

PROTEÍNA FOSFATASAS EN EUCARIOTAS: UN EJEMPLO DE CONSERVACIÓN DE ESTRUCTURAS Y DE DIVERSIDAD DE FUNCIONES

Josep Clotet, Francesc Posas, Eulàlia de Nadal, Lluís Balcells, Néstor Gómez y
Joaquín Ariño

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Universitat Autònoma de Barcelona

1. INTRODUCCIÓN

La fosforilación reversible de proteínas es, sin lugar a dudas, uno de los más importantes mecanismos de regulación de la actividad de las células eucariotas. El estado de fosforilación de una proteína dada puede determinar, por ejemplo, la actividad enzimática de la misma, su localización intracelular o su capacidad para interactuar con otras proteínas. En eucariotas, y desde un punto de vista cuantitativo, la fosforilación ocurre mayoritariamente en residuos de Ser y/o Thr, lo cual no es óbice para que la fosforilación de Tyr, aunque minoritaria, tenga una enorme importancia biológica [ver Dixon, 1996 para una revisión]. En mucha menor medida pueden encontrarse casos de fosforilación en otros residuos (p. ej., His).

Es evidente que, para poder desempeñar un papel regulador, la fosforilación de proteínas debe ser un proceso reversible. La transferencia de un fosfato de la posición gamma del ATP (o, en algún caso, del GTP) está catalizada por proteína quinasas, mientras que la hidrólisis de este fosfato viene catalizada por proteína fosfatasas (PF). Por motivos históricos, el papel de las primeras como reguladoras del “status” de fosforilación ha sido considerado preeminente. Sin embargo, esta visión tiende a verse modificada y, de manera progresiva, el papel de las PF va cobrando relevancia. En base a razones funcionales y estructurales, cabe distinguir entre las quinasas y fosfatasas que modifican residuos de Tyr y las que tienen como sustratos Ser o Thr. No obstante, debe tenerse en cuenta la existencia de un tercer grupo de enzimas, denominados “fosfatasas duales”, capaces de desfosforilar los tres tipos de residuos. En este capítulo nos centraremos en las proteína fosfatasas que

desfosforilan Ser y Thr (Ser/Thr proteína fosfatasas), intentando mostrar la complejidad de esta familia y la relevancia biológica de sus funciones.

Los estudios iniciales sobre las PF fueron de tipo eminentemente bioquímico, fundamentalmente en el contexto de la regulación metabólica. En base a una serie de criterios (como la sensibilidad a inhibidores endógenos y la especificidad de sustrato relativa a las subunidades a y b de la fosforilasa quinasa), a principios de los 80 se clasificó al conjunto de actividades fosfatasa conocidas por aquellas fechas en dos grupos: tipos 1 y 2. Las actividades de tipo 2 fueron, subsecuentemente, distribuidas en tres subgrupos: 2A, 2B y 2C, en base a criterios como la necesidad de cationes divalentes. Más adelante, se ha popularizado el empleo de determinadas toxinas (ácido okadaico, microcistina-LR, etc.) como herramientas para la identificación de los diferentes tipos de actividades fosfatasas en extractos celulares, en base a la supuesta capacidad de estos compuestos para inhibir selectivamente uno u otro tipo. Un resumen de las diferentes características de los cuatro tipos de PF puede verse en la Tabla I.

Tabla 1.- Características bioquímicas de las SER/THR fosfatasas clásicas

	PF-1	PF-2A	PF-2B	PF-2C
Subunidad de la fosforilasa quinasa ⁽¹⁾	b	a	a	a
Sensibilidad a Inhibidor-1 e Inhibidor-2	SI	NO	NO	NO
Sensibilidad a A. Okadaico. IC₅₀ (nM)	10	< 1	≈10000	----
Inhibición por heparina	SI	NO	NO	NO
Activación por poliaminas/policationes	NO	SI	NO	NO
Dependencia de cationes divalentes	NO	NO	Ca ⁺²	Mg ⁺²

⁽¹⁾ Se refiere a la subunidad del enzima fosforilasa quinasa que es desfosforilada de manera preferente.

Una característica importante de las PF encuadradas en esta clasificación es que, con la excepción de las tipo 2C, nos encontramos ante enzimas oligoméricos, compuestos por una subunidad catalítica y una o más subunidades reguladoras. Este hecho tiene enorme importancia, puesto que, como se verá más adelante, una misma subunidad catalítica puede combinarse con diferentes subunidades reguladoras, adquiriendo propiedades diferentes. Por otro lado, entre 1987 y 1989, la clonación de diversos cDNAs que codificaban las diferentes subunidades catalíticas de los cuatro tipos citados de fosfatasas puso de manifiesto varios datos importantes: en primer lugar que, desde un punto de vista estructural, las fosfatasas tipo 1, 2A y 2B constituían una familia fuertemente relacionada (Figura 1), mientras que la estructura de PF-2C era muy diferente. Por otro lado, que la estructura de estas proteínas (sobre todo los tipos 1 y 2A) está enormemente conservada a través de la evolución. Además de ello,

en numerosas especies se encuentran diferentes isoformas de estas subunidades catalíticas, a menudo con pocas diferencias estructurales. Finalmente, la disponibilidad de sondas de DNA procuraba la herramienta adecuada para explorar los genomas de diferentes organismos en busca de productos génicos estructuralmente relacionados con las PF identificadas inicialmente mediante criterios enzimológicos. Esta búsqueda ha resultado ser muy fructífera y, en la actualidad, conocemos una amplia variedad de “nuevas” fosfatasas (en oposición a las fosfatasas “clásicas”) cuya regulación y función comienzan a ser desveladas.

