filamentoso, que engloba el crecimiento invasivo que tiene lugar en células haploides y que consiste en la adhesión de las células al agar (Roberts *et al.*, 1994), y el crecimiento pseudohifal en diploides en el cual las células

se adhieren unas a otras después de dividirse formando largas cadenas de filamentos (Gimeno *et al.*, 1992). El crecimiento filamentososo es un fenotipo complejo que permite la búsqueda de nutrientes a las células que crecen en condiciones no óptimas. Ello se consigue mediante la coordinación de la expresión de un gran número de genes (entre los que se encuentra *FLO11*) involucrados en procesos celulares diversos, como son el ciclo celular, la gemación, la floculación o el mantenimiento de la integridad celular (Gancedo, 2001; Gagiano *et al.*, 2002).

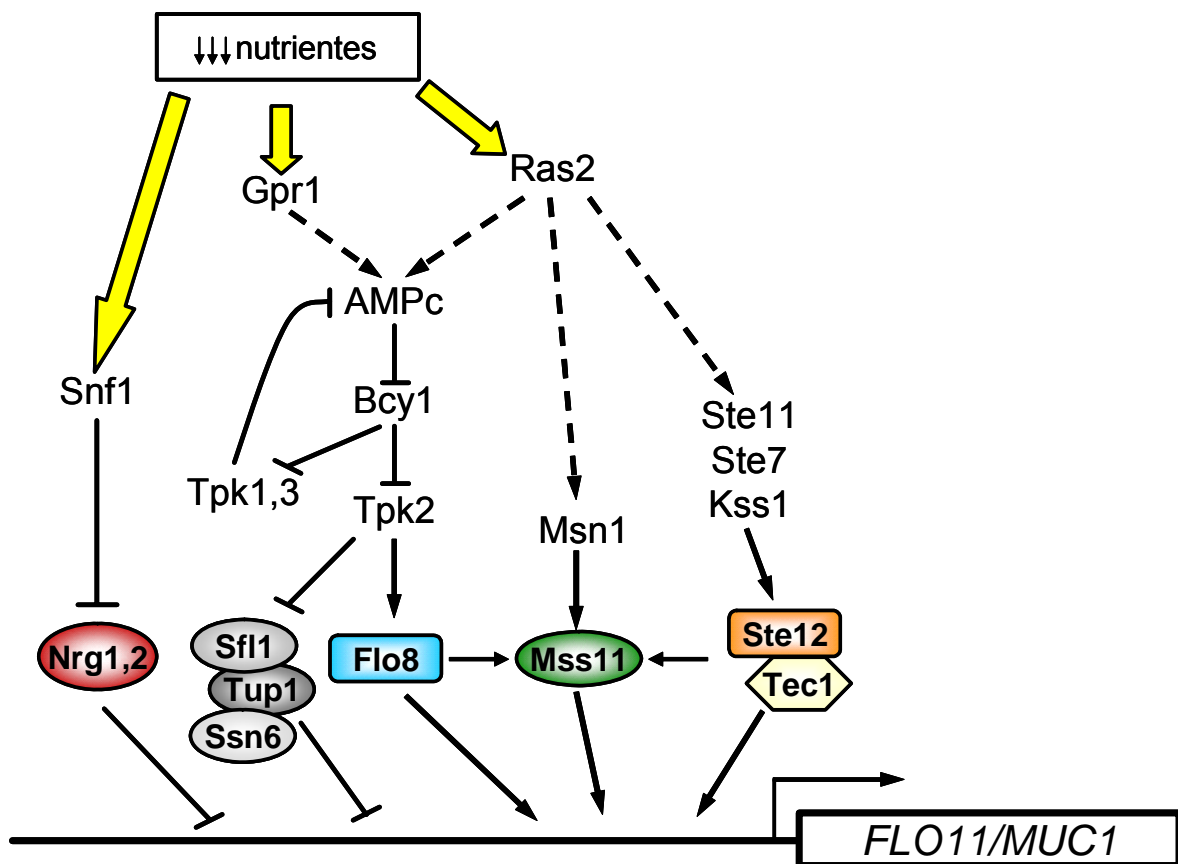


Figura 8. Regulación de la expresión de la floculina Flo11. La expresión de *FLO11* está regulada principalmente por 4 vías de señalización diferentes en respuesta a privación de nutrientes. Las vías de señalización de la quinasa PKA, de la MAPK Kss1 y de Msn1-Mss11 están bajo el control de la proteína Ras2, aunque la vía de la PKA también integra la señal a través del receptor acoplado a proteína G Gpr1. La cuarta vía está formada por la quinasa regulada por glucosa Snf1.

El promotor del gen *FLO11*, de aproximadamente 3,0 Kb, es uno de los más largos que se han identificado en *S. cerevisiae*. En él convergen diferentes vías de

señalización, entre las que se encuentran la vía de la proteína quinasa activada por AMPc (PKA), la vía de la MAPK regulada por feromonas Kss1, los factores de transcripción Msn1-Mss11 y la vía de la quinasa regulada por glucosa Snf1 (Palecek *et al.*, 2002; Gagiano *et al.*, 2002). Estas vías son bastantes complejas y, además, presentan elementos comunes (figura 8).

3.2.1. Vía de la quinasa PKA.

La PKA es la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (AMPc). En *Saccharomyces cerevisiae* la PKA existe como un heterotetrámero que consiste en dos subunidades reguladoras (*BCY1*) y dos subunidades catalíticas (codificadas por alguno de los genes *TPK1*, *TPK2* y *TPK3*). Mientras que estas subunidades catalíticas parecen realizar funciones redundantes durante el crecimiento vegetativo (Toda *et al.*, 1987), se ha demostrado la existencia de diferencias funcionales entre las tres subunidades en el crecimiento filamentoso. Mientras que Tpk2 es un activador del crecimiento filamentoso, Tpk1 y Tpk3 lo reprimen, posiblemente porque regulan negativamente el acúmulo de AMPc (Robertson and Fink, 1998; Loeb *et al.*, 1999; Pan and Heitman, 1999).

La subunidad catalítica Tpk2 favorece el crecimiento filamentoso a través de la regulación que ejerce sobre el activador transcripcional Flo8, que a su vez regula la expresión de *FLO11* (Pan *et al.*, 1999; Rupp *et al.*, 1999). Además, Tpk2 también inhibe al represor transcripcional Sfl1, que normalmente reprime la expresión de *FLO11* por su asociación al complejo represor Ssn6-Tup1 (Robertson *et al.*, 1998; Conlan and Tzamarias, 2001).

Los componentes que activan la vía de la PKA convergen en la activación de la adenilato ciclasa y, por tanto, en un incremento de los niveles de AMPc. Por un lado, la adenilato ciclasa se activa por acción de Ras2 (Pan *et al.*, 1999) y por el otro por la acción de Gpr1 (receptor acoplado a proteína G) y Gpa2 (subunidad α de la proteína G), que regulan la producción de AMPc en respuesta a falta de fuentes de carbono fermentables (glucosa) y limitación de nitrógeno (Pan *et al.*, 2000; Gancedo, 2001; Gagiano *et al.*, 2002).

3.2.2. Vía de la cascada de MAPK feromona-dependiente.

La cascada de MAPK regulada por feromonas fue la primera vía de señalización que se identificó en la transmisión de una señal nutricional (como la limitación de nitrógeno) y que resultaba en el crecimiento filamentoso de las células.

Aunque los elementos de la vía están claramente identificados para el proceso de conjugación, no se conocen los receptores y/o moléculas implicadas en la transmisión de la señal para el crecimiento filamentoso. Al igual que sucede con la vía de la quinasa PKA, esta vía está regulada por la proteína Ras2. Ras2 activa Cdc42 (Mosch *et al.*, 1996), que a su vez activa la quinasa Ste20. Ste20 activa la cascada MAPK compuesta por Ste11, Ste7 y Kss1 (Gustin *et al.*, 1998; Schwartz and Madhani, 2004). La MAPK Kss1 activa los factores de transcripción Ste12 y Tec1, que regulan positivamente la expresión del gen *FLO11* (Pan *et al.*, 2000; Gancedo, 2001; Palecek *et al.*, 2002; Gagiano *et al.*, 2002).

3.2.3. Proteína quinasa Snf1.

La quinasa Snf1 regula la transcripción de *FLO11* en respuesta a privación de glucosa (Kuchin *et al.*, 2002). Esta acción la realiza a través de la inhibición de las proteínas represoras Nrg1 y Nrg2, que median la represión por glucosa de varios genes dependientes de Snf1 (Park *et al.*, 1999; Vyas *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001). En el crecimiento filamentoso Snf1 responde a diferentes señales extracelulares en función del tipo celular. En células haploides se requiere para el crecimiento invasivo en respuesta a falta de glucosa y en células diploides para la diferenciación pseudohifal en respuesta a limitación de nitrógeno (Kuchin *et al.*, 2003). Además de la regulación que ejerce sobre la expresión de *FLO11*, la quinasa Snf1 está implicada en el crecimiento filamentoso de manera independiente de Flo11 (Vyas *et al.*, 2003).

3.2.4. Otros elementos reguladores: Msn1 y Mss11.

Además de las vías descritas hasta el momento, se han identificado dos nuevos factores de transcripción, Msn1 y Mss11, que están implicados en el control de la expresión del gen *FLO11* (Gagiano *et al.*, 1999b). En este trabajo demuestran que Msn1 actúa bajo la proteína Ras2 y Mss11 estaría bajo el control de Msn1, aunque se desconoce el mecanismo molecular a través del cual ejerce esta acción. Además de Msn1, Mss11 parece actuar debajo de Flo8 y Ste12. Aunque Msn1, Flo8 y Ste12 están reguladas por Ras2, actúan en tres vías de señalización diferentes (Gagiano *et al.*, 1999a; Gagiano *et al.*, 1999b).

Recientemente, se ha publicado un trabajo en el que se muestran evidencias genéticas que proponen a Mss11 como un elemento central en la regulación de la expresión de la floculina Flo11, situando todas las vías de señalización descritas por encima de la acción del factor de transcripción Mss11 (van Dyk *et al.*, 2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. LA PROTEÍNA FOSFATASA Ppz1 REGULA LA EXPRESIÓN DE LA ATPasa DE SODIO Ena1 A TRAVÉS DE LA VÍA DE LA CALCINEURINA.

Células de levadura que carecen de las fosfatasas Ppz1 y Ppz2 son hipertolerantes a los cationes sodio y litio. Este fenotipo fue atribuido hace ya algunos años en nuestro laboratorio al hecho de que estas células acumulan menos litio en su interior y presentan incrementada la expresión de la ATPasa de sodio Ena1, que es el principal sistema detoxificador de cationes de *Saccharomyces cerevisiae* (Posas *et al.*, 1995). Actualmente este fenotipo puede ser parcialmente explicado mediante la regulación que ejercen estas fosfatasas sobre el principal sistema de transporte de potasio de la levadura, compuesto por los transportadores Trk1 y Trk2 (Yenush *et al.*, 2002; Yenush *et al.*, 2005). Ppz1 y Ppz2 regulan negativamente la actividad de los transportadores Trk, de tal manera que una cepa *ppz1 ppz2* transporta potasio de forma más eficiente que una cepa salvaje y discrimina mejor entre los cationes sodio y potasio, lo cual disminuye la cantidad de sodio que entra en la célula. Además, el incremento de la concentración intracelular de potasio conduce a una alcalinización del citoplasma que conllevaría, entre otras cosas, el incremento en la expresión del gen *ENA1*, ya que éste se induce en respuesta a estrés alcalino (Haro *et al.*, 1991). Al inicio de la realización de este trabajo se desconocía la relación entre las fosfatasas Ppz y el sistema de transporte Trk. Por ello, el objetivo principal consistió en la identificación del elemento o elementos del promotor del gen *ENA1* necesarios para la regulación ejercida por las fosfatasas Ppz, con la finalidad de elucidar el mecanismo mediante el cual estas fosfatasas regulan la expresión de la ATPasa Ena1.

1.1. Hal3 regula la expresión de *ENA1* a través de las fosfatasas Ppz1 y Ppz2.

Dado que la sobreexpresión del gen *HAL3*, que codifica la subunidad reguladora negativa de la fosfatasa Ppz1 (de Nadal *et al.*, 1998), también confiere tolerancia a sodio y litio, resulta comprensible pensar que en una cepa que sobreexpresa *HAL3* esté incrementada la expresión de *ENA1*. La realización de ensayos de actividad β -galactosidasa utilizando un 'reporter' que contiene el promotor de *ENA1* (-1385/+35) fusionado al gen *lacZ*, nos ha permitido comparar los niveles de expresión de *ENA1* en células que carecen de las fosfatasas Ppz y/o sobreexpresan *HAL3* (figura 9 y figura 1 del artículo 1). Células que carecen de *PPZ1* presentan un

aumento sustancial en los niveles de expresión de *ENA1*, que es a su vez incrementado al deletionar el gen *PPZ2* en estas células. En cambio, deletionar *PPZ2* en células salvajes (WT) no altera la expresión de *ENA1*. Estos resultados están totalmente de acuerdo con los fenotipos de crecimiento en sal que presentan estas cepas (figura 9), es decir, el mutante *ppz1* es tolerante a sal y el doble mutante *ppz1 ppz2* es mucho más tolerante que el mutante simple, mientras que el mutante *ppz2* se comporta como una cepa salvaje en cuanto a tolerancia salina.

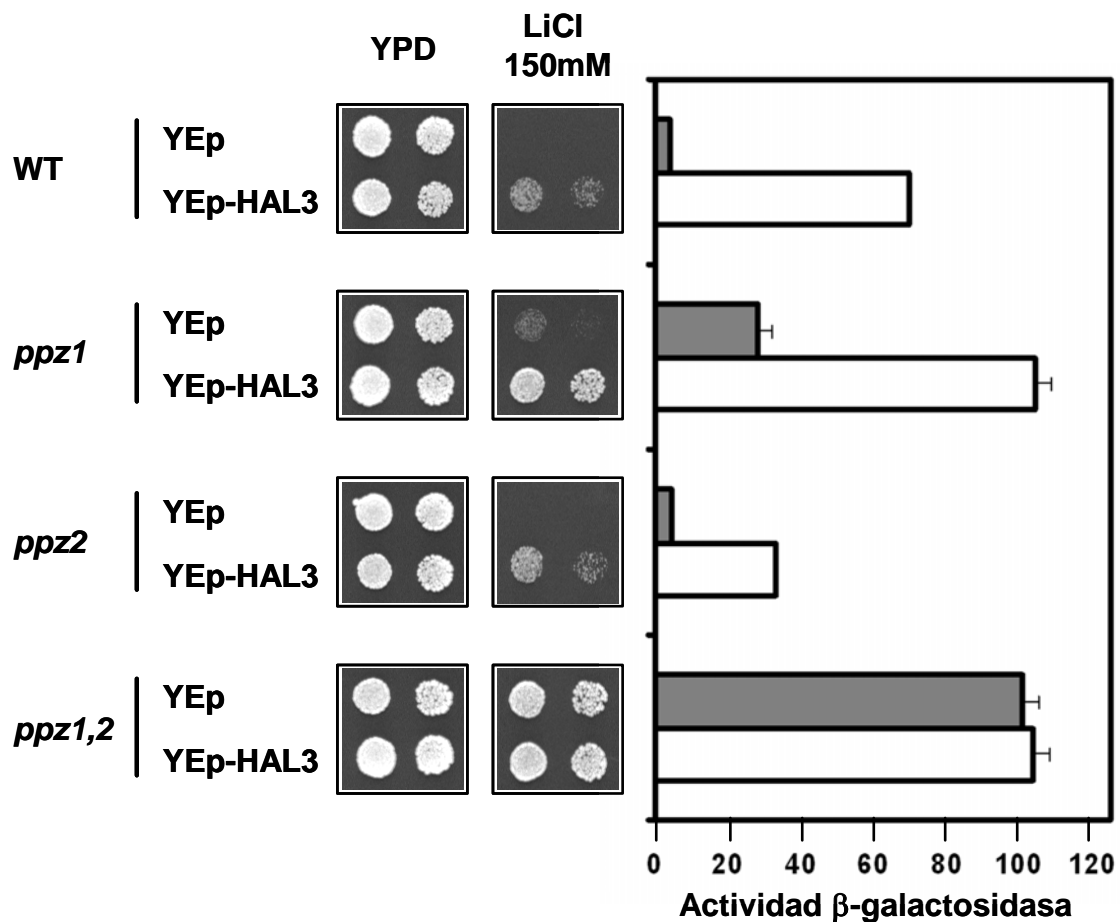


Figura 9. Análisis de la tolerancia salina de los mutantes *ppz* y la sobreexpresión de *HAL3*. En el panel de la izquierda se muestra el análisis fenotípico de la sobreexpresión de *HAL3* en células salvajes o células que carecen de las fosfatasa *PPZ1* y/o *PPZ2*. A la derecha los niveles de expresión de *ENA1* en estas mismas células.

Como era de esperar, la sobreexpresión de *HAL3* incrementa la expresión del gen *ENA1*. El hecho de que la presencia de *HAL3* en alto número de copias incremente la expresión de *ENA1* en una cepa que carece de la fosfatasa Ppz1 sugiere la existencia de otro sustrato para esta subunidad reguladora de Ppz1, y puesto que en una cepa *ppz1 ppz2* la sobreexpresión de *HAL3* no incrementa los niveles de expresión de *ENA1*, es evidente que Hal3 regula dichos niveles de expresión a través de la inhibición de ambas fosfatasas. Aunque hasta el momento sólo se había descrito la capacidad de Hal3 por unir e inhibir a Ppz1 (de Nadal *et al.*, 1998), dadas las similitudes que presenta esta fosfatasa con la proteína Ppz2 y el papel redundante que parecen jugar en las funciones que comparten, es verosímil pensar que Hal3 también podría actuar como subunidad reguladora negativa de la fosfatasa Ppz2. En este trabajo presentamos evidencias de esta relación, ya que mostramos que *in vitro* Hal3 y Ppz2 son capaces de interactuar y que lo hacen con la misma intensidad que Hal3 y Ppz1 (figura 1 del artículo 1). En relación a la expresión de *ENA1*, parece que Hal3 sería mejor inhibidor de la fosfatasa Ppz2 que de Ppz1. Esta conclusión puede deducirse del hecho de que al sobreexpresar *HAL3* en un mutante *ppz1* se obtienen los niveles de expresión de *ENA1* del mutante *ppz1 ppz2*, mientras que esto no sucede en el mutante *ppz2*.

1.2. El incremento en la expresión de *ENA1* que tiene lugar en el mutante *ppz1* implica al elemento CDRE y requiere la vía de señalización de la calcineurina.

Dada la complejidad en la regulación de la expresión del gen *ENA1*, ya que se ve afectada por la acción de diferentes vías de señalización en respuesta a diferentes estímulos (figura 4), nos planteamos identificar sobre qué región del promotor de este gen ejerce su efecto la mutación de *PPZ1*. Mediante la utilización de construcciones basadas en la fusión de diversas regiones del promotor de *ENA1* con el gen *lacZ*, evaluamos los niveles de expresión de los diferentes fragmentos de dicho promotor. Un análisis preliminar, en el que se utilizaron unos plásmidos de la serie pKC (Alepuz *et al.*, 1997), demostró que el incremento de expresión que tiene lugar en el mutante *ppz1* está restringido a la zona del promotor localizada entre las posiciones -752 y -358 respecto al ATG del gen. En esta región se encuentran la mayor parte de los elementos identificados en este promotor (tabla 2). Mediante el mapeo funcional de esta región, restringimos la respuesta al fragmento comprendido entre las posiciones

-751 y -667 (figura 2 del artículo 1), que contiene el elemento CDRE (Mendizabal *et al.*, 2001; Serrano *et al.*, 2002), cuya regulación depende de la vía de señalización de la fosfatasa calcineurina, y uno de los dos elementos de unión postulados para el represor Nrg1, que se encuentra regulado por la proteína Rim101 en respuesta a estrés alcalino (Lamb and Mitchell, 2003). Para tratar de discernir cuál de los dos elementos es relevante en el caso de Ppz1, tratamos células *ppz1* con el inhibidor de la calcineurina FK506 y, al observar los mismos niveles de expresión de *ENA1* que en las células salvajes, determinamos que en la regulación de la expresión de *ENA1* por la fosfatasa Ppz1 no se requiere la presencia de Nrg1 pero sí de la calcineurina. Estos mismos experimentos se realizaron con el doble mutante *ppz1 ppz2* (figura 2 del artículo 1), aunque el resultado fue inesperado, ya que el incremento en la expresión de *ENA1* en esta cepa implica dos regiones diferentes del promotor. La primera de ellas se localiza entre -751 y -667 y, al igual que en la cepa *ppz1*, la respuesta es eliminada por la adición del inhibidor FK506. La nueva región, cuya respuesta es totalmente independiente de la presencia de FK506, se localiza entre las posiciones -573 y -490 y contiene los elementos de represión MIG y CRE (tabla 2), así como alguno de los elementos necesarios para la respuesta a estrés por pH alcalino (Serrano *et al.*, 2002).

Los resultados obtenidos para el mutante *ppz1* sugieren que el incremento de la expresión de *ENA1* que tiene lugar en esta cepa requiere la vía de señalización de la calcineurina, ya que no tiene lugar en presencia de un inhibidor de la vía. Por ello, comprobamos si este incremento en la expresión se pierde tanto al delecionar el gen *CNB1*, que codifica la subunidad reguladora de la calcineurina, como el gen *CRZ1*, que codifica el factor de transcripción que media la mayor parte de los efectos transcripcionales de la calcineurina. Como puede observarse en la figura 3 del artículo 1, las cepas *ppz1 cnb1* y *ppz1 crz1* no presentan incrementada la expresión de *ENA1*, lo que apoya la idea de que la regulación que ejerce Ppz1 sobre el promotor de *ENA1* requiere la presencia de la vía de señalización de la calcineurina. En la figura 3 del artículo 1 demostramos que un 'reporter' que contiene exclusivamente el elemento CDRE del promotor de *ENA1* (-732 a -711) mimetiza el incremento de expresión obtenido con el promotor entero de *ENA1* en el mutante *ppz1*. Además, para que tenga lugar dicho incremento se requiere la presencia de Crz1 (resultados no mostrados). Dado que la calcineurina regula la expresión de una gran variedad de genes, que poseen secuencias CDRE en sus promotores, a través del factor de

transcripción Crz1, nos preguntamos si la delección del gen *PPZ1* también podría incrementar la expresión de estos genes. Como ejemplo, mostramos que en una cepa *ppz1* se incrementa la expresión de un 'reporter' que contiene cuatro copias del elemento CDRE del promotor del gen *FKS2* fusionadas al gen *lacZ* (pAMS366) (Stathopoulos and Cyert, 1997). En cambio, cuando utilizamos una versión del promotor de *FKS2* incapaz de unirse a Crz1 (construcción pAMS364) no se detecta dicho incremento. El hecho de que la construcción del promotor de *FKS2* que se encuentra inducida en la cepa *ppz1* (pAMS366) no contenga las secuencias propuestas como dianas de Nrg1 (CCCCT o CCCTC) (Park *et al.*, 1999), confirma una vez más la idea de que Ppz1 regula negativamente la expresión de la proteína Ena1 a través del elemento CDRE y de la vía de señalización de la calcineurina.

1.3. Análisis de la expresión del gen *ENA1* y de la tolerancia a cationes en cepas que carecen de las fosfatasas Ppz y de componentes de la vía de la calcineurina.

Los resultados anteriores sugieren que células que carecen de la fosfatasa Ppz1 presentan la vía de la calcineurina activada. De acuerdo con esta idea, en la figura 4A del artículo 1 mostramos que los mutantes *ppz1* y *ppz1 ppz2* son más sensibles que la cepa salvaje a la presencia de CaCl₂, mientras que, como ya había sido descrito anteriormente (Withee *et al.*, 1997) el mutante *cnb1* es hipertolerante a este catión. En esta misma figura puede observarse que el doble mutante *ppz1 cnb1* presenta el mismo nivel de tolerancia que el mutante simple *cnb1*, lo que demuestra una vez más que la acción de Ppz1 se sitúa por encima de la de la calcineurina.

El análisis fenotípico salino de cepas que carecen de la fosfatasa Ppz1 y de la subunidad reguladora Cnb1 o del factor de transcripción Crz1 puede observarse en la figura 4B del artículo 1. La delección del gen *CNB1* o del gen *CRZ1* en un mutante *ppz1* disminuye la tolerancia a sodio y litio de este mutante. Este efecto es cuantitativamente diferente para las dos delecciones, ya que la cepa *cnb1 ppz1* es bastante más sensible a sal (sobre todo a litio) que el doble mutante *crz1 ppz1*. El hecho que la delección de *CNB1* en un mutante *ppz1* resulte en una disminución más drástica de la tolerancia puede ser explicado por las funciones no transcripcionales que realiza la calcineurina de forma independiente de Crz1.

1.4. El incremento en la expresión de *ENA1* que tiene lugar en el mutante *ppz1* no está causado por la alcalinización intracelular.

Una vez establecida la relación entre la fosfatasa Ppz1 y la vía de señalización de la calcineurina se nos planteaba la incógnita de cómo podría Ppz1 estar regulando esta vía de señalización. El primer posible mecanismo de regulación que decidimos analizar implica la relación establecida entre la fosfatasa Ppz y el sistema de transportadores Trk (Yenush *et al.*, 2002). Basándose en este trabajo, la hipótesis planteada sería la siguiente: la falta de Ppz1 activaría el transporte de potasio a través de los transportadores Trk provocando una alcalinización del medio intracelular similar a la que se obtiene al tratar las células con un medio alcalino, lo que conllevaría un incremento en la expresión de toda una serie de genes que se inducen en respuesta a estrés por pH alcalino y entre los que se encuentra *ENA1*. Para comprobar esta hipótesis analizamos la expresión de cuatro genes diferentes que se inducen en respuesta a estrés alcalino (*ENA1*, *PHO84*, *PHO89* y *PHO12*) en células salvajes y en células que carecen de las fosfatasas Ppz1 y/o Ppz2 (figura 6 del artículo 1). En la figura puede observarse que, mientras que en el mutante *ppz1* sólo se incrementa la expresión de los genes *ENA1* y *PHO89*, en el doble mutante se incrementa la expresión de los cuatro genes analizados. El incremento en la expresión de los genes *ENA1* y *PHO89* que tiene lugar en el mutante *ppz1* es dependiente de la calcineurina, ya que se inhibe totalmente con FK506, y este incremento es mayor y parcialmente dependiente de calcineurina en el doble mutante *ppz1 ppz2*. A diferencia de lo que pasa con *ENA1* y *PHO89*, la expresión de *PHO84* y *PHO12* sólo está incrementada en el doble mutante *ppz1 ppz2* y este incremento no se ve afectado en absoluto por la presencia de FK506. Estos resultados sugieren que en una cepa que carece de la fosfatasa Ppz1 sólo se incrementa la expresión de aquellos genes cuya regulación transcripcional está mediada por la calcineurina. En cambio, en el doble mutante *ppz1 ppz2* se incrementa la expresión de todos los genes analizados que se inducen por estrés alcalino. Este análisis se realizó también con otros cuatro genes cuya expresión se induce cuando el pH es alcalino de forma totalmente independiente de la calcineurina: *FRE1*, *FIT2*, *SIT1* y *TRR1* (Viladevall *et al.*, 2004). Como puede observarse en la tabla 2 del artículo 1, el análisis de la expresión de estos genes mediante fusiones de sus promotores con el gen *lacZ* reveló que, mientras que ninguno de ellos incrementa sus niveles de expresión en el mutante simple *ppz1*, todos lo hacen en el doble mutante *ppz1 ppz2*, confirmando así la idea de que sólo los

genes regulados por la calcineurina presentan incrementada su expresión cuando falta Ppz1.

En el caso de *Ena1* se ha descrito que el mecanismo que da lugar al incremento de la expresión por pH alcalino es complejo, ya que participan diferentes elementos de su promotor que aún no están completamente caracterizados. Por una parte interviene el elemento CDRE y la calcineurina y por otro lado la región denominada ARR2 regulada parcialmente por la proteína Rim101 (Serrano *et al.*, 2002). Los datos previos sugieren que los niveles de expresión de *ENA1* observados en el mutante *ppz1* no parecen estar causados por un incremento de la alcalinización intracelular, ya que únicamente requiere de uno de los dos elementos necesarios para la regulación transcripcional de *ENA1* frente a esta condición de estrés. Aún así, nos planteamos la posibilidad de que la falta de Ppz1 resulte en un ligero aumento del pH intracelular que incremente la expresión de *ENA1* debida única y exclusivamente a la activación del elemento CDRE. Esta alcalinización intracelular, se acentuaría cuando faltan las dos fosfatasa de forma conjunta, incrementándose todavía más los niveles de expresión de *ENA1* por la activación adicional de la región ARR2 del promotor. Este modelo implica que el elemento CDRE debería ser más sensible que la región ARR2 a pequeños incrementos de pH. Para comprobarlo, utilizamos diferentes construcciones del promotor de *ENA1* que contienen las dos regiones responsables de la respuesta de este gen a pH alcalino y las sometimos a diferentes pHs ambientales (figura 7 del artículo 1). Como puede observarse en la figura, las tres construcciones analizadas difieren en la intensidad pero no en el perfil de expresión, de tal manera que tanto la expresión que viene promovida por el elemento CDRE (construcción pMRK212) como la de la región ARR2 (pMRK213) se inician cuando en el medio de cultivo el pH es mayor de 7.3 y muestran una dependencia gradual del pH extracelular idéntica. Por tanto, este resultado no apoya la hipótesis de que la región del promotor de *ENA1* que contiene el elemento CDRE sea más sensible a incrementos leves de pH que la región ARR2. Además, de acuerdo con este resultado está el hecho de que la expresión del gen *PHO84* que está ya inducida en medios donde el pH es incluso menor de 7.0 (Serrano *et al.*, 2002) no se encuentre incrementada en el mutante simple *ppz1* (figura 6 del artículo 1).

Puesto que se ha postulado que el incremento del pH intracelular en un mutante *ppz1* vendría dado por un exceso de actividad de los transportadores Trk,

consideramos importante evaluar si el incremento en la expresión de *ENA1* causado por la falta de la fosfatasa es dependiente de la presencia de estos transportadores. En la figura 8A del artículo 1 puede observarse que células que carecen simultáneamente de los transportadores Trk1 y Trk2 y de la fosfatasa Ppz1 conservan prácticamente el mismo nivel de expresión de *ENA1* característico del mutante *ppz1* y que, de igual forma que sucedía en este mutante simple, éste disminuye con la presencia de FK506. Además, el análisis de la sensibilidad a sodio y litio del doble mutante *trk1,2* y del triple mutante *ppz1 trk1,2* en ausencia o presencia de FK506 muestra que el triple mutante es más tolerante a estos cationes, cosa que ya había sido demostrada para el cuádruple mutante *ppz1,2 trk1,2* (Yenush *et al.*, 2002). La adición del inhibidor de la calcineurina FK506 elimina totalmente la tolerancia que confiere la delección de Ppz1 en una cepa *trk1,2*, mientras que en el doble mutante *trk1,2* incrementa levemente su sensibilidad (figura 8B del artículo 1). Por último, la determinación del contenido intracelular de los cationes sodio y potasio de estas cepas muestra que el mutante *ppz1*, al igual que el doble mutante *ppz1,2*, acumula más cantidad de potasio y reduce ligeramente el acúmulo de sodio. En cambio, las células que carecen de los transportadores Trk1-Trk2 acumulan menos potasio y más sodio en su interior. La delección del gen *PPZ1* en una cepa *trk1,2* reduce la concentración intracelular de sodio de estas células, lo que es consistente con el hecho de que haya un incremento en la expresión de *ENA1* y con la tolerancia a sodio y litio que muestran.

Todos estos resultados parecen indicar que Ppz1 regula la expresión de *ENA1* de forma dependiente de la vía de señalización de la calcineurina a través de mecanismos que no parecen implicar al pH intracelular ni al principal sistema de transporte de potasio de la célula. Nuestros datos y experimentos previos (Yenush *et al.*, 2002) confirman que las dos fosfatasas Ppz se requieren para regular la acción de los transportadores Trk, ya que sólo al deleccionar los dos genes que las codifican se observa un incremento del pH intracelular y, por tanto, la inducción de la expresión de genes que se inducen en respuesta a estrés alcalino. En cambio, exclusivamente la fosfatasa Ppz1 regula la vía de señalización de la calcineurina.

1.5. Ppz1 no regula la actividad calcineurina a través de la calcipresina Rcn1.

Una vez descartados los transportadores de potasio Trk como mediadores de la regulación ejercida por Ppz1 sobre la vía de señalización del calcio a través de la fosfatasa calcineurina, decidimos abordar otros mecanismos de regulación de esta proteína. Existe un tipo de proteínas reguladoras de la calcineurina, conocidas como calcipresinas, de las cuales su principal representante en *Saccharomyces cerevisiae* es la proteína Rcn1 (Kingsbury and Cunningham, 2000; Gorchach *et al.*, 2000). En resumen, la fosforilación de Rcn1, que se lleva a cabo por la acción de la quinasa Mck1, activa la calcineurina. Por el contrario, cuando Rcn1 está desfosforilado actúa como inhibidor de la calcineurina (figura 5) (Hilioti *et al.*, 2004). La desfosforilación de Rcn1 tendría lugar por la acción de la propia calcineurina cuando la concentración de calcio citosólica es elevada. Nosotros nos planteamos la posibilidad de que Ppz1 actuará como fosfatasa de Rcn1. Si esto fuera así, el doble mutante *ppz1 rcn1* debería tener los mismos niveles de expresión del gen *ENA1* que el mutante simple *rcn1*. En cambio, la delección del gen *PPZ1* en un mutante *rcn1* incrementa la expresión de *ENA1* de forma similar a lo que se observa al deleccionar *PPZ1* en células salvajes (figura 5 del artículo 1), lo cual parece indicar que Ppz1 no regula a la calcineurina mediante la desfosforilación de Rcn1. Por el contrario, cuando analizamos la expresión de *ENA1* del doble mutante *ppz1 mck1* observamos que esta cepa presenta los mismos niveles de expresión que el mutante *mck1*. Este resultado puede ser explicado fácilmente si consideramos que la falta de Mck1 conlleva un acúmulo de la proteína Rcn1 en forma desfosforilada, lo que equivaldría a inhibir completamente a la calcineurina de una manera que no podrá ser recuperada por la delección de *PPZ1*. Ello se refleja en un nivel de expresión de *ENA1* equivalente al obtenido al deleccionar la subunidad reguladora de la calcineurina (Cnb1).

1.6. Ppz1 podría controlar la vía de señalización de la calcineurina mediante la regulación de los transportadores de calcio de la membrana plasmática.

Otro punto posible de la vía de señalización del calcio/calcineurina sobre el cual nos planteamos que la proteína Ppz1 podría ejercer su función y que explicaría el efecto de la falta de esta fosfatasa en la expresión de *ENA1*, sería a través de las quinasas que fosforilan al factor de transcripción Crz1. La fosforilación de Crz1

conlleva su expulsión del núcleo, desactivando así la expresión de los genes regulados por la calcineurina. En este caso, Ppz1 debería tener un papel positivo sobre la actividad de la quinasa PKA y/o Hrr25 (Kafadar *et al.*, 2003; Kafadar and Cyert, 2004), que son las responsables de este proceso. *HRR25* es un gen esencial, mientras que el triple mutante *tpk1-3*, totalmente deficiente en actividad PKA, es inviable. Ello ha dificultado el estudio de la posible relación de la fosfatasa Ppz1 con estas dos quinasas. Nuestros experimentos llevados a cabo mediante la sobreexpresión de *HRR25* no son concluyentes. Por otro lado, la delección de *PPZ1* en células que carecen de *TPK1*, *TPK2* o *TPK3*, así como en células que carecen de las combinaciones de dos de los tres genes, parecen indicar que Ppz1 no estaría regulando el estado de fosforilación de Crz1 a través de la proteína quinasa PKA (no mostrado).

La última hipótesis que estamos evaluando en la actualidad implicaría la regulación del transporte de calcio por parte de Ppz1. El mantenimiento de la homeostasis de calcio es un proceso complejo que implica a un gran número de transportadores (figura 5) distribuidos en diferentes compartimentos celulares, que se encuentran fuertemente regulados con la finalidad de mantener unos niveles constantes de calcio citosólicos. Un incremento de calcio citoplasmático puede deberse a una mayor actividad de los canales de membrana plasmática Cch1-Mid1 o del transportador de vacuola Yvc1. En cambio, el calcio es eliminado del citosol por acción de la bomba de retículo endoplasmático Pmr1 o los transportadores de vacuola Vcx1 y Pmc1. Recientemente, se ha descrito que Ppz1 es una proteína que se encuentra asociada a membrana plasmática y membrana del retículo endoplásmico (Yenush *et al.*, 2005), lo que nos ha llevado a plantearnos si la fosfatasa Ppz1 podría estar regulando a alguno de estos transportadores, alterando los niveles de calcio citosólicos y afectando así la actividad de la calcineurina. Para ello, Ppz1 tendría que actuar bien inhibiendo la liberación de calcio al citosol o bien activando los sistemas que secuestran el calcio dentro de la vacuola o el retículo, de tal manera que la falta de Ppz1 implicaría el aumento de los niveles de calcio en el citoplasma que activarían a la calcineurina incrementando la expresión de los genes regulados por ésta, entre los que se encuentra *ENA1*.

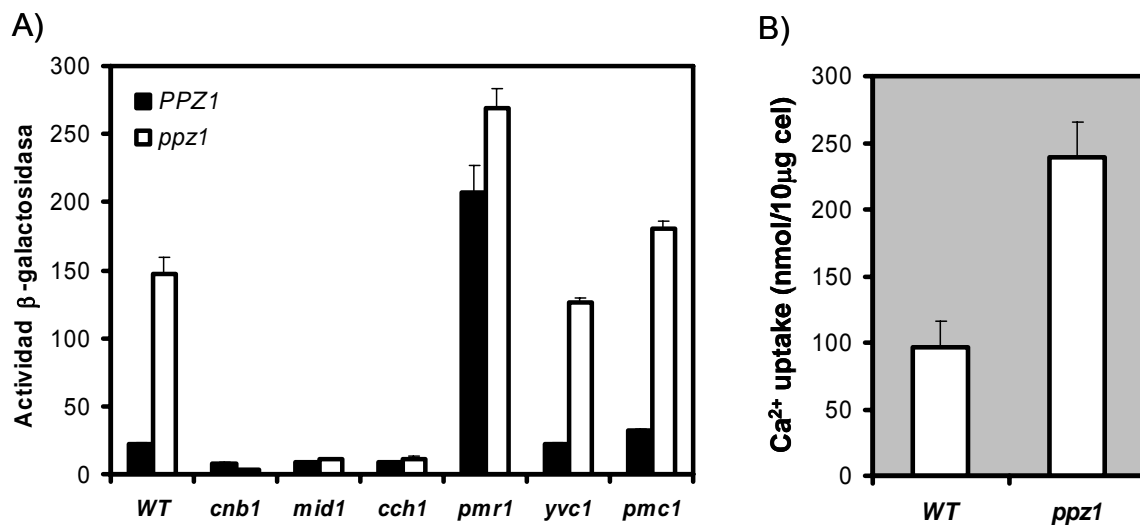


Figura 10. Análisis del papel de la proteína Ppz1 en el transporte de calcio. **A)** Ensayo de actividad β -galactosidas debida al reportero pLA que contiene el elemento CDRE del promotor de *ENA1* (ver materiales y métodos del artículo 1) en células que carecen de los principales transportadores de calcio y/o la fosfatasa Ppz1. **B)** Determinación de los niveles de entrada de calcio en una cepa salvaje o en el mutante *ppz1*.

Con esta finalidad, nos propusimos analizar los niveles de expresión de *ENA1* debidos exclusivamente al elemento CDRE, utilizando el 'reporter' pLA, en células que carecen de la fosfatasa *PPZ1* y los principales transportadores de calcio (figura 10A). La falta de los transportadores de vacuola (*Yvc1* y *Pmc1*) en células *ppz1* prácticamente no altera los niveles de expresión del 'reporter' en estas células, indicando así que Ppz1 no regula esta vía a través del transporte de calcio entre el citosol y la vacuola. Células que carecen de la bomba de calcio *Pmr1* presentan un gran incremento de la expresión de *ENA1* debido a la activación de la calcineurina, ya que estas células tienen una elevada concentración de calcio citoplasmática (Park *et al.*, 2001). La delección de *PPZ1* en células que carecen de *Pmr1* consigue incrementar ligeramente los niveles de expresión de *ENA1*, lo que sugiere que Ppz1 no estaría regulando la actividad del transportador de retículo *Pmr1*. En cambio, el incremento de la expresión de *ENA1* característico del mutante *ppz1* se pierde totalmente al deleccionar cualquier componente del complejo de membrana plasmática *Cch1-Mid1* encargado de transportar el calcio del exterior, lo que evidencia que Ppz1 podría estar regulando negativamente el transporte de calcio del exterior a través de la inhibición de *Cch1* o *Mid1*. El análisis de la entrada de calcio a la célula, llevada a cabo en colaboración con el Dr. Kyle Cunningham de la John Hopkins University, muestra que,

efectivamente, células que carecen de la fosfatasa Ppz1 presentan una mayor entrada de calcio (figura 10B). Dado que se ha descrito que el canal Cch1 puede ser regulado negativamente mediante desfosforilación (Bonilla and Cunningham, 2003), nos planteamos la posibilidad de que Ppz1 pueda actuar desfosforilando Cch1, inhibiendo así su actividad, y por ello el mutante *ppz1* presenta una mayor actividad transportadora de calcio. Aunque, recientemente se ha publicado que Ppz1 no coinmunoprecipita con la proteína Cch1 (Yenush *et al.*, 2005), no descartamos la posibilidad de que esta interacción sea transitoria y poco estable. También sería posible que Ppz1 esté regulando el estado de fosforilación de Cch1 indirectamente o la actividad de Mid1, el otro componente del canal de calcio de la membrana plasmática.

