



Universitat Autònoma de Barcelona

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

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

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

# Regulación de la proteína fosfatasa Ppz1 por su subunidad Hal3: un análisis por mutagénesis

Tesis Doctoral presentada por  
**CARLOS SANTOLARIA BELLO**

Graduado en Bioquímica

para optar al título de Doctor en Bioquímica, Biología Molecular y  
Biomedicina por la Universitat Autònoma de Barcelona

realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la  
Universitat Autònoma de Barcelona y en el Institut de Biotecnologia i  
Biomedicina

dirigida por los Dres. Joaquín Ariño Carmona y Antonio Casamayor Gracia

**ARIÑO  
CARMONA  
JOAQUIN -  
37273798K**

Firmado digitalmente por  
ARIÑO CARMONA JOAQUIN -  
37273798K  
Nombre de reconocimiento  
(DN): c=ES,  
serialNumber=IDCES-3727379  
8K, givenName=JOAQUIN,  
sn=ARIÑO CARMONA,  
cn=ARIÑO CARMONA  
JOAQUIN - 37273798K  
Fecha: 2022.09.02 10:12:22  
+02'00'

Dr. Joaquín Ariño Carmona

**ANTONIO  
CASAMAY  
OR GRACIA  
- DNI  
43398868F**

Signat  
digitalment per  
ANTONIO  
CASAMAYOR  
GRACIA - DNI  
43398868F  
Data: 2022.09.02  
09:50:37 +02'00'

Dr. Antonio Casamayor Gracia

**CARLOS  
SANTOLA  
RIA BELLO  
- DNI  
18055108  
Q**

Signat  
digitalment per  
CARLOS  
SANTOLARIA  
BELLO - DNI  
18055108Q  
Data:  
2022.08.31  
12:49:29  
+02'00'

Carlos Santolaria Bello



“¡Crece, pues, honrando su recuerdo!

Y a los que ahora dudan grítales:

¡Vamos, que nos trazó el camino.

Esa tierra existe, y la veréis!”

Dicen; La Ronda de Boltaña



# **Agradecimientos**



Bueno, pues parece que esta etapa toca a su fin. Después de unos cuantos años dando mal por el I.B.B. por fin presento este trabajo que, ha costado, pero ha salido adelante gracias a la ayuda y apoyo de muchas personas. Esta Tesis es el fruto de varios años de trabajo que comenzó en septiembre de 2015, cuando entré por primera vez en el laboratorio de *Llevats* para realizar las prácticas de la carrera. A las personas que leáis esto, primero, siento la “turra” y, sí, sé que la palabra gracias sale unas cuantas veces, pero de eso tratan los agradecimientos, ¿no?

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directores de Tesis, el Dr. Joaquín Ariño y el Dr. Antonio Casamayor. Muchísimas gracias, Joaquín, por “acoger” en tu laboratorio a este fatigo. Por darme la oportunidad de comenzar en este apasionante mundo que es la investigación mediante las prácticas del grado y poder continuar en el con el máster y el doctorado. Mil gracias por toda la paciencia que has tenido conmigo durante todos estos años, por aguantar mis *PowerPoints*, por los ratos haciendo *bindings*, por todas las horas que has dedicado a que esta Tesis saliera adelante. Gracias por transmitirme tu rigurosidad y buen hacer a la hora de realizar ciencia. Sinceramente muchísimas gracias por todo. Antonio, quiero agradecerte toda la ayuda que he recibido por tu parte, todos los consejos, dudas que me has resuelto, y por estar allí siempre que necesitaba saber algo. Por permitirme hacerte perder el tiempo cuando iba al despacho con cualquier consulta, por chorra que fuera. También, al igual que a Joaquín, gracias por la oportunidad de haber estado todos estos años en *Llevats* y por el tiempo dedicado a la corrección de este trabajo. Este “pueblerino” quiere darte las gracias por todos los buenos momentos hablando de todo menos de ciencia. Por tu humor, por tu ayuda, por todo, gracias. De verdad, Joaquín, Antonio, muchísimas gracias por haberme permitido ser uno más de esta familia que es *Llevats*.

Quiero continuar estos agradecimientos con la que ha sido mi “familia” estos años, esa maravillosa gente de *Llevats*. Empezaré por aquellas personas que no están ya en el I.B.B. Al Dr. David Canadell y al Dr. Albert Serra, los dos primeros referentes que tuve nada más entrar por la puerta del laboratorio. Por todos los trucos y consejos que me disteis los primeros meses que estuve en el I.B.B. Por ayudarme a hacer guardia aquellos jueves que llegaban a reponer las Chocobooms “baratas”. A la Dra. Chunyi “Ana” Zhang, por tu ayuda, consejos y advertencias cuando comencé a hacer los ensayos de inhibición, por tu buen carácter, por tu ayuda, gracias. Muchas gracias a Natalia y Cristina por su paciencia aguantando mis explicaciones durante sus prácticas, por muy caóticas que fueran.

A la Dra. María López-Malo, una de las mejores personas que he tenido la suerte de conocer. Una gran científica, paciente, amable y con una capacidad de trabajo envidiable. No solo quiero agradecerte toda la ayuda que me has prestado, también quiero darte las gracias por el buen rollo que creabas en el laboratorio, *Llevats* no hubiera sido lo mismo sin ti, ni de lejos. También agradecerte haber podido conocer a Guillem, otro sol de persona, por haber podido probar sus arroces, y sobre todo por

## AGRADECIMIENTOS

enseñarme lo que es una auténtica Paella (y que no se dice “paellera”). Gracias. A Elisa, gracias por todos los buenos ratos que pasamos en el laboratorio, por los jueves de la Oreja de van Gogh, por poner a Carlos en vereda y los viernes en el Wimpy. Al Dr. Carlos Calafí, mi melodramático favorito, gracias por las conversaciones, por las “chapas” y las visitas a Sabadell, obviamente de la música que sonaba por el laboratorio no sé si agradecértelo. Espero que todo este yendo bien por el Sur y que, por lo menos no me vuelvas hecho un señorito. Dra. Carol Marcos, aunque tu estancia aquí fue solo un año, no sabría por dónde empezar, muchos buenos momentos, muchas risas, y algún que otro Wimpy. Por darnos un baño de humildad a Marcel y a mí en el Wimpy, por tu forma de ser, tu amabilidad, gracias por todo.

A mi queridísimo Dr. Diego Velázquez, joder (perdón por la expresión) por dónde empiezo. Creo que lo más sensato es empezar por 2010, el año que empecé la carrera, allí coincidí con un joven bilbilitano divertido, amable y muy simpático, poco a poco el hecho de compartir carrera nos fue acercando, hasta que te convertiste en Diego-amigo. Ese amigo que siempre estuvo allí, en los momentos más distendidos, tomando una cerveza o en Mundo y más importante, en los peores momentos. Siempre recordaré aquel veintitantos de diciembre de 2013, cuando estando yo en Zaragoza, haciendo un alto en tu camino de vuelta a Calatayud, pasaste a verme, en aquel momento tan emotivo para mí y mi familia en que recién salía de la “burbuja”, solo puedo decirte gracias. Más adelante tras mi vuelta a la U.A.B. me aconsejaste entrar a hacer las prácticas en el laboratorio de *Biología Molecular de Llevats*, consejo que siempre te agradeceré. A partir de septiembre de 2015 fuiste Diego-maestro, quién me enseñó a trabajar en un laboratorio, quién aguantó mis momentos de “aplataamiento”, mis enfados y salidas de tono (tanto en el laboratorio, como, por si no fuera poco, también en casa). Has sido y eres una de las personas más importantes en mi vida, Diego-pilar. Has sido tantos Diegos: Diego-psicólogo, Diego-pilar, Diego-compañero, Diego-maestro, y más importante, y mi Diego favorito, Diego-AMIGO. Gracias, gracias y mil gracias.

Un millón de gracias al Dr. Marcel Albacar, otro de los pilares fundamentales que han hecho posible este trabajo. Al igual que a Diego te conocí por 2010, pero al no coincidir más que en los momentos recreativos, nuestra relación no fue más allá de la de conocidos. Posteriormente empezaste tu Tesis en *Llevats*, poco a poco nos fuimos conociendo y allí empezó nuestra amistad. Me has ayudado, has estado para cualquier cosa que necesitara, me has hecho reír muchísimo con tu gran sentido de humor y has aguantado mis chistes de mascarillas y del capitán América (sin tirarme nada a la cabeza, cosa que agradezco). Por tu “culpa” he madrugado para andar y ver bichos (tras desayuno contundente o con la promesa de una buena comilona). Has conseguido que hasta el momento de más “bajona” sea un buen momento con tu forma ser. Gracias por las correcciones de mi inglés, gracias por los Wimpys y los vermús, gracias por las risas, millones de gracias por todo.

Muchas gracias a nuestro último fichaje Abdel. Gracias por tu forma de ser, amable y divertida, por tus ganas contagiosas de trabajar y tu curiosidad. Estas cualidades harán que llegues lejos en la ciencia. Te auguro un buen futuro en esta etapa que estás comenzando, y espero más pronto que tarde poder celebrar tu Tesis. Al Dr. Jorge Pérez-Valle, aunque hayamos coincidido sólo últimamente eres una gran persona, y quiero agradecerte todos los buenos ratos que hemos pasado en el laboratorio y tus consejos y buenas palabras mientras escribía. Muchísimas gracias a Montse, la “mamá” de *Llevats*. Gracias por toda tu ayuda, sin ti esta Tesis hubiera sido imposible, y no me refiero a los medios y por ahí. Perdóname por pedirte cosas a última hora porque se me había pasado, y por ser (vamos a decirlo suave) un “poquico” desordenado. Gracias por hablar conmigo cuando lo he necesitado, por estar siempre dispuesta a ayudarme en todo (dentro y fuera del laboratorio), y también gracias a Chechu, por toda su ayuda. En definitiva, Montse, gracias por ser tú.

Quiero dar también las gracias a toda la gente del I.B.B. que ha hecho que mi paso por aquí sea inmejorable. Gracias a los miembros del Servei de Genòmica, especialmente a Roger por los buenos ratos, no solo desayunando, que me has hecho pasar. Gracias a Araís que, aunque yo tuviese un mal día, cruzar contigo dos palabras lo arreglaba, gracias a Francesca, por hacer que el día a día fuese mucho más ameno, gracias a Miguel por compartir la “tristeza” de nuestros equipos, a ver si algún día podemos coincidir comiendo un bocata de calamares por el “casco” en primera y gracias a Fran por las charlas en el cuadrado. A las personas que forman parte de la unidad de Bioquímica de Veterinaria, por su amabilidad durante todos estos años cada vez que subía por allí, ya fuese a realizar las prácticas o cualquier experimento, muchas gracias.

Agradecer al *Col·lectiu de Doctorands en Lluita* la lucha compartida, especialmente a Jara, Sara, Alejandro y Guillem, por estar siempre dando el “callo” y movilizar a tanta gente. Gracias a las personas con quienes compartí la organización de la fondue, Andros, Xavi y Jara (nuevamente). Muchas gracias por los buenos ratos y por lo bien que salió todo, sin vosotros esa fondue hubiera sido un fiasco.

A mi gente de Sabadell, Jaime y Lucía por los vermús toreros, con su posterior sushi, Wimpy o lo que se terciara, gracias por alegrarme el día cada vez que hacíamos algo, gracias a Mireia por las tardes tontas en el Zete y darme ánimos con la Tesis. Gracias a la Dra. Raquel Castillo, tú también eres culpable de hacerme madrugar para andar, que lo sepas, espero que todo continúe genial por “Royal City” y no te conviertas en esa gente que va con chaleco, avisada estás. Gracias a Dr. Jordi Pujols “Jordi Pupus”, sé que no estás por Sabadell pero bueno, te meto aquí porque sí, por ayudarme siempre que he tenido alguna duda sobre “foldinuponpimpun” o cualquier problema con las proteínas, no darte las gracias por intentar que se me suba la gente encima, pero bueno te aprecio igual, también agradecerte todos los años de amistad desde la carrera, a ver si vienes más por Sabadell que se te echa de menos. A Anna y Tefi, mis librerías de

## AGRADECIMIENTOS

cabecera, gracias por todas las recomendaciones, clubs y charlas sobre lo que sea. Gracias a Antonio, por los buenos momentos, las risas y las cervezas en Alguersuari.

A Patri, gracias por estar allí siempre que lo he necesitado, por escucharme, por animarme. Gracias por abrirnos los ojos a Diego y a mí sobre los “gatetes”, gracias por traer a Titín a nuestra vida, gracias por ser la mejor compañera de piso. Muchas gracias por ser como eres, pero, sobre todo, lo que más te agradezco con todo el corazón es que seas mi amiga. Aunque aún me guardo eso de:” ¿Ese es Santo el que juega a rugby? Pero si va dando saltitos”.

Quiero dar las gracias a todas las trabajadoras y trabajadores del Hospital Miguel Servet de Zaragoza. Muchísimas gracias por vuestro trabajo, vuestro trato y todo lo que hicisteis y hacéis por mí, eternamente agradecido.

A mis Kikos, mis amigos de toda la vida de Huesca, sé que no nos vemos, ni hablamos todo lo que deberíamos (mayoritariamente por mi culpa, no me gusta mucho eso de los mensajitos). Quiero daros las gracias, porque pese a la distancia y aunque podamos pasar tiempo y tiempo sin hablar o vernos, siempre estáis allí, siempre puedo contar con vosotros. Muchísimas gracias. También dar un millón de gracias a Manolo y Auxi, por estar apoyándonos siempre que lo hemos necesitado.

Para finalizar esta extensa sección de agradecimientos he dejado a mi familia, como se suele decir: “lo bueno se hace esperar”.

En primer lugar, quiero agradecer a dos de las mujeres más fuertes que conozco, mis Tatas. Lidia, María, sin vosotras detrás nada sería igual, siempre estáis allí. Ojalá en un futuro podamos vernos más a menudo. Pese a la distancia, siempre estáis en mis pensamientos, y si en algún momento tengo la tentación de tirar la toalla pienso en vosotras y se me pasa. No solo sois un apoyo para mí, también para mis padres y mi hermano, no sabéis cuanto os quiero. También quiero darles las gracias a Marcos y Roberto, porque sé que os hacen felices, porque siempre han estado allí apoyándonos y ayudándonos. Por cierto, ya le podéis ir diciendo a Marcos que plante más borrajas, que si no cuando vaya para Yéspola os dejaré sin nada.

Millones y millones de gracias a mis padres. Han sido ellos los que han hecho posible que llegue hasta aquí. Sin su ayuda nunca podría haber estudiado, pero sobre todo sin su cariño, su apoyo y sus ánimos jamás de los jamases hubiera conseguido nada. Tengo grabado a fuego el día que salí de la cámara, ese abrazo, ese abrazo fue el momento más feliz de mi vida, un mes, un ~~puto~~ mes sin poder tocaros, viéndoos a través de una ventana. Papá, Mamá vosotros aguantasteis allí como jabatos, día y noche, hora tras hora, minuto tras minuto, aunque os ignorara, aunque contestara mal, pero siempre allí con buena cara dándome fuerzas en los momentos más duros. Soy lo que soy gracias a vosotros, todos mis éxitos son los vuestros, porque repito, sin vosotros apoyándome

y dándome aliento no soy nada. No podría agradecerlos más todo lo que habéis hecho y hacéis por mí. Os quiero.

Para finalizar, darle las gracias a mi hermano Javier. Tato, esta Tesis hubiera sido imposible sin ti, y no lo digo solamente por ese maravilloso “chuletón” de diciembre de 2013. Eres la persona más constante, entregada y sobre todo, y más importante, con el mayor corazón que conozco. Eres un ejemplo para mí, pese a ser el pequeño, yo de mayor quiero ser como tú. Siempre has creído en mí, siempre me has apoyado y animado. Siempre sabes sacarme una sonrisa, hacer que el peor momento pase y se convierta en una alegría. Gracias por traer a Aresito, y por todos los paseos y buenos momentos que hemos pasado y pasaremos. Te quiero. P.D. Solamente hay una cosa que puedo reprocharte, y es que no vengas más a verme.



# Índice de Contenidos



1.	Abreviaturas.....	1
2.	Resúmenes.....	5
3.	Introducción.....	11
3.1.	Saccharomyces cerevisiae como un organismo modelo.....	13
3.2.	La fosforilación de proteínas .....	14
3.2.1.	Ser/Thr fosfatasas .....	15
3.2.1.1.	Fosfoproteínas fosfatasas (PPP) .....	16
3.2.1.2.	Proteínas fosfatasas dependientes de metales (PPM).....	16
3.2.2.	Ser/Thr fosfatasas de tipo 1 (PP1).....	16
3.2.2.1.	Regulación y motivos de interacción de PP1c .....	18
3.2.2.2.	Reconocimiento de los residuos desfosforilables por PP1 y su relación con regiones intrínsecamente desestructuradas (IDRs) .....	19
3.2.3.	Las fosfatasas de tipo Z .....	19
3.3.	Funciones celulares de Ppz1.....	20
3.3.1.	Homeostasis catiónica.....	21
3.3.2.	Otras funciones de Ppz1.....	23
3.4.	Subunidades reguladoras de Ppz1: Hal3 y Vhs3.....	24
3.5.	Hal3 y Vhs3 como proteínas <i>moonlighting</i> .....	28
3.6.	Enzimas PPCDC y el sistema Ppz1-Hal3 en hongos .....	30
3.6.1.	El papel de las regiones N- y C-terminales de Hal3 en la regulación de Ppz1.....	32
3.7.	La toxicidad derivada de la sobreexpresión de Ppz1 .....	32
4.	Materiales y Métodos.....	35
4.1.	Cepas de levadura y medios de cultivo .....	37
4.2.	Técnicas de DNA Recombinante.....	37
4.3.	Plásmidos.....	38
4.3.1.	Plásmidos preexistentes para expresión en <i>S. cerevisiae</i> .....	38
4.3.2.	Plásmidos preexistentes para expresión en <i>E. coli</i> .....	39
4.3.3.	Mutaciones puntuales del dominio catalítico de Ppz1 .....	40
4.3.4.	Mutaciones en el dominio PD de Hal3.....	41
4.3.5.	Mutaciones en el dominio N-terminal de Hal3.....	42
4.3.6.	Construcción de híbridos CaCab3 y CaHal3 de <i>Candida albicans</i> .....	42

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

4.4.	Ensayos de crecimiento de levadura .....	44
4.4.1.	Medios sólidos.....	44
4.4.2.	Medios líquidos .....	44
4.5.	Esporulación de células diploides, disección de tétradas y análisis de esporas .....	44
4.6.	Microscopía de fluorescencia .....	45
4.7.	Ensayos de complementación en <i>E. coli</i> .....	45
4.8.	Preparación de extractos de levadura para inmunodetección y ensayos de interacción .....	46
4.9.	SDS-PAGE e inmunodetección.....	46
4.10.	Expresión y purificación de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i> .....	47
4.11.	Ensayos de inhibición de la actividad fosfatasa Ppz1 por Hal3 .....	48
4.12.	Ensayos de interacción proteína-proteína .....	49
4.12.1.	Entrecruzamiento químico .....	49
4.12.2.	Ensayos de interacción Ppz1-Hal3 <i>in vitro</i> .....	49
4.13.	Otras técnicas .....	50
4.13.1.	Ensayos fluorimétricos de desnaturalización.....	50
4.13.2.	Cromatografía de filtración en gel .....	50
4.13.3.	Determinación del contenido de flavina.....	50
5.	Objetivos .....	51
6.	Resultados.....	55
6.1.	Análisis comparativo de las fosfatasas tipo 1 y las fosfatasas tipo Z. ....	57
6.1.1.	El análisis mutagénico demuestra que el residuo D615 de Ppz1 juega un papel clave en la regulación de Ppz1. ....	58
6.2.	Estudio del núcleo hidrofóbico de las proteínas AtHal3 y ScHal3.....	62
6.2.1.	Análisis de los mutantes de AtHal3.....	64
6.2.2.	Caracterización funcional de las versiones de ScHal3 <i>in vivo</i> como inhibidores de Ppz1.....	70
6.2.3.	Caracterización <i>in vitro</i> de las versiones de ScHal3 .....	71
6.2.4.	Estudio de la función PPCDC de las versiones mutadas de ScHal3.....	73
6.3.	Mapeo funcional de la región N-terminal de ScHal3 .....	78

6.3.1.	Estudio de diferentes deleciones en la región N-terminal de ScHal3.....	79
6.3.2.	Mapeo de la región 67-110 de ScHal3 .....	83
6.3.3.	La región <sup>90</sup> KRVPAVTFS <sup>98</sup> es crucial para la regulación de la fosfatasa Ppz1 .....	86
6.3.4.	La pérdida de capacidad reguladora de las versiones de ScHal3 no se debe a la falta de interacción con Ppz1.....	92
6.3.5.	Efecto de las diferentes versiones de ScHal3 sobre la localización intracelular de Ppz1 en sobreexpresión.....	93
6.3.6.	Relevancia de la región N-terminal de <i>C. albicans</i> CaCab3 en la regulación de Ppz1 .....	95
7.	Discusión .....	97
7.1.	Análisis comparativo de las fosfatasas tipo 1 y las fosfatasas tipo Z. ....	99
7.2.	Estudio del núcleo hidrofóbico de las proteínas AtHal3 y ScHal3.....	102
7.3.	Mapeo funcional de la región N-terminal de ScHal3 .....	105
7.4.	Distribución del motivo regulador <sup>90</sup> K-R-X <sub>3</sub> -VTFS <sup>98</sup> en proteínas Hal3-like en hongos .....	108
8.	Conclusiones .....	111
9.	Bibliografía .....	115
11.	Anexos.....	131



# 1. Abreviaturas



<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>BS2G</b>	Bis[Sulfosuccinimidil] glutarato
<b>BSA</b>	Albumina de suero bovino
<b>CDK</b>	Quinasa dependiente de ciclina
<b>CoA</b>	Coenzima A
<b>C-terminal</b>	Carboxil terminal
<b>CWI</b>	Vía de la integridad de la pared celular
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleótidos trifosfato
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>ESM</b>	Error estándar de la media
<b>FMN</b>	Flavín mononucleótido
<b>GA</b>	Glutaraldehído
<b>Gal</b>	Galactosa
<b>GDP</b>	Guanosín difosfato
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente
<b>Glu</b>	Glucosa/Dextrosa
<b>GST</b>	Glutación S-transferasa
<b>GTP</b>	Guanosín trifosfato
<b>HA</b>	Hemaglutinina
<b>IDP</b>	Proteínas intrínsecamente desordenadas
<b>IDRs</b>	Regiones intrínsecamente desordenadas
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
<b>LB</b>	<i>Lysogeny Broth</i>
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>nt</b>	Nucleótidos
<b>N-Terminal</b>	Aminoterminal

## ABREVIATURAS

<b>OD</b>	Densidad Óptica
<b><i>o/n</i></b>	<i>Overnight</i>
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PKA</b>	Proteína Quinasa A (quinasa dependiente del cAMP)
<b>pNPP</b>	p-nitrophenylphosphate
<b>PP</b>	Fosfopanteteína
<b>PPC</b>	Fosfopantoteonilcisteína
<b>PPCDC</b>	Fosfopantotenoilcisteín Descarboxilasa
<b>PPM</b>	Proteína fosfatasa dependiente de metales
<b>PPP</b>	Fosfoproteínas fosfatasas
<b>PVDF</b>	Fluoruro de polivinilideno
<b>Raf</b>	Rafinosa
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RT</b>	Temperatura ambiente
<b>SC</b>	Medio sintético completo
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>TB</b>	<i>Terrific Broth</i>
<b>URA</b>	Uracilo
<b>YNB</b>	Base nitrogenada de levadura
<b>YP</b>	Extracto de levadura-peptona
<b>YPD</b>	Extracto de levadura-peptona con dextrosa

## 2. Resúmenes



The protein phosphatase Ppz1 of the model organism *S. cerevisiae* is divided into two distinct regions: an unstructured N-terminal domain and a C-terminal catalytic domain. The catalytic domain shares a high identity with the PP1c phosphatases. Ppz1 is one of the major determinants of salt homeostasis, negatively regulating the main K<sup>+</sup> entry channels, Trk1 and Trk2, and inhibiting the transcription of the *ENA1* gene, which encodes the Ena1 ATPase responsible for exporting Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>. Moreover, Ppz1 is negatively regulated by two subunits: ScHal3 and Vhs3, with ScHal3 being the most relevant *in vivo*. *S. cerevisiae* encodes a third protein structurally related to ScHal3 and Vhs3, called Cab3, which is not an inhibitor of Ppz1. The ScHal3 and Vhs3 proteins are moonlighting proteins, forming a heterotrimer, together with Cab3. This complex generates the enzyme PPCDC, which catalyses the third reaction in the coenzyme A synthesis pathway. Despite the identity between PP1c and Ppz, ScHal3 does not regulate PP1c.

Through chemical crosslinking and sequence analysis studies, our laboratory identified two distinctive residues between PP1c and Ppz phosphatases (lysines in PP1c that are mostly acidic amino acids in Ppz) which are likely interacting with ScHal3. The first objective of this thesis has been to verify if these two residues (D566 and D615) are key elements in Ppz1 for the regulation of the phosphatase mediated by ScHal3. We have shown that residue D615 is a differential structural determinant between PP1c and Ppz, and that it could contribute to the specific mechanism of regulation of Ppz phosphatases by Hal3-type proteins.

The PPCDC from *Arabidopsis thaliana* is a homotrimer composed of three AtHal3 subunits. In the second chapter of the Thesis we identify two residues (G115 and L117), located in the hydrophobic core of the PPCDC of *A. thaliana* that could be relevant in the formation of the trimeric enzyme. To verify this, we constructed mutated versions of these residues and their equivalents in ScHal3 (L403 and L405). After their characterization, we show that these residues are not relevant in the formation of functional PPCDC neither in *A. thaliana* nor in *S. cerevisiae*. However, it was shown that the amino acid L405 of ScHal3 is an important residue for the interaction between Ppz1 and ScHal3, and therefore, for the regulation of the phosphatase.

Finally, we describe a functional mapping of the N-terminal extension of ScHal3 trying to find relevant motifs for the regulation of Ppz1. After characterizing multiple mutated versions of ScHal3, we have identified the <sup>90</sup>K-R-X<sub>3</sub>-VTFS<sup>98</sup> motif as essential for Ppz1 inhibition. Our results suggest that there must be specific interactions between the two N-terminal regions of Ppz1 and ScHal3. Comparative analysis of fungal ScHal3-like proteins and phenotypic assays with hybrid versions of CaCab3 and CaHal3 proteins from *C. albicans* provide evidence that the <sup>90</sup>K-R-X<sub>3</sub>-VTFS<sup>98</sup> motif, or slightly degenerate versions, is essential for the regulation of the Ppz. This motif could be a determinant of the moonlighting capacity of fungal Hal3 or Cab3-like proteins.

La proteína fosfatasa Ppz1 del organismo modelo *S. cerevisiae* se divide en dos regiones diferenciadas: i) un dominio N-terminal desestructurado y un dominio catalítico C-terminal. El dominio catalítico guarda una alta identidad con las fosfatasas PP1c. Ppz1 es uno de los mayores determinantes de la homeostasis salina, regulando negativamente los principales canales de entrada de K<sup>+</sup>, Trk1 y Trk2, e inhibiendo la transcripción del gen *ENA1*, que codifica la ATPasa Ena1 encargada de exportar Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>. A su vez, Ppz1 está regulada negativamente por dos subunidades: ScHal3 y Vhs3, siendo ScHal3 la más relevante *in vivo*. *S. cerevisiae* posee una tercera proteína relacionada estructuralmente con ScHal3 y Vhs3, denominada Cab3, que no es un inhibidor de Ppz1. Las proteínas ScHal3 y Vhs3 son proteínas *moonlighting*. Junto con Cab3, forman un heterotrímero que conforma el enzima PPCDC, el cual que cataliza la tercera reacción en la vía de síntesis de coenzima A. Pese a la identidad entre las PP1c y las Ppz, ScHal3 no regula las PP1c.

Mediante estudios de entrecruzamiento químico y de análisis de secuencias nuestro laboratorio identificó dos residuos distintivos entre las fosfatasas PP1c y las Ppz (lisinas en PP1c que son mayoritariamente aminoácidos ácidos en Ppz) que posiblemente interaccionen con ScHal3. El primer objetivo de esta Tesis ha sido comprobar si estos dos residuos son elementos clave en Ppz1 (D566 y D615) en la regulación de la fosfatasa mediada por ScHal3. Hemos demostrado que el residuo D615 es un determinante estructural diferencial entre las PP1c y las Ppz, y que puede contribuir al mecanismo específico de regulación de las fosfatasas Ppz por proteínas tipo Hal3.

La PPCDC de *Arabidopsis thaliana* es un homotrímero compuesto por tres subunidades de AtHal3. En el segundo capítulo de la Tesis identificamos dos residuos (G115 y L117), ubicados en el núcleo hidrofóbico de la PPCDC de *A. thaliana* que podían ser relevantes en la formación de este enzima. Para verificarlo, construimos versiones mutadas en estos residuos y sus equivalentes en ScHal3 (L403 y L405). Tras caracterizarlas, demostramos que estos residuos no son determinantes en la formación de PPCDC funcionales ni en *A. thaliana*, ni en *S. cerevisiae*. Sin embargo, se puso de manifiesto que el aminoácido L405 de ScHal3 es un residuo importante para la interacción entre Ppz1 y ScHal3 y por tanto para la regulación de la fosfatasa.

Por último, realizamos un mapeo funcional de la extensión N-terminal de ScHal3 tratando de encontrar motivos relevantes para la regulación de Ppz1. Tras la caracterización de múltiples versiones mutadas de ScHal3 hemos identificado el motivo <sup>90</sup>K-R-X<sub>3</sub>-VTFS<sup>98</sup> como imprescindible para la inhibición de Ppz1. Nuestros resultados sugieren que debe haber interacciones específicas entre las regiones N-terminales de Ppz1 y ScHal3. El análisis comparativo de proteínas fúngicas similares a ScHal3 y los ensayos fenotípicos con versiones híbridas de las proteínas CaCab3 y CaHal3 de *C. albicans* nos aportan evidencias de que el motivo R/K-R/K-X<sub>3</sub>-VTFS, o versiones ligeramente degeneradas, es esencial para la regulación de las Ppz. Este motivo podría ser un determinante de la capacidad *moonlighting* de las proteínas tipo Hal3 o Cab3 de hongos.

La proteïna fosfatasa Ppz1 de l'organisme model *S. cerevisiae* es divideix en dues regions diferenciades: un domini N-terminal desestructurat i un domini catalític C-terminal. El domini catalític guarda una alta identitat amb la fosfatasa PP1c. Ppz1 és un dels majors determinants de la homeòstasi salina, regulant negativament els principals canals d'entrada de K<sup>+</sup>, Trk1 i Trk2, i inhibint la transcripció del gen *ENA1*, que codifica la ATPasa Ena1, encarregada d'exportar Na<sup>+</sup> i K<sup>+</sup>. A més, Ppz1 està regulada negativament per dues subunitats: ScHal3 i Vhs3, essent ScHal3 la més rellevant *in vivo*. *S. cerevisiae* posseeix una tercera proteïna relacionada estructuralment amb ScHal3 i Vhs3, denominada Cab3, que no és un inhibidor de Ppz1. Les proteïnes Hal3 i Vhs3 són proteïnes *moonlighting* ja que, juntament amb Cab3, formen un heterotrímer que constitueix l'enzim PPCDC, el qual catalitza la tercera reacció de la via de síntesi de coenzim A. Tot i l'elevada identitat entre PP1c i Ppz1, ScHal3 no regula les PP1c.

Mitjançant estudis d'entrecreuament químic i anàlisi de seqüències, el nostre laboratori va identificar dos residus distintius entre les fosfatases PP1c i les Ppz (lisines en PP1c que majoritàriament són aminoàcids àcids en Ppz1) que possiblement interaccionen amb ScHal3. El primer objectiu d'aquesta Tesi ha estat comprovar si aquests residus (D566 y D615) són elements claus en Ppz1 per la regulació de la fosfatasa per part de ScHal3. Hem demostrat que el residu D615 és un determinant estructural diferencial entre les PP1c i les Ppz, i que pot contribuir al mecanisme específic de regulació de les fosfatases Ppz per proteïnes tipus Hal3.

La PPCDC d'*Arabidopsis thaliana* és un homotrímer compost per tres subunitats de AtHal3. En el segon capítol d'aquesta Tesi identifiquem dos residus (G115 y L117), ubicats al nucli hidrofòbic de la PPCDC d'*A. thaliana* que podrien ser rellevants en la formació d'aquest enzim. Per verificar-ho, vam construir versions mutades en aquests residus i els equivalents en ScHal3 (L403 i L405). Després de caracteritzar-les, vam demostrar que aquests residus no són determinants en la formació de PPCDC funcionals ni en *A. thaliana*, ni en *S. cerevisiae*. No obstant, es va posar de manifest que l'aminoàcid L405 de ScHal3 és un residu important per la interacció entre Ppz1 i ScHal3 i, per tant, per la regulació de la fosfatasa.

Per últim, vam realitzar un mapeig funcional de l'extensió N-terminal de ScHal3 amb l'objectiu de trobar motius rellevants per a la regulació de Ppz1. Després de la caracterització de múltiples versions mutades de ScHal3 hem identificat el motiu <sup>90</sup>K-R-X<sub>3</sub>-VTFS<sup>98</sup> com a imprescindible per la inhibició de Ppz1. Els nostres resultats suggereixen que hi deu haver interaccions específiques entre les regions N-terminals de Ppz1 i ScHal3. L'anàlisi comparatiu de proteïnes fúngiques similars a ScHal3 i els assajos fenotípics amb versions híbrides de les proteïnes CaCab3 i CaHal3 de *C. albicans* ens aporten evidències de que el motiu R/K-R/K-X<sub>3</sub>-VTFS, o versions lleugerament degenerades, és essencial per la regulació de les Ppz1. Aquest motiu podria ser un determinant de la capacitat *moonlighting* de les proteïnes tipus Hal3 o Cab3 en fongs.



# 3. Introducción



### 3.1. Saccharomyces cerevisiae como un organismo modelo

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un organismo eucariota unicelular perteneciente al reino *Fungi*, al filo *Ascomycota* y a la familia *Saccharomycetaceae*. En la naturaleza *S. cerevisiae* se encuentra principalmente en suelos, cortezas de árbol y en la piel de frutas (Wang *et al*, 2012). El uso de *S. cerevisiae* por humanos está documentado desde la antigüedad, debido a su implicación en la preparación de alimentos o bebidas alcohólicas. Este organismo sigue siendo de gran importancia en la actualidad tanto en la industria alimentaria, por su papel en la producción de bebidas fermentadas, pan y otros alimentos, como en la industria biotecnológica por ser un organismo frecuentemente utilizado en la producción de compuestos de interés comercial y en la expresión heteróloga de proteínas.

Las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en el laboratorio presentan dos formas estables: haploides o diploides. Las células haploides están diferenciadas sexualmente en dos tipos:  $a$  o  $\alpha$ . Estas células son capaces de aparearse formando células diploides, las cuales pueden proliferar mediante mitosis o, bajo condiciones de falta de nutrientes, pueden realizar la meiosis, generando 4 esporas haploides. La temperatura óptima de crecimiento de este organismo es 28°C y lo hace tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, utilizando diversas fuentes de carbono, siendo la glucosa la fuente de carbono predilecta. *S. cerevisiae* es un organismo fermentativo preferencial y, mientras disponga de glucosa en el medio, fermenta este azúcar a alcohol, aun en presencia de oxígeno.

*S. cerevisiae* comparte con eucariotas superiores, incluidos mamíferos, los mecanismos celulares básicos (replicación, recombinación y algunos aspectos de la división celular), así como las principales vías metabólicas (Botstein & Fink, 2011), siendo esta levadura el primer organismo eucariota cuyo genoma se secuenció por completo (Goffeau *et al*, 1996). *S. cerevisiae* acumula además un conjunto de importantes cualidades, entre las que destaca un cultivo fácil y económico y una gran accesibilidad a una amplia variedad de herramientas genéticas, lo que define este organismo como un excelente modelo para estudios metabólicos y genéticos.

### 3.2. La fosforilación de proteínas

La fosforilación reversible de proteínas es crucial para la regulación de múltiples funciones celulares, como el metabolismo, la progresión del ciclo celular y la respuesta a estrés. La adición de uno o varios grupos fosfato causa diversas alteraciones a las proteínas, tales como cambios en la actividad enzimática, impedir o promover interacciones con otras proteínas, o cambios en la localización celular, entre otras (Cohen, 2002). La fosforilación es la modificación postraduccional más común de las proteínas y, en *S. cerevisiae* se estima que el 50% del proteoma puede ser fosforilado (Vlastaridis *et al*, 2017; Oughtred *et al*, 2019).

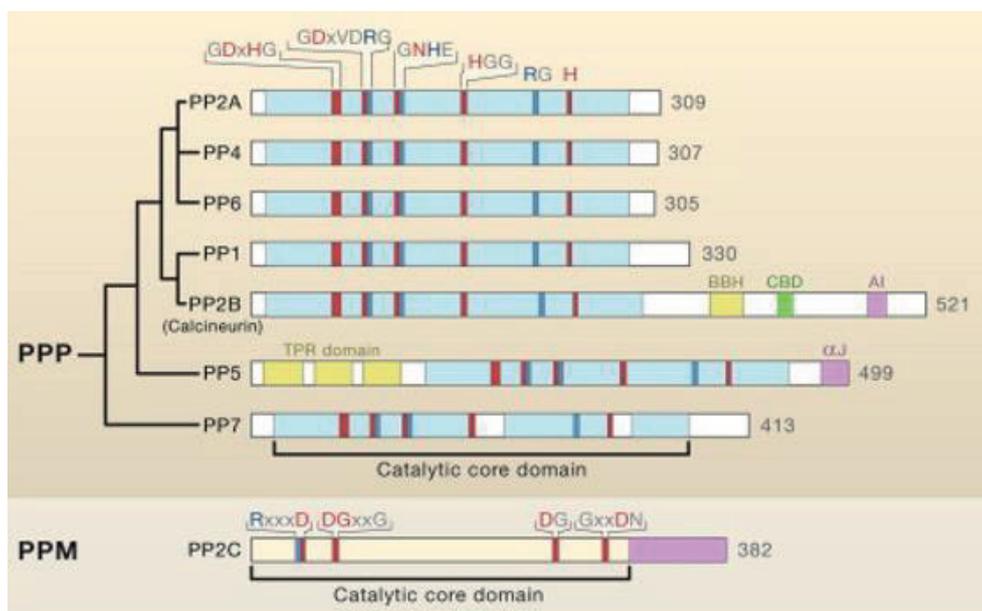
El estado de fosforilación del proteoma está regulado por el balance entre las proteínas quinasas (añaden el grupo  $\gamma$ -fosfato, proveniente del ATP, al sustrato) y las proteínas fosfatasas (hidrolizan el grupo fosfato del sustrato). La fosforilación puede realizarse sobre nueve residuos: serina, treonina, tirosina, cisteína, arginina, lisina, ácido aspártico, ácido glutámico e histidina. En eucariotas los residuos que aparecen mayoritariamente fosforilados son la serina, la treonina y, en menor cantidad, la tirosina (Moorhead *et al*, 2009). Estudios del proteoma humano revelaron que estos tres residuos representan el 86,4%, 11,8% y 1,8%, respectivamente, del número total de residuos fosforilados (Olsen *et al*, 2006).

A diferencia de las quinasas, las funciones y regulación de las fosfatasas están menos exploradas, y esto es debido a varias causas. Por un lado, las fosfatasas son menos selectivas, reconociendo a menudo múltiples sustratos. Por otro lado, un mismo sustrato puede ser desfosforilado por diversas fosfatasas. Finalmente, a diferencia de las quinasas, en los sustratos de las fosfatasas no ha podido identificarse, de una manera general, secuencias primarias específicas alrededor del residuo desfosforilado, impidiendo así la predicción *in silico* de éstos. Como norma general el número de quinasas es mucho mayor que el de fosfatasas. El genoma de *S. cerevisiae* codifica 127 proteínas quinasas y solo se han identificado 43 proteínas fosfatasas (Offley & Schmidt, 2019).

Las fosfatasas se han clasificado en tres familias principales, en función del residuo del que eliminan el grupo fosfato: i) Serina-treonina fosfatasas (Ser/Thr fosfatasas), ii) fosfatasas de tirosina (PTP) y iii) fosfatasas duales, las cuales poseen la capacidad de desfosforilar residuos de serina, treonina y tirosina.

### 3.2.1. Ser/Thr fosfatasa

La primera clasificación de las Ser/Thr fosfatasa, basada en estudios bioquímicos, las dividió en dos familias: fosfatasa de tipo 1 (PP1) o de tipo 2 (PP2) (Ingebritsen *et al*, 1980). Posteriormente se establecieron criterios bioquímicos y funcionales adicionales que clasificaban las Ser/Thr fosfatasa en cuatro grandes grupos: PP1, PP2A, PP2B y PP2C, en función de la especificidad de sustrato, dependencia de cationes divalentes y sensibilidad a diversos inhibidores (Cohen, 1989). Actualmente, las Ser/Thr fosfatasa se dividen en dos grandes familias, basándose esta clasificación en la secuencia, estructura y propiedades enzimáticas: fosfoproteínas fosfatasa (PPP) y proteínas fosfatasa dependientes de metales (PPM) (Shi, 2009b) (Figura 1).



**Figura 1. Clasificación de las Ser/Thr fosfatasa.** Las dos principales familias de las Ser/Thr fosfatasa son las fosfoproteínas fosfatasa (PPP) y las proteínas fosfatasa dependientes de metales (PPM). Se muestran miembros de sus subunidades catalíticas representativos de cada familia. Los dominios catalíticos se señalan debajo del diagrama. Los motivos funcionales característicos están representados encima del diagrama. Todas las proteínas representadas corresponden a *Homo sapiens* excepto la PP7 que pertenece a *Arabidopsis thaliana*. Imagen de (Shi, 2009b).

## 3.2.1.1. Fosfoproteínas fosfatasas (PPP)

Las fosfatasas pertenecientes a la familia de las fosfoproteínas fosfatasas (PPP) presentan una alta identidad de secuencia, especialmente en el núcleo catalítico (Cohen, 1989). Esta familia está compuesta por PP1, PP2A, PP2B, PP4, PP5, PP6 y PP7. Las PPP presentan distintas subunidades reguladoras, las cuales modulan su función celular, por ejemplo, la actividad de la subunidad catalítica de PP1 (PP1c) es regulada por la interacción con los polipéptidos denominados Inhibidor-1 e Inhibidor-2, los cuales no tienen efecto sobre la actividad de los enzimas del grupo PP2. La actividad catalítica de PP1 depende de la presencia en su centro activo de iones de  $Mn^{2+}$ , mientras que estos iones no son necesarios para la actividad de PP2A, y PP2B requiere iones  $Ca^{2+}$  (Ingebritsen & Cohen, 1983). Todos los miembros de esta familia de fosfatasas, a excepción de las PP7, están representadas en *S. cerevisiae* (Stark, 1996).

## 3.2.1.2. Proteínas fosfatasas dependientes de metales (PPM)

La familia de las fosfatasas dependientes de metales (PPM) está compuesta por PP2C y las fosfatasas del complejo de la piruvato deshidrogenasa. Las PP2C tienen características similares a las PP2, tales como ser insensibles a los Inhibidores-1 y 2, pero no presentan identidad de secuencia con las PPP y necesitan de iones  $Mg^{2+}$  y  $Mn^{2+}$  para ser catalíticamente activas. Las PPM no tienen ninguna subunidad reguladora conocida, y funcionan como enzimas monoméricos. La capacidad de las PP2C de realizar funciones diferentes es debida, posiblemente, a la existencia de diversas isoformas de esta familia de enzimas, los cuales presentan un dominio PP2C conservado, variando sus dominios amino o carboxilo terminales. De las siete PPM presentes en *S. cerevisiae* las mejores caracterizadas son la Ptc1 y la Ptc2 (Sharmin *et al*, 2014).

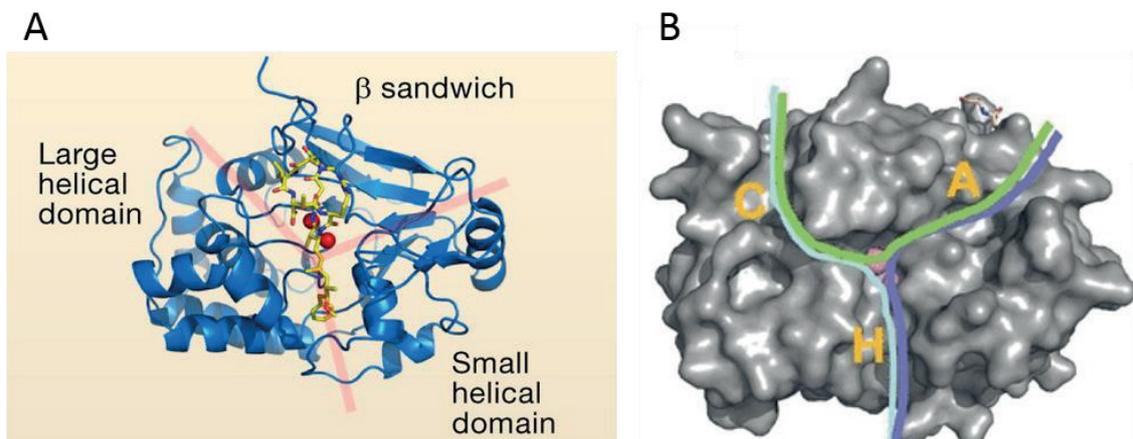
## 3.2.2. Ser/Thr fosfatasas de tipo 1 (PP1)

Investigaciones previas establecieron que PP1 y PP2A representan más del 90% de la actividad fosfatasa en eucariotas (Moorhead *et al*, 2007; Virshup & Shenolikar, 2009; Bollen *et al*, 2010), siendo PP1 la que más contribuiría en esta tarea, debido a la gran diferencia en la abundancia relativa entre estas dos proteínas (Janssens *et al*, 2008; Bollen *et al*, 2010). Las fosfatasas PP1 regulan diversas funciones celulares tales como la síntesis de proteínas, el procesamiento del RNA, la señalización neuronal, el metabolismo de glucógeno, la inducción de la apoptosis y la regulación de diversos puntos de control del ciclo celular (Cannon, 2010; Verbinnen *et al*, 2017).

La subunidad catalítica de PP1 (PP1c) tiene una masa molecular de 35 a 38 kDa, y se asocia a una o más subunidades reguladoras, formando complejos estables denominados holoenzimas (Shi, 2009b). La asociación de PP1c con distintas subunidades

reguladoras define la especificidad de sustrato, localización subcelular y actividad fosfatasa del holoenzima (Zhao & Lee, 1997; Cohen, 2002; Casamayor & Ariño, 2020). Hasta hace pocos años se especulaba que las subunidades PP1c no presentaban ningún tipo de preferencia de sustrato y que esta era debida únicamente a la subunidad reguladora. Sin embargo, los últimos hallazgos sugieren que el centro activo de las subunidades catalíticas presenta cierta preferencia por determinados motivos que rodean el residuo a desfosforilar (Rogers *et al*, 2016; Hoermann *et al*, 2020).

Hoy día se dispone de múltiples estructuras tridimensionales de PP1c de mamíferos. Como podría esperarse, a causa de su alta identidad de secuencia primaria, su estructura es muy similar. Las subunidades PP1c adoptan un plegamiento  $\alpha/\beta$  compacto (Figura 2A), y el sándwich  $\beta$  se encuentra entre dos dominios en hélice  $\alpha$ , los cuales corresponden a los extremos N-terminal y C-terminal (Egloff *et al*, 1995). Estas tres regiones diferenciadas están separadas por tres surcos denominados surco hidrofóbico, surco ácido y surco C-terminal (Figura 2B), que forman un hueco central donde se sitúa el centro catalítico de PP1c, constituido por tres residuos de histidina, dos residuos de ácido aspártico, una asparagina y dos iones ( $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ) esenciales para la actividad fosfatasa. Este centro catalítico está altamente conservado en las PPP, sugiriendo un mecanismo de reacción común (Shi, 2009a).



**Figura 2. Estructura de la subunidad catalítica de la proteína fosfatasa 1 (PP1c).** A) Estructura en formato *cartoon* de PP1c. En azul la estructura de la PP1c de conejo unida a ácido okadaico (amarillo). La forma en Y (rosa) define los tres surcos de PP1c. Los iones  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  están representados como esferas rojas. Imagen de (Shi, 2009b). B) Representación de la superficie de la PP1c humana. Los iones metálicos se muestran como esferas rosas. Se representan con líneas los tres surcos (H, hidrofóbico; A, ácido; y C, C-terminal). Imagen de (Peti *et al*, 2013).