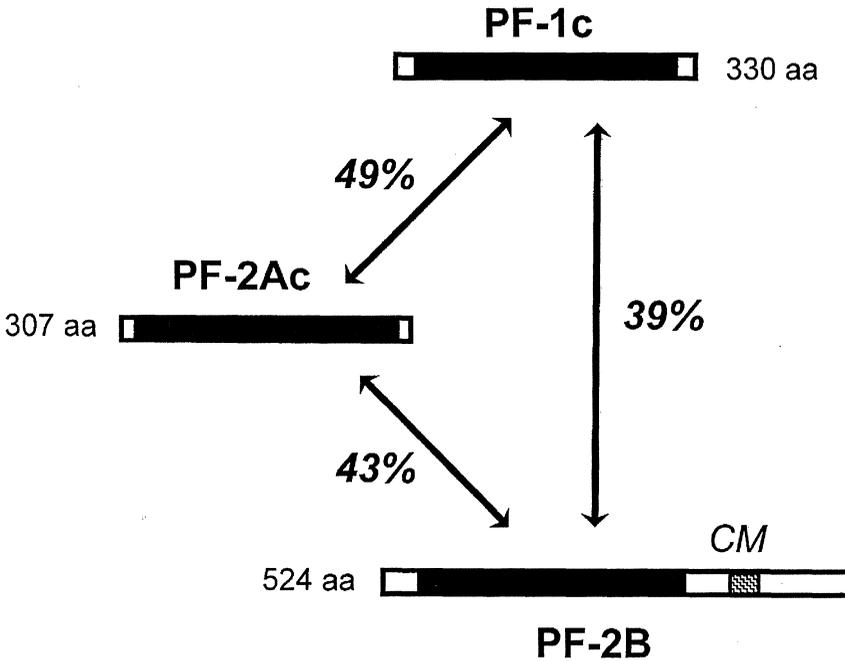


Figura 1. RELACIONES ESTRUCTURALES ENTRE PF-1c, PF-2Ac Y LA SUBUNIDAD CATALITICA DE LA PF-2B. Las regiones que corresponden al dominio fosfatasa conservado se resaltan en negro. Los porcentajes indican el grado de identidad entre las diferentes fosfatasas referido al dominio conservado. Se especifica, en cada caso, el número de aminoácidos de una isoforma típica de mamífero. CM significa el dominio de interacción con calmodulina exclusivo de la PF-2B.

2. PROTEINA FOSFATASA 1

En mamíferos existen al menos cuatro isoformas de la subunidad catalítica de la PF-1 (PF-1c), que se pueden expresar de manera más o menos general (PF-1 α y PF-1 δ) o preferente (PF-1 γ 1, en cerebro o PF-1 γ 2, en testículo). También en *Drosophila* se encuentran cuatro isoformas, mientras que en *S. pombe* se encuentran dos genes que codifican versiones diferentes de esta proteína y en *S. cerevisiae* tan sólo uno [Ohkura *et al.*, 1989]. Un caso espectacular lo constituye el reino vegetal, ya que en *A. thaliana* han sido clonadas al menos seis isoformas diferentes [Smith & Walker, 1993; Smith & Walker, 1996]. Todas estas proteínas poseen poco más de 300 aminoácidos y están fuertemente conservadas en su secuencia. Así pues, las PF-1 de levadura y las de mamíferos mantienen una identidad que llega al 80%. Recientemente, la subunidad catalítica PF-1a, expresada en *E. coli*, ha sido cristalizada y su estructura resuelta con una resolución de 2.1 Å, revelando que es un metaloenzima y que su arquitectura no guarda relación con la de las tirosinas fosfatasas [Goldberg *et al.*, 1995].

La estructura nativa de la PF-1 parece ser la de un complejo 1:1 entre la subunidad catalítica y diferentes subunidades reguladoras [Hubbard & Cohen, 1993]. El papel de estas subunidades reguladoras es el de dirigir la subunidad catalítica a una localización subcelular determinada (de ahí la denominación de *targeting subunits*) o bien el de incrementar su actividad respecto a determinados sustratos. Así por ejemplo, existe un holoenzima unido a glucógeno (PP1G) que es un heterodímero entre PF-1c y la subunidad G. Esta subunidad, que se ha purificado de músculo esquelético y clonado, tiene una masa de 124 kDa y es responsable de la unión de PF-1c a los gránulos de glucógeno, donde puede desfosforilar a la glucógeno sintasa y a la fosforilasa. La fosforilación por diversas quinasas de la subunidad G da lugar a la modulación de la actividad de la PF-1c. Esta misma subunidad reguladora también direcciona a la PF-1c hacia el retículo sarcoplásmico muscular. En levadura se ha identificado un homólogo de la subunidad G, codificado por el gen *GAC1* [François *et al.*, 92]. Se ha demostrado que *GAC1* es necesaria para el normal acúmulo de glucógeno y que interacciona con *GLC7p* (la PF-1c de *S. cerevisiae*). En músculo liso, la PF-1c puede encontrarse unida a la fracción de miosina en forma de trímero, junto con polipéptidos de 130 y 20 kDa.