2. LAS PROTEÍNAS FOSFATASAS Ppz REGULAN EL TRANSPORTE DE POTASIO INDEPENDIENTE DE Trk EN LA LEVADURA *S. cerevisiae*.

Una vez establecida la relación entre las proteínas fosfatasas Ppz y el sistema de transporte de potasio Trk (Yenush *et al.*, 2002), nos planteamos profundizar en la naturaleza de la regulación que ejercen estas dos fosfatasas sobre la homeostasis de potasio y el pH intracelular. Células que carecen de las fosfatasas Ppz1 y Ppz2 o que sobreexpresan la subunidad reguladora negativa de éstas (Hal3) son tolerantes a espermina, tetrametilamonio e higromicina B (Yenush *et al.*, 2002). La tolerancia general a estos cationes tóxicos se correlaciona con la reducción del potencial de membrana, que disminuye la toma voltaje-dependiente de cationes (Mulet *et al.*, 1999; Goossens *et al.*, 2000).

2.1. Cepas que carecen de las fosfatasas Ppz requieren cantidades mayores de potasio en ausencia de los transportadores Trk.

En primer lugar, analizamos los requerimientos de potasio de células que carecen de las fosfatasas Ppz y los transportadores Trk1 y Trk2. Como puede observarse en el panel superior de la figura 1 del artículo 2, células salvajes o células que carecen de las fosfatasas Ppz crecen perfectamente en las tres concentraciones de KCl analizadas. En cambio las cepas *trk1 trk2* y *trk1 trk2 ppz2* tienen unos requerimientos de potasio mayores, ya que son incapaces de crecer cuando la concentración de potasio es muy baja (0.2 mM). Sorprendentemente, la delección del gen *PPZ1* o la delección conjunta de *PPZ1* y *PPZ2* en una cepa *trk1 trk2* agrava drásticamente los requerimientos de potasio, ya que estas células son incapaces de crecer a menos que el medio se suplemente con altas concentraciones de este catión (50 mM). Estos mismos resultados se obtuvieron al cuantificar los tiempos de duplicación de estas cepas en las diferentes concentraciones de potasio analizadas (panel inferior de la figura 1 del artículo 2). El hecho de que la falta de las fosfatasas Ppz tenga como resultado el incremento en las necesidades de potasio de células que carecen del principal sistema de transporte de potasio, sugiere que estas fosfatasas participan en la regulación del sistema de transporte de potasio de baja afinidad Trk-independiente.

Por ello, analizamos si el defecto de crecimiento del cuádruple mutante *ppz1,2 trk1,2* puede ser atribuido a un defecto en el transporte de potasio. En este tipo de experimentos se utiliza cloruro de rubidio y se determina la toma de este análogo del catión potasio. En la figura 2 del artículo 2 se muestra que la falta de las fosfatasas Ppz incrementa la toma de rubidio, mientras que por el contrario la falta de los transportadores Trk la disminuye drásticamente. De acuerdo con los experimentos previos de crecimiento en condiciones limitantes de potasio, se obtiene que tanto la falta de Ppz1 como la falta de las dos fosfatasas anula la toma de rubidio que presentan las células *trk1 trk2*. De hecho, la valoración cinética de este transporte muestra que estas cepas presentan una Km sustancialmente mayor que el mutante *trk1 trk2* (tabla 2 del artículo 2). Además, determinaciones del contenido intracelular de potasio han permitido verificar que tanto el triple mutante como el cuádruple mutante acumulan menor cantidad de potasio en su interior (tabla 2 del artículo 2).

El hecho de que células que carezcan de las fosfatasas Ppz presenten un mayor contenido de potasio intracelular puede ser fácilmente explicable mediante la regulación negativa que ejercen sobre los transportadores Trk (Yenush *et al.*, 2002), hecho que es corroborado por el incremento en la captación de rubidio que presentan estas células respecto a las células salvajes (figura 2 y tabla 2 del artículo 2). Si las fosfatasas Ppz sólo participasen en la homeostasis de potasio mediante la regulación que ejercen sobre el sistema de transporte Trk, sería lógico esperar que la delección de las fosfatasas Ppz en células que carecen de los transportadores Trk1 y Trk2 no tuviera efecto en los requerimientos de potasio de estas células. En cambio, estas células necesitan mayor cantidad de este catión para poder crecer, fenotipo que puede ser atribuido al hecho de que estas células presentan un transporte de rubidio prácticamente inexistente.

2.2. Análisis de la tolerancia a cationes tóxicos de células que carecen de las fosfatasas Ppz y los transportadores de potasio Trk.

Todos estos resultados confirman que las fosfatasas Ppz, además de regular negativamente el sistema de transporte de potasio de alta afinidad (codificado por los genes *TRK1* y *TRK2*), están regulando positivamente el transporte de potasio de baja afinidad.

Para verificar estos resultados analizamos la tolerancia a cationes tóxicos que presentan las células que carecen de las fosfatasa Ppz y/o los transportadores Trk. La deleción conjunta de los genes *TRK1* y *TRK2* causa hiperpolarización de la membrana plasmática (Madrid *et al.*, 1998), resultando en un incremento en la sensibilidad a cationes tóxicos, como la higromicina B, el tetrametilamonio (TMA) y la espermina (Madrid *et al.*, 1998; Mulet *et al.*, 1999; Yenush *et al.*, 2002; Forment *et al.*, 2002). De acuerdo con esto, la falta de las quinasas Hal4 y Hal5, que han sido descritas como activadores positivos de la función Trk, resulta en células sensibles a estos componentes (Mulet *et al.*, 1999), mientras que la falta de las fosfatasa Ppz1 y Ppz2 confiere tolerancia a estos cationes, ya que regularían negativamente la función Trk. Por ello esperaríamos que la ausencia de fosfatasa Ppz en células que carecen del transporte de potasio Trk-dependiente no alterara la tolerancia de estas células a los compuestos analizados. En cambio, se puede observar que la falta de Ppz1 (pero no la de Ppz2) en una cepa *trk1 trk2* incrementa la sensibilidad de estas células a higromicina B, espermina (figura 3 del artículo 2) y TMA (no mostrado) y, por el contrario, incrementa su tolerancia a cationes sodio y litio. El hecho de que las cepas MAR70 (*trk1 trk2 ppz1*) y MAR73 (*trk1 trk2 ppz1 ppz2*) sean más tolerantes a sodio y litio que el doble mutante *trk1 trk2* puede ser explicado fácilmente por la evidencia de que en un mutante *ppz1* tiene lugar un incremento en la expresión del gen *ENA1* que es independiente de los transportadores Trks pero dependiente de la fosfatasa calcineurina (Artículo 1). Puesto que Ena1 representa el principal sistema detoxificador de sodio y litio de la levadura, la activación transcripcional de este mecanismo por la ausencia de la fosfatasa Ppz1 podría explicar la mejora en la tolerancia de estos cationes específicos.

Por otro lado, que el triple mutante (*trk1 trk2 ppz1*) y el cuádruple mutante (*trk1 trk2 ppz1 ppz2*) sean más sensibles a higromicina B y espermina que el doble mutante *trk1 trk2*, junto con el resto de resultados presentados, demuestran que las proteínas fosfatasa Ppz (pero sobre todo Ppz1) están implicadas en la regulación del transporte de potasio de baja afinidad. Aunque la naturaleza molecular de este transporte es hasta el momento elusiva, se ha podido caracterizar funcionalmente mediante la tecnología de *patch-clamp*. El principal componente del transporte de potasio de baja afinidad se ha denominado NSC1 y se ha descrito que es inhibido por cationes divalentes, como el calcio (Bihler *et al.*, 1998; Roberts *et al.*, 1999; Bihler *et al.*, 2002). Dado que en nuestro grupo hemos caracterizado en cierto detalle la relación existente

entre la proteína fosfatasa Ppz1 y la vía de señalización de la calcineurina implicada en la regulación de la homeostasis de calcio (artículo 1), decidimos analizar la posible relación entre este catión divalente y el defecto de crecimiento observado en los mutantes Trk que carecen de las fosfatasa Ppz. Los resultados (figura 4 del artículo 2) muestran que, en las condiciones analizadas (10 mM KCl), la adición de calcio no afecta el crecimiento de las cepas ESV212 (*trk1 trk2*) y MAR62 (*trk1 trk2 ppz2*). En cambio, el calcio agrava considerablemente el defecto de crecimiento de las cepas MAR70 (*trk1 trk2 ppz1*) y MAR73 (*trk1 trk2 ppz1 ppz2*), y este efecto no se puede evitar mediante la adición del inhibidor de la calcineurina FK506. Por el contrario, la adición al medio del quelante de cationes divalentes EGTA mejora sustancialmente el crecimiento de las cepas MAR70 y MAR73, pero no afecta a las células ESV212 o MAR62. Estos efectos en el crecimiento al añadir calcio o EGTA no se observaron cuando se crecieron las células en medio suplementado con 100 mM de cloruro potásico (no mostrado). Estos resultados refuerzan la idea de que el calcio afecta negativamente al sistema de transporte de potasio Trk-independiente. Además, el efecto del calcio o del EGTA sobre el crecimiento del triple mutante *trk1 trk2 ppz1* no parece verse afectado por adición de FK506, lo que sugiere que la inhibición del transporte de potasio de baja afinidad por parte del calcio es independiente de la actividad de la fosfatasa calcineurina.

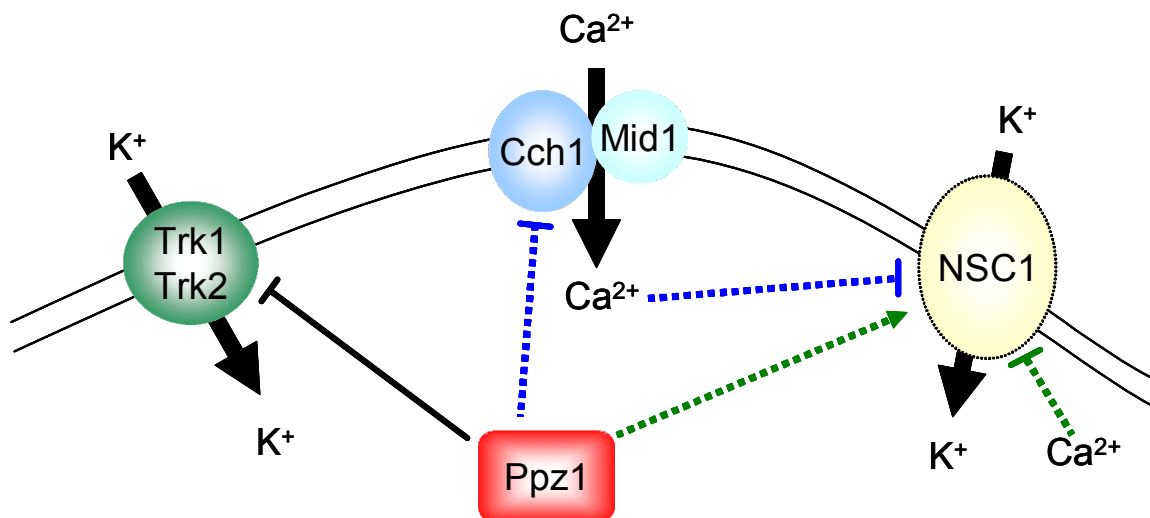


Figura 11. Modelo de la regulación del sistema de transporte de potasio de baja afinidad por la proteína fosfatasa Ppz1. La línea discontinua en NSC1 denota la falta de identidad molecular de este sistema de transporte. Las líneas azules y verdes hacen referencia a los dos posibles mecanismos de regulación que planteamos en este trabajo.

Con estos datos podemos aventurar que, aunque es posible que la regulación por calcio del transporte de potasio de baja afinidad y la ejercida por las proteínas fosfatasas Ppz sean fenómenos independientes (figura 11, líneas de color verde), también sería factible que el incremento de entrada de calcio al interior celular que hemos descrito en el mutante *ppz1* y que tiene lugar a través de los transportadores de membrana plasmática Cch1-Mid1 (figura 10B y páginas 45-47) pueda estar inhibiendo al transporte de potasio de baja afinidad (figura 11, líneas de color azul).

Nuestros resultados sugieren un papel dual para las fosfatasas Ppz en el transporte de potasio. Por un lado, la actividad fosfatasa Ppz produce la inhibición de los transportadores de alta afinidad Trk (Yenush *et al.*, 2002; Yenush *et al.*, 2005), posiblemente mediante desfosforilación (directa o indirecta) de los mismos, ya que en células *ppz1 ppz2* la proteína Trk1 se encuentra más fosforilada y es más activa (Yenush *et al.*, 2005). Por otro lado, la actividad fosfatasa Ppz1 reduce la entrada de calcio que tiene lugar a través de los transportadores de calcio de la membrana plasmática Cch1-Mid1 y este mecanismo podría explicar el efecto positivo que ejerce esta fosfatasa sobre el sistema de transporte de potasio de baja afinidad.

Se ha descrito que la falta de la proteína quinasa Sky1 es capaz de mejorar el defecto de crecimiento en bajo potasio de células *trk1 trk2* (Erez and Kahana, 2002), que es el fenotipo opuesto al que nosotros hemos descrito para las fosfatasas Ppz. Este hecho hace posible que nos planteemos una hipótesis en la cual la quinasa Sky1 y las fosfatasas Ppz están controlando el estado de fosforilación de una diana o dianas relevantes para la entrada de potasio, y por ello tienen funciones contrarias. En cualquier caso, la identificación de las fosfatasas Ppz como reguladores positivos del sistema de entrada de potasio independiente de Trk de la levadura aporta nueva información sobre esta función celular que puede ayudar a la identificación de la naturaleza molecular de este o estos transportadores. Por otro lado, la generación de las cepas MAR70 o MAR73, cuya toma de potasio es prácticamente nula, supone una herramienta extremadamente útil para la expresión de transportadores de potasio heterólogos en la levadura.

3. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL GEN *VHS3* de *S. cerevisiae*.

El gen *VHS3* (*YOR054c*) había sido identificado previamente en nuestro laboratorio por su capacidad de suprimir en multicopia el defecto de crecimiento de un doble mutante condicional *sit4 tetO:HAL3* (Simon *et al.*, 2001). Este mutante, en condiciones no permisivas (es decir, en presencia de doxiciclina), presenta un bloqueo en G1 que impide su crecimiento. Dado que *VHS3* codifica una proteína de elevada similitud de secuencia con Hal3 (49% de identidad) nos propusimos caracterizar funcionalmente Vhs3 en detalle, ya que podría significar la existencia de una nueva subunidad reguladora de la proteína fosfatasa Ppz1.

3.1. El análisis funcional de *VHS3* revela una notable similitud con *HAL3*.

La comparación de la secuencia aminoacídica de las proteínas Vhs3, de 674 residuos, y Hal3, de 562, pone de manifiesto la existencia de una elevada similitud entre ellas, sobre todo en lo que concierne a la región central y a la cola carboxi-terminal ácida que es incluso más extensa en el caso de Vhs3 (ver figura 3 y figura 1 del artículo 3). Debido a este gran parecido de secuencia nos planteamos la posibilidad de que Vhs3 estuviera mimetizando las funciones atribuibles a Hal3. Para comprobar esta hipótesis, analizamos los efectos derivados de la sobreexpresión o la delección del gen *VHS3* en procesos tales como la transición G1/S, el mantenimiento de la integridad celular y la homeostasis iónica, en los cuales se había descrito previamente la implicación de *HAL3*.

En primer lugar analizamos el efecto que causa la sobreexpresión de *VHS3* al crecimiento de una cepa *sit4*, ya que la presencia de *HAL3* en alto número de copias permite recuperar, al menos en parte, el defecto de crecimiento resultante de deleccionar el gen *SIT4* (Di Como *et al.*, 1995). Como puede observarse en la figura 2a del artículo 3, la sobreexpresión de *VHS3* mejora el crecimiento del mutante *sit4* de forma cuantitativamente similar a como lo hace la sobreexpresión de *HAL3* en este mismo mutante. Cuando las células son sincronizadas con α -factor, la sobreexpresión de *VHS3* permite iniciar la síntesis de DNA más rápidamente (figura 2b del artículo 3), si bien no tan efectivamente como lo hace la sobreexpresión de *HAL3*. Aunque la doble delección de los genes *SIT4* y *HAL3* conduce a un fenotipo de letalidad sintética

(Di Como *et al.*, 1995; Clotet *et al.*, 1999), el doble mutante *sit4 vhs3* es viable, si bien crece más lentamente que el mutante simple *sit4* y presenta un marcado retraso en la salida de G1 tras ser inducido con α -factor (figura 2b y 2c del artículo 3). Además, la delección de *VHS3* agrava drásticamente el defecto de crecimiento a altas temperaturas característico del mutante *sit4* (figura 2c del artículo 3).

El exceso de Hal3 es perjudicial para células que carecen de la MAP quinasa Slit2/Mpk1 (de Nadal *et al.*, 1998). En la figura 3 (panel superior) del artículo 3, se muestra que la sobreexpresión de *VHS3* empeora el crecimiento de la cepa *mpk1* y agrava la sensibilidad a cafeína que presenta esta cepa, aunque de manera menos drástica de lo que ocurre ante un exceso de *HAL3*. Por otro lado, se ha descrito que la delección de *HAL3* disminuye sustancialmente la sensibilidad del mutante *mpk1* a cafeína. Como era de esperar, el doble mutante *vhs3 mpk1* muestra una mayor tolerancia a cafeína que el mutante *mpk1*, aunque de nuevo el efecto es menos prominente que en el caso de mutar *hal3* (figura 3, panel inferior, del artículo 3).

Mientras que el mutante *hal3* es halosensible, la sensibilidad salina del mutante *vhs3* es idéntico a la de la cepa salvaje (no mostrado). Por otro lado, la sobreexpresión de *HAL3* incrementa la tolerancia a altas concentraciones de cationes sodio y litio (Ferrando *et al.*, 1995), mientras que, la sobreexpresión de *VHS3* en una cepa salvaje apenas mejora la tolerancia salina (figura 4 del artículo 3). En cambio, este efecto es muy marcado en células que carecen de Hal3 (figura 4 del artículo 3). Puesto que la sobreexpresión de *HAL3* produce un incremento de los niveles de expresión de la ATPasa Ena1 (Ferrando *et al.*, 1995), decidimos analizar la expresión de *ENA1* al sobreexpresar *VHS3* en células salvajes y en mutantes *hal3*, *ppz1* y *ppz1 ppz2*. Como puede apreciarse en la figura 4 del artículo 3, la sobreexpresión de *VHS3* en células salvajes resulta en un pequeño incremento de la expresión de *ENA1*, en comparación con el gran incremento que tiene lugar al sobreexpresar *HAL3*. El incremento producido por la sobreexpresión de *VHS3* se acentúa en células que carecen de Hal3. Por el contrario, el incremento en la expresión de *ENA1* desaparece en células que carecen de las fosfatasa Ppz1 y Ppz2, sugiriendo que este efecto puede ser mediado por las fosfatasa.

Todos estos resultados parecen indicar que la sobreexpresión de *VHS3* o su falta resulta en una serie de fenotipos que son equivalentes a los detectados en células que sobreexpresan o carecen de *HAL3*, aunque cuantitativamente los efectos observados en el caso de *VHS3* son menos intensos (ver tabla 3 para resumen de fenotipos).

		Hal3		Vhs3	
Proceso celular	Cepa	Sobreexpresión	Delección	Sobreexpresión	Delección
Homeostasis salina	salvaje	tolerancia Na ⁺ /Li ⁺	sensibilidad Na ⁺ /Li ⁺	leve tolerancia Na ⁺ /Li ⁺	NF
	<i>hal3</i>	tolerancia Na ⁺ /Li ⁺	-	tolerancia Na ⁺ /Li ⁺	letal
	<i>ppz1</i>	tolerancia Na ⁺ /Li ⁺	NF	NF	NF
	<i>ppz1,2</i>	NF	NF	NF	NF
Ciclo celular	salvaje	NF	NF	NF	NF
	<i>sit4</i>	mejora crecimiento	letal	mejora crecimiento	Empeora crecimiento
Integridad celular	salvaje	NF	NF	NF	NF
	<i>slt2</i>	letal	mejora crecimiento	Empeora crecimiento	leve mejora crecimiento

Tabla 3. Comparación entre los fenotipos resultantes de la sobreexpresión o la delección de las proteínas Hal3 y Vhs3. Se han agrupado los fenotipos en relación a los procesos celulares en los que participan. NF significa ausencia de fenotipo.

3.2. Vhs3 se une a la fosfatasa Ppz1 *in vitro* e *in vivo*.

Los fenotipos resultantes de la sobreexpresión o la falta de *VHS3* están de acuerdo con la posibilidad de que Vhs3 actúe como subunidad reguladora negativa de la fosfatasa Ppz1. Para comprobar esta posibilidad, expresamos en *Escherichia coli* una fusión de GST con el dominio catalítico de Ppz1 (residuos 345-692), que se ha demostrado que interacciona *in vitro* e *in vivo* con Hal3 (de Nadal *et al.*, 1998). En la figura 5a del artículo 3, puede observarse como la GST-Ppz1 (Δ 1-344) bacteriana retiene una versión de Vhs3 marcado con el epítipo FLAG presente en los extractos celulares. Por tanto, se puede concluir que Vhs3 se une *in vitro* al dominio catalítico de la fosfatasa Ppz1.

Además, se expresaron en *Saccharomyces cerevisiae*, y bajo su propio promotor, versiones de la fosfatasa Ppz1 entera y de su dominio carboxi-terminal fusionadas a GST. Se introdujo en estas células el plásmido con la versión marcada de VHS3 (FLAG), se prepararon los extractos y se purificaron las diferentes versiones GST-Ppz1 usando una resina de glutation-agarosa. En la figura 5b del artículo 3, se muestra que Vhs3 copurifica tanto con la GST-Ppz1 como con la GST-Ppz1 (Δ 1-344), aunque lo hace con mayor afinidad con la versión de Ppz1 que sólo tiene el dominio carboxi-terminal. De este resultado podemos concluir que Vhs3 se une *in vivo* a la fosfatasa Ppz1 y que, de igual forma a como sucede con Hal3 (de Nadal *et al.*, 1998), la interacción es más fuerte cuando Ppz1 carece de la región amino-terminal.

3.3. Vhs3 inhibe *in vitro* la actividad de la proteína fosfatasa Ppz1.

Una vez demostrada la interacción entre Vhs3 y Ppz1, analizamos la capacidad de Vhs3 para inhibir Ppz1 *in vitro* utilizando dos sistemas diferentes. En primer lugar, incubamos diferentes cantidades de GST, GST-Vhs3 o GST-Hal3 con GST-Ppz1 (Δ 1-344) y determinamos la actividad fosfatasa de las mezclas usando como sustrato *p*-nitrofenil fosfato. En la figura 6a (panel superior) del artículo 3, se puede ver que Vhs3 es capaz de inhibir la actividad fosfatasa de forma casi tan efectiva como lo hace Hal3.

Confirmamos la capacidad de Vhs3 para inhibir la fosfatasa Ppz1 usando la proteína Reg1 como sustrato (Garcia-Gimeno *et al.*, 2003). Reg1 se fosforila en respuesta a baja glucosa y, cuando se añade glucosa al medio, Reg1 se desfosforila por acción de Glc7. El estado de fosforilación de Reg1 puede detectarse mediante el cambio en la movilidad electroforética en SDS-PAGE cuando se expresa el segmento amino-terminal de la proteína. En la figura 6a (panel inferior) del artículo 3, se observa como Ppz1 puede desfosforilar Reg1 (1-443) y como esta desfosforilación se evita si previamente se añade Vhs3. El mismo resultado puede observarse al añadir Hal3. Con estos resultados podemos concluir que Vhs3 es capaz de inhibir *in vitro* la actividad de la proteína fosfatasa Ppz1, de forma tan eficiente a como lo hace Hal3.

Por lo tanto, podemos considerar a Vhs3 como una segunda subunidad reguladora negativa de Ppz1, aunque a diferencia de lo que ocurre con la proteína

fosfatasa de tipo 1 (PP1) en la cual cada subunidad reguladora parece actuar en un proceso concreto, la proteína Ppz1 tendría dos subunidades reguladoras redundantes. Con los resultados obtenidos hasta el momento, parece claro que tanto Hal3 como Vhs3 pueden unirse a Ppz1 e inhibir su actividad fosfatasa de forma similar. En cambio, los fenotipos obtenidos al sobreexpresar o al deletar *VHS3* no presentan la misma intensidad que los obtenidos para *HAL3* (ver tabla 3 para resumen de fenotipos), sugiriendo que Vhs3 tiene un papel biológico menos destacado. Esto podría tener diferentes explicaciones. En primer lugar, Vhs3 se recupera principalmente en sobrenadantes de extractos proteicos centrifugados a 16000 xg, indicando que es una proteína soluble (no mostrado). Por el contrario, una parte considerable de Ppz1 y de Hal3 se recupera en fracciones particuladas. Esto podría justificar una menor inhibición de Ppz1 *in vivo* por parte de Vhs3, ya que sólo tendría acceso a una fracción de la proteína total. Otra alternativa podría venir dada por una diferencia en los niveles de expresión de Hal3 y Vhs3. La comparación realizada a nivel de Northern blot y microchips de DNA muestra que los niveles de RNA mensajero de *VHS3* son casi indetectables y claramente inferiores a los de *HAL3* (no mostrado).

Puesto que las fosfatasas Ppz presentan algunas funciones comunes con Glc7, que es la subunidad catalítica de PP1, se ha descrito que estas fosfatasas podrían compartir subunidades reguladoras (Venturi *et al.*, 2000; Williams-Hart *et al.*, 2002). Por ello, decidimos analizar la capacidad de Vhs3 para inhibir Glc7 usando como sustrato *p*-nitrofenil fosfato. En la figura 6b del artículo 3, se muestra como Vhs3 es incapaz de inhibir PP1 en concentraciones a las cuales inhibe completamente a Ppz1. Por tanto, y como ya había sido descrito para Hal3 (de Nadal *et al.*, 1998; Garcia-Gimeno *et al.*, 2003), Vhs3 no parece actuar como una subunidad reguladora de la PP1.

3.4. Las mutaciones *hal3* y *vhs3* son sintéticas letales, pero la letalidad no está causada por un exceso de actividad Ppz.

Los resultados presentados sugieren que Hal3 y Vhs3 tienen funciones redundantes como subunidades inhibitoras de Ppz1. Por ello decidimos generar el doble mutante *hal3 vhs3* deletando el gen *VHS3* en células haploides que carecían de Hal3, y viceversa. Ninguna de las dos aproximaciones nos permitió obtener células

viables que contuvieran la doble mutación. Entonces construimos un doble mutante diploide heterocigoto para las dos mutaciones, indujimos la esporulación y analizamos 67 tétradas. Tras la caracterización de las esporas obtenidas, observamos 11 tétradas ditipo no parental (en las cuales sólo dos esporas daban lugar a colonias), 12 ditipo parental (en las cuales crecen las 4 esporas) y 44 tetratipos (con sólo tres esporas que forman colonias). En la figura 7a del artículo 3 se pueden observar diferentes ejemplos de esta última posibilidad. El análisis fenotípico de las colonias resultantes demostró que ninguna de ellas contenía la doble mutación *hal3 vhs3*. Mediante observación microscópica de las placas de disección se determinó que las esporas incapaces de producir colonias macroscópicas no llegaban a germinar, manteniéndose como una única célula. Estos resultados sugieren que las mutaciones *hal3* y *vhs3* deben ser sintéticas letales.

Para comprobar esta posibilidad, se construyó la cepa MAR107, que es un doble mutante *hal3 vhs3* que sobrevive gracias a la presencia de un plásmido multicopia (con el marcador *URA3*) que contiene el gen *HAL3*. Esta cepa, y la cepa MAR88 (*hal3*) que contiene el mismo plásmido, se crecieron en placa con medio sintético en presencia de 5-FOA (ácido 5-fluoro-orótico), que impide el crecimiento de células que contienen el marcador *URA3*. Mientras que la cepa MAR88 puede crecer en placas que contienen 5-FOA, lo que indica que estas células pueden perder el plásmido, la cepa MAR107 no forma ninguna colonia, indicando que la presencia de *HAL3* es necesaria para el crecimiento vegetativo del doble mutante *hal3 vhs3*. Se obtuvo el mismo resultado con la cepa MAR115, que es un doble mutante haploide que crece gracias a la presencia de *VHS3* en un plásmido multicopia con el marcador *URA3*.

Por otro lado, la cepa MAR107 fue transformada con un segundo plásmido multicopia (con el marcador *LEU2*) que contenía el gen *HAL3* o el gen *VHS3*, y tras el plaqueo en medio sintético con 5-FOA y el posterior crecimiento, se determinó que para que esta cepa crezca en medio con 5-FOA necesita la presencia de *HAL3* o de *VHS3*, que son aportados por el segundo plásmido (ver figura 12A). Estos experimentos apoyan la idea de que las mutaciones *hal3* y *vhs3* son sintéticas letales.

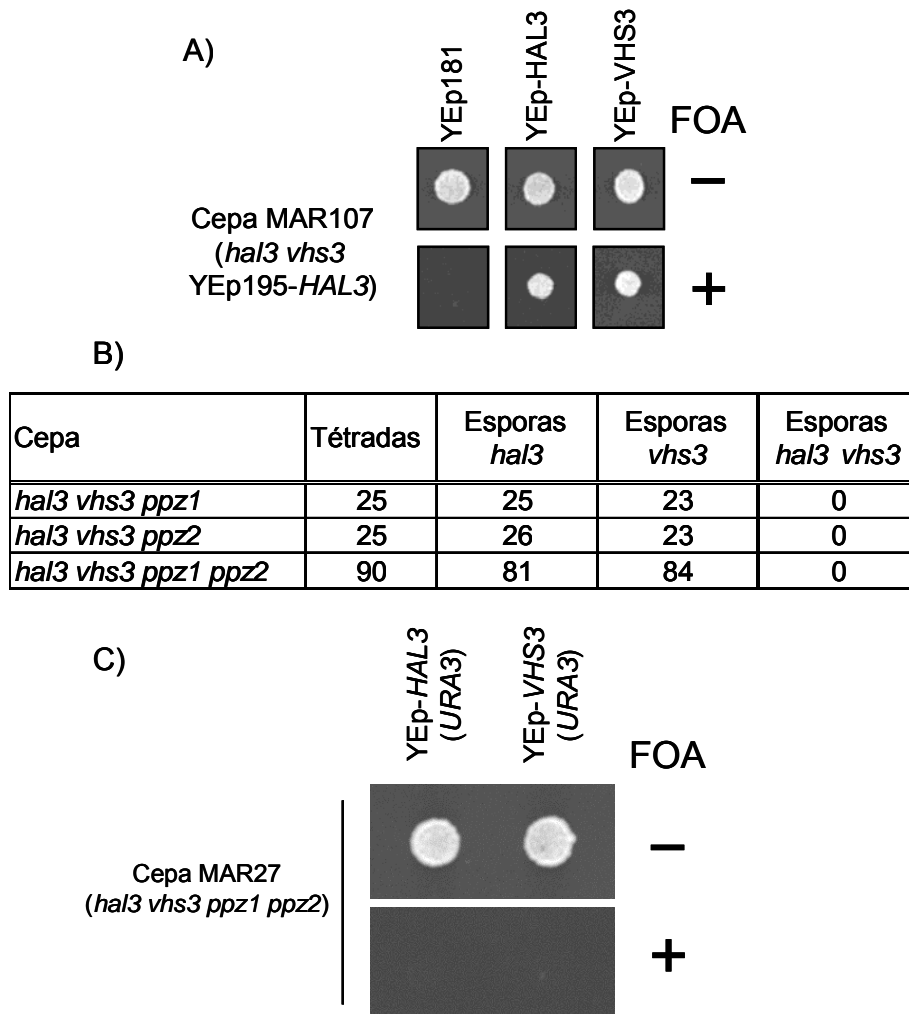


Figura 12. Análisis de la letalidad del doble mutante *hal3 vhs3*. **A**, la cepa *hal3 vhs3* que contiene el gen *HAL3* en un plásmido multicopia con el marcador *URA3* (YEp195) fue transformada con los plásmidos indicados y se creció en medio sintético en presencia o ausencia de ácido 5-fluoro-orótico (FOA) para forzar la pérdida del plásmido *URA3*. **B**, tabla en la cual se indica el número de tétradas diseccionadas para los triples mutantes (*hal3 vhs3 ppz1* o *hal3 vhs3 ppz2*) y el cuádruple mutante (*hal3 vhs3 ppz1 ppz2*) así como el número de esporas viables recuperadas que contenían las mutaciones *hal3*, *vhs3* y *hal3 vhs3*. Se observa que se recuperan esporas *hal3* o *vhs3* pero no se recuperan esporas que contengan las dos mutaciones. **C**, crecimiento en 5-FOA donde se muestra que el cuádruple mutante (*hal3 vhs3 ppz1 ppz2*) no puede perder el plásmido (*URA3*) que contiene *HAL3* o *VHS3* para poder crecer.

Puesto que la sobreexpresión de Ppz1 afecta negativamente al crecimiento celular produciendo un bloqueo en G1 (Clotet *et al.*, 1999), consideramos la posibilidad de que la falta simultánea de *HAL3* y *VHS3* diera lugar a la hiperactivación de Ppz1, lo que podría explicar el fenotipo de letalidad sintética de esta doble mutación. Para comprobar esta posibilidad, generamos los diploides *hal3 vhs3 ppz1*, *hal3 vhs3 ppz2* y

hal3 vhs3 ppz1 ppz2, heterocigotos para todas las mutaciones. Tras la esporulación de estas cepas y la disección de las respectivas tétradas (figura 12B), no conseguimos recuperar ninguna colonia que fuera doble mutante *hal3 vhs3* incluso en presencia de las mutaciones *ppz1*, *ppz2* o *ppz1 ppz2*. Por tanto, el fenotipo de letalidad se mantiene en ausencia de los genes *PPZ1* y *PPZ2*. Además, transformamos la cepa diploide MAR112 (heterocigota para las mutaciones *hal3*, *vhs3*, *ppz1* y *ppz2*) con los plásmidos YEp195-HAL3 o YEp195-VHS3, que contienen los genes *HAL3* o *VHS3* en un plásmido multicopia con el marcador *URA3*. Tras la esporulación, se seleccionaron células haploides que contuvieran las cuatro mutaciones y el plásmido *URA3* y se crecieron en placas que contenían 5-FOA para forzar la pérdida del plásmido. En la figura 12C puede observarse la ausencia de colonias capaces de crecer en presencia de 5-FOA, lo cual indica que esta cepa necesita *HAL3* o *VHS3* para poder crecer, incluso en ausencia de los dos genes que codifican para las fosfatasa Ppz. Por tanto, podemos concluir que la letalidad sintética de las mutaciones *hal3* y *vhs3* no es debida a una hiperactivación de las fosfatasa Ppz. Esta observación es contraria a la definida para la letalidad sintética de las mutaciones *hal3* y *sit4*, que es eliminada por la delección de *PPZ1* (Clotet *et al.*, 1999).

Recientemente, nuestro grupo ha identificado una serie de residuos aminoacídicos en la proteína Hal3 que están implicados en la unión y/o inhibición de Ppz1 (Munoz *et al.*, 2004). Aunque la mutación de estos residuos afecta a la capacidad de Hal3 por unir y/o inhibir Ppz1, no parece afectar a su capacidad de rescatar el crecimiento del doble mutante *hal3 vhs3*. Por tanto, estos resultados apoyan que la letalidad del doble mutante no está causada por un exceso de actividad fosfatasa Ppz, sugiriendo que Vhs3 y/o Hal3 deben estar participando, de forma Ppz-independiente, en un proceso esencial.

La posibilidad de que el fenotipo de letalidad del doble mutante *hal3 vhs3* esté causado por la hiperactivación de Glc7, que también resulta ser letal (Liu *et al.*, 1992; Francisco *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1995), parece descartable, ya que ni Hal3 (de Nadal *et al.*, 1998; Garcia-Gimeno *et al.*, 2003) ni Vhs3 (figura 6B del artículo 3) pueden inhibir *in vitro* la actividad fosfatasa de Glc7. Además, ni la delección ni la sobreexpresión de *VHS3* parecen afectar a la acumulación de glucógeno (no mostrado), un fenotipo característico relacionado con la regulación de la función Glc7 (Francois *et al.*, 1992; Venturi *et al.*, 2000; Garcia-Gimeno *et al.*, 2003).

3.5. Análisis de los efectos de la mutación del residuo His459 en las funciones de Vhs3.

En la planta *Arabidopsis thaliana* existe una proteína similar a Hal3 y Vhs3, denominada AtHal3a (figura 1 del artículo 3), que ha sido estudiada en cierto detalle. La expresión de esta flavoproteína en células de levadura que carecen de *HAL3* complementa parcialmente el fenotipo de sensibilidad a LiCl característico de este mutante, y plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresan AtHal3a muestran una mejora en la tolerancia a estrés salino (Espinosa-Ruiz *et al.*, 1999). La definición de su estructura tridimensional ha permitido predecir la posible existencia de propiedades catalíticas para AtHal3a, mostrando que esta proteína tiene la capacidad de catalizar *in vitro* la decarboxilación de 4'-fosfopantotenoilcisteína (PPC) a fosfopanteteína (PP) (Kupke *et al.*, 2001; Hernandez-Acosta *et al.*, 2002), un paso intermedio en la vía de síntesis de coenzima A. Esta capacidad catalítica implica a los residuos His90 y Cys175, ya que la mutación de estos residuos a alanina y serina respectivamente, resulta en la inactivación completa del enzima (Hernandez-Acosta *et al.*, 2002; Steinbacher *et al.*, 2003). Aunque las proteínas Hal3 y Vhs3 de la levadura sólo poseen conservado el residuo His90 (que es la His459 en Vhs3 y la His378 en Hal3), nos planteamos analizar la importancia de este residuo para las funciones de Vhs3. Por ello, mutamos la histidina 459 a alanina y clonamos la forma mutada con un epítipo 3xFLAG C-terminal en un plásmido multicopia. Se han realizado diferentes análisis fenotípicos, como el crecimiento en una cepa *mpk1*, la tolerancia a sal en una cepa *hal3*, y la mejora de crecimiento de la cepa *sit4*. En todos los casos, nuestros resultados (no mostrado) indican que la versión H459A se comporta exactamente igual que la forma salvaje. En cambio, mientras que la versión salvaje de *VHS3* es capaz de rescatar el fenotipo de letalidad del doble mutante *hal3 vhs3*, la versión H459A no es capaz de suprimir la letalidad ni en monocopia ni en multicopia. Por tanto, aunque el cambio H459A en Vhs3 produce una proteína funcional, al menos en los fenotipos relacionados con Ppz, da lugar a una proteína incapaz de rescatar el fenotipo de letalidad sintética del mutante *hal3 vhs3*, reforzando la idea de que este fenotipo no está relacionado con las funciones que realizan las fosfatasa Ppz. Estos mismos resultados se obtienen con la versión H378A de Hal3 (Munoz *et al.*, 2004). Aunque podríamos especular que el fenotipo de letalidad puede ser el resultado de una pérdida de actividad catalítica necesaria para sintetizar fosfopanteteína, hemos de recordar que ni Hal3 ni Vhs3 conservan la Cys175 (de AtHal3a) necesaria para

completar la reacción catalítica, ya que en su lugar ambas proteínas presentan un residuo Asn. Por tanto, aunque el residuo His es necesario para las funciones Ppz-independientes de Hal3 y Vhs3, no es evidente que estas funciones impliquen la participación en la síntesis de coenzima A.

3.6. El doble mutante condicional *vhs3 tetO:HAL3* presenta un fenotipo de floculación y un incremento en la expresión del gen *FLO11*.