En eucariotas, las PP1c están altamente conservadas, presentando una identidad de secuencia del 70% o superior. Mientras que los genomas de eucariotas superiores codifican varias isoformas de PP1c (3 en mamíferos, y hasta 9 isoformas en la planta *Arabidopsis thaliana* (Schweighofer & Meskiene, 2015)), en *S. cerevisiae* el gen *GLC7* codifica la única subunidad PP1c. *GLC7* codifica una proteína de 312 residuos (36 kDa), la cual presenta una identidad del 85% con las PP1c humanas. Es un gen esencial (Ohkura *et al*, 1989; Clotet *et al*, 1991; Feng *et al*, 1991) y un estudio de complementación confirmó la ortología de *Glc7* con todos los isoenzimas de PP1c en humanos (Gibbons *et al*, 2007).

Inicialmente, *Glc7* atrajo la atención debido a su rol en la acumulación de glucógeno (Peng *et al*, 1990; Feng *et al*, 1991). Al igual que las PP1c de mamífero, *Glc7* regula una gran variedad de eventos celulares. Cuando *Glc7* se encuentra en el núcleo es responsable de la unión de los microtúbulos al cinetocoro, participa en la regulación transcripcional y en diversos puntos de control del ciclo celular. En el citosol, *Glc7* está involucrada en el metabolismo de carbohidratos, la regulación de septinas, la endocitosis, la organización de la actina y la localización de la gema (Cannon, 2010).

### 3.2.2.1. Regulación y motivos de interacción de PP1c

Como hemos comentado, la subunidad catalítica de las fosfatasa de tipo-1 (PP1c) no actúa independientemente y, para poder desempeñar las diversas funciones celulares, necesita asociarse con diferentes subunidades reguladoras (Casamayor & Ariño, 2020). El número de estas subunidades reguladoras varía entre los diferentes organismos eucariotas. En mamíferos se han descrito más de 100 posibles subunidades reguladoras (Moorhead *et al*, 2007), y al menos 30 en *S. cerevisiae* (Cannon, 2010; Offley & Schmidt, 2019). Un número significativo de las subunidades reguladoras de PP1 son proteínas intrínsecamente desordenadas (IDP). A pesar de ello, estas se adaptan e interaccionan con la PP1c de manera similar (Choy *et al*, 2012). Todas ellas presentan secuencias cortas (de 4 a 8 residuos), denominadas SLiMs por sus siglas en inglés (*Short Linear Motifs*), que interaccionan con la subunidad catalítica. Se han encontrado hasta 10 motivos SLiM diferentes en mamíferos, aunque no todos han sido descritos en levadura (Casamayor & Ariño, 2020). En *S. cerevisiae* la mayoría de las subunidades reguladoras como, por ejemplo, *Arf1*, *Bni4*, *Bud14*, *Gac1*, *Gip2*, *Ref2*, *Reg1*, *Reg2* y *Sla1*, interactúan con el surco hidrofóbico de *Glc7* mediante la secuencia consenso RVxF. Mutaciones en este surco hidrofóbico provocan una reducción de la afinidad de algunas subunidades reguladoras, provocando fenotipos compatibles con una pérdida de la actividad de PP1c (Wu & Tatchell, 2001). Por el contrario, *Glc7* tiene subunidades reguladoras, como *Sds22* y *Pti1*, que no presentan este motivo. *Sds22* interacciona cerca del núcleo catalítico mediante una secuencia rica en repeticiones de leucina (Ceulemans & Bollen, 2004) y aunque *Pti1* se describió hace años (He & Moore, 2005), todavía no se ha identificado el motivo de *Glc7* con el que interacciona (He & Moore, 2005).

### 3.2.2.2. Reconocimiento de los residuos desfosforilables por PP1 y su relación con regiones intrínsecamente desestructuradas (IDRs)

Uno de los principales problemas en el estudio de las fosfatasa, como se ha comentado anteriormente, es la aparente falta de secuencias primarias de reconocimiento que definen el residuo a desfosforilar. Estudios recientes han mostrado que las PP1 desfosforilan mayoritariamente (61%), residuos de serina o treonina de regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs) (Hoermann & Köhn, 2021). Las regiones IDRs se caracterizan por ser secuencias que no presentan una estructura secundaria definida, lo que les confiere un alto grado de flexibilidad. Esta gran flexibilidad les permite interactuar con diversas proteínas, lo que explica que las proteínas con IDRs jueguen un papel central en la señalización celular (Iakoucheva *et al*, 2002; Liu *et al*, 2006; Galea *et al*, 2008).

A pesar de que la falta de características estructurales definidas y de secuencia comunes dificulta la identificación, estudio y clasificación de las IDRs, se ha observado que las IDRs están enriquecidas en residuos de serina, prolina y arginina (Iakoucheva, 2004; Basile *et al*, 2019; Hoermann & Köhn, 2021). Precisamente, una característica que parece constante en las IDRs reconocidas por PP1 es la presencia de un residuo de prolina en la posición +1 del residuo a desfosforilar y una arginina en la posición -3 (Hoermann & Köhn, 2021). Estos nuevos datos sobre las PP1 sugieren un insospechado modelo de reconocimiento de sustrato: el primer paso sería la formación del holoenzima, lo que provoca el reconocimiento, mediado por la subunidad reguladora, de la molécula a desfosforilar, seguido de un reconocimiento y selección del residuo a desfosforilar, dentro de la región IDR, por parte de la subunidad PP1c. Es importante remarcar que la presencia de residuos de arginina en las posición -3 del residuo a desfosforilar, o de prolina en la +1, son rasgos característicos de secuencias de reconocimiento de algunas familias de quinasas como: PKA (R-R-X-S/T), Aurora quinasas (R-R-X-S/T) o CDKs (S/T-P-X-K) (Pinna & Ruzzene, 1996; Kettenbach *et al*, 2011, 2012).

### 3.2.3. Las fosfatasa de tipo Z

Las proteínas fosfatasa de tipo Z (Ppz) guardan relación estructural con las PP1, pero a diferencia de estas, que son ubicuas, las Ppz están restringidas a hongos. Las primeras Ppzs descritas fueron las de *S. cerevisiae*, codificadas por dos genes parálogos (PPZ1 y PPZ2) (Posas *et al*, 1992; Lee *et al*, 1993a). A diferencia del gen *GLC7*, estos dos genes no son esenciales, e incluso una doble mutación *ppz1Δ ppz2Δ* es viable, por lo que se dedujo que estas fosfatasa no deben realizar las mismas funciones que Glc7. Posteriormente, se han identificado y caracterizado Ppzs en otros hongos, como Pzh1 en *Schizosaccharomyces pombe* (Balcells *et al*, 1997), Pzl1 en *Neurospora crassa* (Vissi *et al*, 2001), CaPpz1 en *Candida albicans* (Adam *et al*, 2012), PpzA en *Aspergillus nidulans*

(Leiter *et al*, 2012), UmPpz1 en *Ustilago maydis* (Zhang *et al*, 2019b) y CnPpz1 en *Cryptococcus neoformans* (Zhang *et al*, 2019a).

Estructuralmente, las Ppz presentan dos regiones claramente diferenciadas: i) una región aminoterminal, ampliamente desestructurada, con una gran variabilidad de secuencia y extensión entre los diferentes hongos y ii) un dominio catalítico carboxiterminal muy conservado, que guarda identidad con las PP1c. En su extensión aminoterminal, las Ppz conservan un residuo de glicina en la posición 2, dentro de una secuencia consenso de N-miristoilación. Esta miristoilación ha sido demostrada *in vivo* para Ppz1 (Clotet *et al*, 1996) y también se ha verificado la miristoilación del octapéptido inicial de Ppz por parte de la N-miristioil transferasa Nmt1 (Johnson *et al*, 1994). Es sabido que la miristoilación de las proteínas define su localización celular, mediando su interacción con membranas o favoreciendo su estabilidad (Yonemoto *et al*, 1993).

En *S. cerevisiae*, Ppz1 y Ppz2 tienen un tamaño de 692 y 710 residuos, respectivamente. Estas dos proteínas comparten una identidad del 85,9% entre sus dominios catalíticos y de un 32.2% entre sus extensiones aminoterminal (Posas *et al*, 1992; Hughes *et al*, 1993; Calafí *et al*, 2020a). Es destacable que el dominio N-terminal de las Ppz de *S. cerevisiae* es rico (30% de abundancia) en residuos de serina, treonina y asparagina. Cuando se compara los dominios catalíticos de las Ppz de *S. cerevisiae* con Glc7, se obtiene que Ppz1 presenta una identidad del 57.1% y Ppz2 del 60,4%. Ppz1 se localiza mayoritariamente en la periferia celular o, en menor medida, asociada a estructuras internas, siendo necesario para la localización periférica el residuo Gly-2 (Venturi *et al*, 2000; Lee *et al*, 2019; Albacar *et al*, 2022). Otro hecho remarcable, es que las regiones aminoterminal de Ppz1 y Ppz2 conservan la secuencia SxRSxRxxS, en forma de <sup>43</sup>SSRSRRSLPS<sup>52</sup> y <sup>43</sup>SSRSLRSLRS<sup>52</sup>, respectivamente. Esta secuencia consenso se ha demostrado importante en la fosfatasa de *D. hansenii* para la regulación de la homeostasis catiónica (Minhas *et al*, 2012). La similitud de secuencia entre la región catalítica de Ppz1 y la de las PP1c permitió identificar en Ppz1 residuos, como la Arg-451 (equivalente a la Arg-95 en PP1c), cuya mutación (R451L) conduce a una fosfatasa prácticamente inactiva (Clotet *et al*, 1996). Así como ocurre con PP1c, la producción de Ppz1 recombinante activa requiere la inclusión de Mn<sup>2+</sup> tanto en el medio de cultivo como durante el proceso de purificación.

### **3.3. Funciones celulares de Ppz1**

Inicialmente Ppz1 fue identificada como una fosfatasa implicada en el mantenimiento de la pared celular (Posas *et al*, 1993; Lee *et al*, 1993a). En *S. cerevisiae* Ppz1 tiene un papel importante en diversos procesos celulares tales como la regulación de la homeostasis catiónica (Posas *et al*, 1993, 1995; Yenush *et al*, 2002), la progresión en el ciclo celular (Clotet *et al*, 1999; de Nadal *et al*, 2001), la traducción de proteínas

(Aksenova *et al*, 2007; de Nadal *et al*, 2001; Calafí *et al*, 2020b) y la homeostasis de ubiquitinas (Lee *et al*, 2017).

### 3.3.1. Homeostasis catiónica

El mantenimiento de la homeostasis es esencial para la supervivencia de las células. En *S. cerevisiae* la concentración de los principales cationes monovalentes ( $H^+$ ,  $K^+$  y  $Na^+$ ), está fuertemente regulada (Serrano, 1996) y sus mecanismos de transporte están bien identificados y caracterizados (Arino *et al*, 2010; Merchan *et al*, 2011; Barreto *et al*, 2012; Cyert & Philpott, 2013; Kahm & Kschischo, 2016). El catión  $Na^+$  puede entrar en la célula a través de diversos sistemas de transporte de baja afinidad y su acumulación intracelular puede llegar a ser tóxica. *S. cerevisiae* es capaz de mantener una baja concentración intracelular de  $Na^+$ , incluso en presencia de altas concentraciones extracelulares del catión, gracias a la regulación coordinada de los sistemas de entrada y salida. Hay dos clases principales de transportadores que median el eflujo de este catión: Nha1 (antiportador  $Na^+/H^+$ ) y la familia de ATPasas Ena (Yenush, 2016).

El antiportador  $Na^+/H^+$  Nha1 es una proteína de membrana plasmática de 958 residuos codificada por el gen *NHA1*. Este gen, cuya expresión es constitutiva (Bañuelos *et al*, 1998), fue identificado en un estudio donde se observó que su sobreexpresión mejoraba el crecimiento de una cepa sensible a sal (Prior *et al*, 1996). En la proteína Nha1 se predicen doce dominios transmembrana, y una extensa región citosólica de 550 residuos, que corresponde a su región carboxiterminal. Nha1 también es capaz de eliminar cationes  $K^+$  con una afinidad similar a la que presenta por los cationes  $Na^+$ . Las ATPasas Ena se localizan en la membrana celular, y eliminan cationes  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Li^+$  del interior celular en contra de gradiente, utilizando la energía generada por la hidrólisis de ATP (Haro *et al*, 1991; Benito *et al*, 1997). La delección de los genes de la familia *ENA* provoca un aumento de la sensibilidad a sal y a pH alcalino (Haro *et al*, 1991; Rodríguez-Navarro *et al*, 1994). El primer miembro de esta familia en ser identificado fue Ena1 y es aceptado como el miembro funcionalmente más relevante (Haro *et al*, 1991; Wieland *et al*, 1995). La expresión de los genes *ENA* es muy baja en condiciones de cultivo normales, pero la expresión de *ENA1* se induce fuertemente cuando las levaduras se encuentran en medios con altas concentraciones de  $Na^+$  (y/o  $Li^+$ ) o pH alcalino (Garcia-deblas *et al*, 1993; Mendoza *et al*, 1994), así como en condiciones de baja glucosa (Alepez *et al*, 1997). La regulación transcripcional del gen *ENA1* requiere la participación de diversas vías de señalización que, mediante múltiples factores de transcripción (Crz1, Sko1, Mig1 y Nrg1 entre otros), activan o silencian su transcripción (Ruiz & Ariño, 2007).

En *S. cerevisiae* las Ppz son importantes reguladores de la tolerancia salina, limitando la expresión del gen *ENA1* (Posas *et al*, 1995; Ariño, 2002; Ruiz *et al*, 2003). Las cepas mutantes *ppz1Δ* presentan fenotipos hipertolerantes a cationes de  $Li^+$  y  $Na^+$ , debido a un aumento del eflujo de estos cationes, acompañado por un aumento de la expresión de *ENA1* (Posas *et al*, 1995). Estas características se ven exageradas por la

delección adicional del gen *PPZ2*, que por sí sola no da lugar a fenotipos relevantes (Posas *et al*, 1995; Ruiz *et al*, 2003). El mecanismo por el cual Ppz1 regula la expresión de *ENA1* no está completamente claro, pero parece que este efecto está mediado por la vía de la PP2B o calcineurina (Ruiz *et al*, 2003).

Uno de los cationes que juega un papel relevante en diversos procesos, como traducción de proteínas, síntesis de piruvato y regulación del ciclo celular, es el  $K^+$  (Arino *et al*, 2010; Rodríguez-Navarro & Benito, 2010; Cyert & Philpott, 2013). Mantener una concentración adecuada de este catión es crucial para la supervivencia celular, ya que el  $K^+$  es determinante para el volumen y la turgencia celular, el potencial de membrana y la fuerza iónica intracelular. El transporte de potasio involucra sistemas de alta y baja afinidad (Rodríguez-Navarro & Ramos, 1984). El sistema de alta afinidad está mediado por los transportadores Trk1 y Trk2 (Gaber *et al*, 1988; Ko *et al*, 1990; Ko & Gaber, 1991), siendo Trk1 el más relevante fisiológicamente. La doble mutación *trk1Δ trk2Δ* provoca que las cepas no sean capaces de crecer en medios con concentraciones de  $K^+$  normales, siendo solventado este defecto de crecimiento con la adición de potasio al medio (Ko *et al*, 1990; Ko & Gaber, 1991; Gomez *et al*, 1996; Madrid *et al*, 1998; Mulet *et al*, 1999).

Los transportadores Trk se regulan mediante fosforilación (Yenush, 2016). Estudios previos han demostrado que las quinasas Hal4 y Hal5 son necesarias para estabilizar los transportadores Trk en la membrana plasmática, especialmente en condiciones de bajo potasio (Mulet *et al*, 1999; Pérez-Valle *et al*, 2007), aunque no se ha demostrado la fosforilación directa de los transportadores por parte de estas quinasas. Las células doble mutantes *ppz1Δ ppz2Δ* presentan una entrada masiva de potasio, lo que provoca una pérdida del potencial de membrana y una alcalinización del citosol (Yenush *et al*, 2002). Posteriormente, se describió que la fosfatasa Ppz1 interacciona físicamente con el transportador Trk1, y que el nivel de fosforilación de este transportador aumenta en una cepa mutante *ppz1Δ ppz2Δ* (Yenush *et al*, 2005). Aunque la desfosforilación directa de los transportadores Trk por Ppz1 no ha sido descrita todavía, todo indica que las fosfatasas Ppz, especialmente Ppz1, están implicadas en la regulación negativa de los transportadores Trk, jugando un papel importante en el mantenimiento de la concentración intracelular de potasio.

Como se ha mencionado al comienzo del apartado 3.3., Ppz1 fue asociada originalmente con el mantenimiento de la pared celular en *S. cerevisiae* (Posas *et al*, 1993). Además, el gen *PPZ2* se identificó como un supresor dependiente de dosis del fenotipo lítico característico de las cepas mutantes *mpk1/slt2Δ* (Lee *et al*, 1993a). La pared celular en *S. cerevisiae* es fundamental para el mantenimiento de la forma celular y actúa como protección contra agentes físicos o químicos externos (Klis *et al*, 2006). Esta estructura es vital para la supervivencia de la levadura y su mantenimiento está estrictamente controlado por la vía de la integridad de la pared celular (CWI). La vía CWI se activa en respuesta a estrés de pared causado por agentes químicos como rojo Congo, blanco de calcoflúor y cafeína, enzimas como la zimoliasa, o por condiciones

ambientales adversas como un choque térmico, un choque osmótico y pH alcalino (Levin, 2005). Las proteínas de membrana Wsc1 y Mid2, actúan como sensores de la vía, activando la GTPasa Rho1. Rho1 transduce la señal interaccionando con la proteína quinasa C (Pkc1) y activándola. La Pkc1 provoca entonces la activación de la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK, por sus siglas en inglés), que consiste en una cascada de fosforilaciones mediadas por diversas proteínas quinasas (Bck1, Mkk1, Mkk2 y Slk2) (Levin, 2011). La activación de Slk2 provoca la fosforilación de multitud de proteínas diana tanto nucleares, como el factor de transcripción Rlm1, como citosólicas, activándose la transcripción de genes para responder al daño de la pared celular (Levin, 2005). El mutante *slt2Δ* presenta un fenotipo lítico en condiciones de temperaturas altas (37 °C) que es compensado por la sobreexpresión moderada de Ppz1. Adicionalmente, las cepas *slt2Δ* mutantes presentan sensibilidad a cafeína o blanco de calcoflúor, siendo contrarrestado estos fenotipos líticos con la adición al medio de sorbitol a concentración 1 M como estabilizador osmótico (Lee *et al*, 1993b).

Un defecto lítico similar al característico en cepas con mutaciones en la vía CWI ha sido observado en mutantes *ppz1Δ ppz2Δ*. Este defecto lítico, al igual que en las cepas mutantes *slt2Δ*, se suprime mediante la adición al medio de sorbitol a 1 M (Hughes *et al*, 1993; Posas *et al*, 1993). La relación entre la vía CWI y los efectos causados por la mutación de los genes *PPZ* puede ser explicada por la desregulación de la captación de K<sup>+</sup> en las células mutantes *ppz*. El aumento de turgencia celular causado por una mayor entrada de potasio al interior de la célula provocaría una mayor presión sobre la pared celular, que activaría la vía CWI. Esta hipótesis se ve respaldada por datos experimentales que mostraron que un doble mutante *ppz1Δ ppz2Δ* presentaba una mayor expresión del gen *SLT2* y una mayor cantidad de la proteína hiperfosforilada, lo que se ha correlacionado con una mayor actividad quinasa de Slk2 (Yenush *et al*, 2002; Merchan *et al*, 2004).

### 3.3.2. Otras funciones de Ppz1

La sobreexpresión de Ppz1 provoca el bloqueo del crecimiento celular, con una parada en la transición G<sub>1</sub>/S, un retraso en la expresión de los genes *CLN2* y *CLB5* y un incremento en la proporción de células sin gemar (Clotet *et al*, 1999). El defecto de crecimiento derivado del exceso de Ppz1 esta exacerbado en células con un bajo nivel de ciclinas de la fase G<sub>1</sub>. Así, la mutación del gen *PPZ1* rescata el fenotipo sintético letal de la mutación *sit4Δ cln3Δ*, que afecta a dos genes importantes en la transición de fase G<sub>1</sub>/S (Clotet *et al*, 1999). Además, células mutantes *ppz1Δ* presentan una expresión temprana de los genes *CLN2* y *CLB5*, causando una entrada prematura en la fase S. Por lo tanto, Ppz1 juega un papel importante en la transición G<sub>1</sub>/S.

Otro de los procesos celulares en los que está implicada Ppz1 es la traducción de proteínas. Se ha descrito la interacción *in vivo* de Ppz1 con el factor de traducción EF1B $\alpha$  (Tef5) (de Nadal *et al*, 2001), el cual es un factor de intercambio de GDP por GTP del factor de elongación 1. Asimismo, el residuo conservado Ser86 de Tef5 está hiperforilado en una cepa doble mutante *ppz1 $\Delta$  ppz2 $\Delta$* . Se ha demostrado además en este mutante una mayor tendencia de los ribosomas a ignorar los codones *stop* (*readthrough*), traduciendo regiones del mRNA que no deben ser traducidas. Estos hechos sugieren que la fidelidad de la traducción podría estar afectada en ausencia de Ppz1 (de Nadal *et al*, 2001). Posteriormente, esta idea ha sido reforzada por el trabajo de Aksenova y colaboradores que probaron que Ppz1 está implicada en la fidelidad de traducción, afectando la eficiencia de *readthrough* y la manifestación del determinante antisupresor no Mendeliano [ISP<sup>+</sup>] (Aksenova *et al*, 2007). Adicionalmente, nuestro laboratorio ha demostrado que Ppz1 está unido a ribosomas en proceso de traducción, y que puede copurificarse con diversas proteínas ribosomales y factores de traducción (Calafí *et al*, 2020b).

En los últimos años, se ha descrito que las fosfatasas Ppz están implicadas en la homeostasis de ubiquitinas, ya que un doble mutante *ppz1 $\Delta$  ppz2 $\Delta$*  presenta una caída en los niveles de ubiquitina debido, en parte, a un aumento de su fosforilación en el residuo Ser-57 (Lee *et al*, 2017). Dos años después, el mismo grupo describió que Ppz1 regula la endocitosis del transportador de metionina Mup1 (Lee *et al*, 2019). La presencia de metionina en el medio desencadena la endocitosis de Mup1 mediada por Art1, una proteína adaptadora de la ubiquitina-ligasa Rsp5. Ppz1 desfosforila Art1 promoviendo el reconocimiento y la unión de Art1 y Mup1. Aunque Ppz1 no es necesaria para la translocación de Art1, si es esencial para la interacción de estas dos proteínas.

### **3.4. Subunidades reguladoras de Ppz1: Hal3 y Vhs3**

En *S. cerevisiae* han sido descritas más de 30 subunidades reguladoras de la proteína Glc7 (Cannon, 2010; Offley & Schmidt, 2019). Sin embargo, sólo se han identificado dos para las fosfatasas Ppz: Hal3 y Vhs3, y ambas son subunidades reguladoras negativas (de Nadal *et al*, 1998; Ruiz *et al*, 2004).

La proteína Hal3 fue identificada en dos laboratorios de manera independiente en 1995: por un lado, como un supresor multicopia del defecto del crecimiento en una cepa mutante *sit4 $\Delta$* , que denominaron *SIS2* (di Como *et al*, 1995) y, por otro lado, Ferrando y colaboradores describieron que una cepa silvestre que sobreexpresaba el gen *HAL3* presentaba un fenotipo de hipertolerancia a sodio (Ferrando *et al*, 1995). El gen *HAL3* se expresa constitutivamente y codifica una proteína de 562 residuos, de localización citosólica (Ferrando *et al*, 1995). Hal3 posee tres regiones diferenciadas: i) una extensión N-terminal, de unos 250 residuos, la cual está desestructurada, ii) un dominio

denominado PD, comprendido entre los residuos 250-482 aproximadamente y iii) una cola C-terminal (CtD), de 80 residuos, caracterizada por un elevado número de residuos ácidos (especialmente de ácido aspártico) (Abrie *et al*, 2012).

Ferrando y sus colaboradores demostraron que la sobreexpresión del gen *HAL3* provoca una mayor expresión del gen *ENA1* (Ferrando *et al*, 1995). Esta mayor expresión explicaría, por lo menos en parte, el fenotipo de hipertolerancia a sodio y litio derivado de la sobreexpresión de este gen (Ferrando *et al*, 1995; de Nadal *et al*, 1998; Ruiz *et al*, 2003). Asimismo, la captación de K<sup>+</sup>, vía regulación de los transportadores Trk, se ve incrementada en una cepa silvestre que sobreexpresa el gen *HAL3* (Ferrando *et al*, 1995; Yenush *et al*, 2002). Además, la sobreexpresión del gen provoca un fenotipo lítico en células mutantes *slt2Δ*, que carecen de la MAPK de la vía de la CWI, y este fenotipo puede ser revertido con la adición de un estabilizador osmótico al medio de cultivo (de Nadal *et al*, 1998). La observación de que múltiples fenotipos causados por la sobreexpresión de *HAL3* resultaban muy similares a los observados en cepas mutantes *ppz1Δ* y, por el contrario, fenotipos derivados de la delección del gen *HAL3* eran opuestos a los causados por la delección del gen *PPZ1*, sugirieron que Hal3 podría ser un regulador negativo de Ppz1.

El papel regulador de Hal3 sobre Ppz1 fue confirmado cuando se demostró su capacidad para interactuar e inhibir Ppz1 (de Nadal *et al*, 1998), verificándose que Hal3 interactúa con el dominio catalítico de esta fosfatasa. La proteína Hal3 no presenta similitud con las subunidades reguladoras de Glc7 identificadas, y no es capaz de inhibir esta fosfatasa (de Nadal *et al*, 1998; García-Gimeno *et al*, 2003), aunque posee una secuencia parecida al motivo RVxF (<sup>263</sup>KLHVL<sup>F268</sup>), presente en la mayoría de las subunidades reguladoras de Glc7 (Bollen *et al*, 2010). Nuestro laboratorio demostró que las mutaciones H265G o F268A no afectaban a la capacidad de interacción de Hal3 con Ppz1 (Muñoz *et al*, 2004), sugiriendo que este mecanismo de interacción es diferente al de Glc7 con sus subunidades reguladoras. En el trabajo de Muñoz y colaboradores también se identificaron dos residuos de Hal3, Glu420 y Val462, cuya mutación independiente generaba versiones incapaces de inhibir a Ppz1, pero que mantenían la capacidad de interacción (Muñoz *et al*, 2004). Por lo tanto, el proceso de inhibición de Ppz1 por parte de Hal3 debe emplear elementos estructurales diferentes a los requeridos para la interacción entre ambas proteínas.

*S. cerevisiae* posee una segunda proteína estructuralmente relacionada con Hal3, denominada Vhs3 (Ruiz *et al*, 2004). El gen *VHS3* fue identificado como un supresor multicopia de la letalidad de una cepa doble mutante *sit4Δ hal3Δ* (Muñoz *et al*, 2003) y codifica una proteína de 674 residuos que presenta una identidad del 49% con Hal3. Vhs3 posee, al igual que Hal3, tres regiones diferenciadas: un extremo N-terminal desestructurado, un dominio PD y una cola ácida (CtD). Su sobreexpresión provoca fenotipos similares a los de la sobreexpresión de Hal3 (Ruiz *et al*, 2004): es capaz de rescatar del bloqueo en la transición de la fase G<sub>1</sub>/S en una cepa mutante *sit4Δ*, agrava

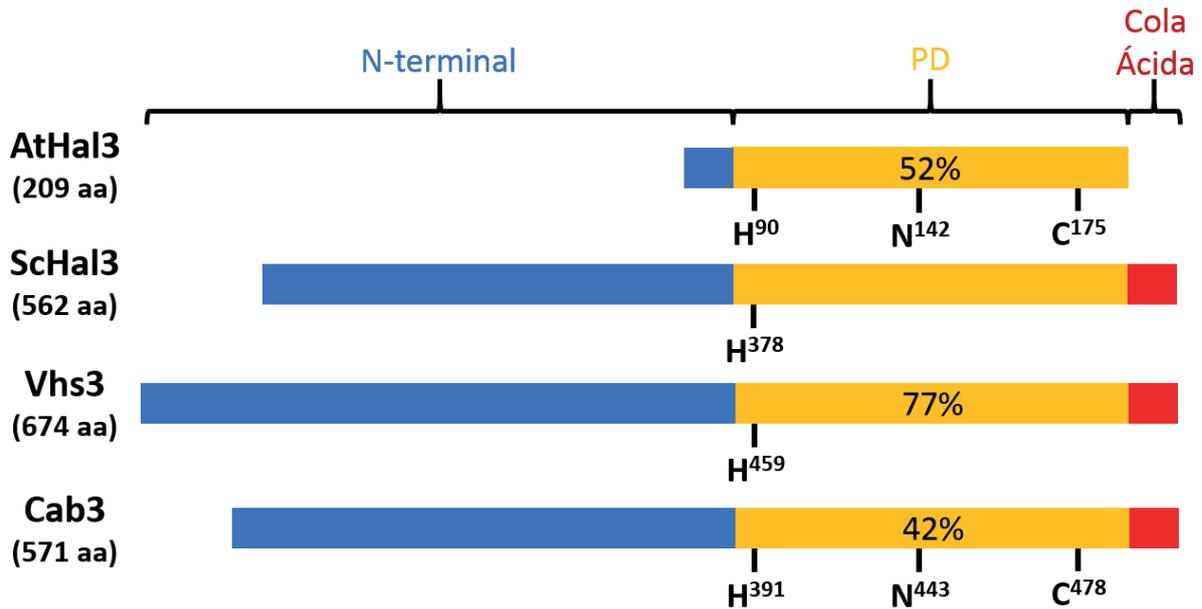
el fenotipo lítico de una cepa mutante *slt2Δ*, aumenta la tolerancia a sal en una cepa silvestre e incrementa la expresión del gen *ENA1* (aunque estos efectos son menos notorios que en la sobreexpresión de *HAL3*). Se ha demostrado *in vitro* la capacidad de Vhs3 de interactuar con Ppz1 y, más concretamente, con su dominio catalítico (Ppz1-C<sub>ter</sub>) y esta proteína es capaz de inhibir *in vitro* la actividad de Ppz1 con una eficiencia similar a Hal3. En consecuencia, Vhs3 se considera también un regulador negativo de Ppz1 (Ruiz *et al*, 2004). Sin embargo, la mutación del gen *VHS3* no disminuye la tolerancia a sal, por lo que se considera que, *in vivo*, su papel sobre Ppz1 debe ser menos relevante que el de Hal3. Esta menor relevancia puede ser explicada por unos menores niveles de mRNA y por lo tanto una inferior cantidad de proteína en comparación con Hal3 (Ruiz *et al*, 2004; Ho *et al*, 2018). Sorprendentemente, la doble mutación de los genes *HAL3* y *VHS3* resultó ser sintética letal, y este fenotipo no pudo ser rescatado incluso añadiendo la doble mutación *ppz1Δ ppz2Δ*. Estos datos, sugirieron que las proteínas Hal3 y/o Vhs3 debían tener alguna otra función vital, independiente de la regulación de Ppz1 (Ruiz *et al*, 2004).

*S. cerevisiae* posee una tercera proteína relacionada estructuralmente con Hal3 y Vhs3, denominada Cab3. El gen *CAB3* es esencial (Giaever *et al*, 2002) y codifica una proteína de 571 residuos, que presenta una identidad del 28% con Hal3. La proteína Cab3 presenta las mismas regiones diferenciadas que Hal3 y Vhs3 (N-terminal desestructurado, dominio PD y cola ácida). Sin embargo, no tiene capacidad inhibitoria sobre Ppz1 (Ruiz *et al*, 2009).

A diferencia de las fosfatasas tipo Z, que son exclusivas de hongos, proteínas con marcadas similitudes a sus inhibidores Hal3 y Vhs3 se encuentran de manera ubicua en eucariotas (tanto en hongos, como en plantas y animales) e incluso en procariotas. Esta similitud está, en general, restringida al dominio PD. La ubicuidad de estas proteínas sugirió que debían tener un papel importante en algún proceso clave para la supervivencia celular, necesariamente desligado de su papel como reguladores de las fosfatasas Ppz.

La planta *Arabidopsis thaliana* codifica dos proteínas, AtHal3a y AtHal3b, con notable similitud (52% en el caso de AtHal3a) con el dominio PD de Hal3 en *S. cerevisiae* (a partir de ahora, ScHal3) (Figura 3). Estudios realizados por Espinosa-Ruiz y colaboradores confirmaron que la sobreexpresión de AtHal3a complementaba ligeramente la sensibilidad a sal en células de *S. cerevisiae* mutantes *schal3Δ* (Espinosa-Ruiz *et al*, 1999). Este fenotipo indicó que había funciones conservadas entre AtHal3a y ScHal3. Posteriormente, la resolución de la estructura tridimensional mediante difracción de rayos-X, demostró que AtHal3 era una flavoproteína, cuya unidad funcional era un trímero (Albert *et al*, 2000). Poco después se demostró que AtHal3 podía catalizar *in vivo* la descarboxilación de la fosfopantoteonilcisteína (PPC) a fosfopanteteína (PP), una reacción de la vía de síntesis del coenzima A (CoA) (Kupke *et al*, 2001) y que, por lo tanto, AtHal3 era una fosfopantoteonilcisteína descarboxilasa

(PPCDC). Adicionalmente, estos autores identificaron tres residuos esenciales implicados en el centro activo: His-90, Asn-142 y Cys-175. Estos residuos son aportados por monómeros opuestos, por lo que este enzima tiene tres centros activos idénticos.



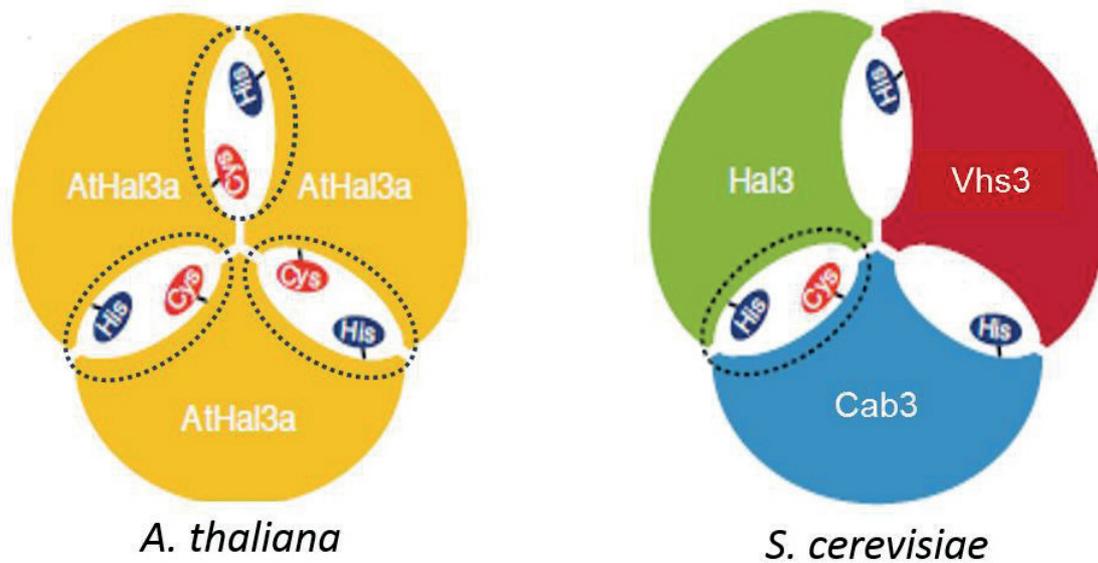
**Figura 3. Esquema de la estructura de AtHal3, ScHal3, Vhs3 y Cab3.** Se indican los porcentajes de identidad del dominio PD de las diferentes proteínas con el dominio PD de ScHal3. Los residuos identificados en el centro activo del enzima de *A. thaliana* y requeridos para llevar a cabo la descarboxilación de la fosfopantoteonilcisteína (PPC) a fosfopanteteína (PP), aparecen señalados debajo del esquema de AtHal3. Bajo cada esquema se indican los residuos conservados del centro activo de AtHal3 en las diferentes proteínas de *S. cerevisiae*.

### 3.5. Hal3 y Vhs3 como proteínas *moonlighting*

El CoA es un cofactor común en muchas reacciones enzimáticas. Se sintetiza mediante cinco pasos que se inician con la fosforilación del pantotenato, a la que le sigue la adición de una cisteína para formar la 4'-fosfopantoteonilcisteína. Es en la tercera reacción de esta ruta donde interviene el enzima PPCDC (Strauss *et al*, 2001; Ye *et al*, 2005), que cataliza la descarboxilación de la 4'-fosfopantoteonilcisteína (PPC) a 4'-fosfopanteteína (PP) (Kupke *et al*, 2001; Hernandez-Acosta *et al*, 2002; Steinbacher *et al*, 2003). Esta reacción consta de dos etapas que son, tomando como ejemplo AtHal3a: i) con la intervención del residuo de histidina 90, el PPC se oxida formando una molécula intermediaria de tioaldehído, la cual espontáneamente se descarboxila generando el intermedio 4'-fosfopantotenoil-aminoetenotiol; ii) el 4'-fosfopantotenoil-aminoetenotiol se reduce a PP y el cofactor FMN se oxida, siendo crucial el residuo de cisteína 175 en este paso (Hernandez-Acosta *et al*, 2002).

La mayoría de los enzimas PPCDC caracterizados en bacteria y organismos eucariotas, como en humanos o plantas, están codificados por un solo gen (Kupke, 2001; Hernandez-Acosta *et al*, 2002; Daugherty *et al*, 2002; Steinbacher *et al*, 2003). Como hemos comentado, el enzima PPCDC se forma por la trimerización de tres subunidades idénticas, de manera que se crean tres centros activos, cada uno de ellos formado por la interfaz de dos monómeros. Uno de los monómeros aporta la His, mientras el otro provee la Cys requerida para la reacción, así como la Asn conservada (Asn142 en AtHal3a), necesaria para la interacción con la cisteína del sustrato.

Aunque el grado de identidad entre el dominio PD de las tres proteínas de *S. cerevisiae* con AtHal3 es bastante parecido, la presencia de los tres residuos catalíticos solo se da en Cab3, lo que sugirió que esta última proteína podría ser una buena candidata para cumplir la función PPCDC, no caracterizada aún en esta levadura. No obstante, nuestro laboratorio demostró que Cab3, por sí sola, no forma un enzima PPCDC, y que, en *S. cerevisiae*, el enzima PPCDC está constituida por un heterotrímero, compuesto siempre por una subunidad Cab3 combinada con dos subunidades ScHal3, dos Vhs3 o una de cada (Ruiz *et al*, 2009). En el heterotrímero, Cab3 aporta el residuo de cisteína (Cys-478) y el de asparagina (Asn-443), mientras que el residuo de histidina necesario para la catálisis proviene de ScHal3 o Vhs3 (His-378 o His-459 respectivamente). Aunque, aparentemente Cab3 presenta el residuo de histidina (His-391), este residuo no es funcional (Ruiz *et al*, 2009), lo que impide la formación de un homotrímero Cab3 catalíticamente activo. Esta anómala estructura, donde el enzima solo posee un único centro activo funcional (Figura 4), explica la naturaleza esencial del gen *CAB3* y el fenotipo sintético letal del doble mutante *hal3Δ vhs3Δ*. En conclusión, ScHal3 y Vhs3 realizan dos funciones no relacionadas; i) regular la actividad de la fosfatasa Ppz1 y ii) junto con Cab3, formar el enzima PPCDC, por lo que ScHal3 y Vhs3 se pueden definir como proteínas *moonlighting*.



**Figura 4. Esquema de los enzimas PPCDC de *A. thaliana* y *S. cerevisiae*.** Panel izquierdo: Esquema del enzima homotrimérico de *A. thaliana* (AtHal3a), donde se muestran los residuos conservados implicados en los tres centros activos (His-90 y Cys-175). Panel derecho: Modelo propuesto del enzima heterotrimérico de *S. cerevisiae* compuesto por las tres subunidades Cab3, ScHal3 y Vhs3, en el que se muestran los residuos conservados de histidina (His-378 en ScHal3, His-459 en Vhs3 e His-391 en Cab3) y de cisteína (Cys-478) de Cab3. Encuadrados con líneas punteadas los tres centros activos del enzima PPCDC de *A. thaliana* y el único centro activo del enzima PPCDC de *S. cerevisiae*. Imagen tomada de (Ruiz et al, 2009).

Una proteína *moonlighting* es aquella que tiene diversos roles no relacionados que: i) no son producto de la fusión de genes, ii) no son debidos a variantes de *splicing* del mRNA o iii) a múltiples fragmentos proteolíticos (Jeffery, 2003, 2009; Tompa *et al*, 2005). Se han descrito proteínas *moonlighting* en múltiples especies, desde procariotas a animales (Huberts & van der Klei, 2010). En levadura se han identificado varias proteínas *moonlighting* (Gancedo & Flores, 2008; Huberts & van der Klei, 2010; Gancedo *et al*, 2016). Se cree que la presencia de estas proteínas es ventajosa para las células o los organismos, permitiendo la expansión de funciones sin ampliar el genoma (Jeffery, 1999, 2009).

Cabe resaltar que, en la mayoría de los organismos, incluyendo algunas levaduras y hongos, las PPCDCs (<300 residuos) presentan un *core* similar al dominio PD en ScHal3 de *S. cerevisiae*, pero carecen de la extensión N-terminal y la cola ácida C-terminal. Hace 10 años se publicó un mapeo funcional preliminar en el que se caracterizaron las tres regiones diferenciadas de ScHal3, tanto en su función como regulador negativo de Ppz1 como en su papel en la formación de la PPCDC (Abrie *et al*, 2012). El dominio conservado PD es, lógicamente, necesario para la actividad PPCDC. Por el contrario, ni la extensión N-terminal ni la cola ácida son necesarias para esta función, aunque, la estabilidad de las interacciones entre ScHal3 y Cab3 parece favorecida por la presencia de la región N-terminal de ScHal3. En cuanto a la capacidad reguladora negativa sobre Ppz1, este estudio mostró que el dominio PD de ScHal3 es necesario para la interacción con la

fosfatasa, pero no es suficiente para inhibirla. La extensión N-terminal, por sí sola, no es capaz de interactuar con Ppz1, pero contribuye a la regulación de la fosfatasa, mientras que la cola ácida (CtD) es necesaria para la inhibición (Muñoz *et al*, 2004) (Figura 5).



**Figura 5. Esquema de la funcionalidad de las regiones de ScHal3.** La parte superior de la figura indica la funcionalidad de las regiones respecto a la regulación de Ppz1. La parte inferior hace referencia a la funcionalidad respecto a la formación de la actividad PPCDC. Figura modificada de (Abrie *et al*, 2012).

### 3.6. Enzimas PPCDC y el sistema Ppz1-Hal3 en hongos

Diversas investigaciones han mostrado que, en animales y plantas, las proteínas PPCDC son estructuralmente similares a las de *A. thaliana*. Sin embargo, el estudio de diversos genomas de hongos en busca de genes que pudieran codificar las proteínas encargadas de formar los enzimas PPCDC ha ofrecido una interesante variedad de posibilidades. Se presentan tres escenarios posibles (Ruiz *et al*, 2009). En el primero, que correspondería al conjunto de organismos que sufrieron una duplicación genómica ancestral se encuentran, al igual que en *S. cerevisiae*, tres posibles genes que codificarían homólogos de Cab3, ScHal3 y Vhs3. En la segunda situación se identifican solo dos proteínas: una similar a Cab3, que conserva los residuos de cisteína y de asparagina; y otra similar a ScHal3/Vhs3, que mantiene el residuo de histidina. Un ejemplo de este segundo grupo sería *Candida albicans*, cuyos genes CaCab3 y CaHal3 han sido identificados y caracterizados (Petrényi *et al*, 2016), mostrando que estas dos proteínas conservan los residuos clave del centro catalítico (una His en CaHal3 y la Cys y Asn en CaCab3) y forman un enzima PPCDC funcional. Por último, organismos que presentan un único posible gen que codifique una proteína con actividad PPCDC. Este es el caso, por ejemplo, de *Schizosaccharomyces pombe*, en el que nuestro laboratorio demostró que la proteína SpHal3, que contiene todos los determinantes para poseer actividad PPCDC, es capaz de formar un enzima PPCDC funcional (Molero *et al*, 2013). Este caso es particularmente notable ya que el gen *SpHAL3* codifica una proteína en la

que la región PPCDC se localiza en su mitad amino terminal, correspondiendo su mitad C-terminal al enzima timidilato sintasa.

Mientras que todas las flavoproteínas fúngicas estructuralmente relacionadas con ScHal3 conservan una alta identidad en el dominio PD, no todas ellas mantienen las extensiones N- y C-terminales y, en caso de existir, pueden diferir en gran medida en secuencia y extensión, denotando posiblemente que no son regiones esenciales para la síntesis del CoA (Abrie *et al*, 2012). Es razonable especular que estas extensiones podrían estar relacionadas con la capacidad para inhibir a las fosfatasas Ppz. De hecho, nuestro grupo demostró que la proteína de *S. pombe* (SpHal3), que no posee la extensión N-terminal y exhibe una mínima región ácida, no es capaz de inhibir ni ScPpz1 ni a la propia fosfatasa tipo Z de *S. pombe*. Una situación similar se observó para el enzima de *C. neoformans* (CnHal3), que presenta una extensión N-terminal muy corta y una cola C-terminal que no es rica en residuos ácidos (Molero *et al*, 2013; Zhang *et al*, 2019a). La incapacidad de inhibir tanto su propia fosfatasa de tipo Z como la de *S. cerevisiae* también se ha observado en la flavoproteína de *U. maydis* (UmHal3), la cual presenta una extensión N-terminal muy extensa, pero con una similitud residual a la región N-terminal de ScHal3, y carece de cola ácida (Zhang *et al*, 2019b). Hay que remarcar que la incapacidad de las proteínas homologas a ScHal3 descritas anteriormente para regular sus correspondientes fosfatasas tipo Z o a las ScPpz, no puede atribuirse a diferencias estructurales entre las fosfatasas, dado que se ha demostrado que ScHal3 es capaz de inhibir potentemente a todas ellas (Molero *et al*, 2013; Petrényi *et al*, 2016; Zhang *et al*, 2019a, 2019b).

Un caso curioso es el del hongo *C. albicans*. Como hemos comentado, su genoma codifica dos proteínas similares a ScHal3: CaCab3 y CaHal3. Estas dos proteínas presentan las tres regiones características de ScHal3: N-terminal desestructurado, dominio PD y cola ácida. Desde el punto de vista de la función PPCDC, CaCab3 es el homólogo de ScCab3 y CaHal3 lo es de ScHal3. Se demostró, además, que CaCab3 y CaHal3 son capaces de unirse y de inhibir, *in vitro*, a su fosfatasa tipo Z (CaPpz1). Pero a diferencia de las proteínas de *S. cerevisiae*, cuando estas flavoproteínas se sobreexpresaron en *S. cerevisiae*, solamente CaCab3 era capaz de mimetizar (parcialmente) los fenotipos derivados de la sobreexpresión de ScHal3 tanto en una cepa silvestre como en un mutante *hal3Δ* (Petrényi *et al*, 2016). Estos resultados permitieron proponer que, en *C. albicans*, la capacidad de actuar como proteína *moonlighting* corresponde a CaCab3 y no a CaHal3.

### **3.6.1. El papel de las regiones N- y C-terminales de Hal3 en la regulación de Ppz1**

Los datos acumulados apuntan a que las regiones N-terminal y C-terminal de ScHal3 son necesarias para la regulación de Ppz1. El papel funcional de la característica cola ácida de ScHal3 fue reconocido desde los primeros estudios (di Como *et al*, 1995; Ferrando *et al*, 1995), y confirmado más tarde en cuanto necesario para una correcta función reguladora de Ppz1 (Abrie *et al*, 2012). Este papel fue reforzado por estudios más recientes en nuestro laboratorio (Zhang *et al*, 2019a) al demostrar que una versión híbrida de CnHal3, donde se sustituyó su cola C-terminal (sin carácter ácido) por la cola ácida de ScHal3, era capaz de recuperar parcialmente el fenotipo hipertolerante a Li<sup>+</sup>, indicativo de que la molécula híbrida podía inhibir ScPpz1.

Tanto la región N-terminal de ScHal3 como la cola ácida C-terminal son unas regiones que se predicen desestructuradas. Como se explicó en el apartado 3.2.2.2. las IDRs presentan una gran flexibilidad. Esta característica les permite adoptar diversas conformaciones y, potencialmente, interactuar con un amplio abanico de proteínas, jugando así un papel central en la señalización celular (Iakoucheva *et al*, 2002; Liu *et al*, 2006; Galea *et al*, 2008). La extensión N-terminal de ScHal3, aunque incapaz de interactuar por sí sola con la fosfatasa, es necesaria para la inhibición de Ppz1 (Abrie *et al*, 2012). Es destacable que el estado de fosforilación de las IDRs juega un importante papel en la modulación de la conformación de la estructura e interacciones de las mismas (Wright & Dyson, 2015). En este sentido, casi la cuarta parte de los residuos de esta región son potencialmente fosforilables (Ser, Thr y Tyr) y algunos de ellos se han descrito como fosforilados *in vivo* en diversos estudios (Albuquerque *et al*, 2008; Holt *et al*, 2009; Swaney *et al*, 2013; Guerreiro *et al*, 2017; Lanz *et al*, 2021). Podría especularse, por tanto, que diversas vías de señalización podrían modificar los patrones de fosforilación de esta región, modulando quizás la interacción Ppz1-ScHal3, y confiriendo así a la región N-terminal de Hal3 un papel en la regulación de la fosfatasa. Esta hipótesis justificaría por qué proteínas similares a ScHal3 sin extensión N-terminal (o muy divergente) no son capaces de inhibir las fosfatasas tipo Z (véase apartado 3.6).