El núcleo contiene una notable actividad de tipo 1, que en gran medida se encuentra asociada a la cromatina. En parte, esta actividad es latente, es decir, está asociada a un polipéptido inhibitorio (NIPP-1) [Beullens *et al.*, 1993] cuya estructura ha sido elucidada recientemente [Van Eynde *et al.*, 1995]. La forma latente puede ser activada *in vitro* por fosforilación de NIPP-1 por la PK-A o la caseína quinasa-2, mientras que la PF-2A, al desfosforilar NIPP-1, puede revertir la activación.

La fracción citosólica de la PF-1c está asociada a una proteína termoestable (22.8 kDa) denominada inhibidor-2 (o modulador). El inhibidor-2 (I-2) puede ser fosforilado en la Thr-72 por la glucógeno sintasa quinasa-3, dando lugar a una reactivación de la fosfatasa. Se ha especulado también con un posible papel del I-2 como *chaperone* de la PF-1c. En levadura se ha

identificado un posible homólogo del I-2 (GLC8) [Cannon *et al.*, 1995]. Otro importante regulador de la PF-1c es el Inhibidor-1, un polipéptido de 18,7 kDa que actúa como inhibidor una vez que es fosforilado en la Thr-35 por la PK-A. Este proceso ocurre *in vivo* en músculo, en respuesta a adrenalina o, en hígado, en respuesta a glucagon.

La complejidad de la regulación de la actividad PF-1 sugiere que esta fosfatasa desempeña una amplia variedad de cometidos en la célula. Ciertamente, su relación con el metabolismo del glucógeno, la contracción muscular, la síntesis de proteínas, etc. está fuera de duda, si bien no en todos los casos están claros los mecanismos moleculares subyacentes. Recientemente, se ha puesto en evidencia la participación de la PF-1 en la regulación del ciclo celular. Así, ciertos mutantes en la PF-1 de *A. nidulans* son incapaces de completar la anafase [Doonan & Morris, 1989], mientras que en *S. pombe* parece estar involucrada en la segregación de cromosomas [Ohkura *et al.*, 89]. Asimismo, en *S. cerevisiae*, la PF-1c es requerida para que la célula ejecute la transición G2/M [Hisamoto *et al.*, 1994], en un proceso que parece implicar la interacción física de la PF-1 con el producto del gen *EGP1* [Hisamoto *et al.*, 1995]. En este mismo organismo, la PF-1c interacciona con proteínas involucradas en meiosis y en los mecanismos de secreción de vesículas [Tu *et al.* 1996]. De manera análoga, ha podido demostrarse un papel de la PF-1 en la progresión de la mitosis en *Drosophila* y en fibroblastos de rata.

3. PROTEINA FOSFATASA 2A

Las formas nativas de la actividad PF-2A son heterotrímeros compuestos por un núcleo formado por una subunidad catalítica (PF-2Ac) y una subunidad reguladora (PR65 o subunidad A), asociado con formas diferentes de la denominada subunidad B (Tabla 2). La subunidad catalítica es una proteína de poco más de 300 aminoácidos, que guarda una identidad relativamente alta (casi del 50%) con PF-1c (Figura 1). Análogamente, esta proteína está altamente conservada a través de la evolución. Así, las PF-2Ac de mamíferos y *Drosophila* son más del 90% idénticas. En mamíferos se han descritos dos isoformas (a y b), que son entre sí 97% idénticas [Stone *et al.*, 1987, Ariño *et al.*, 1988]. También dos isoformas se han identificado en *S. cerevisiae* o *S. pombe*. En otras especies, como es el caso de *Drosophila* o *Xenopus*, tan sólo parece existir una isoforma. Sin embargo, como hemos comentado en el caso de la PF-1c, en plantas el número de isoformas es mucho mayor. Así, al menos 5 de ellas parecen existir en *A. thaliana*. Estas, en función de su secuencia, se pueden clasificar en dos subfamilias, aunque todas ellas mantienen un mismo y elevado nivel de identidad con las proteínas de animales o levaduras (alrededor del 80%) [Ariño *et al.*, 1993; Casamayor *et al.*, 1994].

Tabla 2.-Estructura oligomérica fundamental de la PF-2A

Sub. Catalítica	Sub. A (PR65)	Otras subunidades	Denominación
C (36 kDa)	A (65 kDa)	B (≈55 kDa)	PF-2A ₁
C (36 kDa)	A (65 kDa)	B' (≈54 kDa)	PF-2A ₀
C (36 kDa)	A (65 kDa)	B'' (≈74-130 kDa)	PCS-M ⁽¹⁾
C (36 kDa)	A (65 kDa)	PR72 (72 kDa)	---
C (36 kDa)	A (65 kDa)	st y mT ⁽²⁾	---

⁽¹⁾ Por polycation-stimulated protein phosphatase M

⁽²⁾ Por small-t y middle-T, antígenos de los virus SV40 y del poliovirus.