Con la finalidad de identificar las funciones Ppz-independientes de Vhs3 y Hal3, decidimos construir un doble mutante *hal3 vhs3* condicional (cepa MAR24) delecionando el gen *VHS3* y reemplazando el promotor de *HAL3* por un promotor *tetO* regulable por doxiciclina (figura 13A), de tal manera que la expresión de *HAL3* se anula en presencia de doxiciclina. Cuando crecimos esta cepa en placas con 20-100 µg/ml de doxiciclina, su crecimiento se redujo pero las células eran todavía capaces de proliferar (figura 7B del artículo 3). Cuando se analizó el crecimiento en medio líquido, observamos que las células tratadas con doxiciclina presentaban un marcado fenotipo de floculación (figura 7C del artículo 3 y figura 13B). Al analizar estos cultivos mediante microscopía óptica observamos que en presencia de doxiciclina forman grandes agrupaciones de células estructuradas en un único plano (figura 13B). El hecho de que no podamos reproducir con el mutante condicional la letalidad del doble mutante *hal3 vhs3* puede explicarse por la expresión residual de la construcción *tetO:HAL3*, ya que situaciones parecidas han sido descritas para un número sustancial de genes esenciales (Belli *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2003; Davydenko *et al.*, 2004). En cualquier caso, el análisis del doble mutante condicional MAR24 nos ha permitido identificar un nuevo fenotipo asociado a la disminución de la expresión de Hal3 y Vhs3: la capacidad de flocular. Un factor crítico para la floculación de las células es la presencia o ausencia de proteínas tipo lectina (floculinas), como son Flo1, Flo5, Flo9 y Flo11, aunque la expresión de las tres primeras suele estar silenciada en las cepas de levadura de laboratorio. Por tanto, decidimos explorar la posibilidad de que la floculina Flo11 pudiera estar implicada en el fenotipo de floculación del mutante condicional *hal3 vhs3*. Como puede observarse en la figura 7C del artículo 3, en presencia de doxiciclina la cepa MAR24 es incapaz de flocular cuando falta Flo11. Además, mediante el análisis cuantitativo del fenotipo de floculación determinamos que, mientras que el mutante *vhs3* no flocula, el mutante *hal3* muestra una débil tendencia

a flocular, de forma similar a como lo hace la cepa JC001 (*tetO:HAL3*) en presencia de doxiciclina (figura 7C del artículo 3). El nivel de floculación se incrementa considerablemente en la cepa MAR24 al reducir la expresión de *HAL3* por la adición de doxiciclina, y este efecto se elimina completamente cuando se deletiona el gen *FLO11*, indicando que el fenotipo de floculación que resulta de la falta de Hal3 y Vhs3 requiere de la floculina Flo11.

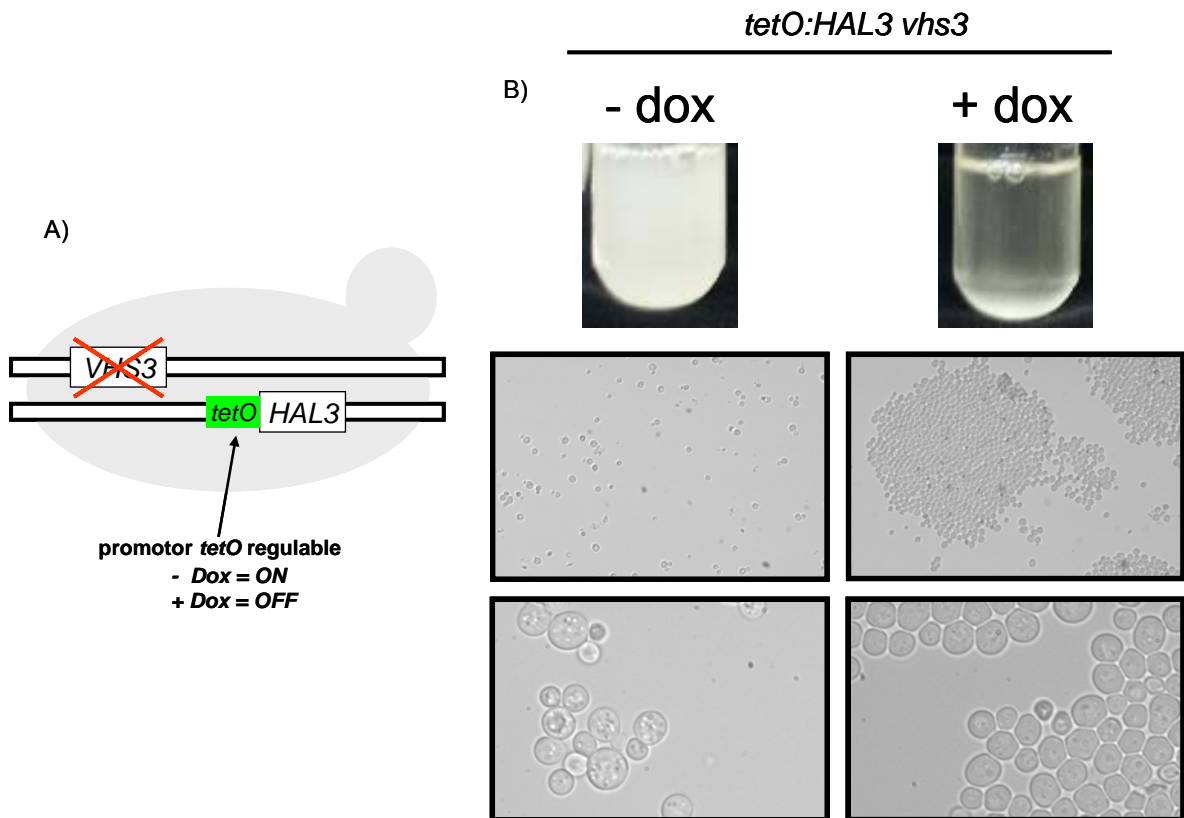


Figura 13. El mutante condicional *tetO:HAL3 vhs3* es viable y presenta un fenotipo de floculación. A, esquema del mutante condicional *tetO:HAL3 vhs3*. B, en presencia de doxiciclina el mutante condicional crece formando flóculos que sedimentan rápidamente al cesar la agitación. Sobre una superficie estas células se agregan en un plano.

Puesto que el control de la expresión de *FLO11* es el principal mecanismo para regular su función, consideramos interesante probar qué sucede con la expresión de *FLO11* en la cepa MAR24 en condiciones no permisivas. Con esta finalidad, generamos un 'reporter' que contiene el promotor entero de *FLO11* (aproximadamente 3.0 Kb) fusionado al gen de la β -galactosidasa. En la figura 8 del artículo 3 puede observarse que la adición de doxiciclina a la cepa MAR24 resulta en un marcado

incremento de la expresión de *FLO11*. Por tanto, la falta de Hal3 y Vhs3 da lugar a un incremento en la expresión del gen *FLO11*, lo que sugiere que Hal3 y Vhs3 son reguladores negativos de la expresión de esta floculina.

La regulación de la expresión del gen *FLO11* es compleja e implica a diversas vías de señalización que convergen en diferentes factores de transcripción (figura 7). Con la finalidad de identificar en qué vía o vías estaban participando las proteínas Hal3 y Vhs3 decidimos deletar en la cepa MAR24 los principales factores de transcripción que controlan la expresión de *FLO11* y analizar, en presencia de doxiciclina, los niveles de expresión de la floculina. Como muestra la figura 8 del artículo 3, el incremento de expresión de *FLO11* que tiene lugar en la cepa MAR24 tratada con doxiciclina prácticamente se elimina cuando falta Flo8, que es el factor de transcripción responsable de la inducción de la expresión de *FLO11* en respuesta a la activación de la proteína quinasa A (PKA). En cambio, la delección de otros factores de transcripción como *STE12*, *TEC1* o *MSS11*, no afecta a la expresión de *FLO11* en las condiciones analizadas. Además, la delección de *FLO8* elimina el fenotipo de floculación de la cepa MAR24 en presencia de doxiciclina, mientras que la falta de Snf1 no lo hace (no mostrado). Estos datos sugieren que Hal3 y Vhs3 actúan regulando la función del factor de transcripción Flo8, aunque se requiere un análisis más detallado para identificar sobre qué elemento de la vía de señalización de la PKA ejercen su regulación. Un punto importante en el contexto de nuestro trabajo es evaluar si esta nueva función asignada a las proteínas Hal3 y Vhs3 está mediada o no por las proteínas fosfatasa Ppz. Nuestros resultados preliminares muestran que las células que sobreexpresan la fosfatasa Ppz1 presentan una débil tendencia a flocular y un pequeño incremento en la expresión de *FLO11*, aunque estos efectos son sustancialmente más débiles que los producidos por la ausencia de Vhs3 y Hal3 (no mostrado). Un análisis más detallado nos ha permitido comprobar que la delección del gen *PPZ1* en la cepa MAR24 suprime completamente el fenotipo de floculación que tiene lugar en ésta cuando le añadimos doxiciclina (no mostrado), sugiriendo que las fosfatasas Ppz están implicadas en este proceso. De forma contradictoria a lo esperado, la expresión en monocopia de la versión de Vhs3 H459A o de la versión de Hal3 H378A no consigue eliminar el fenotipo de floculación de la cepa MAR24 en presencia de doxiciclina, y además la expresión en monocopia de versiones mutadas de Hal3 incapaces de unir y/o inhibir Ppz1 disminuye la intensidad de este fenotipo de floculación, aunque no llega a eliminarlo plenamente (no mostrado). Los datos de los

que disponemos hasta el momento no nos permiten explicar por qué para esta nueva función en la que participan Hal3/Vhs3 y que requiere de la presencia de las fosfatasas Ppz, es imprescindible el residuo histidina conservado y no lo son los residuos necesarios para la unión y/o inhibición de Ppz1.

Una posible explicación que puede justificar la aparición de este fenotipo de floculación cuando faltan Hal3 y Vhs3 sería la siguiente: la falta de Hal3 y Vhs3 da lugar a la hiperactivación de las fosfatasas Ppz y ello conlleva presumiblemente la inhibición de los transportadores de potasio Trk (Yenush *et al.*, 2002; Yenush *et al.*, 2005), disminuyendo la entrada de potasio al interior celular y acidificando el citosol. Esta disminución en el pH intracelular podría activar la proteína quinasa A (Colombo *et al.*, 1998; Thevelein and De Winde, 1999), que a su vez activaría la expresión del gen *FLO11*, mediante la regulación del factor de transcripción Flo8. Una mayor expresión de la floculina Flo11 induciría la floculación de estas células.

3.7. Estudio de complementación de la letalidad del doble mutante *hal3 vhs3*.

En este trabajo, hemos concluido que Hal3 y Vhs3 están realizando alguna función esencial diferente a la de subunidades reguladoras negativas de las fosfatasas Ppz1 y Ppz2. Como ya hemos mencionado anteriormente, para realizar esta función requieren del residuo His378 (Hal3) o His459 (Vhs3). Dado que el genoma de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* contiene el gen *YKL088w* que presenta una cierta identidad de secuencia con estos genes (figura 3), decidimos probar si su sobreexpresión complementaba la letalidad del doble mutante *hal3 vhs3* (Tabla 4). Aunque Ykl088w también conserva el residuo histidina (figura 3), en este caso His391, no es capaz de suprimir el fenotipo de letalidad producido por la doble delección de *HAL3* y *VHS3*, por lo que concluimos que Ykl088w no parece estar realizando la misma función que Hal3 y Vhs3.

Analizamos, además, la posible complementación de la letalidad del doble mutante por homólogos de Hal3 de eucariotas superiores. Para ello utilizamos un plásmido de expresión de levadura, denominado pRS699 (Gaxiola *et al.*, 1992) que contiene clonado el gen *HAL3* de *Arabidopsis thaliana* o el homólogo de ratón bajo el

promotor del gen *PMA1*, que se expresa de forma constitutiva (gentilmente proporcionados por el Dr. Ramón Serrano de la Universidad Politécnica de Valencia).

	<u>Mutación</u>	<u>Cepa</u> <i>hal3 vhs3</i>
ScHAL3	WT	+
	His378	-
ScVHS3	WT	+
	His459	-
YKL088w	WT	-
	His391	-
	Cys478	-
AtHal3a	WT	+
	His90	-
	Cys175	+
MmHal3	WT	+
HsPPCDC	WT	+
	Cys173	+

Tabla 4. Complementación del doble mutante *hal3 vhs3*. Se sobrexpresaron en el diploide *hal3 vhs3* los genes indicados y sus versiones, se indujo la esporulación y se analizaron las tétradas resultantes. El "+" hace referencia a la aparición de haploides *hal3 vhs3*, mientras que "-" se aplica a los casos en que no se rescataron haploides viables con la doble mutación.

Este mismo plásmido fue utilizado para clonar el cDNA del homólogo humano (HsPPCDC o *HsHAL3*), amablemente cedido por los Drs. Andrei Osterman (Instituto Burnham, California) y Erick Strauss (Universidad de Stellenbosch, Sudáfrica). Como puede observarse en la tabla 4, tanto la expresión del gen de plantas como el de ratón y humano permiten crecer al doble mutante *hal3 vhs3*. En el caso del gen de plantas y el gen humano hemos generado unas versiones que presentan una mutación puntual en la cisteína catalítica (Cys175 en *AtHal3a* y Cys173 en *HsPPCDC*) y en ambos casos la pérdida de este residuo no afecta a la capacidad de complementar la letalidad de células *hal3 vhs3*. En cambio, la mutación puntual del residuo His90 de la proteína

AtHal3a la vuelve incapaz de suprimir el fenotipo de letalidad. De estos resultados podemos concluir que Hal3 y Vhs3 están realizando una función esencial en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que se ha conservado en la evolución, ya que proteínas homólogas de plantas, ratón y humano pueden complementar la falta de la función Hal3/Vhs3. Para la realización de esta función es esencial la presencia del residuo histidina catalítico implicado en un paso intermedio en la síntesis de coenzima A, mientras que, en cambio, no parece requerir la cisteína que también es necesaria para este proceso.

En resumen, en este trabajo, caracterizamos a la proteína Vhs3 como reguladora negativa de la actividad proteína fosfatasa Ppz1 en todos los procesos en los cuales se ha descrito que participa. Demostramos, además, que las fosfatasas Ppz y sus subunidades reguladoras Hal3/Vhs3 participan en la regulación de la expresión de la floculina Flo11 y, por tanto, en el proceso de floculación. También hemos hallado una nueva función esencial para Hal3 y Vhs3 que no requiere de las fosfatasas Ppz, lo que indica que las proteínas Hal3/Vhs3 son capaces de desarrollar funciones no relacionadas con la previamente descrita para ellas de subunidades reguladoras negativas de las fosfatasas Ppz. Esta capacidad de las proteínas de desempeñar funciones múltiples no relacionadas (proteínas *moonlighting*), parece ser común en la naturaleza, y ocurre tanto en procarionotas como en eucariotas (Jeffery, 1999; Jeffery, 2003). Es interesante observar que una de las maneras que presentan estas proteínas para ejecutar funciones diferentes es alterar su estado de oligomerización. En relación con esto, se ha descrito que la proteína AtHal3a de *A. thaliana* es capaz de formar homotrímeros (Albert *et al.*, 2000). Es interesante remarcar que toda una serie de residuos requerida para la formación de trímeros de AtHal3a se encuentra conservada tanto en la proteína Hal3 (Albert *et al.*, 2000) como en la proteína Vhs3 (no mostrado) de la levadura *S. cerevisiae*. Una atractiva hipótesis, que está siendo investigada en nuestro laboratorio, consiste en suponer que Hal3 y Vhs3 podrían adquirir funciones diferenciadas alternando su estado de asociación. La naturaleza esencial de la nueva función Ppz-independiente de Hal3 y Vhs3 podría sugerir que ésta consiste en catalizar un paso intermedio en la síntesis de coenzima A. Sin embargo, nuestros estudios de complementación arrojan algunas dudas al respecto, que esperamos clarificar mediante investigaciones en curso.

CONCLUSIONES

LA PROTEÍNA FOSFATASA Ppz1 REGULA LA EXPRESIÓN DE LA ATPasa DE SODIO Ena1 A TRAVÉS DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA CALCINEURINA

1._____La proteína Hal3 es capaz de interactuar *in vitro* con la fosfatasa Ppz2, y lo hace con la misma intensidad que con Ppz1.

2._____El incremento en la expresión de *ENA1* que tiene lugar en el mutante *ppz1* depende única y exclusivamente del elemento CDRE e implica la participación de la vía de señalización de la calcineurina.

3._____Ppz1 no regula la actividad calcineurina a través de la proteína calcipresina Rcn1. El papel de Ppz1 sobre calcineurina podría explicarse mediante el efecto negativo que Ppz1 ejerce sobre la entrada de calcio que tiene lugar a través de los transportadores Cch1-Mid1 de la membrana plasmática.

4._____El incremento de expresión de *ENA1* que tiene lugar en el doble mutante *ppz1 ppz2* depende del elemento CDRE y la región ARR2, e implica respectivamente a la vía de la calcineurina y a un cambio en el pH intracelular, presumiblemente como consecuencia de una hiperactivación de los transportadores de potasio Trks.

LAS PROTEÍNAS FOSFATASAS Ppz REGULAN EL TRANSPORTE DE POTASIO INDEPENDIENTE DE Trk EN LA LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae*

1._____La delección de *PPZ1* incrementa drásticamente los requerimientos de potasio de células que carecen de los principales transportadores de potasio Trk1 y Trk2. La toma de potasio de estas células es prácticamente nula, lo que sugiere que la fosfatasa Ppz1 debe estar regulando positivamente el transporte de potasio de baja afinidad.

2._____El transporte de potasio de baja afinidad, denominado NSC1, es inhibido por cationes calcio, y esta inhibición es independiente de la actividad de la fosfatasa calcineurina. Ppz1 podría estar regulando positivamente a NSC1 mediante la inhibición que ejerce sobre el transporte de calcio al interior celular.

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL GEN *VHS3* DE *Saccharomyces cerevisiae*

1.____ Hemos caracterizado a la proteína Vhs3 como una segunda subunidad reguladora negativa de las fosfatasas Ppz1 y Ppz2. Vhs3 es capaz de unirse a Ppz1 *in vivo* e inhibir *in vitro* su actividad. Tanto Hal3 como Vhs3 modulan todas las funciones hasta ahora descritas para estas fosfatasas, aunque Vhs3 lo hace con menor intensidad.

2.____ Vhs3 y Hal3 regulan negativamente la expresión de la floulina Flo11. De todas las vías que regulan la expresión de *FLO11*, Hal3 y Vhs3 únicamente participan en la que tiene lugar a través de la proteína quinasa A y del factor de transcripción Flo8. Esta regulación la ejercen a través de la inhibición de las fosfatasas Ppz.

3.____ Las mutaciones *hal3* y *vhs3* son sintéticas letales, y la letalidad no está causada por un exceso de actividad Ppz. Por tanto, estas proteínas presentan una función esencial independiente de las fosfatasas Ppz y, en consecuencia, pueden considerarse multifuncionales (proteínas *moonlighting*).

4.____ Las proteínas Hal3 y Vhs3 participan en un proceso esencial que está conservado a lo largo de la evolución. Para ello requieren el residuo conservado de Histidina que ha sido implicado en la catálisis de un paso intermedio de la biosíntesis de coenzima A, pero no el residuo Cisteína, también necesario.

REFERENCIAS

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

Albert,A., Yenush,L., Gil-Mascarell,M.R., Rodriguez,P.L., Patel,S., Martinez-Ripoll,M., Blundell,T.L., and Serrano,R. (2000b). X-ray structure of yeast Hal2p, a major target of lithium and sodium toxicity, and identification of framework interactions determining cation sensitivity. *J. Mol. Biol.*, 295, 927-938.

Alepuz,P.M., Cunningham,K.W., and Estruch,F. (1997). Glucose repression affects ion homeostasis in yeast through the regulation of the stress-activated ENA1 gene. *Mol. Microbiol.*, 26, 91-98.

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

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

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

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

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

Banuett,F. (1998). Signalling in the yeasts: an informational cascade with links to the filamentous fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62, 249-274.

Beck,T. and Hall,M.N. (1999). The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature*, 402, 689-692.

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

Berti,A., Ramos,J., Ludwig,J., Lichtenberg-Frate,H., Reid,J., Bihler,H., Calero,F., Martinez,P., and Ljungdahl,P.O. (2003). Characterization of potassium transport in wild-type and isogenic yeast strains carrying all combinations of *trk1*, *trk2* and *tok1* null mutations. *Mol. Microbiol.*, 47, 767-780.

Bidard,F., Blondin,B., Dequin,S., Vezinhet,F., and Barre,P. (1994). Cloning and analysis of a FLO5 flocculation gene from *S. cerevisiae*. *Curr. Genet.*, 25, 196-201.

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

Bihler,H., Slayman,C.L., and Berti,A. (2002). Low-affinity potassium uptake by *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by NSC1, a calcium-blocked non-specific cation channel. *Biochim. Biophys. Acta*, 1558, 109-118.

- Black,S., Andrews,P.D., Sneddon,A.A., and Stark,M.J. (1995). A regulated MET3-GLC7 gene fusion provides evidence of a mitotic role for *Saccharomyces cerevisiae* protein phosphatase 1. *Yeast*, 11, 747-759.
- Bollen,M. (2001). Combinatorial control of protein phosphatase-1. *Trends Biochem. Sci.*, 26, 426-431.
- Bonilla,M. and Cunningham,K.W. (2003). Mitogen-activated protein kinase stimulation of Ca(2+) signaling is required for survival of endoplasmic reticulum stress in yeast. *Mol. Biol. Cell*, 14, 4296-4305.
- Bonilla,M., Nastase,K.K., and Cunningham,K.W. (2002). Essential role of calcineurin in response to endoplasmic reticulum stress. *EMBO J.*, 21, 2343-2353.
- Cappellaro,C., Baldermann,C., Rachel,R., and Tanner,W. (1994). Mating type-specific cell-cell recognition of *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall attachment and active sites of α - and α -agglutinin. *EMBO J.*, 13, 4737-4744.
- Carlson,M. (1999). Glucose repression in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2, 202-207.
- Ceulemans,H. and Bollen,M. (2006). A tighter RVxF motif makes a finer Sift. *Chem. Biol.*, 13, 6-8.
- Ceulemans,H., Vulsteke,V., De Maeyer,M., Tatchell,K., Stalmans,W., and Bollen,M. (2002). Binding of the concave surface of the Sds22 superhelix to the α 4/ α 5/ α 6-triangle of protein phosphatase-1. *J. Biol. Chem.*, 277, 47331-47337.
- Clotet,J., Gari,E., Aldea,M., and Ariño,J. (1999). The yeast ser/thr phosphatases sit4 and ppz1 play opposite roles in regulation of the cell cycle. *Mol. Cell Biol.*, 19, 2408-2415.
- Clotet,J., Posas,F., Casamayor,A., Schaaff-Gerstenschlager,I., and Ariño,J. (1991). The gene DIS2S1 is essential in *Saccharomyces cerevisiae* and is involved in glycogen phosphorylase activation. *Curr. Genet.*, 19, 339-342.
- Clotet,J., Posas,F., de Nadal,E., and Ariño,J. (1996). The NH2-terminal extension of protein phosphatase PPZ1 has an essential functional role. *J. Biol. Chem.*, 271, 26349-26355.
- Cohen,P. (1989). The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.*, 58, 453-508.
- Cohen,P.T. (1997). Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem. Sci.*, 22, 245-251.
- Cohen,P.T. (2002). Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J. Cell Sci.*, 115, 241-256.
- Colombo,S., Ma,P., Cauwenberg,L., Winderickx,J., Crauwels,M., Teunissen,A., Nauwelaers,D., De Winde,J.H., Gorwa,M.F., Colavizza,D., and Thevelein,J.M. (1998). Involvement of distinct G-proteins, Gpa2 and Ras, in glucose- and intracellular acidification-induced cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, 17, 3326-3341.
- Conlan,R.S. and Tzamarias,D. (2001). Sfl1 functions via the co-repressor Ssn6-Tup1 and the cAMP-dependent protein kinase Tpk2. *J. Mol. Biol.*, 309, 1007-1015.
- Crespo,J.L., Daicho,K., Ushimaru,T., and Hall,M.N. (2001). The GATA transcription factors GLN3 and GAT1 link TOR to salt stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 276, 34441-34444.

- Crespo, J.L. and Hall, M.N. (2002). Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66, 579-91, table.
- Cunningham, K.W. and Fink, G.R. (1996). Calcineurin inhibits VCX1-dependent H⁺/Ca²⁺ exchange and induces Ca²⁺ ATPases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, 16, 2226-2237.
- Cyert, M.S., Kunisawa, R., Kaim, D., and Thorner, J. (1991). Yeast has homologs (CNA1 and CNA2 gene products) of mammalian calcineurin, a calmodulin-regulated phosphoprotein phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 88, 7376-7380.
- Cyert, M.S. and Thorner, J. (1992). Regulatory subunit (CNB1 gene product) of yeast Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphoprotein phosphatases is required for adaptation to pheromone. *Mol. Cell Biol.*, 12, 3460-3469.
- Daugherty, M., Polanuyer, B., Farrell, M., Scholle, M., Lykidis, A., Crecy-Lagard, V., and Osterman, A. (2002). Complete reconstitution of the human coenzyme A biosynthetic pathway via comparative genomics. *J. Biol. Chem.*, 277, 21431-21439.
- Davydenko, S.G., Juselius, J.K., Munder, T., Bogengruber, E., Jantti, J., and Keranen, S. (2004). Screening for novel essential genes of *Saccharomyces cerevisiae* involved in protein secretion. *Yeast*, 21, 463-471.
- de Nadal, E., Clotet, J., Posas, F., Serrano, R., Gomez, N., and Ariño, J. (1998). The yeast halotolerance determinant Hal3p is an inhibitory subunit of the Ppz1p Ser/Thr protein phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95, 7357-7362.
- de Nadal, E., Fadden, R.P., Ruiz, A., Haystead, T., and Ariño, J. (2001). A role for the Ppz Ser/Thr protein phosphatases in the regulation of translation elongation factor 1B α . *J. Biol. Chem.*, 276, 14829-14834.
- Denis, V. and Cyert, M.S. (2002). Internal Ca(2⁺) release in yeast is triggered by hypertonic shock and mediated by a TRP channel homologue. *J. Cell Biol.*, 156, 29-34.
- Di Como, C.J., Bose, R., and Arndt, K.T. (1995). Overexpression of SIS2, which contains an extremely acidic region, increases the expression of SWI4, CLN1 and CLN2 in *sit4* mutants. *Genetics*, 139, 95-107.
- Durr, G., Strayle, J., Plemper, R., Elbs, S., Klee, S.K., Catty, P., Wolf, D.H., and Rudolph, H.K. (1998). The medial-Golgi ion pump Pmr1 supplies the yeast secretory pathway with Ca²⁺ and Mn²⁺ required for glycosylation, sorting, and endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Mol. Biol. Cell*, 9, 1149-1162.
- Elbing, K., McCartney, R.R., and Schmidt, M.C. (2006). Purification and characterization of the three Snf1-activating kinases of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.*, 393, 797-805.
- Eng, W.K., Faucette, L., McLaughlin, M.M., Cafferkey, R., Koltin, Y., Morris, R.A., Young, P.R., Johnson, R.K., and Livi, G.P. (1994). The yeast FKS1 gene encodes a novel membrane protein, mutations in which confer FK506 and cyclosporin A hypersensitivity and calcineurin-dependent growth. *Gene*, 151, 61-71.
- Erez, O. and Kahana, C. (2002). Deletions of SKY1 or PTK2 in the *Saccharomyces cerevisiae* *trk1Delta trk2Delta* mutant cells exert dual effect on ion homeostasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 295, 1142-1149.

- Espinosa-Ruiz,A., Belles,J.M., Serrano,R., and Culianez-Macia,F.A. (1999). Arabidopsis thaliana AtHAL3: a flavoprotein related to salt and osmotic tolerance and plant growth. *Plant J.*, 20, 529-539.
- Estrada,E., Agostinis,P., Vandenheede,J.R., Goris,J., Merlevede,W., Francois,J., Goffeau,A., and Ghislain,M. (1996). Phosphorylation of yeast plasma membrane H⁺-ATPase by casein kinase I. *J. Biol. Chem.*, 271, 32064-32072.
- Fairman,C., Zhou,X., and Kung,C. (1999). Potassium uptake through the TOK1 K⁺ channel in the budding yeast. *J. Membr. Biol.*, 168, 149-157.
- Farcasanu,I.C., Hirata,D., Tsuchiya,E., Nishiyama,F., and Miyakawa,T. (1995). Protein phosphatase 2B of *Saccharomyces cerevisiae* is required for tolerance to manganese, in blocking the entry of ions into the cells. *Eur. J. Biochem.*, 232, 712-717.
- Feng,Z.H., Wilson,S.E., Peng,Z.Y., Schlender,K.K., Reimann,E.M., and Trumbly,R.J. (1991). The yeast GLC7 gene required for glycogen accumulation encodes a type 1 protein phosphatase. *J. Biol. Chem.*, 266, 23796-23801.
- Ferrando,A., Kron,S.J., Rios,G., Fink,G.R., and Serrano,R. (1995). Regulation of cation transport in *Saccharomyces cerevisiae* by the salt tolerance gene HAL3. *Mol. Cell Biol.*, 15, 5470-5481.
- Forment,J., Mulet,J.M., Vicente,O., and Serrano,R. (2002). The yeast SR protein kinase Sky1p modulates salt tolerance, membrane potential and the Trk1,2 potassium transporter. *Biochim. Biophys. Acta*, 1565, 36-40.
- Francisco,L., Wang,W., and Chan,C.S. (1994). Type 1 protein phosphatase acts in opposition to IpL1 protein kinase in regulating yeast chromosome segregation. *Mol. Cell Biol.*, 14, 4731-4740.
- Francois,J.M., Thompson-Jaeger,S., Skroch,J., Zellenka,U., Spevak,W., and Tatchell,K. (1992). GAC1 may encode a regulatory subunit for protein phosphatase type 1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, 11, 87-96.
- Frederick,D.L. and Tatchell,K. (1996). The REG2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a type 1 protein phosphatase-binding protein that functions with Reg1p and the Snf1 protein kinase to regulate growth. *Mol. Cell Biol.*, 16, 2922-2931.
- Fukuda,A., Nakamura,A., Tagiri,A., Tanaka,H., Miyao,A., Hirochika,H., and Tanaka,Y. (2004). Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ antiporter from rice. *Plant Cell Physiol*, 45, 146-159.
- Gaber,R.F., Styles,C.A., and Fink,G.R. (1988). TRK1 encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, 8, 2848-2859.
- Gagiano,M., Bauer,F.F., and Pretorius,I.S. (2002). The sensing of nutritional status and the relationship to filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, 2, 433-470.
- Gagiano,M., van Dyk,D., Bauer,F.F., Lambrechts,M.G., and Pretorius,I.S. (1999a). Divergent regulation of the evolutionarily closely related promoters of the *Saccharomyces cerevisiae* STA2 and MUC1 genes. *J. Bacteriol.*, 181, 6497-6508.

- Gagiano,M., van Dyk,D., Bauer,F.F., Lambrechts,M.G., and Pretorius,I.S. (1999b). Msn1p/Mss10p, Mss11p and Muc1p/Flo11p are part of a signal transduction pathway downstream of Mep2p regulating invasive growth and pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.*, 31, 103-116.
- Gancedo,J.M. (2001). Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 25, 107-123.
- Garcia,A., Cayla,X., Caudron,B., Deveaud,E., Roncal,F., and Rebollo,A. (2004). New insights in protein phosphorylation: a signature for protein phosphatase 1 interacting proteins. *C. R. Biol.*, 327, 93-97.
- Garcia-Gimeno,M.A., Muñoz,I., Ariño,J., and Sanz,P. (2003). Molecular characterization of Ypi1, a novel *Saccharomyces cerevisiae* type 1 protein phosphatase inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 278, 47744-47752.
- Garciadeblas,B., Rubio,F., Quintero,F.J., Banuelos,M.A., Haro,R., and Rodriguez-Navarro,A. (1993). Differential expression of two genes encoding isoforms of the ATPase involved in sodium efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, 236, 363-368.
- Garrett-Engle,P., Moilanen,B., and Cyert,M.S. (1995). Calcineurin, the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein phosphatase, is essential in yeast mutants with cell integrity defects and in mutants that lack a functional vacuolar H(+)-ATPase. *Mol. Cell Biol.*, 15, 4103-4114.
- Gaxiola,R., de Larrinoa,I.F., Villalba,J.M., and Serrano,R. (1992). A novel and conserved salt-induced protein is an important determinant of salt tolerance in yeast. *EMBO J.*, 11, 3157-3164.
- Gimeno,C.J., Ljungdahl,P.O., Styles,C.A., and Fink,G.R. (1992). Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell*, 68, 1077-1090.
- Gomez,M.J., Luyten,K., Onuhoa,C.N., and Ramos,J. (1994). Sodium tolerance depends on the capacity to transport potassium in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiol. (Praha)*, 39, 519-520.
- Goossens,A., de La,F.N., Forment,J., Serrano,R., and Portillo,F. (2000). Regulation of yeast H(+)-ATPase by protein kinases belonging to a family dedicated to activation of plasma membrane transporters. *Mol. Cell Biol.*, 20, 7654-7661.
- Gorlach,J., Fox,D.S., Cutler,N.S., Cox,G.M., Perfect,J.R., and Heitman,J. (2000). Identification and characterization of a highly conserved calcineurin binding protein, CBP1/calciopressin, in *Cryptococcus neoformans*. *EMBO J.*, 19, 3618-3629.
- Guo,B., Styles,C.A., Feng,Q., and Fink,G.R. (2000). A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A*, 97, 12158-12163.
- Gustin,M.C., Albertyn,J., Alexander,M., and Davenport,K. (1998). MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62, 1264-1300.
- Hardy,T.A. and Roach,P.J. (1993). Control of yeast glycogen synthase-2 by COOH-terminal phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 268, 23799-23805.
- Haro,R., Bañuelos,M.A., Quintero,F.J., Rubio,F., and Rodríguez-Navarro,A. (1993). Genetic basis of sodium exclusion and sodium tolerance in yeast. A model for plants. *Physiologia Plantarum*, 89, 868-874.
- Haro,R., Garcíadeblas,B., and Rodríguez-Navarro,A. (1991). A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett.*, 291, 189-191.

- Heath,V.L., Shaw,S.L., Roy,S., and Cyert,M.S. (2004). Hph1p and Hph2p, novel components of calcineurin-mediated stress responses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell*, 3, 695-704.
- Heinisch,J.J., Lorberg,A., Schmitz,H.P., and Jacoby,J.J. (1999). The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.*, 32, 671-680.
- Hernandez-Acosta,P., Schmid,D.G., Jung,G., Cullanez-Macia,F.A., and Kupke,T. (2002). Molecular characterization of the *Arabidopsis thaliana* flavoprotein AtHAL3a reveals the general reaction mechanism of 4'-phosphopantothienoylcysteine decarboxylases. *J. Biol. Chem.*, 277, 20490-20498.
- Hilioti,Z., Gallagher,D.A., Low-Nam,S.T., Ramaswamy,P., Gajer,P., Kingsbury,T.J., Birchwood,C.J., Levchenko,A., and Cunningham,K.W. (2004). GSK-3 kinases enhance calcineurin signaling by phosphorylation of RCNs. *Genes Dev.*, 18, 35-47.
- Hirata,D., Harada,S., Namba,H., and Miyakawa,T. (1995). Adaptation to high-salt stress in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by Ca^{2+} /calmodulin-dependent phosphoprotein phosphatase (calcineurin) and cAMP-dependent protein kinase. *Mol. Gen. Genet.*, 249, 257-264.
- Hisamoto,N., Sugimoto,K., and Matsumoto,K. (1994). The Glc7 type 1 protein phosphatase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for cell cycle progression in G2/M. *Mol. Cell Biol.*, 14, 3158-3165.
- Huang,D., Chun,K.T., Goebel,M.G., and Roach,P.J. (1996). Genetic interactions between REG1/HEX2 and GLC7, the gene encoding the protein phosphatase type 1 catalytic subunit in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 143, 119-127.
- Hughes,V., Muller,A., Stark,M.J., and Cohen,P.T. (1993). Both isoforms of protein phosphatase Z are essential for the maintenance of cell size and integrity in *Saccharomyces cerevisiae* in response to osmotic stress. *Eur. J. Biochem.*, 216, 269-279.
- Iida,H., Nakamura,H., Ono,T., Okumura,M.S., and Anraku,Y. (1994). MID1, a novel *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a plasma membrane protein, is required for Ca^{2+} influx and mating. *Mol. Cell Biol.*, 14, 8259-8271.
- Ingebritsen,T.S. and Cohen,P. (1983). Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. *Science*, 221, 331-338.
- Jeffery,C.J. (1999). Moonlighting proteins. *Trends Biochem. Sci.*, 24, 8-11.
- Jeffery,C.J. (2003). Moonlighting proteins: old proteins learning new tricks. *Trends Genet.*, 19, 415-417.
- Kafadar,K.A. and Cyert,M.S. (2004). Integration of stress responses: modulation of calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae* by protein kinase A. *Eukaryot. Cell*, 3, 1147-1153.
- Kafadar,K.A., Zhu,H., Snyder,M., and Cyert,M.S. (2003). Negative regulation of calcineurin signaling by Hrr25p, a yeast homolog of casein kinase I. *Genes Dev.*, 17, 2698-2708.
- Ketchum,K.A., Joiner,W.J., Sellers,A.J., Kaczmarek,L.K., and Goldstein,S.A. (1995). A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature*, 376, 690-695.
- Kim,M.D., Hong,S.P., and Carlson,M. (2005). Role of Tos3, a Snf1 protein kinase kinase, during growth of *Saccharomyces cerevisiae* on nonfermentable carbon sources. *Eukaryot. Cell*, 4, 861-866.

- Kinclova,O., Ramos,J., Potier,S., and Sychrova,H. (2001). Functional study of the *Saccharomyces cerevisiae* Nha1p C-terminus. *Mol. Microbiol.*, 40, 656-668.
- Kingsbury,T.J. and Cunningham,K.W. (2000). A conserved family of calcineurin regulators. *Genes Dev.*, 14, 1595-1604.
- Kinoshita,N., Ohkura,H., and Yanagida,M. (1990). Distinct, essential roles of type 1 and 2A protein phosphatases in the control of the fission yeast cell division cycle. *Cell*, 63, 405-415.
- Klein,C.J., Olsson,L., and Nielsen,J. (1998). Glucose control in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of Mig1 in metabolic functions. *Microbiology*, 144 (Pt 1), 13-24.
- Ko,C.H., Buckley,A.M., and Gaber,R.F. (1990). TRK2 is required for low affinity K⁺ transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 125, 305-312.
- Ko,C.H. and Gaber,R.F. (1991). TRK1 and TRK2 encode structurally related K⁺ transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, 11, 4266-4273.
- Kuchin,S., Vyas,V.K., and Carlson,M. (2002). Snf1 protein kinase and the repressors Nrg1 and Nrg2 regulate FLO11, haploid invasive growth, and diploid pseudohyphal differentiation. *Mol. Cell Biol.*, 22, 3994-4000.
- Kuchin,S., Vyas,V.K., and Carlson,M. (2003). Role of the yeast Snf1 protein kinase in invasive growth. *Biochem. Soc. Trans.*, 31, 175-177.
- Kuno,T., Tanaka,H., Mukai,H., Chang,C.D., Hiraga,K., Miyakawa,T., and Tanaka,C. (1991). cDNA cloning of a calcineurin B homolog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 180, 1159-1163.
- Kupke,T. (2001). Molecular characterization of the 4'-phosphopantothienylcysteine decarboxylase domain of bacterial Dfp flavoproteins. *J. Biol. Chem.*, 276, 27597-27604.
- Kupke,T., Hernandez-Acosta,P., and Culianez-Macia,F.A. (2003). 4'-phosphopantetheine and coenzyme A biosynthesis in plants. *J. Biol. Chem.*, 278, 38229-38237.
- Kupke,T., Hernandez-Acosta,P., Steinbacher,S., and Culianez-Macia,F.A. (2001). Arabidopsis thaliana flavoprotein AtHAL3a catalyzes the decarboxylation of 4'-Phosphopantothienylcysteine to 4'-phosphopantetheine, a key step in coenzyme A biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 276, 19190-19196.
- Kupke,T. and Schwarz,W. (2006). 4'-phosphopantetheine biosynthesis in archaea. *J. Biol. Chem.*, 281, 5435-5444.
- Kupke,T., Uebele,M., Schmid,D., Jung,G., Blaesse,M., and Steinbacher,S. (2000). Molecular characterization of lantibiotic-synthesizing enzyme EpiD reveals a function for bacterial Dfp proteins in coenzyme A biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 275, 31838-31846.
- Lamb,T.M. and Mitchell,A.P. (2003). The transcription factor Rim101p governs ion tolerance and cell differentiation by direct repression of the regulatory genes NRG1 and SMP1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, 23, 677-686.
- Lamb,T.M., Xu,W., Diamond,A., and Mitchell,A.P. (2001). Alkaline response genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the RIM101 pathway. *J. Biol. Chem.*, 276, 1850-1856.