### **3.7. La toxicidad derivada de la sobreexpresión de Ppz1**

La sobreexpresión de Ppz1, al igual que la de Glc7, es deletérea para la célula (Liu *et al*, 1992; Black *et al*, 1995; Clotet *et al*, 1996; de Nadal *et al*, 1998), razón por la cual su actividad debe estar finamente regulada. La expresión del gen *PPZ1* bajo su propio promotor a partir de un vector episomal provoca un fenotipo de crecimiento lento. Cuando esta sobreexpresión se realiza bajo el control de un promotor fuerte como *GAL1-10*, el efecto deletéreo se exagera, ocasionando una parada total del crecimiento. La sobreexpresión del dominio catalítico (Ppz1-C<sub>ter</sub>) acarrea un fenotipo similar. Sin

embargo, cuando se sobreexpresa la región N-terminal no se observa ningún efecto negativo (Clotet *et al*, 1996). La parada de crecimiento originada por la sobreexpresión de Ppz1 es contrarrestada por la sobreexpresión de ScHal3 (de Nadal *et al*, 1998). En un estudio realizado por Makanae y colaboradores, donde se analizó el máximo número de copias de un gen bajo su propio promotor que toleraba la célula, se identificó *PPZ1* como uno de los genes con menor índice de tolerancia (Makanae *et al*, 2013).

Al menos dos eran las hipótesis que podrían explicar la toxicidad causada por la sobreexpresión de Ppz1. La primera hacía referencia a que el exceso de actividad Ppz1 podría desregular una o más vías de señalización imprescindibles para el correcto funcionamiento de la célula. Otra posible hipótesis era que la acumulación de Ppz1 secuestrara a sus subunidades reguladoras ScHal3 y Vhs3 originando, por tanto, un defecto en la vía de la síntesis de CoA. Diversas son las evidencias que apoyan la primera de las hipótesis. Por un lado, nuestro laboratorio demostró recientemente que la sobreexpresión de una versión mutada de Ppz1 (R451L), que resultaba catalíticamente inactiva, no ocasionó defectos en el crecimiento (Calafí *et al*, 2020b), sugiriendo que la toxicidad de Ppz1 es debida a su actividad fosfatasa. Hay que remarcar que la mutación (R451L) no afecta a la capacidad de interacción de ScHal3 con Ppz1 (de Nadal *et al*, 1998). Además, el defecto de crecimiento causado por la sobreexpresión de Ppz1 no se atenuaba por la sobreexpresión de la PPCDC humana (Calafí *et al*, 2020b), la cual forma un enzima PPCDC funcional cuando se expresa en *S. cerevisiae* (Ruiz *et al*, 2009). Todos estos resultados implican a la actividad fosfatasa de Ppz1 y no a que el exceso de la proteína secuestre a sus subunidades reguladoras, imposibilitando así la síntesis de CoA.

La sobreexpresión de Ppz1 provoca una profunda alteración en muchos mecanismos celulares, incluyendo la desregulación de la homeostasis de potasio y de pH, estrés oxidativo, interrupción de la síntesis de proteínas o falta de adaptación a la fuente de carbono (Calafí *et al*, 2020b; Velázquez *et al*, 2020; Albacar *et al*, 2021). Estas alteraciones derivan, o se ven reflejadas, en cambios en el fosfoproteoma, que afectan a componentes clave de la señalización celular como las quinasas Hog1 y Snf1, provocando, posiblemente, una amplificación de los efectos tóxicos de la sobreexpresión de Ppz1. Por consiguiente, la toxicidad de la sobreexpresión de Ppz1 no parece ser debida a la desregulación de una vía concreta si no que, presumiblemente, sea multifactorial, afectando a múltiples procesos celulares (Casamayor & Ariño, 2022).

Sean cuales sean las causas de la toxicidad de Ppz1 en sobreexpresión, es evidente que esta es neutralizada por la sobreexpresión de Hal3 (de Nadal *et al*, 1998; Calafí *et al*, 2020b; Albacar *et al*, 2022). Evidencias recientes parecen indicar que, en estas circunstancias, el papel de Hal3 no se limita a su función como inhibidor de Ppz1. Así, Albacar y colaboradores han mostrado que la capacidad de ScHal3 de eliminar la toxicidad de la sobreexpresión de Ppz1 requiere la relocalización subcelular de Ppz1 en membranas internas, principalmente vacuolares, donde se encuentra acompañada por Hal3 (Albacar *et al*, 2022). Debido a que la mayoría de los sustratos conocidos de Ppz1,

como Trk1/Trk2 y Nha1, están localizados en la membrana plasmática, se podría suponer que la mera eliminación de Ppz1 de la membrana plasmática debería ser suficiente para contrarrestar la toxicidad derivada de su sobreexpresión. Sin embargo, la expresión de la versión de Ppz1 que presenta el cambio de la Gly-2 (requerida para la miristoilación de Ppz1) por Ala, cuya localización es totalmente citosólica, sigue siendo, aunque en menor medida, tóxica para la célula (Calafí *et al*, 2020a). Este hecho sugiere que debe haber sustratos citosólicos implicados en la toxicidad de Ppz1. No se puede descartar que entre los potenciales sustratos citosólicos podrían encontrarse quinasas cuyo estado de fosforilación, y seguramente su estado de activación, está alterado tras la sobreexpresión de Ppz1 (Velázquez *et al*, 2020). Por lo tanto, el secuestro de Ppz1 en membranas internas permitiría también evitar la exposición de sustratos citosólicos al exceso de actividad fosfatasa. Por otro lado, como hemos comentado anteriormente, la sobreexpresión de una versión catalíticamente inactiva de Ppz1 (R451L), que no provoca alteraciones significativas sobre el crecimiento de las levaduras (Calafí *et al*, 2020b), no se internaliza cuando se sobreexpresa con ScHal3 (Albacar *et al*, 2022). Todos estos datos, junto con que no se ha descrito la presencia de Ppz1 en membranas vacuolares en condiciones de crecimiento estándar (Wiederhold *et al*, 2010), sugieren que el mecanismo de internalización de Ppz1 no es una estrategia encaminada a la regulación de Ppz1 en condiciones normales, sino un sistema de emergencia que se dispara ante la presencia de un exceso anormal de actividad Ppz1 y que persigue neutralizar este peligroso exceso (Albacar *et al*, 2022).

## 4. Materiales y Métodos



#### 4.1. Cepas de levadura y medios de cultivo

Las células de *S. cerevisiae* fueron cultivadas con agitación constante (230 rpm) a 28 °C en YPD (1% extracto de levadura, 2% de peptona y 2% de glucosa) o, cuando fue necesario para la selección de plásmido, en medio sintético (SC) compuesto por: 0,17% base nitrogenada de levadura (YNB) sin sulfato amónico ni aminoácidos, 0,5% sulfato amónico, 2% glucosa y 0,13% mezcla *drop-out* sin uracilo (URA<sup>-</sup>) (Adams *et al*, 1998). En determinados casos, especificados en el texto, se utilizó otra fuente de carbono, sustituyendo la glucosa por rafinosa (Raf) y/o galactosa (Gal). En el caso de las cepas que presentaban fenotipo lítico se añadió a los medios sorbitol, a una concentración final de 1 M, como estabilizador osmótico. En caso de utilizar medios sólidos se añadió un 2% de agar a los medios descritos. Las cepas utilizadas en este trabajo se especifican en la Tabla A1 de Anexos.

#### 4.2. Técnicas de DNA Recombinante

Las células de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Taylor *et al*, 1993) se utilizaron como huésped de DNA plasmídico. Se cultivaron a 37 °C en *Lysogeny Broth* (medio LB) cuya composición es: 1% Triptona, 0,5% extracto de levadura y 0,5% NaCl, suplementado con 50  $\mu$ g/ml de ampicilina cuando era requerido para el mantenimiento del plásmido. Las técnicas de DNA recombinante se realizaron como se describe en (Green & Sambrook, 2012), utilizando enzimas de restricción *Fast Digest* (Thermo Fisher), y *Fast T4 DNA ligasa* (Thermo Fisher). La polimerasa *Q5 High-fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs) se utilizó para generar todas las mutaciones descritas en este trabajo. Las purificaciones de DNA, tanto productos de PCR como fragmentos digeridos por enzimas de restricción, se realizaron mediante electroforesis en geles de agarosa. Las bandas que contenían el DNA de interés fueron escindidas y su DNA purificado utilizando el *kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel).

Las células de *E. coli* se transformaron utilizando el método estándar descrito en (Green & Sambrook, 2012), basado en el método del cloruro de calcio. Para la transformación de las células de *S. cerevisiae* se utilizó el método del acetato de litio (Ito *et al*, 1983).

### 4.3. Plásmidos

A continuación, se describen las construcciones existentes al inicio de este trabajo.

#### 4.3.1. Plásmidos preexistentes para expresión en *S. cerevisiae*

Tabla 1. Plásmidos para expresión en *S. cerevisiae*.

Nombre	Descripción	Referencia
pRS316	Plásmido centromérico, contiene el gen <i>URA3</i> para su selección	(Sikorski & Hieter, 1989)
pRS316-Ppz1	pRS316 que contiene el gen <i>PPZ1</i> , recuperado del vector YCp33- <i>PPZ1</i> y clonado en las dianas BamHI/HindII de pRS316	(Aksenova <i>et al</i> , 2007)
pWS93	Plásmido multicopia para la expresión, en <i>S. cerevisiae</i> , bajo el control del promotor <i>ADH1</i> de proteínas fusionadas con 3xHA (hemaglutinina) en su N-terminal. Contiene el gen <i>URA3</i> para su selección	(Song & Carlson, 1998)
pWS93-AtHal3:	pWS93 en el que se ha clonado, en las dianas EcoRI/Sall, la zona codificante del gen <i>AtHAL3a</i>	(Ruiz <i>et al</i> , 2009)
pWS93-CaHal3	pWS93 que contiene la zona codificante del gen <i>CaHAL3</i> , clonada en las dianas EcoRI/Sall	(Petrényi <i>et al</i> , 2016)
pWS93-CaCab3	pWS93 que tiene clonada en las dianas EcoRI/Sall la zona codificante del gen <i>CaCAB3</i>	(Petrényi <i>et al</i> , 2016)
pWS93-ScCab3	pWS93 que posee la zona codificante el gen <i>ScCAB3</i> , clonada en las dianas EcoRI/Sall	(Ruiz <i>et al</i> , 2009)
pWS93-ScHal3	pWS93 que presenta la zona codificante del gen <i>ScHAL3</i> clonada en las dianas EcoRI/Sall	(Ruiz <i>et al</i> , 2009)
pWS93-ScHal3-PD	pWS93 al que se ha insertado la región codificante del dominio PD del gen <i>ScHAL3</i> en las dianas EcoRI/Sall	(Ruiz <i>et al</i> , 2009)
pWS93-ScHal3-PD-Cter	pWS93 que contiene la zona codificante del dominio PD y la cola C-terminal del gen <i>ScHAL3</i> , clonada en las dianas EcoRI/Sall	(Ruiz <i>et al</i> , 2009)

#### 4.3.2. Plásmidos preexistentes para expresión en *E. coli*

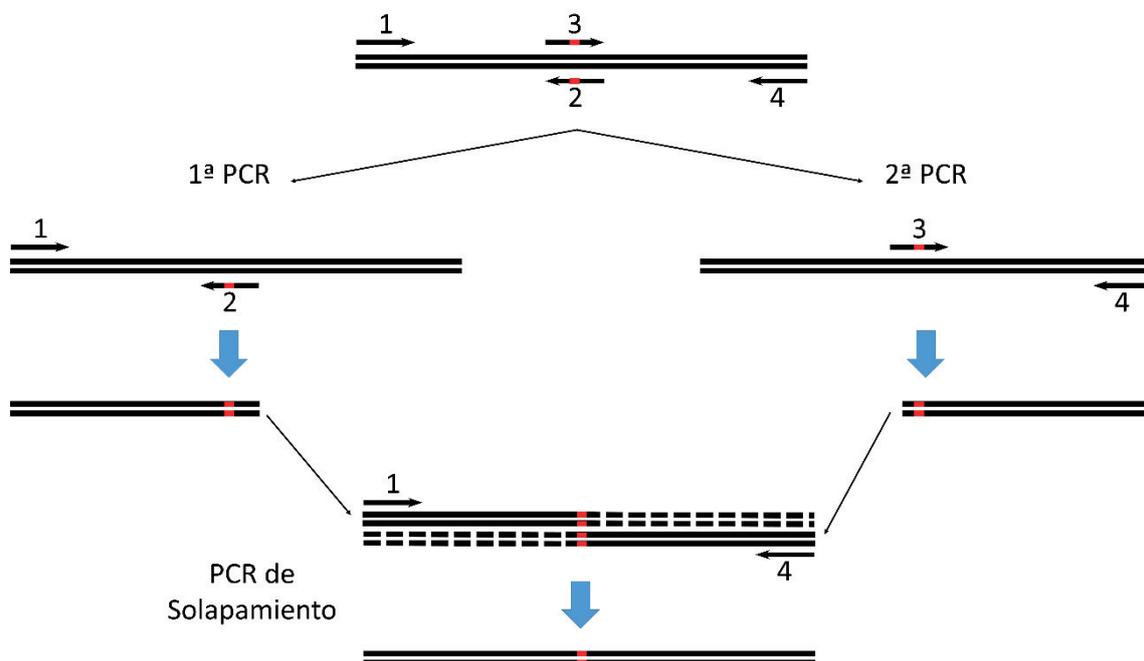
Tabla 2. Plásmidos para expresión en *E. coli*.

Nombre	Descripción	Referencia
<b>pGEX-6P-1</b>	Plásmido para expresión de proteínas fusionadas a glutatión transferasa (GST) en su extremo N-terminal, con un sitio de corte para la proteasa <i>PreScission</i>	GE Healthcare
<b>pGEX-6P-1-AtHal3</b>	pGEX-6P-1 en el que se ha insertado la zona codificante del gen <i>AtHAL3a</i> amplificado del vector pRS699-AtHal3a (Espinosa-Ruiz <i>et al</i> , 1999) con los oligonucleótidos AtHal3_EcoRI_5 y AtHal3_Sall_3 y clonada en las dianas EcoRI/Sall	(Santolaria <i>et al</i> , 2018)
<b>pGEX-6P-1-CaCab3</b>	pGEX-6P-1 que presenta clonada en las dianas EcoRI/XhoI la zona codificante del gen <i>CaCAB3</i>	(Petrényi <i>et al</i> , 2016)
<b>pGEX-6P-1-CaHal3</b>	pGEX-6P-1 en el que posee la zona codificante del gen <i>CaHAL3</i> , clonada en las dianas EcoRI/XhoI	(Petrényi <i>et al</i> , 2016)
<b>pGEX-6P-1-ScCab3</b>	pGEX-6P-1 en el que se ha insertado la zona codificante del gen <i>ScCAB3</i> en las dianas EcoRI/XhoI	(Ruiz <i>et al</i> , 2009)
<b>pGEX-6P-1-ScHal3</b>	pGEX-6P-1 en el que se ha clonado en las dianas EcoRI/XhoI la zona codificante del gen <i>ScHAL3</i>	(Muñoz <i>et al</i> , 2004)
<b>pGEX-6P-1-Ppz1</b>	pGEX-6P-1 en el que se ha insertado la zona codificante del gen <i>PPZ1</i>	(Muñoz <i>et al</i> , 2004)
<b>pGEX-6P-1-Ppz1-Cter</b>	pGEX-6P-1 que codifica el dominio catalítico de Ppz1 ( $\Delta 1-344$ )	(Muñoz <i>et al</i> , 2004)

**4.3.3. Mutaciones puntuales del dominio catalítico de Ppz1**

Las versiones con mutaciones puntuales en el dominio catalítico de Ppz1 se realizaron utilizando una PCR de dos pasos por solapamiento (Figura 6), utilizando como molde el plásmido pRS316-Ppz1, para las mutaciones simples, y el plásmido pRS316-Ppz1-D566K para obtener el doble mutante (los detalles de los oligonucleótidos se encuentran en la Tabla A2 de Anexos y los detalles de la estrategia de las PCR de solapamiento en la tabla A3 de Anexos). Para ello se clonaron los fragmentos resultantes (605 nt), digeridos con los enzimas Pacl y HindIII, en las mismas dianas del plásmido pRS316-Ppz1, obteniendo los plásmidos pRS316-Ppz1-D566K, pRS316-Ppz1-D615K y pRS316-Ppz1-D566K-D615K. Estos plásmidos fueron utilizados para la expresión en levadura. Para la expresión en *E. coli* se extrajeron los fragmentos comprendidos entre las dianas Kpn2I y Bsp1407I (1097 nt) de los plásmidos pRS316 que contenían las versiones mutadas y se clonaron en las mismas dianas de pGEX-6P-1-Ppz1, obteniendo los plásmidos pGEX-6P-1-Ppz1-D566K, pGEX-6P-1-Ppz1-D615K y pGEX-6P-1-Ppz1-D566K-D615K.

Todos los oligonucleótidos utilizados en este trabajo están descritos en la Tabla A2 de Anexos.



**Figura 6. Estrategia de PCR de Solapamiento.** Esquema de la estrategia utilizada para la obtención de diversos mutantes por PCR de dos pasos por solapamiento.

#### 4.3.4. Mutaciones en el dominio PD de Hal3

En la construcción de los vectores pGEX-6P-1-AtHal3-L117E, pGEX-6P-1-AtHal3-G115N-L117E y pGEX-6P-1-ScHal3-L405E, se utilizó el método *Quick-Change* (Liu & Naismith, 2008), partiendo de 1 ng de DNA plasmídico, 0,2 mM dATP, 0,2 mM dTTP, 0,2 mM dCTP, 0,2 mM dGTP (Sigma Life Science), 0,5  $\mu$ M de cada oligonucleótido y un tiempo de extensión de 50 s/kb en un volumen final de 50  $\mu$ l. Para la construcción del plásmido pGEX-6P-1-AtHal3-L117E el molde utilizado fue el plásmido pGEX-AtHal3 y los oligonucleótidos AtHal3\_L117E\_5/ AtHal3\_L117E\_3, en la construcción del plásmido pGEX-6P-1-AtHal3-G115N-L117E se utilizó como molde el plásmido pGEX-6P-1-AtHal3-L117E y los oligonucleótidos AtHal3\_G115N\_L117E\_5/ AtHal3\_G115N\_L117E\_3 y para la construcción del plásmido pGEX-6P-1-ScHal3-L405E, se utilizó como molde el plásmido pGEX-6P-1-ScHal3 y los oligonucleótidos ScHal3\_L405E\_5/ ScHal3\_L405E\_3 (las secuencias de los oligonucleótidos se presentan en la Tabla A2 de Anexos). El producto de la reacción se purificó con el *kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel), y se eluyó en un volumen de 30  $\mu$ l en el tampón AE (5 mM Tris-HCl, pH 8,5) del mismo kit, tras lo cual se digirió el DNA utilizado como molde de la PCR con DpnI (*FastDigest*, Thermo Scientific), un enzima que reconoce la secuencia 5'-GATC-3' metilada, para finalmente transformar células de *E. coli* utilizando 10  $\mu$ l del producto de la digestión.

La elaboración de las versiones mutadas ScHal3-L403N y ScHal3-L403N-L405E, se realizó mediante una PCR de dos pasos por solapamiento (Figura 6). Los detalles de los moldes, oligonucleótidos y sitios de clonación están descritos en las Tablas A2 y A4 de Anexos. Los fragmentos obtenidos en la segunda PCR fueron clonados en las dianas de restricción EcoRI/XhoI del plásmido pGEX-6P-1, obteniéndose los plásmidos pGEX-6P-1-ScHal3-L403N y pGEX-6P-1-ScHal3-L403N-L405E. Estos constructos fueron utilizados para la expresión en *E. coli*.

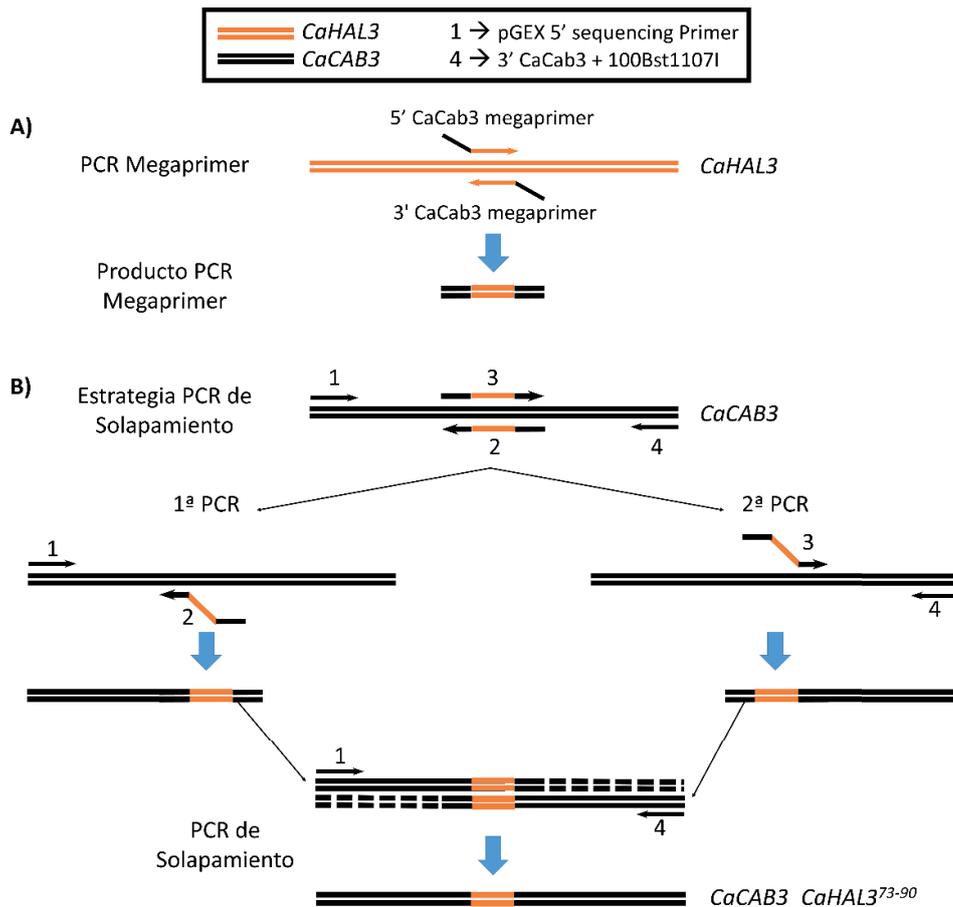
La construcción de los plásmidos pWS93 para expresión en levadura que contienen las versiones mutadas del gen *AtHAL3* o *ScHAL3* se realizó digiriendo con los enzimas EcoRI y XhoI los vectores pGEX-6P-1-AtHal3-L117E, pGEX-6P-1-AtHal3-G115N-L117E, pGEX-6P-1-ScHal3-L403N, pGEX-6P-1-ScHal3-L405E y pGEX-6P-1-ScHal3-L403N-L405E. Posteriormente se clonó estos insertos en el plásmido pWS93 en las dianas EcoRI y Sall, obteniendo los plásmidos pWS93-AtHal3-L117E, pWS93-6P-1-AtHal3-G115N-L117E, pWS93-ScHal3-L403N, pWS93-ScHal3-L405E y pWS93-ScHal3-L403N-L405E.

### 4.3.5. Mutaciones en el dominio N-terminal de Hal3

Los diversos tipos de mutaciones en el dominio N-terminal de ScHal3 se generaron por una PCR de dos pasos por solapamiento (Figura 6). Los detalles de los moldes y oligonucleótidos empleados se encuentran en las Tablas A2 y A4 de Anexos. Los fragmentos obtenidos en la PCR de solapamiento fueron clonados en las pertinentes dianas de restricción de los plásmidos pGEX-6P-1 o pGEX-6P-1-ScHal3 descritos en la Tabla A3. Estos constructos fueron utilizados directamente para la expresión heteróloga de proteínas en *E. coli* y como fuente para la construcción de los plásmidos para expresión en levadura. En este caso, se extrajeron los insertos de los diversos constructos en pGEX-6P-1 mediante los enzimas de restricción EcoRI y XhoI, y se clonaron en las dianas EcoRI y Sall del plásmido multicopia pWS93.

### 4.3.6. Construcción de híbridos CaCab3 y CaHal3 de *Candida albicans*

Las proteínas híbridas de *C. albicans*, se generaron a partir de los genes *CaCAB3* y *CaHAL3* clonados en el plásmido pGEX-6P-1 (Petrényi *et al*, 2016). En la construcción del gen híbrido CaCab3\_CaHal3<sup>73-90</sup> de *C. albicans* se utilizó como molde el vector pGEX-6P-1-CaHal3 para amplificar fragmentos solapantes mediante el uso de los oligonucleótidos 5' CaCab3 megaprimer y 3' CaCab3 megaprimer, obteniendo como resultado el producto de PCR Megaprimer (Figura 7A). Posteriormente se utilizó como molde el plásmido pGEX-6P-1-CaCab3, y se realizó una PCR de dos pasos por solapamiento. La región 5' se amplificó a partir del producto de PCR Megaprimer y el oligonucleótido pGEX 5' sequencing Primer, mientras que la región 3' se generó utilizando el producto de PCR Megaprimer y el oligonucleótido 3' CaCab3 + 100Bst1107I. El material amplificado en estas dos PCR se mezcló y se reamplificó con los oligonucleótidos pGEX 5' sequencing Primer y 3' CaCab3 + 100Bst1107I. El producto de amplificación (1722 nt) se digirió con los enzimas EcoRI y Bst1107I y se clonó en el plásmido pGEX-6P-1-CaCab3 en las mismas dianas, dando como resultado el plásmido pGEX-6P-1-CaCab3-CaHal3<sup>73-90</sup> (Figura 7B).



**Figura 7. Estrategia de construcción del gen híbrido *CaCab3\_CaHal3<sup>73-90</sup>* de *C. albicans*.** A) Obtención del producto de PCR Megaprimer que se usó como oligonucleótidos en la PCR de solapamiento. B) Esquema de la PCR por solapamiento utilizada para la obtención del gen híbrido *CaCab3\_CaHal3<sup>73-90</sup>* de *C. albicans*.

La versión *CaHal3-CaCab3<sup>89-134</sup>* fue obtenida por el mismo proceso. Para la obtención del producto de PCR Megaprimer se utilizó como molde el plásmido pGEX-6P-1-*CaCab3* y los oligonucleótidos 5' *CaHal3* megaprimer y 3' *CaHal3* megaprimer. Luego se utilizó como molde el plásmido pGEX-6P-1-*CaHal3* y como cebadores el producto de PCR Megaprimer junto con los oligonucleótidos pGEX 5' sequencing Primer (para la región 5') o 3' *CaHal3* + 80Bsu15I (para la región 3'). Posteriormente se realizó una PCR de solapamiento utilizando estos fragmentos como molde y los oligonucleótidos pGEX 5' sequencing Primer y 3' *CaHal3* + 80Bsu15I. El fragmento obtenido (1325 nt) se digirió con los enzimas de restricción EcoRI y Bsu15I y se clonó en el plásmido pGEX-6P-1-*CaHal3* en las mismas dianas, obteniéndose el plásmido pGEX-6P-1-*CaHal3-CaCab3<sup>89-134</sup>*.

Los vectores pWS93-*CaCab3-CaHal3<sup>73-90</sup>* y pWS93-*CaHal3-CaCab3<sup>89-134</sup>* se construyeron digiriendo los plásmidos pGEX-6P-1-*CaCab3-CaHal3<sup>73-90</sup>* y pGEX-6P-1-*CaHal3-CaCab3<sup>89-134</sup>* con los enzimas EcoRI y KspAI, liberando fragmentos de 992 nt y 476 nt, respectivamente. Posteriormente estos fragmentos se clonaron en los plásmidos pWS93-*CaCab3* y pWS93-*CaHal3* en las mismas dianas.

### 4.4. Ensayos de crecimiento de levadura

#### 4.4.1. Medios sólidos

La determinación de la sensibilidad a diferentes condiciones en medio sólido de las cepas conteniendo los plásmidos con las diferentes versiones mutadas de los genes *HAL3* y *PPZ1* se realizó de la siguiente manera: cultivos saturados, crecidos durante una noche en medio SC-URA<sup>-</sup> con glucosa al 2% (suplementados con sorbitol o sustituyendo la fuente de carbono en aquellos casos que fue necesario), se diluyeron a una densidad óptica a 600 nm (OD<sub>600</sub>) de 0,05, y se realizaron dos diluciones seriadas 1/5, sembrándose 3 µl de cada dilución en placas de medio sintético carente de uracilo (SC-URA<sup>-</sup>) (Posas *et al*, 1995).. Las placas se incubaron a 28 °C y el crecimiento se registró a los 3 días (si no se especifica lo contrario en el texto).

#### 4.4.2. Medios líquidos

Para la determinación del crecimiento en medio líquido de las células transformadas con los plásmidos que codifican las diferentes versiones de los genes *HAL3* y *PPZ1* se obtuvieron cultivos saturados procediendo de igual manera que en el apartado anterior. Estos cultivos fueron diluidos a OD<sub>600</sub> = 0,004 en un volumen final de 300 µl en placas *Honeycomb 2* (Escandinavian Clinics), incubándose a 28 °C y se realizaron lecturas de la OD<sub>600</sub> cada 30 min (agitando previamente durante 7 min) en un equipo *BioscreenC* (ThermoFisher Scientific).

### 4.5. Esporulación de células diploides, disección de tétradas y análisis de esporas

Las cepas diploides AGS4 y MAR25 (Tabla A1) transformadas con el plásmido pWS93 conteniendo los genes *ScHAL3*, *AtHAL3*, *ScCAB3*, o sus versiones mutadas se crecieron en medio SC-URA<sup>-</sup> a 28 °C hasta la saturación de los cultivos. Las células se sedimentaron a 1228 xg durante 5 min a temperatura ambiente (RT), se lavaron dos veces con H<sub>2</sub>O, se transfirieron a medio de esporulación (1% acetato potásico, 0,1% extracto de levadura y 0,05% glucosa, pH 7,2) y se incubaron a 28 °C en agitación constante (230 rpm), durante 5-7 días. Cuando el porcentaje de células esporuladas superó el 60%, según observación microscópica, los cultivos fueron considerados aptos para su análisis. Cincuenta µl de la suspensión de células del medio de esporulación se centrifugó a 1228 xg, las células se lavaron dos veces con H<sub>2</sub>O, fueron resuspendidas en 250 µl de H<sub>2</sub>O y se añadió 12,5 µl de Zimoliasa 10 U/ml (obtenida de *Arthrobacter luteus*, MP Biomedicals), para ser incubadas durante 10 min a RT. Entre 7,5 y 10 µl de la suspensión de células fueron sembrados en una fina línea en placas de YPD recién preparadas. La disección de las esporas que componen cada tétrada se realizó con un equipo *MSM 300 Yeast Dissection Microscope* (Singer Instruments). Las placas fueron

posteriormente incubadas a 28 °C durante 72 h, tras lo cual fueron fotografiadas. Se determinó el genotipo de las células haploides obtenidas de cada tétrada realizando réplicas en placas con los correspondientes medios selectivos. El crecimiento de las células haploides en estas placas se documentó a las 72h.

### 4.6. Microscopía de fluorescencia

Las células MAC003 transformadas con el plásmido pWS93, ya sea vacío o conteniendo diferentes versiones del gen *SCHAL3* y se crecieron durante una noche hasta saturación en medio SC-URA<sup>-</sup> con glucosa. Los cultivos se diluyeron hasta una OD<sub>600</sub> de 0,004 en medio SC-URA<sup>-</sup> sustituyendo la glucosa por un 2% de rafinosa. Los cultivos fueron crecidos durante 16 h aproximadamente a 28 °C en agitación hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> de 0,6, momento en que se añadió galactosa a una concentración final del 2% para inducir la sobreexpresión de Ppz1, reanudando la incubación durante 6 h a 28 °C en agitación. Posteriormente se prepararon diluciones de los cultivos a una OD<sub>600</sub> de 0,12 en un volumen final de 1 ml, de los cuales se añadieron 300 µl a un pocillo de placas *µ-Slide 8 Well* (Ibidi), previamente tratado con 10 µl de Concanavalina A (1 mg/ml, Merck, Darmstadt). La cubeta *µ-Slide 8 Well* fue incubada 30 min a 28 °C, para que se depositaran las células en el fondo. Las micrografías fueron tomadas con un microscopio *Nikon Eclipse TE-2000E* (Nikon), utilizando el filtro FITC, con tiempos de exposición 3000 ms para las células transformadas con el plásmido vacío, y 1500 ms para el resto.

### 4.7. Ensayos de complementación en *E. coli*

La capacidad de las diferentes versiones del gen *AtHAL3* de realizar la conversión de 4'-fosfopantotenoilcisteína a 4'-fosfopanteteína se evaluó utilizando la cepa BW369 de *E. coli*, que contiene la mutación termosensible *dfp-707t*, la cual provoca que esta cepa sea incapaz de sintetizar CoA a 37 °C, ya que en estas condiciones la mutación elimina la función fosfopantotenoilcistein Descarboxilasa (Spitzer & Weiss, 1985; Kupke, 2001; Strauss *et al*, 2001). Los cultivos de *E. coli* transformadas con los plásmidos pGEX6P-1 que contenían las versiones mutadas del gen *AtHAL3* se crecieron en medio LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina a 30 °C durante una noche. Posteriormente se diluyeron los cultivos hasta una OD<sub>600</sub> de 0,05 y se incubaron a 30 o 37 °C (temperatura permisiva o no permisiva) durante 6 h. A continuación, los cultivos se distribuyeron en placas con ampicilina y se incubaron durante 24 h a las temperaturas indicadas.

#### **4.8. Preparación de extractos de levadura para inmunodetección y ensayos de interacción**

Se prepararon cultivos exponenciales de las células que contenían los plásmidos con los genes nativos o las diferentes versiones de los genes *AtHAL3*, *CaCAB3*, *CaHAL3*, *ScCAB3*, *SchAL3* o *PPZ1*, en un volumen de 10 ml de medio SC-URA<sup>-</sup>. Cuando se alcanzó una OD<sub>600</sub> de 0,8 se recolectaron las células mediante centrifugación (1620 xg durante 5 min a 4 °C), se lavaron 2 veces con agua fría y se congelaron a -20 °C hasta que fueron usadas. Los extractos de proteínas se realizaron como se describe en (Abrie *et al*, 2012): las células se resuspendieron en 100 µl de tampón de lisis frío (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 0,1% tritón X-100, 2 mM ditioneitol (DTT) y *Complete<sup>TM</sup> protease inhibitor mixture* (Roche)), se añadió el volumen equivalente a 100 µl de bolas de 0,5 mm de zirconia/silica (BioSpec), y posteriormente se realizó la lisis celular mediante agitación vigorosa utilizando un equipo *FastPrep cell Breaker* (*FastPrep<sup>®</sup> 24*, MP Biomedicals) con una potencia de 5,5 durante 45 s (3 ciclos, incubando las muestras durante 3-4 min en hielo entre ciclos), tras lo cual, se añadieron 25 µl de tampón y se centrifugaron las muestras durante 10 min a 500 xg a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante en nuevos tubos y se cuantificó la proteína total mediante el método de *Bradford* (Sigma-Aldrich). La obtención de muestras para realizar ensayos de interacción se llevó a cabo mediante la misma metodología, pero partiendo de un cultivo exponencial de 60 ml, empleando 500 µl de tampón de lisis, 400 µl de bolas y, tras la lisis celular, se añadió 125 µl de tampón de lisis.

#### **4.9. SDS-PAGE e inmunodetección**

A los extractos proteicos (40 µg de proteína total) se les añadió tampón de carga 4x SDS-PAGE (200 mM Tris-HCl pH 6,8, 40% glicerol, 8% SDS, 0,4% azul de bromofenol, 5% β-mercaptoetanol), para obtener una concentración final de tampón 1x. Las muestras fueron calentadas a 95 °C durante 5 min y resueltas mediante SDS-PAGE. Tras la finalización de la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (*Immobilon-P*, Millipore), mediante transferencia en semi-seco utilizando un equipo TE77XP (Hoefler; 1,1 mA/cm<sup>2</sup>, durante 1 h 30 min). Posteriormente las membranas se bloquearon con TBS-Tween 20 (20 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20,) con 5% leche desnatada en polvo (Régilait) durante 1 h en agitación. La incubación con el anticuerpo primario se realizó durante la noche a 4 °C en agitación suave. Las membranas se lavaron tres veces con TBS-Tween 20 durante 10 min y se incubaron 1 h con el anticuerpo secundario a RT en agitación.

La detección de las proteínas etiquetadas con el epítipo HA fue realizada utilizando anticuerpos monoclonales anti-HA (Roche), producidos en ratón, a una dilución 1:10000 en TBS-Tween 20 suplementado con un 5% de leche desnatada en polvo. Para la

detección de la proteína Ppz1 y sus variantes se utilizaron anticuerpos policlonales anti GST-Ppz1 obtenidos en conejo (Posas *et al*, 1992) diluidos 1:250 en TBS-Tween 20 suplementado con un 5% de leche desnatada en polvo. Como anticuerpos secundarios se utilizaron anti-IgG de ratón (GE-Healthcare o Biolegends) o anti-IgG de conejo (GE-Healthcare) marcados con peroxidasa de rábano diluidos 1:20000 en TBS-Tween 20 suplementada con 5% leche desnatada en polvo (Santolaria *et al*, 2018). Tras la incubación con el anticuerpo secundario las membranas se lavaron con TBS-Tween 20 (dos lavados de 15 y 10 min y tres lavados finales de 5 min cada uno).

La visualización de las proteínas inmunoreactivas se realizó mediante los kits *ECL Prime Western Blotting System* (GE Healthcare) o *Westar ηCUltra 2.0* (Cyanagen), y la quimioluminiscencia se detectó mediante un equipo *Molecular Imager VersaDoc MP 4000* (BioRad) o un *LAS-3000 Imaging System* (Fuji). Las membranas se tiñeron con Rojo Ponceau (AMRESCO) para evaluar la carga y la eficiencia de la transferencia.

#### **4.10. Expresión y purificación de proteínas recombinantes en *E. coli*.**

Todas las proteínas recombinantes fueron expresadas en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) RIL (Stratagene) como se describe en (García-Gimeno *et al*, 2003; Muñoz *et al*, 2004; Abrie *et al*, 2012). Las células transformadas se crecieron en placas de LB suplementadas con 100 µg/ml de ampicilina y 34 µg/ml de cloranfenicol a 37 °C. Se inocularon colonias individuales en 5 ml de LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina y 34 µg/ml de cloranfenicol, que se dejaron crecer durante una noche hasta su saturación. Se inoculó 1 ml del cultivo saturado por cada 100 ml de medio *Terrific Broth* (TB, 1.2% triptona, 2.4% extracto de levadura, 0.5% glicerol, 0.17 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 0.72 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Green & Sambrook, 2012). Los volúmenes de TB utilizados en este trabajo fueron 250 o 500 ml. Los cultivos se crecieron a 37 °C en agitación hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> de 0,6-0,8. Para inducir la expresión se añadió isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0,1 mM, y se incubó el cultivo a 20 °C durante 16 h para una óptima expresión de estas proteínas (Muñoz *et al*, 2004; Ruiz *et al*, 2009). Para la expresión de la proteína Ppz1 y sus versiones se suplementó el medio con 0,5 mM de MnCl<sub>2</sub> para garantizar la correcta actividad fosfatasa.

Los cultivos fueron centrifugados a 6500 xg durante 20 min a 4°C, y las células se resuspendieron en tampón de lisis (descrito en el apartado 4.8.), suplementando también con 0,5 mM de MnCl<sub>2</sub> en el caso de células que expresaban las diferentes versiones de Ppz1. En el caso de que las proteínas expresadas fueran a ser empleadas en los experimentos de entrecruzamiento químico se reemplazó el Tris-HCl de los tampones por NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 50 mM ajustado a pH 7.0. Las células se lisaron mediante sonicación (10 ciclos de 30 s a máxima potencia, con una pausa de 60 s entre ciclos) en

un equipo *Bioruptor Plus* (Diagenode) manteniendo las muestras en un baño refrigerado de agua a 4°C. El extracto obtenido se centrifugó a 7800 xg durante 10 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Para purificar las proteínas, el lisado celular se incubó con la resina de glutatión-Sefarosa 4B (Cytiva, resina GS) a razón de 400 µl de resina GS por litro de cultivo durante al menos 4 h a 4°C en rotación en una noria a 8-9 rpm. Posteriormente se centrifugó la mezcla a 750 xg durante 5 min a 4°C y la resina se lavó, por resuspensión, al menos 8 veces con 500 µl de tampón de lisis (descrito en el apartado 4.8.) y dos veces con el tampón de lisis carente de Tritón X-100. En caso de ser necesaria la eliminación de la GST de la proteína de fusión se realizó un lavado de la resina con 500 µl de tampón *PreScission* (50 mM Tris-HCl pH 7, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT), y se añadió a la resina 250 µl de tampón *PreScission*, como paso previo al tratamiento con 4 µl de proteasa *PreScission* (GE Healthcare) durante 16 h a 4°C en una noria a 8-9 rpm, como se describe en (Abrie *et al*, 2012). Cada muestra se distribuyó en dos pocillos de una placa *Multi Screen 96-well filter plate* (Millipore) que se centrifugó a 750 xg a 4°C. Esta operación se repitió dos veces más, añadiendo 50-150 µl de tampón *PreScission* para lavar la resina. A la mezcla de proteína eluída se le añadió glicerol hasta una concentración final del 10% para su almacenamiento a -80°C. La cantidad de proteína recombinante obtenida fue determinada mediante SDS-PAGE y tinción con solución Azul de Coomassie (10% ácido acético, 25% isopropanol y 0,25% *Coomassie Brilliant Blue R250* (AMRESCO)) durante 1 h. Los geles fueron desteñidos con solución decolorante (10% ácido acético y 25% isopropanol) y escaneados con un equipo *Epson Perfection V500 Photo Scanner*. La cuantificación fue llevada a cabo mediante el programa *GelAnalyzer 2010a* (<http://www.gelanalyzer.com>), comparando las bandas con una recta patrón de albumina de suero bovino (BSA).

### **4.11. Ensayos de inhibición de la actividad fosfatasa Ppz1 por Hal3**

La capacidad de las diversas versiones de Hal3 de inhibir *in vitro* la actividad fosfatasa Ppz1 fue determinada utilizando proteínas recombinantes expresadas en *E. coli*, sin GST, como se describe en el apartado anterior. Para los ensayos de actividad se mezcló, en un volumen final de 300 µl en placas de 96 pocillos, 2-10 pmol de Ppz1 (o 1-10 pmol de Ppz1-C<sub>ter</sub>) junto con el tampón de reacción (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 2 mM MnCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT) y cantidades crecientes de Hal3. La placa se incubó a 30°C durante 5 min, tras lo cual se inició la reacción añadiendo 10 mM del sustrato *p*-nitrofenil fosfato (pNPP, Sigma). La actividad fosfatasa se determinó mediante la cuantificación de la absorbancia a 405 nm (A<sub>405</sub>) del producto de la reacción (4-nitrofenol), utilizando un lector de placas *Multiskan Ascent plate reader* (Thermo Scientific). Cuando la A<sub>405</sub> de la muestra que no contenía inhibidor alcanzó un valor cercano a 1,2 se recogieron los datos

y se analizaron. La absorbancia de la mezcla de reacción sin enzima ni inhibidor fue tomada como blanco. El tiempo de la reacción varió entre 20 y 50 min.

## **4.12. Ensayos de interacción proteína-proteína**

### **4.12.1. Entrecruzamiento químico**

La capacidad de oligomerizar *in vitro* de las diferentes versiones de AtHal3 y ScHal3 fue analizada mediante ensayos de entrecruzamiento químico, utilizando para ello las proteínas recombinantes producidas en *E. coli* (Molero *et al*, 2013). La reacción de entrecruzamiento fue llevada a cabo en volúmenes de 50  $\mu$ l conteniendo 1 o 2  $\mu$ g de proteína recombinante en presencia de 0,01% glutaraldehído (GA). Las muestras se incubaron durante 25 min a 24 °C, tras lo cual se interrumpió la reacción mediante la adición de 2  $\mu$ l de 1 M Tris-HCl (pH 7,5) y posterior incubación de las muestras a 24 °C durante 5 min. Cuando se utilizó Bis[Sulfosuccinimidil] glutarato (BS2G, Covachem) como reactivo de entrecruzamiento, se emplearon 20  $\mu$ g de proteína recombinante a una concentración final de 0,2  $\mu$ g/ $\mu$ l, junto con 200  $\mu$ g de BS2G y se incubó durante 1 h a 25 °C. Se detuvo la reacción añadiendo bicarbonato de amonio a una concentración final de 100 mM y posterior incubación de las muestras durante 10 min a 25 °C. Una vez parada la reacción se añadió a las muestras el correspondiente volumen de tampón de carga 4x SDS-PAGE para una concentración final 1x y se calentaron a 95 °C durante 5 min. Las proteínas entrecruzadas se resolvieron mediante geles SDS-PAGE al 10% para las muestras de AtHal3 y al 6% para las de ScHal3. La tinción de los geles se realizó utilizando Azul de Coomassie y se decoloraron con solución decolorante (10% ácido acético, 25% isopropanol).

### **4.12.2. Ensayos de interacción Ppz1-Hal3 *in vitro***

Para determinar la capacidad de unión de las diferentes versiones de ScHal3 a Ppz1, Ppz1-C<sub>ter</sub> (Ppz1  $\Delta$ 1-344), o ScCab3, se utilizaron alícuotas de 100  $\mu$ l de resina de GS conteniendo 4 u 8  $\mu$ g de GST-Ppz1, 4  $\mu$ g de GST-Ppz1-C<sub>ter</sub> o 10  $\mu$ g de GST-ScCab3, excepto en los ensayos realizados con las versiones ScHal3\_L403N, ScHal3\_L405E y ScHal3\_L403N\_L405E, en los que se utilizó alícuotas de 50  $\mu$ l de la resina conteniendo Ppz1. La resina se incubó durante 1 h 30 min a 4 °C en rotación junto con 600  $\mu$ g de extractos proteínicos provenientes de la cepa IM021 (*ppz1*  $\Delta$  *hal3*  $\Delta$ ), que expresaban las diferentes versiones de ScHal3 con una etiqueta 3xHA en un volumen final de 600  $\mu$ l (excepto en los ensayos de unión a ScCab3, en los que fueron utilizados 2 mg de extracto proteínico).

Tras la incubación, las muestras fueron transferidas a una placa de 96 pocillos con filtro *MultiScreen Filter Plates* (Millipore), y se centrifugaron 1 min a 500 xg a 4 °C. Las muestras fueron lavadas 3 veces con tampón de lisis, descrito en el apartado 4.8.,

carente de Tritón-X100 y de inhibidor de proteasas. Se recuperó la resina retenida en el filtro con 120  $\mu$ l de tampón SDS-PAGE 2x (0,125M Tris-HCl pH 6,8, 20% glicerol, 4% SDS, 0,004% azul de bromofenol, 2,5%  $\beta$ -mercaptoetanol), excepto para las versiones ScHa3\_L403N, ScHa3\_L405E y ScHa3\_L403N\_L405E, en las que se utilizaron 50  $\mu$ l, se incubaron las muestras a 95 °C durante 5 min y se sedimentó la resina mediante un pulso rápido en una microcentrífuga para recuperar el sobrenadante. Las proteínas presentes en 40  $\mu$ l de sobrenadante se resolvieron por SDS-PAGE y fueron inmunodetectadas por *western blot* como se ha descrito en el apartado 4.9. Los niveles de interacción fueron determinados integrando la señal de las bandas inmunoreactivas y la de la tinción con rojo Ponceau de las respectivas las proteínas cebo fusionadas a GST, mediante el programa *GelAnalyzer 2010a* (<http://www.gelanalyzer.com>), y calculando los respectivos cocientes. Los datos se refirieron al cociente del carril que contenía la muestra ScHal3 nativo.

### **4.13. Otras técnicas**

#### **4.13.1. Ensayos fluorimétricos de desnaturalización**

La determinación de las curvas de desnaturalización de las proteínas recombinantes (sin GST) ScHal3, ScHal3\_L403N, ScHal3\_L405E y ScHal3\_L403N\_L405E se realizaron mediante ensayos fluorimétricos en un aparato *FP-8200 Spectrofluorometer* (JASCO) a longitudes de onda ( $\lambda$ ) de 295 nm para la excitación y 338 nm para la emisión. La concentración de proteína recombinante fue de 1  $\mu$ M en un tampón 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 10% glicerol y 2 mM DTT. La rampa térmica fue de 2 °C/min.