En mamíferos, existen al menos dos isoformas de PR65 (α y β), tres isoformas de PR55 (α , β , γ) y dos isoformas de PR72. Sin embargo, muy recientemente se han obtenido evidencias que podrían ampliar substancialmente la lista de posibles subunidades reguladoras [Pitcher *et al.*, 1995; Csontos *et al.*, 1996; Zolnierowicz *et al.*, 1996]. Contrariamente, la situación en *Drosophila* parece ser mucho menos compleja, ya que cada una de las subunidades reguladoras parece codificada por un único gen. La estructura oligomérica de la PP-2A parece tener un carácter general, ya que en levaduras se han identificado genes con una substancial identidad a las subunidades A (*TPD3*) y B (*CDC55*) [Van Zyl *et al.*, 1992; Healy *et al.*, 1991] y lo mismo puede decirse en plantas superiores [ver Smith & Walker, 1996 para una reciente revisión].

Los mecanismos que regulan la actividad PP-2A en la célula distan de ser bien comprendidos, habiéndose postulado diversas vías de regulación. *In vitro*, la ceramida activa las formas triméricas de la PF-2A que contienen tanto la subunidad PR55a como la subunidad B' (54 kDa), pero no el dímero PF-2Ac/A o la propia subunidad catalítica [Dobrowsky *et al.*, 1994]. Es interesante recordar que la generación de ceramida es un proceso derivado de la unión del TNF- α o del γ -interferón a sus receptores. Recientemente, en *S. cerevisiae*, se ha identificado una fosfatasa activada por ceramida que esta involucrada en el ciclo celular [Nickels & Broach, 1996]. Por otro lado, se ha demostrado que un cierto número de tirosina quinazas, entre las que se encuentran p60^{v-src}, p56^{lck} y los receptores de EGF e insulina, pueden fosforilar la PF-2Ac en la Tyr-307 localizada muy cerca del extremo C-terminal de la proteína. Esta fosforilación produce una poderosa inactivación de la fosfatasa [Chen *et al.*, 1992]. Existen ciertas evidencias en favor de que este mecanismo es relevante *in vivo*. Otro posible mecanismo de control implicaría la carboximetilación del aminoácido C-terminal, la Leu-309 [Zolnierowicz *et al.*, 1994]. Por último, se ha descrito también la existencia de inhibidores proteicos de la PF-2A [Damuni *et al.*, 1995;

Li *et al.*, 1996]. Es remarcable que, aunque comúnmente considerada como una Ser/Thr fosfatasa, en ciertas condiciones esta proteína puede actuar como una tirosina fosfatasa. La actividad Tyr fosfatasa es incrementada poderosamente mediante incubación del dímero (o, en menor extensión, de la subunidad catalítica), con una proteína de 37 kDa denominada PTPA en presencia de ATP/Mg²⁺ [Van Hoof *et al.*, 1995]

Lógicamente, la interacción del dímero PF-2Ac/A con otras subunidades reguladoras debe suponer un importante mecanismo de control de la actividad biológica de la PF-2A. Esto puede ocurrir, por ejemplo; influenciando la especificidad de sustrato. Esta especificidad puede incluso afectar determinados fosfoaminoácidos de un misma proteína. Así, mientras el trímero PF-2Ac/A/PR72 desfosforila preferencialmente las serinas 120 y 123 del antígeno T grande del virus SV40, la desfosforilación de la Thr-124 (precisamente la diana de la quinasa cdk1) sólo es catalizada por el trímero PF-2Ac/A/PR55 [Cegielska *et al.*, 1994]. Por otro lado, mutaciones específicas de la subunidad reguladora B en *Drosophila* han mostrado una disminución en la actividad de la fosfatasa únicamente hacia determinados sustratos.

Al igual que en el caso de la PF-1 [Clotet *et al.*, 1991], se ha demostrado en levaduras que la actividad PF-2A es esencial para la célula [Sneddon *et al.*, 1990]. En eucariotas superiores, las funciones celulares de la PF-2A han sido exploradas a menudo mediante el uso de inhibidores como el ácido okadaico. No obstante, debe considerarse que, a la luz de la aparición de nuevos tipos de Ser/Thr fosfatasas (ver más adelante), la inhibición de un proceso biológico por bajas concentraciones de esta toxina no siempre es garantía de que la PF-2A sea la única fosfatasa responsable. Aún así, hay poderosas evidencias de que esta fosfatasa está involucrada en la regulación del ciclo celular, particularmente en la transición G2/M, sobre la cual ejerce un efecto negativo. El efecto negativo de la PP2A en la entrada a mitosis se ha verificado también en levaduras, donde parece asociado a la presencia de la subunidad B (CDC55p). La actividad PF-2A es relevante en el control de algunos procesos metabólicos, tal como la síntesis y degradación de glucógeno en mamíferos y levaduras, en el correcto desarrollo corporal en *Drosophila* y en otras importantes funciones [vease Shenolikar, 1994 para una revisión]. Una posible base molecular para explicar alguna de estas funciones es la posibilidad de que la PF-2A desfosforile determinados factores de transcripción. Por ejemplo, se cree que, de manera directa o indirecta, la actividad PP-2A es clave en la desfosforilación del factor de transcripción CREB, el cual se une a los elementos que responden a AMPc.