- Lee,K.S., Hines,L.K., and Levin,D.E. (1993). A pair of functionally redundant yeast genes (PPZ1 and PPZ2) encoding type 1-related protein phosphatases function within the PKC1-mediated pathway. *Mol. Cell Biol.*, 13, 5843-5853.
- Lengeler,K.B., Davidson,R.C., D'souza,C., Harashima,T., Shen,W.C., Wang,P., Pan,X., Waugh,M., and Heitman,J. (2000). Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64, 746-785.
- Lesage,F., Guillemare,E., Fink,M., Duprat,F., Lazdunski,M., Romey,G., and Barhanin,J. (1996). A pH-sensitive yeast outward rectifier K⁺ channel with two pore domains and novel gating properties. *J. Biol. Chem.*, 271, 4183-4187.
- Liu,H., Krizek,J., and Bretscher,A. (1992). Construction of a GAL1-regulated yeast cDNA expression library and its application to the identification of genes whose overexpression causes lethality in yeast. *Genetics*, 132, 665-673.
- Lo,W.S. and Dranginis,A.M. (1996). FLO11, a yeast gene related to the STA genes, encodes a novel cell surface flocculin. *J. Bacteriol.*, 178, 7144-7151.
- Lo,W.S. and Dranginis,A.M. (1998). The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphae formation and invasion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*, 9, 161-171.
- Locke,E.G., Bonilla,M., Liang,L., Takita,Y., and Cunningham,K.W. (2000). A homolog of voltage-gated Ca(2+) channels stimulated by depletion of secretory Ca(2+) in yeast. *Mol. Cell Biol.*, 20, 6686-6694.
- Loeb,J.D., Kerentseva,T.A., Pan,T., Sepulveda-Becerra,M., and Liu,H. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* G1 cyclins are differentially involved in invasive and pseudohyphal growth independent of the filamentation mitogen-activated protein kinase pathway. *Genetics*, 153, 1535-1546.
- Ludin,K., Jiang,R., and Carlson,M. (1998). Glucose-regulated interaction of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 with the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95, 6245-6250.
- Madrid,R., Gomez,M.J., Ramos,J., and Rodriguez-Navarro,A. (1998). Ectopic potassium uptake in *trk1 trk2* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membrane potential. *J. Biol. Chem.*, 273, 14838-14844.
- Marquez,J.A. and Serrano,R. (1996). Multiple transduction pathways regulate the sodium-extrusion gene *PMR2/ENA1* during salt stress in yeast. *FEBS Lett.*, 382, 89-92.
- Matheos,D.P., Kingsbury,T.J., Ahsan,U.S., and Cunningham,K.W. (1997). Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.*, 11, 3445-3458.
- Matsumoto,T.K., Ellsmore,A.J., Cessna,S.G., Low,P.S., Pardo,J.M., Bressan,R.A., and Hasegawa,P.M. (2002). An osmotically induced cytosolic Ca²⁺ transient activates calcineurin signaling to mediate ion homeostasis and salt tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 277, 33075-33080.
- Mendizabal,I., Pascual-Ahuir,A., Serrano,R., and de Larrinoa,I.F. (2001). Promoter sequences regulated by the calcineurin-activated transcription factor Crz1 in the yeast *ENA1* gene. *Mol. Genet. Genomics*, 265, 801-811.

- Mendizabal,I., Rios,G., Mulet,J.M., Serrano,R., and de Larrinoa,I.F. (1998). Yeast putative transcription factors involved in salt tolerance. *FEBS Lett.*, 425, 323-328.
- Mendoza,I., Rubio,F., Rodriguez-Navarro,A., and Pardo,J.M. (1994). The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 269, 8792-8796.
- Merchan,S., Bernal,D., Serrano,R., and Yenush,L. (2004). Response of the *Saccharomyces cerevisiae* Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway to increases in internal turgor pressure caused by loss of Ppz protein phosphatases. *Eukaryot. Cell*, 3, 100-107.
- Mitsui,K., Ochi,F., Nakamura,N., Doi,Y., Inoue,H., and Kanazawa,H. (2004). A novel membrane protein capable of binding the Na⁺/H⁺ antiporter (Nha1p) enhances the salinity-resistant cell growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 279, 12438-12447.
- Mosch,H.U. and Fink,G.R. (1997). Dissection of filamentous growth by transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 145, 671-684.
- Mosch,H.U., Roberts,R.L., and Fink,G.R. (1996). Ras2 signals via the Cdc42/Ste20/mitogen-activated protein kinase module to induce filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A*, 93, 5352-5356.
- Moser,M.J., Geiser,J.R., and Davis,T.N. (1996). Ca²⁺-calmodulin promotes survival of pheromone-induced growth arrest by activation of calcineurin and Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase. *Mol. Cell Biol.*, 16, 4824-4831.
- Mulet,J.M., Leube,M.P., Kron,S.J., Rios,G., Fink,G.R., and Serrano,R. (1999). A novel mechanism of ion homeostasis and salt tolerance in yeast: the Hal4 and Hal5 protein kinases modulate the Trk1-Trk2 potassium transporter. *Mol. Cell Biol.*, 19, 3328-3337.
- Muller,E.M., Locke,E.G., and Cunningham,K.W. (2001). Differential regulation of two Ca²⁺ influx systems by pheromone signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 159, 1527-1538.
- Muñoz,I., Ruiz,A., Marquina,M., Barcelo,A., Albert,A., and Ariño,J. (2004). Functional characterization of the yeast Ppz1 phosphatase inhibitory subunit Hal3: a mutagenesis study. *J. Biol. Chem.*, 279, 42619-42627.
- Muñoz,I., Simon,E., Casals,N., Clotet,J., and Ariño,J. (2003). Identification of multicopy suppressors of cell cycle arrest at the G1-S transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 20, 157-169.
- Murguia,J.R., Belles,J.M., and Serrano,R. (1996). The yeast HAL2 nucleotidase is an in vivo target of salt toxicity. *J. Biol. Chem.*, 271, 29029-29033.
- Nakamura,T., Liu,Y., Hirata,D., Namba,H., Harada,S., Hirokawa,T., and Miyakawa,T. (1993). Protein phosphatase type 2B (calcineurin)-mediated, FK506-sensitive regulation of intracellular ions in yeast is an important determinant for adaptation to high salt stress conditions. *EMBO J.*, 12, 4063-4071.
- Nass,R., Cunningham,K.W., and Rao,R. (1997). Intracellular sequestration of sodium by a novel Na⁺/H⁺ exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane H⁺-ATPase. Insights into mechanisms of sodium tolerance. *J. Biol. Chem.*, 272, 26145-26152.
- Nass,R. and Rao,R. (1998). Novel localization of a Na⁺/H⁺ exchanger in a late endosomal compartment of yeast. Implications for vacuole biogenesis. *J. Biol. Chem.*, 273, 21054-21060.

- Paidhungat,M. and Garrett,S. (1997). A homolog of mammalian, voltage-gated calcium channels mediates yeast pheromone-stimulated Ca²⁺ uptake and exacerbates the cdc1(Ts) growth defect. *Mol. Cell Biol.*, 17, 6339-6347.
- Palecek,S.P., Parikh,A.S., and Kron,S.J. (2002). Sensing, signalling and integrating physical processes during *Saccharomyces cerevisiae* invasive and filamentous growth. *Microbiology*, 148, 893-907.
- Palmer,C.P., Zhou,X.L., Lin,J., Loukin,S.H., Kung,C., and Saimi,Y. (2001). A TRP homolog in *Saccharomyces cerevisiae* forms an intracellular Ca²⁺-permeable channel in the yeast vacuolar membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A*, 98, 7801-7805.
- Pan,X., Harashima,T., and Heitman,J. (2000). Signal transduction cascades regulating pseudohyphal differentiation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Opin. Microbiol.*, 3, 567-572.
- Pan,X. and Heitman,J. (1999). Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, 19, 4874-4887.
- Park,S.Y., Seo,S.B., Lee,S.J., Na,J.G., and Kim,Y.J. (2001). Mutation in PMR1, a Ca²⁺-ATPase in Golgi, confers salt tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by inducing expression of PMR2, an Na⁺-ATPase in plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, 276, 28694-28699.
- Park,S.H., Koh,S.S., Chun,J.H., Hwang,H.J., and Kang,H.S. (1999). Nrg1 is a transcriptional repressor for glucose repression of STA1 gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, 19, 2044-2050.
- Peng,Z.Y., Trumbly,R.J., and Reimann,E.M. (1990). Purification and characterization of glycogen synthase from a glycogen-deficient strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 265, 13871-13877.
- Persson,B.L., Petersson,J., Fristedt,U., Weinander,R., Berhe,A., and Pattison,J. (1999). Phosphate permeases of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and regulation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1422, 255-272.
- Portillo,F. (2000). Regulation of plasma membrane H⁺-ATPase in fungi and plants. *Biochim. Biophys. Acta*, 1469, 31-42.
- Portillo,F., Mulet,J.M., and Serrano,R. (2005). A role for the non-phosphorylated form of yeast Snf1: tolerance to toxic cations and activation of potassium transport. *FEBS Lett.*, 579, 512-516.
- Posas,F., Bollen,M., Stalmans,W., and Ariño,J. (1995a). Biochemical characterization of recombinant yeast PPZ1, a protein phosphatase involved in salt tolerance. *FEBS Lett.*, 368, 39-44.
- Posas,F., Camps,M., and Ariño,J. (1995b). The PPZ protein phosphatases are important determinants of salt tolerance in yeast cells. *J. Biol. Chem.*, 270, 13036-13041.
- Posas,F., Casamayor,A., and Ariño,J. (1993). The PPZ protein phosphatases are involved in the maintenance of osmotic stability of yeast cells. *FEBS Lett.*, 318, 282-286.
- Posas,F., Casamayor,A., Morral,N., and Ariño,J. (1992). Molecular cloning and analysis of a yeast protein phosphatase with an unusual amino-terminal region. *J. Biol. Chem.*, 267, 11734-11740.
- Prior,C., Potier,S., Souciet,J.L., and Sychrova,H. (1996). Characterization of the NHA1 gene encoding a Na⁺/H⁺-antiporter of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, 387, 89-93.

- Proft,M. and Serrano,R. (1999).** Repressors and upstream repressing sequences of the stress-regulated ENA1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*: bZIP protein Sko1p confers HOG-dependent osmotic regulation. *Mol. Cell Biol.*, 19, 537-546.
- Proft,M. and Struhl,K. (2004).** MAP kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction. *Cell*, 118, 351-361.
- Ramos,J., Alijo,R., Haro,R., and Rodriguez-Navarro,A. (1994).** TRK2 is not a low-affinity potassium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 176, 249-252.
- Ramos,J., Contreras,P., and Rodriguez-Navarro,A. (1985).** A potassium transport mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. 143, 88-93.
- Ramos,J., Haro,R., Alijo,R., and Rodriguez-Navarro,A. (1992).** Activation of the potassium uptake system during fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 174, 2025-2027.
- Reynolds,T.B. and Fink,G.R. (2001).** Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science*, 291, 878-881.
- Roberts,R.L. and Fink,G.R. (1994).** Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes Dev.*, 8, 2974-2985.
- Roberts,S.K., Fischer,M., Dixon,G.K., and Sanders,D. (1999).** Divalent cation block of inward currents and low-affinity K⁺ uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 181, 291-297.
- Robertson,L.S. and Fink,G.R. (1998).** The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 95, 13783-13787.
- Roy,A., Lu,C.F., Marykwas,D.L., Lipke,P.N., and Kurjan,J. (1991).** The AGA1 product is involved in cell surface attachment of the *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion glycoprotein a-agglutinin. *Mol. Cell Biol.*, 11, 4196-4206.
- Rudolph,H.K., Antebi,A., Fink,G.R., Buckley,C.M., Dorman,T.E., LeVitre,J., Davidow,L.S., Mao,J.I., and Moir,D.T. (1989).** The yeast secretory pathway is perturbed by mutations in PMR1, a member of a Ca²⁺ ATPase family. *Cell*, 58, 133-145.
- Rupp,S., Summers,E., Lo,H.J., Madhani,H., and Fink,G. (1999).** MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast FLO11 gene. *EMBO J.*, 18, 1257-1269.
- Sanz,P., Alms,G.R., Haystead,T.A., and Carlson,M. (2000).** Regulatory interactions between the Reg1-Glc7 protein phosphatase and the Snf1 protein kinase. *Mol. Cell Biol.*, 20, 1321-1328.
- Schwartz,M.A. and Madhani,H.D. (2004).** Principles of MAP kinase signaling specificity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.*, 38, 725-748.
- Serrano,R. (1988).** H⁺-ATPase from plasma membranes of *Saccharomyces cerevisiae* and *Avena sativa* roots: purification and reconstitution. *Methods Enzymol.*, 157, 533-544.
- Serrano,R. (1996).** Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int. Rev. Cytol.*, 165, 1-52.

- Serrano,R., Kielland-Brandt,M.C., and Fink,G.R. (1986). Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na⁺ + K⁺), K⁺- and Ca²⁺-ATPases. *Nature*, 319, 689-693.
- Serrano,R., Ruiz,A., Bernal,D., Chambers,J.R., and Ariño,J. (2002). The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium-mediated signalling. *Mol. Microbiol.*, 46, 1319-1333.
- Simon,E., Barcelo,A., and Ariño,J. (2003). Mutagenesis analysis of the yeast Nha1 Na⁺/H⁺ antiporter carboxy-terminal tail reveals residues required for function in cell cycle. *FEBS Lett.*, 545, 239-245.
- Simon,E., Clotet,J., Calero,F., Ramos,J., and Ariño,J. (2001). A screening for high copy suppressors of the sit4 hal3 synthetically lethal phenotype reveals a role for the yeast Nha1 antiporter in cell cycle regulation. *J. Biol. Chem.*, 276, 29740-29747.
- Spitzer,E.D., Jimenez-Billini,H.E., and Weiss,B. (1988). beta-Alanine auxotrophy associated with dfp, a locus affecting DNA synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 170, 872-876.
- Spitzer,E.D. and Weiss,B. (1985). dfp Gene of *Escherichia coli* K-12, a locus affecting DNA synthesis, codes for a flavoprotein. *J. Bacteriol.*, 164, 994-1003.
- Stathopoulos,A.M. and Cyert,M.S. (1997). Calcineurin acts through the CRZ1/TCN1-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes Dev.*, 11, 3432-3444.
- Stathopoulos-Gerontides,A., Guo,J.J., and Cyert,M.S. (1999). Yeast calcineurin regulates nuclear localization of the Crz1p transcription factor through dephosphorylation. *Genes Dev.*, 13, 798-803.
- Steinbacher,S., Hernandez-Acosta,P., Bieseler,B., Blaesse,M., Huber,R., Cullanez-Macia,F.A., and Kupke,T. (2003). Crystal structure of the plant PPC decarboxylase AtHAL3a complexed with an ene-thiol reaction intermediate. *J. Mol. Biol.*, 327, 193-202.
- Stralfors,P., Hiraga,A., and Cohen,P. (1985). The protein phosphatases involved in cellular regulation. Purification and characterisation of the glycogen-bound form of protein phosphatase-1 from rabbit skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.*, 149, 295-303.
- Strauss,E., Kinsland,C., Ge,Y., McLafferty,F.W., and Begley,T.P. (2001). Phosphopantothenoylcysteine synthetase from *Escherichia coli*. Identification and characterization of the last unidentified coenzyme A biosynthetic enzyme in bacteria. *J. Biol. Chem.*, 276, 13513-13516.
- Strauss,E., Zhai,H., Brand,L.A., McLafferty,F.W., and Begley,T.P. (2004). Mechanistic studies on phosphopantothenoylcysteine decarboxylase: trapping of an enethiolate intermediate with a mechanism-based inactivating agent. *Biochemistry*, 43, 15520-15533.
- Su,S.S. and Mitchell,A.P. (1993). Molecular characterization of the yeast meiotic regulatory gene RIM1. *Nucleic Acids Res.*, 21, 3789-3797.
- Sutton,A., Immanuel,D., and Arndt,K.T. (1991). The SIT4 protein phosphatase functions in late G1 for progression into S phase. *Mol. Cell Biol.*, 11, 2133-2148.
- Szoor,B., Feher,Z., Zeke,T., Gergely,P., Yatzkan,E., Yarden,O., and Dombradi,V. (1998). pzl-1 encodes a novel protein phosphatase- \bar{Z} -like Ser/Thr protein phosphatase in *Neurospora crassa*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1388, 260-266.

Teunissen,A.W., Holub,E., van der,H.J., van den Berg,J.A., and Steensma,H.Y. (1993). Sequence of the open reading frame of the FLO1 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 9, 423-427.

Teunissen,A.W. and Steensma,H.Y. (1995). Review: the dominant flocculation genes of *Saccharomyces cerevisiae* constitute a new subtelomeric gene family. *Yeast*, 11, 1001-1013.

Thevelein,J.M. and De Winde,J.H. (1999). Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.*, 33, 904-918.

Tilburn,J., Sarkar,S., Widdick,D.A., Espeso,E.A., Orejas,M., Mungroo,J., Penalva,M.A., and Arst,H.N., Jr. (1995). The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J.*, 14, 779-790.

Toda,T., Cameron,S., Sass,P., Zoller,M., and Wigler,M. (1987). Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell*, 50, 277-287.

Treitel,M.A. and Carlson,M. (1995). Repression by SSN6-TUP1 is directed by MIG1, a repressor/activator protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 92, 3132-3136.

Tu,J. and Carlson,M. (1994). The GLC7 type 1 protein phosphatase is required for glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, 14, 6789-6796.

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

Tzamarias,D. and Struhl,K. (1995). Distinct TPR motifs of Cyc8 are involved in recruiting the Cyc8-Tup1 corepressor complex to differentially regulated promoters. *Genes Dev.*, 9, 821-831.

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

van Dyk,D., Pretorius,I.S., and Bauer,F.F. (2004). Mss11p is a central element of the regulatory network that controls FLO11 expression and invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*.

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

Verstrepen,K.J., Derdelinckx,G., Verachtert,H., and Delvaux,F.R. (2003). Yeast flocculation: what brewers should know. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 61, 197-205.

Viladevall,L., Serrano,R., Ruiz,A., Domenech,G., Giraldo,J., Barcelo,A., and Ariño,J. (2004). Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 279, 43614-43624.

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

Vyas,V.K., Kuchin,S., Berkey,C.D., and Carlson,M. (2003). Snf1 kinases with different beta-subunit isoforms play distinct roles in regulating haploid invasive growth. *Mol. Cell Biol.*, 23, 1341-1348.

Vyas,V.K., Kuchin,S., and Carlson,M. (2001). Interaction of the repressors Nrg1 and Nrg2 with the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 158, 563-572.

Wek,R.C., Cannon,J.F., Dever,T.E., and Hinnebusch,A.G. (1992). Truncated protein phosphatase GLC7 restores translational activation of GCN4 expression in yeast mutants defective for the eIF-2 alpha kinase GCN2. *Mol. Cell Biol.*, 12, 5700-5710.

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

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

Withee,J.L., Mulholland,J., Jeng,R., and Cyert,M.S. (1997). An essential role of the yeast pheromone-induced Ca²⁺ signal is to activate calcineurin. *Mol. Biol. Cell*, 8, 263-277.

Wright,M.B., Ramos,J., Gomez,M.J., Moulder,K., Scherrer,M., Munson,G., and Gaber,R.F. (1997). Potassium transport by amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 272, 13647-13652.

Yenush,L., Merchan,S., Holmes,J., and Serrano,R. (2005). pH-Responsive, Posttranslational Regulation of the Trk1 Potassium Transporter by the Type 1-Related Ppz1 Phosphatase. *Mol. Cell Biol.*, 25, 8683-8692.

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

Yonamine,I., Yoshida,K., Kido,K., Nakagawa,A., Nakayama,H., and Shinmyo,A. (2004). Overexpression of NtHAL3 genes confers increased levels of proline biosynthesis and the enhancement of salt tolerance in cultured tobacco cells. *J. Exp. Bot.*, 55, 387-395.

Yoshimoto,H., Saltsman,K., Gasch,A.P., Li,H.X., Ogawa,N., Botstein,D., Brown,P.O., and Cyert,M.S. (2002). Genome-wide analysis of gene expression regulated by the calcineurin/Crz1p signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 277, 31079-31088.

Zhang,N., Osborn,M., Gitsham,P., Yen,K., Miller,J.R., and Oliver,S.G. (2003). Using yeast to place human genes in functional categories. *Gene*, 303, 121-129.

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

Zhou,H. and Winston,F. (2001). NRG1 is required for glucose repression of the SUC2 and GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC. Genet.*, 2, 5.

Zhou,X.L., Vaillant,B., Loukin,S.H., Kung,C., and Saimi,Y. (1995). YKC1 encodes the depolarization-activated K⁺ channel in the plasma membrane of yeast. *FEBS Lett.*, 373, 170-176.

ARTÍCULOS

Regulation of *ENA1* Na⁺-ATPase Gene Expression by the Ppz1 Protein Phosphatase Is Mediated by the Calcineurin Pathway

Amparo Ruiz,¹ Lynne Yenush,² and Joaquín Ariño^{1*}

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Barcelona,¹ and Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Universidad Politécnica de Valencia-CSIC, Valencia,² Spain

Received 9 June 2003/Accepted 22 July 2003

Saccharomyces cerevisiae strains lacking the Ppz1 protein phosphatase are salt tolerant and display increased expression of the *ENA1* Na⁺-ATPase gene, a major determinant for sodium extrusion, while cells devoid of the similar Ppz2 protein do not show these phenotypes. However, a *ppz1 ppz2* mutant displays higher levels of *ENA1* expression than the *ppz1* strain. We show here that the increased activity of the *ENA1* promoter in a *ppz1 ppz2* mutant maps to two regions: one region located at –751 to –667, containing a calcineurin-dependent response element (CDRE), and one downstream region (–573 to –490) whose activity responds to intracellular alkalization. In contrast, the increased *ENA1* expression in a *ppz1* mutant is mediated solely by an intact calcineurin/Crz1 signaling pathway, on the basis that (i) this effect maps to a single region that contains the CDRE and (ii) it is blocked by the calcineurin inhibitor FK506, as well as by deletion of the *CNB1* or *CRZ1* gene. The calcineurin dependence of the increased *ENA1* expression of a *ppz1* mutant would suggest that Ppz1 could negatively regulate calcineurin activity. In agreement with this notion, a *ppz1* strain is calcium sensitive, and this mutation does not result in a decrease in the calcium hypertolerance of a *cnb1* mutant. It has been shown that *ENA1* can be induced by alkalization of the medium and that a *ppz1 ppz2* strain has a higher intracellular pH. However, we present several lines of evidence that show that the gene expression profile of a *ppz1* mutant does not involve an alkalization effect. In conclusion, we have identified a novel role for calcineurin, but not alkalization, in the control of *ENA1* expression in *ppz1* mutants.

The *Saccharomyces cerevisiae* Ppz phosphatases are encoded by the *PPZ1* and *PPZ2* genes (21, 37, 38), and they are characterized by a catalytic carboxyl-terminal half related to type 1 phosphatases and an amino-terminal extension. The catalytic moieties of the two proteins are very similar (92%). In contrast, the sequences of the amino-terminal halves are much less related. These phosphatases are involved in a variety of cell processes, including regulation of salt tolerance (39), maintenance of cell wall integrity (26, 37), and regulation of the cell cycle at the G₁/S transition (5, 6). In all cases, the function of Ppz1 appears to be more important than that of Ppz2. For instance, a *ppz1* deletion mutant is tolerant to high concentrations of sodium or lithium cations, while a *ppz2* mutant is not. However, the *ppz1 ppz2* double mutant is more tolerant than the *ppz1* single mutant (39). Genetic and biochemical evidence has identified the halotolerant determinant Hal3, also known as Sis2 (12, 13), as a negative regulatory subunit of Ppz1 (11). Therefore, overexpression of Hal3 results in increased salt tolerance. Hal3 binds to the carboxy-terminal catalytic moiety of Ppz1, thus modulating the diverse physiological functions of the phosphatase. No evidence of Hal3 interaction with Ppz2 has been reported so far.

In *S. cerevisiae*, the *ENA1* gene plays an important role in salt tolerance. This gene encodes a P-type Na⁺-ATPase that represents the most important element for the efflux of Na⁺

and Li⁺. Consequently, an *ena1* mutant is highly sensitive even to low concentrations of Na⁺ or Li⁺ (14). The *ENA1* gene is barely expressed under standard growth conditions, but it is strongly induced by exposure to high salt concentrations and to an alkaline pH. This transcriptional response of *ENA1* is based on a complex regulation of its promoter (28). Expression of *ENA1* is repressed by the presence of glucose in the medium (2), through a mechanism that involves the general repressor complex Mig1-Ssn6-Tup1 (40). Saline induction is mediated by two pathways: the Hog1 mitogen-activated protein kinase pathway and the calcineurin pathway. The Hog1 pathway responds to increased osmolarity and acts through the Sko1 transcriptional inhibitor (40), which binds to a cyclic AMP response element present in the *ENA1* promoter.

The Ca²⁺-calmodulin-activated protein phosphatase calcineurin is structurally and functionally conserved from yeast to humans. The enzyme is a heterodimer composed of a catalytic A subunit and a regulatory B subunit. In *S. cerevisiae*, the catalytic subunit is encoded by two genes (*CNA1* and *CNA2*), while a single gene (*CNB1*) codes for the regulatory subunit (9, 10, 24, 27, 48). Calcineurin regulates *ENA1* transcription in response to sodium and lithium toxicity by dephosphorylating and activating the transcriptional activator Crz1/Tcn1/Hal8 (29, 31, 44), which binds specific DNA sequences known as calcineurin-dependent response elements (CDRE). Two such elements are present in the *ENA1* promoter, at positions –813 to –821 and –727 to –719; the downstream element is more relevant for the transcriptional response under stress conditions (30). The function of calcineurin can be regulated by a conserved family of proteins termed calcipressins, which are represented in *S. cerevisiae* by a single gene known as *RCN1*.

* Corresponding author. Mailing address: Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Veterinària, Ed. V, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Barcelona, Spain. Phone: 34-93-5812182. Fax: 34-93-5812006. E-mail: Joaquin.Ariño@uab.es.

Interestingly, although it seems clear that Rcn1 binds and inhibits calcineurin, it is not evident whether this protein acts as a regulator of calcineurin or as a downstream effector of the phosphatase (17, 23). Recently, a role for the TOR (target of rapamycin) pathway in the regulation of *ENAI* expression through the Gln3 and Gat1 transcription factors has been documented (7).

The transcriptional response of *ENAI* to an alkaline pH is also rather complex and not yet fully understood. Although the effect of a high pH on *ENAI* induction was described about 10 years ago (14, 33), only recently has a report (43) addressed the molecular basis of this effect and identified two responsive regions (ARR1 and ARR2) in the *ENAI* promoter. ARR1 maps to the downstream CDRE and is responsible for the calcineurin-dependent component of the response. ARR2 spans nucleotides -573 to -490 and integrates Rim101-dependent and -independent inputs. A very recent report has suggested that Rim101 may inhibit the function of the Nrg1 transcription factor, which in turn would negatively regulate the *ENAI* promoter (25).

The early observation that a *ppz1 ppz2* mutant showed increased expression of the *ENAI* gene (39) provided a reasonable explanation for the observed salt-tolerant phenotype. However, it has been shown very recently that a *ppz1 ppz2* mutant strain displays an augmented intracellular pH and, under NaCl stress conditions, a higher-than-normal intracellular potassium content. This is likely the result of an inhibitory role of the Ppz phosphatases on the Trk1/Trk2 potassium transporters, and it may explain most of the phenotypes observed in cells lacking both phosphatase genes (49). Despite the evident link between lack of Ppz phosphatases and Trk function, a number of important issues remain to be resolved. For instance, there was evidence that deletion of both *PPZ* phosphatases in a *trk1 trk2* background still produced a detectable increase in salt tolerance (49), suggesting that Trk-independent mechanisms may exist. In addition, since the saline tolerances of *ppz1* and *ppz2* mutants are not equivalent, it was important to evaluate the relative contributions of the two gene products to this phenotype.

The fact that the *ENAI* ATPase gene is a major determinant for salt tolerance prompted us to investigate how the absence of Ppz1, Ppz2, or both phosphatases affects *ENAI* expression. In this report we present a detailed dissection of the relative contributions of the Ppz phosphatases to the regulation of *ENAI*, providing evidence that Ppz1 negatively controls *ENAI* expression through mechanisms that involve calcineurin but not intracellular alkalinization.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strains and growth conditions. Yeast cells were grown at 28°C in YPD medium (containing, per liter, 10 g of yeast extract, 20 g of peptone, and 20 g of dextrose) or, when indicated, in synthetic minimal (SD) or complete minimal (CM) medium (1). The relevant genotypes of the strains described in this work are given in Table 1. Sensitivity to LiCl and NaCl was monitored essentially as in reference 39.

Gene disruptions and plasmids. Disruption of the *PPZ1* gene with the *URA3* marker was carried out as in reference 38. Deletion of this gene with the *TRP1* marker was performed as follows. Plasmid pYC2Z1 (6) was digested with *Bam*HI/*Hind*III, and the 1.6-kbp insert was cloned into the same sites of plasmid pGEM-3Z (Promega). This construct was then digested with *Sal*I/*Stu*I, and the DNA fragment released was replaced with a 0.85-kbp *TRP1* marker, previously released from plasmid YDp-W (4) by digestion with *Sal*I/*Sma*I. The disruption

TABLE 1. *S. cerevisiae* strains used in this work

Strain	Relevant genotype	Source or reference
DBY746	<i>MATα ura3-52 leu2-3, 112 his3-Δ1 trp1-Δ239</i>	D. Botstein
EDN2	DBY746 <i>ppz1::TRP1</i>	This work
EDN85	DBY746 <i>ppz1::TRP1 ppz2::KAN</i>	This work
MAR55	DBY746 <i>ppz2::TRP1</i>	This work
MAR15	DBY746 <i>cnb1::KAN</i>	43
EDN92	DBY746 <i>crz1::KAN</i>	43
MAR18	DBY746 <i>crz1::KAN ppz1::URA3</i>	This work
MAR19	DBY746 <i>cnb1::KAN ppz1::URA3</i>	This work
EDN308	DBY746 <i>crz1::KAN ppz1::TRP1</i>	This work
MAR40	DBY746 <i>cnb1::KAN ppz1::TRP1</i>	This work
ESV212	DBY746 <i>trk1::LEU2 trk2::HIS3</i>	This work
MAR37	DBY746 <i>ppz1::TRP1 trk1::LEU2 trk2::HIS3</i>	This work
RSC25	DBY746 <i>rcn1::KAN</i>	This work
MAR39	DBY746 <i>ppz1::TRP1 rcn1::KAN</i>	This work
MAR43	DBY746 <i>mck1::KAN</i>	This work
MAR46	DBY746 <i>ppz1::TRP1 mck1::KAN</i>	This work
JA100	<i>MATα ura3-52 leu2-3, 112 his4 trp1-1 can-1^r</i>	11
EDN75	JA100 <i>ppz1::KAN</i>	11
JA-103	JA100 <i>ppz2::TRP1</i>	6
EDN76	JA100 <i>ppz1::KAN ppz2::TRP1</i>	This work

cassette was then digested with *Sac*I, and the 1.3-kbp fragment was used for yeast transformation. This strategy removes most of the Ppz1 protein (from residue 1 to residue 547). Deletion of *PPZ2* with a *TRP1* marker was performed as described by Clotet et al. (6). To disrupt the *PPZ2* gene with the KanMX marker, a 2.2-kbp *Bam*HI/*Bam*HI fragment of the gene was cloned into pUC18 and then digested with *Hpa*I and *Bgl*II to remove approximately 1.5 kbp corresponding to a small fragment of the 5' untranslated region plus the first 460 codons. This fragment was replaced by the KanMX marker, obtained by digestion of plasmid pFA6-kanMX4 (45) with *Bgl*II and *Eco*RV. The final construct was then cleaved by *Bam*HI, and the insert was used to transform yeast cells. Disruptions of *CNB1* and *CRZ1* with the *KAN* marker have been described previously (43). The *TRK1* and *TRK2* genes were disrupted with the *LEU2* and *HIS3* markers, respectively, by using deletion cassettes described previously (20). Strains carrying deletions of the *RCN1* and *MCK1* genes were generated as follows. Deletion cassettes were amplified by PCR from genomic DNA prepared from *rcn1::KanMX* and *mck1::KanMX* deletion mutants in the BY4741 background (46). The oligonucleotides used spanned nucleotides -842 to +746 (*RCN1*) and -467 to +1782 (*MCK1*). Positions are relative to the initiating ATG codon. The amplification fragments were purified and used to transform the desired strains.

For high-copy expression of *HAL3*, the gene was recovered from plasmid YEep351-HAL3 (13) by digestion with *Eco*RI/*Hind*III and cloned into these sites of plasmid YEplac181 (16).

β -Galactosidase reporter constructs and assays. Plasmid pKC201, containing the entire promoter of *ENAI*, has been described previously (2, 8). The pMP and pMR series, containing defined fragments of the *ENAI* promoter, have also been described previously (40, 43). pMRK211 was constructed similarly to pMRK212 and pMRK213 (43). Plasmid pLA, a gift from I. Fernandez de Larrinoa (Universidad del Pais Vasco, San Sebastián, Spain), contains the -732-to-711 sequence of the *ENAI* promoter, corresponding to the high-affinity Crz1-binding element (30), and derives from plasmid pLG Δ 312s (19). Plasmid pAMS366 contains four copies in tandem of the wild-type CDRE present in the *FKS2* promoter, while pAMS364 contains a mutated version that cannot bind Crz1 (44). The construction of pPHO84-LacZ, pPHO89-LacZ, and pPHO12-LacZ has been described previously (43). Plasmids pFRE1-LacZ, pTRR1-LacZ, and pFIT2-LacZ were constructed by PCR amplification of the -792-to-+73, -758-to-+82, and -695-to-+82 regions of the respective genes, which were cloned into the *Eco*RI/*Hind*III sites of plasmid YEep357 (34). Plasmid pSIT1-LacZ was constructed by cloning the -786-to-+52 region of *SIT1* into the *Eco*RI/*Sal*I site of YEep357. In all cases, cloning resulted in translational fusions with the β -galactosidase gene.

The levels of expression driven by the various promoters tested (as well as by specific CDRE) in different mutant backgrounds were determined by using β -galactosidase reporter constructs as follows. Yeast cells were transformed with the desired plasmids, and positive clones were grown in selective medium (lacking uracil) to an A_{660} of 1.5 to 2.0. These cultures were used to inoculate YPD medium (2.5 ml), and growth was resumed until an A_{660} of 0.6 to 0.8 was reached

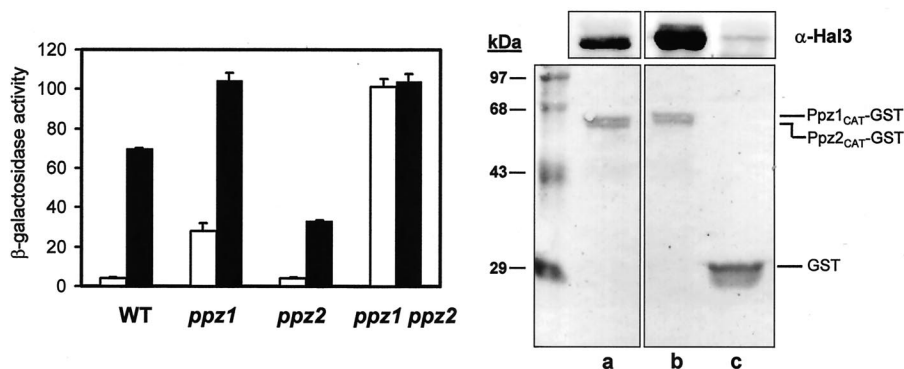


FIG. 1. Effects of overexpression of Hal3 on *ENAI* expression in different Ppz backgrounds. (Left) Strains JA100 (wild type [WT]), EDN75 (*ppz1*), JA103 (*ppz2*), and EDN76 (*ppz1 ppz2*) bearing plasmid pKC201 (2), which encodes the β -galactosidase reporter gene fused to the *ENAI* promoter, were transformed with the high-copy-number plasmid YEplac181 carrying no insert (open bars) or the same plasmid carrying the entire *HAL3* gene. Cells were grown as described in Materials and Methods, and β -galactosidase activity was measured. Data are means \pm standard errors of the means from three to nine independent clones. (Right) The catalytic domains of both Ppz1 and Ppz2 were purified from *E. coli* as GST fusion proteins. Approximately 3 μ g of purified protein was then used as an affinity resin to copurify Hal3 from crude yeast extracts. The material retained by the resin after extensive washing was then separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to a nitrocellulose membrane, and probed with antibodies specific for Hal3. The bottom panel shows the Ponceau S staining of the membrane, as a control for protein loading. The upper panel shows the result of Western blot analysis with Hal3-specific antibodies. Lane a, Hal3 purified by using the catalytic domain of Ppz2; lane b, Hal3 purified by using the catalytic domain of Ppz1). No Hal3 was detected by using GST alone as an affinity resin (lane c).

(approximately 5 h). When sensitivity to FK506 was tested, YPD medium was made 1.5 μ g/ml FK506 from a 10-mg/ml stock solution of the drug (in 90% ethanol–10% Tween P-20 [vol/vol]). Control cells were exposed only to the vehicle. Cells were recovered by centrifugation, and β -galactosidase assays were performed as described previously (41). The sensitivity to ambient pH of the response of the ARR1 and ARR2 elements of the *ENAI* promoter was determined essentially as described previously (43).

In vitro binding experiments. Interaction experiments were performed essentially as described previously (11). The construction of the glutathione *S*-transferase (GST) fusion protein containing the catalytic moiety (amino acids 345 to 692) of Ppz1 (Ppz1CAT-GST) has been documented previously (6). The catalytic domain (amino acids 379 to 710) of Ppz2 (Ppz2CAT) was cloned by PCR from genomic DNA using primers 5' ATATCTAGATAGGACTAATACTATGGTCGA and 3' ATAATAGTCGACTCAGCGATTGGCTAATTTAC. The resulting PCR product was then digested with *Xba*I and *Sal*I and was subcloned into the pGEX-KG vector (18). The yeast strain (LY127) used as a source of Hal3 has been described previously (49).

Intracellular cation measurements. Intracellular sodium and potassium concentrations were determined essentially as described previously (3). Briefly, YPD medium containing 0.3 M sodium chloride was inoculated with the different strains, and growth was resumed until an optical density at 660 nm (OD_{660}) of 0.9 to 1.0 was reached. Cells were recovered by filtration and washed with a 0.6 M sorbitol solution containing 10 mM magnesium chloride, and extracts were prepared by boiling for 30 min. Extracts were centrifuged for 1 min at 10,000 \times g, and the concentrations of the cations were measured in the supernatants by flame spectroscopy.

RESULTS

The Hal3-dependent regulation of *ENAI* expression is mediated by both Ppz1 and Ppz2 phosphatases. Hal3 was identified some time ago as a negative regulatory subunit of Ppz1. To characterize the relative influences of Ppz1 and Ppz2 phosphatases on *ENAI* expression, we first compared the effects of high-copy expression of Hal3 on the expression of the ATPase gene in wild-type cells and cells deficient in Ppz1, Ppz2, or both phosphatases. As shown in Fig. 1, overexpression of Hal3 in wild-type cells resulted in increased *ENAI* expression. When Hal3 was overexpressed in *ppz1* cells, the activity of the *ENAI* promoter reached virtually the same level as that observed in a

ppz1 ppz2 strain carrying an empty plasmid. Interestingly, expression of *ENAI* did not increase further when Hal3 was overexpressed in the *ppz1 ppz2* double mutant. A *ppz2* mutant did not show altered *ENAI* expression, and in this background, overexpression of Hal3 produced a level of activity of the *ENAI* promoter almost identical to that observed in a *ppz1* strain bearing an empty plasmid. These results indicated that Hal3 influences both Ppz1 and Ppz2 functions. To confirm the possibility of Ppz2 being a target for Hal3, the catalytic domains of both Ppz1 and Ppz2 were purified from *Escherichia coli* as GST fusion proteins and used as an affinity system to purify Hal3 from crude yeast extracts. As shown in Fig. 1, Hal3 was retained in similar amounts by Ppz1 and Ppz2, proving that Hal3 is able to interact in vitro with both phosphatases.