#### **4.13.2. Cromatografía de filtración en gel**

La cromatografía de exclusión por tamaño fue realizada en el sistema *Akta Explorer* (GE Healthcare), cargando 500  $\mu$ l de las diferentes versiones recombinantes (sin GST) de ScHal3 a una concentración de entre 0,2-0,4 mg/ml en una columna *Superdex 200 HR 10/30*. El flujo se estableció a 0,75 ml/min y se recogieron fracciones de 1 ml. Como tampón de cromatografía se empleó una solución compuesta por 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl y 2 mM DTT.

#### **4.13.3. Determinación del contenido de flavina**

Muestras de proteínas recombinantes (sin GST) de ScHal3 nativo, ScHal3\_L403N, ScHal3\_L405E, ScHal3\_L403N\_L405E, AtHal3-L117E y AtHal3-G115N-L117E, se concentraron mediante filtración, utilizando dispositivos Amicon® Ultra-0.5 mL Centrifugal Filters Ultracel®-30K (Millipore), hasta una concentración entre 0,15-0,45 mg/ml, y se sometieron a un rastreo espectrofotométrico, midiendo a intervalos crecientes de 3 nm entre las longitudes de onda 220-745 nm. Se utilizaron dos preparaciones independientes de cada versión.

# 5. Objetivos



Los principales objetivos de esta tesis han sido:

- 1.- Explorar los efectos de sustituir los residuos D566 y D615 de Ppz1, fuertemente conservados en las proteínas de tipo Ppz, por residuos de lisina, característicos de las proteínas de tipo PP1c, investigando su impacto en la regulación por Schal3.
- 2.- Estudiar el núcleo hidrofóbico de los trímeros formados por proteínas AtHal3 y Schal3, analizando el papel de los residuos identificados como relevantes en la formación del enzima PPCDC de *S. cerevisiae* y en la función de Schal3 como regulador de Ppz1.
- 3.- Determinar la relevancia del extremo N-terminal de Schal3 en la regulación de la fosfatasa Ppz1 e identificar posibles motivos estructurales requeridos para la misma.

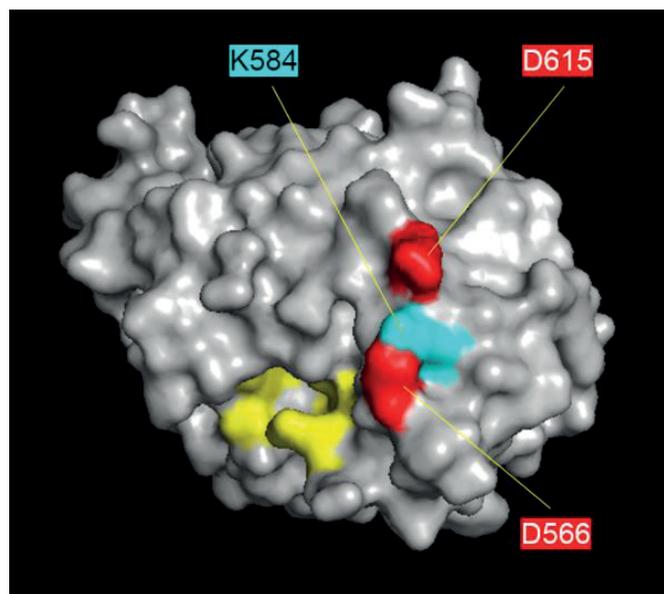


## 6. Resultados



## 6.1. Análisis comparativo de las fosfatasas tipo 1 y las fosfatasas tipo Z.

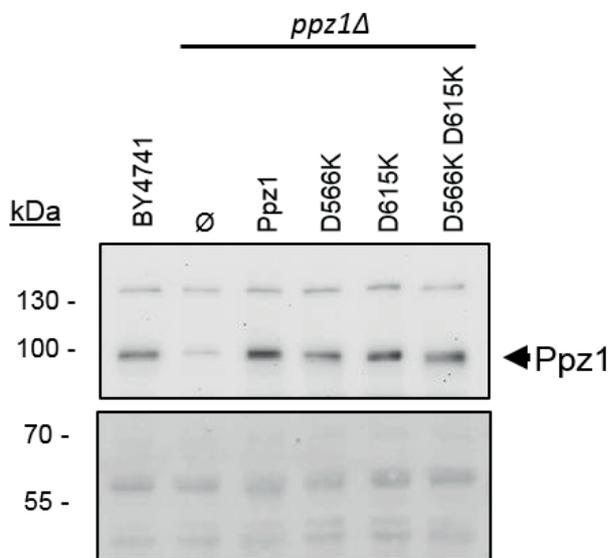
En este capítulo se mostrarán los resultados obtenidos del estudio de los residuos D566 y D615 de Ppz1. Este estudio deriva del trabajo bioinformático realizado por el Dr. Antonio Casamayor y los experimentos de entrecruzamiento químico realizados por el Dr. Diego Velázquez (Casamayor *et al*, 2022). Tras el análisis de los datos de los experimentos de entrecruzamiento se observó que la lisina 90 de ScHal3, un residuo altamente conservado en la extensión N-terminal de las proteínas homólogas de ScHal3, se unía covalentemente con el residuo K584 de Ppz1. Cuando se localiza este aminoácido en nuestro modelo de Ppz1, aparece muy cerca de los residuos D566 y D615 (Figura 8). Cuando Ppz1 se compara con la fosfatasa Glc7, estos dos residuos alinean con los aminoácidos K210 y K259 de Glc7. Se trata, por lo tanto, de dos cambios no conservativos que provocarían que la carga de esta región cambie drásticamente.



**Figura 8. Modelo del dominio C-terminal de Ppz1.** El residuo K584, el cual se unía covalentemente con el residuo K90 de ScHal3 en los ensayos de entrecruzamiento, aparece señalado y coloreado en cian. Los residuos D566 y D615 de Ppz1 (mutados en este trabajo) aparecen señalados y coloreados en rojo. En amarillo, residuos catalíticos. (imagen modificada de (Casamayor *et al*, 2022)).

**6.1.1. El análisis mutagénico demuestra que el residuo D615 de Ppz1 juega un papel clave en la regulación de Ppz1.**

Partiendo de los datos descritos en el apartado anterior se decidió generar tres versiones de la fosfatasa Ppz1 con las siguientes mutaciones: D566K, D615K y la doble mutación D566K D615K, para mimetizar los residuos de lisina presentes en las posiciones equivalentes de las fosfatasas de tipo 1. Estas versiones se expresaron en levadura bajo el control de su propio promotor utilizando el plásmido pRS316 (centromérico). Una vez transformadas las levaduras se procedió a realizar ensayos de inmunodetección para asegurarnos de que todas las versiones se expresaban a niveles similares (Figura 9).



**Figura 9. Inmunodetección de las versiones de Ppz1 expresadas en *S. cerevisiae*.** Las cepas se transformaron con los plásmidos pRS316 indicados. Se prepararon los extractos proteínicos y los niveles de expresión de las diversas versiones de Ppz1 se examinaron mediante ensayos de inmunodetección (panel superior), utilizando anticuerpos anti-Ppz1 como se describe en el apartado 4.8. de Materiales y Métodos. Panel inferior: sección de membrana de PVDF teñida con rojo Ponceau para monitorizar la carga y la eficiencia de la transferencia.

Una vez comprobado que todas las versiones se expresaban de manera equivalente se procedió a realizar ensayos de crecimiento en medio sólido. Como se muestra en la Figura 10, la transformación con el plásmido que contiene la fosfatasa nativa provoca una disminución de la fuerte tolerancia a los cationes de litio característica del mutante *ppz1Δ*. En comparación con las células que expresaban la Ppz1 nativa, las levaduras que expresaban la versión D566K eran más tolerantes a cationes litio, mientras que las que expresaban la versión D615K mostraban una ligera pérdida de tolerancia. Las levaduras que expresaban el doble mutante presentaron un fenotipo intermedio respecto a las dos mutaciones simples, con una tolerancia similar a la de las células con la versión nativa.

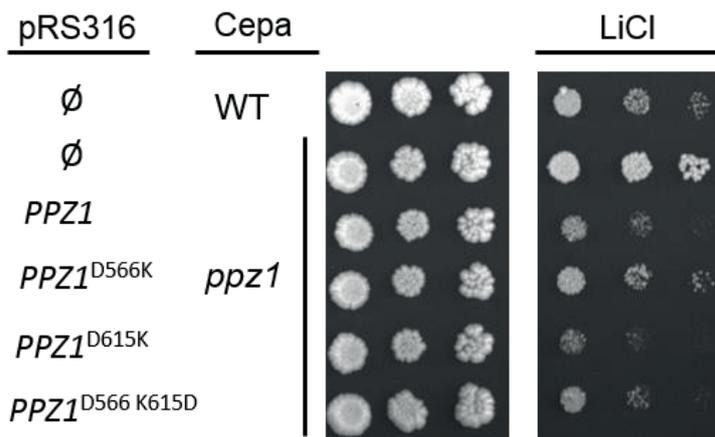


Figura 10. Caracterización de las versiones mutadas de Ppz1: ensayos de tolerancia a Li<sup>+</sup> en medio sólido. Se transformó la cepa DBY746 silvestre (WT) y su derivada *ppz1Δ* con los vectores indicados. Se realizaron ensayos de crecimiento en medio sólido en placas SC-URA con o sin LiCl (100 mM). ∅, plásmido vacío. Fotografías tomadas después de seis días de crecimiento.

Para continuar explorando si estos residuos eran una característica diferencial entre las fosfatasa PP1 y las Ppz, se transformó la cepa JA100 mutante para el gen *slt2Δ* (JC10) con los plásmidos pRS316 que contenían el gen *PPZ1* y sus variantes. Mediante un ensayo de crecimiento en medio líquido (Figura 11) se observó que la expresión de la fosfatasa Ppz1 mejoró el crecimiento de las células mutantes *slt2Δ* en presencia de cafeína a una concentración de 2 mM, aunque sin igualar el de la cepa silvestre. Este efecto también se observó en las células que expresaban las versiones D566K y el doble mutante (D566K D615K). Sin embargo, las células que expresaban la versión mutada D615K presentaron un mayor crecimiento que las que expresaban la versión nativa, e incluso ligeramente mayor que la cepa silvestre, acercándose al crecimiento de la cepa CCV186 (mutante *slt2Δ hal3Δ*). Estos resultados sugieren que la versión D615K provoca que la fosfatasa Ppz1 esté anormalmente activa, mientras que la mutación D566K provoca el efecto contrario.

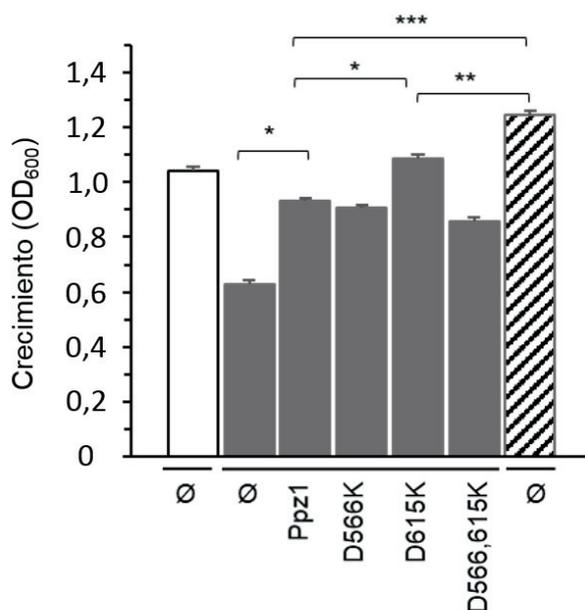
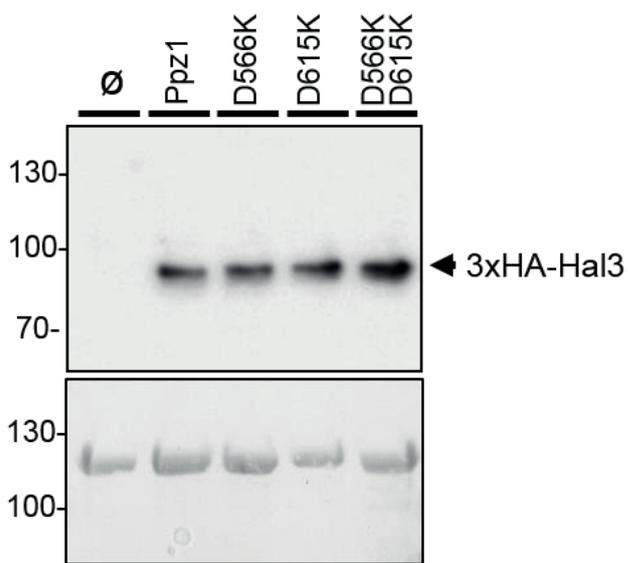


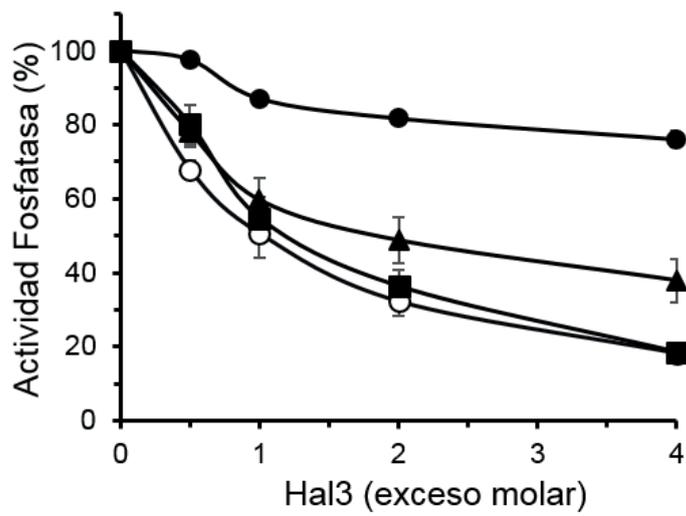
Figura 11. Ensayos de crecimiento en medio líquido de las versiones mutadas de Ppz1. Las cepas JA100 (genotipo silvestre, barra sin colorear), JC10 (*slt2Δ*, barras grises) y CCV186 (*slt2Δ hal3Δ*, barra rayada) se transformaron con los plásmidos indicados y se cultivaron en medio líquido en presencia de cafeína 2 mM (OD<sub>600</sub> inicial = 0,004). El crecimiento se midió cada 30 min en un aparato BioScreen C (ThermoFisher Scientific). Se representa la OD<sub>600</sub> obtenida tras incubar 24 h las células. Los datos son la media ± ESM de tres clones independientes cultivados al menos por duplicado. \*, p < 0,01; \*\*, p < 0,001; \*\*\*, p < 0,0001.

Con el fin de profundizar más en la causa de estos fenotipos, se realizó una caracterización *in vitro* de estas fosfatasa. Para ello, se expresaron de manera recombinante en *E. coli* como proteínas de fusión con GST. Tras la purificación por afinidad, las fosfatasas unidas a resina de glutatión-sefarosa se utilizaron como cebo para realizar ensayos de interacción con extractos proteínicos de levadura provenientes de la cepa IM021 (*ppz1Δ hal3Δ*), que contenían ScHal3 marcado con una etiqueta 3xHA (Figura 12). Tras procesar las muestras como se indica en el apartado 4.12.2. de Materiales y Métodos y realizar una inmunodetección de ScHal3, se observó que ninguna de las mutaciones provocaba una pérdida de la capacidad de interacción con ScHal3.



**Figura 12. Ensayos de interacción de las versiones mutadas de Ppz1 con ScHal3.** Se utilizó 8  $\mu$ g de GST-Ppz1 unida a 100  $\mu$ l de resina como cebo de las diferentes versiones de ScHal3 expresadas mediante el vector pWS93 en la cepa IM021 (*ppz1Δ hal3Δ*);  $\emptyset$ , plásmido vacío. Tras el lavado de la resina, las muestras se resolvieron por SDS-PAGE (geles al 8%). Las versiones de ScHal3 marcadas con una etiqueta 3xHA se detectaron por inmunodetección (panel superior). La membrana se tiñó con rojo Ponceau para evaluar la carga de la fosfatasa fusionada a GST (panel inferior).

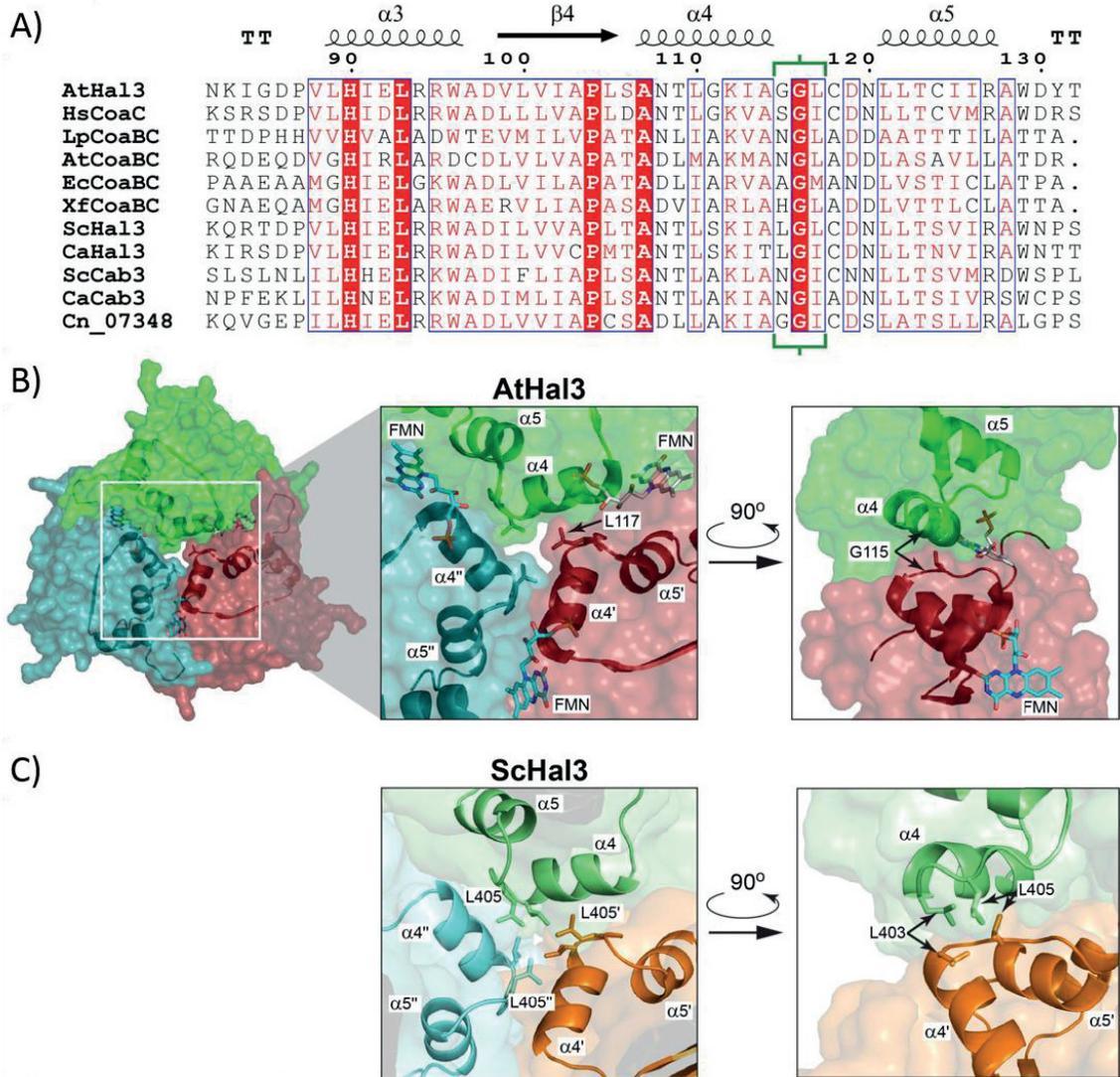
Para finalizar la caracterización *in vitro*, eliminamos la región GST de las fosfatasas, y realizamos ensayos de inhibición por ScHal3 (Figura 13). La versión que presenta la mutación D566K fue inhibida igual que la fosfatasa nativa, a diferencia de la versión D615K, que presentó una clara resistencia a la inhibición. La versión doble mutante (D566K D615K) tuvo un comportamiento intermedio. Estos datos concuerdan con los obtenidos en los ensayos fenotípicos (Figuras 10 y 11), indicando que el residuo D615 puede ser un elemento estructural clave en la inhibición de la fosfatasa mediada por ScHal3. Dado que la versión mutada en el residuo D566 es inhibida de igual manera que la Ppz1 nativa, pero su expresión en *S. cerevisiae* presenta unos fenotipos achacables a una función deficiente *in vivo*, se determinó la actividad específica de las diferentes versiones de la fosfatasa expresadas de manera recombinante. Encontramos que, en comparación con la Ppz1 nativa, la versión D566K aparecía de manera sistemática ligeramente menos activa ( $81,5 \% \pm 8,2$ ,  $n = 3$ ), mientras que la variante D615K era indistinguible de la fosfatasa nativa ( $99,3 \pm 1,3$ ,  $n = 3$ ). Por lo tanto, una menor actividad catalítica de la versión D566K podría explicar los resultados obtenidos en los ensayos fenotípicos. El comportamiento intermedio *in vivo* de la versión doble mutante podría explicarse por un efecto compensatorio de ambas mutaciones.



**Figura 13. Ensayos de inhibición de la actividad fosfatasa de las versiones mutadas de Ppz1.** Las diferentes versiones de Ppz1 (○, nativa; ■, D566K; ●, D615K; ▲, D566K D615K) se incubaron con cantidades crecientes de ScHal3 expresado en bacterias. Los datos se representan como el porcentaje de actividad de fosfatasa en ausencia de inhibidor y corresponden a la media  $\pm$  ESM de al menos tres ensayos independientes, utilizando dos preparaciones diferentes de cada proteína.

## 6.2. Estudio del núcleo hidrofóbico de las proteínas AtHal3 y ScHal3

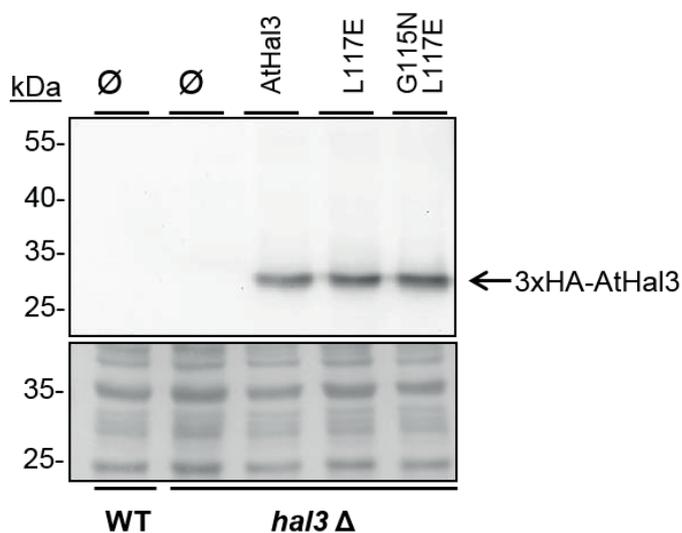
En el presente apartado se expondrán los resultados derivados del estudio del núcleo hidrofóbico de las proteínas AtHal3 y ScHal3. Este trabajo se realizó en colaboración con el Dr. Erick Strauss (Stellenbosch University, República Sudafricana). Resultados procedentes, por un lado, del alineamiento de múltiples proteínas con actividad PPCDC y de proteínas similares a ScHal3 y, por otro, del estudio de la estructura tridimensional del enzima PPCDC de *A. thaliana*, indicaban que gran parte de la interfaz entre los monómeros que conforman los complejos PPCDC se crea por la interacción de las hélices  $\alpha 4$  y  $\alpha 5$  (Figura 14A y 14B). En la citada interacción se encuentran implicados tres residuos contiguos: 115-117 en AtHal3 y 403-405 en ScHal3 (corchete verde de la Figura 14A). Estos residuos quedan muy cercanos unos de otros en el espacio central creado por los monómeros. Es destacable que el residuo L117 de AtHal3 (L405 de ScHal3) está fuertemente conservado o cambia a otro residuo también hidrofóbico y voluminoso. Esto sugiere que podría ser un determinante importante en la formación y/o mantenimiento del trímero PPCDC. En la posición 116 de AtHal3 está siempre conservado un residuo de glicina, debido seguramente a las restricciones estéricas para la formación del *loop*, mientras que la posición 115 (403 en ScHal3) es más variable. En ScHal3 la región del *loop* consiste en L-G-L y, basándonos en un modelo generado para ScHal3, debería formar un núcleo hidrofóbico muy compacto (Figura 14C). Tras este análisis consideramos que estos residuos podrían jugar un papel central en el proceso de trimerización de los complejos PPCDC. Por ello decidimos explorar esta hipótesis mediante un análisis mutacional comparativo.



**Figura 14. Análisis comparativo de los residuos de AtHal3 y ScHal3 mutados en este capítulo.** A) Alineamiento de diversas proteínas PPCDC y homologas a ScHal3, comprendido entre los residuos 82-132 de AtHal3 (UniProt Q9SWE5), en el que se indican los correspondientes motivos de estructura secundaria de la estructura de AtHal3 (PDB id 1MVN). Los residuos en los que se centró este trabajo están marcados con un corchete verde. Las secuencias alineadas son: CoaC humana (HsCoaC; Q96CD2); CoaBC de *Lactobacillus plantarum* (LpCoaBC, 7V924), CoaBC de *Agrobacterium tumefaciens* (AtCoaBC, F7U4A8), CoaBC de *Escherichia coli* (EcCoaBC, P0ABQ0), CoaBC de *Xylella fastidiosa* (XfCoaBC, Q87F20), Hal3 de *S. cerevisiae* (ScHal3, P36024), CaCab3 de *C. albicans* (CaHal3, A0A1D8PKD2), ScCab3 de *S. cerevisiae* (ScCab3, P36076), *C. albicans* Cab3 (CaCab3, Q5A868), CNAG\_07348 de *C. neoformans* (Cn\_07348, J9VG12). B) Estructura del trímero de AtHal3 obtenida por cristalografía de rayos X (PDB, 1MVN), cada monómero se muestra de diferente color. La secuencia mostrada en la imagen A se muestra en formato *cartoon* para resaltar su posición y participación en el mantenimiento de la parte central del trímero. Los paneles central y derecho (en el que, por claridad, solo se incluyen 2 monómeros) muestran ampliada la zona central del trímero, indicando las posiciones de las hélices  $\alpha 4$  y  $\alpha 5$  de los monómeros, así como las posiciones de los residuos L117 y G115 (formato de barra o *stick*). El cofactor FMN se muestra en formato de barra coloreado en función de sus átomos. C) Ampliación de la región central de un modelo del trímero de ScHal3, construido en base a la estructura de AtHal3. Los monómeros se muestran en diferentes colores y se indica la identidad de las hélices. Los residuos L403 y L405 de los monómeros están en formato de barra (tomado de Santolaria *et al.* 2018).

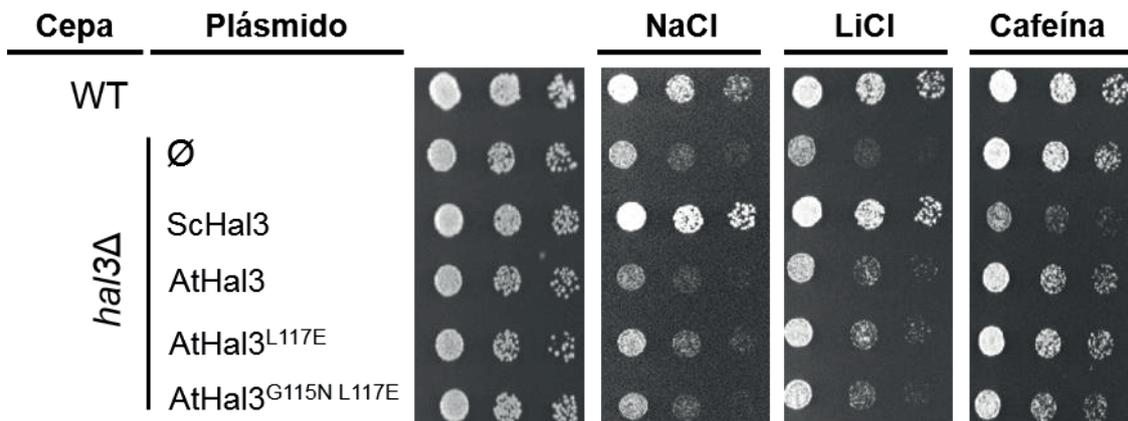
**6.2.1. Análisis de los mutantes de AtHal3**

Basándonos en la hipótesis descrita en el apartado anterior decidimos mutagenizar el residuo L117 de AtHal3 por un residuo de ácido glutámico, ya que este presenta un tamaño similar, pero es polar y está cargado negativamente en condiciones fisiológicas, con el objetivo de interrumpir cualquier interacción hidrofóbica en la que el residuo 117 de AtHal3 pudiera estar implicado. También se realizó una segunda mutación de la posición 115 sustituyendo la glicina por una asparagina, un residuo más voluminoso que debería afectar al plegamiento de la región. Se transformaron células de *S. cerevisiae* con estas variantes clonadas en el vector pWS93, bajo el promotor constitutivo del gen *ADH1*, y se comprobó el nivel de expresión de las versiones mutadas, observándose que ambas se expresaron a un nivel similar al de la proteína nativa (Figura 15).



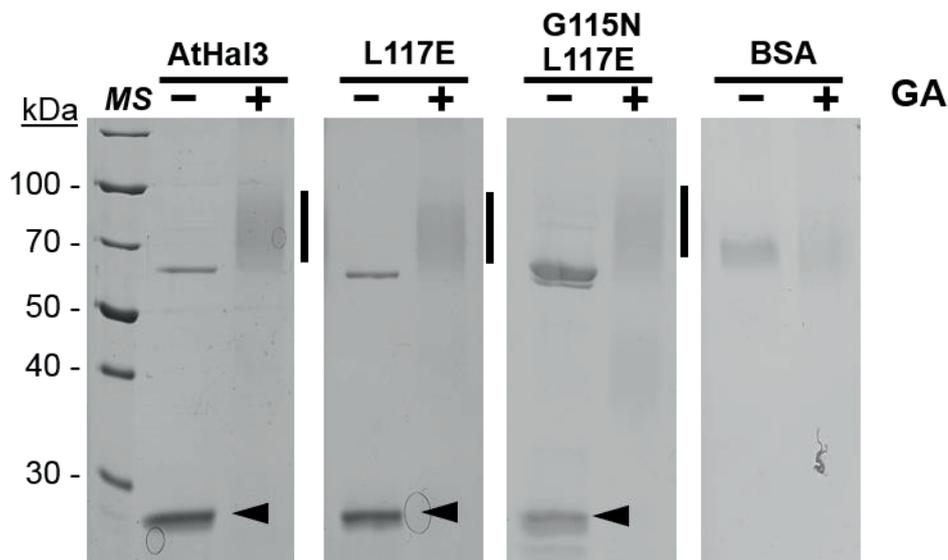
**Figura 15. Inmunodetección de las versiones de AtHal3 expresadas en *S. cerevisiae*.** La cepa silvestre (WT) y su isogénica *hal3Δ* se transformaron con los plásmidos pWS93 indicados. Se prepararon los extractos proteínicos y los niveles de expresión de las diversas versiones de AtHal3 se examinaron mediante ensayos de inmunodetección como se describe en el apartado 4.9. de Materiales y Métodos. Panel inferior: sección de membrana de PVDF teñida con rojo Ponceau para monitorizar la carga y la eficiencia de la transferencia.

Las células de *S. cerevisiae* transformadas se sometieron a ensayos de crecimiento en medio sólido (Figura 16). Como se describió en (Espinosa-Ruiz *et al*, 1999), la sobreexpresión de AtHal3 aumentó ligeramente la tolerancia a la toxicidad de los cationes litio. Las versiones mutadas presentaron un fenotipo similar a la versión nativa. Sin embargo, ni la versión nativa ni las versiones mutadas consiguieron imitar el efecto nocivo de la sobreexpresión de ScHal3 en los ensayos realizados en placas suplementadas con cafeína, ni tampoco confirieron hipertolerancia a NaCl.



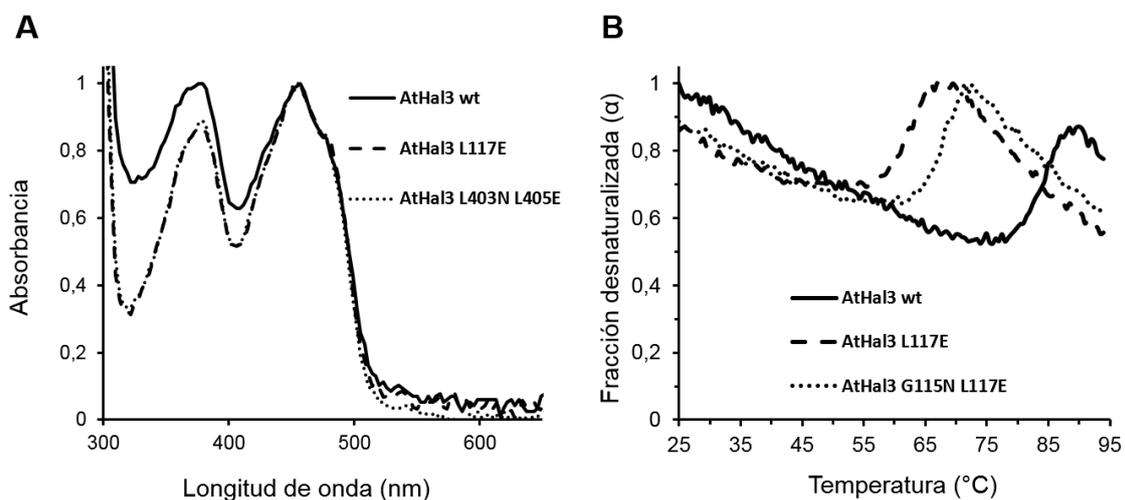
**Figura 16. Caracterización fenotípica de las versiones mutadas de AtHal3.** Los diferentes vectores pWS93 se introdujeron en la cepa BY4741 y en el mutante *hal3Δ*, y se realizaron ensayos de crecimiento en medio sólido en placas SC-URA<sup>-</sup>, suplementadas con NaCl (1 M), LiCl (150 mM) o cafeína (8 mM). Fotografías tomadas 48 h tras la siembra.

Posteriormente investigamos si las mutaciones introducidas en AtHal3 podrían afectar la capacidad de esta proteína para formar trímeros *in vitro*. Con este fin, expresamos las proteínas recombinantes en *E. coli* como fusiones GST. Estas proteínas se purificaron como se indica en el apartado 4.10. de Materiales y Métodos, para finalmente eliminar el dominio GST. Las muestras se trataron con glutaraldehído para unir covalentemente aquellos residuos de lisina que estuvieran espacialmente cercanos. En todos los casos el tratamiento de entrecruzamiento mostró la aparición de una banda ancha en torno a los 70-80 kDa, compatible con la generación de trímeros de AtHal3 (masa molecular esperable de 69 kDa) (Figura 17), por lo que podemos concluir que estas mutaciones no afectan a la capacidad de AtHal3 para trimerizar.



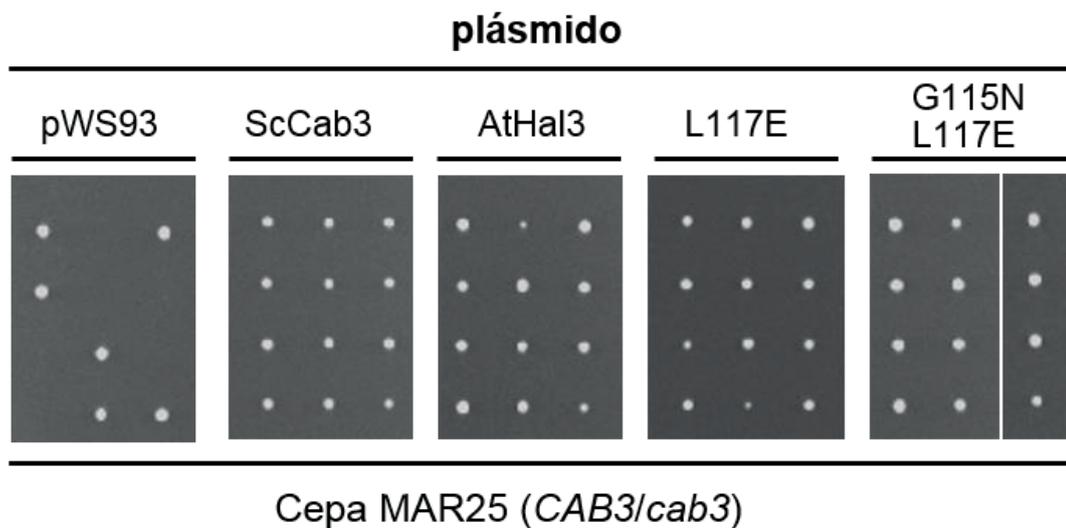
**Figura 17. Ensayos de entrecruzamiento de las versiones de AtHal3.** Se incubó 1 µg de AtHal3 nativo o sus versiones mutadas con glutaraldehído (0,01% concentración final; GA, +) o con solvente (-). Se resolvieron las muestras mediante SDS-PAGE (gel al 10% de acrilamida), tras lo cual se realizó la tinción con Azul de Coomassie. La flecha indica la movilidad del monómero y la barra vertical señala la región (70-80 kDa), donde aparece el previsible homotrímero tras el tratamiento. Se observa la presencia de una proteína contaminante de origen bacteriano (≈70 kDa), correspondiente a DnaK.

La presencia de FMN es esencial para la función PPCDC, por lo que decidimos verificar la presencia o ausencia del cofactor en las versiones mutadas de AtHal3. Para ello, concentramos las preparaciones de proteína recombinante y las sometimos a un rastreo espectrofotométrico, ya que el cofactor FMN oxidado presenta dos picos de absorción característicos a 382 y 452 nm. Como se muestra en la Figura 18A, todas las versiones de AtHal3 presentaron los picos de absorción típicos de la flavina, indicando que esta molécula estaba presente en las muestras. Consideramos también que dichas mutaciones podían afectar a la estabilidad de la proteína, por lo que decidimos realizar un ensayo de desnaturalización de las versiones de AtHal3. Para ello se siguió la curva de desnaturalización por temperatura de las diferentes versiones, midiendo la pérdida de fluorescencia de las muestras provocada por la exposición de los residuos de triptófano al solvente (Figura 18B). Ambas versiones mostraron curvas bifásicas, al igual que la proteína nativa. Este perfil seguramente sea el resultado de una desnaturalización en dos etapas, perdiendo primero la estructura oligomérica (que nuestro grupo demostró que se acompaña de la pérdida del cofactor FMN (Abrie *et al*, 2015)) y una segunda etapa que se relaciona con la pérdida de estructura terciaria. Sin embargo, a diferencia de la versión nativa, que presentó el aumento de la fluorescencia alrededor de los 80°C, las versiones mutadas mostraron un aumento de la fluorescencia a una temperatura menor, a partir de los 55-60 °C. Estos resultados indican que las variantes mutadas forman homotrímeros que son menos estables que la versión nativa de AtHal3.



**Figura 18. Caracterización *in vitro* de las versiones de AtHal3.** A) Espectro UV-Visible de las preparaciones de AtHal3. Se muestra los dos picos característicos de la molécula de FMN oxidada (382 y 452 nm). Se normalizó para el valor más alto en cada muestra (tomado como unidad) debido a la diferencia de concentración. B) Análisis de la estabilidad estructural dependiente de temperatura de las versiones de AtHal3. Se muestra el cambio en los valores normalizados derivados de los datos de fluorescencia de los residuos de Trp al quedar expuestos al solvente. La longitud de onda de excitación fue de 295 nm y la emisión 338 nm, con una rampa de temperatura de 2 °C/min.

La capacidad de formar homotrimeros es un requisito indispensable para generar un enzima PPCDC activo. Por ello, especulamos que las versiones mutadas de AtHal3 deberían ser funcionales. Para probar esta hipótesis, transformamos la cepa MAR25, un heterocigoto diploide para la delección *cab3*, con los plásmidos pWS93 que contenían la región codificante del gen *AtHAL3* nativo y sus versiones. Se provocó la esporulación de las células y se realizó un análisis de las tétradas obtenidas. Como se explicó en la Introducción, la mutación *cab3Δ* es letal, por lo que, tras la esporulación de las células transformadas con pWS93, sólo aquellas esporas que contengan la copia cromosómica del gen *CAB3* serán viables (Figura 19, primer panel). Las esporas resultantes de las células transformadas con el plásmido pWS93-ScCab3 se utilizaron como control positivo (Figura 19, segundo panel), generando cuatro esporas viables. Como control positivo adicional se utilizó el plásmido pWS93-AtHal3 que, en estudios previos (Ruiz *et al*, 2009), se demostró que puede reemplazar funcionalmente a ScCab3. Como se muestra en la Figura 19 (tercer panel), se generaron también cuatro esporas viables. El análisis de las esporas de las células transformadas con los plásmidos que contenían las versiones mutadas de AtHal3 mostró un resultado igual al de los controles positivos.



**Figura 19. Análisis de tétradas de la cepa MAR25.** Cultivos de la cepa MAR25 (*CAB3 / cab3*) transformada con el plásmido pWS93 conteniendo AtHal3 y sus derivados indicados en la parte superior, se sometieron a esporulación y a disección de las tétradas resultantes. El crecimiento de las 4 esporas indica que la proteína expresada es capaz de reemplazar *in vivo* a ScCab3, y conserva la función PPCDC.

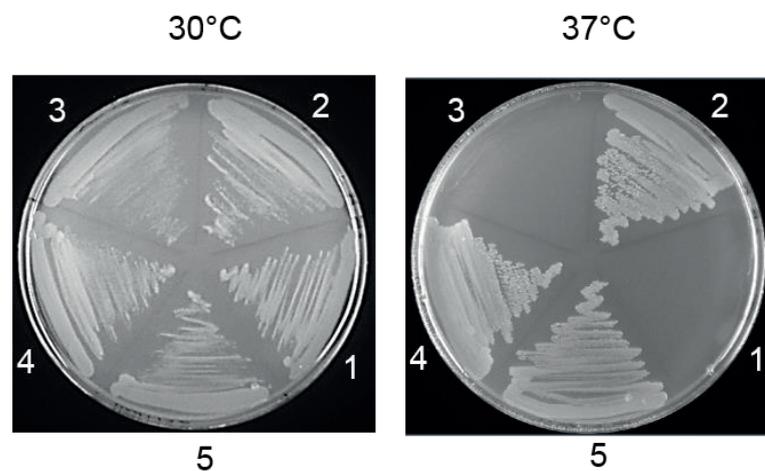
## RESULTADOS

Las versiones de AtHal3 se sometieron a un segundo análisis de tétradas utilizando la cepa AGS4 (*HAL3 / hal3Δ VHS3 / vhs3Δ*). La doble mutación *hal3Δ vhs3Δ* es sintética letal por lo que, cuando se provoca la esporulación de esta cepa, solo serán viables aquellas esporas que contengan la copia cromosómica del gen *HAL3*, *VHS3* o de ambos. Tras la transformación y esporulación de las células que contenían los plásmidos pWS93 portadores de las versiones mutadas de AtHal3, se comprobó si se recuperaban esporas dobles mutantes (*hal3Δ vhs3Δ*), dado que esto indicaría que estas versiones de AtHal3 forman enzimas PPCDC funcionales. Se utilizaron como control negativo células transformadas con el vector vacío ( $\emptyset$ ) y, como controles positivos, transformantes con los plásmidos pWS93-ScHal3 y pWS93-AtHal3. Tras el análisis de 12 a 35 tétradas, según el caso, se observó el mismo resultado que en el experimento anterior: la transformación con las versiones de AtHal3 complementa la doble mutación *hal3Δ vhs3Δ*, permitiendo el crecimiento de las esporas dobles mutantes (Tabla 3).

**Tabla 3. Análisis de tétradas de la cepa AGS4.** Las células transformadas con el plásmido pWS93 y sus derivados, indicados en la primera columna, se sometieron a esporulación y a la disección de las tétradas resultantes. Para identificar el genotipo, tras el crecimiento de las esporas se realizaron réplicas en placas con los marcadores correspondientes, presencia de *LEU2* para la mutación *hal3Δ* y resistencia a G418 (geneticina) para la *vhs3Δ*.

pWS93	n.º de Tétradas	Complementación
$\emptyset$	12	NO
ScHal3	35	SI
AtHal3	29	SI
AtHal3 L117E	27	SI
AtHal3 G115N L117E	15	SI

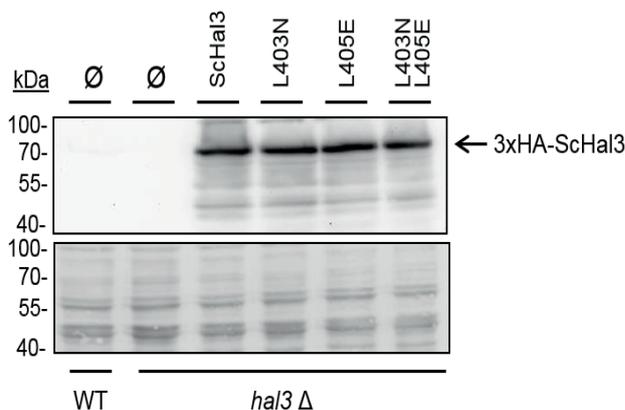
Estos resultados indicaron que ninguna de las mutaciones afectó a la función de AtHal3 en la biosíntesis de CoA. Para cerciorarnos completamente de ello, transformamos la cepa de *E. coli* BW396 con las diferentes versiones clonadas en el plásmido pGEX-6P-1, que permite su expresión en esta bacteria. Esta cepa presenta la mutación *dfp-707<sup>ts</sup>* que suprime la actividad PPCDC cuando las células se cultivan a 37 °C. Como se muestra en la Figura 20, la presencia del plásmido vacío o del plásmido que contiene el gen *SchAL3* no permitió el crecimiento a 37 °C. Por el contrario, como se había descrito previamente en (Ruiz *et al*, 2009; Kupke, 2001), expresar la proteína AtHal3 nativa complementa la mutación *dfp-707<sup>ts</sup>*. También se observó crecimiento a la temperatura restrictiva de las células transformadas con las versiones AtHal3 L117E y G115N L117E, lo que confirma que estas mutaciones no alteran la función PPCDC normal.



**Figura 20. Ensayos de sensibilidad a temperatura de la cepa de *E. coli* BW396.** Se transformó la cepa BW396 (*dfp-707<sup>ts</sup>*) con el plásmido pGEX-6P-1 vacío (1) como control negativo, o portando la región codificante de los genes AtHAL3 (2) como control positivo, SchAL3 (3), o las versiones mutadas del gen AtHAL3 L117E (4) y G115N L117E (5). En la parte superior se indica la temperatura a la que se incubaron las placas durante 24 h, 30 °C (temperatura permisiva) o 37 °C (temperatura restrictiva).

**6.2.2. Caracterización funcional de las versiones de ScHal3 *in vivo* como inhibidores de Ppz1.**

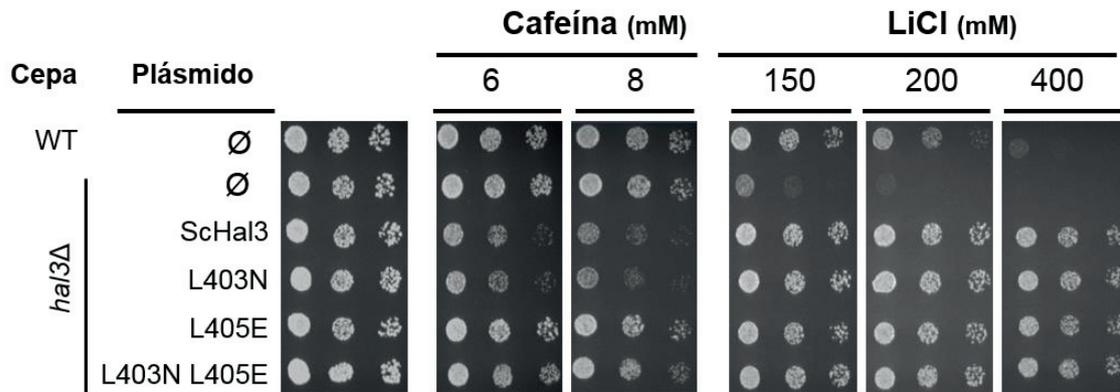
Continuando con la hipótesis descrita en el apartado 6.2., decidimos introducir mutaciones similares a las de AtHal3 en ScHal3. Se cambió la leucina 405 por ácido glutámico (imitando la versión AtHal3 L117E), mientras que el residuo leucina 403 (que en AtHal3 es una glicina) se cambió a asparagina, debido a que es el residuo que ocupa esa posición en ScCab3, ya que en estudios previos (Olzhausen *et al*, 2013) se demostró que la oligomerización de ScCab3 se producía a través de la región N-terminal, no estando implicado el dominio PD. Se preparó, además, una versión que contenía ambas mutaciones. Estas versiones se construyeron en plásmidos pWS93 (expresión en levadura) y pGEX-6P-1 (expresión en bacteria). Una vez introducidas en levadura se comprobó su nivel de expresión mediante inmunodetección. Como se muestra en la Figura 21, todas las versiones se expresan a niveles similares que el ScHal3 nativo.