4. PROTEINA FOSFATASA 2B

La PF-2B, también denominada calcineurina, fue identificada inicialmente en cerebro como una de las más abundantes proteínas capaces de unir calmodulina y sólo más tarde se describió su actividad como Ser/Thr fosfatasa. El enzima es un heterodímero, compuesto por calcineurina A (60 kDa) y calcineurina B (19 kDa). La calcineurina A es la subunidad catalítica, además de unir calmodulina. La calcineurina B, que es un miembro de la familia de

proteínas enlazantes de calcio con estructura de hélice o “mano” EF, contiene cuatro bucles de unión a calcio y muestra un 35% de identidad con la calmodulina. En mamíferos, ambas proteínas están codificadas por múltiples genes: tres, en el caso de la subunidad A y dos en el de la B. La multiplicidad de isoformas es aún mayor de lo predecible, puesto que algunos de estos genes dan lugar a transcritos diferentes, a menudo de expresión específica en un determinado tejido. En *S. cerevisiae*, la subunidad A está codificada por dos genes (*CNA1* y *CNA2*) cuya función es, aparentemente, redundante [Cyert, 1993]. La subunidad B está codificada por un único gen (*CNB1*). Hasta la fecha, no se han identificado genes que codifiquen una PF-2B en plantas. La calcineurina ha sido cristalizada en complejo con la FKBP12 y el fármaco FK506 (ver más adelante) [Griffith *et al.*, 1995].

A diferencia de otras fosfatasa, la PF-2B presenta una especificidad de sustrato bastante alta. La actividad PF-2B es dependiente de Ca^{+2} ($K_d=0.1$ nM) y es estimulada por calmodulina, aunque el enzima purificado también requiere la presencia de iones divalentes, como Mg^{+2} o Mn^{+2} . El extremo C-terminal de la subunidad A posee un centro con capacidad autoinhibitoria. Ello explica que el enzima puede activarse *in vitro* por proteólisis. La unión de calmodulina a la subunidad A o la de calcio a la B permiten superar el efecto autoinhibitorio citado extremo C-terminal. Tanto en mamíferos superiores como en levaduras, la subunidad B está miristilada. Sin embargo, al menos en este último caso, la falta de miristilación no parece conllevar anomalías funcionales evidentes [Cyert, 1993]. Uno de los descubrimientos más relevantes en este campo ha sido la identificación de PF-2B como la diana celular más relevante para una serie de fármacos de carácter inmunosupresor (ciclosporina A, FK506, etc.). El complejo fármaco-receptor (éstos últimos conocidos como inmunofilinas) se asocia a la PF-2B provocando la inactivación de la fosfatasa. Al parecer, la interacción ocurre con la subunidad B, aunque se requiere la presencia de la subunidad A en el complejo [véase una revisión en Shenolikar, 1994].

La fosfatasa 2B parece desempeñar diversas funciones biológicas. En relación con su participación en los mecanismos de inmunosupresión, existen evidencias de que la calcineurina interviene en la vía activada por calcio involucrada en la activación de las células T en respuesta al antígeno. Este proceso, que tiene como resultado la expresión del gen de la interleucina-2, implicaría una desfosforilación de la subunidad citosólica del factor de transcripción NF-AT. Recientes evidencias indican que esta interacción podría ser directa [Loh *et al.*, 1996]. Entre otros efectos, la calcineurina parece estar implicada en la expresión inducida por calcio de ciertos genes en páncreas o en la mediación de la estimulación α -adrenérgica de la Na^+/K^+ ATPasa en las células del túbulo renal. A diferencia de lo descrito para la PF-1 o la PF-2A, en *S. cerevisiae* la calcineurina no es esencial. La delección de ambas subunidades A o de la única subunidad B da lugar a células hipersensibles a sodio. Este efecto es debido a que las células deficientes en calmodulina han perdido parcialmente la capacidad para expresar la ATPasa que, mayoritariamente, es responsable de la salida del catión del interior de la célula [Mendoza *et al.*, 1994]. Además, la calcineurina parece ser necesaria en el proceso de adaptación a la feromona factor a [Cyert, 1993]. Curiosamente, en *S. pombe* la calcineurina parece estar

codificada por único gen [Yoshida *et al.*, 1994]. La interrupción del mismo da lugar a defectos en la citoquinesis y a células virtualmente estériles. El primer fenotipo es también observable tras tratamiento con ciclosporina A.

5. PROTEINA FOSFATASA 2C

La PF-2C, una actividad inicialmente identificada como dependiente de Mg^{+2} , corresponde a una proteína monomérica (43-48 kDa) que es estructuralmente diferente del resto de las subunidades catalíticas. No obstante, muestra cierta similitud con la fosfatasa mitocondrial que desfosforila la piruvato deshidrogenasa (un tipo muy específico de proteína fosfatasa). Una de las características típicas de la PF-2C es su total insensibilidad a ácido okadaico. En mamíferos se han clonado dos isoformas mayoritarias, las cuales a su vez pueden dar lugar a diferentes transcritos (p. ej., por *splicing* alternativo). Estas variedades, en algunos casos, muestran diferente distribución tisular. Una revisión profunda de la relación estructural de la PF-2C con otras familias de proteínas eucariotas y procariotas puede obtenerse en [Bork *et al.*, 1996].