The increased *ENAI* expression of a *ppz1* mutant functionally maps to a CDRE and depends on an intact calcineurin-signaling pathway. The *ENAI* promoter is rather complex and is able to respond to different stimuli. We have analyzed the levels of expression in wild-type, *ppz1*, and *ppz1 ppz2* cells by using a number of reporter constructs that allow functional mapping of this promoter. As shown in Fig. 2, the increased *ENAI* expression characteristic of a *ppz1* mutant could be detected in all constructs including the -751 -to- -667 region, which contains the downstream CDRE defined for this promoter, but not in those lacking this element. In addition, incubation of the cells with the calcineurin inhibitor FK506 reduced the activity of the promoter in the *ppz1* mutant to the levels observed in wild-type cells. Interestingly, when the same experiments were performed with a *ppz1 ppz2* mutant, expression levels from the full promoter increased twofold and were reduced only partially after addition of FK506. As observed, the FK506-inhibitable expression fully maps to the -751 -to- -667 region. In contrast, the non-FK506-inhibitable component maps to a downstream region, delimited by nucleotides

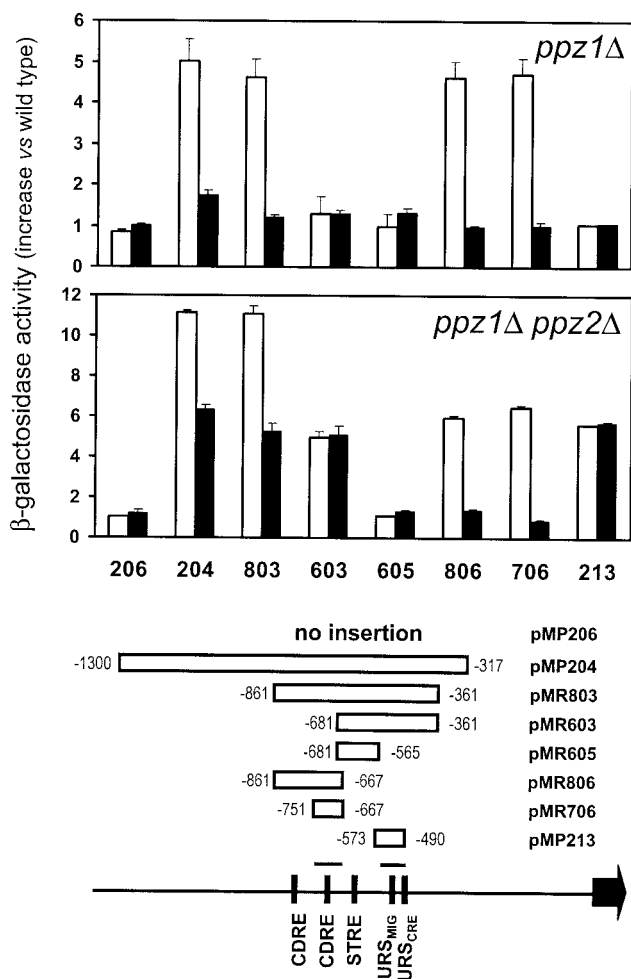


FIG. 2. Mapping the activity of the *ENA1* promoter in *ppz1* and *ppz1 ppz2* mutants. Strains JA100 (wild type), EDN75 (*ppz1*), and EDN76 (*ppz1 ppz2*) were transformed with the indicated constructs. (Bottom) Relevant regulatory elements described in the main text are schematically depicted. Rectangles represent the fragments of the *ENA1* promoter contained in the constructs, and numbers indicate their relative nucleotide positions (from the initiating Met codon). (Top) Data represent the ratio of β -galactosidase activity between each mutant and the isogenic wild-type strain in the absence (open bars) or presence (solid bars) of 1.5 μ g of FK506/ml. Each data point corresponds to the mean \pm standard error of the mean from three to nine independent clones.

–573 and –490. The level of expression driven from this region was not increased at all in a *ppz2* mutant.

The results described above suggested that the increased *ENA1* expression of a *ppz1* mutant was fully dependent on the existence of a functional calcineurin pathway. Consequently, we show (Fig. 3, left) that this increase in expression was completely abolished in a strain lacking the *CNB1* gene, which encodes the regulatory subunit of calcineurin. It is accepted that most, if not all, of the transcriptional response triggered by activation of calcineurin appears to be mediated by the transcriptional factor Crz1. As shown, lack of Ppz1 did not result in increased *ENA1* expression in a *crz1* mutant, providing additional support to the idea that the Ppz1-dependent effect on *ENA1* promoter activity requires an intact calcineurin/Crz1-

signaling pathway. Furthermore, expression driven exclusively by a synthetic sequence reproducing the CDRE found at positions –732 to –711 of the *ENA1* promoter was also increased in a *ppz1* strain (Fig. 3, right), and this increase was fully dependent on the presence of Crz1 (data not shown). Finally, we found that expression from the pAMS366 construct, which contains four tandem copies of the CDRE found in the calcium-responsive gene *FKS2*, was also increased in a *ppz1* mutant. This increase, however, was not detected when a mutated version of the *FKS2* CDRE (pAMS364), unable to bind Crz1 (44), was used (Fig. 3, right). The levels of expression driven from these chimeric promoters were only slightly increased by further deletion of the *PPZ2* phosphatase gene in a *ppz1* background.

Cation tolerance and *ENA1* gene expression analysis of strains lacking Ppz phosphatases and components of the calcineurin pathway. These results suggested that a *ppz1* strain may have an activated calcineurin pathway, and they were compatible with the notion of Ppz1 acting as a negative regulator of calcineurin. Accordingly, we observed that *ppz1* and *ppz1 ppz2* mutants were more sensitive to addition of exogenous CaCl_2 than the wild-type strain (Fig. 4A). Because deletion of *CNB1* in an otherwise wild-type background has been shown to confer calcium tolerance (47), we tested whether lack of *ppz1* affected this tolerance. We observed that a strain lacking Ppz1 and Cnb1 displayed a tolerance identical to that of a *cnb1* single mutant, demonstrating that Ppz1 is not required for this tolerance and lending further support to the idea that Ppz1 may act upstream of calcineurin. We next examined the salt tolerance phenotypes of strains lacking the Ppz1 phosphatase and components of the calcineurin pathway. As shown in Fig. 4B, we observed a decrease in the salt tolerance of the *ppz1* mutant upon further removal of either *CNB1* or its downstream transcription factor, *CRZ1*. Mutation of the *CNB1* gene in a *ppz1* background has more pronounced effects in terms of salt tolerance, as expected, since calcineurin is known to have cellular effects independent of Crz1.

Because Rcn1 has been reported as a protein that is able to interact with calcineurin and regulate its function, we were interested in evaluating whether the lack of Rcn1 could affect the level of expression of *ENA1* in a *ppz1* mutant. To this end, the *RCN1* gene was disrupted in wild-type and *ppz1* backgrounds, and the resulting strains were transformed with the *ENA1*-LacZ reporter pKC201. As shown in Fig. 5, in the absence of Rcn1, expression from the *ENA1* promoter was almost unaffected. We also tested the effect of disrupting *MCK1*, a gene encoding one of the four putative yeast homologs of glycogen synthase kinase-3, which has recently been postulated to be an upstream activator of calcineurin (K. Cunningham, personal communication). Interestingly, mutation of *MCK1* fully abolished the increased *ENA1* expression of the *ppz1* mutant (Fig. 5). The *mck1* mutant displayed a tolerance to high calcium concentrations virtually identical to that of a *cnb1* strain, and this tolerance was not decreased by deletion of *PPZ1* (data not shown).

The increased *ENA1* expression of a *ppz1* mutant is likely not due to intracellular alkalization. Recent evidence (49) has shown that the absence of both Ppz1 and Ppz2 results in an increased intracellular pH and that this increase is quantitatively similar to the transient rise in the intracellular pH ob-

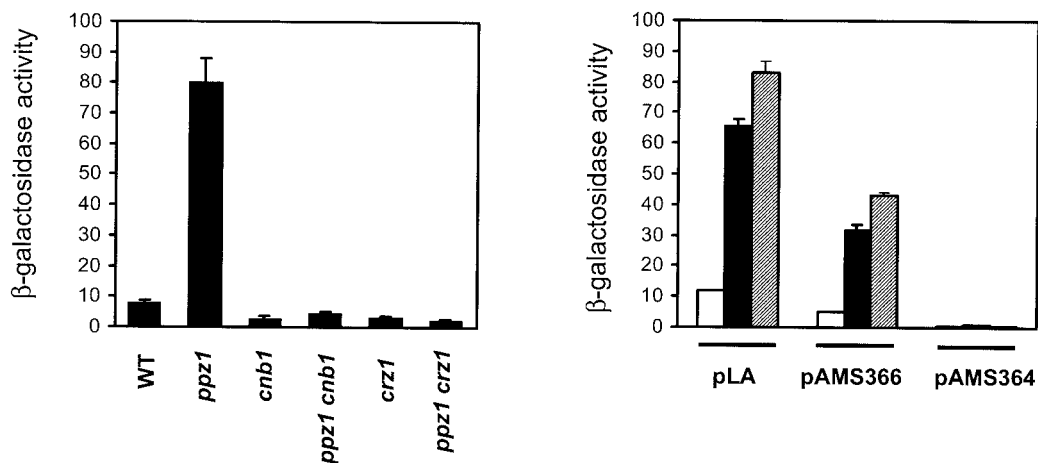


FIG. 3. Regulation of *ENA1* expression by Ppz1 requires the integrity of the calcineurin-Crz1 pathway. (Left) Strain DBY746 (wild type [WT]) and the indicated isogenic derivatives were transformed with plasmid pKC201, and β -galactosidase activity was measured. Data are means \pm standard errors of the means from 6 to 12 independent clones. (Right) Strains DBY746 (wild type) (open bars), EDN2 (*ppz1*) (filled bars), and EDN85 (*ppz1 ppz2*) (hatched bars) were transformed with plasmid pLA (containing the -732-to-711 CDRE found in the *ENA1* promoter as the only regulatory element), pAMS366 (bearing the wild-type CDRE found in the *FKS2* promoter), or pAMS364 (bearing a mutated, nonfunctional version of the CDRE in pAMS366). Data are means \pm standard errors of the means of β -galactosidase activities measured from three to nine independent clones.

served after shifting of a standard yeast culture to pH 5.8 to 8.5. Because it is known that expression from the *ENA1* promoter is substantially enhanced by exposure of cells to a high pH, it can be postulated that the increase in *ENA1* expression found in the *ppz1 ppz2* double mutant is due to intracellular alkalinization. In this context, it was reasonable to ask whether the higher *ENA1* expression characteristic of a *ppz1* mutant, which we have now observed to be calcineurin dependent, could also be influenced by intracellular pH.

To test this hypothesis, we first compared the expression of four different genes known to be induced by exposure of cells

to an alkaline environment (*ENA1*, *PHO84*, *PHO89*, and *PHO12*) in wild-type, *ppz1*, *ppz2*, and *ppz1 ppz2* strains, both in the presence and in the absence of the calcineurin inhibitor FK506. Interestingly, as documented in Fig. 6, while *ENA1* promoter activity (plasmid pKC201) was increased in *ppz1* and *ppz1 ppz2* cells, expression of *PHO84* and *PHO12* was increased only in the *ppz1 ppz2* double mutant and was not affected by the presence of the drug FK506. A remarkable observation was that the expression of *PHO89* was also increased in a single *ppz1* mutant (but not in a *ppz2* strain), and this increase was fully abolished by exposure of the cells to

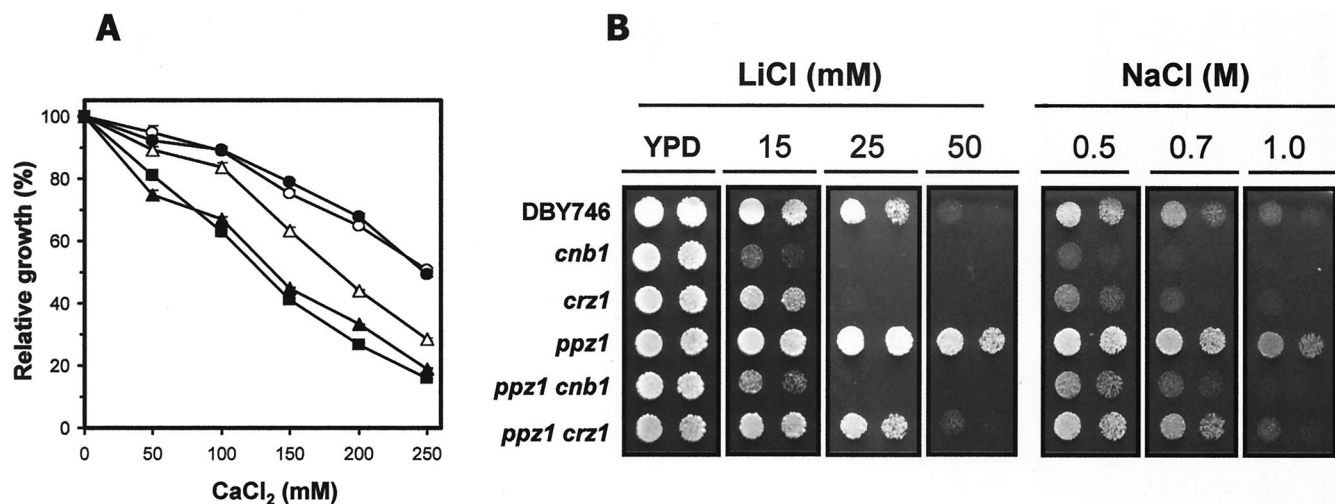


FIG. 4. Effects on tolerance to calcium, lithium, and sodium ions of mutation of *CNB1* and *CRZ1* in a *ppz1* background. (A) Strains DBY746 (wild type) (Δ), EDN2 (*ppz1*) (\blacktriangle), EDN85 (*ppz1 ppz2*) (\blacksquare), MAR15 (*cnb1*) (\circ), and MAR19 (*ppz1 cnb1*) (\bullet) were tested for growth in liquid cultures at the indicated concentrations of $CaCl_2$. Data are expressed as the percentage of growth relative to that in cultures without added salt. Each data point is the mean \pm standard error of the mean from four independent cultures. (B) Cultures (OD_{660} , 0.05 and 0.01) of the indicated strains were spotted onto YPD plates containing the indicated concentrations of LiCl or NaCl. Growth was monitored after incubation at 28°C for 60 h.

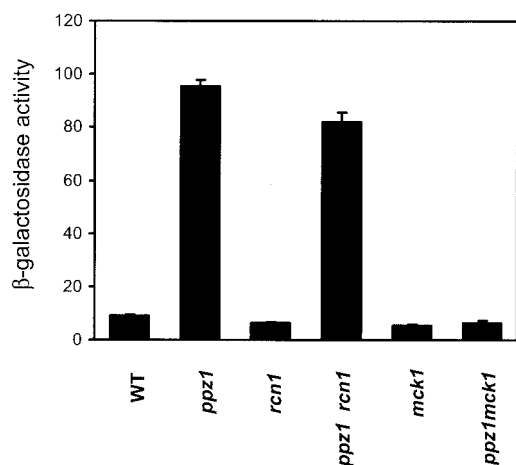


FIG. 5. Lack of Ppz1 does not result in increased *ENAI* expression in an *Mck1* kinase-deficient background. The indicated strains were transformed with plasmid pKC201, and β -galactosidase activity was measured. Data are means \pm standard errors of the means from six independent clones. WT, wild type.

FK506. The level of *PHO89* expression in the *ppz1 ppz2* double mutant was higher than that observed in the *ppz1* single mutant, and in this case, a substantial part of the response was blocked by the calcineurin inhibitor. We extended the study to four additional genes whose expression has been found to

increase under alkaline stress: *FRE1*, *SIT1*, *TRR1*, and *FIT2*. The appropriate reporter constructs were transformed into wild-type, *ppz1*, *ppz2*, and *ppz1 ppz2* cells in two different genetic backgrounds, and the level of expression of each construct was monitored. As shown in Table 2, none of these promoters showed increased activity in *ppz1* or *ppz2* cells, while all of them were more active in the double mutant. It is worth noting that all four genes respond to an alkaline pH essentially in a calcineurin-independent manner (L. Viladevall and J. Ariño, unpublished data). We considered then the possibility that the lack of *ppz1* could result in a relatively light increase in pH and that the response of the calcineurin-responsive region could be particularly sensitive to small increases in pH. To test this, we determined the responses of reporter constructs containing the -742 -to- -490 (pMRK211), -742 -to- -577 (pMRK212), or -573 -to- -490 (pMRK213) region of the *ENAI* promoter when cells were grown at different ambient pHs (Fig. 7). As can be observed, the profile of the response was essentially the same when expression was driven from the region containing the CDRE or from the downstream region to which the FK506-insensitive increase in *ENAI* expression of a *ppz1 ppz2* strain was mapped (note that the region of the *ENAI* promoter in plasmid pMRK213 is the same as that in plasmid pMP213). Therefore, our results do not support the hypothesis that the region of the *ENAI* promoter containing the CDRE is more sensitive to an increase in pH than the downstream responsive region.

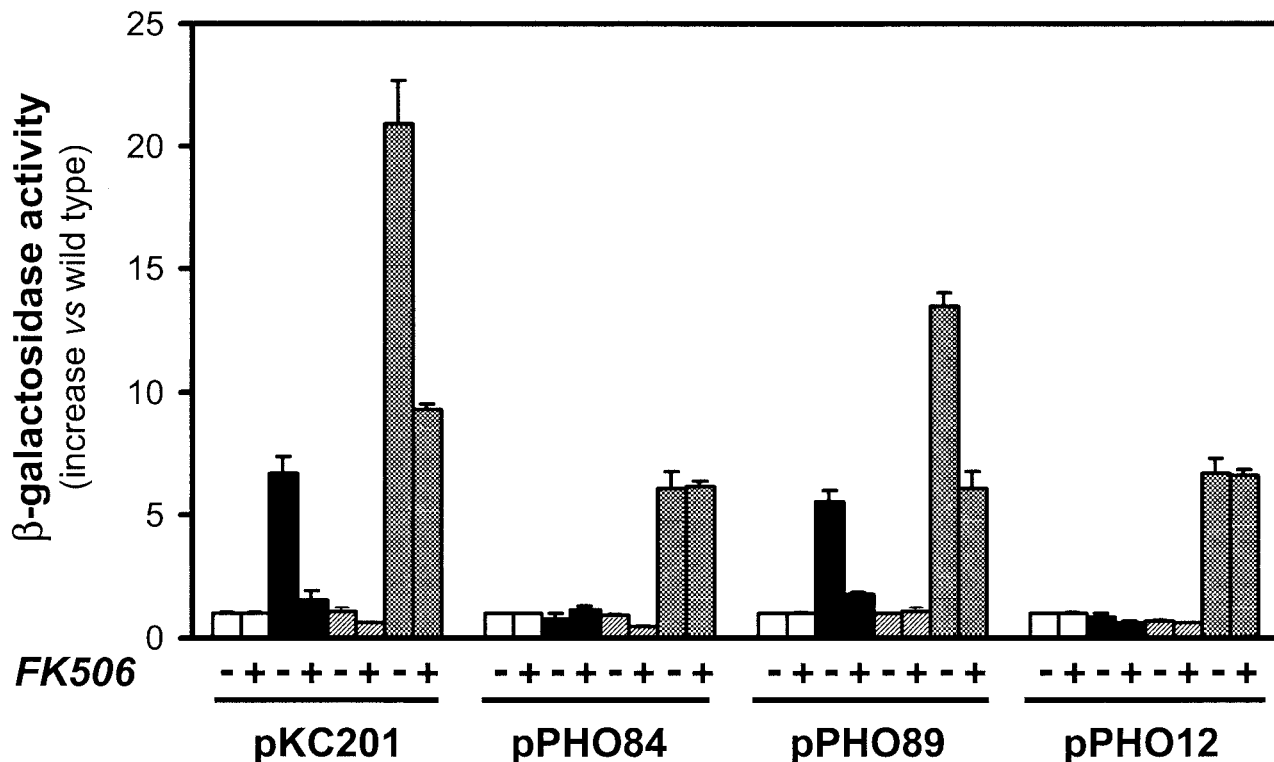


FIG. 6. Effects of calcineurin inhibition on the expression levels of different alkali-inducible genes in wild-type and Ppz-deficient backgrounds. Strains JA100 (wild type) (open bars), EDN75 (*ppz1*) (filled bars), JA103 (*ppz2*) (hatched bars), and EDN76 (*ppz1 ppz2*) (stippled bars) were transformed with plasmid pKC201, pPHO84, pPHO89, or pPHO12. Cultures were incubated in the presence ($1.5 \mu\text{g/ml}$) or absence of FK506 as described in Materials and Methods, and β -galactosidase activity was measured. Data are means \pm standard errors of the means from 3 to 12 independent clones.

TABLE 2. Effects of the absence of Ppz1 and Ppz2 functions on the activities of the *FRE1*, *FIT2*, *SIT1*, and *TRR1* promoters

Reporter and background	β-Galactosidase activity (fold induction) ^a in the following mutant:			
	Wild type	<i>ppz1</i>	<i>ppz2</i>	<i>ppz1 ppz2</i>
pFRE1				
JA100	4.4 ± 0.3 (1.0)	4.1 ± 0.8 (0.9 ± 0.2)	3.0 ± 0.4 (0.7 ± 0.1)	14.8 ± 1.6 (3.4 ± 0.4)
DBY746	1.7 ± 0.1 (1.0)	1.3 ± 0.2 (0.8 ± 0.1)	1.3 ± 0.2 (0.7 ± 0.1)	27.9 ± 8.7 (16.6 ± 2.2)
pFIT2				
JA100	4.2 ± 0.5 (1.0)	3.2 ± 0.2 (0.8 ± 0.0)	2.1 ± 0.2 (0.8 ± 0.1)	41.3 ± 3.0 (9.9 ± 0.7)
DBY746	0.6 ± 0.1 (1.0)	1.1 ± 0.3 (1.9 ± 0.5)	1.0 ± 0.1 (1.8 ± 0.2)	47.8 ± 5.1 (83.1 ± 8.8)
pSIT1				
JA100	166.6 ± 9.9 (1.0)	128.3 ± 11.8 (0.8 ± 0.1)	140.0 ± 6.0 (0.8 ± 0.0)	350.4 ± 25.4 (2.1 ± 0.2)
DBY746	174.4 ± 6.9 (1.0)	185.4 ± 7.4 (1.1 ± 0.0)	179.0 ± 5.3 (1.0 ± 0.0)	627.1 ± 35.7 (3.6 ± 0.2)
pTRR1				
JA100	111.1 ± 9.9 (1.0)	132.7 ± 9.1 (1.2 ± 0.1)	118.8 ± 2.6 (1.1 ± 0.0)	424.2 ± 39.6 (3.8 ± 0.4)
DBY746	164.5 ± 6.0 (1.0)	148.6 ± 9.2 (0.9 ± 0.1)	151.7 ± 3.9 (0.9 ± 0.0)	336.0 ± 21.1 (2.0 ± 0.1)

^a β-Galactosidase activity is expressed in Miller units. Fold induction is given relative to activity in the isogenic wild-type strain.

Marked increases in intracellular concentrations of potassium can lead to alkalinization of the cytoplasm. Because the Trk1/Trk2 transporters represent by far the most important K⁺ uptake system, we considered it important to evaluate whether the increase in *ENAI* expression derived from the absence of Ppz1 was dependent on intact Trk1/Trk2-mediated transport.

As shown in Fig. 8A, cells carrying deletions of both the *TRK1* and *TRK2* genes retain most of the increased *ENAI* expression characteristic of a *ppz1* mutant, and under these circumstances, the expression is still completely blocked by incubation of the cells with FK506. When the sensitivities of these strains to sodium and lithium cations were tested, we observed (Fig. 8B)

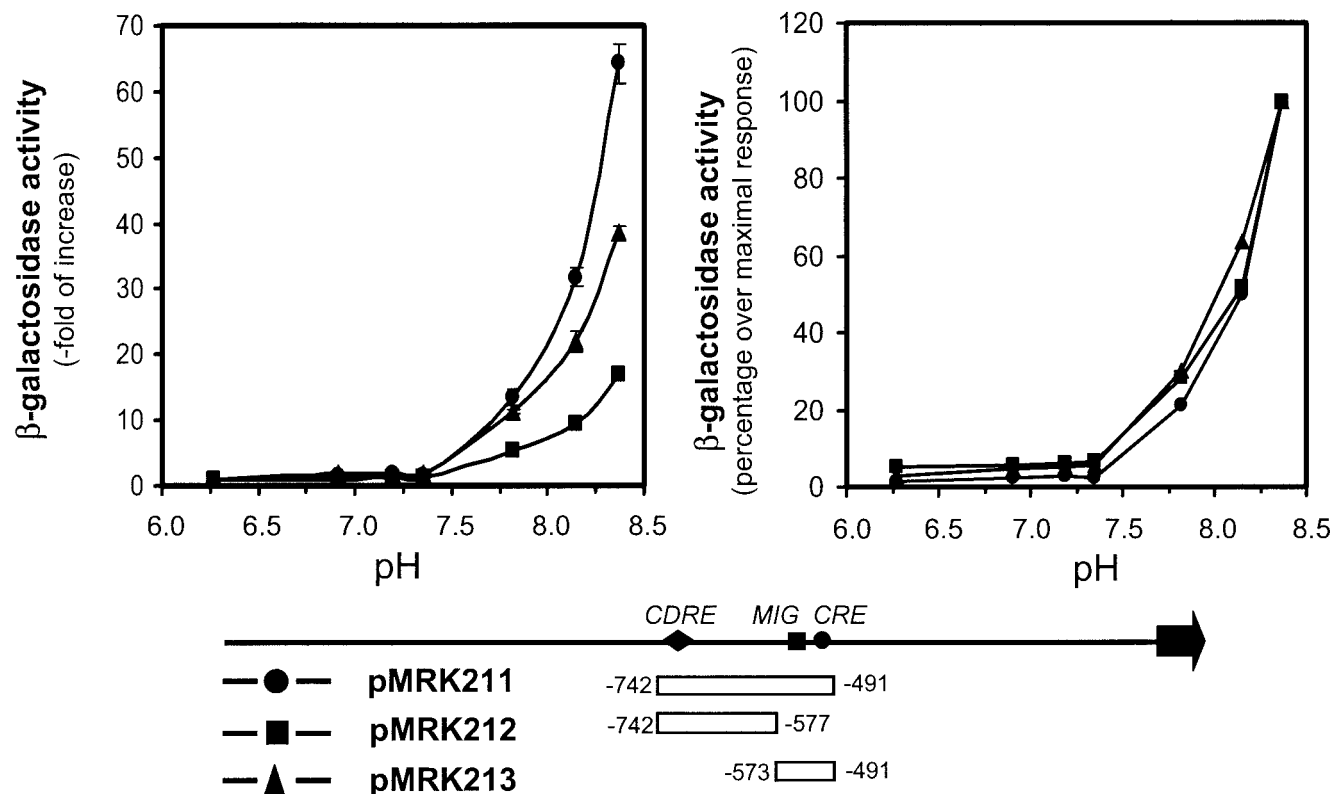


FIG. 7. Sensitivities of Ppz-regulatable regions of the *ENAI* promoter to different levels of alkalinization. The wild-type strain DBY746 was transformed with the indicated constructs bearing the regions of the *ENAI* promoter depicted schematically at the bottom. Cells were exposed to the indicated pH for 60 min and then processed for β-galactosidase activity measurement. The responses of each construct are expressed as the ratio of expression between each pH tested and the lowest pH used in the experiment (6.3) (left graph) and as the percentage of the maximal response (right graph). Data are means ± standard errors of the means from three independent clones.

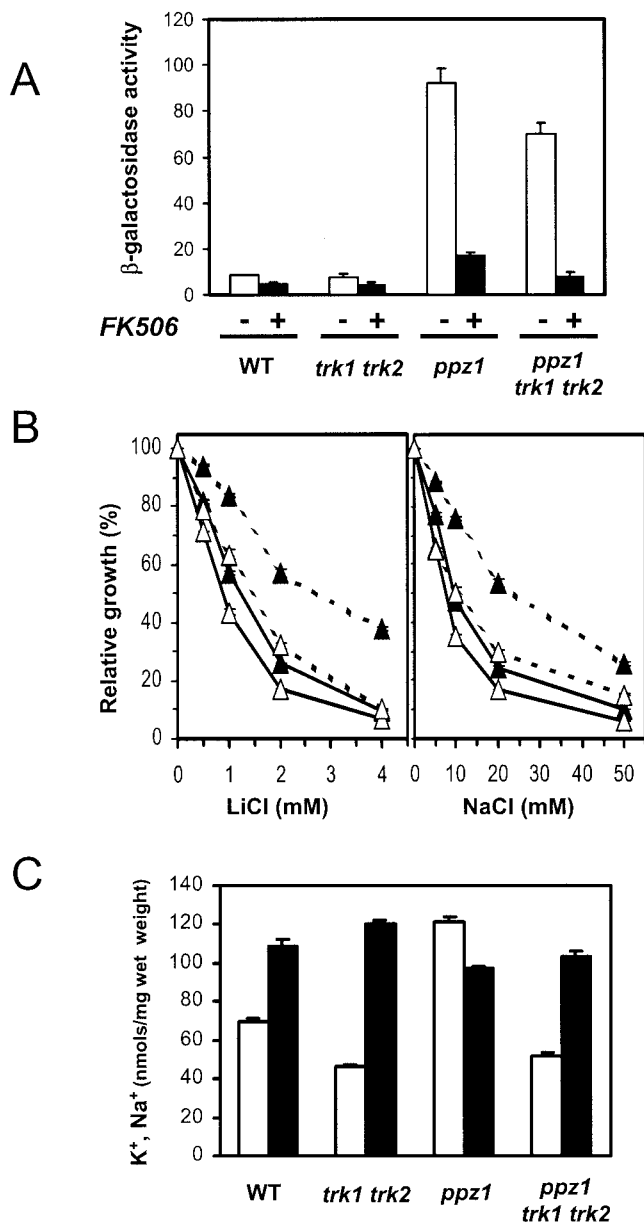


FIG. 8. Effects of the absence of Ppz1 on the expression of *ENAI* and on salt tolerance in a Trk-deficient background. (A) The wild-type (WT) strain DBY746 and its derivatives EDN2 (*ppz1*), ESV212 (*trk1 trk2*), and MAR37 (*ppz1 trk1 trk2*) were transformed with plasmid pKC201 and cultured in the presence or absence of FK506. β -Galactosidase activity was measured, and data are presented as means \pm standard errors of the means from six independent clones. (B) Strains ESV212 (solid lines) and MAR37 (dashed lines) were tested for growth in liquid cultures at the indicated concentrations of LiCl or NaCl in the absence (solid symbols) or presence (open symbols) of 1.5 μ g of FK506/ml. Data, expressed as percentages of the growth of cultures without added salt, are means \pm standard errors of the means from three independent cultures. (C) The indicated strains were grown in the presence of 0.3 M NaCl, extracts were prepared as described in Materials and Methods, and the concentrations of potassium (open bars) and sodium (solid bars) were measured. Data, expressed as nanomoles per milligram of cells (fresh weight), are means \pm standard errors of the means from two independent experiments, performed in duplicate.

that, as was observed with the *ppz1 ppz2* mutant (49), the absence of Ppz1 increased tolerance to these cations in the hypersensitive *trk1 trk2* background. Interestingly, this increase was abolished in the presence of the calcineurin inhibitor FK506. Addition of the drug slightly increased the sensitivity of the *trk1 trk2* mutant. Finally, the intracellular concentrations of sodium and potassium ions were determined in wild-type, *trk1 trk2*, *ppz1*, and *trk1 trk2 ppz1* cells grown in the presence of 0.3 M NaCl (Fig. 8C). As previously reported for the *ppz1 ppz2* mutant, disruption of *PPZ1* clearly increased the intracellular potassium ion concentration and slightly reduced the content of sodium, while lack of the Trk system decreased the potassium and increased the sodium ion concentration. Deletion of *PPZ1* in the *trk*-deficient background showed a slight decrease in the intracellular Na⁺ concentration relative to that in the *trk1 trk2* mutant. Equivalent results were obtained when cells were grown in the presence of a higher NaCl concentration (0.5 M). This decrease in Na⁺ accumulation in the *ppz1 trk1 trk2* strain is consistent with the continued induction of *ENAI* in this strain and likely explains the relative tolerance to NaCl and LiCl.

DISCUSSION

It has been known for some time that the Ppz1 and Ppz2 phosphatases are not functionally equivalent. For instance, the absence of Ppz1 results in clear-cut phenotypes, while cells lacking Ppz2 are indistinguishable from wild-type cells. Although the recent finding that the Ppz phosphatases are negative effectors of potassium influx, probably by regulating the Trk1/Trk2 potassium transporters (49), has provided a very fruitful framework for understanding the diverse phenotypes associated with the absence or the overexpression of these proteins, we considered it necessary to initiate a detailed evaluation of the function and regulation of these proteins independently, in order to better understand their individual physiological roles. Because it was known that Hal3 was able to interact with and inhibit Ppz1, we first raised the question of whether Hal3 could be considered fully specific for Ppz1. We show here that Hal3 can bind Ppz2 *in vitro* with roughly the same efficiency as that for Ppz1 binding. Furthermore, high-copy expression of Hal3 in the *ppz1* mutant results in a level of *ENAI* expression virtually identical to that observed in the *ppz1 ppz2* double mutant, suggesting that high levels of Hal3 could fully inhibit Ppz2 function. The observation that high-copy expression of Hal3 fails to increase expression of the *ENAI* promoter in a *ppz1 ppz2* mutant is in agreement with the notion that the regulation of the expression of the ATPase gene by Hal3 is fully mediated by both the Ppz1 and Ppz2 phosphatases. Consistent with these results, overexpression of Hal3 also fails to increase salt tolerance in a *ppz1 ppz2* double mutant (data not shown). In conclusion, Hal3 appears to regulate both the Ppz1 and Ppz2 phosphatases. A practical consequence of these observations would be that high-copy expression of Hal3 could not be considered a suitable tool for specific inhibition of Ppz1.

Since the absence of Ppz1 and Ppz2 affects *ENAI* expression, we considered that a detailed functional analysis of the *ENAI* promoter in *ppz1* and *ppz1 ppz2* mutants might provide useful information on the mechanism of action of these phos-

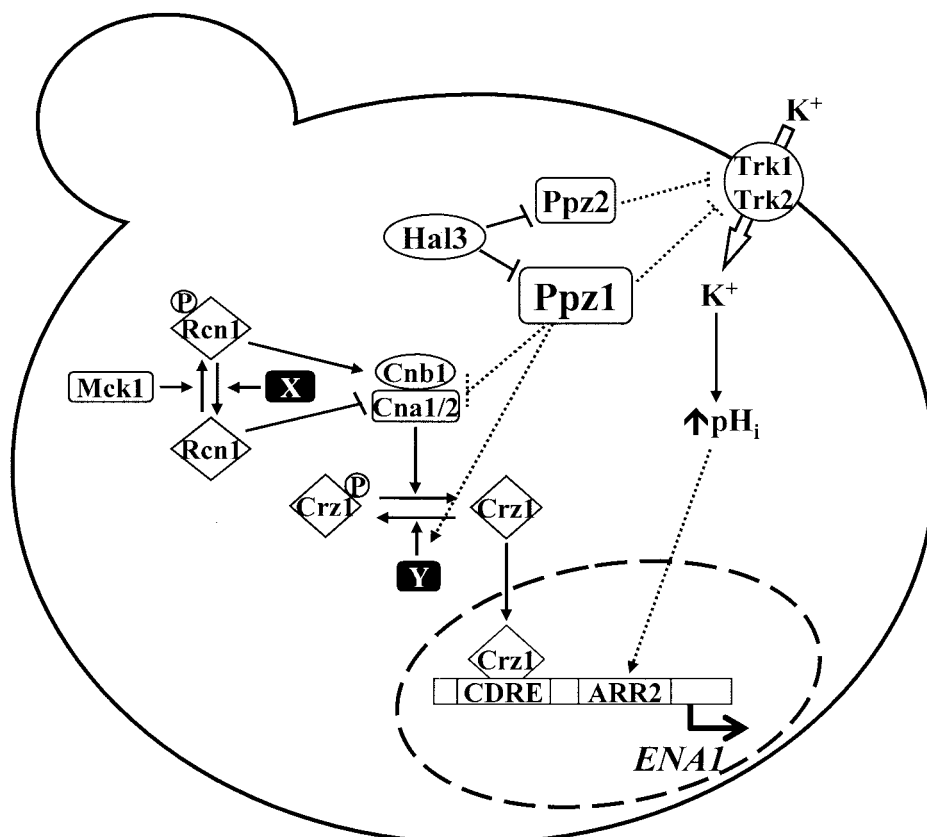


FIG. 9. Schematic depiction of the relationship of Hal3, Ppz1, and Ppz2 with the calcineurin-dependent pathway and the transcriptional regulation of the *ENAI* gene. “X” represents the protein phosphatase(s) that dephosphorylates Rcn1, and “Y” represents the protein kinase that phosphorylates Crz1. Discontinuous lines indicate functional relationships whose mechanisms have yet to be clarified.

phatases. Here we present evidence that a region containing the downstream CDRE of *ENAI* (30, 43) is necessary and sufficient to mimic the increased expression of the full promoter in a *ppz1* mutant. It should be noted that this region also contains one of the two possible binding sites for Nrg1, a transcription factor which, very recently, has been proposed to negatively regulate *ENAI* transcription under the influence of Rim101 (25). However, we observed that the increase in *ENAI* expression characteristic of *ppz1* mutants was completely blocked by incubation of the cells with the calcineurin inhibitor FK506; by mutation of the *CNB1* gene, encoding the regulatory subunit of calcineurin; or by the absence of the calcineurin-activated Crz1/Tcn1 transcription factor (Fig. 3), which is responsible for most, if not all, of the transcriptional effects of calcineurin (50). Furthermore, we show (Fig. 3, right) that a reporter construct containing the CDRE sequence found in *FKS2*, which does not contain the CCCCT or CCCTC sequences proposed as Nrg1 binding sites (35), was also over-expressed in a *ppz1* strain. These findings are consistent with the hypothesis that the effect of Ppz1 on the regulation of *ENAI* expression is not related to Nrg1 function. Mapping of the *ENAI* promoter activity in a *ppz1 ppz2* mutant revealed an additional functionally relevant target region, designated ARR2 by Serrano et al. (43). Transcription from this region is not blocked by FK506, indicating that it is not influenced by calcineurin activity. This region was identified recently as being

responsible for a substantial, calcineurin-insensitive component of the alkaline response of *ENAI* (43). Therefore, the complete absence of Ppz activity results in increased *ENAI* expression by modulation of the activity of at least two different sites in its promoter.

The results presented in this paper suggest that Ppz1 might act as an upstream negative regulator of the calcineurin pathway (see Fig. 9 for a schematic depiction). The observations that a *ppz1* mutant is sensitive to calcium ions, as would be expected for a strain with higher-than-normal calcineurin activity, and that this sensitivity is fully abolished by deletion of *cnb1* are in agreement with this model. It should be noted that a previous report failed to identify a *ppz1* mutant as calcium sensitive (42). These authors based their work in a genetic background (W303-1A-derived strains) different from those used in this work. We have also tested calcium tolerance for *ppz1* and *ppz1 ppz2* mutants in the W303-1A background, and we were able to observe a slight calcium-sensitive phenotype in the *ppz1* mutant that was exacerbated in the double mutant (data not shown).

It has recently been shown that calcineurin function can be modulated by a conserved family of proteins termed calcipressins, represented in budding yeast by a single gene, *RCN1* (17, 23). It is not evident from the literature how Rcn1 acts on calcineurin. For instance, overproduction has been shown to inhibit calcineurin function, and bacterially expressed Rcn1

inhibits calcineurin *in vitro* (23). In contrast, a null mutant exhibits reduced calcineurin activity and, like calcineurin mutants, presents increased sensitivity to sodium and lithium cations (15, 17, 22, 23). Recently, K. Cunningham's laboratory (John Hopkins University) has suggested a model in which Rcn1 stimulates calcineurin when phosphorylated at a given site, while a nonphosphorylated form of Rcn1 would have a potent inhibitory activity. These authors have also identified the Mck1 protein kinase, a member of the glycogen synthase kinase-3 family, as the major Rcn1 kinase activity in yeast (K. Cunningham, personal communication).

We have found that expression from the *ENAI* promoter is somewhat lower in an *rcn1* mutant than in a wild-type strain (6.5 ± 0.4 versus 8.9 ± 0.4 Miller units) and that lack of Rcn1 in a *ppz1* mutant only marginally decreases the activity of the promoter (Fig. 5). In contrast, deletion of *MCK1* in a *ppz1* background decreases the activity of the promoter to wild-type levels. We consider that these results provide support for the model of Mck1/Rcn1-mediated regulation of calcineurin activity mentioned above. Lack of Rcn1 would represent the absence of an inhibitor (when dephosphorylated) but also that of a possible activator of calcineurin (when phosphorylated by Mck1). This might have little influence on *ENAI* expression in a *ppz1* mutant, in which calcineurin activity would already be abnormally increased due to the absence of the Ppz1 phosphatase. However, lack of Mck1 would result in the incapacity to phosphorylate Rcn1, and this unphosphorylated form of the protein would strongly inhibit the activity of calcineurin, possibly overriding the positive effect due to the lack of Ppz1. It should be noted that our results rule out the possibility of Ppz1 acting as an Rcn1 phosphatase (which would account for the calcineurin-dependent activation of the *ENAI* promoter in the *ppz1* mutant), as in this scenario the absence of Ppz1 should not result in increased *ENAI* promoter activity in an *rcn1* strain. A role for Mck1 in sodium tolerance was postulated some time ago (36). These authors observed that an *mck1* mutant was more sensitive to high sodium concentrations and that expression of *ENAI* was reduced under 0.5 M NaCl stress. In addition, overexpression of *MCK1* was able to somewhat improve the growth of a strain lacking both catalytic subunits of calcineurin, which would suggest a calcineurin-independent mechanism. However, in this experiment the *MCK1* gene was expressed from the strong *ADHI* promoter, and therefore, conditions were far from physiological.

Recent work (49) has shown that the *ppz1 ppz2* mutant has a more alkaline cytosolic pH, and it was postulated that the increased basal activity of the *ENAI* promoter may be the result of this alkalization. In this study, we show that the induction of the *ENAI* promoter in the double mutant maps to two different regions; a pH-responsive region (-573 to -490) and the calcineurin-dependent CDRE (-751 to -667). Interestingly, several lines of evidence demonstrate that, in a single *ppz1* mutant, the CDRE is necessary and sufficient for the observed *ENAI* induction and that alterations in intracellular pH are not involved in the changes in gene expression observed in this mutant. First, only promoters of calcineurin-responsive genes, such as *ENAI* or *PHO89*, show increased activity in a *ppz1* mutant, while several other alkaline pH-responsive genes do not. Second, the CDRE-containing region of *ENAI* is not particularly sensitive to alkaline pHs. Thus, the

possibility that lack of Ppz1 might result in a slight increase in pH that would be to drive transcription from this element seems unlikely. In fact, the increase in expression of *ENAI* in a *ppz1* mutant is quantitatively similar at different ambient pHs (from pH 5.8 to 7.2 [data not shown]). Third, the increased activity of the *ENAI* promoter due to the lack of Ppz1 is largely conserved in a *trk1 trk2* mutant (Fig. 8), ruling out the possibility of intracellular alkalization as a result of enhanced Trk activity in the absence of Ppz1. In addition, we confirm and extend here the previous observation (49) that the absence of both the Ppz1 and Ppz2 phosphatases results in increased expression of alkali-inducible genes. This increased expression is not at all affected by calcineurin inhibition in some cases, while in other cases it displays a significant calcineurin-dependent component, suggesting that the absence of both phosphatases triggers regulatory mechanisms that are not elicited by the simple loss of Ppz1 function.