**Figura 21. Inmunodetección de las versiones de ScHal3 expresadas en *S. cerevisiae*.** Las cepas se transformaron con los plásmidos pWS93 indicados. Se prepararon los extractos proteínicos y los niveles de expresión de las diversas versiones de ScHal3 se examinaron mediante ensayos de inmunodetección igual que en la Figura 15.

Las células de *S. cerevisiae* transformadas con los plásmidos pWS93 se sometieron a ensayos de crecimiento en medio sólido (Figura 22). Como controles se utilizaron células de la cepa BY4741 transformada con el plásmido pWS93 vacío (∅, control negativo) y con el plásmido pWS93-ScHal3 (control positivo). Las células transformadas con las versiones de ScHal3 no mostraron ninguna diferencia de crecimiento respecto a las transformadas con la versión nativa en las placas que contenían LiCl. Cuando se suplementó las placas con cafeína la versión mutada en la leucina 403 presentó una pérdida de crecimiento indistinguible de la versión nativa. Sin embargo, tanto la versión que contiene la mutación L405E como el doble mutante exhibieron un mayor crecimiento que la versión nativa, similar al crecimiento del control negativo. Estos resultados indican que la mutación L405E afecta específicamente ciertas funciones de la proteína y que, debido a que el efecto de ScHal3 sobre la tolerancia a cafeína y Li<sup>+</sup> está

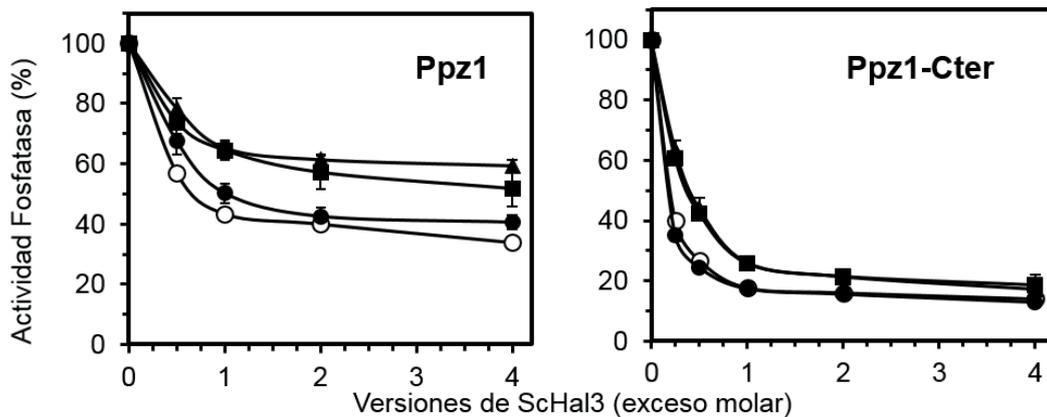
relacionado con la inhibición de Ppz1, debe conllevar una pérdida en la capacidad de ScHal3 de regular a la fosfatasa.



**Figura 22. Caracterización funcional de las versiones mutadas de ScHal3.** La cepa BY4741 y su derivada *hal3Δ* se transformaron con los vectores pWS93 indicados y se realizaron ensayos de crecimiento en medio sólido en placas SC-URA, que contenían las concentraciones indicadas de cafeína o LiCl. Fotografías tomadas 48 h tras la siembra.

### 6.2.3. Caracterización *in vitro* de las versiones de ScHal3

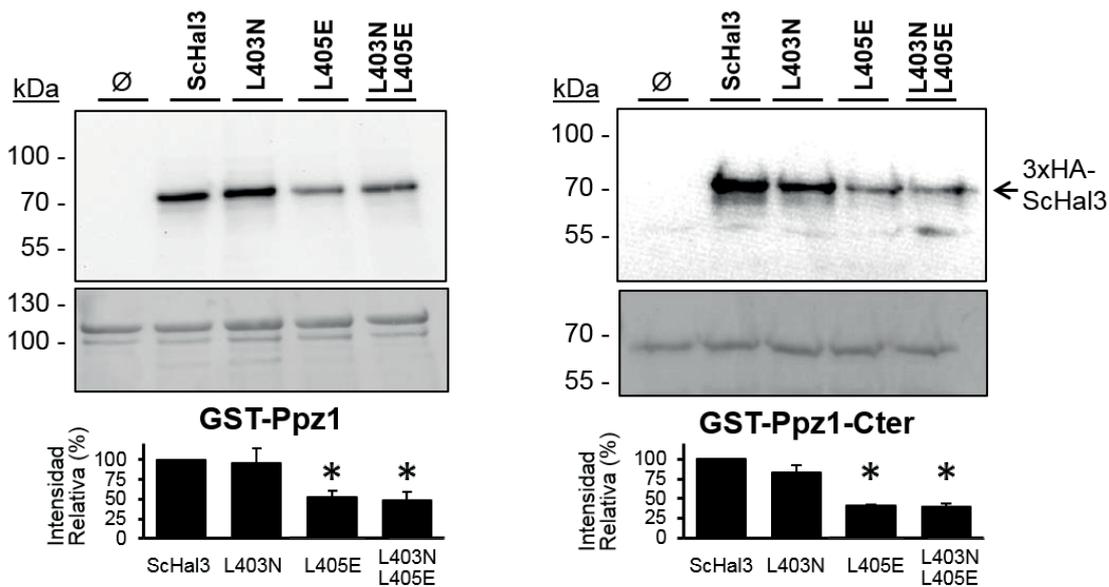
La diferencia en los fenotipos observada en el apartado anterior podía ser debido a una pérdida de la capacidad inhibitoria de la fosfatasa o a una menor capacidad de interacción. Para discernir entre estas dos posibilidades se expresaron de manera recombinante en *E. coli* las tres versiones mutadas de ScHal3, así como la fosfatasa Ppz1 y su dominio catalítico (Ppz1-C<sub>ter</sub>), a las cuales se eliminó el dominio GST. En primer lugar, se realizaron ensayos de inhibición de la fosfatasa y de su dominio catalítico (Ppz1-C<sub>ter</sub>). Como se muestra en la Figura 23, la mutación L403N no tuvo ningún efecto en la capacidad de inhibición sobre la fosfatasa completa o sobre el dominio catalítico, mientras que las versiones que presentan la mutación L405E mostraron una menor capacidad inhibitoria, siendo más acentuada en los ensayos realizados con la versión completa de Ppz1.



**Figura 23. Ensayos de la capacidad inhibitoria de las versiones de ScHal3.** Se incubaron 10 pmoles de la fosfatasa Ppz1 o de su dominio catalítico (Ppz1-C<sub>ter</sub>) con cantidades crecientes de ScHal3 nativo (o), o sus versiones (●, L403N; ■, L405E; ▲, L403N L405E). Los datos se representan como porcentaje de la actividad de las preparaciones enzimáticas sin inhibidor y corresponden a la media ± ESM de 4 a 8 experimentos independientes.

## RESULTADOS

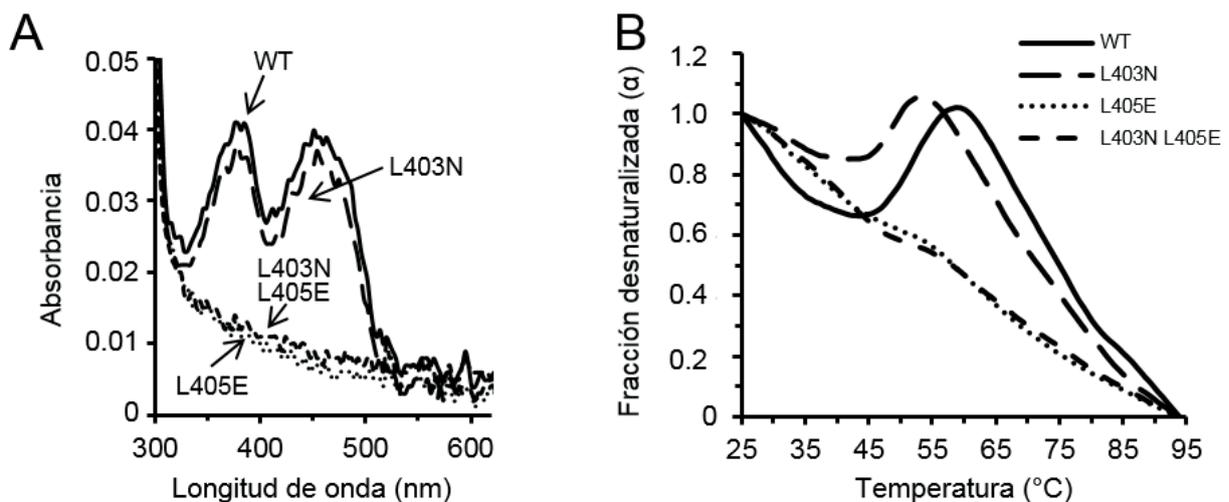
Dado que la pérdida de la capacidad inhibitoria de las versiones mutadas en el residuo L405 podía ser resultado de una pérdida de la capacidad de unión, decidimos realizar ensayos de interacción entre las diferentes versiones de ScHal3 y la fosfatasa Ppz1. En estos ensayos se utilizó como cebo la fosfatasa Ppz1 o su dominio catalítico (Ppz1-C<sub>ter</sub>) fusionadas a GST y unidas a resina de glutatión-sefarosa tal y como se describe en el apartado 4.12.2. de Materiales y Métodos. La proteína ScHal3 nativa y sus versiones, portando una etiqueta 3xHA, fueron expresadas en la cepa de levadura IM021 (*ppz1Δ hal3Δ*). Como se muestra en la Figura 24 (panel izquierdo), la mutación del L403N apenas afectó a la interacción con la fosfatasa. Sin embargo, la versión L405E y el doble mutante (L403N L405E) mostraron una pérdida considerable de interacción, de alrededor de un 50% respecto a la versión nativa (Figura 24, panel inferior izquierdo). Esta pérdida de interacción se vio acrecentada cuando se utilizó como cebo el dominio catalítico de Ppz1 (Ppz1-C<sub>ter</sub>) (Figura 24, panel derecho). Estos resultados muestran que la pérdida de capacidad inhibitoria de las versiones que contienen la mutación L405E puede ser debida a una menor capacidad de interacción con la fosfatasa Ppz1.



**Figura 24. Ensayos de interacción de las versiones de ScHal3.** Se utilizaron 4  $\mu$ g de fosfatasas fusionadas a GST inmovilizadas en resina de glutatión-sefarosa como cebo de las diferentes versiones de ScHal3 (*pWS93*) expresadas en la cepa IM021 (*ppz1Δ hal3Δ*);  $\emptyset$ , plásmido vacío. Tras el lavado de la resina, las muestras se resolvieron por SDS-PAGE (geles al 10%). Las versiones de ScHal3 marcadas con una etiqueta 3xHA se detectaron por inmunoblot (panel superior). La membrana se tiñó con rojo Ponceau para evaluar la carga de la fosfatasa fusionada a GST (panel medio). Los histogramas (panel inferior) muestran el cociente de las cantidades relativas de ScHal3 obtenidas frente a la cantidad de GST-Ppz1 recuperada, calculado a partir de la integración de la señal de quimioluminiscencia de las versiones ScHal3 y la integración de las bandas correspondientes a GST-Ppz1 o GST-Ppz1-C<sub>ter</sub>. Se presentan datos de 3 experimentos independientes que se muestran como media  $\pm$  desviación estándar. \*,  $p < 0,05$  determinado por prueba t de Student de dos colas.

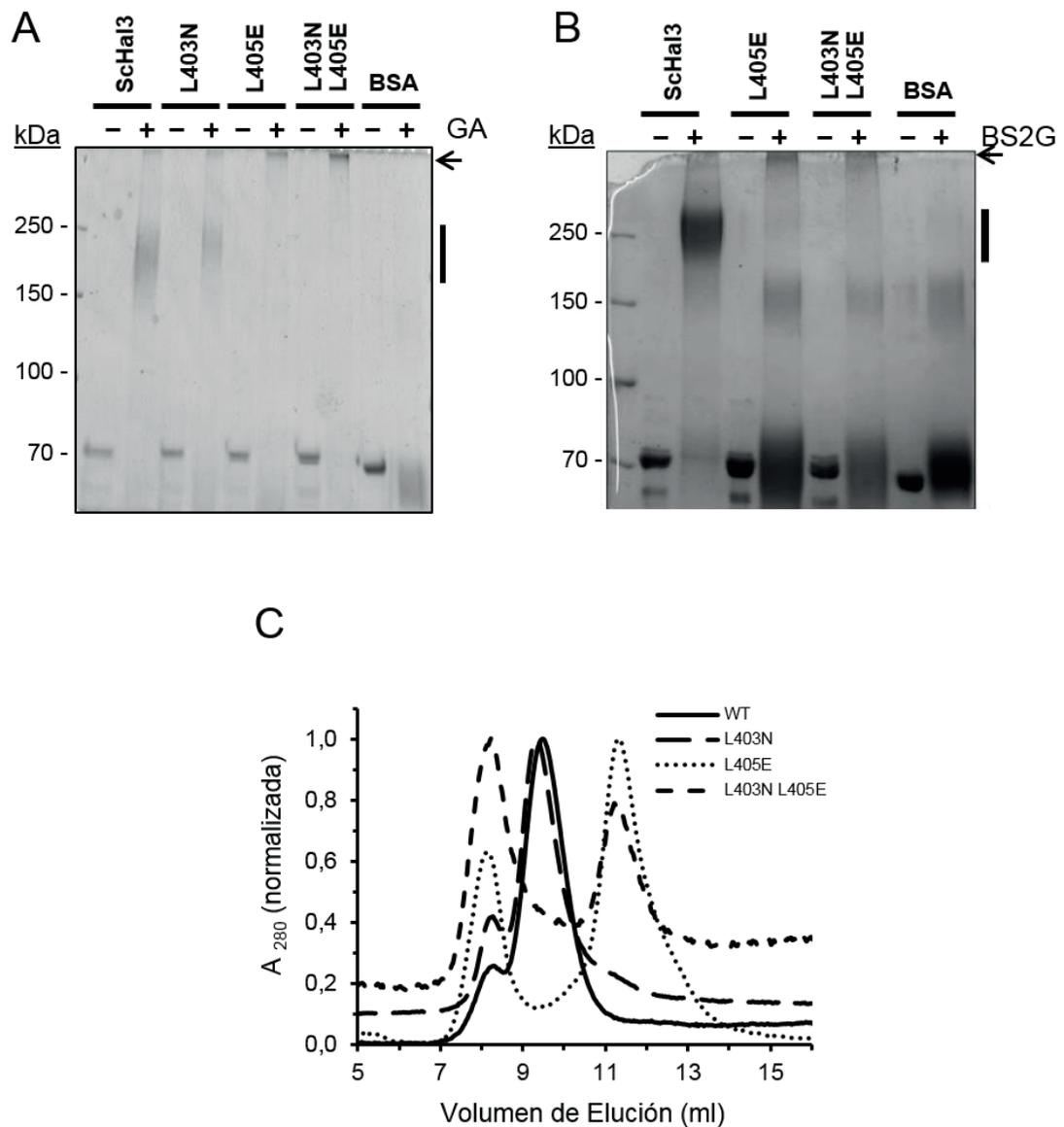
### 6.2.4. Estudio de la función PPCDC de las versiones mutadas de ScHal3

Un hecho que nos llamó la atención cuando estábamos caracterizando estas versiones de ScHal3 como inhibidores de Ppz1 fue que al purificar ScHal3 recombinante y sus variantes, la versión nativa y la que presentaba la mutación L403N eran amarillas y, por el contrario, las dos versiones que presentaban la mutación L405E no lo eran. El color amarillento se debe a la presencia del cofactor FMN, por lo que su ausencia sugería que dichas versiones podían no contener este cofactor. Como se ha explicado anteriormente, la presencia de FMN es esencial para la función PPCDC, por lo que decidimos verificar la presencia o ausencia del cofactor en las citadas variantes, del mismo modo que en la Figura 18A. Como se muestra en la Figura 25A, las versiones que contienen la mutación L405E no presentaron los picos de absorción típicos de la flavina, indicando que esta molécula no estaba presente en las muestras. Esta ausencia podría deberse a cambios estructurales inducidos por la mutación L405E, que a su vez podrían verse reflejados en la capacidad de trimerización. Consideramos también que dichos cambios podían afectar a la estabilidad de la proteína, por lo que decidimos realizar un ensayo de desnaturalización de las versiones de ScHal3, mediante la misma técnica que en la figura 18B. La versión L403N presentaba una curva de desnaturalización similar a la de la proteína nativa, disminuyendo su fluorescencia entre los 25 y 45 °C, mostrando una recuperación entre los 55-60 °C y una caída marcada a partir de los 65 °C (Figura 25B). Sin embargo, las curvas de las versiones que incluyen la mutación L405E difirieron de la versión nativa: su fluorescencia cayó de manera continua desde el inicio del ensayo. Estos resultados indican que estas versiones son menos estables que la versión nativa o que la que contiene la mutación en el residuo L403.



**Figura 25. Rastreo espectrofotométrico y estudio de la estabilidad de las versiones de ScHal3.** A) Espectro UV-Visible de las preparaciones indicadas de ScHal3, mostrando los dos picos característicos de la molécula de FMN oxidada (382 y 452 nm). WT indica la versión nativa de ScHal3. B) Análisis de la estabilidad estructural dependiente de temperatura de las versiones de ScHal3. Ensayo realizado como en la figura 18B.

Por último, evaluamos la capacidad de trimerizar de las diferentes versiones de ScHal3. Las versiones recombinantes de ScHal3 se entrecruzaron con glutaraldehído, de manera similar a lo que se hizo para las variantes de AtHal3 (Figura 17). En estos ensayos se observó que la mutación L403N no alteró la capacidad de la proteína para formar trímeros. En cambio, las dos versiones que contienen la mutación L405E no formaron trímeros, si no que el entrecruzamiento provocó la formación de complejos de muy alta masa molecular, que no fueron capaces de penetrar en el gel de poliacrilamida (Figura 26A). Cuando se utilizó BS2G para el entrecruzamiento (Figura 26B), las versiones mutadas en el residuo leucina 405 presentaron también estructuras de muy alto peso molecular que, al igual que en el ensayo realizado con glutaraldehído no pudieron penetrar en el gel, si bien una fracción de las muestras permaneció en forma monomérica. Apareció también una banda difusa alrededor de 150 kDa que era inespecífica, ya que se observó también en el carril correspondiente a la BSA, que se utilizó como control negativo. Por último, para confirmar la capacidad de trimerización de estas versiones, muestras de proteína ScHal3 nativo recombinante y sus versiones se sometieron a una cromatografía de exclusión por tamaño. Como se muestra en la Figura 26C, la versión nativa y la mutada en la leucina L403N eluyeron en la misma fracción. Las versiones mutadas en la leucina 405 eluyeron en dos fracciones, ambas diferentes de la fracción en la que eluyó la versión nativa, una asimilable a la forma monomérica (aunque esta fracción corresponde a un tamaño algo mayor que el esperado de un monómero, quizás debido a la estructura desordenada de los dominios N-terminal y C-terminal) y otra cercana al  $V_0$ , compatible con especies de muy alto peso molecular, que podría corresponder a las especies que son incapaces de penetrar en el gel de poliacrilamida.



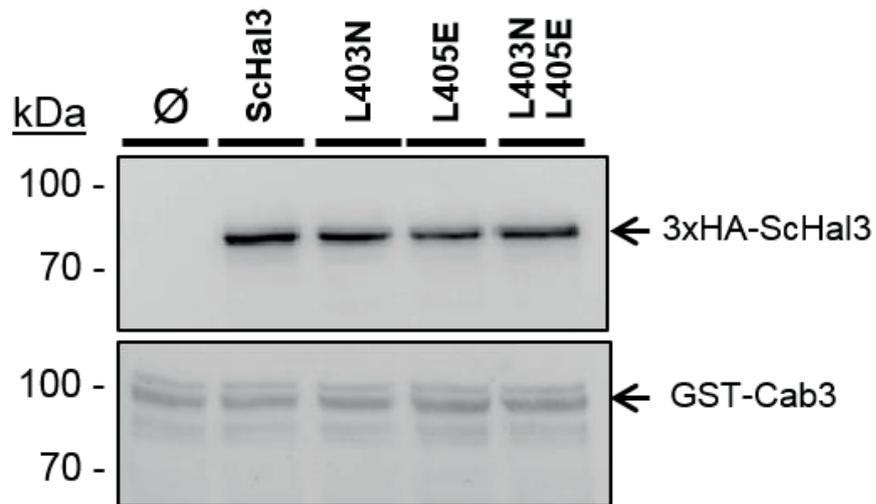
**Figura 26. Capacidad de trimerización de las versiones de ScHal3.** A) y B) Entrecruzamiento in vitro de las versiones de ScHal3. Las muestras se trataron como se describe en el apartado 4.12.1. de Materiales y Métodos. Se indica con (+) en la parte superior de los geles las muestras tratadas con glutaraldehído (GA; 2  $\mu$ g de proteína) o BS2G (20  $\mu$ g de proteína). Tras el tratamiento se resolvieron las muestras mediante SDS-PAGE (gel de poliacrilamida al 6%). Se visualizaron las muestras utilizando una tinción con azul de Coomassie. Las flechas indican la aparición de unas bandas de muy alto peso molecular. Las barras verticales indican la región del gel correspondiente a 190 kDa (tamaño predicho para el homotrímero). C) Las muestras indicadas se sometieron a una cromatografía de exclusión por tamaño. La  $A_{280}$  fue monitorizada y se normalizó para el valor más alto en cada muestra (tomado como unidad) debido a la diferencia de concentración.

Estos resultados encajan con los obtenidos en los ensayos de entrecruzamiento químico, indicando que la mutación L405E provoca la pérdida de la capacidad de formar trímeros y de retener la molécula de FMN, pudiendo comprometer su capacidad de formar complejos PPCDC funcionales. Esta capacidad se estudió transformando la cepa de levadura AGS4 (*HAL3 / hal3Δ VHS3 / vhs3Δ*) con los plásmidos pWS93 que expresan las versiones de ScHal3. Se indujo la esporulación de los transformantes y se analizaron de 18 a 35 tétradas para determinar si estas versiones de ScHal3 eran capaces de rescatar el fenotipo sintético letal provocado por la doble mutación *hal3Δ vhs3Δ* (Tabla 4). Sorprendentemente, recuperamos esporas con este genotipo que contenían las diversas versiones mutadas de ScHal3, incluidas aquellas que portaban la mutación L405E, lo que sugiere que todas las versiones de ScHal3 son capaces de formar complejos PPCDC funcionales.

**Tabla 4. Análisis de tétradas de la cepa AGS4.** La cepa AGS4 (*HAL3 / hal3Δ VHS3 / vhs3Δ*) fue transformada con los plásmidos pWS93 que contenían las diferentes versiones de ScHal3 indicados en la primera columna. Los transformantes se sometieron a esporulación y se diseccionaron las tétradas resultantes. Para identificar el genotipo, tras el crecimiento de las esporas, se realizaron réplicas en placas como las descritas en la Tabla 3.

pWS93-	n.º de Tétradas	Complementación
∅	12	NO
ScHal3	35	SÍ
ScHal3 L405E	39	SÍ
ScHal3 L403G L405E	21	SÍ
ScHal3 L403N L405E	18	SÍ

Tras observar la funcionalidad de todas las versiones de ScHal3 quisimos verificar que éstas mantenían su capacidad de interacción con ScCab3. Con este objetivo expresamos de manera recombinante ScCab3 en *E. coli* como una proteína fusión con GST y la recuperamos mediante una purificación por afinidad con resina de glutatión-sefarosa. Como se muestra en la Figura 27 todas las versiones fueron retenidas por la proteína fusión GST-ScCab3 de una manera similar. Este resultado respalda los datos obtenidos en el análisis de tétradas en cuanto a que estas versiones de ScHal3 no tienen afectada la capacidad de formar heterotrímeros funcionales con ScCab3.



**Figura 27. Ensayos de interacción de las versiones de ScHal3 con GST-ScCab3.** Se utilizaron 10  $\mu$ g de ScCab3 fusionado a GST e inmovilizado en resina de glutatión-sefarosa como cebo para las diferentes versiones de ScHal3 (pWS93) expresadas en la cepa IM021 (*ppz1 $\Delta$  hal3 $\Delta$* ). Tras el lavado de la resina, las muestras se resolvieron por SDS-PAGE (geles al 8%). Las versiones de ScHal3 marcadas con una etiqueta 3xHA se detectaron por inmunodetección (panel superior);  $\emptyset$ , plásmido vacío. La membrana se tiñó con rojo Ponceau para evaluar la carga de Cab3 fusionado a GST (panel inferior).

### 6.3. Mapeo funcional de la región N-terminal de ScHal3

Como se ha explicado en el apartado 3.6.1. de la Introducción, la extensión N-terminal de ScHal3 es necesaria para una completa regulación de Ppz1 (Abrie *et al*, 2012), por lo que esta región podría contener determinantes estructurales claves para la interacción y/o inhibición de la fosfatasa. Con la finalidad de identificar las regiones que pudieran ser relevantes para la regulación de Ppz1, realizamos un mapeo funcional de la región N-terminal de ScHal3. Para ello nos basamos en dos diferentes tipos de información. En primer lugar, en datos obtenidos a partir de los ya mencionados ensayos de entrecruzamientos (*cross-linking*) *in vitro* entre las proteínas ScHal3 y Ppz1-C<sub>ter</sub> recombinantes (Casamayor *et al*, 2022). Como hemos comentado en el capítulo 1, estos datos mostraban que, cuando ocurría la interacción entre Ppz1-C<sub>ter</sub> y ScHal3 recombinantes, varios residuos de lisina del dominio N-terminal de ScHal3, incluyendo la Lys90, estaban físicamente cercanos a residuos de lisina del dominio catalítico de Ppz1 (Ppz1-C<sub>ter</sub>) (Figura 28). Asimismo, observamos, mediante alineamientos, que la región 67-110 de ScHal3 estaba conservada en proteínas homólogas a Hal3, dotadas de extensión N-terminal y que correspondían a determinados grupos de hongos.

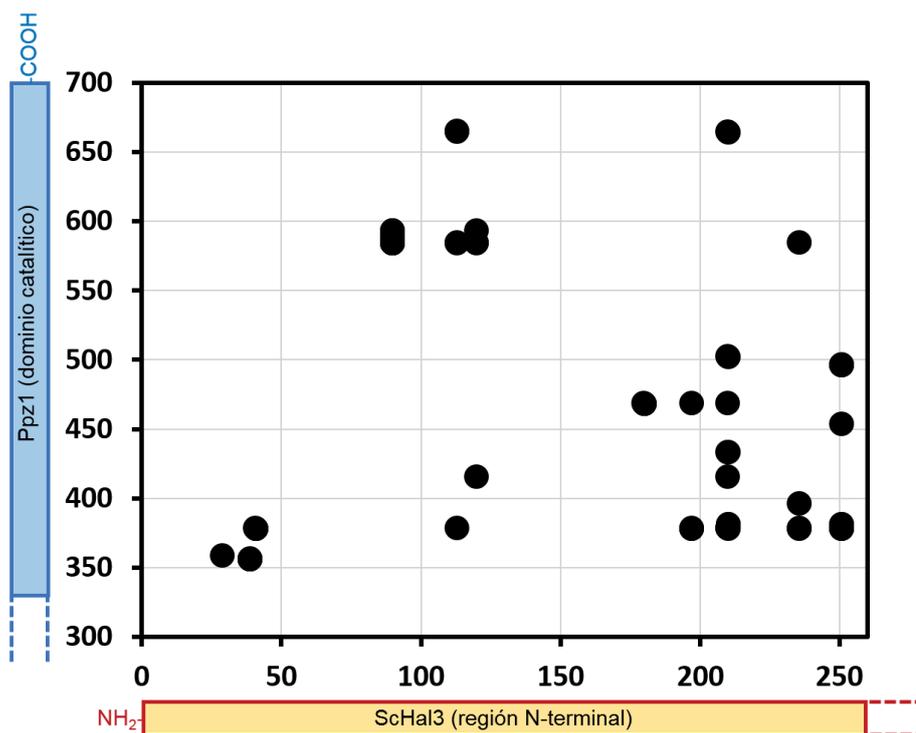
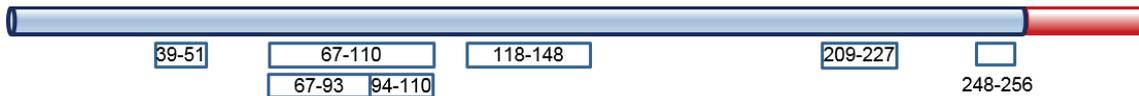


Figura 28. Mapa bidimensional de las interacciones físicas entre Ppz1-C<sub>ter</sub> y ScHal3. Cada círculo representa residuos de lisina espacialmente cercanos en los ensayos de entrecruzamiento químico (Casamayor *et al*, 2022).

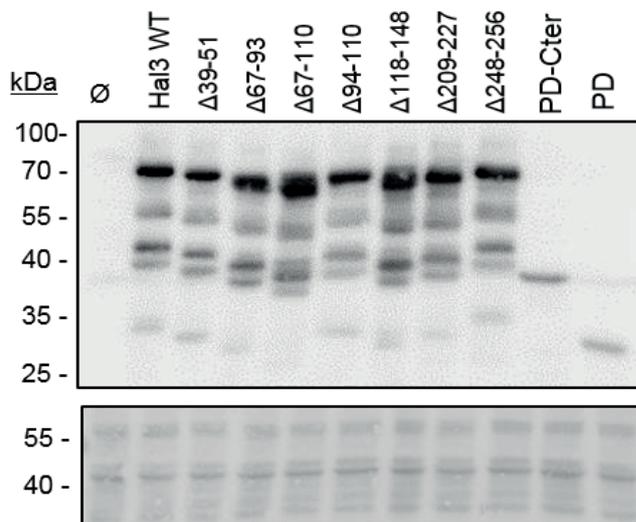
### 6.3.1. Estudio de diferentes deleciones en la región N-terminal de ScHal3

Tras analizar la información obtenida se decidió estudiar el papel de cinco regiones específicas, comprendidas entre los aminoácidos 20-51, 67-110, 118-148, 209-227 y 248-256. Para ello se construyeron versiones de ScHal3 portadoras de estas deleciones y, además, se realizaron dos deleciones adicionales dentro de la relativamente extensa región 67-110 (67-93 y 94-110) (Figura 29).



**Figura 29. Esquema de las regiones delecionadas en la extensión N-terminal de ScHal3.** Se representa la región N-terminal de ScHal3 y en la parte inferior se muestran las regiones seleccionadas para su deleción. Los números indican el primer y último residuo eliminado.

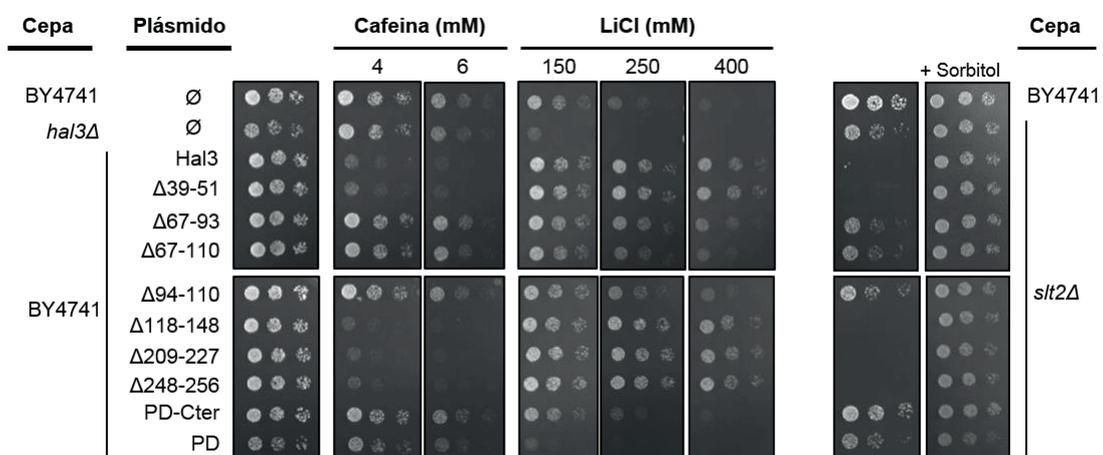
Estas versiones de ScHal3 fueron clonadas en el plásmido multicopia pWS93 y se introdujeron en diversas cepas de levadura para evaluar, mediante análisis fenotípicos, la capacidad de cada versión de inhibir la fosfatasa Ppz1. A modo de comparación, incluimos en estos estudios construcciones ya caracterizadas (Abrie *et al*, 2012), que expresaban versiones de ScHal3 sin la región N-terminal (PD-C<sub>ter</sub>) o sin la extensión N-terminal ni la cola ácida (PD). Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que las versiones PD-C<sub>ter</sub> y PD de ScHal3 se expresaban a niveles inferiores que la versión nativa, por lo que no podíamos descartar que las versiones con deleciones parciales del dominio N-terminal presentaran el mismo problema de expresión. En consecuencia, se procedió a estudiar los niveles de expresión de cada versión mutada de ScHal3. Se prepararon extractos proteínicos y los experimentos de inmunodetección mostraron que todas las versiones con deleciones parciales del dominio N-terminal presentaban unos niveles de expresión similares a los de la proteína nativa, a diferencia de las versiones PD-C<sub>ter</sub> y PD, en las que se confirmó una menor expresión (Figura 30).



**Figura 30. Cuantificación mediante inmunodetección de las versiones delecionadas de ScHal3.** La cepa BY4741 se transformó con los plásmidos pWS93 indicados. Se prepararon los extractos proteínicos y los niveles de expresión de las diversas versiones de ScHal3 se examinaron mediante ensayos de inmunodetección igual que en la Figura 15.

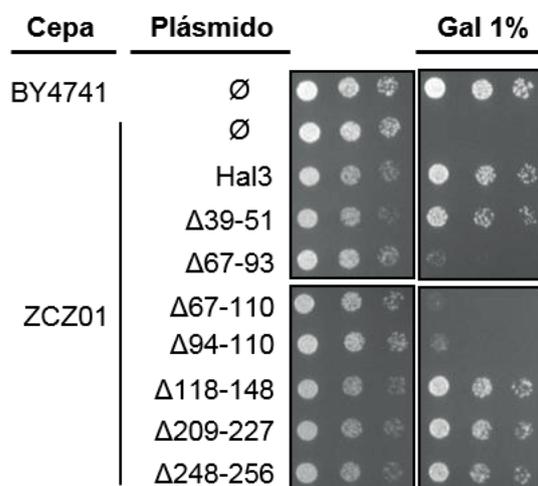
A continuación, se realizaron ensayos de crecimiento en medio sólido para analizar la capacidad de las versiones ScHal3 como inhibidoras de la fosfatasa Ppz1. Como se ha descrito en la Introducción (apartado 3.4.) y se muestra en la Figura 22, la sobreexpresión del ScHal3 nativo confiere una menor tolerancia a cafeína, e incrementa la tolerancia a cationes tóxicos como es el caso del litio. En los ensayos de crecimiento en medio sólido se puede observar que varias de las versiones mutadas presentan fenotipos similares a la sobreexpresión del ScHal3 nativo (Figura 31). Por el contrario, las versiones deletionadas en la región 67-110 y las dos versiones carentes de la extensión N-terminal no alteran la tolerancia a cafeína y no incrementan la tolerancia a cationes de litio. Estos fenotipos son compatibles con una pérdida de la capacidad reguladora de Ppz1. Cuando se verificó el efecto de la sobreexpresión de las variantes de ScHal3 en una cepa *slt2Δ*, en la que ScHal3 nativo induce un fenotipo lítico, se observó que las células transformadas con los plásmidos que contenían las versiones deletionadas en la región 67-110, así como las que carecían por entero de la región N-terminal crecían perfectamente en ausencia de soporte osmótico (Figura 31, panel derecho). Este resultado es congruente con una pérdida de la capacidad reguladora sobre Ppz1.

Debido a que todos los fenotipos probados están relacionados con el papel de ScHal3 como regulador de Ppz1, estos resultados indicaban que la región 67-110 debía contener determinantes claves para la regulación de Ppz1. Sin embargo, por lo que se refiere a las versiones PD-C<sub>ter</sub> y PD, su menor expresión nos impedían sacar conclusiones relevantes a partir de los ensayos fenotípicos realizados.



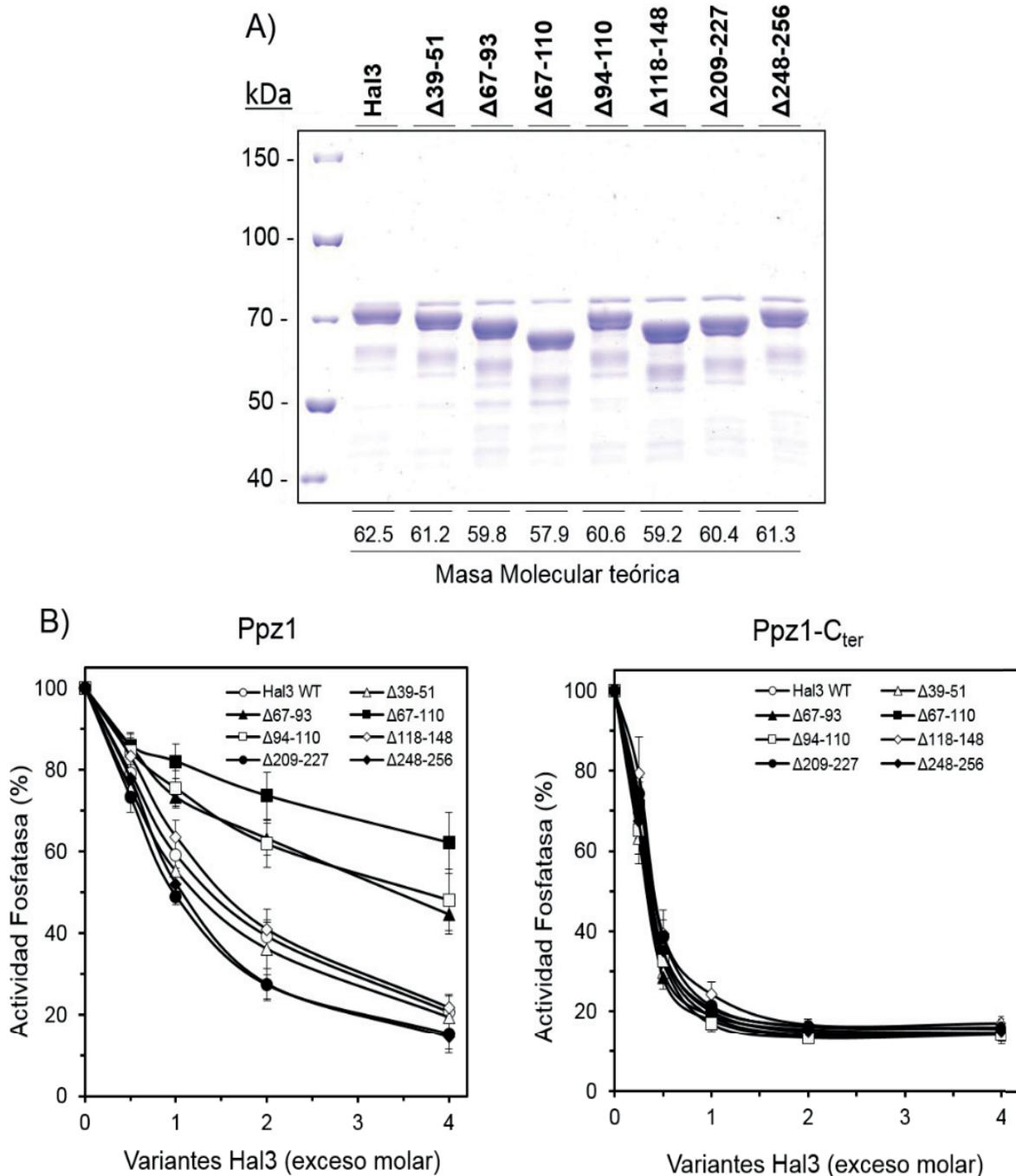
**Figura 31. Efectos sobre la tolerancia a litio y cafeína de diversas deletiones en la extensión N-terminal de ScHal3.** La cepa BY4741 y sus versiones mutantes *hal3Δ* y *slt2Δ* se transformaron con el plásmido pWS93 vacío ( $\emptyset$ ) o portando el gen ScHAL3 y sus versiones deletionadas. Los cultivos se depositaron en placas SC-URA con diferentes concentraciones de cafeína o LiCl, como se describe en Materiales y Métodos (apartado 4.4.1). En los ensayos realizados en la cepa mutante *slt2Δ* se añadió un 10% de sorbitol, que actúa como soporte osmótico, para el control positivo de crecimiento. Fotografías tomadas 3 días después de la siembra.

Por otra parte, la sobreexpresión de Ppz1 causa un bloqueo del crecimiento de las células de *S. cerevisiae*, y este efecto es revertido cuando se sobreexpresa ScHal3. Aprovechamos esta capacidad para comprobar si las versiones deletionadas de ScHal3 eran capaces de mimetizar el efecto de ScHal3 nativo. Se realizaron ensayos de crecimiento en medio sólido utilizando la cepa ZCZ01 (que expresa Ppz1 bajo el promotor fuerte inducible *GAL1-10*), la cual es incapaz de crecer cuando se induce la expresión de Ppz1 mediante la adición de galactosa en el medio de cultivo. En estas condiciones, las células transformadas con el plásmido que contiene ScHal3 nativo son capaces de restablecer su crecimiento. Este efecto beneficioso es reproducido por todas las versiones mutadas de ScHal3, a excepción de las versiones que presentan una delección comprendida entre los residuos 67-110 (Figura 32).



**Figura 32. Efecto de la sobreexpresión de ScHal3 y sus versiones en la cepa ZCZ01.** La cepa ZCZ01 se transformó con los plásmidos pWS93 indicados y se sembraron diluciones seriadas en placas de medio sintético carente de uracilo y sustituyendo la glucosa por rafinosa (2%) como se describe en el apartado 4.1. de Materiales y Métodos. Se indujo la sobreexpresión de Ppz1 suplementando el medio con galactosa (1%).

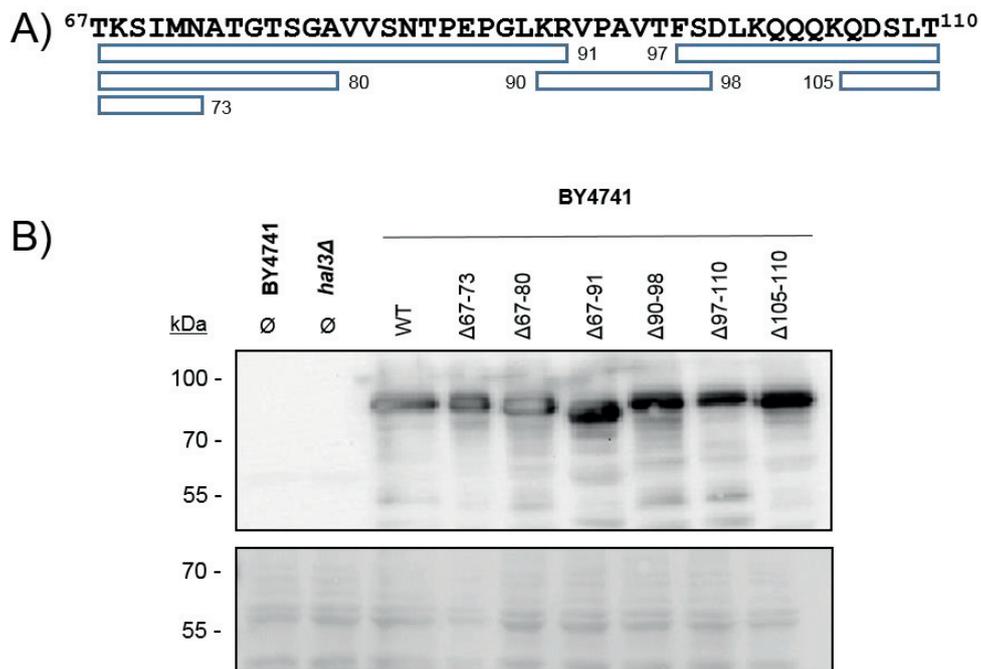
La capacidad inhibitoria sobre la fosfatasa Ppz1 de las versiones de ScHal3 deletionadas fue verificada mediante ensayos de inhibición *in vitro*. Para ello las siete versiones de ScHal3, así como la fosfatasa Ppz1 y su dominio catalítico, se expresaron en *E. coli* como proteínas de fusión unidas a GST (Figura 33A) y se realizaron los ensayos una vez eliminados las regiones GST. Como se observa en la Figura 33B (panel izquierdo) la incubación de la fosfatasa con ScHal3, a una relación estequiométrica de 1 a 4, consigue reducir la actividad fosfatasa hasta un 20% de la medida en ausencia del inhibidor. Las versiones  $\Delta 67-93$  y  $\Delta 94-110$  reducen la actividad hasta un 50% aproximadamente, y la versión  $\Delta 67-110$ , en las mismas condiciones, sólo consigue reducir la actividad Ppz1 en un 30% aproximadamente. Las versiones  $\Delta 39-51$  y  $\Delta 118-148$ , por el contrario, presentaban una capacidad inhibitoria similar a la versión nativa, y las versiones con delecciones más cercanas al dominio PD ( $\Delta 209-227$  y  $\Delta 248-256$ ) eran incluso ligeramente más efectivas que la versión nativa. Se realizaron también ensayos para comprobar la capacidad inhibitoria de estas variantes sobre la actividad que presenta el dominio catalítico de Ppz1 (Ppz1-C<sub>ter</sub>). Sorprendentemente, en este caso todas las versiones de ScHal3 presentaban una capacidad inhibitoria igual a la de la versión nativa de ScHal3.



**Figura 33. Ensayos de inhibición por ScHal3 y sus variantes por delección de la actividad fosfatasa Ppz1.**  
 A) Análisis por SDS-PAGE (8%) seguida por tinción con azul de *Coomassie* de la proteína ScHal3 nativa recombinante y sus versiones delecionadas expresadas en *E. coli* tras la eliminación del dominio GST. Las masas moleculares teóricas se indican en la parte inferior del gel. B) Capacidad inhibitoria de las diferentes versiones de ScHal3 sobre la fosfatasa Ppz1 (panel izquierdo) o Ppz1-C<sub>ter</sub> (panel derecho). La actividad fosfatasa se midió como se describe en el apartado 4.11. de Materiales y Métodos, utilizando de 2 a 10 pmoles de Ppz1 o 5 pmoles del dominio catalítico de Ppz1. Los valores representados en la gráfica son medias  $\pm$  ESM de 4 a 7 ensayos, representándose como porcentaje de actividad fosfatasa respecto al control sin inhibidor. Para estos ensayos se usaron al menos dos preparaciones diferentes de las fosfatasas e inhibidores.

### 6.3.2. Mapeo de la región 67-110 de ScHal3

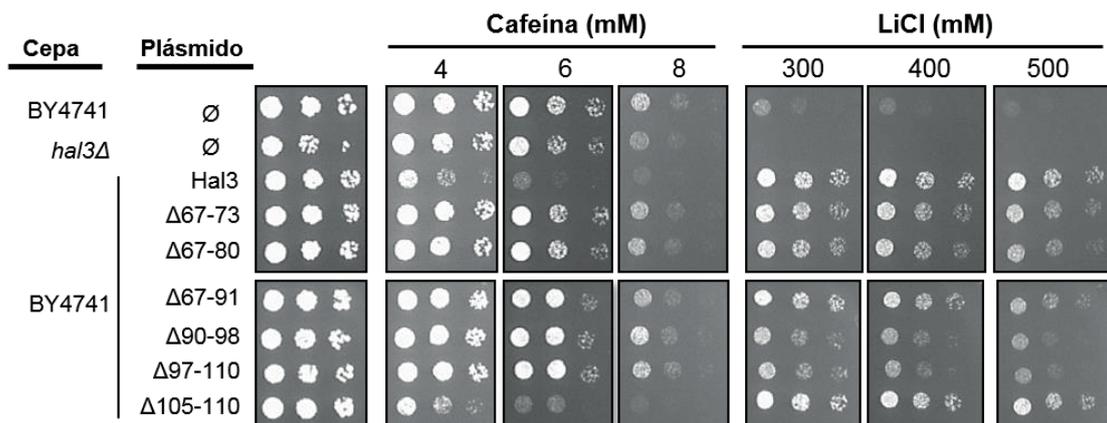
Los resultados del apartado anterior mostraron que la región 67-110 de ScHal3 juega un papel relevante en la función reguladora de Ppz1. Para tratar de identificar los determinantes funcionales presentes en esta región, se generaron seis deleciones adicionales entre los residuos 67 y 110 ( $\Delta 67-73$ ,  $\Delta 67-80$ ,  $\Delta 67-91$ ,  $\Delta 90-98$ ,  $\Delta 97-110$  y  $\Delta 105-110$ ) (Figura 34A). Se comprobó que el nivel de expresión de estas versiones era similar a la versión nativa mediante un ensayo de inmunodetección antes de realizar los ensayos fenotípicos (Figura 34B).