En mamíferos se conoce poco sobre la función y la regulación de la PF-2C. *In vitro*, esta fosfatasa es particularmente activa sobre enzimas importantes en el metabolismo del colesterol, así como sobre la proteína quinasa dependiente de Ca^{+2} /calmodulina II (convirtiéndola en calcio-independiente). Esta última actividad podría, además, ser relevante *in vivo*. Tanto en *S. cerevisiae* como en *S. pombe* existen tres genes que codifican la PF-2C. En ambas especies la PF-2C está, como mínimo, involucrada en la transducción de señales relacionada con los mecanismos osmosensores. En *S. cerevisiae*, éstos implican una cascada del tipo MAP quinasa (HOG1), la cual es controlada negativamente por la fosfatasa [Maeda *et al.*, 1994]. En *S. pombe* una de las isoformas, *ptc1+*, está involucrada en la respuesta a stress térmico, puesto que su mRNA se induce en estas condiciones y los mutantes por delección son particularmente sensibles a esta circunstancia. En plantas superiores se ha identificado una proteína estructuralmente relacionada con la PF-2C, codificada por el gen ABI1, que contiene además un presunto centro de unión a calcio. Esta fosfatasa es esencial en la respuesta de la planta a ácido abscísico [Leung *et al.*, 1994; Meyer *et al.*, 1994].

6. LAS NUEVAS FORMAS DE SER/THR FOSFATASAS

El estudio de la actividad fosfatasa, fundamentalmente en mamíferos, ha puesto en evidencia que existen proteína Ser/Thr fosfatasas que difieren en sus propiedades de los enzimas descritos en las páginas precedentes. Este es el caso de la actividad fosfatasa mitocondrial específica para la piruvato deshidrogenasa (que como se ha comentado, tiene una lejana relación con la PF-2C) o para la deshidrogenasa de 2-oxo-ácidos de cadena ramificada. Pero, al margen de estos casos específicos, se han identificado otras actividades de difícil clasificación. Así, la denominada PP3 tiene una especificidad de sustrato similar a la PF-1 y, sin embargo, es insensible a ácido okadaico. Según se deduce de la secuenciación

parcial de la proteína, PP3 estaría emparentada estructuralmente con la PF-1c [Honkanen *et al.*, 1991].

Tabla 3.- Nuevas formas de Ser/Thr proteina fosfatasa

Designación	Organismo	Características estructurales	Funciones conocidas
PPI	Fago λ	Codificada por el orf221. Similar a PF-1c y PF-2c	* Decisión lisis/lisogenia
PPX	M/DM/P	* Poco más de 300 aa., contiene sólo núcleo catalítico * más similar a PF-2Ac que a PF-1c	* Localiza preferentemente en centrosomas
PPV	M/DM	* Poco más de 300 aa, contiene sólo núcleo catalítico * más similar a PF-2Ac que a PF-1c	* Homólogo a SIT4 ?
PPY rdgC	DM DM	* más similar a PF-1Ac que a PF-2Ac * Relacionada con PF-2B	* Evita la degradación del retinal inducida por luz * localización nuclear
PP5/PPT1	M/SC	* aprox. 500 aa * Repetición de un motivo "tetratricopeptido"	
SIT4 (PPH1)	SC	* 311 aa, contiene sólo núcleo catalítico * más similar a PF-2Ac que a PF-1c	* Se requiere en la transición G1/S * homólogo PPV? (<i>Drosophila</i>)
PPH3	SC	* 308 aa, contiene sólo núcleo catalítico * más similar a PP2Ac que a PF-1c	* actividad funcional residual tipo PF-2A
PPG1	SC	* 368 aa / Inserción C-terminal de 50 aa. * más similar a PP2Ac que a PF-1c	* involucrado en acúmulo de glucógeno
PPZ1/PPZ2	SC (SP ?)	* 692/710 aa * Mitad C-terminal relacionada con PF-1c y 92% idéntica entre ellas * Extensión N-terminal rica en Ser y residuos básicos	* mutantes tolerantes a Na ⁺ y Li ⁺ * mutantes líticos ante ciertas situaciones de stress * La sobreexpresión suprime la mutación Dmpk1
PPQ1 (SAL1)	SC	* 549 aa, dominio N-terminal rico en Ser/Asn * más similar a PF-1c que a PF-2Ac	* afecta la precisión en la traducción * incrementa la eficiencia de supresores omnipotentes

Abreviaturas: M: mamíferos, DM: *Drosophila*, P: Plantas superiores, SC: *S. cerevisiae*, SP: *S. pombe*

Sin embargo, la aproximación experimental que ha proporcionado una mayor información sobre la existencia de nuevas formas de Ser/Thr fosfatasa ha

sido clonación de los correspondientes cDNAs o genes, bien mediante el análisis de bibliotecas con sondas correspondientes a otras fosfatasa, la amplificación por PCR, o la complementación fenotípica de ciertas mutaciones. En la Tabla 3 se sintetizan algunos de los conocimientos que se tienen en este momento al respecto. Cabe resaltar tres aspectos: primero, que la mayoría de estas nuevas formas guardan una relación estructural con la PF-1c o la PF-2Ac. Segundo, que en la mayoría de los casos estas nuevas formas tan sólo han sido identificada en una única especie o tipo celular (por supuesto, ello no implica necesariamente que sean específicas de esta especie o tipo celular). En este sentido, el caso de la PPX es especial, ya que esta fosfatasa ha sido identificada en mamíferos, insectos y plantas [ver Pérez-Callejón, 1993 y referencias allí incluidas]. Posiblemente la PP5, identificada en mamíferos y que tiene un homólogo en levadura (PPT), sea también una fosfatasa ubicua [Becker *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1994].