An interesting question is how much the increased expression of *ENAI* contributes to the salt-tolerant phenotype of a *ppz1* mutant. As shown in Fig. 4B, a *crz1* mutant is less sensitive to lithium or sodium than a *cnb1* mutant, supporting the notion that calcineurin plays a role(s) in salt tolerance that does not involve Crz1-mediated transcriptional regulation. Interestingly, deletion of *CRZ1* in a *ppz1* background reduces tolerance to lithium and sodium cations, although the effect is less potent than that observed upon deletion of *CNBI*. As we show that increased *ENAI* expression observed in the absence of Ppz1 is dependent on the presence of Crz1, it could be hypothesized that the difference in tolerance between a *ppz1* and a *ppz1 crz1* mutant would be due to the incapacity of the latter to increase *ENAI* expression levels. Similarly, a higher *ENAI* expression would explain the FK506-sensitive increase in sodium and lithium tolerance provided by disruption of *PPZ1* in a *trk1 trk2* strain (Fig. 8), suggesting a role for calcineurin as a downstream effector of Ppz1. In addition to regulating *ENAI* expression, it is known that, in the presence of high NaCl concentrations, calcineurin is able to regulate the Trk potassium transporters, positively influencing the ability of Trk to convert to the high-affinity state which allows for better discrimination of potassium from sodium (32, 33). Therefore, a likely possibility that would contribute to the marked salt tolerance phenotype of a *ppz1* mutant would be that the absence of Ppz1 would activate calcineurin and consequently influence the cation selectivity of the Trk transporters. Of course, this model does not rule out an alternative, calcineurin-independent regulation of Trk function.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank F. Pérez-Bermejo and A. Friedrich (Fujisawa Co.) for kindly supplying the calcineurin inhibitor FK506 and R. Haro, R. Serrano, E. Simón, D. Bernal, and J. L. Revuelta for strains and constructs. The contribution of F. Posas in the earliest steps of this work and the excellent technical assistance of Anna Vilalta, Manuel Clemente, and Jacobo Molins are acknowledged. We are particularly grateful to Kyle Cunningham (John Hopkins University, Baltimore, Md.) for generously sharing unpublished data.

This work was supported by a research grant from the "Fundación Ramón Areces" to J.A. and by grants BMC2002-04011-C05-04, BMC2002-04011-C05-02, and GEN2001-4707-C08-03 (Ministerio de Ciencia y Tecnología, Government of Spain, and Fondo Europeo de Desarrollo Regional). A. Ruiz is the recipient of a fellowship from the

CIRIT (Generalitat de Catalunya). L. Yenush is supported by the Ramón y Cajal Program (Ministerio de Ciencia y Tecnología).

REFERENCES

- Adams, A., D. E. Gottschlings, C. A. Kaiser, and T. Stearns. 1998. Methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Alepuz, P. M., K. W. Cunningham, and F. Estruch. 1997. Glucose repression affects ion homeostasis in yeast through the regulation of the stress-activated *ENA1* gene. *Mol. Microbiol.* **26**:91–98.
- Ariño, J., F. Posas, and J. Clotet. 1998. The search for the biological function of novel yeast Ser/Thr phosphatases. *Methods Mol. Biol.* **93**:305–313.
- Berben, G., J. Dumont, V. Gilliquet, P. A. Bolle, and F. Hilger. 1991. The YDp plasmids: a uniform set of vectors bearing versatile gene disruption cassettes for *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **7**:475–477.
- Clotet, J., E. Garí, M. Aldea, and J. Ariño. 1999. The yeast Ser/Thr phosphatases Sit4 and Ppz1 play opposite roles in regulation of the cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* **19**:2408–2415.
- Clotet, J., F. Posas, E. de Nadal, and J. Ariño. 1996. The NH₂-terminal extension of protein phosphatase Ppz1 has an essential functional role. *J. Biol. Chem.* **271**:26349–26355.
- Crespo, J. L., K. Daicho, T. Ushimaru, and M. N. Hall. 2001. The GATA transcription factors GLN3 and GAT1 link TOR to salt stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **276**:34441–34444.
- Cunningham, K. W., and G. R. Fink. 1996. Calcineurin inhibits VCX1-dependent H⁺/Ca²⁺ exchange and induces Ca²⁺ ATPases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **16**:2226–2237.
- Cyert, M. S., and J. Thorner. 1992. Regulatory subunit (*CNB1* gene product) of yeast Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphoprotein phosphatases is required for adaptation to pheromone. *Mol. Cell. Biol.* **12**:3460–3469.
- Cyert, M. S., R. Kunisawa, D. Kaim, and J. Thorner. 1991. Yeast has homologs (*CNA1* and *CNA2* gene products) of mammalian calcineurin, a calmodulin-regulated phosphoprotein phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:7376–7380.
- de Nadal, E., J. Clotet, F. Posas, R. Serrano, N. Gomez, and J. Ariño. 1998. The yeast halotolerance determinant Hal3p is an inhibitory subunit of the Ppz1p Ser/Thr protein phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:7357–7362.
- Di Como, C. J., R. Bose, and K. T. Arndt. 1995. Overexpression of SIS2, which contains an extremely acidic region, increases the expression of SWI4, CLN1 and CLN2 in *sit4* mutants. *Genetics* **139**:95–107.
- Ferrando, A., S. J. Kron, G. Rios, G. R. Fink, and R. Serrano. 1995. Regulation of cation transport in *Saccharomyces cerevisiae* by the salt tolerance gene *HAL3*. *Mol. Cell. Biol.* **15**:5470–5481.
- Garcia-deblás, B., F. Rubio, F. J. Quintero, M. A. Banuelos, R. Haro, and A. Rodríguez-Navarro. 1993. Differential expression of two genes encoding isoforms of the ATPase involved in sodium efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **236**:363–368.
- Giaever, G., A. M. Chu, L. Ni, C. Connelly, L. Riles, S. Veronneau, S. Dow, A. Lucau-Danila, K. Anderson, B. Andre, A. P. Arkin, A. Astromoff, M. El Bakkoury, R. Bangham, R. Benito, S. Brachet, S. Campanaro, M. Curtiss, K. Davis, A. Deutschbauer, K. D. Entian, P. Flaherty, F. Foury, D. J. Garfinkel, M. Gerstein, D. Gotte, U. Guldener, J. H. Hegemann, S. Hempel, Z. Herman, D. F. Jaramillo, D. E. Kelly, S. L. Kelly, P. Kotter, D. LaBonte, D. C. Lamb, N. Lan, H. Liang, H. Liao, L. Liu, C. Luo, M. Lussier, R. Mao, P. Menard, S. L. Ooi, J. L. Revuelta, C. J. Roberts, M. Rose, P. Ross-Macdonald, B. Scherens, G. Schimmack, B. Shafer, D. D. Shoemaker, S. Sookhai-Mahadeo, R. K. Storms, J. N. Strathern, G. Valle, M. Voet, G. Volckaert, C. Y. Wang, T. R. Ward, J. Wilhelm, E. A. Winzler, Y. Yang, G. Yen, E. Youngman, K. Yu, H. Bussey, J. D. Boeke, M. Snyder, P. Philippsen, R. W. Davis, and M. Johnston. 2002. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* **418**:387–391.
- Gietz, R. D., and A. Sugino. 1988. New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **74**:527–534.
- Gorlach, J., D. S. Fox, N. S. Cutler, G. M. Cox, J. R. Perfect, and J. Heitman. 2000. Identification and characterization of a highly conserved calcineurin binding protein, CBP1/calciressin, in *Cryptococcus neoformans*. *EMBO J.* **19**:3618–3629.
- Guan, K. L., and J. E. Dixon. 1991. Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione *S*-transferase. *Anal. Biochem.* **192**:1262–1267.
- Guarente, L., and T. Mason. 1983. Heme regulates transcription of the *CYC1* gene of *S. cerevisiae* via an upstream activation site. *Cell* **32**:1279–1286.
- Haro, R., L. Sainz, F. Rubio, and A. Rodríguez-Navarro. 1999. Cloning of two genes encoding potassium transporters in *Neurospora crassa* and expression of the corresponding cDNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **31**:511–520.
- Hughes, V., A. Muller, M. J. Stark, and P. T. Cohen. 1993. Both isoforms of protein phosphatase Z are essential for the maintenance of cell size and integrity in *Saccharomyces cerevisiae* in response to osmotic stress. *Eur. J. Biochem.* **216**:269–279.
- Jesus Ferreira, M. C., X. Bao, V. Laize, and S. Hohmann. 2001. Transposon mutagenesis reveals novel loci affecting tolerance to salt stress and growth at low temperature. *Curr. Genet.* **40**:27–39.
- Kingsbury, T. J., and K. W. Cunningham. 2000. A conserved family of calcineurin regulators. *Genes Dev.* **14**:1595–1604.
- Kuno, T., H. Tanaka, H. Mukai, C. D. Chang, K. Hiraga, T. Miyakawa, and C. Tanaka. 1991. cDNA cloning of a calcineurin B homolog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **180**:1159–1163.
- Lamb, T. M., and A. P. Mitchell. 2003. The transcription factor Rim101p governs ion tolerance and cell differentiation by direct repression of the regulatory genes *NRG1* and *SMP1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **23**:677–686.
- Lee, K. S., L. K. Hines, and D. E. Levin. 1993. A pair of functionally redundant yeast genes (*PPZ1* and *PPZ2*) encoding type 1-related protein phosphatases function within the PKC1-mediated pathway. *Mol. Cell. Biol.* **13**:5843–5853.
- Liu, Y., S. Ishii, M. Tokai, H. Tsutsumi, O. Ohki, R. Akada, K. Tanaka, E. Tsuchiya, S. Fukui, and T. Miyakawa. 1991. The *Saccharomyces cerevisiae* genes (*CMP1* and *CMP2*) encoding calmodulin-binding proteins homologous to the catalytic subunit of mammalian protein phosphatase 2B. *Mol. Gen. Genet.* **227**:52–59.
- Márquez, J. A., and R. Serrano. 1996. Multiple transduction pathways regulate the sodium-extrusion gene *PMR2/ENA1* during salt stress in yeast. *FEBS Lett.* **382**:89–92.
- Matheos, D. P., T. J. Kingsbury, U. S. Ahsan, and K. W. Cunningham. 1997. Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **11**:3445–3458.
- Mendoza, I., A. Pascual-Ahuir, R. Serrano, and I. F. de Larrinoa. 2001. Promoter sequences regulated by the calcineurin-activated transcription factor Crz1 in the yeast *ENA1* gene. *Mol. Genet. Genomics* **265**:801–811.
- Mendizabal, I., G. Rios, J. M. Mulet, R. Serrano, and I. F. de Larrinoa. 1998. Yeast putative transcription factors involved in salt tolerance. *FEBS Lett.* **425**:323–328.
- Mendoza, I., F. J. Quintero, R. A. Bressan, P. M. Hasegawa, and J. M. Pardo. 1996. Activated calcineurin confers high tolerance to ion stress and alters the budding pattern and cell morphology of yeast cells. *J. Biol. Chem.* **271**:23061–23067.
- Mendoza, I., F. Rubio, A. Rodríguez-Navarro, and J. M. Pardo. 1994. The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **269**:8792–8796.
- Myers, A. M., A. Tzagoloff, D. M. Kinney, and C. J. Lusty. 1986. Yeast shuttle and integrative vectors with multiple cloning sites suitable for construction of *lacZ* fusions. *Gene* **45**:299–310.
- Park, S. H., S. S. Koh, J. H. Chun, H. J. Hwang, and H. S. Kang. 1999. Nrg1 is a transcriptional repressor for glucose repression of *STAI* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **19**:2044–2051.
- Piao, H. L., K. T. Pih, J. H. Lim, S. G. Kang, J. B. Jin, S. H. Kim, and I. Hwang. 1999. An *Arabidopsis* *GSK3/shaggy*-like gene that complements yeast salt stress-sensitive mutants is induced by NaCl and abscisic acid. *Plant Physiol.* **119**:1527–1534.
- Posas, F., A. Casamayor, and J. Ariño. 1993. The PPZ protein phosphatases are involved in the maintenance of osmotic stability of yeast cells. *FEBS Lett.* **318**:282–286.
- Posas, F., A. Casamayor, N. Morral, and J. Ariño. 1992. Molecular cloning and analysis of a yeast protein phosphatase with an unusual amino-terminal region. *J. Biol. Chem.* **267**:11734–11740.
- Posas, F., M. Camps, and J. Ariño. 1995. The PPZ protein phosphatases are important determinants of salt tolerance in yeast cells. *J. Biol. Chem.* **270**:13036–13041.
- Proft, M., and R. Serrano. 1999. Repressors and upstream repressing sequences of the stress-regulated *ENA1* gene in *Saccharomyces cerevisiae*: bZIP protein Sko1p confers HOG-dependent osmotic regulation. *Mol. Cell. Biol.* **19**:537–546.
- Reynolds, A., V. Lundblad, D. Dorris, and M. Keaveney. 1997. Yeast vectors and assays for expression of cloned genes, p. 13.6.1–13.6.6. *In* F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl (ed.), *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, New York, N.Y.
- Sakumoto, N., I. Matsuoaka, Y. Mukai, N. Ogawa, Y. Kaneko, and S. Harashima. 2002. A series of double disruptants for protein phosphatase genes in *Saccharomyces cerevisiae* and their phenotypic analysis. *Yeast* **19**:587–599.
- Serrano, R., A. Ruiz, D. Bernal, J. R. Chambers, and J. Ariño. 2002. The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium-mediated signalling. *Mol. Microbiol.* **46**:1319–1333.
- Stathopoulos, A. M., and M. S. Cyert. 1997. Calcineurin acts through the *CRZ1/TCN1*-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes Dev.* **11**:3432–3444.
- Wach, A., A. Brachet, R. Pohlmann, and P. Philippsen. 1994. New heterol-

- ogous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**:1793–1808.
46. Winzeler, E. A., D. D. Shoemaker, A. Astromoff, H. Liang, K. Anderson, B. Andre, R. Bangham, R. Benito, J. D. Boeke, H. Bussey, A. M. Chu, C. Connelly, K. Davis, F. Dietrich, S. W. Dow, M. El Bakkoury, F. Foury, S. H. Friend, E. Gentalen, G. Giaever, J. H. Hegemann, T. Jones, M. Laub, H. Liao, and R. W. Davis. 1999. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* **285**:901–906.
 47. Withee, J. L., J. Mulholland, R. Jeng, and M. S. Cyert. 1997. An essential role of the yeast pheromone-induced Ca^{2+} signal is to activate calcineurin. *Mol. Biol. Cell* **8**:263–277.
 48. Ye, R. R., and A. Bretscher. 1992. Identification and molecular characterization of the calmodulin-binding subunit gene (*CMPT1*) of protein phosphatase 2B from *Saccharomyces cerevisiae*. An α -factor inducible gene. *Eur. J. Biochem.* **204**:1713–1723.
 49. Yenush, L., J. M. Mulet, J. Ariño, and R. Serrano. 2002. The Ppz protein phosphatases are key regulators of K^+ and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression. *EMBO J.* **21**: 920–929.
 50. Yoshimoto, H., K. Saltsman, A. P. Gasch, H. X. Li, N. Ogawa, D. Botstein, P. O. Brown, and M. S. Cyert. 2002. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the calcineurin/Crz1p signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **277**:31079–31088.

The Ppz protein phosphatases regulate Trk-independent potassium influx in yeast

Amparo Ruiz^a, María del Carmen Ruiz^b, Miguel Angel Sánchez-Garrido^b,
Joaquín Ariño^{a,*}, José Ramos^b

^aDepartament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Barcelona, Spain

^bDepartamento de Microbiología, Edificio Severo Ochoa, Campus de Rabanales, Universidad de Córdoba 14071, Spain

Received 23 September 2004; revised 20 October 2004; accepted 21 October 2004

Available online 4 November 2004

Edited by Maurice Montal

Abstract The Ppz protein phosphatases have been recently shown to negatively regulate the major potassium transport system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, encoded by the *TRK1* and *TRK2* genes. We have found that, in the absence of the Trk system, Ppz mutants require abnormally high concentrations of potassium to proliferate. This can be explained by the observation that *trk1 trk2 ppz1* or *trk1 trk2 ppz1 ppz2* strains display a very poor rubidium uptake, with markedly increased K_m values. These cells are very sensitive to the presence of several toxic cations in the medium, such as hygromycin B or spermine, but not to lithium or sodium cations. At limiting potassium concentrations, addition of EGTA to the medium improves growth of these mutants. Therefore, our results indicate that, in addition to their role in regulating Trk potassium transporters, Ppz phosphatases (essentially Ppz1) positively affect the residual low affinity potassium transport mechanisms in yeast. These findings may provide a new way to elucidate the molecular nature of the low affinity potassium uptake system in yeast as well as a useful model to analyze the function of plant or mammalian potassium channels through heterologous expression in yeast.

© 2004 Published by Elsevier B.V. on behalf of the Federation of European Biochemical Societies.

Keywords: Protein phosphatases; Potassium uptake; Trk1/Trk2 transporter; Yeast

1. Introduction

Saccharomyces cerevisiae *PPZ1* and *PPZ2* genes encode two structurally similar Ser/Thr protein phosphatases which are involved in a variety of cell processes, such as salt tolerance, maintenance of cell integrity and regulation of cell cycle at the G₁/S transition (see [1] for a review). The biological role of Ppz1 is more important than that of Ppz2, as deduced by the fact that deletion of the latter does not result in significant phenotypes, although it intensifies the phenotypes associated to the absence of *PPZ1*. For instance, cells lacking Ppz1 are tolerant to high concentrations of sodium or lithium cations, while *ppz2* cells are not. However, a double *ppz1 ppz2* mutant

is even more tolerant than a single *ppz1* strain. It has been recently proposed that most of the phenotypes produced by deletion of the Ppz phosphatases could be explained by a negative role of these proteins on the Trk1/Trk2 potassium transporters [2,3].

Trk1 and Trk2 are membrane proteins responsible for the high affinity potassium uptake in *S. cerevisiae*. Trk1 appears to be the most important component in this uptake, as mutation of this gene results in a significant defect in potassium transport and the inability to grow under limiting concentrations of this cation [4–6]. Mutation of *TRK2* aggravates the requirement for potassium of a *trk1* mutant. It has been documented that defects in potassium transport result in increased sensitivity to sodium or lithium cations [7–10]. Furthermore, cells lacking the high affinity transporters show highly hyperpolarized membrane potential [11].

The viability of *trk1 trk2* cells revealed the existence of additional forms to transport potassium, although the nature of this transport remains still obscure. Two main alternatives have been postulated in the past few years. For instance, the existence of a calcium-blocked, non-specific cation channel named NSC1 has been proposed as the primary low-affinity potassium uptake route [12–14]. However, the molecular nature of this transporter has not been determined. In contrast, an ectopic, non-specific uptake that would occur through sugar and/or amino acid permeases has been postulated [11,15].

In this work, we present data supporting the notion that the Ppz phosphatases (essentially Ppz1) also influence the low affinity potassium uptake observed in the absence of the Trk transporters. In this case, however, the phosphatases would act as positive modulators of the transport.

2. Materials and methods

2.1. Yeast strains and growth conditions

Yeast cells were grown, unless otherwise stated, at 28 °C in YPD medium, complete minimal medium (CM) lacking the appropriate requirements for selection or in the ammonium-phosphate K⁺- and Na⁺-free minimal medium [16,17]. When indicated, media were supplemented with KCl. All yeast strains used in this work are listed in Table 1. Strains MAR71 and MAR72 were constructed by transforming strains ESV210 (*trk1::LEU2*) and ESV220 (*trk2::HIS3*), respectively, with the *ppz1::URA3* and *ppz2::TRP1* disruption cassettes described in [18] and [19]. Strains MAR70, MAR62, and MAR73 were obtained by transformation of strain ESV212 (*trk1::LEU2 trk2::HIS3*) with the mentioned disruption cassettes.

*Corresponding author. Fax: +34-93-5812006.
E-mail address: joaquin.arino@uab.es (J. Ariño).

Table 1
Yeast strains used in this work

Name	Relevant genotype	Source/reference
DBY746	<i>MATα ura3-52 leu2-3, 112 his3- Δ1 trp1- Δ239</i>	D. Botstein [28]
JA31	<i>DBY746 ppz1 ::URA3 ppz2 ::TRP1</i>	[22]
ESV212	<i>DBY746 trk1 ::LEU2 trk2 ::HIS3</i>	This work
MAR70	<i>DBY746 trk1 ::LEU2 trk2 ::HIS3 ppz1 ::URA3</i>	This work
MAR62	<i>DBY746 trk1 ::LEU2 trk2 ::HIS3 ppz2 ::TRP1</i>	This work
MAR71	<i>DBY746 trk1 ::LEU2 ppz1 ::URA3 ppz2 ::TRP1</i>	This work
MAR72	<i>DBY746 trk2 ::HIS3 ppz1 ::URA3 ppz2 ::TRP1</i>	This work
MAR73	<i>DBY746 trk1 ::LEU2 trk2 ::HIS3 ppz1 ::URA3 ppz2 ::TRP1</i>	This work

2.2. Growth experiments

To test the growth capacity of the yeast cells on solid media, plates were spotted with 3–10 μ l of diluted cultures and incubated for the indicated periods of time. To calculate the doubling time, cells were grown in liquid ammonium phosphate medium supplemented with 100 mM KCl, washed twice with sterile cool distilled water and inoculated (10^5 cells/ml) in the same medium containing different concentrations of KCl. Density of the cultures (A_{550}) was monitored at different times [20]. To evaluate the effect of external calcium levels on growth, cells were cultured overnight in YPD, washed and resuspended at A_{620} 0.05 in ammonium phosphate medium supplemented with KCl. Aliquots were distributed in 96-well plates, incubated for 24 h and the optical density determined. Under these conditions, the A_{620} of the cultures varied from 0.2 to 0.9, according to the strain and the treatment.

2.3. K^+ content of cells and Rb^+ transport experiments

The K^+ content of cells grown in ammonium phosphate supplemented with 10 mM KCl was determined by collecting them on Millipore filters, which were rapidly washed with 20 mM $MgCl_2$. The cells were then extracted with acid and analyzed by atomic emission spectrophotometry, essentially as described in [21]. The experiments were repeated 3–6 times and the standard deviations calculated.

The time course of Rb^+ uptake of actively growing cells was studied in ammonium phosphate medium supplemented with 20 mM KCl. When the A_{550} of the culture reached values of 0.3, $RbCl$ (50 mM) was added to the medium (zero time) and samples of cells were withdrawn at various times thereafter [21]. The kinetic constants for rubidium transport were determined in K^+ -starved cells. To this end, the different strains were grown in ammonium phosphate medium supplemented with 100 mM KCl, resuspended in K^+ -free medium, and grown for 5 additional hours. Then, the cells were centrifuged, washed, and resuspended in uptake buffer, consisting of 10 mM MES (brought to pH 5.8 with $Ca(OH)_2$), 0.1 mM $MgCl_2$, 2 mM $CaCl_2$, and 2% glucose (w/v). The required amount of $RbCl$ was added to the buffer at zero time and samples of cells were withdrawn at various times. Cells were treated as described for determining the K^+ content. The velocity values are expressed as nmol/min/mg of dry weight of cells. All experiments were repeated at least three times.

3. Results

3.1. *Ppz* phosphatase mutants show increased potassium requirement in the absence of *Trk* transporters

To evaluate the effect of the absence of *Ppz* phosphatases in the ability of cells lacking the *Trk* potassium transporters to grow under limiting potassium concentrations, the *PPZ1* and *PPZ2* genes were disrupted in a *trk1 trk2* background. These strains were spotted on ammonium phosphate plates supplemented with different concentrations of potassium chloride. As observed in Fig. 1, upper panel, wild-type and *ppz1 ppz2* cells were able to grow even at very low concentration of added potassium (0.2 mM), while the strains lacking the *trk1 trk2* transporters did not. *Trk*-deficient cells or *trk1 trk2 ppz2* mutants grew when the concentration of potassium was increased

to 5 mM. Interestingly, mutation of *PPZ1* in *Trk*-deficient cells did not allow growth at 5 mM KCl, but required a higher amount (50 mM) of added potassium. The quadruple mutant did show a similar phenotype to that of the *ppz1 trk1 trk2* strain. To quantify these effects more accurately, a similar experiment was performed in liquid medium containing different amounts of added potassium (Fig. 1, lower panel). As it can be observed, the absence of *Ppz1* function severely affects growth at limiting potassium as denoted by the increase in the doubling time. Additional mutation of *PPZ2* slightly aggravates the growth defect. These phenotypes are eliminated by increasing potassium in the medium.

The growth defect of *Trk Ppz* mutants could be attributed to a defect in the transport of this cation. To evaluate this possibility, we grew different mutants in ammonium phosphate medium containing 20 mM potassium, 50 mM rubidium chloride was added and the time-course of rubidium uptake (widely used as a K^+ analog in transport experiments) was

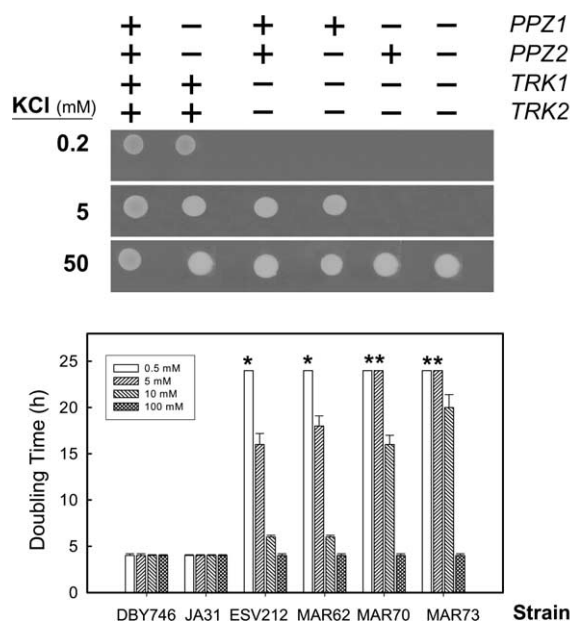


Fig. 1. Upper panel: DBY746 wild-type cells and the indicated isogenic derivatives were spotted in ammonium phosphate plates containing different concentrations of potassium chloride. Growth was monitored after 3 days. Lower panel: The indicated strains were inoculated in liquid ammonium phosphate medium containing different concentrations of potassium chloride and A_{550} determined periodically for at least 48 h. Asterisks denote strains that did not significantly proliferate after 48 h of culture. As both panels are aligned, the corresponding genotype for each strain appears at the top of the upper panel.

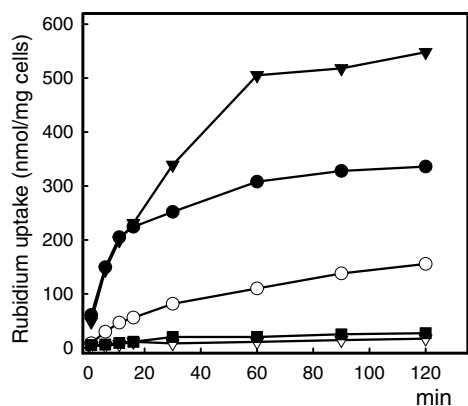


Fig. 2. Wild type strain DBY746 (●) as well as ESV212 (*trk1 trk2*, -○-), JA31 (*ppz1 ppz2*, -▼-), MAR70 (*ppz1 trk1 trk2*, -■-) and MAR73 (*ppz1 ppz2 trk1 trk2*, -▽-) isogenic derivatives were grown in ammonium phosphate medium containing 20 mM potassium chloride. At time zero, rubidium chloride was added to achieve a concentration of 50 mM, aliquots of the cells taken at the indicated times and the amount of internal rubidium were determined. A representative experiment is shown.

determined. As shown in Fig. 2, lack of Ppz phosphatases increased rubidium uptake while, as expected, Trk mutants showed a dramatic reduction in uptake. Remarkably, under the conditions tested the uptake of strain MAR70 (*ppz1 trk1 trk2*) and that of the quadruple mutant was virtually null. Similar results were obtained at different rubidium concentrations or when cells were grown in SD medium. Strain MAR72 (*ppz1 ppz2 trk2*) behaved similarly to the *ppz1 ppz2* mutant, while uptake of strain MAR71 (*ppz1 ppz2 trk1*) was similar to that of the quadruple mutant strain (not shown). Measurement of the intracellular potassium levels under limiting extracellular potassium (Table 2) revealed that strain, MAR70 (*ppz1 trk1 trk2*) and MAR73 (*ppz1 ppz2 trk1 trk2*) accumulated less potassium than the wild-type strain or even than the *trk1 trk2* mutant.

Table 2

Effects on the potassium content and on the kinetic parameters for rubidium uptake of Trk and Ppz mutations

Strain	Genotype	Potassium content (nmol/mg)	Rubidium uptake kinetic parameters	
			K_m (mM)	V_{max} (nmol/mg/min)
DBY746	<i>PPZ1 PPZ2 TRK1 TRK2</i>	405 ± 33	0.2 ± 0.03	28.5 ± 3.5
JA31	<i>ppz1 ppz2 TRK1 TRK2</i>	577 ± 26	0.2 ± 0.03	30.0 ± 3.2
ESV212	<i>PPZ1 PPZ2 trk1 trk2</i>	380 ± 27	14.0 ± 2.4	10.1 ± 2.3
MAR62	<i>PPZ1 ppz2 trk1 trk2</i>	391 ± 43	16.2 ± 2.1	9.2 ± 3.7
MAR70	<i>ppz1 PPZ2 trk1 trk2</i>	344 ± 38	66.9 ± 3.9	7.5 ± 1.4
MAR73	<i>ppz1 ppz2 trk1 trk2</i>	329 ± 45	70.0 ± 5.4	7.1 ± 2.0

For potassium content measurements, cells were grown in ammonium phosphate medium supplemented with 10 mM KCl. For rubidium uptake experiments, cells were potassium-starved and K_m and V_{max} determined as described under Experimental. Data are means ± SD from three independent experiments.

To characterize the nature of the effect of lack of Ppz phosphatases in a Trk-deficient background, uptake of rubidium was quantified under conditions that would allow determining the kinetic parameters of the transport. As shown in Table 2, deletion of *PPZ2* did not significantly alter the K_m or the V_{max} of a *trk1 trk2* strain. In contrast, deletion of *PPZ1* drastically increased the K_m of the transport (almost 5-fold) and somewhat reduced the V_{max} . These parameters were very similar in the quadruple mutant.

3.2. Ppz phosphatase mutants show altered sensitivity to toxic cations in the absence of Trk transporters

The results presented above reinforce the notion that Ppz phosphatases (essentially Ppz1) are negative effectors of the Trk potassium transporters. Remarkably, in the absence of Trk1 and Trk2, our data show that the absence of the phosphatases drastically worsens the transport of potassium. We considered that the very poor transport observed in the quadruple mutant should reflect in the tolerance of these cells to toxic cations. To test this hypothesis, different mutants were grown in the presence of hygromycin B, spermine or tetramethylammonium (TMA), as well as in diverse concentrations of sodium or lithium chloride. We observed (Fig. 3) that, as previously reported [2,11], *trk1 trk2* mutants are sensitive to low concentrations of hygromycin B, spermine or TMA (not shown). The absence of Ppz1 (but not that of *PPZ2*) further increased sensitivity to these compounds. In contrast, lack of Ppz1 (or deletion of both *PPZ* phosphatases genes) increased tolerance to both sodium and lithium cations of Trk-deficient cells.

Low affinity potassium transport has been documented in the absence of Trk transporters and some reports have linked this phenomenon to the presence of calcium cations in the medium. We then decided to analyze the possible relationship

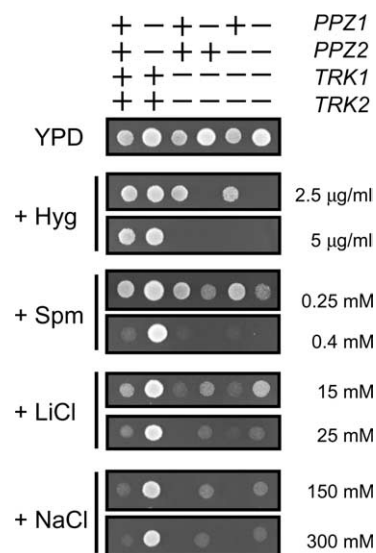


Fig. 3. Effect of mutation of Trk potassium transporters and Ppz phosphatases on tolerance to toxic cations. The wild-type strain DBY746 and its derivatives JA31 (*ppz1 ppz2*), ESV212 (*trk1 trk2*), MAR70 (*ppz1 trk1 trk2*), MAR62 (*ppz2 trk1 trk2*) and MAR73 (*ppz1 ppz2 trk1 trk2*) were spotted on YPD plates containing the indicated concentrations of different toxic cations. Hyg, hygromycin B; Spm, spermine. Growth was monitored after 3 days.

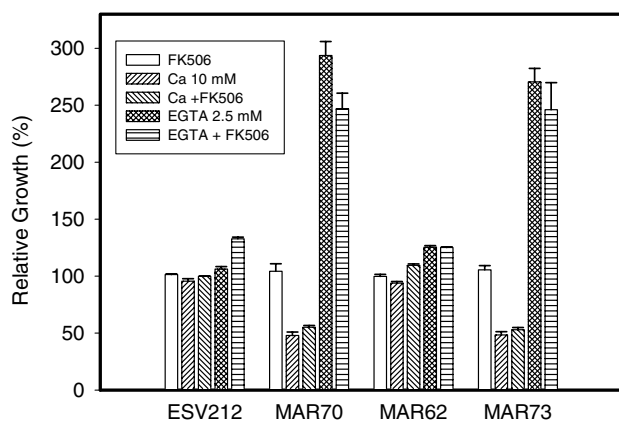


Fig. 4. Functional interactions between calcium and the Trk and Ppz mutations. Cells were inoculated (A_{620} 0.05) in ammonium phosphate medium supplemented with 10 mM KCl (plus the indicated compounds) and grown for 24 h. FK506 was used at 1.5 μ g/ml. Data represent the percentage of growth with respect to that of cells that received no treatment and expressed as means \pm SEM from six independent determinations.

between this divalent cation and the growth defect observed in the Trk mutants lacking Ppz phosphatases. Results in Fig. 4 show that, under the conditions tested, addition of calcium barely affects growth of ESV212 (*trk1 trk2*) or MAR62 (*ppz2 trk1 trk2*) cells. However, calcium worsened the growth defect of strains MAR70 (*ppz1 trk1 trk2*) and MAR73 (*ppz1 ppz2 trk1 trk2*), and this was not prevented by incubation of the cells with the calcineurin inhibitor FK506. These effects on growth were not observed when cells were cultured in the presence of higher potassium concentrations (100 mM). In contrast, addition of EGTA to the medium significantly improved growth of strains MAR70 and MAR73, but did not affect ESV212 or MAR62 cells. At high potassium (100 mM), none of the strains were affected by EGTA (not shown).

4. Discussion

Several lines of evidence appeared in the last two years have provided support to the notion that the Ppz protein phosphatases act as negative effectors on potassium uptake through regulation of the high-affinity potassium transporters Trk1/Trk2. For instance, potassium content in *ppz1 ppz2* cells is higher than in wild-type cells under different growth conditions (i.e., saline stress) and this increase is abolished in *trk1 trk2* double mutants [2,3,22]. In addition, strong overexpression of Ppz1 results in decreased rubidium uptake [2]. We have confirmed the high content of potassium of a *ppz1 ppz2* strain in the absence of salt stress and our data also indicate that the single *ppz1* mutant (but not a *ppz2* strain) already shows a large accumulation of potassium, suggesting that Ppz1 has the major role for Trk regulation. Furthermore, we find that *ppz1 ppz2* cells display a substantially increased rubidium uptake (Fig. 2), a phenotype that is also evident in a single *ppz1* mutant (not shown). All these results agree with the idea that the Ppz phosphatases negatively regulate Trk potassium transporters.

On the light of the results described above, it could be expected that the absence of the Ppz phosphatases in cells deficient in the Trk-dependent potassium transport would have no effect

on potassium requirements. However, we observe that these cells have increased potassium needs and this effect is almost as intense when only *PPZ1* is deleted in a *trk1 trk2* background (Fig. 1). The increased potassium requirement can be justified by the observation that *ppz1 ppz2 trk1 trk2* cells display a marginal rubidium uptake, much poorer than that of *trk1 trk2* mutants. These findings suggest that the Ppz phosphatases are positive regulators of the Trk-independent, low affinity potassium uptake. It has been described that decreased potassium transport caused by deletion of *TRK1* and *TRK2* results in hyperpolarization of the cell membrane [11] and in increased sensitivity to toxic cations, such as hygromycin B, spermine or TMA [2,11,23,24]. Accordingly, lack of Hal4 and Hal5 protein kinases, described as positive activators of Trk function, yields cells hypersensitive to this type of compounds [24], while deletion of the Ppz phosphatases results in increased tolerance to these cations [2]. On the basis of these precedents and our results, it could be expected that strain MAR73 would display higher sensitivity to hygromycin B or spermine than the double *trk1 trk2* mutant, a phenotype that is indeed observed (Fig. 3). We also show that the lack of Ppz1 or both Ppz1 and Ppz2 phosphatases in a Trk-deficient background does not result in increased sensitivity to sodium and lithium when compared with the *trk1 trk2* mutant, but instead in higher tolerance. This difference in behavior can be explained on the light of the recent finding that lack of Ppz phosphatases results in increased expression of the *ENAI* gene in a Trk-independent, calcineurin-dependent fashion and that a *ppz1 trk1 trk2* mutant, upon saline stress, contains less internal sodium than a *trk1 trk2* strain [22]. Because *ENAI* encodes a P-type Na^+ -ATPase acting as a major sodium and lithium efflux system, transcriptional activation of this mechanism by the absence of Ppz phosphatases could explain the improvement in tolerance for these specific cations.

Our results demonstrate that Ppz phosphatases, and specifically Ppz1, influence low-affinity, Trk-independent potassium transport. Very little is known about the nature of this transport, which has not been elucidated at the molecular level. Patch-clamp analysis allowed identifying a major low-affinity potassium uptake process, termed NSC1 [12–14], which is inhibited by divalent cations, such as calcium. Interestingly, we observe that calcium cations worsen growth of strain MAR73 at low potassium concentrations (10 mM), while addition of the chelating agent EGTA drastically improves growth, and that these effects disappear at high (100 mM) potassium levels. This reinforces the notion that calcium negatively affects low affinity, Trk-independent potassium uptake. We recently reported that lack of Ppz1 phosphatase results in sensitivity to calcium ions due to activation of the calcineurin pathway [22]. However, it must be noted that the growth defect described here is observed at rather low concentrations of external calcium, which do not affect growth of Ppz mutants ([22] and data not shown), and it is not abolished by chemical inhibition of calcineurin with FK506 (Fig. 4). Therefore, the modulation of the low affinity potassium uptake by calcium seems to be an event independent of the activation of the calcineurin pathway. In addition, our data suggest that the effect of calcium cations on the low affinity potassium transport cannot be mediated by the Ppz phosphatases. It can be proposed that either both the effect of calcium and the phosphatases are independent events or, alternatively, that the phosphatases might influence calcium homeostasis and, as a consequence, affect low affinity potassium transport.

Our findings suggest a dual role for the Ppz phosphatases in potassium transport: inhibition of Ppz phosphatase activity would result in activation of the high-affinity Trk transporters and inhibition of the low affinity potassium uptake, while activation of the phosphatases would result in the opposite situation. This regulatory switch might include the inhibitory Ppz subunits Hal3 [22,25] and Vhs3 [26], which so far appear to govern all Ppz functions. Interestingly, it has been reported that deletion of *SKY1*, encoding a SR protein kinase, is able to improve growth of *trk1 trk2* cells on low potassium [27], a phenotype just opposed to the one described here for the Ppz phosphatases. This raises the possibility that the kinase and the phosphatases may have contrary functions, perhaps by controlling the phosphorylation state of a target(s) relevant for potassium uptake. In any case, the identification of the Ppz phosphatases as positive regulators of the Trk-independent, low affinity potassium uptake in yeast adds new players to this cellular function and may provide a way to elucidate the elusive molecular nature of this phenomenon. In addition, the ability to generate strains, such as MAR70 and MAR73, displaying a near-zero potassium influx offers a useful tool to analyze heterologous expression of potassium channels in yeast.