**Figura 34. Expresión en *S. cerevisiae* de versiones de ScHal3 con diversas deleciones en la región 67-110.** A) Esquema de los fragmentos delecionados de la región 67-110 de ScHal3. B) Ensayo de inmunodetección. Las cepas se transformaron con los plásmidos pWS93 indicados. Se prepararon los extractos proteínicos y los niveles de expresión de las diversas versiones de ScHal3 se examinaron mediante ensayos de inmunodetección igual que en la Figura 15.

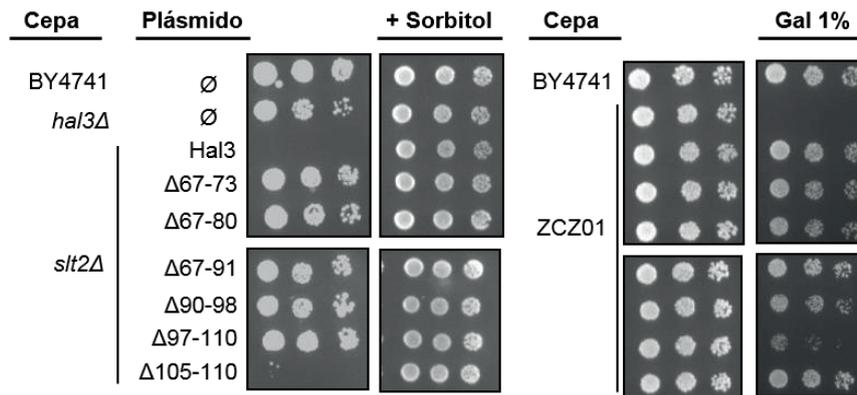
## RESULTADOS

Estas versiones fueron sometidas a los mismos ensayos que las deleciones del apartado anterior. En los ensayos de crecimiento en medio sólido solamente la deleción  $\Delta 105-110$  se comportó como un ScHal3 nativo cuando se suplementó el medio con cafeína o LiCl (Figura 35). El resto de las deleciones mostraron una pérdida de capacidad inhibitoria de Ppz1 en el ensayo de cafeína. Sin embargo, solo las variantes con las deleciones  $\Delta 90-98$  y  $\Delta 97-110$  fueron claramente incapaces de conferir un nivel de hipertolerancia a cationes de litio similar al de la versión de ScHal3 nativa, mientras que el efecto de las deleciones  $\Delta 67-73$ ,  $\Delta 67-80$  y  $\Delta 67-91$  fue más limitado.



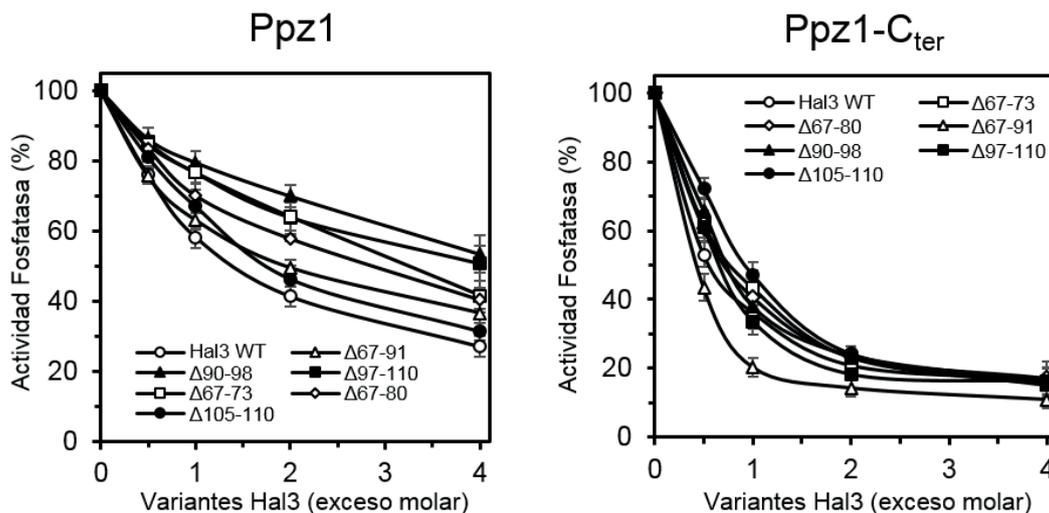
**Figura 35. Mapeo funcional de la región 67-110 de ScHal3 para los fenotipos de tolerancia a cafeína y litio.** Las cepas indicadas que contenían las diferentes construcciones fueron analizadas como en la Figura 31.

Células de la cepa mutante *slt2Δ* se transformaron con los plásmidos pWS93 que contenían estas mismas deleciones y se evaluó la capacidad de los transformantes para crecer sin soporte osmótico (Figura 36, panel izquierdo). Se observó de nuevo que todas las variantes, a excepción de la versión  $\Delta 105-110$ , eran incapaces de mimetizar el efecto de la versión nativa, permitiendo un crecimiento de las células cuando no se suplementaba el medio con sorbitol. Este patrón, similar al observado en los ensayos con cafeína, sugiere que en la región comprendida entre los residuos 67-105 residen elementos estructurales importantes para la regulación de la fosfatasa Ppz1. Sorprendentemente, cuando se realizó el ensayo fenotípico de estas versiones en la cepa ZCZ01, solamente la versión  $\Delta 97-110$  fue claramente incapaz de atenuar la toxicidad derivada de la sobreexpresión de Ppz1, mientras que la versión  $\Delta 90-98$  presentó, quizás, un crecimiento ligeramente menor que la versión nativa (Figura 36, panel derecho). Se comprobó que esta incapacidad para atenuar la toxicidad de la sobreexpresión de Ppz1 no era debido a una expresión deficiente de las versiones de ScHal3 en la cepa ZCZ01 (Figura A1)



**Figura 36. Análisis fenotípico de las versiones delecionadas de ScHal3 en la región 67-110.** Las cepas indicadas que contenían las diferentes construcciones fueron analizadas como en las Figuras 31 y 32. Las fotografías se tomaron 3 días después de la siembra, excepto las placas que contienen la cepa *slt2Δ*, tomadas a cuatro días.

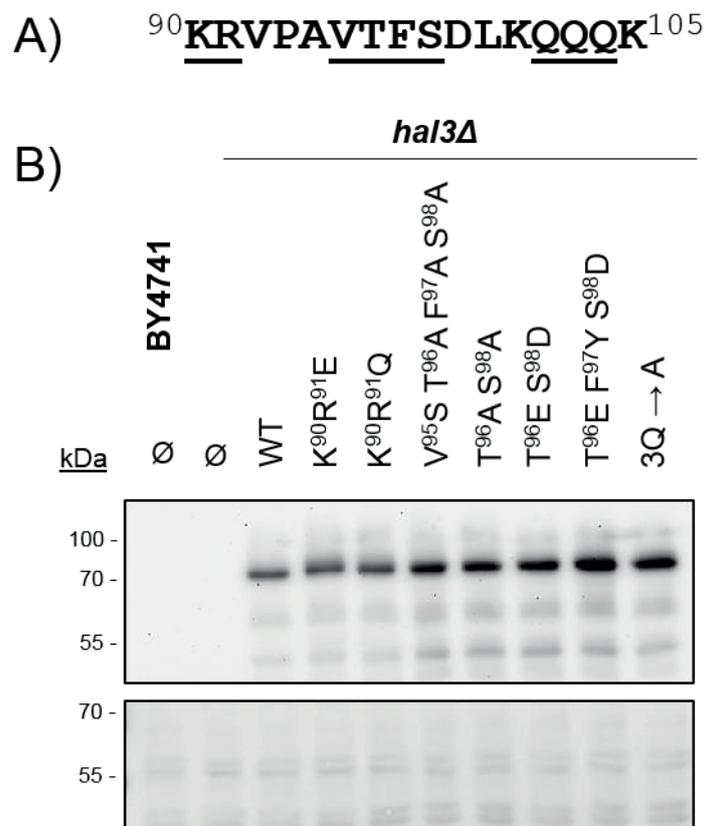
También se estudió la capacidad de estas nuevas versiones de inhibir la fosfatasa Ppz1 *in vitro*, procediendo de la misma forma que en el apartado anterior. Se puede observar que las versiones delecionadas en la región 67-91 o 105-110 tienen poco o ningún impacto en la capacidad inhibitoria sobre la fosfatasa Ppz1 (Figura 37, panel izquierdo). Por el contrario, las versiones Δ90-98 y Δ97-110 muestran una pérdida de capacidad inhibitoria. Estos resultados confirman que los determinantes estructurales relevantes en la regulación de Ppz1 están comprendidos entre los residuos 90-105 de ScHal3. Cuando se realizaron los ensayos de actividad Ppz1 utilizando el dominio catalítico de Ppz1 (Ppz1-C<sub>ter</sub>) se observó de nuevo que todas las versiones mutadas de ScHal3 mantenían la capacidad inhibitoria del ScHal3 nativo, a excepción de la versión Δ67-91, la cual daba lugar incluso a una mayor inhibición (Figura 37, panel derecho).



**Figura 37. Efecto inhibitorio sobre la actividad Ppz1 de las versiones de ScHal3 con deleciones en la región 67-110.** La capacidad inhibitoria de las diferentes versiones de ScHal3 sobre la fosfatasa Ppz1 (panel izquierdo) o Ppz1-C<sub>ter</sub> (panel derecho) se evaluó como se describe en la Figura 33. En los ensayos se emplearon al menos dos preparaciones diferentes de las fosfatasas e inhibidores.

**6.3.3. La región <sup>90</sup>KRVPAVTFS<sup>98</sup> es crucial para la regulación de la fosfatasa Ppz1**

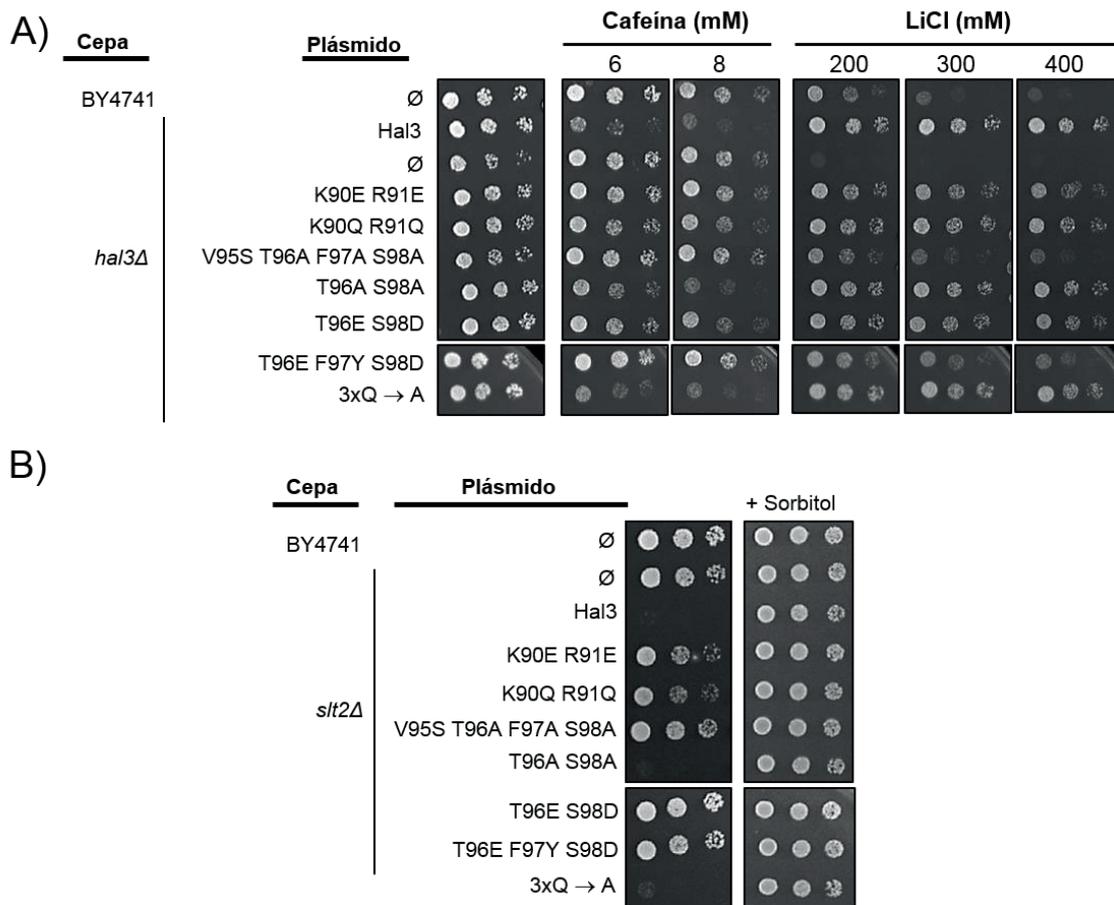
Los resultados descritos en los apartados anteriores delimitan una región concreta de ScHal3 como imprescindible para la regulación de Ppz1. El siguiente objetivo fue identificar los residuos clave en esta regulación. Para ello se construyeron diversas versiones con mutaciones por sustitución en la región 90-105 de ScHal3 (Figura 38A) y se sometieron a ensayos de inmunodetección para asegurarnos de su correcta expresión (Figura 38B).



**Figura 38. Niveles de expresión de las variantes de ScHal3 con mutaciones en residuos comprendidos en la región 90-105.** A) Secuencia de la región 90-105 de ScHal3. Los residuos mutados están subrayados. B) El ensayo de inmunodetección de las versiones mutadas en la región 90-105 de ScHal3 se realizó como en la figura 15.

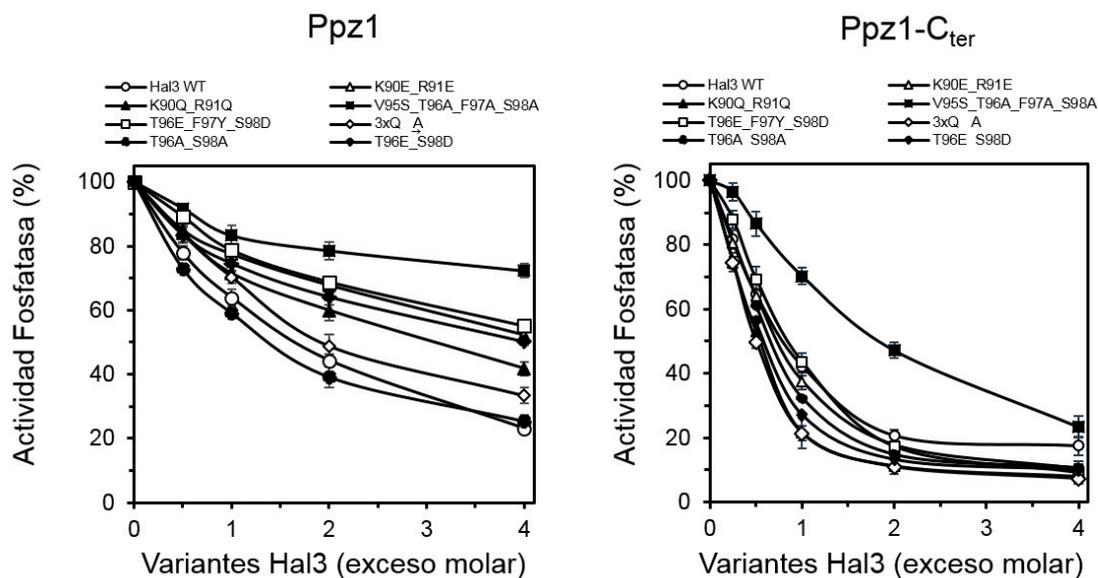
Las versiones mutadas de ScHal3 se sometieron a los mismos ensayos de crecimiento en medio sólido que se han descrito para las versiones deletionadas. Los cambios en los residuos K90 y R91, tanto a ácido glutámico como a glutamina, redujeron la capacidad para provocar sensibilidad a cafeína, pero apenas afectaron a la hipertolerancia a cationes de litio (Figuras 39A). También eliminaron el efecto deletéreo de la sobreexpresión de ScHal3 en células mutantes *slt2Δ* (Figuras 39B). La mutación a alanina (fosfoinhibitoria) de los residuos T96 y S98 no ocasionó ningún efecto diferencial. Sin embargo, las mutaciones fosfomiméticas apenas disminuyeron el crecimiento en presencia de cafeína y permitieron el crecimiento de una cepa *slt2Δ*. Las

mutaciones <sup>95</sup>VTFS<sup>98</sup> a <sup>95</sup>SAAA<sup>98</sup> y <sup>96</sup>TFS<sup>98</sup> a <sup>96</sup>EYD<sup>98</sup> fueron incapaces de reproducir el fenotipo de la versión nativa en ninguna de las pruebas empleadas. Por último, la triple mutación de los residuos de glutamina 102, 103 y 104 por alanina (3xQ→A) no confirió ninguna diferencia con la versión nativa. En los ensayos de crecimiento en medio sólido realizados con la cepa ZCZ01 no se observaron diferencias en ningún caso respecto a la versión nativa (Figura A2). Estos resultados indican que la región <sup>95</sup>VTFS<sup>98</sup> es importante en la mayoría de las condiciones probadas, mientras que la alteración de los residuos K90 y R91 mostraba efectos condiciones más específicas.



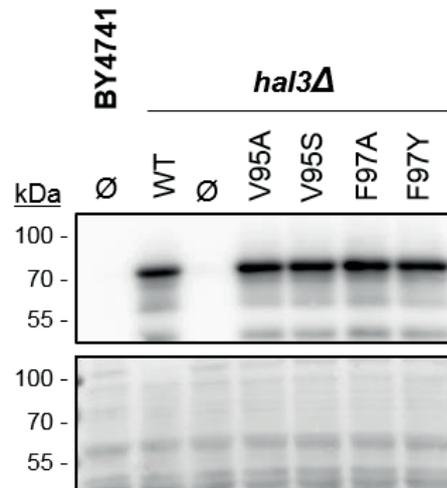
**Figura 39. Mapeo funcional de los residuos comprendidos en la región 90-105 de ScHal3.** A) y B) Las cepas transformadas con los plásmidos que contenían las diferentes versiones de ScHal3 fueron analizadas como en la Figura 31. Fotografías tomadas 3 días después de la siembra, excepto en las placas que contienen la cepa *slt2Δ*, tomadas a cuatro días.

A continuación, se determinó la capacidad de los diferentes mutantes puntuales de ScHal3 para inhibir *in vitro* la actividad Ppz1. Los resultados obtenidos mostraron concordancia con los ensayos fenotípicos (Figura 40, panel izquierdo). El mutante cuádruple en la región <sup>95</sup>VTFS<sup>98</sup> presentó la mayor pérdida de capacidad inhibitoria sobre Ppz1. El triple mutante T96E-F97Y-S98E, mostraba una pérdida importante, aunque no tan elevada como el cuádruple mutante. Las mutaciones fosfomiméticas T96E-S98D, y ambas mutaciones de los residuos K90-R91 provocaron una pérdida de la capacidad reguladora similar al triple mutante. Por el contrario, tanto la mutación fosfoinhibitoria de los residuos T96 y S98, como la triple mutación 3xQ→A no tuvieron apenas efecto sobre la actividad Ppz1. Cuando se realizaron los ensayos de inhibición utilizando el dominio catalítico de Ppz1 (Ppz1-C<sub>ter</sub>), la mayoría de las versiones se comportaba como la versión nativa o incluso presentaba una mayor capacidad de inhibición. Sin embargo, para nuestra sorpresa, la versión cuádruple mutante en la región <sup>95</sup>VTFS<sup>98</sup> perdió capacidad inhibitoria, alcanzándose una inhibición sustancial de la actividad fosfatasa solo cuando se incubó en un exceso molar de 4 a 1 (Figura 40, panel derecho).



**Figura 40. Análisis de la capacidad inhibitoria de Ppz1 de las versiones mutadas de ScHal3.** Se incubaron Ppz1 (panel derecho) o Ppz1-C<sub>ter</sub> (panel izquierdo) recombinantes con cantidades crecientes de ScHal3 nativo o sus versiones mutadas. Los datos obtenidos se representan como se describe en la Figura 33. Se usaron al menos dos preparaciones diferentes de las fosfatasas e inhibidores para estos ensayos.

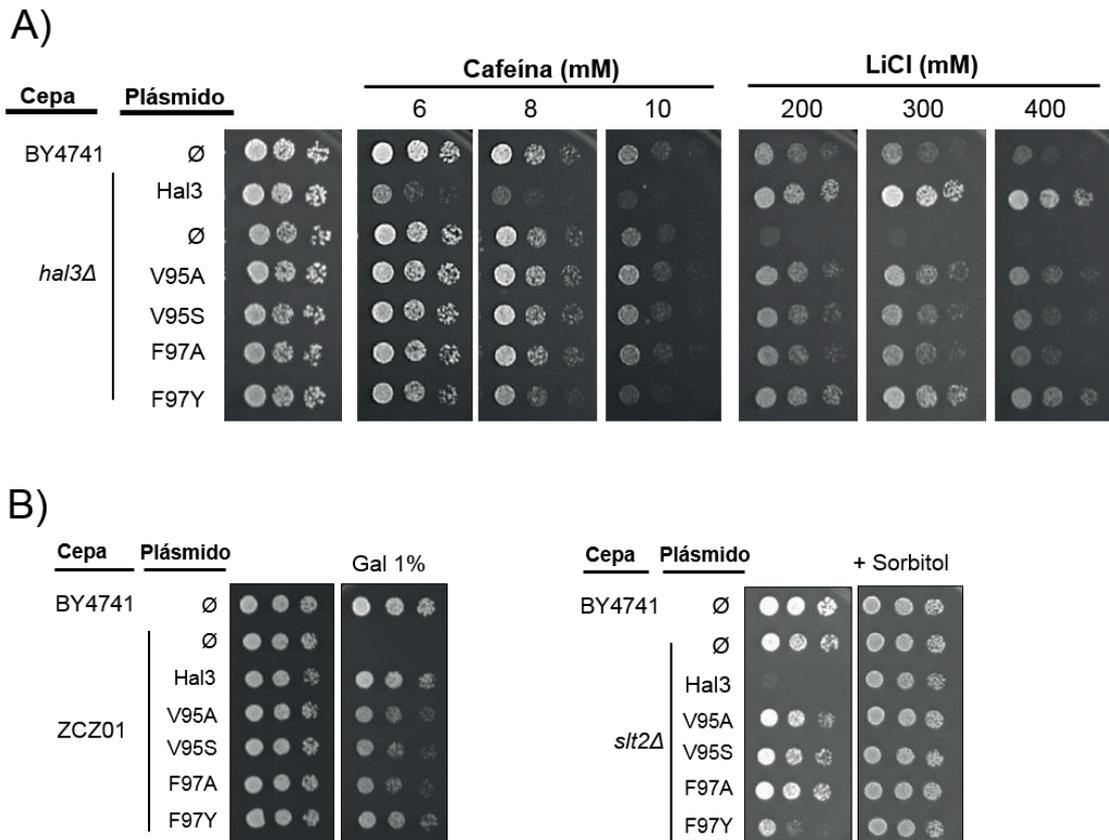
El hecho de que el mutante de la región <sup>96</sup>TFS<sup>98</sup> mostrara fenotipos más marcados que el doble mutante T96E-S98D parecía indicar un papel relevante del residuo Phe97 en la regulación de Ppz1. Por este motivo se sustituyó este residuo por tirosina (cambio conservativo) o por alanina. Además, puesto que las mutaciones de los residuos <sup>95</sup>VTFS<sup>98</sup> y <sup>96</sup>TFS<sup>98</sup> mostraban fenotipos bastante similares, se realizaron sustituciones de la Val95 a alanina y a serina. Tras su construcción y clonación en los plásmidos necesarios se comprobó su expresión mediante inmunodetección (Figura 41).



**Figura 41. Inmunodetección de las versiones mutantes puntuales de ScHal3.** La cepa se transformó con los plásmidos pWS93 indicados. Se prepararon los extractos proteínicos y los niveles de expresión de las diversas versiones de ScHal3 se examinaron mediante ensayos de inmunodetección realizados como en la figura 15.

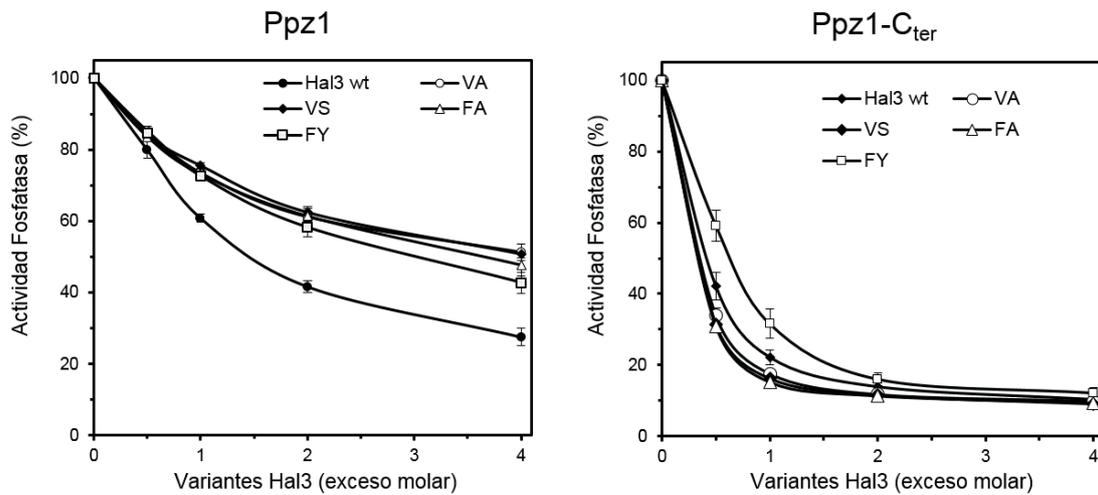
## RESULTADOS

En los ensayos fenotípicos descritos anteriormente las células que expresan las versiones de ScHal3 V95A, V95S y F97A no mostraron la pérdida de tolerancia a cafeína característica de la sobreexpresión de ScHal3, y su crecimiento fue similar al de las células que portaban el plásmido vacío, indicando una pérdida importante de la capacidad reguladora de Ppz1 (Figura 42A). Cuando fueron crecidas en medio que contenía LiCl, se observó una ligera pérdida de la hipertolerancia en comparación con las células que sobreexpresan ScHal3 nativo (Figura 42A). Los ensayos realizados en la cepa ZCZ01 muestran que estas tres versiones presentan una pérdida moderada de la capacidad de neutralizar la sobreexpresión de Ppz1 (Figura 42B). Las células *slt2Δ* transformadas con ellas fueron capaces de crecer sin soporte osmótico, indicando la pérdida de la regulación sobre Ppz1. Por el contrario, el cambio conservativo F97Y dio lugar a consecuencias leves o nulas en comparación con la versión nativa de ScHal3. Estos resultados indican que los residuos V95 y F97 de ScHal3 son importantes en la regulación de la fosfatasa Ppz1 (Figura 42B).



**Figura 42. Caracterización funcional de las versiones mutadas en los residuos V95 y F97 de ScHal3.** A) y B) Las cepas transformadas con los plásmidos que contenían las diferentes versiones de ScHal3 fueron analizadas como en las Figuras 31 y 32. Fotografías tomadas 3 días después de la siembra, excepto en las placas que contienen la cepa *slt2Δ*, tomadas a los cuatro días.

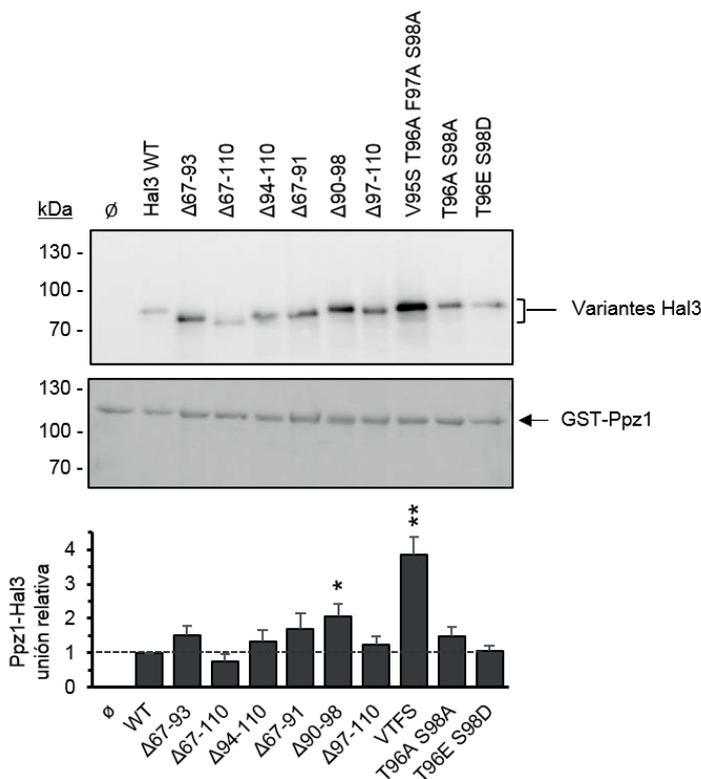
Es remarcable que en los ensayos de inhibición *in vitro* de la fosfatasa Ppz1 las cuatro versiones mutadas presentaron una pérdida de capacidad inhibitoria importante (Figura 43, panel izquierdo). Cuando se evaluó esta capacidad sobre el dominio catalítico de Ppz1 (Ppz1-C<sub>ter</sub>) (Figura 43, panel derecho), las versiones mutadas de ScHal3 presentaron una curva de inhibición similar a la versión nativa, a excepción de la versión que contenía la mutación F97Y, la cual mostró una moderada pérdida de capacidad inhibitoria cuando se incubó a razones molares de 0,5 y 1 respecto a la fosfatasa. Todos estos resultados indican que la región <sup>95</sup>VTFS<sup>98</sup> y específicamente los residuos V95 y F97 de la región N-terminal de ScHal3, juegan un papel relevante en la inhibición de la fosfatasa Ppz1.



**Figura 43. Ensayos de inhibición de la actividad fosfatasa de los mutantes puntuales ScHal3.** La capacidad inhibitoria de las diferentes versiones mutadas de ScHal3 sobre la fosfatasa Ppz1 (panel izquierdo) o su dominio catalítico (Ppz1-C<sub>ter</sub>, panel derecho) se valoró como se describe en la Figura 33. En estos ensayos se usaron al menos dos preparaciones diferentes de las fosfatasas e inhibidores.

**6.3.4. La pérdida de capacidad reguladora de las versiones de ScHal3 no se debe a la falta de interacción con Ppz1.**

Con el propósito de discernir si la pérdida de capacidad reguladora de determinadas versiones de ScHal3 analizadas se debía a una incapacidad para bloquear la reacción catalítica o a una disminución en la intensidad de la interacción con la fosfatasa Ppz1, se realizaron una serie de ensayos de interacción Ppz1-ScHal3. Se utilizó GST-Ppz1 unida a resina de glutatión-sefarosa y extractos de levadura de la cepa IM021 (*ppz1Δ hal3Δ*) que expresaban las diferentes versiones de ScHal3 marcadas con una etiqueta 3xHA (como se detalla en el apartado 4.12.2. de Materiales y Métodos). La cantidad de ScHal3 unida a Ppz1 cuantificada mediante *Western-blot* de fue normalizada con respecto a la cantidad de GST-Ppz1 detectada. El resultado de estos experimentos indica que la mayoría de las versiones mutadas de ScHal3 mostraron una capacidad de unión a Ppz1 similar a la de la versión nativa (Figura 44). Solamente la versión Δ67-110 mostró una ligera pérdida de unión, siendo este cambio no significativo estadísticamente. Sorprendentemente, versiones que presentan una incapacidad notable de inhibir Ppz1, como la versión Δ90-98 o la cuádruple mutante <sup>95</sup>VTFS<sup>98</sup>, mostraron una interacción con Ppz1 incrementada. Los resultados obtenidos indican, por lo tanto, que la pérdida de capacidad inhibitoria de estas versiones de ScHal3 no es causada por una pérdida de interacción con la fosfatasa y, en consecuencia, deben afectar al mecanismo de inhibición.

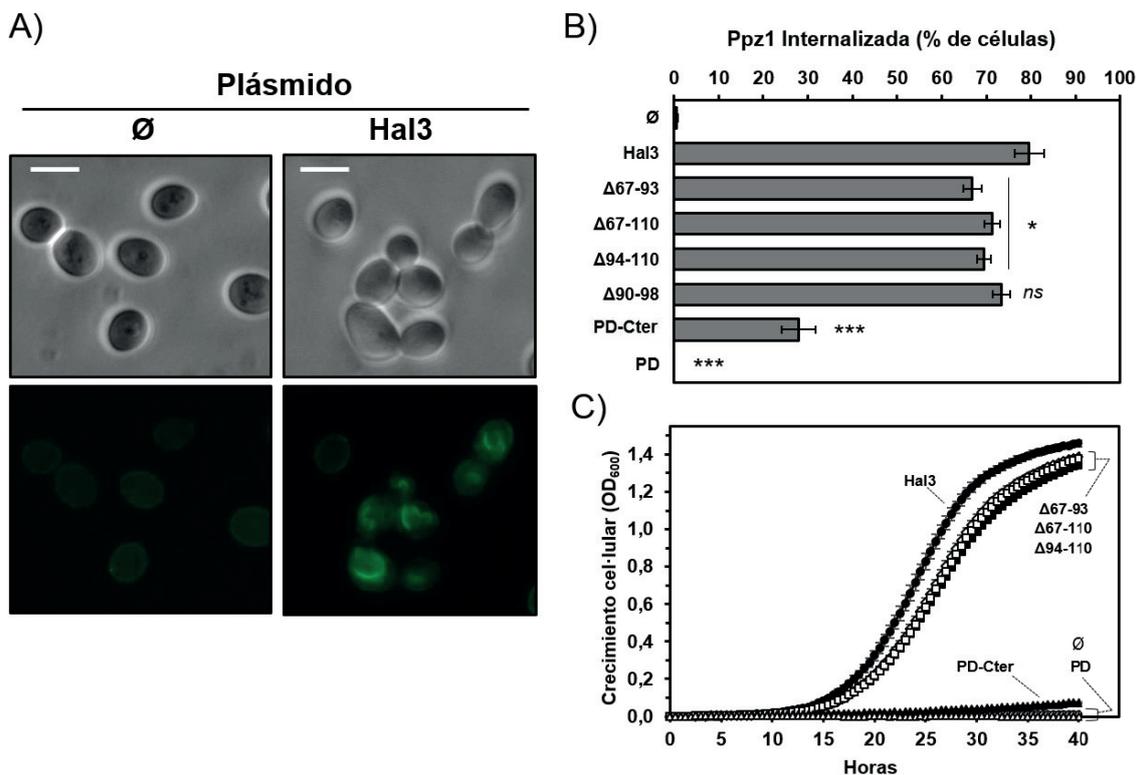


**Figura 44. Ensayos de interacción Ppz1-ScHal3.** Se utilizó 6 μg de GST-Ppz1 unida a 100 μl de resina como cebo de las diferentes versiones de ScHal3 marcadas con una etiqueta 3xHA expresadas desde el plásmido pWS93 en la cepa IM021 (*ppz1 hal3*); ∅, plásmido vacío. Tras el lavado de la resina que contenía la proteína de fusión GST-Ppz1, las muestras se resolvieron por SDS-PAGE (geles al 8%). Las versiones de ScHal3 retenidas por la resina se detectaron utilizando anticuerpos anti-HA (panel superior). La membrana se tiñó con rojo Ponceau para evaluar la carga de la fosfatasa fusionada a GST (panel medio). El histograma (panel inferior) muestra los cocientes de las integraciones de las señales de quimioluminiscencia de ScHal3 retenidas en la resina frente a la cantidad de GST-Ppz1 recuperada, tomando como valor 1 el cociente obtenido para la proteína ScHal3 nativa. Se realizaron entre 6 y 8 experimentos para cada versión. Los datos se muestran como media ± ESM \*, p<0,05; \*\*, p<0,01 (prueba t de Student de dos colas).

### **6.3.5. Efecto de las diferentes versiones de ScHal3 sobre la localización intracelular de Ppz1 en sobreexpresión.**

Como se ha comentado, nuestro grupo descubrió recientemente que la capacidad de ScHal3 para rescatar el defecto de crecimiento provocado por la sobreexpresión de Ppz1 no solo implicaba la capacidad de inhibir la actividad de la fosfatasa, sino también la translocación de ésta de la periferia a membranas internas, principalmente de vacuola (Albacar *et al*, 2022). Con el objetivo de comprobar si las variantes generadas de ScHal3 afectaban esta capacidad, introdujimos estos constructos en la cepa MAC003, que expresa, bajo el promotor *GAL1-10*, la proteína Ppz1 fusionada con GFP en su extremo C-terminal. Como se muestra en la Figura 45 (A y B), la cepa que contiene el plásmido vacío mantiene a la fosfatasa Ppz1 en su localización normal, la periferia celular. Cuando se expresa el gen *ScHAL3* nativo, la fosfatasa se localiza en membranas internas en un 80% de las células. Este valor es algo superior al reportado en (Albacar *et al*, 2022), posiblemente debido a que en nuestro caso el gen *ScHAL3* se expresa desde un promotor más fuerte. Las células que sólo sobreexpresan el dominio PD de ScHal3 son indistinguibles de las que contienen el plásmido vacío ( $\emptyset$ ), mientras que la expresión de este dominio junto con la cola ácida C-terminal (PD-C<sub>ter</sub>) proporciona una muy moderada capacidad de internalizar la fosfatasa (observada en el 28% de las células). Las células que expresan las versiones de ScHal3  $\Delta 67-93$ ,  $\Delta 67-110$  o  $\Delta 94-110$  mostraron una diferencia leve, pero significativa, respecto a las células transformadas con la versión nativa (valores comprendidos entre 67% y 71%).

Para conocer el efecto atenuador de las diferentes versiones de ScHal3 sobre la toxicidad causada por la sobreexpresión de Ppz1, se realizaron ensayos de crecimiento en cultivo líquido de la cepa MAC003 expresando las versiones de ScHal3 objeto de estudio. Como se observa en la Figura 45C las células que expresan las versiones de ScHal3  $\Delta 67-93$ ,  $\Delta 67-110$  o  $\Delta 94-110$  presentan un leve defecto de crecimiento en comparación con las que expresan la versión nativa. Esto indica una compensación parcial de la toxicidad de Ppz1. La versión PD+CtD, en cambio, mostró un defecto de crecimiento muy fuerte, aunque distinguible de la incapacidad de crecer tanto de la versión que expresaba el dominio PD como de la que contenía el plásmido vacío. Cabe recordar, no obstante, que estas pérdidas de función reguladora de las versiones PD-C<sub>ter</sub> y PD podrían deberse a la menor expresión de estas proteínas.



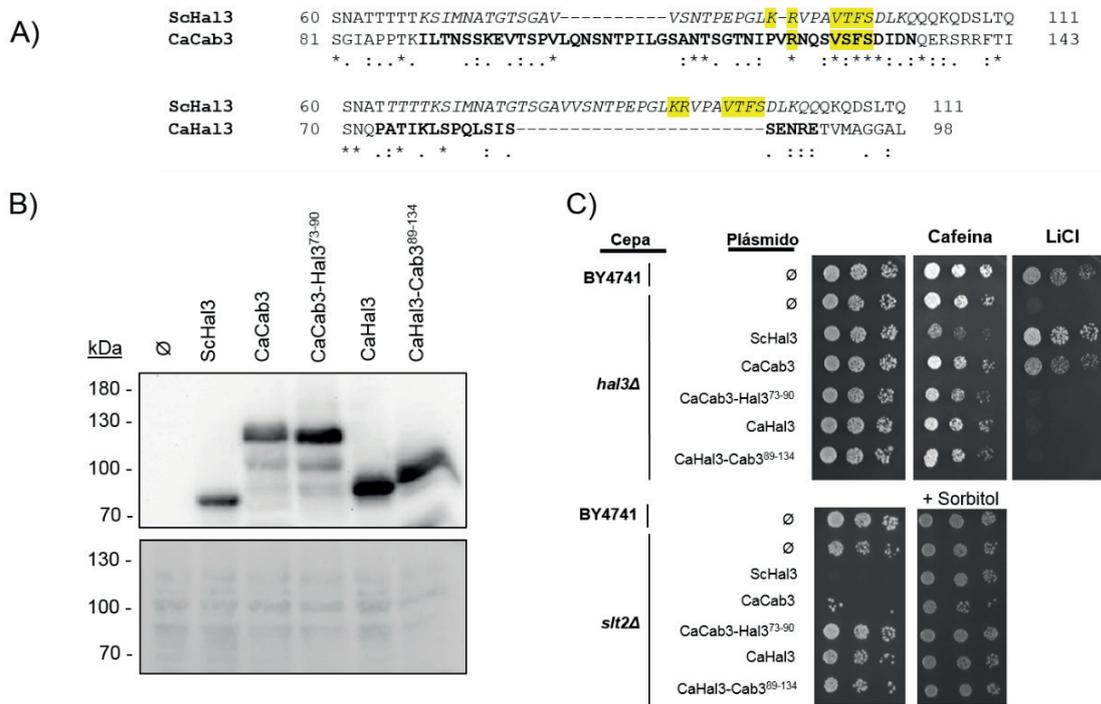
**Figura 45. Capacidad de las versiones de ScHal3 para translocar Ppz1 a membranas internas en sobreexpresión y atenuar su toxicidad.** A) y B) Translocación de Ppz1 a membranas internas. A) Micrografías representativas de cultivos de células MAC003 (sobreexpresan Ppz1 con una etiqueta GFP C-terminal) transformadas con el plásmido pWS93 vacío (∅) o el mismo plásmido conteniendo el gen ScHAL3 nativo. La exposición fue de 3 y 1,5 segundos respectivamente. Las barras representan 5 μm. B) Los cultivos de la cepa MAC003 transformada con las versiones de ScHal3 indicadas se monitorizaron 6 h después de la inducción de la sobreexpresión de Ppz1 y el porcentaje de células que internalizaron Ppz1 se determinó mediante un conteo a ciegas. Se contabilizaron entre 293 y 813 células para cada constructo. ns, no significativo; \*, p<0,05; \*\*\*, p<0,001; en comparación con ScHal3 nativo, determinado por prueba t de Student de dos colas. C) Las células MAC003 se cultivaron durante una noche en medio SC-URA; posteriormente se transfirieron a medio YP Rafinosa, al cual se le añadió un 2% de galactosa para iniciar la sobreexpresión de Ppz1. La OD<sub>600</sub> de partida fue de 0,004 y se monitorizo el crecimiento cada 30 min. El gráfico representa la media ± desviación estándar de 6 cultivos independientes. ∅, levaduras transformadas con el vector pWS93 vacío.

### **6.3.6. Relevancia de la región N-terminal de *C. albicans* CaCab3 en la regulación de Ppz1**

Como se mencionó en la introducción (apartado 3.6.) *C. albicans* posee dos proteínas que presentan semejanza con ScHal3: CaCab3 y CaHal3 y ambas contienen una extensa región N-terminal. Es remarcable notar que CaCab3, a diferencia de CaHal3, presenta en su extremo N-terminal cierta similitud con la región 67-110 de ScHal3, conservando el residuo R91 y una versión del motivo <sup>95</sup>VTFS<sup>98</sup> de ScHal3 ligeramente modificada en la que el residuo de treonina es sustituido por una serina (<sup>127</sup>VSFS<sup>130</sup>) (Figura 46A). Dado que la secuencia de esta región en ambas proteínas de *C. albicans* difiere enormemente (Figura 46) y sólo CaCab3 es capaz de regular Ppz1 *in vivo*, nos planteamos si esta región podía estar relacionada con la capacidad diferencial de regulación de la fosfatasa. Para averiguarlo se diseñó un experimento consistente en obtener proteínas híbridas mediante el intercambio de las regiones 89-134 de CaCab3 por la región 73-90 de CaHal3 y viceversa, obteniendo los constructos CaCab3-CaHal3<sup>73-90</sup> y CaHal3-CaCab3<sup>89-134</sup>.

Estas construcciones híbridas se introdujeron en células BY4741, tanto silvestres como mutantes *hal3Δ* o *slt2Δ*, y se comprobó, mediante inmunodetección, que su expresión era igual o incluso superior al de las versiones nativas (Figura 46B). Posteriormente estas células transformadas se sometieron a ensayos de crecimiento en medio sólido. Las células que contenían *CaHAL3* no mostraron ningún cambio fenotípico respecto a las células transformadas con el plásmido vacío, confirmándose los datos previos de (Petrényi *et al*, 2016), que indicaban que la expresión de esta proteína no afecta a la regulación de Ppz1. La expresión de CaCab3 tuvo muy poco impacto en el crecimiento en presencia cafeína, pero como se había descrito anteriormente (Petrényi *et al*, 2016), mejoró el crecimiento en la placa suplementada con litio, casi hasta el nivel que lo hace la expresión de ScHal3 (Figura 46C). Este efecto mimético también se observó en el fondo *slt2Δ*, donde la expresión de CaCab3 provocó un fenotipo lítico. Todos estos rasgos fenotípicos, coherentes con la inhibición de Ppz1, se perdieron cuando se expresó la versión híbrida de CaCab3, que se comportó como CaHal3 o el vector vacío.

Estos resultados indican que la región 89-134 de CaCab3 es relevante en la regulación de la fosfatasa Ppz1, como lo es la región equivalente de ScHal3 (67-110). Sin embargo, la introducción de esta región de CaCab3 en CaHal3 no fue suficiente (Figura 38C) para transformar CaHal3 en un regulador de Ppz1 (Figura 38C), por lo que debe de haber otros determinantes estructurales implicados en la regulación de la fosfatasa de los que CaHal3 carece.



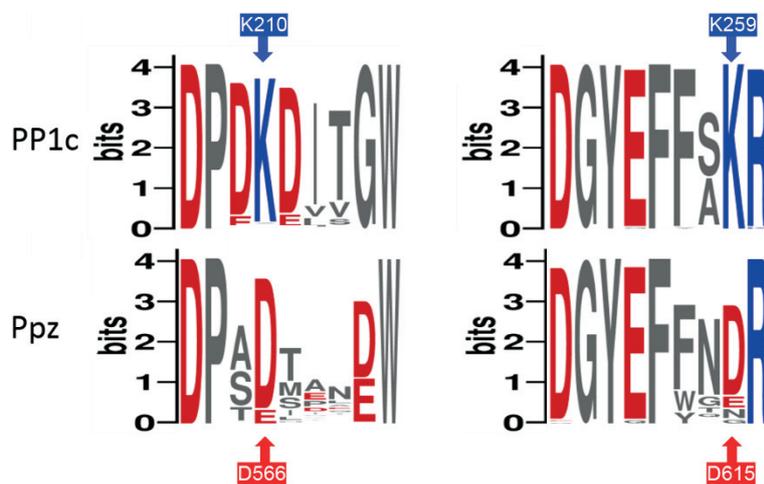
**Figura 46. Intercambio de las regiones N-terminales relevantes de CaCab3 y CaHal3.** A) Comparación de la región 60-111 de ScHal3 y las regiones correspondientes de CaCab3 y CaHal3. Los residuos relevantes de ScHal3 importantes en la regulación de Ppz1 descritos en esta Tesis aparecen subrayados en amarillo. En negrita se muestran los fragmentos intercambiados entre CaCab3 y CaHal3 y en cursiva la región correspondiente a ScHal3. B) Ensayo de inmunodetección de las versiones híbridas de *C. albicans*. Las construcciones indicadas se introdujeron en la cepa *hal3Δ*, se prepararon extractos proteínicos y se evaluó el nivel de expresión de las proteínas nativas e híbridas mediante inmunodetección usando anticuerpos anti-HA (panel superior). El panel inferior muestra la tinción de la membrana con rojo Ponceau para evaluar la eficiencia de la carga y de la transferencia. C) Los diferentes vectores (pWS93) se introdujeron en la cepa BY4741 y sus versiones mutadas *hal3Δ* y *slt2Δ*, y se realizaron ensayos de crecimiento en medio sólido en placas SC-URA, suplementando las placas con 8 mM de cafeína o 200 mM de LiCl (fondo *hal3Δ*) o con sorbitol 1 M (fondo *slt2Δ*).