Es evidente que, debido a lo reciente del descubrimiento de estas nuevas formas de fosfatasa, bien poco es sabido en la mayoría de los casos sobre la función de las mismas ni sobre su regulación. Uno de los pocos casos en que se han realizado algunos avances en este sentido es, precisamente, el de uno de los tipos de fosfatasa de *S. cerevisiae* estudiados en nuestro laboratorio: el compuesto por el par de genes *PPZ1* y *PPZ2*. El gen *PPZ1* fue clonado por nuestro grupo tras haber puesto en evidencia, mediante técnicas de PCR, que el genoma de esta levadura codificaba una posible fosfatasa relacionada con las PF-1 [Posas *et al.*, 1992]. Poco mas tarde se puso de manifiesto la existencia de un segundo gen relacionado, denominado *PPZ2* [Lee *et al.*, 1993, Hughes *et al.*, 1993]. Ambas proteínas tienen un tamaño anormalmente grande para una Ser/Thr fosfatasa (692 y 710 aminoácidos, respectivamente) y constan de una mitad C-terminal que muestra un 62% de identidad con la PF-1c de diferentes especies, precedida por una larga extensión N-terminal rica en Ser y Thr, además de en aminoácidos básicos. Estudios fenotípicos iniciales, utilizando cepas delecionadas en estos genes o complementando en multicopia determinadas mutaciones, mostraron que estas fosfatasa están involucradas en el mantenimiento de la integridad celular ante determinadas situaciones de stress, como pueden ser la exposición a cafeína o el crecimiento a temperaturas relativamente altas. En estas circunstancias, los mutantes sufre lisis celular. [Posas *et al.*, 1993, Lee *et al.*, 1993]. Estos estudios relacionaron las PPZ con la vía en cascada que relaciona la proteína quinasa C (PKC1) con la MAP quinasa codificada por el gen *SLT2/MPK1* y que está involucrada en la correcta formación de la pared celular [para una revisión, ver Herskowitz, 1995]. Sin embargo, esta no es la única función biológica en la que las PPZ parecen jugar un papel importante. Mediante una mezcla de fortuna e intuición (a partes desiguales) nuestro laboratorio descubrió que la deleción de *PPZ1* (pero no la de *PPZ2*) confería a la levadura un fenotipo de alta tolerancia al catión sodio. No obstante, la deleción de *PPZ2* en un fondo genético $\Delta ppz1$ incrementaba aún más la halotolerancia. Este descubrimiento era notable por cuanto, si bien se conocían ya diversas mutaciones que tornaban las células hipersensibles a sodio, se trataba del primer (y todavía único) caso en que la eliminación de un gen producía un incremento en la tolerancia. Nuestros estudios han demostrado que este fenotipo ocurre porque las células carentes de PPZ bombean sodio más

eficazmente al exterior de la célula. Este bombeo está promovido por una ATPasa del tipo P, codificada por el gen *ENA1/PMR2A* [Haro *et al.*, 1991] la cual, en condiciones basales, apenas es expresada mientras que, tras la exposición a sodio, los niveles de su mRNA se incrementan fuertemente en pocos minutos. Precisamente, en células carentes de PPZ la expresión de *ENA1* esta muy incrementada en condiciones basales y todavía aumenta más tras la exposición de las células a sodio [Posas *et al.*, 1995a].

Ciertamente, la estructura de la mitad N-terminal de las PPZ es merecedora de atención. Para empezar, la presunta Gly aminoterminal (Gly-2) se presenta en un consenso óptimo para sufrir miristilación, es decir, incorporación covalente de miristato, catalizada por una transferasa específica. Tomando como modelo PPZ1, hemos podido comprobar que se produce una cierta incorporación de [³H]mirístico in vivo y que la mutación de la Gly-2 a Ala no sólo impide la miristilación sino que afecta poderosamente la función de PPZ1 en la homeostasis salina. Sin embargo, la proteína mutada es perfectamente funcional cuando se comprobaba creciendo las células en presencia de cafeína. Una disección similar entre ambos fenotipos puede observarse al expresar formas de la PPZ1 que han sufrido diferentes deleciones en la mitad N-terminal. En cambio, la funcionalidad es destruida a todos los efectos si se genera un versión de la PPZ1 carente de actividad catalítica (R451L). Por lo tanto, la actividad fosfatasa de la PPZ1 es esencial para su función, mientras que la mitad N-terminal posee determinantes específicos de función [Clotet *et al.*, 1996]. Esta actividad ha sido caracterizada mediante la expresión de la proteína en *E. coli*, como una fusión con la glutation-S-transferasa. El enzima recombinante es dependiente de Mn⁺² y no actúa como fosforilasa fosfatasa (que es el sustrato usual para la PF-1). Su sensibilidad a ácido okadaico es similar a la de PF-1 pero, sin embargo, es mucho menos sensible al inhibidor-2 [Posas *et al.*, 1995b]