Acknowledgements: We thank Carlos Casanova and Elizabeth Moreno for their contribution in some experiments. The excellent technical assistance of Anna Vilalta and María Jesús Álvarez is acknowledged. We are grateful to F. Pérez-Bermejo and A. Friedrich (Fujisawa Co.) for kindly supplying the calcineurin inhibitor FK506. This work was supported by grants 2001SGR00193 (Generalitat de Catalunya) and BMC2002-04011-C05-04 to J.A., and BMC2002-04011-C05-01 to J.R. (Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain and Fondo Europeo de Desarrollo Regional). A. Ruiz was recipient of a fellowship from the Generalitat de Catalunya, Spain.

References

- Arino, J. (2002) Novel protein phosphatases in yeast. *Eur. J. Biochem.* 269, 1072–1077.
- Yenush, L., Mulet, J.M., Arino, J. and Serrano, R. (2002) The Ppz protein phosphatases are key regulators of K⁺ and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression. *EMBO J.* 21, 920–929.
- Merchan, S., Bernal, D., Serrano, R. and Yenush, L. (2004) Response of the *Saccharomyces cerevisiae* Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway to increases in internal turgor pressure caused by loss of Ppz protein phosphatases. *Eukaryot. Cell* 3, 100–107.
- Ramos, J., Contreras, P. and Rodriguez-Navarro, A. (1985) A potassium transport mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. 143, 88–93.
- Ko, C.H. and Gaber, R.F. (1991) TRK1 and TRK2 encode structurally related K⁺ transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 11, 4266–4273.
- Gaber, R.F., Styles, C.A. and Fink, G.R. (1988) TRK1 encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 8, 2848–2859.
- Gomez, M.J., Luyten, K., Onuhua, C.N. and Ramos, J. (1994) Sodium tolerance depends on the capacity to transport potassium in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiol. (Praha)* 39, 519–520.
- Mendoza, I., Rubio, F., Rodriguez-Navarro, A. and Pardo, J.M. (1994) The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 269, 8792–8796.
- Haro, R., Bañuelos, M.A., Quintero, F.J., Rubio, F. and Rodriguez-Navarro, A. (1993) Genetic basis of sodium exclusion and sodium tolerance in yeast. A model for plants. *Physiol. Plantarum* 89, 868–874.
- Bertl, A., Ramos, J., Ludwig, J., Lichtenberg-Frate, H., Reid, J., Bihler, H., Calero, F., Martinez, P. and Ljungdahl, P.O. (2003) Characterization of potassium transport in wild-type and isogenic yeast strains carrying all combinations of *trk1*, *trk2* and *tok1* null mutations. *Mol. Microbiol.* 47, 767–780.
- Madrid, R., Gomez, M.J., Ramos, J. and Rodriguez-Navarro, A. (1998) Ectopic potassium uptake in *trk1 trk2* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membrane potential. *J. Biol. Chem.* 273, 14838–14844.
- Roberts, S.K., Fischer, M., Dixon, G.K. and Sanders, D. (1999) Divalent cation block of inward currents and low-affinity K⁺ uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 181, 291–297.
- Bihler, H., Slayman, C.L. and Bertl, A. (1998) NSC1: a novel high-current inward rectifier for cations in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 432, 59–64.
- Bihler, H., Slayman, C.L. and Bertl, A. (2002) Low-affinity potassium uptake by *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by NSC1, a calcium-blocked non-specific cation channel. *Biochim. Biophys. Acta* 1558, 109–118.
- Wright, M.B., Ramos, J., Gomez, M.J., Moulder, K., Scherrer, M., Munson, G. and Gaber, R.F. (1997) Potassium transport by amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 272, 13647–13652.
- Asensio, J., Ruiz-Argueso, T. and Rodriguez-Navarro, A. (1976) Sensitivity of yeasts to lithium. *Antonie Van Leeuwenhoek* 42, 1–8.
- Ramos, J. and Rodriguez-Navarro, A. (1986) Regulation and interconversion of the potassium transport systems of *Saccharomyces cerevisiae* as revealed by rubidium transport. *Eur. J. Biochem.* 154, 307–311.
- Posas, F., Casamayor, A., Morral, N. and Arino, J. (1992) Molecular cloning and analysis of a yeast protein phosphatase with an unusual amino-terminal region. *J. Biol. Chem.* 267, 11734–11740.
- Clotet, J., Posas, F., de Nadal, E. and Arino, J. (1996) The NH₂-terminal extension of protein phosphatase PPZ1 has an essential functional role. *J. Biol. Chem.* 271, 26349–26355.
- Gomez, M.J., Luyten, K. and Ramos, J. (1996) The capacity to transport potassium influences sodium tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 135, 157–160.
- Rodriguez-Navarro, A. and Ramos, J. (1984) Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 159, 940–945.
- Ruiz, A., Yenush, L. and Arino, J. (2003) Regulation of ENA1 Na⁺-ATPase gene expression by the Ppz1 protein phosphatase is mediated by the calcineurin pathway. *Eukaryot. Cell* 2, 937–948.
- Forment, J., Mulet, J.M., Vicente, O. and Serrano, R. (2002) The yeast SR protein kinase Sky1p modulates salt tolerance, membrane potential and the Trk1,2 potassium transporter. *Biochim. Biophys. Acta* 1565, 36–40.
- Mulet, J.M., Leube, M.P., Kron, S.J., Rios, G., Fink, G.R. and Serrano, R. (1999) A novel mechanism of ion homeostasis and salt tolerance in yeast: the Hal4 and Hal5 protein kinases modulate the Trk1-Trk2 potassium transporter. *Mol. Cell. Biol.* 19, 3328–3337.
- de Nadal, E., Clotet, J., Posas, F., Serrano, R., Gomez, N. and Arino, J. (1998) The yeast halotolerance determinant Hal3p is an inhibitory subunit of the Ppz1p Ser/Thr protein phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7357–7362.
- Ruiz, A., Munoz, I., Serrano, R., Gonzalez, A., Simon, E. and Arino, J. (2004) Functional characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* VHS3 gene: a regulatory subunit of the Ppz1 protein phosphatase with novel, phosphatase-unrelated functions. *J. Biol. Chem.* 279, 34421–34430.
- Erez, O. and Kahana, C. (2002) Deletions of SKY1 or PTK2 in the *Saccharomyces cerevisiae* *trk1Delta trk2Delta* mutant cells exert dual effect on ion homeostasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295, 1142–1149.
- Posas, F., Camps, M. and Arino, J. (1995) The PPZ protein phosphatases are important determinants of salt tolerance in yeast cells. *J. Biol. Chem.* 270, 13036–13041.

Functional Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* *VHS3* Gene

A REGULATORY SUBUNIT OF THE Ppz1 PROTEIN PHOSPHATASE WITH NOVEL, PHOSPHATASE-UNRELATED FUNCTIONS*

Received for publication, January 20, 2004, and in revised form, June 7, 2004
Published, JBC Papers in Press, June 10, 2004, DOI 10.1074/jbc.M400572200

Amparo Ruiz‡, Ivan Muñoz§, Raquel Serrano§, Asier González§, Ernesto Simón¶, and Joaquín Ariño||

From the Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Barcelona, Spain

The yeast gene *VHS3* (YOR054c) has been recently identified as a multicopy suppressor of the G₁/S cell cycle blockade of a conditional *sit4* and *hal3* mutant. *Vhs3* is structurally related to *Hal3*, a negative regulatory subunit of the Ser/Thr protein phosphatase Ppz1 important for cell integrity, salt tolerance, and cell cycle control. Phenotypic analyses using *vhs3* mutants and overexpressing strains clearly show that *Vhs3* has functions reminiscent to those of *Hal3* and contrary to those of Ppz1. Mutation of *Vhs3* His⁴⁵⁹, equivalent to the supposedly functionally relevant His⁹⁰ in the plant homolog *AtHal3a*, did not affect *Vhs3* functions mentioned above. Similarly to *Hal3*, *Vhs3* binds *in vivo* to the C-terminal catalytic moiety of Ppz1 and inhibits *in vitro* its phosphatase activity. Therefore, our results indicate that *Vhs3* plays a role as an inhibitory subunit of Ppz1. We have found that the *vhs3* and *hal3* mutations are synthetically lethal. Remarkably, lethality is not suppressed by deletion of *PPZ1*, *PPZ2*, or both phosphatase genes, indicating that it is not because of an excess of Ppz phosphatase activity. Furthermore, a *Vhs3* version carrying the H459A mutation did not rescue the synthetically lethal phenotype. A conditional *vhs3 tetO:HAL3* double mutant displays, in the presence of doxycycline, a flocculation phenotype that is dependent on the presence of Flo8 and Flo11. These results indicate that, besides its role as Ppz1 inhibitory subunit, *Vhs3* (and probably *Hal3*) might have important Ppz-independent functions.

The *Saccharomyces cerevisiae* Ppz Ser/Thr protein phosphatases, encoded by genes *PPZ1* and *PPZ2* (1–3), are characterized by a C-terminal half closely related to type 1 phosphata-

ses (see Ref. 4 for a recent review). These phosphatases are involved in several cell processes. They interact functionally with the protein kinase C-activated MAP¹ kinase pathway and thus play a role in cell wall integrity (2, 5), regulate salt tolerance (6), and control cell cycle at the G₁/S transition (7, 8). In all these cases, Ppz1 has a more prominent role, as denoted by the observation that cells lacking Ppz2 display a wild-type phenotype, unless *PPZ1* has been also deleted. Recent evidence indicates that most of the phenotypes associated with the absence or the overexpression of the Ppz phosphatases are a consequence of the inhibitory effect that these phosphatases exert on the function of the Trk1/Trk2 potassium transporters (9). In addition, it has been postulated a negative role for Ppz1 on the calcineurin pathway, which would explain the increased expression of the *ENA1* Na⁺-ATPase in *ppz1* cells and, at least in part, the salt tolerant phenotype of the mutant strain (10).

Ppz1 is negatively regulated by *Hal3/Sis2*, which binds to the C-terminal catalytic moiety of the phosphatase and inhibits its activity (11), although the mechanism of inhibition is still unknown. *HAL3/SIS2* was identified independently by two laboratories: as a gene able to confer saline tolerance when overexpressed (12), and as a multicopy suppressor of the growth defect of a *sit4* mutant (13). *Sit4* is a Ser/Thr protein phosphatase (14) required for proper passage from G₁ to S phase (15, 16). The current evidence suggests that *Hal3* regulates most (if not all) the functions of Ppz1. Therefore, overexpression of *HAL3* in an *slt2/mpk1* MAP kinase mutant aggravates the lytic defect of this strain (11), thus mimicking the effect of deletion of *PPZ1*. Similarly, overexpression of *HAL3* confers salt tolerance (and increases *ENA1* expression), and mutation of the gene results in salt sensitivity, in a Ppz-dependent fashion (10, 11). Finally, it is known that the *sit4* and *hal3* mutations are synthetically lethal because of a G₁/S blockade (13, 17), and this phenotype is suppressed by disruption of *PPZ1* (8).

In a recent work (18) we reported the use of a conditional *sit4Δ tetO:HAL3* strain to screen for multicopy suppressors of the G₁ blockade suffered by this strain under non permissive conditions (presence of doxycycline). Among the several ORFs identified, YOR054c (renamed as *VHS3*) has our immediate attention because it encoded an acidic, 674 residue protein displaying a substantial sequence similarity (49% identity) with *Hal3*. In this work we characterize the biological role of *Vhs3* and demonstrate that in addition to acting as a negative

* This work was supported by Grants BMC2002-04011-C05-04 and GEN2001-4707-C08-03 (Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain and Fondo Europeo de Desarrollo Regional), and 2001SGR00193 from the Generalitat de Catalunya (to J. A.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

‡ Recipient of a fellowship from the DURSI (Generalitat de Catalunya).

§ Recipients of fellowships from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, Spain.

¶ Recipient of a fellowship from the Universitat Autònoma de Barcelona.

|| To whom correspondence should be addressed: Dept. Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Veterinària, Ed. V, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Barcelona, Spain. Tel.: 34-93-5812182; Fax: 34-93-5812006; E-mail: Joaquin.Arino@uab.es.

¹ The abbreviations used are: MAP, mitogen-activated protein; GST, glutathione S-transferase; 5-FOA, 5-fluoro-orotic acid; ORF, open reading frame.

TABLE I
Yeast strains used in this work

Name	Relevant genotype	Source/Ref.
JA100	MAT α <i>ura3-52 leu2-3,112 his4 trp1-1 can-1r</i>	11
JA110	JA100 <i>sit4::TRP1</i>	8
JC002	JA100 <i>sit4::TRP1</i> _{prom} <i>tet0::HAL3</i>	17
JC133	JA100 <i>sit4::TRP1 vhs3::URA3</i>	This work
JC010	JA100 <i>mpk1::LEU2</i>	60
MAR20	JA100 <i>mpk1::LEU2 hal3::LEU2</i>	This work
MAR9	JA100 <i>mpk1::LEU2 vhs3::URA3</i>	This work
JA104	JA100 <i>hal3::LEU2</i>	11
MAR88	JA100 <i>hal3::kanMX</i>	This work
MAR79	JA100 <i>vhs3::URA3</i>	This work
MAR107	JA100 <i>hal3::kanMX vhs3::nat1</i> [YEplac195-HAL3]	This work
MAR109	JA100 <i>hal3::kanMX vhs3::nat1 ppz1::LEU2</i> [YEplac195-HAL3]	This work
MAR110	JA100 <i>hal3::kanMX vhs3::nat1 ppz1::LEU2 ppz2::TRP1</i> [YEplac195-HAL3]	This work
EDN75	JA100 <i>ppz1::KANMx</i>	24
JC001	JA100 _{prom} <i>tet0::HAL3</i>	This work
MAR24	JA100 _{prom} <i>tet0::HAL3 vhs3::URA3</i>	This work
MAR80	JA100 _{prom} <i>tet0::HAL3 flo11::TRP1</i>	This work
MAR81	JA100 _{prom} <i>tet0::HAL3 vhs3::URA3 flo11::TRP1</i>	This work
MAR82	JA100 _{prom} <i>tet0::HAL3 flo8::TRP1</i>	This work
MAR83	JA100 _{prom} <i>tet0::HAL3 vhs3::URA3 flo8::TRP1</i>	This work
MAR84	JA100 _{prom} <i>tet0::HAL3 ste12::TRP1</i>	This work
MAR85	JA100 _{prom} <i>tet0::HAL3 vhs3::URA3 ste12::TRP1</i>	This work
MAR86	JA100 _{prom} <i>tet0::HAL3 tec1::TRP1</i>	This work
MAR87	JA100 _{prom} <i>tet0::HAL3 vhs3::URA3 tec1::TRP1</i>	This work
AGS1	JA100 _{prom} <i>tet0::HAL3 mss11::TRP1</i>	This work
AGS2	JA100 _{prom} <i>tet0::HAL3 vhs3::URA3 mss11::TRP1</i>	This work
1788	MAT α <i>ura3-52 leu2-3,112 his4 trp1-1 can-1r</i>	D. Levin
MAR6	1788 <i>hal3::LEU2/HAL3 vhs3::URA3/VHS3</i>	This work
AGS4	1788 <i>hal3::LEU2/HAL3 vhs3::kanMX/VHS3</i>	This work
MAR26	1788 <i>hal3::LEU2/HAL3 vhs3::URA3/VHS3 ppz1::KAN/PPZ1</i>	This work
MAR23	1788 <i>hal3::LEU2/HAL3 vhs3::URA3/VHS3 ppz2::TRP1/PPZ2</i>	This work
MAR27	1788 <i>hal3::LEU2/HAL3 vhs3::URA3/VHS3 ppz1::KAN/PPZ1 ppz2::TRP1/PPZ2</i>	This work
MAR112	1788 <i>hal3::LEU2/HAL3 vhs3::nat1/VHS3 ppz1::KAN/PPZ1 ppz2::TRP1/PPZ2</i>	This work
MAR113	MAT α <i>hal3::LEU2 vhs3::nat1 ppz1::KAN/ ppz2::TRP1</i> [YEplac195-HAL3]	This work
MAR115	MAT α <i>hal3::LEU2/HAL3 vhs3::kanMX/VHS3</i> [YEplac195-VHS3]	This work
MCY3000	FY250 <i>glc7-T152K</i>	32
DBY746	MAT α <i>ura3-52 leu2-3,112 his3-Δ1 trp1-Δ239</i>	D. Botstein
EDN4	DBY746 <i>hal3::LEU2</i>	61
EDN2	DBY746 <i>ppz1::TRP1</i>	10
EDN85	DBY746 <i>ppz1::TRP1 ppz2::KAN</i>	10
MAR11	DBY746 <i>vhs3::URA3</i>	This work

regulatory subunit of the Ppz1 protein phosphatase, this protein may also have other important functions.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Strains and Growth Conditions—Yeast cells were grown at 28 °C in YPD medium (10 g/liter yeast extract, 20 g/liter peptone, and 20 g/liter dextrose) or, when indicated, in synthetic minimal or complete minimal medium (19). The relevant genotype of the strains described in this work can be found in Table I.

Gene Disruption and Plasmid Construction—Disruption of the *VHS3* gene was done by cloning a 3.6-kbp KpnI/EcoRI genomic fragment, encompassing the entire gene, into the same sites of plasmid pUC19, to yield pUC19-VHS3 and replacing a 1.05-kbp NheI/SnaBI fragment with a NheI/SmaI 1.1-kbp fragment from plasmid YDp-U (20), containing the *URA3* marker. The disruption cassette is recovered by digestion with KpnI/EcoRI and used to transform yeast cells. Disruption of *VHS3* with the *nat1* marker was accomplished as follows. The 1.29-kbp PvuII/SpeI fragment from plasmid pAG25 (21), containing the *nat1* gene from *Streptomyces noursei* was used to replace the 1.05-kbp SnaBI/NheI fragment of plasmid pUC19-VHS3. The deletion cassette was released by digestion with AfeI/PvuII and used to transform the appropriate strains. Positive clones were selected in the presence of nourseothricin (21). Disruption of *VHS3* with the *kanMX* marker (from nucleotides -40 to 2050, relative to the initiating Met codon) was accomplished by the short flanking gene replacement technique (22). The *HAL3* gene was disrupted with the *LEU2* marker as previously described (12). To construct strain MAR88 (*hal3::kanMX*), genomic DNA from the appropriate deletion mutant in the BY4741 background (23) was used to amplify the *HAL3* genomic locus using oligonucleotides spanning from positions -108 to +2150, and the amplification fragment used to transform the wild-type strain JA100. Deletion of the *PPZ1* gene with the *kanMX* marker has been reported previously (24). Deletion of *PPZ1* with the *LEU2* marker was done by replacing a 1.6-kbp XhoI/StuI

fragment from plasmid YEp181-Ppz1 (7) with the SmaI/SalI 1.7 kbp *LEU2* marker from plasmid YDp-L (20). The PstI/NdeI 2.5 kbp cassette is used to transform cells. Deletion of *PPZ2* with a *TRP1* marker was performed as described in Ref. 7. The use of the cassette *tetO::HAL3* was described previously in Ref. 17.

Deletion of the *FLO11/MUC1* gene was performed as follows. A 5.2-kbp region of the *FLO11* genomic locus spanning the entire ORF, plus 484 nucleotides upstream and 761 nucleotides downstream, was amplified by PCR and cloned into the XbaI/EcoRV sites of pBluescript to give plasmid pBS-*FLO11*. Then, a 3.6-kbp HincII/PstI fragment of the ORF was replaced by the 0.85-kbp *TRP1* marker, recovered from plasmid YDp-W (20) by digestion with SmaI/PstI, to yield plasmid pBS-*FLO11::TRP1*. This plasmid was digested with ApaI/SacI, and the resulting 2.5-kbp fragment was used to transform cells.

To construct the *flo8::TRP1* cassette, a 3.99-kbp fragment spanning from -998 to +2987 (referred to the ATG of the *FLO8* ORF) was amplified by PCR, digested with XbaI (an artificially added site) and EcoRV, and then cloned into the XbaI and HincII sites of pBluescript to give plasmid pBS-*FLO8*. An EcoRI/SalI 1.8-kbp fragment of the *FLO8* gene was replaced by the marker *TRP1* (0.85 kbp), recovered from plasmid YDp-W. The resulting construct, pBS-*flo8::TRP1*, was digested with NdeI, and cells were transformed with the 2.65-kbp fragment released.

To disrupt the *STE12* gene, a 3.7-kbp fragment (from -970 to +2700 relative to the initiating codon) was amplified by PCR including added PstI and EcoRI sites. After digestion with the indicated enzymes, it was inserted into pUC19 generating pUC19-*STE12*. Then, a HincII/BamHI 1.6-kbp fragment was replaced by the marker *TRP1* (obtained by digestion of YDp-W with SmaI/BamHI). This plasmid, called pUC19-*ste12::TRP1*, was digested with SacI, and the 1.75-kbp *ste12::TRP1* cassette used to transform the appropriate strains.

Disruption of the *TEC1* gene was made as follows. First, a 3.0-kbp fragment from positions -1050 to +1950 (referred to the ATG codon)

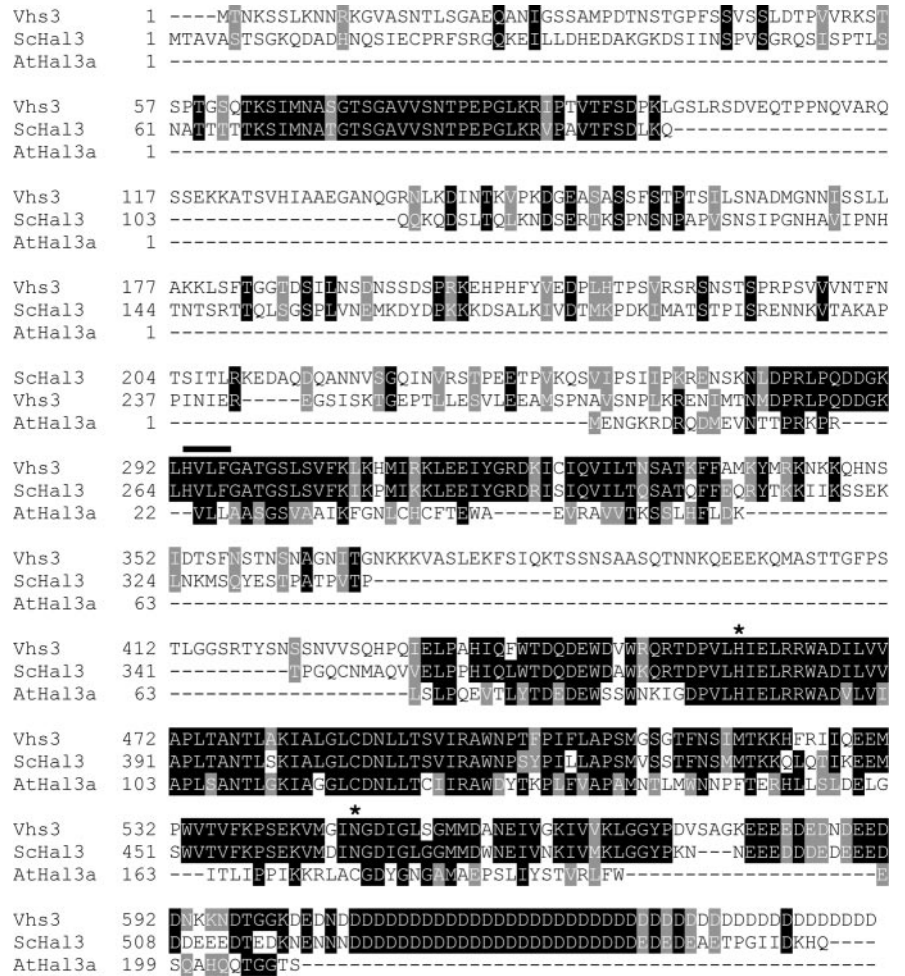


FIG. 1. Pairwise comparison using the ClustalW program of the Vhs3, *S. cerevisiae* Hal3 (ScHal3), and *A. thaliana* Hal3a (AtHal3a) proteins. Black boxes indicate identical amino acids, and gray boxes denote conserved changes. The asterisks indicate the conserved His residue (His⁴⁵⁹ in Vhs3) and the non-conserved Cys residue (Cys¹⁷⁵, present only in AtHal3a). The line shows the HVXF motif.

was amplified by PCR using a 3'-primer with a KpnI artificial site. The fragment obtained by digestion with PstI and KpnI was cloned into pUC19, yielding plasmid pUC19-*TEC1*. Then, the 0.92-kbp XbaI/StuI fragment was replaced by the SmaI/NheI fragment of YDp-W, which contains the *TRP1* marker and the resulting construct (pUC19-*tec1::TRP1*) digested with SphI and XhoI to produce the *tec1::TRP1* cassette (2.95 kbp) employed for yeast transformation.

The *MSS11* gene was disrupted with the *TRP1* marker as follows. A fragment from -950 to +2742 was amplified by PCR with an added HindIII restriction site, digested with BamHI/HindIII and cloned into the same sites of plasmid pUC19 to give pUC19-*MSS11*. The construct was cleaved by XhoI/HincII and the 0.89-kbp DNA fragment obtained was replaced with a 0.85-kbp *TRP1* marker, previously released from plasmid YDp-W by digestion with SalI/SmaI. The final construct, pUC19-*mss11::TRP1*, was digested with SnaBI/KpnI and the 2.47 kbp fragment released was used for yeast transformation. All gene deletions generated in this work were confirmed by PCR.

For high copy expression of *HAL3*, the gene was recovered from plasmid YEp351-*HAL3* (12) by digestion with EcoRI/HindIII and cloned into these sites of YEplac112 (*TRP1* marker) and YEplac181 (*LEU2* marker) vectors (25). High copy expression of *VHS3* was achieved by cloning a 3566-bp insert, starting from a KpnI site at position -776 from the ATG codon of *VHS3* and ending at the EcoRI site located 765 bp after the stop codon, at these sites of plasmids YEp351 (*URA3* marker), YEplac181, or YEplac112 (*TRP1* marker). An identical cloning strategy using plasmid YCplac22 (*TRP1* marker) allowed low copy, centromeric expression.

The construction of a version of *VHS3* carrying a C-terminal 3×FLAG tag was as follows. An artificial SacI site right in front of the stop codon (which introduces the residues EL) was created by sequential PCR using external oligonucleotides that encompassed the ClaI and AfeI sites. The amplification fragment was digested with these enzymes and used to replace the 1.13-kbp ClaI/AfeI fragment of YEp195-VHS3. A 3×FLAG tag, with added SacI sites, was amplified by PCR from plasmid pCM220 (a gift of M. Aldea, Universitat de Lleida, Spain) and

then cloned into the previous construct in the appropriate orientation to yield YEp195-VHS3(3×FLAG).

Mutation of Vhs3 His⁴⁵⁹ to Ala was made by sequential PCR. In a first step, the 1.13-kbp ClaI/AfeI fragment of *VHS3* gene was amplified in two separate reactions by using primers with the modification introduced to change His⁴⁵⁹ to Ala (CA to GC). In the second step the entire ClaI/AfeI fragment was amplified, digested, and the product cloned into the ClaI/AfeI sites of YEp195-VHS3, to yield YEp195-VHS3(H459A). The mutated version of the gene was also cloned in the centromeric plasmid YCplac22 as a KpnI/EcoRI fragment.

To express in bacteria GST-Hal3 and GST-Vhs3 fusion proteins the *HAL3* and *VHS3* genes were amplified by PCR, with added EcoRI/XhoI sites, and cloned into plasmid pGEX6P-1 (Amersham Biosciences). The catalytic domain of Ppz1 (Δ1-344) amplified by PCR as described previously (7) was cloned into the SalI and HindIII sites of the pSP72 vector (Promega) to yield plasmid pSC2. The insert was recovered by digestion with BamHI and PvuII and cloned into the BamHI and SmaI sites of plasmid pGEX6P-1. The constructs for bacterial expression of GST-Ypi1 and GST-Glc7 have been previously described (26).

A *FLO11*-lacZ reporter plasmid (pFLO11-LacZ) was constructed by PCR amplification of the 3-kbp region 5' of the ATG using primers with added BglII sites, following by cloning into the BamHI site of YEp367R (27). All fragments generated by PCR reactions (with the only exception of the *FLO11* promoter) were fully sequenced to confirm the absence of unwanted changes.

β-Galactosidase Assays—To evaluate the influence of high levels of *HAL3* or *VHS3* on *ENA1* expression, the different strains tested were transformed with plasmids YEpHAL3 or YEpVHS3, and then with plasmid pKC201, which contains the entire *ENA1* promoter fused to the β-galactosidase gene (28). β-Galactosidase assays were carried out as described in Ref. 10. Analysis of the *FLO11* promoter activity was carried out by introducing into the appropriate strains the *FLO11*-lacZ reporter described above. Cultures were grown overnight in selective medium, diluted up to an OD₆₀₀ of 0.005 and then grown for 15 h at 28 °C in YPD medium, in the presence or the absence of 100 μg/ml

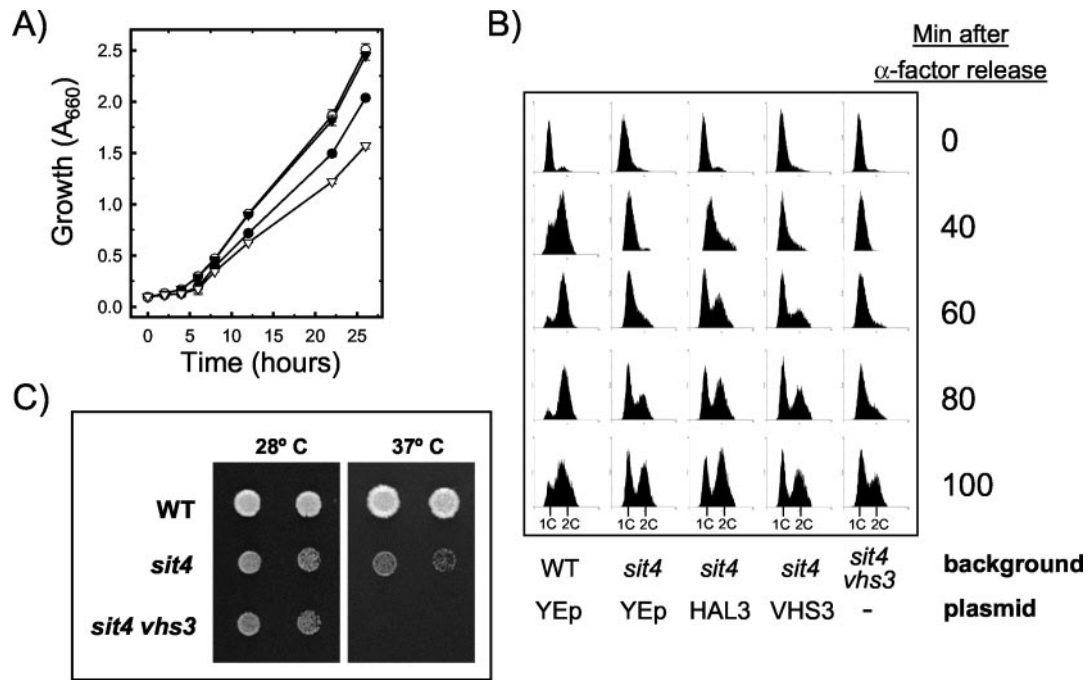


FIG. 2. Effect of high copy expression of *VHS3* on *sit4* cells. *A*, JA110 cells (*sit4*) bearing an empty plasmid (●), as well as carrying YEp195-*HAL3* (○) or YEp195-*VHS3* (▼) plasmids, and strain JC133 (*sit4 vhs3*, ▽) were inoculated on synthetic minimal medium lacking uracil at a OD_{660} of 0.01, and growth was monitored for the indicated times. *B*, above-mentioned strains plus the wild-type (*WT*) strain JA100 bearing the indicated plasmids were arrested in G_1 by incubation with α -factor. The pheromone was washed out and entry into cell cycle monitored by the DNA content. *C*, indicated strains (two dilutions, 1:5) were grown at 28 or 37 °C on synthetic minimal medium. Growth was monitored after 3 days.

doxycycline (control cells received the same volume of the vehicle, a 50% ethanol solution). Then cells were collected and processed for β -galactosidase assay as above.

In Vitro and in Vivo Binding Assays—*In vitro* binding assays were performed as follows. GST-Ppz1(Δ 1–344) was expressed in bacteria and bound to glutathione-agarose beads essentially as described previously (26). Cell extracts from strain EDN75 (*ppz1* Δ) were prepared as described (11) and 1 mg of total protein incubated with 50 μ l of the affinity beads for 1 h at 4 °C. Washing and subsequent procedures were as in Ref. 11 except that after extensive washing the beads were resuspended in 100 μ l of 2 \times SDS sample buffer and boiled. After a brief centrifugation, the sample (10 μ l) was electrophoresed, transferred to membranes, and probed with anti-FLAG-antibodies (Sigma).

Expression in yeast of the GST fusion versions of the full-length and the catalytic domain of Ppz1 from the native *PPZ1* promoter was accomplished by transformation of strain EDN75 (*ppz1::kanMX*) with plasmids pYGST-C1Z1 and pYGST-C2Z1, respectively (11). Identification of *in vivo* binding of Vhs3 with the different Ppz1 versions was carried out essentially as previously described for Hal3 (11) except that cells were transformed in this case with plasmid YEp195-*VHS3*(3 \times FLAG) and bound proteins revealed with anti-FLAG antibodies.

In Vitro Phosphatase Assays—The effect of the diverse inhibitors on Ppz1 and Glc7 phosphatase activities were evaluated using bacterially expressed proteins. Conditions for expression and purification of the Ypi1, Ppz1(Δ 1–344), and Glc7 fusion proteins have been previously reported (26). For expression of the phosphatases the growth medium did include 0.5 mM $MnCl_2$. GST-Hal3 and GST-Vhs3 were expressed in bacteria by induction with 1 mM isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside for 3 h at 30 °C and purified essentially as described previously (26).

Ppz1 and Glc7 phosphatase activities were measured using *p*-nitrophenyl phosphate as in Ref. 26 with the following modifications: the concentration of substrate was 10 mM, 1 μ g of Ppz1 and 2 μ g of Glc7 were used, and the assays were carried out for 20 min. When inhibitors were included, they were incubated with the phosphatase at 30 °C for 5 min. The reactions were carried out in a final volume of 300 μ l.

The protein phosphatase activity of Ppz1 was assayed as using the HA-tagged N-terminal domain of Reg1 as endogenous substrate. Crude yeast extracts were prepared as described (11), and the assay was performed essentially as described in Ref. 26, except that 2 μ g of GST-Ppz1(Δ 1–344) was used in the assay.

Other Techniques—Growth on plates (drop tests) or in liquid cultures was assessed as in Refs. 6 and 29, respectively. Yeast cells were arrested in G_1 with α -factor, and DNA content monitored by flow cytom-

etry as in Ref. 8. Budding index was determined by microscopic counting of at least 400 cells per point. Sporulation and tetrad dissection were done essentially as described in Ref. 19. Random spore analysis was performed as in Ref. 30. For 5-fluoro-orotic acid (5-FOA) selection, cells were grown overnight on YPD and around 1000 colony forming units plated in complete minimal medium (containing 50 μ g/ml uracil) with 1 mg/ml 5-FOA.

Flocculation assays were performed as described by Bony *et al.* (31) with several modifications. Basically, yeast cells were inoculated in minimal medium at OD_{660} 0.01 with or without 50 μ g/ml of doxycycline and were incubated for 2 days. Then, cells were deflocculated and the OD_{660} of the suspension measured. After the addition of calcium chloride (that induces flocculation), tubes were shaken at 28 °C (230 strokes/min) for 5 min and left standing for 4 min. A sample of the supernatant was then taken, made 0.21 M EDTA, and the OD_{660} measured. The flocculation index is expressed as the ratio of the OD_{660} between the fully deflocculated cell suspension and the EDTA-treated supernatant.

RESULTS

Functional Analysis of *VHS3* Reveals Close Similarity with *HAL3*—*VHS3* was identified in our laboratory as a gene that, in high copy number, was able to rescue the G_1/S cell cycle blockade of a conditional *sit4 hal3* mutant. As the primary sequence of Vhs3 revealed a significant similarity with Hal3 (Fig. 1), we considered the possibility that Vhs3 could be functionally mimicking Hal3. To test this possibility, we transformed a *sit4* strain with a high copy plasmid bearing the *VHS3* gene. Overexpression of *VHS3* improved the slow growth phenotype of a *sit4* Δ strain similar to the *HAL3* gene (Fig. 2). This effect was also detected when cells were synchronized with α -factor, and recovery from the G_1 arrest was followed by monitoring DNA content (Fig. 2) and budding index (not shown). However, in cells arrested in G_1 , the effect of overexpression of *VHS3* was weaker than that produced by *HAL3*. In contrast to the observation that deletion of *HAL3* is lethal in the absence of *sit4* (8, 13), we have been able to construct viable double *sit4 vhs3* strains. This strain, however, grows more slowly than the single *sit4* mutant under standard conditions and recovers very slowly from a α -factor-induced G_1 arrest. In

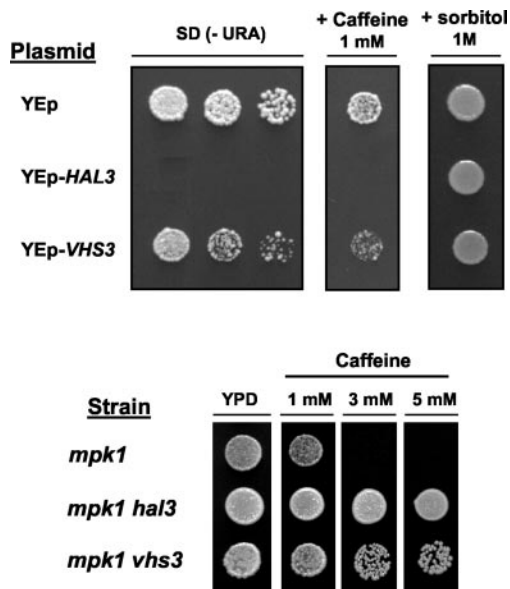


FIG. 3. Effect of *VHS3* overexpression or deletion in a *slt2/mpk1* background. Upper panel, strain JC010 (*mpk1Δ*) was transformed with the indicated plasmids and spotted on synthetic minimal (SD) plates lacking uracil (three dilutions of the culture) or on plates containing the indicated concentrations of caffeine or sorbitol. Lower panel, *HAL3* and *VHS3* genes were deleted in a JC010 background, and the sensitivity of the different strains to several concentrations of caffeine was tested. Growth was monitored after 60 h at 28 °C.

addition, mutation of *vhs3* greatly enhances the characteristic temperature-sensitive growth defect of the *slt4* mutation (Fig. 2).

An excess of Hal3 is deleterious for a cell lacking the Slt2/Mpk1 MAP kinase (11). We found that overexpression of *VHS3* in a *slt2/mpk1* strain grown in synthetic medium resulted in a growth defect and it exacerbated the sensitivity to caffeine of this strain. The defects were rescued in plates osmotically stabilized by inclusion of sorbitol (Fig. 3). This suggests that, similarly to *HAL3*, the excess of *VHS3* aggravates the lytic phenotype of the *slt2/mpk1* mutation. However, the effects were less dramatic than those caused by overexpression of *HAL3*. Mutation of *HAL3* has been reported to alleviate *slt2/mpk1* phenotypes, such as caffeine sensitivity. As shown in Fig. 3, a double *mpk1 vhs3* mutant exhibits an increased tolerance to caffeine when compared with the *slt2/mpk1* strain, although *mpk1 vhs3* cells are slightly less tolerant than the *mpk1 hal3* strain.

High copy expression of *HAL3* increases tolerance to high concentrations of sodium and lithium cations. We have found that overexpression of *VHS3* on a wild-type strain also improves salt tolerance (particularly to high sodium), although very slightly. The effect was more dramatic in cells lacking Hal3 (Ref. 18 and Fig. 4), but overexpression of *VHS3* could not increase tolerance in a *hal3 ppz1* mutant (not shown), suggesting that this effect could be mediated by the phosphatase. In all cases, the tolerance conferred by overexpression of *VHS3* was less marked than that obtained by overexpression of *HAL3*. The sensitivity to sodium or lithium of a *vhs3* mutant, assessed in two different genetic backgrounds (JA100 and DBY746), was virtually identical to that of the wild-type strain. It has been reported that overexpression of *HAL3* results in increased expression levels of the *ENA1* Na⁺-ATPase gene (12). As we show in Fig. 4, high copy expression of *VHS3* in wild-type cells results in a modest increase in expression of a β -galactosidase reporter driven by the entire *ENA1* promoter (about 2.5-fold). This effect is weaker than that obtained by overexpression of *HAL3*. However, it becomes rather intense (about 8-fold) in

cells lacking Hal3. Overexpression of *VHS3* in a *ppz1* background resulted only in a slight increase in the expression driven from the *ENA1* promoter and, similarly to *HAL3*, did not affect expression in a *ppz1 ppz2* strain (Fig. 4).