# 7. Discusión



## 7.1. Análisis comparativo de las fosfatasas tipo 1 y las fosfatasas tipo Z.

Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que la interacción entre la fosfatasa Ppz1 y su subunidad reguladora Hal3 ocurre *in vivo* cuando ambas proteínas son coexpresadas de manera heteróloga y simultánea en *E. coli* (Molero *et al*, 2017). Este hecho se utilizó para, una vez purificadas las proteínas, estudiar en detalle las interacciones entre el dominio catalítico de Ppz1 (Ppz1-C<sub>ter</sub>) y Hal3, mediante diversos ensayos de entrecruzamiento químico y análisis por LC-MS/MS (Casamayor *et al*, 2022). Los resultados indicaron que la lisina 90 de ScHal3, un residuo altamente conservado en la extensión N-terminal de las proteínas tipo ScHal3 de los *Saccharomycetaceae*, aparecía unido covalentemente con la lisina 584 de Ppz1. Como se explicó al comienzo del apartado 6.1., en nuestro modelo de Ppz1-C<sub>ter</sub> (Figura 8) el residuo K584 se localiza muy próximo a los residuos D566 y D615, los cuales aparecen en la superficie de la proteína. En el análisis comparativo realizado entre las PP1c y las Ppz de diversos hongos se observó que estos dos residuos podrían ser elementos distintivos entre ambas familias de fosfatasas ya que, mientras en las Ppz mantenían casi sin excepción el carácter ácido, en las PP1c aparecían invariablemente como Lys (Figura 47). Estos dos residuos de Ppz1 se alinean con las lisinas 210 y 259 de Glc7 y, por lo tanto, representan un cambio drástico en la carga de la superficie entre Ppz1 y PP1c en esta región específica.



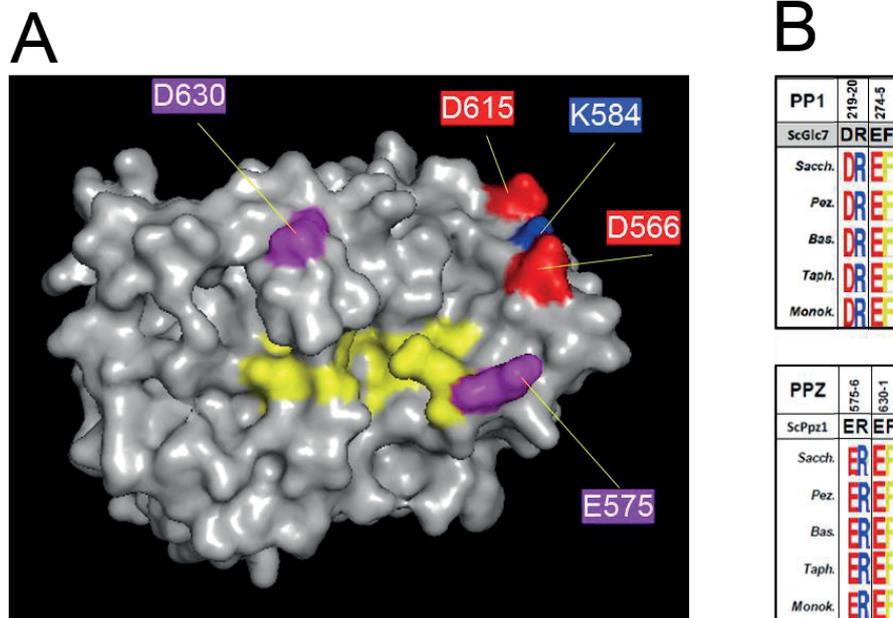
**Figura 47. Conservación de algunos residuos diferenciales entre las fosfatasas PP1c y Ppz de hongos.** Las secuencias de Pp1c y Ppz seleccionadas en (Casamayor *et al*, 2022) fueron alineadas y la frecuencia de aparición de residuos de las regiones mencionadas en el texto se representó mediante WebLogo (Crooks *et al*, 2004). Los residuos básicos se representan en azul y los ácidos en rojo. En el eje Y se representa el contenido de información para cada posición en bits, siendo el valor máximo 4 bits. Se señalan con flechas los números de los residuos diferenciales correspondientes a Glc7 (sobre fondo azul) y Ppz1 (sobre fondo rojo).

Nuestro laboratorio había descrito que ScHal3 no es capaz de inhibir Glc7 (García-Gimeno *et al*, 2003). Por el contrario, ScHal3 es capaz de inhibir todas las fosfatasa de tipo Z examinadas hasta la fecha, incluso aquellas de hongos filogenéticamente distantes respecto a *S. cerevisiae* (Molero *et al*, 2013; Petrényi *et al*, 2016; Zhang *et al*, 2019b, 2019a), sugiriendo que las Ppz conservan elementos estructurales claves para la interacción e inhibición por parte de ScHal3. Los datos obtenidos en nuestro laboratorio (Casamayor *et al*, 2022), apuntaban precisamente a los residuos D566 y D615 de Ppz1 como posibles elementos clave en la regulación de Ppz1, presumiblemente por establecer interacciones electroestáticas con las subunidades reguladoras.

Como se muestra en la sección de Resultados, apartado 6.1.1., la expresión de una versión de Ppz1 conteniendo la mutación D566K no conseguía normalizar plenamente el fenotipo de hipertolerancia a Li<sup>+</sup> causado por la delección de *ppz1* (Figura 10), lo que sugería una pérdida de función. No obstante, el nivel de expresión de esta variante era perfectamente normal (Figura 9), y en los ensayos de interacción y capacidad inhibidora por ScHal3 realizados *in vitro*, se comportó como la proteína Ppz1 nativa (Figuras 12 y 13). Sin embargo, su actividad específica fue algo menor que la de la Ppz1 nativa (Resultados, apartado 6.1.1. pág. 60), lo que podría explicar los resultados de los ensayos fenotípicos. Si observamos el modelo de Ppz1-C<sub>ter</sub> (Figura 8), el residuo D566 queda cercano a los residuos del centro catalítico. Además del cambio de carga de la zona, la mutación a lisina podría provocar impedimentos estéricos del sustrato con el centro catalítico, ya que este residuo presenta una cadena lateral más larga. Estos cambios en factores tan importantes como la carga y el tamaño impedirían la correcta interacción entre el centro catalítico de Ppz1 y su sustrato, provocando que la versión Ppz1-D566K sea catalíticamente menos activa. Así pues, el conjunto de datos obtenidos de la caracterización de la variante mutada Ppz1-D566K, parecen indicar que la menor funcionalidad *in vivo* de esta versión sería el resultado de una menor actividad fosfatasa constitutiva, sin que esta mutación afectara a la regulación por ScHal3.

En cuanto a la mutación Ppz1-D615K, presentó una ligera pérdida de tolerancia a Li<sup>+</sup>, en comparación con las células *ppz1Δ* que expresaban la fosfatasa nativa (Figura 10), y una mayor capacidad que la versión nativa para contrarrestar la mutación *s/t2Δ* (Figura 11), siendo ambos fenotipos compatibles con una fosfatasa anormalmente activa. En los ensayos de interacción con ScHal3, Ppz1-D615K presentó una capacidad de unión similar a la versión nativa (Figura 12), pero mostró una clara resistencia a ser inhibida por ScHal3. Este resultado explicaría por qué estas fosfatasas parecen ser más activas, *in vivo*, que la versión nativa. Por otra parte, la versión doble mutante (Ppz1-D566K D615K) presentó un comportamiento similar a la versión nativa en los ensayos fenotípicos y en los ensayos de interacción, mientras que en los ensayos de inhibición fue ligeramente resistente ScHal3. Este comportamiento podría explicarse por un efecto compensatorio entre ambas mutaciones.

El hecho de que la mutación D615K da lugar a una Ppz1 más refractaria a la inhibición por ScHal3 sugiere que las interacciones electroestáticas pueden desempeñar un papel importante en el mecanismo de inhibición. Esta hipótesis encajaría con la propuesta de que la interacción *in vivo* entre Ppz1 y ScHal3 es dependiente del pH intracelular (Yenush *et al*, 2005). Estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que la mutación de dos residuos ácidos de Ppz1 (E575 y E630) a glicina disminuían de manera notable la susceptibilidad de la fosfatasa para ser inhibida por ScHal3, sin afectar a la interacción entre las dos proteínas (Molero *et al*, 2017). La dificultad en identificar mutaciones específicas en Ppz1 que disminuyan su interacción con Hal3 podría significar que esta interacción involucra múltiples determinantes estructurales redundantes, de manera que la eliminación de uno de ellos no tendría apenas ningún efecto sobre la interacción de estas dos proteínas. Al igual que los residuos mutados en este trabajo (D566 y D615), los residuos descritos en el trabajo de Molero y colaboradores están cerca del centro catalítico (Figura 48A) pero, a diferencia de los residuos D566 y D615, se encuentran conservados entre PP1c y Ppz, no siendo por tanto distintivos entre ambos tipos de fosfatasas en la mayoría de los hongos examinados (Casamayor *et al*, 2022) (Figura 48B). Todos estos resultados indican que el residuo D615 de Ppz1, conservado en las fosfatasas Ppz, es un importante determinante estructural diferencial respecto a las PP1c y que puede contribuir al mecanismo específico de regulación de esta familia de fosfatasas por proteínas tipo Hal3.



**Figura 48. Modelo del dominio catalítico de Ppz1 y residuos conservados entre las fosfatasas PP1c y Ppz.** A) Modelo del dominio C-terminal de Ppz1. En azul el residuo K584, el cual se unía covalentemente con el residuo K90 de ScHal3 en los ensayos de entrecruzamiento; en rojo los residuos D566 y D615 mutados en esta Tesis y en magenta los residuos descritos por Molero y colaboradores (E575 y D630), los cuales afectaban a la inhibición de Ppz1 por ScHal3 (Molero *et al*, 2017). B) Conservación de los residuos E575 y D630 de Ppz1 entre las fosfatasas analizadas de los diferentes taxones (Casamayor *et al*, 2022). *Sacch.* *Saccharomycotina*; *Pez.* *Peizomycotina*; *Bas.* *Basidiomycota*; *Taph.* *Taphrinomycotina*; *Monok.* *Monokarya*.

## 7.2. Estudio del núcleo hidrofóbico de las proteínas AtHal3 y ScHal3

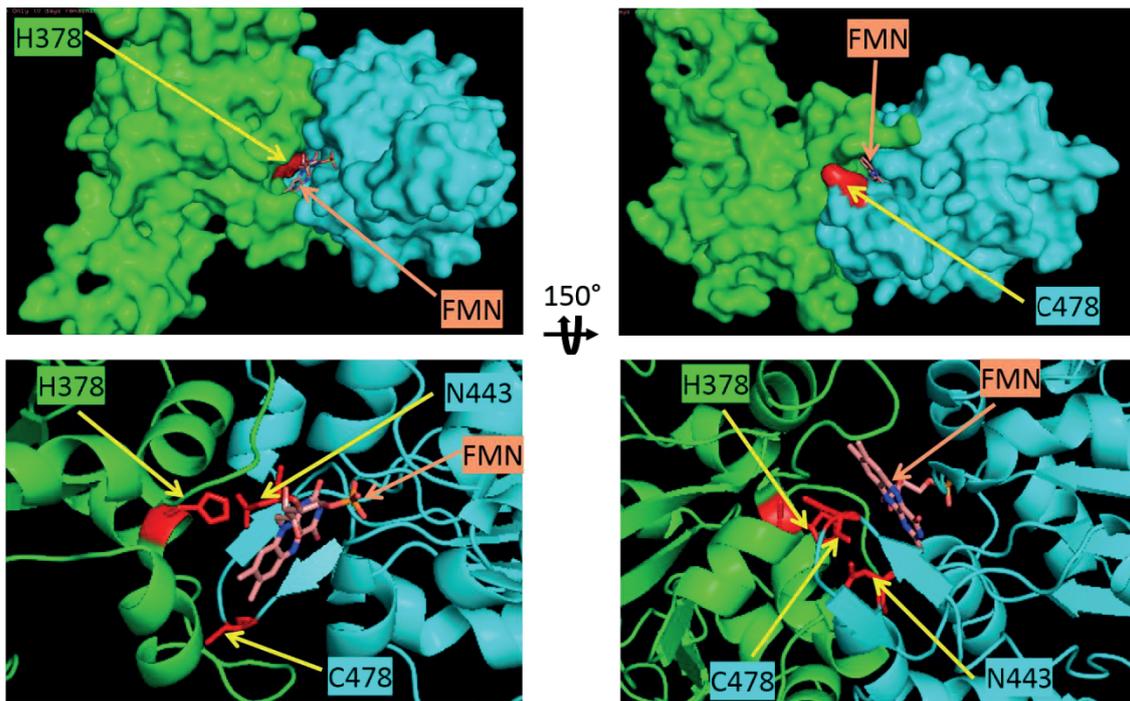
La doble función de ScHal3 como regulador de Ppz1 y componente del heterotrímero PPCDC sugiere que esta proteína debe poder alternar su interacción con unas u otras proteínas. La estructura tridimensional de AtHal3 sugirió la posibilidad de la presencia de un núcleo hidrofóbico relevante para la estabilidad del homotrímero, y por tanto importante para la función PPCDC, el cual involucraría a los residuos G115 y L117 de AtHal3 (Figura 14). En un modelo del homotrímero de ScHal3, generado a partir de la estructura tridimensional del enzima de *A. thaliana* (Albert *et al*, 2000), y mediante un alineamiento de secuencias, se observa que estos residuos son equivalentes a las L403 y L405 de ScHal3 (Figura 14). En estudios previos se mostró que el enzima PPCDC humano (HsCoaC), similar en tamaño y secuencia a AtHal3, es mucho más estable que el dominio PD de ScHal3, presentando una temperatura de fusión de 20 °C a 30 °C mayor que éste (Abrie *et al*, 2015). Los datos presentados en esta Tesis muestran que, *in vitro*, tanto la proteína AtHal3, como sus homotrímeros, son más estables que sus homólogos de levadura (Figura 18B y 25B), posiblemente debido a interacciones más optimizadas entre las superficies de los monómeros que quedan en contacto. En esta Tesis mostramos que las mutaciones en los residuos G115 y L117 de AtHal3 no alteraban la capacidad de trimerización *in vitro* (Figura 17) ni la función del enzima PPCDC (Tabla 3 y Figuras 19 y 20). Así pues, la eliminación de las interacciones de los residuos G115 o L117 solo provocarían una ligera pérdida de estabilidad, que es insuficiente para impedir la formación de una PPCDC en condiciones fisiológicas (Tabla 3 y Figuras 19 y 20).

De manera similar, la mutación en el aminoácido L403 de ScHal3 (equivalente a la G115 de AtHal3) no alteró la capacidad de trimerizar (Figuras 26A y 26B), lo que sugiere que este residuo no es fundamental para la interacción entre monómeros. Sin embargo, el cambio en el residuo L405 de ScHal3, equivalente al L117 de AtHal3, impedía la formación del homotrímero de ScHal3, produciendo complejos de mayor masa molecular (Figuras 26A y 26B). Podría considerarse que la mutación L405E en ScHal3 causaría una incorrecta interacción entre los dominios PD de los monómeros, provocando un mayor número de interacciones artefactuales de la extensión N-terminal. Estas interacciones artefactuales serían favorecidas por la gran variedad de conformaciones posibles de esta región, la cual, como se ha explicado en la Introducción (apartado 3.4.), se predice desestructurada. La intervención de la región N-terminal de ScHal3 en la formación de estos complejos de alta masa molecular podría explicar por qué no se forman en la versión de AtHal3 que porta la mutación equivalente L117E.

La mutación en el residuo L403 de ScHal3 no provocó alteraciones de su comportamiento en ninguno de los ensayos realizados, tanto *in vivo*, como *in vitro*, (Resultados, apartados 6.2.2., 6.2.3. y 6.2.4.) sugiriendo que este residuo tiene poca relevancia funcional. Por el contrario, el cambio en el residuo L405 por ácido glutámico

tiene un importante impacto en ScHal3. En primer lugar, las variantes que presentan la mutación L405E no son capaces de retener el cofactor FMN (Figura 25A). En estudios previos realizados por nuestro grupo se demostró que la desnaturalización de los trímeros formados por los dominios PD de las proteínas de ScHal3 (ScHal3, Vhs3 y Cab3) ocurre en dos etapas: primero se pierde la forma oligomérica, que provoca la liberación de la flavina, y en una segunda fase se pierde la estructura terciaria (Abrie *et al*, 2015). La falta de FMN en las versiones recombinantes que poseen la mutación L405E podría ser debida a la incapacidad de estas variantes de formar homotrímeros y, por tanto, de retener la flavina. Esta conclusión es respaldada por la diferencia en las curvas de desnaturalización de las versiones mutadas en la leucina 405 respecto a la proteína nativa, ya que las versiones que contienen la mutación L405E presentan una pérdida gradual pero constante de la estructura terciaria, mientras que la proteína nativa y la variante L403N muestran un perfil bifásico (Figura 25B). Este perfil bifásico, seguramente, sea el resultado de una desnaturalización en dos etapas, al igual que sucedía con los trímeros formados por los dominios PD de las proteínas de *S. cerevisiae* (Abrie *et al*, 2015).

Es remarcable que la mutación L117E de AtHal3 no afectó a la capacidad de la proteína para retener el FMN (Figura 11), indicando de nuevo que este residuo es prescindible para la formación de los homotrímeros en AtHal3. En estudios realizados por Olzhausen y colaboradores se mostró que, aunque Cab3 puede formar dímeros, no puede trimerizar (Olzhausen *et al*, 2013), y nuestros datos demuestran que la proteína Cab3 recombinante, por si sola, no es capaz de unir FMN. Sin embargo, los ensayos realizados en esta Tesis demuestran que, si bien la versión ScHal3-L405E no puede formar homotrímeros capaces de unirse a FMN, aún puede sustituir a ScHal3 nativo *in vivo* y contribuir a la generación de enzimas PPCDC funcionales (Tabla 4). Por consiguiente, debemos asumir que la versión de ScHal3 con la mutación L405E puede interactuar de manera eficiente con Cab3 y reconstituir un sitio catalítico funcional que contiene el cofactor FMN. Por ello, lo más probable es que la inclusión de la molécula de FMN en el complejo se produzca como resultado de la interacción de ScHal3 y Cab3 (Figura 49). De hecho, nuestros datos indican que la proteína Cab3 recombinante interacciona de un modo tan eficiente, *in vitro*, con todas las versiones mutagenizadas de ScHal3 probadas como lo hace con la proteína nativa (Figura 27). Olzhausen y colaboradores demostraron que, *in vivo*, Cab3 interactúa con otros enzimas de la vía de síntesis de CoA, tales como Cab2, Cab4 y Cab5 (Olzhausen *et al*, 2013). Estas interacciones podrían contribuir a la reconstrucción del centro catalítico del enzima PPCDC formado por Cab3 y las versiones mutadas de ScHal3 en la leucina 405.



**Figura 49. Modelo del heterotrímero formado por una subunidad de Cab3 y dos subunidades de ScHal3.** Modelo basado en la estructura del enzima PPCDC de *A. thaliana* (Albert *et al*, 2000). Por claridad solo se incluyen los monómeros de Cab3 y ScHal3 que forman el centro catalítico. Se muestra el modelo en dos formatos: en la parte superior la superficie de las proteínas y en la parte inferior en formato *cartoon*, donde se detalla el centro catalítico. En verde el monómero de ScHal3, en azul el monómero de Cab3. Se resaltan en rojo y en formato *stick* los residuos implicados en el centro catalítico del enzima. La molécula de FMN se representa en formato *stick* con los átomos de carbono en salmón. En este modelo la molécula de FMN quedaría encajada entre los monómeros que forman el centro activo, rodeada de los residuos implicados en la reacción enzimática.

Planteando un modelo simple, se esperaría que la expresión en levadura de versiones de ScHal3 incapaces de formar trímeros aumentaría el número de monómeros libres, resultando en una mayor inhibición de Ppz1. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que las células que sobreexpresaban versiones de ScHal3 que contenían la mutación L405E presentaban una pérdida de capacidad reguladora de la fosfatasa cuando crecen en medio conteniendo cafeína, mientras que esta pérdida de capacidad inhibitoria no se apreció en las células expuestas a  $\text{Li}^+$  (Figura 22). Este comportamiento no es achacable a diferencias en el nivel de expresión (Figura 21), sino que es debido a una menor capacidad de interacción de ScHal3 con Ppz1 y, por ende, a una disminución de la capacidad inhibitoria (Figuras 23 y 24). Por lo tanto, mientras que la mutación en el aminoácido L403 de ScHal3 no provoca ningún efecto, la sustitución del residuo L405 por ácido glutámico afecta a la capacidad de interacción con Ppz1. Estos resultados tienen importantes implicaciones, ya que la interacción entre ScHal3 y Ppz1 sólo sería relevante para un ScHal3 monomérico, es decir, cuando el residuo L405 quedara expuesto, cosa que no ocurre al formarse el trímero. Esta observación dotaría de más apoyo al concepto de que ScHal3 interactúa con Ppz1 en su estado monomérico (Abrie *et al*, 2015).

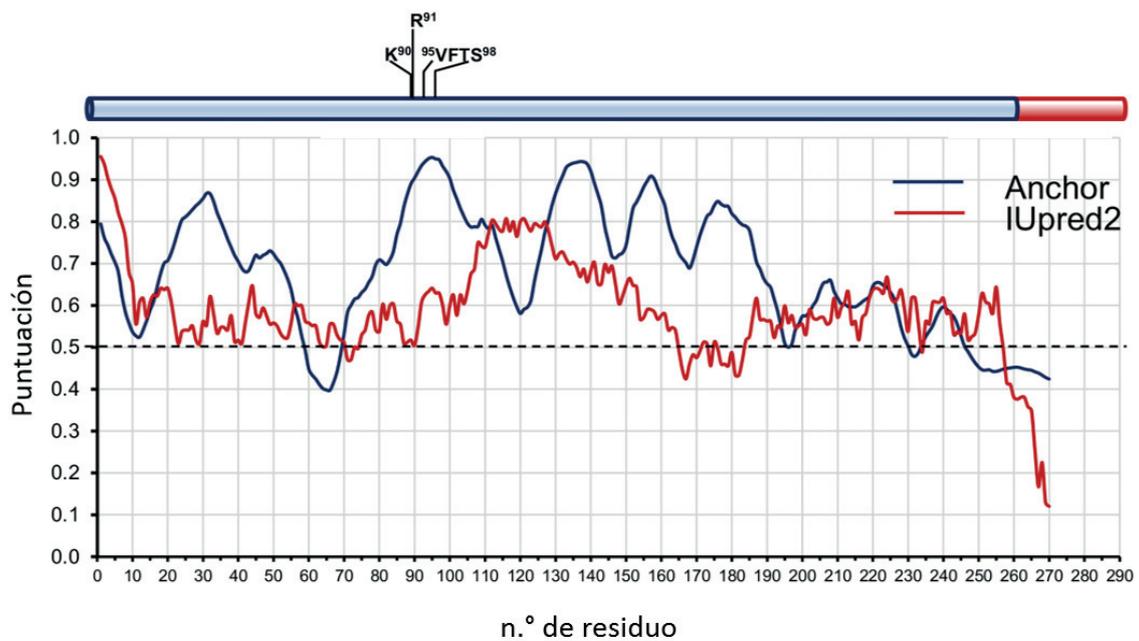
### 7.3. Mapeo funcional de la región N-terminal de ScHal3

Trabajos previos mostraron que, aunque la región N-terminal de ScHal3 aislada no tenía ninguna función por sí misma, podría contribuir a la regulación de Ppz1 (Abrie *et al*, 2012). Esta conclusión concuerda con los datos obtenidos recientemente en nuestro laboratorio, mediante los ensayos de entrecruzamiento químico y posterior análisis de las muestras por LC-MS/MS, donde se observó que la mayoría de las interacciones detectadas se daban entre el dominio catalítico de Ppz1 y la extensión N-terminal de ScHal3 (Casamayor *et al*, 2022). Los resultados expuestos en esta Tesis apuntan a una correlación entre la pérdida de capacidad inhibitoria *in vitro* de diversas versiones de ScHal3 y su fracaso a la hora de mimetizar *in vivo* el comportamiento de la versión nativa. En estos casos, la pérdida de capacidad inhibitoria de las variantes de ScHal3 no es provocada por una menor unión a Ppz1. Es más, en algunos casos ésta se ve incluso potenciada (Figura 44), como en la delección  $\Delta 90-98$  o en el caso de la mutación en los residuos <sup>95</sup>VTFS<sup>98</sup>. La irrelevancia del motivo R/K-R/K-X<sub>3</sub>-VTFS de ScHal3 para la interacción con Ppz1 encaja con los estudios realizados en nuestro laboratorio y por Petrényi y colaboradores donde se demostró que las proteínas Cab3, de *S. cerevisiae* y CaHal3, ambas desprovistas del motivo R/K-R/K-X<sub>3</sub>-VTFS, eran capaces de interactuar tanto con Ppz1, como con la fosfatasa tipo Z de *C. albicans* (CaPpz1) (Ruiz *et al*, 2009; Petrényi *et al*, 2016).

Los resultados expuestos en esta Tesis indican que la región comprendida entre los residuos 90-98 de ScHal3 juega un papel relevante en el mecanismo inhibitorio de Ppz1. Es remarcable el hecho de que una pérdida de capacidad inhibitoria de las variantes de ScHal3 solo se observó sobre la fosfatasa nativa (Figuras 33B, 37, 40 y 43), mientras que cuando se realizaron los ensayos de inhibición sobre el dominio catalítico de Ppz1 (Ppz1-C<sub>ter</sub>), todas las versiones de ScHal3, a excepción del mutante en los residuos <sup>95</sup>VTFS<sup>98</sup>, mostraron una capacidad inhibitoria similar a la de la proteína ScHal3 nativa (Figuras 33B, 37, 40 y 43). Estos resultados sugieren que debe de haber interacciones específicas entre las regiones N-terminales de Ppz1 y ScHal3, las cuales podrían modular la capacidad de ScHal3 como inhibidor de la fosfatasa. Esta hipótesis encaja con la propuesta presentada por nuestro laboratorio de que la extensión N-terminal de Ppz1 protegería a la fosfatasa de la excesiva inhibición de ScHal3 (de Nadal *et al*, 1998).

El motivo regulador <sup>90</sup>K-R-X<sub>3</sub>-VTFS<sup>98</sup> que hemos descrito en ScHal3 presenta cierta similitud con el motivo consenso RVXF, clave para la interacción y regulación de las PP1c por parte de muchas de sus subunidades reguladoras (Wakula *et al*, 2003; Casamayor & Ariño, 2020). Sin embargo, hemos demostrado aquí que, aunque necesario para la correcta regulación de Ppz1, no es necesario para la interacción con la fosfatasa (Figura 44). Por lo tanto, nuestros datos no respaldan la idea de que el motivo R/K-R/K-X<sub>3</sub>-VTFS está reemplazando al motivo RVXF de las subunidades reguladoras de PP1c, sino que tendría un papel específico en la regulación de las fosfatasas Ppz. En cualquier caso,

nuestros resultados muestran que la presencia de un residuo voluminoso en la posición F97 de ScHal3 es importante, ya que la mutación a alanina tiene un efecto más marcado que el cambio por tirosina (Figura 42). Por el contrario, en el caso del residuo V95, la disminución del tamaño del residuo (en el cambio por alanina) o alteraciones de su hidrofobicidad (en la mutación a serina) resultaron en una pérdida de función similar (Figura 42). Es interesante resaltar que este motivo se encuentra en un pequeño segmento que se predice como una posible región de *folding-upon-binding* (secuencias desordenadas que, cuando interactúan con otros polipéptidos, adquieren estructura secundaria) (Figura 50). Estas regiones de *folding-upon-binding* están involucradas en funciones reguladoras y de señalización celular (Yang *et al*, 2019). La alta puntuación obtenida para esta región nos hace hipotetizar que la interacción del motivo <sup>90</sup>K-R-X<sub>3</sub>-VTFS<sup>98</sup> de ScHal3 con Ppz1 provocaría la estructuración de la región, contribuyendo a un posicionamiento adecuado de ScHal3 para inhibir, de manera efectiva, la actividad catalítica de Ppz1.



**Figura 50. Predicción de regiones intrínsecamente desordenadas (IDR) y de *folding-upon-binding* para la región N-terminal de ScHal3.** La predicción de IDR, según el software IUPred2, se muestra en rojo y la predicción de regiones de *folding-upon-binding*, basadas en el software Anchor2, en azul. El valor de corte de 0,5 (línea discontinua) corresponde a un 5 % de predicción de falsos positivos en IDR o en regiones de *folding-upon-binding*. El esquema en la parte superior muestra la ubicación del motivo K-R-X<sub>3</sub>-VTFS. La extensión N-terminal está coloreada en azul claro.

Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que la capacidad de contrarrestar los efectos deletéreos de la sobreexpresión de Ppz1 por parte de ScHal3 implica la relocalización celular de la fosfatasa desde la periferia a membranas internas (Albacar *et al*, 2022). En esta Tesis mostramos que deleciones de la región N-terminal de ScHal3 que afectan notoriamente la capacidad de inhibición *in vivo* de la fosfatasa por parte de ScHal3, sólo presentan una pequeña pérdida de la capacidad de reubicar Ppz1 y

compensar el defecto de crecimiento causado por la sobreexpresión de la fosfatasa (Figura 45). Estos resultados, sugieren que la región 67-110 de ScHal3, tiene poca relevancia con respecto a la relocalización subcelular de la Ppz1 en sobreexpresión. Como se ha mencionado en el apartado 6.3.1. de Resultados, el hecho de que las versiones carentes en su totalidad de la extensión N-terminal no sean capaces de promover la relocalización de Ppz1 podría ser debido a su menor nivel de expresión (Figura 30). Esta menor expresión podría indicar un posible papel de esta extensión N-terminal en la estabilización del polipéptido. En cualquier caso, los resultados presentados en esta Tesis confirman la relevancia de la redistribución intracelular de Ppz1 en la neutralización de los efectos tóxicos derivados de su sobreexpresión.

En esta Tesis hemos mostrado para todas las variantes de ScHal3 analizadas una perfecta correlación fenotípica entre la sensibilidad a cafeína y los ensayos realizados en la cepa mutante *slt2Δ*, lo cual, interpretamos como el resultado del impacto de la cafeína en la vía CWI (Ruta & Farcasanu, 2020). No obstante, en diversas versiones de ScHal3 ha podido observarse comportamientos dispares, *in vivo*, en función del ensayo fenotípico realizado. Las versiones que presentan la mutación L405E y algunas variantes deletionadas o mutadas en la extensión N-terminal de ScHal3 presentaron una ligera o nula pérdida de función cuando se sometieron a ensayos de tolerancia a Li<sup>+</sup> y, sin embargo, mostraron fenotipos asociados a una importante pérdida de capacidad reguladora de Ppz1 en los ensayos asociados a estrés de pared (Figuras 22, 31, 35, 36, 39 y 42). Cabe resaltar que este comportamiento dispar ya había sido descrito previamente tanto en mutantes puntuales de ScHal3 (Muñoz *et al*, 2004), como cuando se expresaron en *S. cerevisiae* proteínas similares a ScHal3 de otros hongos, como es el caso de SpHal3 de *S. pombe* (Molero *et al*, 2013) o de CaCab3 de *C. albicans* (Petrényi *et al*, 2016). Una explicación plausible sería que las manifestaciones fenotípicas dependan del grado de inhibición que las variantes de ScHal3 puedan ejercer sobre Ppz1. Es importante remarcar que se ha demostrado que el bloqueo de la transcripción del gen *ENA1*, mediado por Ppz1, es independiente de su efecto negativo sobre la entrada de K<sup>+</sup> a través de los transportadores Trk1/2 (Ruiz *et al*, 2003). Posiblemente, el efecto perjudicial de la sobreexpresión de ScHal3 en los ensayos de estrés de pared sea causado por una fuerte inhibición de la fosfatasa, lo que conduce a una entrada masiva de K<sup>+</sup> y un aumento de la turgencia celular (Merchan *et al*, 2004). En consecuencia, se podría suponer que la inhibición parcial de Ppz1 sería suficiente para inducir la expresión de *ENA1* y, por consiguiente, aumentar la tolerancia a Li<sup>+</sup>, mientras que, para que se produzca una entrada excesiva de K<sup>+</sup>, sería necesario un mayor grado de inhibición de Ppz1.

Es destacable, que en los ensayos de entrecruzamiento químico y posterior análisis por LC-MS/MS (Casamayor *et al*, 2022), los 16 residuos de lisina del dominio catalítico de Ppz1 que aparecían covalentemente unidas a lisinas de ScHal3 estaban ampliamente distribuidos a lo largo de todo el polipéptido (Figura 28), mientras que en ScHal3 las

lisinas reactivas se encuentran mayoritariamente en la región N-terminal y el primer tercio del dominio PD (Casamayor *et al*, 2022). Esto resulta interesante porque, como ya se ha explicado en la Introducción (apartado 3.5.), la extensión N-terminal de ScHal3, aunque no es capaz por si sola de unirse a Ppz1, es relevante para la inhibición de la fosfatasa (Abrie *et al*, 2012). Estos datos, junto con el hecho que las ciertas versiones deletionadas o mutadas de la extensión N-terminal de ScHal3 no sean capaces de inhibir correctamente Ppz1, pero sí a su dominio catalítico (Ppz1-C<sub>ter</sub>) (Figuras 33B, 37, 40 y 43), nos permiten hipotetizar un modelo de la interacción Ppz1-ScHal3, en el cual, las interacciones iniciales involucrarían residuos ubicados dentro de la región PD. Tras esta primera fase de interacción, la proteína ScHal3, quedaría posicionada correctamente, permitiendo que su dominio N-terminal reforzara esta unión mediante interacciones adicionales con Ppz1.

#### **7.4. Distribución del motivo regulador <sup>90</sup>K-R-X<sub>3</sub>-VTFS<sup>98</sup> en proteínas Hal3-like en hongos**

Los análisis comparativos de proteínas fúngicas similares a ScHal3 realizados en nuestro laboratorio muestran que la región N-terminal que precede al dominio PD, se encuentra solamente en el genoma de los *Saccharomycetes*. En otras clases de *Ascomycotas*, las proteínas se reducen al dominio PD y, a menudo, carecen de cola ácida (Santolaria *et al*, 2022). La relevancia funcional del motivo <sup>90</sup>K-R-X<sub>3</sub>-VTFS<sup>98</sup>, presente en la extensión N-terminal de ScHal3 que hemos puesto de manifiesto, explicaría porque la proteína de *S. pombe* (SpHal3), sin extensión N-terminal, o las proteínas de *C. neoformans* (CnHal3a y CnHal3b), con una región N-terminal muy corta, no fueron capaces de inhibir sus propias fosfatasas tipo Z ni la de *S. cerevisiae* (Molero *et al*, 2013; Zhang *et al*, 2019a). También justificaría por qué la proteína de *U. maydis*, que contiene una región N-terminal muy extensa, pero carente del motivo específico mencionado, tampoco puede inhibir su fosfatasa tipo Z, ni la Ppz1 de *S. cerevisiae* (Zhang *et al*, 2019b). Como se indica en la Introducción, apartado 3.6., la incapacidad de estas proteínas de inhibir sus Ppz no puede atribuirse a diferencias estructurales entre las fosfatasas, ya que ScHal3 es capaz de inhibir fuertemente todas ellas (Molero *et al*, 2013; Petrényi *et al*, 2016; Zhang *et al*, 2019a, 2019b). Estos hechos, junto con los resultados presentados en esta Tesis respecto a la mutagénesis de CaCab3 (Figura 46), refuerzan la idea de que el motivo consenso R/K-R/K-X<sub>3</sub>-VTFS, o versiones ligeramente degeneradas, podrían ser una característica estructural importante para el papel regulador de las proteínas homólogas a ScHal3 sobre sus propias fosfatasas Ppz.

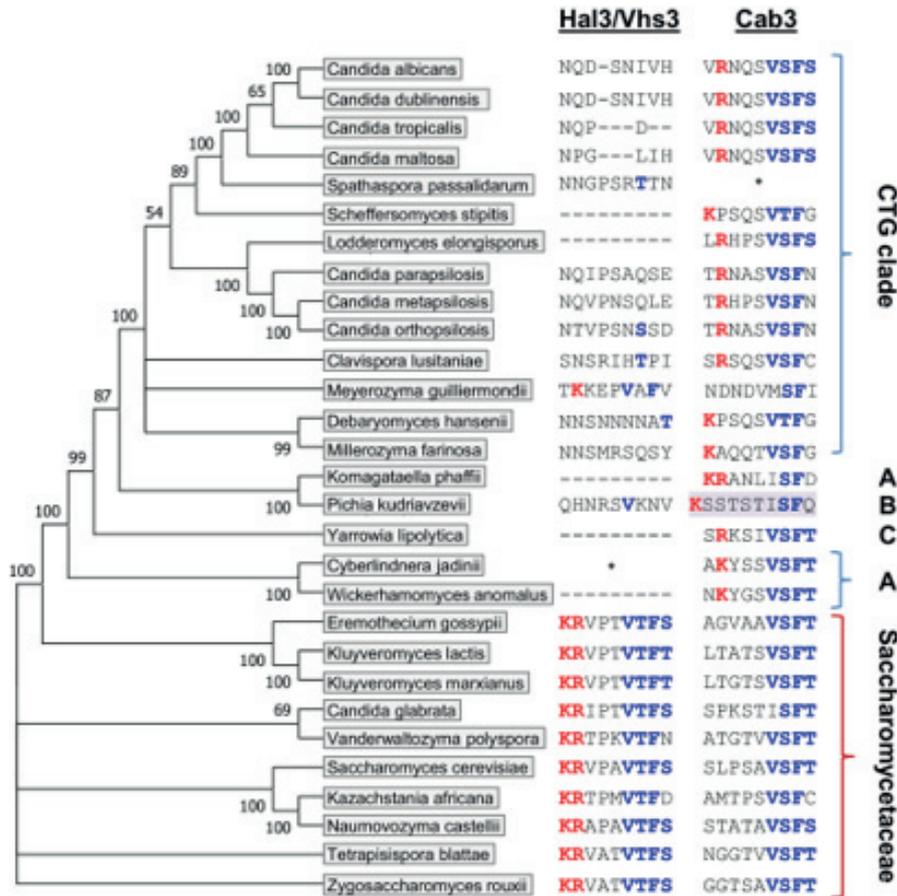


Figura 51. Identificación de la secuencia consenso de regulación en diversos clados del orden de los *Saccharomycetales*. La filogenia de las especies seleccionadas se basó en la alineación provista en la referencia (Mü & Kollmar, 2014) y se representó usando el software MEGA X (Kumar *et al*, 2018). La identificación de las secuencias consenso se realizó mediante inspección de alineamientos de Clustal Omega y una búsqueda de combinaciones degeneradas en archivos FASTA, mediante un software desarrollado en el laboratorio. Los residuos claves del consenso se indican en negrita. La secuencia anómala en *P. kudriavzevii* está sombreada. El asterisco indica que la secuencia encontrada en la base de datos aparece incompleta en el extremo N-terminal. (A), *Phaffomycetaceae*; (B), *Pichiaceae*; (C), *Dipodascaceae*. Imagen de (Santolaria *et al*, 2022).

Por lo que respecta a la distribución del citado motivo regulador entre proteínas tipo Hal3 o Cab3, el análisis comparativo revela dos escenarios posibles (Figura 51): i) está presente en las proteínas Hal3, pero no en las proteínas Cab3, en las familias *Saccharomycetaceae* y *Saccharomycodaceae*; ii) se encuentra en proteínas tipo Cab3, pero no en las proteínas Hal3, en la mayoría de miembros del clado CTG, incluyendo especies de *Candida* patógenas (Szabó *et al*, 2021), así como en las familias *Phaffomycetaceae*, *Pichiaceae* y *Dipodascaceae* (Szabó *et al*, 2021). Los genomas de todas estas especies codifican proteínas de tipo Hal3 y Cab3, por lo que es esperable que el enzima PPCDC sea un heterotrímero, formado por combinaciones de estas dos proteínas. Dado que, los datos presentados en esta Tesis asocian la presencia del motivo consenso (R/K-R/K-X<sub>3</sub>-VTFS) con la capacidad de inhibir Ppz1, se puede concluir que en el primer escenario la capacidad *moonlighting* corresponde a Hal3, mientras que en el segundo caso Cab3 sería la proteína *moonlighting*.



# 8. Conclusiones



- 1.- La menor funcionalidad *in vivo* de la versión D566 de Ppz1 es el resultado de una menor actividad fosfatasa constitutiva, sin que esta mutación afecte a la regulación por ScHal3.
- 2.- El residuo D615 de Ppz1, conservado en las fosfatasas de tipo Z, es un importante determinante estructural diferencial y puede contribuir al mecanismo específico de regulación de esta familia de fosfatasas por proteínas tipo Hal3.
- 3.- El comportamiento de la versión doble mutante de Ppz1 (D566K D615K) puede explicarse por un efecto compensatorio entre ambas mutaciones.
- 4.- Los residuos G115 y L117 de AtHal3 no son esenciales para la formación de un enzima PPCDC funcional ni afectan su capacidad de trimerización.
- 5.- El residuo L403 de ScHal3 no tiene ninguna relevancia ni en la formación del enzima PPCDC, ni en el papel de ScHal3 como regulador de Ppz1.
- 6.- La incapacidad de la variante L405E de ScHal3 para formar homotrímeros puede ser causada por una incorrecta interacción entre los dominios PD de los monómeros que propicia interacciones artefactuales de la región N-terminal de ScHal3. Sin embargo, la mutación de este residuo no afecta a la formación de PPCDC funcionales.
- 7.- La incapacidad parcial para regular Ppz1 de las versiones de ScHal3 con la mutación L405E es debida a una pérdida en la capacidad de interacción con la fosfatasa.
- 8.- El análisis por mutagénesis de la extensión N-terminal de ScHal3 revela un motivo <sup>90</sup>K-R-X<sub>3</sub>-VTFS<sup>98</sup> que es imprescindible para la regulación de Ppz1. La presencia del citado motivo puede explicar la capacidad de CaCab3, pero no de CaHal3, para inhibir tanto ScPpz1 como CaPpz1.
- 9.- La presencia del motivo consenso R/K-R/K-X<sub>3</sub>-VTFS, o versiones ligeramente degeneradas del mismo, puede identificarse en un subconjunto de especies de levaduras y, en estos casos determinaría, en función de su presencia en Hal3 o Cab3, la capacidad *moonlighting* de estas proteínas.
- 10.- Nuestros resultados sugieren que debe de haber interacciones específicas entre las regiones N-terminales de Ppz1 y ScHal3 que son esenciales para la regulación de la fosfatasa.



## 9. Bibliografía



- Abrie JA, González A, Strauss E & Ariño J (2012) Functional mapping of the disparate activities of the yeast moonlighting protein Hal3. *Biochemical Journal* 442: 357–368
- Abrie JA, Molero C, Ariño J & Strauss E (2015) Complex stability and dynamic subunit interchange modulates the disparate activities of the yeast moonlighting proteins Hal3 and Vhs3. *Sci Rep* 5: 1–17
- Adam C, Erdei E, Casado C, Kovacs L, Gonzalez A, Majoros L, Petrenyi K, Bagossi P, Farkas I, Molnar M, *et al* (2012) Protein phosphatase CaPpz1 is involved in cation homeostasis, cell wall integrity and virulence of *Candida albicans*. *Microbiology (Reading)* 158: 1258–1267
- Adams A, Gottschling DE, Kaiser CA & Stearns T (1998) *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY
- Aksenova A, Muñoz I, Volkov K, Ariño J & Mironova L (2007) The HAL3-PPZ1 dependent regulation of nonsense suppression efficiency in yeast and its influence on manifestation of the yeast prion-like determinant [ISP+]. *Genes to Cells* 12: 435–445
- Albacar M, Sacka L, Calafí C, Velázquez D, Casamayor A, Ariño J & Zimmermannova O (2021) The Toxic Effects of Ppz1 Overexpression Involve Nha1-Mediated Deregulation of K<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> Homeostasis. *Journal of Fungi* 7: 1010
- Albacar M, Velázquez D, Casamayor A & Ariño J (2022) The toxic effects of yeast Ppz1 phosphatase are counteracted by subcellular relocalization mediated by its regulatory subunit Hal3. *FEBS Letters*
- Albert A, Martinez-Ripoll M, Espinosa-Ruiz A, Yenush L, Culianez-Macia FA & Serrano R (2000) The X-ray structure of the FMN-binding protein AtHal3 provides the structural basis for the activity of a regulatory subunit involved in signal transduction. *Structure* 8: 961–969
- Albuquerque CP, Smolka MB, Payne SH, Bafna V, Eng J & Zhou H (2008) A Multidimensional Chromatography Technology for In-depth Phosphoproteome Analysis. *Molecular & Cellular Proteomics* 7: 1389–1396
- Alepuz PM, Cunningham KW & Estruch F (1997) Glucose repression affects ion homeostasis in yeast through the regulation of the stress-activated ENA1 gene. *Mol Microbiol* 26: 91–8
- Ariño J (2002) Novel protein phosphatases in yeast. *Eur J Biochem* 269: 1072–1077
- Arino J, Ramos J & Sychrova H (2010) Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 74: 95–120

- Balcells L, Gómez N, Casamayor A, Clotet J & 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
- Bañuelos MA, Sychrová H, Bleykasten-Grosshans C, Souciet J-L & Potier S (1998) The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology (N Y)* 144: 2749–2758
- Barreto L, Canadell D, Valverde-Saubí D, Casamayor A & Ariño J (2012) The short-term response of yeast to potassium starvation. *Environ Microbiol* 14: 3026–42
- Basile W, Salvatore M, Bassot C & Elofsson A (2019) Why do eukaryotic proteins contain more intrinsically disordered regions? *PLoS Comput Biol* 15: e1007186
- Benito B, Quintero FJ & Rodríguez-Navarro A (1997) Overexpression of the sodium ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*: conditions for phosphorylation from ATP and Pi. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1328: 214–225
- Black S, Andrews PD, Sneddon AA & Stark MJR (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, Peti W, Ragusa MJ & Beullens M (2010) The extended PP1 toolkit: designed to create specificity. *Trends Biochem Sci* 35: 450–458
- Botstein D & Fink GR (2011) Yeast: An experimental organism for 21st century biology. *Genetics* 189: 695–704
- Brachmann CB, Davies A, Cost GJ, Caputo E, Li J, Hieter P & Boeke JD (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 14: 115–132
- Calafí C, López-Malo M, Albacar M, Casamayor A & Ariño J (2020a) The N-Terminal Region of Yeast Protein Phosphatase Ppz1 Is a Determinant for Its Toxicity. *Int J Mol Sci* 21
- Calafí C, López-Malo M, Velázquez D, Zhang C, Fernández-Fernández J, Rodríguez-Galán O, de la Cruz J, Ariño J & Casamayor A (2020b) Overexpression of budding yeast protein phosphatase Ppz1 impairs translation. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1867: 118727
- Canadell D, González A, Casado C & Ariño J (2015) Functional interactions between potassium and phosphate homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 95: 555–572

- Cannon JF (2010) Function of Protein Phosphatase-1, Glc7, in *Saccharomyces cerevisiae*. In pp 27–59.
- Casamayor A & Ariño J (2020) Controlling Ser/Thr protein phosphatase PP1 activity and function through interaction with regulatory subunits. In pp 231–288.
- Casamayor A & Ariño J (2022) When Phosphatases Go Mad: The Molecular Basis for Toxicity of Yeast Ppz1. *Int J Mol Sci* 23(08):4304
- Casamayor A, Velázquez D, Santolaria C, Albacar M, Rasmussen MI, Højrup P & Ariño J (2022) Comparative Analysis of Type 1 and Type Z Protein Phosphatases Reveals D615 as a Key Residue for Ppz1 Regulation. *Int J Mol Sci* 2022: 23
- Ceulemans H & Bollen M (2004) Functional Diversity of Protein Phosphatase-1, a Cellular Economizer and Reset Button. *Physiol Rev* 84: 1–39
- Choy MS, Page R & Peti W (2012) Regulation of protein phosphatase 1 by intrinsically disordered proteins. *Biochem Soc Trans* 40: 969–974
- Clotet J, Gari E, Aldea M & Ariño J (1999) The yeast Ser/Thr phosphatases Sit4 and Ppz1 play opposite roles in regulation of the cell cycle. *Mol Cell Biol* 19: 2408–2415
- Clotet J, Posas F, Casamayor A, Schaaff-Gerstenschlager I & 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 & Ariño J (1996) The NH<sub>2</sub>-terminal extension of protein phosphatase PPZ1 has an essential functional role. *Journal of Biological Chemistry* 271: 26349–26355
- Cohen P (1989) The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem* 58: 453–508
- Cohen PTW (2002) Protein phosphatase 1 – targeted in many directions. *J Cell Sci* 115: 241–256
- di Como CJ, Bose R & Arndt KT (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
- Crooks GE, Hon G, Chandonia J-M & Brenner SE (2004) WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res* 14: 1188–90
- Cyert MS & Philpott CC (2013) Regulation of cation balance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 193: 677–713
- Daugherty M, Polanuyer B, Farrell M, Scholle M, Lykidis A, de Crécy-Lagard V & Osterman A (2002) Complete Reconstitution of the Human Coenzyme A Biosynthetic

- Pathway via Comparative Genomics. *Journal of Biological Chemistry* 277: 21431–21439
- Egloff M-P, Cohen PTW, Reinemer P & Barford D (1995) Crystal Structure of the Catalytic Subunit of Human Protein Phosphatase 1 and its Complex with Tungstate. *J Mol Biol* 254: 942–959
- Espinosa-Ruiz A, Bellés JM, Serrano R & Culiáñez-Macià FA (1999) *Arabidopsis thaliana* AtHAL3: A flavoprotein related to salt and osmotic tolerance and plant growth. *Plant Journal* 20: 529–539
- Feng ZH, Wilson SE, Peng ZY, Schlender KK, Reimann EM & Trumbly RJ (1991) The yeast GLC7 gene required for glycogen accumulation encodes a type 1 protein phosphatase. *Journal of Biological Chemistry* 266: 23796–801
- Ferrando A, Kron SJ, Rios G, Fink GR & Serrano R (1995) Regulation of cation transport in *Saccharomyces cerevisiae* by the salt tolerance gene *HAL3*. *Mol Cell Biol* 15: 5470–5481
- Gaber RF, Styles CA & Fink GR (1988) *TRK1* encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 8: 2848–2859
- Galea CA, Wang Y, Sivakolundu SG & Kriwacki RW (2008) Regulation of cell division by intrinsically unstructured proteins: intrinsic flexibility, modularity, and signaling conduits. *Biochemistry* 47: 7598–609
- Gancedo C & Flores C-L (2008) Moonlighting Proteins in Yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 72: 197–210
- Gancedo C, Flores C-L & Gancedo JM (2016) The Expanding Landscape of Moonlighting Proteins in Yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 80: 765–777
- Garciadeblas B, Rubio F, Quintero FJ, Bañuelos MA, Haro R & Rodríguez-Navarro A (1993) Differential expression of two genes encoding isoforms of the ATPase involved in sodium efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 236–236: 363–368
- García-Gimeno MA, Muñoz I, Ariño J & Sanz P (2003) Molecular characterization of Ypi1, a novel *Saccharomyces cerevisiae* type 1 protein phosphatase inhibitor. *Journal of Biological Chemistry* 278: 47744–47752
- Giaever G, Chu AM, Ni L, Connelly C, Riles L, Veronneau S, Dow S, Lucau-Danila A, Anderson K, Andre B, *et al* (2002) Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 418: 387–391
- Gibbons JA, Kozubowski L, Tatchell K & Shenolikar S (2007) Expression of human protein phosphatase-1 in *Saccharomyces cerevisiae* highlights the role of phosphatase

- isoforms in regulating eukaryotic functions. *Journal of Biological Chemistry* 282: 21838–21847
- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, *et al* (1996) Life with 6000 genes. *Science* (1979) 274: 546–567
- Gomez MJ, Luyten K & Ramos J (1996) The capacity to transport potassium influences sodium tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 135: 157–160
- Green MR & Sambrook J (2012) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Guerreiro JF, Mira NP, Santos AXS, Riezman H & Sá-Correia I (2017) Membrane Phosphoproteomics of Yeast Early Response to Acetic Acid: Role of Hrk1 Kinase and Lipid Biosynthetic Pathways, in Particular Sphingolipids. *Front Microbiol* 8
- Haro R, Garciadeblas B & Rodriguez-Navarro A (1991) A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett* 291: 189–191
- Hernandez-Acosta P, Schmid DG, Jung G, Culianez-Macia FA & Kupke T (2002) Molecular characterization of the *Arabidopsis thaliana* flavoprotein AtHal3a reveals the general reaction mechanism of 4'-phosphopantothienoylcysteine decarboxylases. *Journal of Biological Chemistry* 277: 20490–20498
- He X & Moore C (2005) Regulation of yeast mRNA 3' end processing by phosphorylation. *Mol Cell* 19: 619–629
- Ho B, Baryshnikova A & Brown GW (2018) Unification of protein abundance datasets yields a quantitative *Saccharomyces cerevisiae* proteome. *Cell Syst* 6: 192-205.e3
- Hoermann B & Köhn M (2021) Evolutionary crossroads of cell signaling: PP1 and PP2A substrate sites in intrinsically disordered regions. *Biochem Soc Trans* 49: 1065–1074
- Hoermann B, Kokot T, Helm D, Heinzlmeir S, Chojnacki JE, Schubert T, Ludwig C, Berteotti A, Kurzawa N, Kuster B, *et al* (2020) Dissecting the sequence determinants for dephosphorylation by the catalytic subunits of phosphatases PP1 and PP2A. *Nat Commun* 11: 3583
- Holt LJ, Tuch BB, Villén J, Johnson AD, Gygi SP & Morgan DO (2009) Global analysis of Cdk1 substrate phosphorylation sites provides insights into evolution. *Science* (1979) 325: 1682–1686
- Huberts DHEW & van der Klei IJ (2010) Moonlighting proteins: An intriguing mode of multitasking. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1803: 520–525

- Hughes V, Müller a, Stark MJ & Cohen PT (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. *European journal of biochemistry / FEBS* 216: 269–279
- Iakoucheva LM (2004) The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation. *Nucleic Acids Res* 32: 1037–1049
- Iakoucheva LM, Brown CJ, Lawson JD, Obradović Z & Dunker AK (2002) Intrinsic disorder in cell-signaling and cancer-associated proteins. *J Mol Biol* 323: 573–84
- Ingebritsen TS & Cohen P (1983) Protein Phosphatases: properties and role in cellular regulation. *Science (1979)* 221: 331–338
- Ingebritsen TS, Foulkes JG & Cohen P (1980) The broad specificity protein phosphatase from mammalian liver. *FEBS Lett* 119: 9–15
- Ito H, Fukuda Y, Murata K & Kimura A (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 153: 163–168
- Janssens V, Longin S & Goris J (2008) PP2A holoenzyme assembly: in cauda venenum (the sting is in the tail). *Trends Biochem Sci* 33: 113–121
- Jeffery CJ (1999) Moonlighting proteins. *Trends Biochem Sci* 24: 8–11
- Jeffery CJ (2003) Moonlighting proteins: old proteins learning new tricks. *Trends Genet* 19: 415–7
- Jeffery CJ (2009) Moonlighting proteins—an update. *Mol Biosyst* 5: 345
- Johnson DR, Cok SJ, Feldmann H & Gordon JI (1994) Suppressors of nmt1-181, a conditional lethal allele of the *Saccharomyces cerevisiae* myristoyl-CoA: protein N-myristoyltransferase gene, reveal proteins involved in regulating protein N-myristoylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91: 10158–10162
- Kahm M & Kschischo M (2016) Mathematical Modelling of Cation Transport and Regulation in Yeast. *Adv Exp Med Biol* 892: 291–305
- Kettenbach AN, Schweppe DK, Faherty BK, Pechenick D, Pletnev AA & Gerber SA (2011) Quantitative phosphoproteomics identifies substrates and functional modules of Aurora and Polo-like kinase activities in mitotic cells. *Sci Signal* 4
- Kettenbach AN, Wang T, Faherty BK, Madden DR, Knapp S, Bailey-Kellogg C & Gerber SA (2012) Rapid determination of multiple linear kinase substrate motifs by mass spectrometry. *Chem Biol* 19: 608–618
- Klis FM, Boorsma A & de Groot PWJ (2006) Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23: 185–202

- Ko CH, Buckley AM & Gaber RF (1990) TRK2 is required for low affinity K<sup>+</sup> transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 125: 305–312
- Ko CH & Gaber RF (1991) TRK1 and TRK2 encode structurally related K<sup>+</sup> transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 11: 4266–4273
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C & Tamura K (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol* 35: 1547–1549
- Kupke T (2001) Molecular characterization of the 4'-phosphopantothienoylcysteine decarboxylase domain of bacterial Dfp flavoproteins. *Journal of Biological Chemistry* 276: 27597–27604
- Kupke T, Hernandez-Acosta P, Steinbacher S & Culianez-Macia FA (2001) *Arabidopsis thaliana* flavoprotein AtHAL3a catalyzes the decarboxylation of 4'-Phosphopantothienoylcysteine to 4'-phosphopantetheine, a key step in coenzyme A biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* 276: 19190–19196
- Lanz MC, Yugandhar K, Gupta S, Sanford EJ, Faça VM, Vega S, Joiner AMN, Fromme JC, Yu H & Smolka MB (2021) In-depth and 3-dimensional exploration of the budding yeast phosphoproteome. *EMBO Rep* 22
- Lee KS, Hines LK & Levin DE (1993a) A pair of functionally redundant yeast genes (*PPZ1* and *PPZ2*) encoding type 1-related protein phosphatases function within the PKC1-mediated pathway. *Mol Cell Biol* 13: 5843–5853
- Lee KS, Irie K, Gotoh Y, Watanabe Y, Araki H, Nishida E, Matsumoto K & Levin DE (1993b) A yeast mitogen-activated protein kinase homolog (Mpk1p) mediates signalling by protein kinase C. *Mol Cell Biol* 13: 3067–3075
- Lee S, Ho H-C, Tumolo JM, Hsu P-C & MacGurn JA (2019) Methionine triggers Ppz-mediated dephosphorylation of Art1 to promote cargo-specific endocytosis. *J Cell Biol* 218: 977–992
- Lee S, Tumolo JM, Ehlinger AC, Jernigan KK, Qualls-Histed SJ, Hsu P-C, McDonald WH, Chazin WJ & MacGurn JA (2017) Ubiquitin turnover and endocytic trafficking in yeast are regulated by Ser57 phosphorylation of ubiquitin. *Elife* 6
- Leiter É, González A, Erdei É, Casado C, Kovács L, Ádám C, Oláh J, Miskei M, Molnar M, Farkas I, *et al* (2012) Protein phosphatase Z modulates oxidative stress response in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 49: 708–716
- Levin DE (2005) Cell Wall Integrity Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69: 262–291
- Levin DE (2011) Regulation of Cell Wall Biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: The Cell Wall Integrity Signaling Pathway. *Genetics* 189: 1145–1175

- Liu H, Krizek J & 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
- Liu H & Naismith JH (2008) An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol. *BMC Biotechnol* 8: 91
- Liu J, Perumal NB, Oldfield CJ, Su EW, Uversky VN & Dunker AK (2006) Intrinsic disorder in transcription factors. *Biochemistry* 45: 6873–88
- Madrid R, MJ G, Ramos J & Rodriguez-Navarro A (1998) Ectopic potassium uptake in *trk1 trk2* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membrane potential. *Journal of Biological Chemistry* 273: 14838–14844
- Makanae K, Kintaka R, Makino T, Kitano H & Moriya H (2013) Identification of dosage-sensitive genes in *Saccharomyces cerevisiae* using the genetic tug-of-war method. *Genome Res*: 300–311
- Mendoza I, Rubio F, Rodriguez-Navarro A & Pardo JM (1994) The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 269: 8792–6
- Merchan S, Bernal D, Serrano R & 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
- Merchan S, Pedelini L, Hueso G, Calzada A, Serrano R & Yenush L (2011) Genetic alterations leading to increases in internal potassium concentrations are detrimental for DNA integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells* 16: 152–65
- Minhas A, Sharma A, Kaur H, Rawal Y, Ganesan K & Mondal AK (2012) Conserved Ser/Arg-rich motif in PPZ orthologs from fungi is important for its role in cation tolerance. *Journal of Biological Chemistry* 287: 7301–7312
- Molero C, Casado C & Arino J (2017) The inhibitory mechanism of Hal3 on the yeast Ppz1 phosphatase: A mutagenesis analysis. *Sci Rep* 7: 8819
- Molero C, Petrényi K, González A, Carmona M, Gelis S, Abrie JA, Strauss E, Ramos J, Dombradi V, Hidalgo E, *et al* (2013) The *Schizosaccharomyces pombe* fusion gene *HAL3* encodes three distinct activities. *Mol Microbiol* 90: 367–382
- Moorhead GBG, De Wever V, Templeton G & Kerk D (2009) Evolution of protein phosphatases in plants and animals. *Biochemical Journal* 417: 401–409

- Moorhead GBG, Trinkle-Mulcahy L & Ulke-Lemée A (2007) Emerging roles of nuclear protein phosphatases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 234–244
- Mulet JM, Leube MP, Kron SJ, Rios G, Fink GR & Serrano R (1999) A novel mechanism of ion homeostasis and salt tolerance in yeast: the Hal4 and Hal5 protein kinases modulate the Trk1-Trk2 potassium transporter. *Mol Cell Biol* 19: 3328–3337
- Muñoz I, Ruiz A, Marquina M, Barceló A, Albert A & Ariño J (2004) Functional characterization of the yeast Ppz1 phosphatase inhibitory subunit Hal3: a mutagenesis study. *Journal of Biological Chemistry* 279: 42619–42627
- Muñoz I, Simón E, Casals N, Clotet J & Ariño J (2003) Identification of multicopy suppressors of cell cycle arrest at the G<sub>1</sub>-S transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 20: 157–169
- Mü S & Kollmar M (2014) Molecular Phylogeny of Sequenced *Saccharomycetes* Reveals Polyphyly of the Alternative Yeast Codon Usage. *Genome Biol Evol* 6(12):3222-37.
- de Nadal E, Calero F, Ramos J & Ariño J (1999) Biochemical and genetic analyses of the role of yeast casein kinase 2 in salt tolerance. *J Bacteriol* 181: 6456–6462
- de Nadal E, Clotet J, Posas F, Serrano R, Gomez N & 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
- de Nadal E, Fadden RP, Ruiz A, Haystead T & Ariño J (2001) A Role for the Ppz Ser/Thr Protein Phosphatases in the Regulation of Translation Elongation Factor 1B $\alpha$ . *Journal of Biological Chemistry* 276: 14829–14834
- Offley SR & Schmidt MC (2019) Protein phosphatases of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 65: 41–55
- Ohkura H, Kinoshita N, Miyatani S, Toda T & Yanagida M (1989) The fission yeast *dis2*<sup>+</sup> gene required for chromosome disjoining encodes one of two putative type 1 protein phosphatases. *Cell* 57: 997–1007
- Olsen J v., Blagoev B, Gnad F, Macek B, Kumar C, Mortensen P & Mann M (2006) Global, In Vivo, and Site-Specific Phosphorylation Dynamics in Signaling Networks. *Cell* 127: 635–648
- Olzhausen J, Moritz T, Neetz T & Sch H (2013) Molecular characterization of the heteromeric coenzyme A-synthesizing protein complex (CoA-SPC) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 13: 565–573
- Oughtred R, Stark C, Breitkreutz B-J, Rust J, Boucher L, Chang C, Kolas N, O'Donnell L, Leung G, McAdam R, *et al* (2019) The BioGRID interaction database: 2019 update. *Nucleic Acids Res* 47: D529–D541

- Peng ZY, Trumbly RJ & Reimann EM (1990) Purification and characterization of glycogen synthase from a glycogen-deficient strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 265: 13871–7
- Pérez-Valle J, Jenkins H, Merchan S, Montiel V, Ramos J, Sharma S, Serrano R & Yenush L (2007) Key Role for Intracellular K<sup>+</sup> and Protein Kinases Sat4/Hal4 and Hal5 in the Plasma Membrane Stabilization of Yeast Nutrient Transporters. *Mol Cell Biol* 27: 5725–5736
- Peti W, Nairn AC & Page R (2013) Structural basis for protein phosphatase 1 regulation and specificity. *FEBS Journal* 280: 596–611
- Petrényi K, Molero C, Kónya Z, Erdődi F, Ariño J & Dombrádi V (2016) Analysis of Two Putative *Candida albicans* Phosphopantothienoylcysteine Decarboxylase / Protein Phosphatase Z Regulatory Subunits Reveals an Unexpected Distribution of Functional Roles. *PLoS One* 11: e0160965
- Pinna LA & Ruzzene M (1996) How do protein kinases recognize their substrates? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1314: 191–225
- Posas F, Camps M & Arino J (1995) The Ppz protein phosphatases are important determinants of salt tolerance in yeast cells. *Journal of Biological Chemistry* 270: 13036–13041
- Posas F, Casamayor A & Arino J (1993) The PPZ protein phosphatases are involved in the maintenance of osmotic stability of yeast cells. *FEBS Lett* 318: 282–286
- Posas F, Casamayor A, Morral N & Arino J (1992) Molecular cloning and analysis of a yeast protein phosphatase with an unusual amino-terminal region. *Journal of Biological Chemistry* 267: 11734–11740
- Prior C, Potier S, Souciet JL & Sychrova H (1996) Characterization of the *NHA1* gene encoding a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiporter of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 387: 89–93
- Rodríguez-Navarro A & Benito B (2010) Sodium or potassium efflux ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1798: 1841–1853
- Rodríguez-Navarro A, Quintero FJ & Garciadeblás B (1994) Na<sup>+</sup>-ATPases and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters in fungi. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1187: 203–205
- Rodríguez-Navarro A & Ramos J (1984) Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 159: 940–945

- Rogers S, McCloy R, Watkins DN & Burgess A (2016) Mechanisms regulating phosphatase specificity and the removal of individual phosphorylation sites during mitotic exit. *BioEssays* 38: S24–S32 doi:10.1002/bies.201670905 [PREPRINT]
- Ruiz A & Ariño J (2007) Function and Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* ENA Sodium ATPase System. *Eukaryot Cell* 6: 2175–2183
- Ruiz A, González A, Muñoz I, Serrano R, Abrie JA, Strauss E & Ariño J (2009) Moonlighting proteins Hal3 and Vhs3 form a heteromeric PPCDC with Ykl088w in yeast CoA biosynthesis. *Nat Chem Biol* 5: 920–928
- Ruiz A, Muñoz I, Serrano R, González A, Simón E & Ariño J (2004) Functional characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* VHS3 gene: A regulatory subunit of the Ppz1 protein phosphatase with novel, phosphatase-unrelated functions. *Journal of Biological Chemistry* 279: 34421–34430
- Ruiz A, Yenush L & Ariño J (2003) Regulation of ENA1 Na<sup>+</sup>-ATPase gene expression by the Ppz1 protein phosphatase is mediated by the calcineurin pathway. *Eukaryot Cell* 2: 937–948
- Santolaria C, Velázquez D, Albacar M, Casamayor A & Ariño J (2022) Functional mapping of the N-terminal region of the yeast moonlighting protein Sis2/Hal3 reveals crucial residues for Ppz1 regulation. *FEBS J*
- Santolaria C, Velázquez D, Strauss E & Ariño J (2018) Mutations at the hydrophobic core affect Hal3 trimer stability, reducing its Ppz1 inhibitory capacity but not its PPCDC moonlighting function. *Sci Rep* 8: 14701
- Schweighofer A & Meskiene I (2015) Phosphatases in Plants. In pp 25–46.
- Serrano R (1996) Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int Rev Cytol* 165: 1–52
- Sharmin D, Sasano Y, Sugiyama M & Harashima S (2014) Effects of deletion of different PP2C protein phosphatase genes on stress responses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 31: 393–409
- Shi Y (2009a) Assembly and structure of protein phosphatase 2A. *Sci China C Life Sci* 52: 135–146
- Shi Y (2009b) Serine/Threonine Phosphatases: Mechanism through Structure. *Cell* 139: 468–484
- Sikorski RS & Hieter P (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122: 19–27

- Song W & Carlson M (1998) Srb/mediator proteins interact functionally and physically with transcriptional repressor Sfl1. *EMBO J* 17: 5757–5765
- Spitzer ED & Weiss B (1985) dfp Gene of *Escherichia coli* K-12, a locus affecting DNA synthesis, codes for a flavoprotein. *J Bacteriol* 164: 994–1003
- Stark MJR (1996) Yeast Protein Serine/Threonine Phosphatases: Multiple Roles and Diverse Regulation. *Yeast* 12: 1647–1675
- Steinbacher S, Hernandez-Acosta P, Bieseler B, Blaesse M, Huber R, Culianez-Macia FA & Kupke T (2003) Crystal structure of the plant PPC decarboxylase AtHAL3a complexed with an ene-thiol reaction intermediate. *J Mol Biol* 327: 193–202
- Strauss E, Kinsland C, Ge Y, McLafferty FW & Begley TP (2001) Phosphopantothenoylecysteine synthetase from *Escherichia coli*. Identification and characterization of the last unidentified coenzyme A biosynthetic enzyme in bacteria. *Journal of Biological Chemistry* 276: 13513–13516
- Swaney DL, Beltrao P, Starita L, Guo A, Rush J, Fields S, Krogan NJ & Villén J (2013) Global analysis of phosphorylation and ubiquitylation cross-talk in protein degradation. *Nat Methods* 10: 676–682
- Szabó K, Miskei M, Farkas I & Dombrádi V (2021) The phosphatome of opportunistic pathogen *Candida* species. *Fungal Biol Rev* 35: 40–51
- Taylor RG, Walker DC & McInnes RR (1993) *E. coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic Acids Res* 21: 1677–1678
- Tompa P, Szász C & Buday L (2005) Structural disorder throws new light on moonlighting. *Trends Biochem Sci* 30: 484–489
- Velázquez D, Albacar M, Zhang C, Calafí C, López-Malo M, Torres-Torronteras J, Martí R, Kovalchuk SI, Pinson B, Jensen ON, *et al* (2020) Yeast Ppz1 protein phosphatase toxicity involves the alteration of multiple cellular targets. *Sci Rep* 10: 15613
- Venturi GM, Bloecher A, Williams-Hart T & Tatchell K (2000) Genetic interactions between GLC7, PPZ1 and PPZ2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 155: 69–83
- Verbinnen I, Ferreira M & Bollen M (2017) Biogenesis and activity regulation of protein phosphatase 1. *Biochem Soc Trans* 45: 89–99
- Virshup DM & Shenolikar S (2009) From Promiscuity to Precision: Protein Phosphatases Get a Makeover. *Mol Cell* 33: 537–545
- Vissi E, Clotet J, de Nadal E, Barcelo A, Bako E, Gergely P, Dombradi V & Ariño J (2001) Functional analysis of the *Neurospora crassa* PZL-I protein phosphatase by expression in budding and fission yeast. *Yeast* 18: 115–124

- Vlastaridis P, Kyriakidou P, Chaliotis A, van de Peer Y, Oliver SG & Amoutzias GD (2017) Estimating the total number of phosphoproteins and phosphorylation sites in eukaryotic proteomes. *Gigascience* 6
- Wakula P, Beullens M, Ceulemans H, Stalmans W & Bollen M (2003) Degeneracy and Function of the Ubiquitous RVXF Motif That Mediates Binding to Protein Phosphatase-1. *Journal of Biological Chemistry* 278: 18817–18823
- Wang Q-M, Liu W-Q, Liti G, Wang S-A & Bai F-Y (2012) Surprisingly diverged populations of *Saccharomyces cerevisiae* in natural environments remote from human activity. *Mol Ecol* 21: 5404–5417
- Wiederhold E, Veenhoff LM, Poolman B & Slotboom DJ (2010) Proteomics of *Saccharomyces cerevisiae* Organelles. *Mol Cell Proteomics*: 431–445
- Wieland J, Nitsche AM, Strayle J, Steiner H & Rudolph HK (1995) The *PMR2* gene cluster encodes functionally distinct isoforms of a putative Na<sup>+</sup> pump in the yeast plasma membrane. *EMBO J* 14: 3870–3882
- Winzeler EA, Shoemaker DD, Astromoff A, Liang H, Anderson K, Andre B, Bangham R, Benito R, Boeke JD, Bussey H, *et al* (1999) Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* 285: 901–906
- Wright PE & Dyson HJ (2015) Intrinsically disordered proteins in cellular signalling and regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16: 18–29
- Wu X & Tatchell K (2001) Mutations in Yeast Protein Phosphatase Type 1 that Affect Targeting Subunit Binding. *Biochemistry* 40: 7410–7420
- Yang J, Gao M, Xiong J, Su Z & Huang Y (2019) Features of molecular recognition of intrinsically disordered proteins via coupled folding and binding. *Protein Science* 28: 1952–1965
- Yenush L (2016) Potassium and Sodium Transport in Yeast. In pp 187–228.
- Yenush L, Merchan S, Holmes J & 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 JM, Arino J & Serrano R (2002) The Ppz protein phosphatases are key regulators of K<sup>+</sup> and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression. *EMBO J* 21: 920–929
- Ye Y, Osterman A, Overbeek R & Godzik A (2005) Automatic detection of subsystem/pathway variants in genome analysis. *Bioinformatics* 21 Suppl 1: i478-86

- Yonemoto W, McGlone ML & Taylor SS (1993) N-myristylation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase conveys structural stability. *Journal of Biological Chemistry* 268: 2348–52
- Zhang C, García-Rodas R, Molero C, de Oliveira HC, Tabernero L, Reverter D, Zaragoza O & Ariño J (2019a) Characterization of the atypical Ppz/Hal3 phosphatase system from the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* 111: 898–917
- Zhang C, de la Torre A, Pérez-Martín J & Ariño J (2019b) Protein Phosphatase Ppz1 Is Not Regulated by a Hal3-Like Protein in Plant Pathogen *Ustilago maydis*. *Int J Mol Sci* 20
- Zhao S & Lee EYC (1997) A Protein Phosphatase-1-binding Motif Identified by the Panning of a Random Peptide Display Library. *Journal of Biological Chemistry* 272: 28368–28372

# 10. Anexos



Tabla A1. Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en esta Tesis.

Cepa	Genotipo	Referencia
BY4741	<i>MAT a his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	(Winzeler <i>et al</i> , 1999)
BY4741 <i>hal3Δ</i>	BY4741 <i>hal3::KanMX4</i>	(Winzeler <i>et al</i> , 1999)
BY4741 <i>ppz1Δ</i>	BY4741 <i>ppz1::KanMX4</i>	(Brachmann <i>et al</i> , 1998)
BY4741 <i>slt2Δ</i>	BY4741 <i>slt2::KanMX4</i>	(Winzeler <i>et al</i> , 1999)
ZCZ01	BY4741 <i>pGAL:PPZ1:KanMX6</i>	(Calafí <i>et al</i> , 2020b)
MAC003	BY4741 <i>pGAL:PPZ1:KanMX6 + GFP</i> C-terminal	(Albacar <i>et al</i> , 2022)
JA100	<i>Mat a ura3-52 leu2-3,112 trp1-1 his4 can-1r</i>	(de Nadal <i>et al</i> , 1998)
IM0021	JA100 <i>ppz1::KanMX4 hal3::LEU2</i>	(Muñoz <i>et al</i> , 2004)
JC10	JA100 <i>slt2::LEU2</i>	(Vissi <i>et al</i> , 2001)
CCV186	JA100 <i>slt2::LEU2 hal3::KanMX</i>	(Petrényi <i>et al</i> , 2016)
AGS9	JA100 <i>ppz1::LEU2</i>	(Canadell <i>et al</i> , 2015)
EDN76-5	JA100 <i>ppz1::KanMX ppz2::TRP1</i>	(Ruiz <i>et al</i> , 2003)
DBY746	<i>MAT α his3Δ1 leu2Δ3 112 ura3-52 trp1-289 met15Δ0 ura3Δ0</i>	David Botstein
EDN4	DBY746 <i>hal3::LEU2</i>	(de Nadal <i>et al</i> , 1999)
DBY746 <i>ppz1Δ</i>	DBY746 <i>ppz1::LEU2</i>	R. Serrano, stock del laboratorio
MAR25	<i>MAT α/α ura3-52 leu2-3, 112 trp1-1 his 4 can-1r CAB3/cab3::KanMX4</i>	(Ruiz <i>et al</i> , 2009)
AGS4	<i>MAT α/α ura3-52 leu2-3, 112 trp1-1 his 4 can-1r HAL3/hal3::LEU2 VHS3/vhs3::KanMX4</i>	(Ruiz <i>et al</i> , 2004)

Tabla A2. Oligonucleótidos utilizados en esta Tesis.

Nombre	Secuencia (5'-3')
AtHal3_EcoRI_5	CGTGAATTCGAGAATGGGAAAAGAGACAG
AtHal3_Sall_3	TACGTCGACTTAAGTCCACCGGTTT
AtHal3_L117E_5	AAGATTGCTGGTGGGGAATGTGATAATCTTCTGACTTGC
AtHal3_L117E_3	TCAGAAGATTATCACATTCCCCACCAGCAATCTT
AtHal3_G115N_L117E_5	CCTTAGGCAAGATTGCTAATGGGGAATGTGATAATC
AtHal3_G115N_L117E_3	GATTATCACATTCCCCATTAGCAATCTTGCCTAAGG
ScHal3_L405E_5	AAAATTGCTTTGGGCGAATGCGACAATCTTCTGACAA
ScHal3_L405E_3	CAGAAGATTGTCGCATTCGCCAAAGCAATTTTTGATAA
ScHal3 L403N 5'	TTATCAAAAATTGCTAATGGCCTGTGCGACAATCT
ScHal3 L403N 3'	GATTGTGCGCACAGGCCATTAGCAATTTTTGATAATG
ScHal3_L403N_L405E_5	TTATCAAAAATTGCTAATGGCGAATGCGACAATCT
ScHal3_L403N_L405E_3	GATTGTGCGCATTCGCCATTAGCAATTTTTGATAATG
5HAL3_EcoRI	GGGAATTCATGACTGCCGTGCGCTCTACT
3HAL3_XhoI	CACGCTCGAGCATAGACTATTTATTGATGC
3' Hal3 Δ39-51	TAGGGCTTATTGATTGCCTCGCATCCTCATGGTCCAA
5' Hal3 Δ39-51	TTGGACCATGAGGATGCGAGGCAATCAATAAGCCCTACT
3' Hal3 Δ67-93	ATCACTGAAAGTGACGGCAGTCGTGGTAGTAGCATT
5' Hal3 Δ67-93	AATGCTACTACCACGACTGCCGTCACTTTCAGTGATC
3' Hal3 Δ67-110	TGAGTCGTTCTTCAGCTGAGTCGTGGTAGTAGCATT
5' Hal3 Δ67-110	AATGCTACTACCACGACTCAGCTGAAGAACGACTCAG
3' Hal3 Δ94-110	TGAGTCGTTCTTCAGCTGGGGGACTCTCTCAAACCAG
5' Hal3 Δ94-110	GGTTTGAAGAGAGTCCCCCAGCTGAAGAACGACTCAG
3' Hal3 Δ118-148	CCCAGATAATTGCGTTGTTTCTGAGTCGTTCTTCAGC
5' Hal3 Δ118-148	CTGAAGAACGACTCAGAAACAACGCAATTATCTGGG
3' Hal3 Δ209-227	CGTTTCTCCGGGGTAGAAAGTGTAATACTGGTGGGG
5' Hal3 Δ209-227	CCCACCAGTATTACACTTTCTACCCCGGAAGAAACG
3' Hal3 Δ248-256	TCCATCATCTTGAGGTAGTTTGGGGATGATGGAAGGAA
5' Hal3 Δ248-256	CCTTCCATCATCCCCAACTACCTCAAGATGATGAAAAATT
5' ScHal3 Δ67-73	CGAATGCTACTACCACGACTACCGGCACCTCCGGCGCAG
3' ScHal3 Δ67-73	CTGCGCCGGAGGTGCCGGTAGTCGTGGTAGTAGCATTCCG
5' ScHal3 Δ67-80	AGTCGTGGTAGTAGCATTCCGGTAGTAAGTAATACTCCGGAGC
3' ScHal3 Δ67-80	GCTCCGGAGTATTACTTACTACAGTCGTGGTAGTAGCATTCCG
5' ScHal3 Δ67-91	CGAATGCTACTACCACGACTAGAGTCCCCGCCGTCCTT
3' ScHal3 Δ67-91	AAGTGACGGCGGGGACTCTAGTCGTGGTAGTAGCATTCCG
5' ScHal3 Δ90-98	ACTCCGGAGCCTGTTTGGATCTAAAGCAACAGCAAAAGC
3' ScHal3 Δ90-98	CTTTTGCTGTTGCTTTAGATCCAAACCAGGCTCCGGAGT
5' ScHal3 Δ97-110	AGAGTCCCCGCCGTCCTCAGCTGAAGAACGACTCAGA
3' ScHal3 Δ97-110	TCTGAGTCGTTCTTCAGCTGAGTGACGGCGGGGACTCT
5' ScHal3 Δ105-110	GTGATCTAAAGCAACAGCAACAGCTGAAGAACGACTCAGA
3' ScHal3 Δ105-110	TCTGAGTCGTTCTTCAGCTGTTGCTGTTGCTTTAGATCAC
3' Hal3 K90E R91E	GAAAGTGACGGCGGGGACTTCTTCCAAACCAGGCTCCGGAGT
5' Hal3 K90E R91E	ACTCCGGAGCCTGTTTGGGAAGAAGTCCCCGCCGTCCTTTC

3' Hal3 K90Q R91Q	GAAAGTGACGGCGGGGACTTGTGCAAACCAGGCTCCGGAGT
5' Hal3 K90Q R91Q	ACTCCGGAGCCTGTTTTGCAACAAGTCCCCGCCGTCACCTTC
3' Hal3 V95S T96A F97A S98A	TTTTGCTGTTGCTTTAGATCAGCAGCAGCAGAGGCGGGGACTCTCTTCAA
5' Hal3 V95S T96A F97A S98A	TTGAAGAGAGTCCCCGCCTCTGCTGCTGCTGATCTAAAGCAACAGCAAAA
3' Hal3 T96A S98A	TTTTGCTGTTGCTTTAGATCAGCGAAAGCGACGGCGGGGACTCTCTT
5' Hal3 T96A S98A	AAGAGAGTCCCCGCCGTCGCTTTGCTGATCTAAAGCAACAGCAAAA
3' Hal3 T96E S98D	TTTTGCTGTTGCTTTAGATCATCGAATTCGACGGCGGGGACTCTCTT
5' Hal3 T96E S98D	AAGAGAGTCCCCGCCGTCGAATTCGATGATCTAAAGCAACAGCAAAA
3' HAL3 T96E F97Y S98D	TTTTGCTGTTGCTTTAGATCATCATATTCGACGGCGGGGACTCTCTT
5' HAL3 T96E F97Y S98D	AAGAGAGTCCCCGCCGTCGAATATGATGATCTAAAGCAACAGCAAAA
3' Hal3 Q102-104A	AGTCAGACTATCCTGCTTAGCAGCAGCCTTTAGATCACTGAAAGTGACG
5' Hal3 Q102-104A	CGTCACTTTCAGTGATCTAAAGGCTGCTGCTAAGCAGGATAGTCTGACT
3' Hal3 F97A	TTGCTGTTGCTTTAGATCACTAGCAGTGACGGCGGGGACTCT
5' Hal3 F97A	AGAGTCCCCGCCGTCACTGCTAGTGATCTAAAGCAACAGCAA
3' Hal3 F97Y	TTGCTGTTGCTTTAGATCACTATAAGTGACGGCGGGGACTCT
5' Hal3 F97Y	AGAGTCCCCGCCGTCACTTATAGTGATCTAAAGCAACAGCAA
3' Hal3 V95A	GTTGCTTTAGATCACTGAAAGTAGCGGCGGGGACTCTCTTCAAA
5' Hal3 V95A	TTTGAAGAGAGTCCCCGCCGCTACTTTCAGTGATCTAAAGCAAC
3' Hal3 V95S	GTTGCTTTAGATCACTGAAAGTAGAGGCGGGGACTCTCTTCAAA
5' Hal3 V95S	TTTGAAGAGAGTCCCCGCCTCTACTTTCAGTGATCTAAAGCAAC
5' CaCab3 Megaprimer	TCATCATCAACACCTTCCAATCAAATTCTAACCAATTCTTCAAAGAAG
3' CaCab3 Megaprimer	CAATGCACCACCCGCCATCACAGTATTGTCTATATCAGAAAACGATACAC
3' CaCab3 +100 Bst1107I	TCAGCCATTCTCTCATACCTCCCATACCAAT
Seq Primer5' CaHal3 KspAI	CATCTCCAGTTAACAGTGG
5' CaHal3 megaprimer	AGTGGTATTGCACCACCAACGAAACCAGCAACTATCAAGTTATCACC
3' CaHal3 megaprimer	TGTAATCGACGGGAACGTTCTTGCTCACGATTTTCCAGTGAGATT
3' CaHal3 + 80 Bsu15I	TCGACAAGGTGTTGGCAGTCATTGGACAAA
Seq Primer 3' CaHal3	GGCAGCGGCTGAGTGTGG
Hal3 Rev seq core	CCTCATCCTCATCATCGTC
3'_HAL3+920	CTGTGTTGCTGATTGAGTGAG
pGEX 5 Sequencing Primer	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG
pGEX 3 Sequencing Primer	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG
HAL3prom_3_Sall	CATGTGCGACTGCTGTTTGCTTCTAGATCTTTC
Ppz1 Δ20-52 3'	AATTAGTATTCGTAGTGGACGACGAGGAGGAATTCGAATGTG
Ppz1 Δ20-52 5'	CACATTCGAATTCCTCCTCGTCCACTACGAATACTAATT
Ppz1 Δ69-106 3'	CTCTTAGTAGAGGATGATGAAGGTGGAGTGGAGGGATCAGGGA
Ppz1 Δ69-106 5'	TCCCTGATCCCTCCACTCCACCTTCATCATCCTCTACTAAGAG
Ppz1 Δ123-146 3'	GTGTGTGCTACTATTGTTTGTACTTGATCTTCTAGAAGTAGAAGG
Ppz1 Δ123-146 5'	CCTTCTACTTCTAGAAGATCAAGTACAAACAATAGTAGCACACAC
Ppz1 Δ226-236 3'	GCGAAGATGCATGAGAATTTGAATTGTTAGAGGAGTATGATCCATTG
Ppz1 Δ226-236 5'	CAATGGATCATACTCCTCTAACAATTCAAATTCTCATGCATCTTCGC
Ppz1 Δ312-319 3'	TATTTTTATCATTAAACATTTTCCATAGATGAATTTTCAATGTCATCATC
Ppz1 Δ312-319 5'	GATGATGACATTGAAAATTCATCTATGGAAAATGTTAATGATAAAAATA
pGEX 3 Sequencing Primer	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG
Ppz1_5'_cat	CAAGTCGCGATATTTACCCG

Ppz1_BspEI_3	TTGTTTCCGGAAGATTGCA
Ppz1_Promotor_BamHI	GTGGATCCATG TTCAGATAG
5_Ppz1_D566K	CTTTTGTGGTCCGATCCCACAAAATCACCCAACGAATGGGAGG
3_Ppz1_D566K	CCTCCATTTCGTTGGGTGATTTTGTGGGATCGGACCACAAAAG
5_Ppz1_D615K	GGAAGACGGTTATGAATTTTTCAATAAAAGAAGTCTCGTTACGGTG
3_Ppz1_D615K	CACCGTAACGAGACTTCTTTTATTGAAAAATTCATAACCGTCTTCC
M13rev	CAGGAAACAGCTATGAC
PPZ1_5'_seq_cat	TGCTATCGTAGCCGAAAGA

Tabla A3. Condiciones de las PCR de solapamiento de las construcciones de Ppz1.

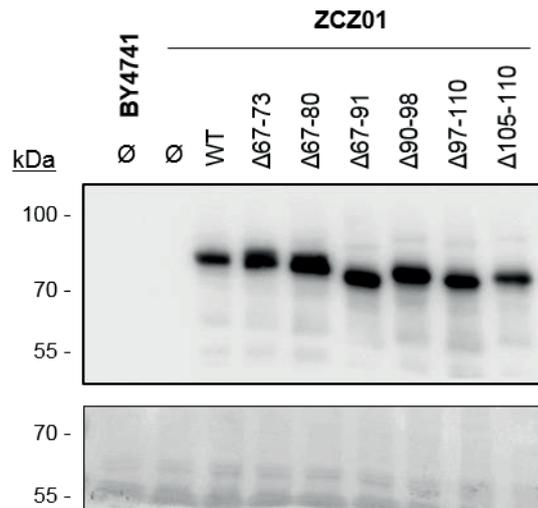
Plásmido	Molde	Oligonucleótidos 1ª PCR	Oligonucleótidos 2ª PCR	PCR de solapamiento	Clonado en pRS316-Ppz1
pRS316-Ppz1-D566K	pRS316-Ppz1	Ppz1_5'_seq_cat	5_Ppz1_D566K	Ppz1_5'_seq_cat M13rev	PacI HindIII
		3_Ppz1_D566K	M13rev		
pRS316-Ppz1-D615K		Ppz1_5'_seq_cat	5_Ppz1_D615K		
		3_Ppz1_D615K	M13rev		
pRS316-Ppz1-D566K-615K	pRS316-Ppz1-D566K	Ppz1_5'_seq_cat	5_Ppz1_D615K		
		3_Ppz1_D615K	M13rev		
		3'_HAL3+920	3'_Hal3_V95A		
pGEX-6P-1-V9S		5'_Hal3_V95S	pGEX 5 Sequencing Primer		
		3'_HAL3+920	3'_Hal3_V95S		
pGEX-6P-1-F97A		5'_Hal3_F97A	pGEX 5 Sequencing Primer		
		3'_HAL3+920	3'_Hal3_F97A		
pGEX-6P-1-F97Y		5'_Hal3_F97Y	pGEX 5 Sequencing Primer		
	3'_HAL3+920	3'_Hal3_F97Y			

Tabla A 4. Condiciones de las PCR de solapamiento de las construcciones de ScHal3.

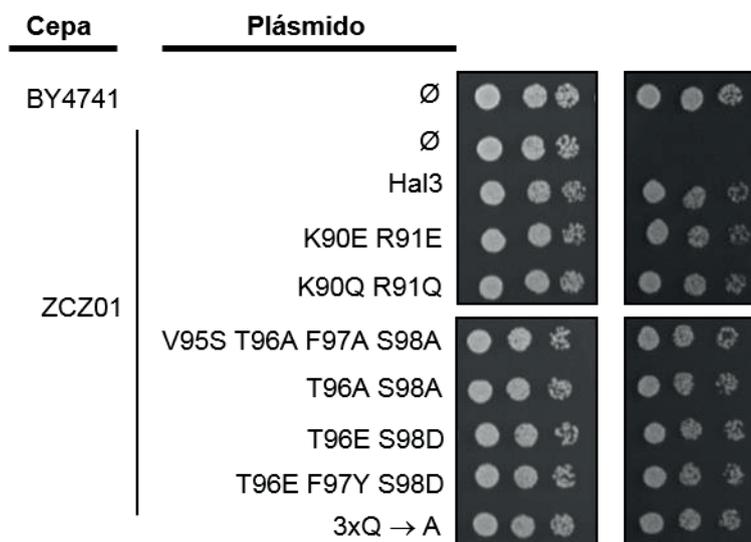
Plásmido	Molde	Oligonucleótidos 1ª PCR	Oligonucleótidos 2ª PCR	PCR de solapamiento	Clonado en pGEX-6P-1
pGEX-6P-1-ScHal3_L403N	pGEX-6P-1_ScHal3	5HAL3_EcoRI	ScHal3 L403N 5'	5HAL3_EcoRI 3HAL3_XhoI	EcoRI XhoI
		ScHal3 L403N 3'	3HAL3_XhoI		
pGEX-6P-1-ScHal3_L403N_L405E	pGEX-6P-1_ScHal3_L405E	5HAL3_EcoRI	ScHal3_L403N_L405E_5	5HAL3_EcoRI 3HAL3_XhoI	
		ScHal3_L403N_L405E_3	3HAL3_XhoI		
pGEX-6P-1-Δ39-51	pGEX-6P-1_ScHal3	5'_Hal3_Δ39-51	pGEX 5' Sequencing Primer	pGEX 5' Sequencing Primer pGEX 3' Sequencing Primer	
		pGEX 3 Sequencing Primer	3'_Hal3_Δ39-51		
pGEX-6P-1-Δ67-93		5'_Hal3_Δ67-93	pGEX 5' Sequencing Primer		
		pGEX 3 Sequencing Primer	3'_Hal3_Δ67-93		
pGEX-6P-1-Δ67-110		5'_Hal3_Δ67-110	pGEX 5' Sequencing Primer		
		pGEX 3 Sequencing Primer	3'_Hal3_Δ67-110		
pGEX-6P-1-Δ94-110		5'_Hal3_Δ94-110	pGEX 5' Sequencing Primer		
		pGEX 3 Sequencing Primer	3'_Hal3_Δ94-110		
pGEX-6P-1-Δ118-148		5'_Hal3_Δ118-148	pGEX 5' Sequencing Primer		
		pGEX 3 Sequencing Primer	3'_Hal3_Δ118-148		
pGEX-6P-1-Δ209-227		5'_Hal3_Δ209-227	pGEX 5' Sequencing Primer		
		pGEX 3 Sequencing Primer	3'_Hal3_Δ209-227		
pGEX-6P-1-Δ248-256	5'_Hal3_Δ248-256	pGEX 5' Sequencing Primer			
	pGEX 3 Sequencing Primer	3'_Hal3_Δ248-256			

pGEX-6P-1-Δ67-73	pGEX-6P-1_ScHal3	5'_ScHal3_Δ67-73	pGEX 5' Sequencing Primer	pGEX 5' Sequencing Primer 3'_HAL3+920	BamHI			
		3'_HAL3+920	3'_ScHal3_Δ67-73					
pGEX-6P-1-Δ67-80		5'_ScHal3_Δ67-80	pGEX 5' Sequencing Primer					
		3'_HAL3+920	3'_ScHal3_Δ67-80					
pGEX-6P-1-Δ67-91		5'_ScHal3_Δ67-91	pGEX 5' Sequencing Primer					
		3'_HAL3+920	3'_ScHal3_Δ67-91					
pGEX-6P-1-Δ90-98		5'_ScHal3_Δ90-98	pGEX 5' Sequencing Primer					
		3'_HAL3+920	3'_ScHal3_Δ90-98					
pGEX-6P-1-Δ97-110		5'_ScHal3_Δ97-110	pGEX 5' Sequencing Primer					
		3'_HAL3+920	3'_ScHal3_Δ97-110					
pGEX-6P-1-Δ105-110		5'_ScHal3_Δ105-110	pGEX 5' Sequencing Primer					
		3'_HAL3+920	3'_ScHal3_Δ105-110					
pGEX-6P-1-K90E_R91E		pGEX-6P-1_ScHal3	5'_Hal3_K90E_R91E			pGEX 5' Sequencing Primer	pGEX 5' Sequencing Primer Hal3 Rev seq core	KpnI/Kpn2I
			Hal3 Rev seq core			3'_Hal3_K90E_R91E		
pGEX-6P-1-K90Q_R91Q	5'_Hal3_K90Q_R91Q		pGEX 5' Sequencing Primer					
	Hal3 Rev seq core		3'_Hal3_K90Q_R91Q					
pGEX-6P-1-V95S_T96A_F97A_S98A	5'_Hal3_V95S_T96A_F97A_S98A		pGEX 5' Sequencing Primer					
	Hal3 Rev seq core		3'_Hal3_V95S_T96A_F97A_S98A					
pGEX-6P-1-T96A_S98A	5'_Hal3_T96A_S98A		pGEX 5' Sequencing Primer					
	Hal3 Rev seq core		3'_Hal3_T96A_S98A					
pGEX-6P-1-T96E_S98D	5'_Hal3_T96E_S98D		pGEX 5' Sequencing Primer					
	Hal3 Rev seq core		3'_Hal3_T96E_S98D					
pGEX-6P-1-T96E_F97Y_S98D	5'_Hal3_T96E_F97Y_S98D		pGEX 5' Sequencing Primer					
	Hal3 Rev seq core		3'_Hal3_T96E_F97Y_S98D					
pGEX-6P-1-Q102_Q103A_Q104A	5'_Hal3_Q102-104A		pGEX 5' Sequencing Primer					
	Hal3 Rev seq core		3'_Hal3_Q102-104A					

pGEX-6P-1-V95A	pGEX-6P-1_ScHal3	5'_Hal3_V95A	pGEX 5' Sequencing Primer	pGEX 5' Sequencing Primer 3'_HAL3+920	BamHI
		3'_HAL3+920	3'_Hal3_V95A		
pGEX-6P-1-V9S		5'_Hal3_V95S	pGEX 5' Sequencing Primer		
		3'_HAL3+920	3'_Hal3_V95S		
pGEX-6P-1-F97A		5'_Hal3_F97A	pGEX 5' Sequencing Primer		
		3'_HAL3+920	3'_Hal3_F97A		
pGEX-6P-1-F97Y		5'_Hal3_F97Y	pGEX 5' Sequencing Primer		
		3'_HAL3+920	3'_Hal3_F97Y		



**Figura A1. Inmunodetección de las diferentes versiones de ScHal3 expresadas en la cepa ZCZ01.** La cepa ZCZ01 se transformó con los plásmidos pWS93 indicados. Se prepararon los extractos proteínicos y los niveles de expresión de las diversas versiones de ScHal3 se examinaron mediante ensayos de inmunodetección como se describe en el apartado 4.9. de Materiales y Métodos (panel superior). Panel inferior: sección de membrana de PVDF teñida con rojo Ponceau para monitorizar la carga y la eficiencia de la transferencia.



**Figura A2. Ensayos de crecimiento en la cepa ZCZ01 de las versiones mutadas en la región 90-105 de ScHal3.** Tras transformar la cepa ZCZ01 con los plásmidos pWS93 indicados el ensayo se realizó como en la Figura 32. Fotografías tomadas 3 días después de la siembra.