Vhs3 Binds in Vitro and in Vivo Ppz1—The phenotypes resulting from overexpression or disruption of the *VHS3* gene were consistent with the possibility of Vhs3 acting as a negative regulatory subunit of the Ppz1 phosphatase. To test this possibility we expressed in *Escherichia coli*, as a GST fusion, the catalytic domain of Ppz1 (residues 345–692), which has been shown to bind *in vitro* and *in vivo* Hal3 (11), and used it to construct an affinity system. As shown in Fig. 5, the bacterially expressed catalytic domain of Ppz1 can bind a version of Vhs3 tagged with the FLAG epitope present in yeast cell extracts. In addition, GST-fused versions of the entire Ppz1 and its C-terminal domain were expressed in *S. cerevisiae* from the native *PPZ1* promoter. These cells were transformed with a plasmid bearing the tagged version of Vhs3, extracts were prepared and the Ppz1 derivatives affinity-purified using glutathione beads. As shown in Fig. 5, the purified Ppz1 fractions contained bound Vhs3. The amount of bound Vhs3 was greatly increased when the C-terminal half of Ppz1 was expressed. Previous experiments had shown that the tagged version of Vhs3 was functionally equivalent to the native form of the protein (not shown). These results are consistent with the notion that Vhs3 can interact *in vivo* with the catalytic moiety of Ppz1.

Vhs3 Inhibits in Vitro the Ppz1 Protein Phosphatase Activity—To further test the possibility of Vhs3 being a negative regulatory subunit of Ppz1, we verified the ability of Vhs3 to inhibit Ppz1 *in vitro* by using two different assays. First, we incubated different amounts of GST, GST-Vhs3, or GST-Hal3 with bacterially expressed GST-Ppz1(Δ 1–344) and determined the phosphatase activity of the mixtures using *p*-nitrophenyl phosphate as substrate (Fig. 6). We observed that Vhs3 was able to inhibit the phosphatase activity in a dose-dependent fashion almost as effectively as Hal3. The inhibitory effect of Vhs3 was destroyed by heating the protein at 80 °C for 10 min prior to the assay (not shown).

We confirmed the Ppz1 inhibitory capacity of Vhs3 by performing a recently described assay for Ppz1 activity that uses Reg1 as a protein substrate (26). Reg1 is phosphorylated in response to a low glucose signal and, when glucose is added back to the media, Reg1 is dephosphorylated by Glc7 (32). The phosphorylation status of Reg1 can be monitored by changes in SDS-PAGE electrophoretic mobility when expressing an N-terminal domain of the protein. As shown in Fig. 6, Ppz1 readily dephosphorylates Reg1_{1–443} and this dephosphorylation is prevented by previous addition of Vhs3 to the mixture as efficiently as Hal3 does. These results indicate that Vhs3 inhibits Ppz1 activity *in vitro*.

Ppz1 is related in sequence to the catalytic subunit of type 1 protein phosphatases (PP1c), which is represented in yeast by a single gene (*GLC7*). Therefore, we tested the ability of Vhs3 to inhibit Glc7 by using *p*-nitrophenyl phosphate as substrate. Fig. 6 shows that Vhs3 was unable to inhibit PP1c under conditions that allow virtually complete inhibition of Ppz1, while the recently characterized (26) Glc7 inhibitor Ypi1 does.

The hal3 and vhs3 Mutations Are Synthetically Lethal, but Lethality Is Not Caused by Enhanced Ppz Activation—The results presented so far suggested that Hal3 and Vhs3 have somewhat redundant functions as inhibitory subunits of Ppz1. To further test this possibility, we tried to construct a *hal3 vhs3* double mutant by deleting the *vhs3* gene on a haploid *hal3Δ* background. However, none of our attempts were successful. We then transformed a heterozygous diploid *hal3Δ* strain with

FIG. 4. Effect of *VHS3* overexpression on salt tolerance and *ENA1* promoter activity. Upper panel, wild-type strain DBY746 and its isogenic derivative EDN4 (*hal3*) were transformed with the indicated plasmids. Positive clones were grown in YPD plates supplemented with the indicated concentrations of LiCl or NaCl for 60 h. Lower panel, strains DBY746 (WT), EDN4 (*hal3*), EDN2 (*ppz1*), and EDN85 (*ppz1 ppz2*) bearing the plasmid pKC201 (which encodes the β -galactosidase reporter gene fused to the *ENA1* promoter) were transformed with the high copy plasmids (YEplac112 or YEplac181) carrying no insert (empty bars) or the *HAL3* (filled bars) or the *VHS3* (striped bars) genes. Cells were grown as indicated under "Experimental Procedures" and β -galactosidase activity measured. Data are presented as the increase in expression compared with the strain carrying the empty plasmid and are mean \pm S.E. from three independent clones. WT, wild type.

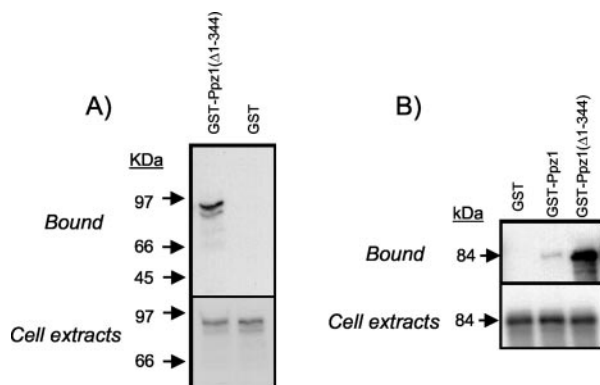
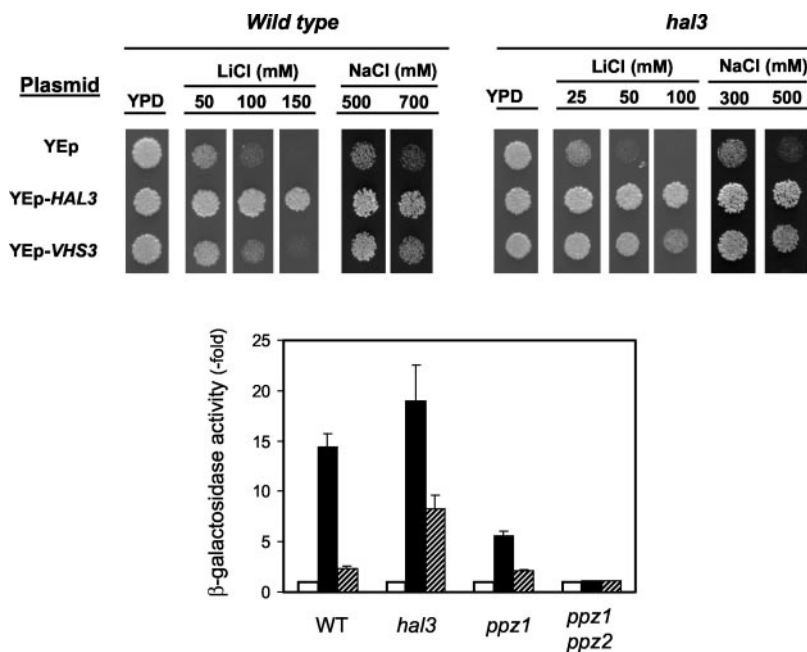


FIG. 5. *Vhs3* binds *in vitro* and *in vivo* to Ppz1. A, cell extracts from strain EDN75 were prepared as described, and 1 mg of total protein was mixed with bacterially expressed recombinant GST or GST-Ppz1(Δ 1-344) bound to glutathione-Sepharose beads. The presence of Vhs3-3 \times FLAG bound to the affinity system was detected using anti-FLAG antibodies. The lower panel shows the immunoblot of the cell extracts (20 μ g of protein) used in the experiment. B, strain EDN75 (*ppz1* Δ) expressing the indicated forms of Ppz1 were transformed with a plasmid expressing Vhs3-3 \times FLAG. The GST-fused versions of Ppz1 were affinity-purified from total yeast extracts (2.5 mg of total protein) using glutathione-Sepharose beads. The affinity matrix was boiled in 75 μ l of SDS-PAGE sample buffer and 15 μ l were electrophoresed in 8% SDS-polyacrylamide gels. Proteins were transferred to membranes and Vhs3-3 \times FLAG detected with anti-FLAG antibodies. The lower panel shows the amount of Vhs3-3 \times FLAG present in the extracts (25 μ g of total protein) revealed with anti-FLAG antibodies.

a disruption cassette for *VHS3*, to generate strain MAR6, sporulation was induced and 67 tetrads were dissected. Upon characterization of the resulting spores, we observed 11 non-parental ditypes (with 2 spores giving colonies), 12 parental ditypes (all 4 spores grew), and 44 tetratypes (with only 3 colony-forming spores). Fig. 7A shows several samples of the latter possibility. Phenotypic analysis of the growing colonies proved that none of them carried the double *hal3 vhs3* mutation. Microscopic observation of the dissection plates showed that spores unable to produce macroscopic colonies remained as a single cell (not shown). These results suggested that the *vhs3 hal3* mutations might be synthetically lethal. To further test this possibility, we constructed strain MAR107, which carries both *hal3* and *vhs3* mutations and depends on *URA3*-selectable plasmid-borne *HAL3* copies for survival. This strain, as well as

strain MAR88 (*hal3*) carrying the same plasmid, were plated in synthetic medium in the presence of 5-FOA, which does not allow growth of cells carrying the *URA3* marker. While strain MAR88 produced a significant number of colonies in 5-FOA plates, showing that the plasmid could be lost, strain MAR107 did not produce any colony, indicating that the presence of *HAL3* was necessary for vegetative growth in a *hal3 vhs3* background. A similar experiment was carried out with strain MAR115, which depends of the presence of plasmid-borne copies of *VHS3*. Again, plating in the presence of 5-FOA showed that the plasmid could not be evicted. These experiments support the notion that the *vhs3* and *hal3* mutations are synthetically lethal.

As it is known that an excess of Ppz1 activity could be deleterious for the cell (7) we considered the possibility that the simultaneous absence of *hal3* and *vhs3* could lead to an hyperactive Ppz1, which could explain the synthetically lethal phenotype of this double mutation. To test this possibility, we started from a diploid strain heterozygous for the *hal3* and *vhs3* mutations (MAR6) and introduced in it the *ppz1*, *ppz2*, and *ppz1 ppz2* mutations, respectively, in heterozygosity. These strains were induced to sporulate and tetrads (25 for the triple mutants and 90 for the quadruple one) were dissected. Interestingly, we could not recover double *hal3 vhs3* mutants even in the presence of the *ppz1*, *ppz2* or *ppz1 ppz2* mutations. Furthermore, we transformed the diploid strain MAR112 (heterozygous for the *hal3*, *vhs3*, *ppz1*, and *ppz2* mutations) with plasmid YEp195-HAL3, which provides the *HAL3* gene in a *URA3*-based high copy plasmid. Upon sporulation, haploid transformants carrying all four disruptions and the *URA3* plasmid were recovered and grown on plates containing 5-FOA, to force eviction of the plasmid. We could not recover 5-FOA-resistant colonies, indicating the requirement for the plasmid-borne *HAL3* gene, even in the absence of both phosphatase genes. Identical results were obtained when the *ppz1 ppz2* mutations were introduced in strain MAR107, and eviction of the plasmid was tested. All these results indicate that the deleterious effect of the *hal3 vhs3* mutations was not because of hyperactivation of the Ppz phosphatases.

Effects of the Mutation of His⁴⁵⁹ on Vhs3 Functions—His⁴⁵⁹ is a conserved Vhs3 residue that also appears in Hal3 and *Arabidopsis thaliana* AtHal3a (Fig. 1). In the plant protein this

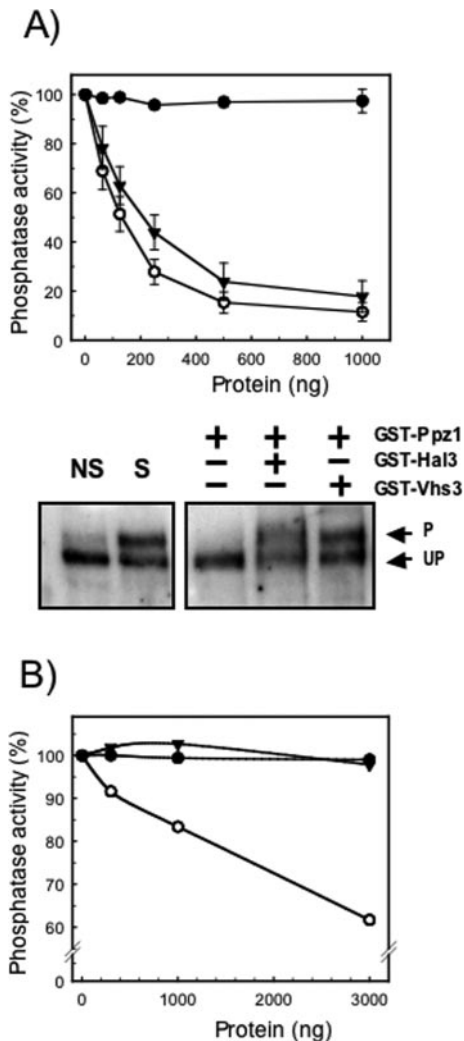


FIG. 6. Effects of Vhs3 on Ppz1 and Glc7 activities. *A, upper panel*, *p*-nitrophenyl phosphate dephosphorylation assays were carried out as described under “Experimental Procedures.” 1 μ g of purified GST-Ppz1 _{Δ 1–344} was incubated with *p*-nitrophenylphosphate (10 mM) as substrate in the presence of increasing amounts of purified GST (●), GST-Hal3 (○), or GST-Vhs3 (▼) proteins. Values are means \pm S.E. for three different assays, expressed as percentage of phosphatase activity relative to control without inhibitors. *Lower panel*, HA-Reg1_{1–443} dephosphorylation state of HA-Reg1_{1–443} before (NS, not shifted) or after (S, shifted), monitored by SDS-PAGE and immunoblot with anti-HA antibodies. 1.8 μ g of purified GST-Ppz1_{1–344} (GST-Ppz1) were preincubated during 5 min with buffer, GST-Hal3 (2 μ g), or GST-Vhs3 (2 μ g) and then for 20 min at 30 °C with 1 μ g of the extracts. Samples were analyzed by SDS-PAGE (10% polyacrylamide gels) and immunodetected with anti-HA monoclonal antibodies. P, phosphorylated; UP, unphosphorylated forms of HA-Reg1_{1–443}. *B*, 2 μ g of purified GST-Glc7 was incubated with *p*-nitrophenyl phosphate in the presence of increasing amounts of purified GST (●), GST-Ypi1 (○), or GST-Vhs3 (▼) proteins. Values correspond to a representative assay, made by duplicate, and are expressed as percentage of phosphatase activity relative to control without inhibitors.

residue (His⁹⁰) has been postulated to be important for the functional role of the protein (33). To test the relevance of this His in Vhs3, we have mutated His⁴⁵⁹ to Ala, and cloned the mutated form, carrying a 3 \times FLAG C-terminal epitope, in a multicopy plasmid. Diverse phenotypic tests were performed, such as growth in a *slt2/mpk1* background, tolerance to salt in a *hal3* strain, and rescue of the growth defect of a *sit4* strain. In all cases, our results (not shown) indicated that the H495A version behaved identically to the wild-type form. However,

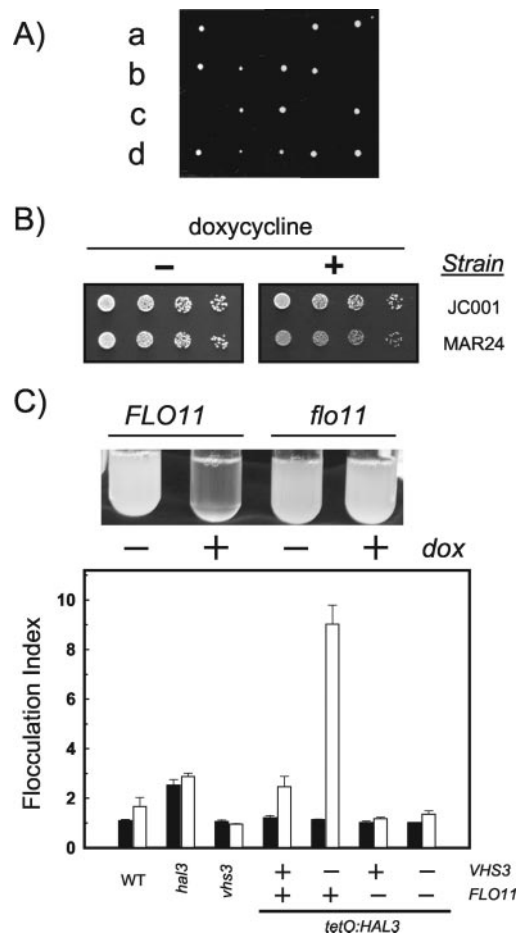


FIG. 7. Phenotypic effects of the *vhs3 hal3* mutations. *A*, diploid strain MAR6, heterozygous for the *vhs3* and *hal3* mutations, was induced to sporulate and 67 tetrads were dissected (only five tetratypes are shown). In all cases, spores able to form colonies did not carry the markers associated to both mutations. *B*, strains JC001 (*tetO:HAL3*) and MAR24 (*tetO:HAL3 vhs3*) were spotted at four 1:5 dilutions in synthetic medium in the presence or the absence of 50 μ g/ml doxycycline. Growth was monitored after 60 h at 28 °C. *C, upper panel*, strains MAR24 (*tetO:HAL3 vhs3 FLO11*) and MAR81 (*tetO:HAL3 vhs3 flo11*) were inoculated in 5 ml of complete minimal medium and grown for 2 days with shaking (230 strokes/min) in the presence or absence of 50 μ g/ml doxycycline at 28 °C. Then, tubes were removed from the shaker and photographed immediately. *Lower panel*, indicated strains were grown, as described under “Experimental Procedures” in the presence (open bars) or the absence (closed bars) of doxycycline and subjected to the flocculation test as described. Signs + and – denote that a given strain carries a wild-type (WT) copy or has been deleted for the indicated gene, respectively. The higher the flocculation index, the stronger is the tendency of the strain to flocculate. Data are mean \pm S.E. from 3 to 6 experiments.

while a wild-type high copy version of *VHS3* did rescue the *hal3 vhs3* lethal phenotype, we could not recover *hal3 vhs3* haploid progeny when the diploid strain MAR6, heterozygous for the *hal3* and *vhs3* mutations, was transformed in either low copy or high copy with the H495A version.

A Conditional *vhs3 tetO:HAL3* Double Mutant Displays a Flocculation Phenotype and Has Increased *FLO11* Expression—The results described above were compatible with the possibility of Vhs3 (and also Hal3) having unsuspected functions, perhaps unrelated to its role as regulator of the Ppz1 protein phosphatase. To gain insight into which could be these functions we constructed a conditional *hal3 vhs3* double mutant (strain MAR24) by deleting the *VHS3* gene and replacing the *HAL3* promoter by a doxycycline-regulatable *tetO* promoter. When this strain was plated in the presence of 20–100

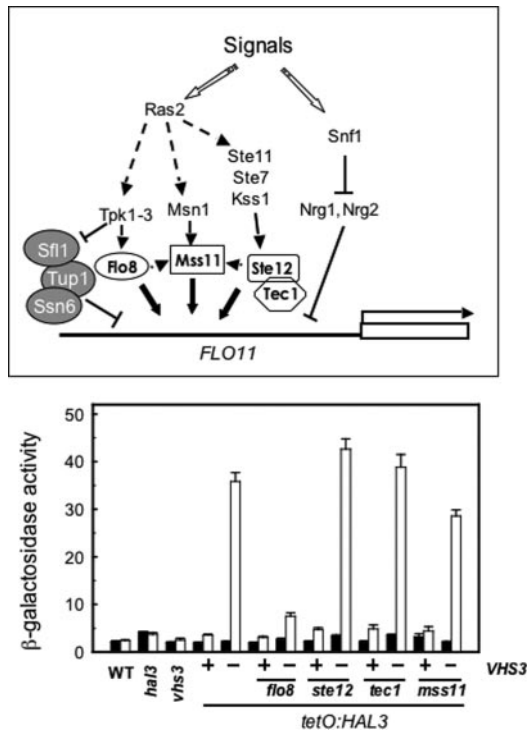


FIG. 8. *FLO11* expression in different mutant backgrounds. *Upper panel*, major signaling pathways regulating *FLO11* expression. This schematic depiction integrates information taken from Refs. 52–57, omitting multiple elements of the system for the sake of clarity. *Lower panel*, indicated strains were transformed with plasmid pFLO11-LacZ, and cultures were grown for 15 h at 28 °C in YPD medium as indicated in the presence (*open bars*) or the absence (*closed bars*) of 100 µg/ml doxycycline. Cells were then collected and processed for β -galactosidase activity assay. Data are mean \pm S.E. from 6 to 12 independent transformants. WT, wild type.

µg/ml doxycycline, growth was somewhat reduced, but cells were still able to proliferate (Fig. 7B). Interestingly, when cultured in liquid medium, the presence of doxycycline resulted in a readily detectable flocculation phenotype (Fig. 7C). However, flocculation was not produced when the same strain was deleted for the *FLO11* gene, encoding a glycosylphosphatidylinositol-anchored cell surface protein required for cell-cell adhesion. Quantitative analyses were performed to monitor more accurately the flocculation phenotype. As shown in Fig. 7C (*lower panel*), a *vhs3* mutant does not flocculate, whereas a *hal3* mutant shows a weak tendency to flocculate, similar to that of strain JC001 (*tetO:HAL3*) in the presence of doxycycline. Flocculation was greatly enhanced in strain MAR24 when grown in the presence of the antibiotic, and this effect was fully abolished when the *FLO11* gene was deleted, indicating that the flocculation phenotype resulting from the lack of Hal3 and Vhs3 function requires the Flo11 flocculin.

Because the control of *FLO11* expression is an important way to regulate its function (see “Discussion”), we considered interesting to test whether strain MAR24 could have an increased *FLO11* expression under non-permissive conditions. To this end, a β -galactosidase reporter containing the entire *FLO11* promoter was introduced in different strains and the activity of the promoter determined in the presence and absence of doxycycline. As it can be observed (Fig. 8), addition of doxycycline to strain MAR24 results in about 15-fold increase in *FLO11* expression. Interestingly, this effect was largely abolished when this strain was deleted for *FLO8*, a gene required for *FLO11* induction following protein kinase A activation. In contrast, deletion of *STE12*, *TEC1*, or *MSS11*, encoding elements that mediate other activating pathways (see Fig. 8 and

“Discussion”) did not affect *FLO11* expression under the conditions tested.

DISCUSSION

The gene *VHS3* (YOR054c) was identified in a recent screen in search of multicopy genes able to suppress the G_1/S blockage of a conditional *sit4 hal3* mutant. This gene encodes a 674-residue protein that is closely related to *S. cerevisiae* Hal3 (49% of identity) and also contains a characteristic C-terminal highly acidic tail that, in the case of Hal3, has been shown to be essential for function in salt tolerance and cell cycle (12, 13). These features and the fact that there was essentially no functional information available for *VHS3* prompted us to characterize in detail this gene and to investigate whether it could be a functional homologue of Hal3. We have observed that overexpression or deletion of *VHS3* results in a number of phenotypes that are reminiscent to those detected in cells that overexpress or lack *HAL3*. As we demonstrated earlier for Hal3 (11), Vhs3 binds *in vivo* to the catalytic moiety of Ppz1 more efficiently than that to the entire protein, and it can inhibit *in vitro* the activity of the phosphatase almost as efficiently as Hal3 does. Therefore, Vhs3 can be considered as an inhibitory subunit of Ppz1. We have also observed that, for all these phenotypes, the effects of the overexpression or the absence of Vhs3 are less dramatic than those observed for Hal3, suggesting a less prominent biological role. This could have several explanations. For instance, Vhs3 is almost fully recovered in $16,000 \times g$ supernatants, indicating that is a soluble protein (not shown). In contrast, a substantial amount of Ppz1 (7) and Hal3 (data not shown) is recovered in particulate fractions. Therefore, despite that Vhs3 can effectively inhibit Ppz1, only a limited fraction of the phosphatase might be able to interact with Vhs3 *in vivo*. Alternatively, a difference in their expression levels could account for the intensity of the observed phenotypes. Although the comparison has not been carried out at the protein level, Northern blot and DNA microarray data would support this possibility because, at least in exponentially growing cells, *VHS3* mRNA levels are almost undetectable and clearly lower than those of *HAL3*.²

Overexpression of Ppz1 negatively affects cell growth and leads to a G_1 blockage that can be alleviated by high levels of Hal3 (8). We hypothesized that the synthetic lethal phenotype of the *hal3 vhs3* mutation could be due to an abnormally increased Ppz1 activity caused by the absence of its natural inhibitors. However, we have observed that the lethal phenotype is maintained even in the absence of both *PPZ1* and *PPZ2* phosphatase genes. This is in contrast with the situation defined by the synthetic lethality of the *sit4* and *hal3* mutations, which is rescued by deletion of *PPZ1* (8). In addition, current work in our laboratory has revealed a number of mutations in the Hal3 protein that abolishes binding and/or inhibition of Ppz1. However, none of these mutations affect the ability of Hal3 to rescue growth of a *hal3 vhs3* strain.³ Therefore, these results do not support our initial hypothesis and suggest for the first time that Vhs3 or/and Hal3 must have important, Ppz-independent functions. It has been reported that Ppz1 and Ppz2 may have overlapping functions with Glc7, the essential type 1 protein phosphatase in yeast, and that all three phosphatases may act through common regulatory proteins (34, 35). Because high levels of Glc7 activity are lethal (36–38) an alternative possibility to explain the synthetic lethal phenotype of the *hal3 vhs3* mutation would be that these proteins could be inhibiting Glc7. However, it has been proved that Hal3 does not

² R. Serrano, L. Viladevall, and J. Ariño, unpublished results.

³ I. Muñoz, A. Ruiz, M. Marquina, A. Barcelo, A. Albert, and J. Ariño, submitted manuscript.

interact with Glc7 nor inhibit its activity (11, 26), and we show here that Vhs3 cannot inhibit Glc7 *in vitro*. In addition, mutation or overexpression of *VHS3* did not affect glycogen accumulation (not shown), a characteristic phenotype attributed to modulation of Glc7 function (26, 34, 39). Therefore, it is not likely that the lethal phenotype of the double *hal3 vhs3* mutant could be attributed to Glc7 hyperactivation.

The plant *A. thaliana* encodes a protein similar to Hal3 and Vhs3, named AtHal3a (Fig. 1), which has been characterized in some detail. Expression of this flavoprotein in *hal3* yeast cells partially complements the characteristic LiCl sensitivity of this strain, and transgenic *Arabidopsis* plants that overexpress AtHal3a show improved tolerance to salt stress (40). The elucidation of its crystal structure (33) allowed the prediction of catalytic properties to AtHal3a, and it has been shown that the recombinant protein has the capacity to catalyze *in vitro* the decarboxylation of 4'-phosphopantothienoylcysteine to 4'-phosphopantetheine (41, 42), one of the steps in coenzyme A biosynthesis. This catalytic capacity involves AtHal3a His⁹⁰, as mutation of this residue to Ala leads to the complete inactivation of the enzyme. We have observed that the H459A change in Vhs3 produces a functional protein, as far as the Ppz-related phenotypes are concerned. However, this same change produced a protein unable to rescue the synthetically lethal phenotype of the *hal3 vhs3* mutant, supporting again the notion that this phenotype is unrelated to Ppz functions. Although this could lead to speculation that the lethal phenotype may be the result of loss of the above catalytic activity, it must be noted that AtHal3a also requires a conserved Cys¹⁷⁵ within the substrate recognition clamp to complete the catalytic reaction (41, 43). However, both Hal3 and Vhs3 lack the equivalent residue, which corresponds to Asn in both proteins. Therefore, the lethal effect of the absence of Hal3 and Vhs3 is not likely to be the result of a defect in this hypothetical catalytic activity.

Our tetrad analysis experiments showed that the spores that failed to form colonies remained as single cells. This is interesting as often maternal cells provide enough products to carry out at least a few cell divisions. This might reflect that the lack of Vhs3 and Hal3 activities could result in impossibility to germinate, rather than in blockage of vegetative cell growth. However, while formally a role of *hal3* and *vhs3* in germination cannot be discarded, we also show that vegetatively growing *hal3 vhs3* cells that survive because the presence of episomal copies of *HAL3* or *VHS3* cannot lose the plasmids, indicating that simultaneous lack of *hal3* and *vhs3* functions is incompatible with vegetative growth.

In an attempt to gain insight into the novel functions of Hal3 and Vhs3 we have constructed a conditional *tetO:HAL3 vhs3* mutant, which allows the turning off of the expression of *HAL3* when cells are grown in the presence of doxycycline. This approach has been successfully used in the past in our laboratory to explore the nature of the synthetically lethal phenotype of the *hal3 sit4* mutations (17, 18). Interestingly, and in contrast to the phenotype observed in the *tetO:HAL3 sit4* strain, the presence of doxycycline did not result in severe growth arrest, but in a flocculation phenotype. The observation that a conditional double mutant based in the *tetO*-regulatable expression of *HAL3* fails to reproduce the *vhs3 hal3* growth defect may appear in conflict with our observations described above. However, similar situations have been widely documented for a substantial number of essential genes (44–46), and could be explained by a residual expression from the *tetO:HAL3* construct. In any case, analysis of the conditional mutant strain MAR24 has led us to the identification of a novel phenotype associated to decreased expression of Hal3 and Vhs3: the ability to flocculate. It is known that a critical factor for flocculation

of yeast cells is the presence or the absence of lectin-like proteins (floculins), such as Flo1, Flo5, and Flo9, the so called *FLO1*-type phenotypic class, and Flo11. These proteins are present in the cell walls of flocculent cells and allow selective binding of mannose residues located in the cell walls of adjacent yeast cells (see Ref. 47 and references therein). The possibility that Flo11 might be involved in the flocculation phenotype of the conditional *hal3 vhs3* mutant draws our immediate attention, because this floculin has been shown to be involved in diploid pseudohyphal differentiation (48–50) and haploid invasive growth (48, 49, 51) in response to nutrient limitation. We demonstrate here that the flocculation phenotype due to the absence of Vhs3 and Hal3 function is dependent on the presence of Flo11 and that is accompanied by an increased expression from the *FLO11* promoter, suggesting that Vhs3 and Hal3 are negative regulators of *FLO11* expression.

FLO11 has one of the largest promoters in the yeast *S. cerevisiae*. This promoter integrates multiple signals mediated by at least 4 major pathways (see Fig. 8 for a diagram and Refs. 52–57). Protein kinase A activation inhibits the repressor complex Sfl1-Tup1-Ssn6 and activates the positive transcription factor Flo8. In addition, the invasive growth MAP kinase cascade results in the activation of the MAP kinase Kss1, which in turn activates the Ste12/Tec1 transcription factor system. The Mss11 transcription factor, which shows a limited homology with Flo8, is also a positive effector of *FLO11* transcription. All three pathways can be activated by the small guanine nucleotide-binding protein Ras2. In addition, a recently discovered pathway involves the AMP-activated kinase yeast homolog Snf1 in the regulation of *FLO11* expression by means of the Nrg1/Nrg2 repressors. We have observed that the increased expression from the *FLO11* promoter in strain MAR24 is almost fully blocked in the absence of Flo8, while deletion of the *STE12*, *MSS11*, *TEC1*, or *STE12* genes did not affect the activity of the promoter (Fig. 8). In addition, deletion of *FLO8* abolished the flocculent phenotype, while the *SNF1* mutation did not (not shown). These data are consistent with the notion that Vhs3 and Hal3 probably function upstream of the Flo8 transcription factor. Although further analysis will be required to elucidate the exact role of these proteins on the regulation of Flo8, an important point within the context of this work would be to evaluate whether or not this function is mediated by the Ppz phosphatases. Our preliminary data suggest that Ppz1 is probably not a key component of the system because, although cells overexpressing the phosphatase display some tendency to flocculate and have slightly increased *FLO11* expression, these effects are much weaker than those produced by the absence of Vhs3 and Hal3. In addition, low copy expression of the H459A version of Vhs3 completely fails to abolish flocculation of strain MAR24 in the presence of doxycycline (data not shown).

In conclusion, we have demonstrated that the previously uncharacterized protein Vhs3 can act as a negative regulatory subunit of Ppz1, thus, adding an additional level of complexity to the regulation and function of this protein phosphatase. In addition, we also show here that Vhs3 (and perhaps Hal3) fulfill essential functions that are independent of their role in regulating Ppz1. The existence of proteins able to carry out different and unrelated cellular functions (known as moonlighting proteins) has been reported in the last few years (see Refs. 58 and 59 for reviews). Perhaps Hal3 and Vhs3 are new examples of these kinds of proteins.

Acknowledgments—We thank Laia de Nadal for support in the initial steps of this project and Ester Castellsagué for help in some experiments. We thank Isabel López Calderón for helpful discussion. The excellent technical assistance of Anna Vilalta is acknowledged.

REFERENCES

1. Posas, F., Casamayor, A., Morral, N., and Arino, J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 11734–11740
2. Lee, K. S., Hines, L. K., and Levin, D. E. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 5843–5853
3. Hughes, V., Muller, A., Stark, M. J., and Cohen, P. T. (1993) *Eur. J. Biochem.* **216**, 269–279
4. Arino, J. (2002) *Eur. J. Biochem.* **269**, 1072–1077
5. Posas, F., Casamayor, A., and Arino, J. (1993) *FEBS Lett.* **318**, 282–286
6. Posas, F., Camps, M., and Arino, J. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 13036–13041
7. Clotet, J., Posas, F., de Nadal, E., and Arino, J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 26349–26355
8. Clotet, J., Gari, E., Aldea, M., and Arino, J. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2408–2415
9. Yenush, L., Mulet, J. M., Arino, J., and Serrano, R. (2002) *EMBO J.* **21**, 920–929
10. Ruiz, A., Yenush, L., and Arino, J. (2003) *Eukaryotic Cell* **2**, 937–948
11. de Nadal, E., Clotet, J., Posas, F., Serrano, R., Gomez, N., and Arino, J. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 7357–7362
12. Ferrando, A., Kron, S. J., Rios, G., Fink, G. R., and Serrano, R. (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**, 5470–5481
13. Di Como, C. J., Bose, R., and Arndt, K. T. (1995) *Genetics* **139**, 95–107
14. Arndt, K. T., Styles, C. A., and Fink, G. R. (1989) *Cell* **56**, 527–537
15. Sutton, A., Immanuel, D., and Arndt, K. T. (1991) *Mol. Cell. Biol.* **11**, 2133–2148
16. Fernandez-Sarabia, M. J., Sutton, A., Zhong, T., and Arndt, K. T. (1992) *Genes Dev.* **6**, 2417–2428
17. Simon, E., Clotet, J., Calero, F., Ramos, J., and Arino, J. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 29740–29747
18. Munoz, I., Simon, E., Casals, N., Clotet, J., and Arino, J. (2003) *Yeast* **20**, 157–169
19. Adams, A., Gottschling, D. E., Kaiser, C. A., and Stearns, T. (1997) *Methods in Yeast Genetics*, pp. 147–148, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
20. Berben, G., Dumont, J., Gilliquet, V., Bolle, P. A., and Hilger, F. (1991) *Yeast* **7**, 475–477
21. Goldstein, A. L., and McCusker, J. H. (1999) *Yeast* **15**, 1541–1553
22. Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R., and Philippsen, P. (1994) *Yeast* **10**, 1793–1808
23. Giaever, G., Chu, A. M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., Andre, B., Arkin, A. P., Astromoff, A., El Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Brachat, S., Campanaro, S., Curtiss, M., Davis, K., Deutschbauer, A., Entian, K. D., Flaherty, P., Foury, F., Garfinkel, D. J., Gerstein, M., Gotte, D., Guldener, U., Hegemann, J. H., Hempel, S., Herman, Z., Jaramillo, D. F., Kelly, D. E., Kelly, S. L., Kotter, P., LaBonte, D., Lamb, D. C., Lan, N., Liang, H., Liao, H., Liu, L., Luo, C., Lussier, M., Mao, R., Menard, P., Ooi, S. L., Revuelta, J. L., Roberts, C. J., Rose, M., Ross-Macdonald, P., Scherens, B., Schimmack, G., Shafer, B., Shoemaker, D. D., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R. K., Strathern, J. N., Valle, G., Voet, M., Volkert, G., Wang, C. Y., Ward, T. R., Wilhelmy, J., Winzler, E. A., Yang, Y., Yen, G., Youngman, E., Yu, K., Bussey, H., Boeke, J. D., Snyder, M., Philippsen, P., Davis, R. W., and Johnston, M. (2002) *Nature* **418**, 387–391
24. de Nadal, E., Fadden, R. P., Ruiz, A., Haystead, T., and Arino, J. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 14829–14834
25. Gietz, R. D., and Sugino, A. (1988) *Gene (Amst.)* **74**, 527–534
26. Garcia-Gimeno, M. A., Munoz, I., Arino, J., and Sanz, P. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 47744–47752
27. Myers, A. M., Tzagoloff, A., Kinney, D. M., and Lusty, C. J. (1986) *Gene (Amst.)* **45**, 299–310
28. Alepuz, P. M., Cunningham, K. W., and Estruch, F. (1997) *Mol. Microbiol.* **26**, 91–98
29. Calero, F., Gomez, N., Arino, J., and Ramos, J. (2000) *J. Bacteriol.* **182**, 394–399
30. Treco, D. A., and Winston, F. (1998) *Current Protocols in Molecular Biology*, pp. 13.2.10–13.2.11, John Wiley & Sons, New York
31. Bony, M., Barre, P., and Blondin, B. (1998) *Yeast* **14**, 25–35
32. Sanz, P., Alms, G. R., Haystead, T. A., and Carlson, M. (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20**, 1321–1328
33. Albert, A., Martinez-Ripoll, M., Espinosa-Ruiz, A., Yenush, L., Culiñez-Macia, F. A., and Serrano, R. (2000) *Structure Fold. Des.* **8**, 961–969
34. Venturi, G. M., Bloecher, A., Williams-Hart, T., and Tatchell, K. (2000) *Genetics* **155**, 69–83
35. Williams-Hart, T., Wu, X., and Tatchell, K. (2002) *Genetics* **160**, 1423–1437
36. Liu, H., Krizek, J., and Bretscher, A. (1992) *Genetics* **132**, 665–673
37. Francisco, L., Wang, W., and Chan, C. S. (1994) *Mol. Cell. Biol.* **14**, 4731–4740
38. Zhang, S., Guha, S., and Volkert, F. C. (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**, 2037–2050
39. Francois, J. M., Thompson-Jaeger, S., Skroch, J., Zellenka, U., Spevak, W., and Tatchell, K. (1992) *EMBO J.* **11**, 87–96
40. Espinosa-Ruiz, A., Belles, J. M., Serrano, R., and Culiñez-Macia, F. A. (1999) *Plant J.* **20**, 529–539
41. Hernandez-Acosta, P., Schmid, D. G., Jung, G., Culiñez-Macia, F. A., and Kupke, T. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 20490–20498
42. Kupke, T., Hernandez-Acosta, P., Steinbacher, S., and Culiñez-Macia, F. A. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 19190–19196
43. Steinbacher, S., Hernandez-Acosta, P., Bieseler, B., Blaesse, M., Huber, R., Culiñez-Macia, F. A., and Kupke, T. (2003) *J. Mol. Biol.* **327**, 193–202
44. Belli, G., Gari, E., Aldea, M., and Herrero, E. (1998) *Yeast* **14**, 1127–1138
45. Zhang, N., Osborn, M., Gitsham, P., Yen, K., Miller, J. R., and Oliver, S. G. (2003) *Gene (Amst.)* **303**, 121–129
46. Davydenko, S. G., Juselius, J. K., Munder, T., Bogengruber, E., Jantti, J., and Keranen, S. (2004) *Yeast* **21**, 463–471
47. Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Verachtert, H., and Delvaux, F. R. (2003) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**, 197–205
48. Lambrechts, M. G., Bauer, F. F., Marmur, J., and Pretorius, I. S. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 8419–8424
49. Lo, W. S., and Dranginis, A. M. (1998) *Mol. Biol. Cell* **9**, 161–171
50. Lo, W. S., and Dranginis, A. M. (1996) *J. Bacteriol.* **178**, 7144–7151
51. Roberts, R. L., and Fink, G. R. (1994) *Genes Dev.* **8**, 2974–2985
52. Gancedo, J. M. (2001) *FEMS Microbiol. Rev.* **25**, 107–123
53. Pan, X., Harashima, T., and Heitman, J. (2000) *Curr. Opin. Microbiol.* **3**, 567–572
54. Palecek, S. P., Parikh, A. S., and Kron, S. J. (2002) *Microbiology* **148**, 893–907
55. Kuchin, S., Vyas, V. K., and Carlson, M. (2002) *Mol. Cell. Biol.* **22**, 3994–4000
56. Gagliano, M., Bauer, F. F., and Pretorius, I. S. (2002) *FEMS Yeast Res.* **2**, 433–470
57. Gagliano, M., Bester, M., van Dyk, D., Franken, J., Bauer, F. F., and Pretorius, I. S. (2003) *Mol. Microbiol.* **47**, 119–134
58. Jeffery, C. J. (2003) *Trends Genet.* **19**, 415–417
59. Jeffery, C. J. (1999) *Trends Biochem. Sci.* **24**, 8–11
60. Vissi, E., Clotet, J., de Nadal, E., Barcelo, A., Bako, E., Gergely, P., Dombradi, V., and Arino, J. (2001) *Yeast* **18**, 115–124
61. de Nadal, E., Calero, F., Ramos, J., and Arino, J. (1999) *J. Bacteriol.* **181**, 6456–6462