Muy recientes evidencias sugieren que PPZ1 puede estar interaccionando en la célula con un modulador negativo de su función en la hemostasis salina. Datos preliminares sugieren que este modulador podría ser el producto del gen *HAL3*, recientemente identificado como un gen cuya deleción da lugar a una hipersensibilidad a sodio, precisamente debido a que provoca una disminución en la expresión de *ENA1* [Ferrando *et al.*, 1995]. Por ejemplo, hemos comprobado que la mutación $\Delta hal3$ carece de efecto en un fondo genético $\Delta ppz1$ (pero no $\Delta ppz2$). Además, es posible demostrar una interacción física entre PPZ1 recombinante y Hal3p procedentes de extractos de levadura mediante experimentos de *trapping*. Un aspecto interesante es que la interacción parece notablemente más fuerte cuando en estos experimentos se emplea como "cebo" únicamente la mitad C-terminal de PPZ1 (es decir, el dominio fosfatasa), sugiriendo que Hal3p podría interaccionar con la región catalítica de PPZ1. Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho de que *in vitro*, Hal3p inhibe substancialmente la actividad de la fosfatasa recombinante. Este conjunto de datos sugieren que Hal3p podría comportarse como una verdadera subunidad reguladora de PPZ1. Esta regulación podría afectar exclusivamente a alguna de las posibles dianas de PPZ1 en la célula, toda vez que Hal3 no parece estar relacionado con el mantenimiento de la integridad celular bajo ciertas formas de stress, en el cual PPZ1 desempeña algún papel. Una posibilidad, perfectamente

asumible a la luz de lo descrito en los capítulos precedentes, sería que Hal3p modulara la actividad de PPZ1 sobre determinados sustratos, sin alterar otras posibles dianas celulares de la fosfatasa. El establecimiento de una relación funcional entre Hal3p y PPZ1p adquiere mayor relevancia si consideramos que podría extenderse más allá de *S. cerevisiae*. Efectivamente, nuestro laboratorio ha clonado y está en vías de caracterizar un probable homólogo estructural y funcional de las PPZ en la levadura de fisión *S. pombe*, muy alejada evolutivamente de *S. cerevisiae*. Por otra parte, datos preliminares del proyecto de secuenciación sistemático de *S. pombe* indican que el genoma de este organismo codifica una proteína con notable similitud a Hal3p, a la vez que parece muy probable la existencia de un homólogo de Hal3 en plantas superiores.

7. CONCLUSIONES, REFLEXIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

En este capítulo hemos pasado revista, de manera superficial, a la información que se dispone en la actualidad sobre las proteína Ser/Thr fosfatasas. De estos datos pueden derivarse varias conclusiones. Por un lado, que este tipo de enzimas representa una familia de gran complejidad. Esta complejidad reside no sólo en la existencia de un numeroso grupo de proteínas dotadas de la actividad catalítica característica, sino de la existencia, a menudo, de múltiples isoformas de cada una de ellas. Este aspecto, como hemos documentado, es particularmente espectacular en plantas superiores. Sin ir más lejos, en *S. cerevisiae* pueden existir alrededor de veinte genes que codifican proteínas con actividad Ser/Thr fosfatasa demostrada o seriamente presumible. No parece exagerado pensar que, en genomas más complejos, esta cifra pueda llegar al centenar. A este nivel de complejidad debe añadirse la existencia de diferentes subunidades reguladoras, algunas de las cuales presentan también en múltiples formas. Esta situación, al menos por lo que sabemos, es particularmente compleja en las fosfatasas de tipo 1 y 2A (y quizá ello explique lo pleiotrópico de sus acciones).

Hasta hace poco tiempo la actividad de las proteína fosfatasas se consideraba, en el contexto de la actividad celular, como de regulación relativamente simple, en el sentido de que un conjunto limitado de estos enzimas, actuando sobre un amplio espectro de sustratos, eran capaces de revertir la acción de un muy nutrido grupo de proteína quinasas altamente específicas y sobre las cuales recaía la regulación del proceso. Esta visión es claramente obsoleta y debe dejar paso a un escenario en el cual las regulación de las fosfatasas es una pieza clave en la modulación de los procesos celulares. Esta regulación puede ocurrir de diferentes maneras, como la modificación covalente de las propias subunidades catalíticas, la interacción de éstas con determinadas subunidades reguladoras (las cuáles a su vez también pueden ser modificadas post-traduccionalmente), produciendo un efecto de *targeting* o de alteración en la especificidad de sustrato, o la existencia de mecanismos de expresión selectiva de una u otra isoforma en determinado tejido o célula. Por supuesto, nada impide

que varios de estos mecanismos se den simultáneamente. En lo que hace referencia a la interacción de subunidades catalíticas con ciertas subunidades reguladoras, hemos de considerar que las pequeñas variaciones en secuencia que se observan entre diferentes isoformas de una subunidad catalítica dada podrían ser decisivas a la hora de interaccionar o no con una subunidad reguladora específica (sin comprometer la actividad del enzima en otras circunstancias). Un ejemplo de ello nos lo proporcionaría la PF-1c de *S. cerevisiae* (GLC7p). En esta proteína (que es más del 80% idéntica a la PF-1c humana !), la substitución de la Arg-73 por Cys no elimina la actividad catalítica, pero evita su interacción con la subunidad reguladora G (GAC1p) y, en consecuencia, afecta la síntesis de glucógeno sin alterar otros procesos. A partir de estos ejemplos podemos entender como la evolución ha mantenido fuertemente conservada la estructura de una amplia familia de proteínas con actividad hidrolasa de esteres fosfóricos y, a la vez, ha podido diversificar enormemente sus funciones.

En el ámbito de las proteínas fosfatasa, el futuro plantea una serie de retos importantes. Al margen de identificar posibles nuevos miembros de esta extensa familia, un aspecto crucial será entender de que manera unas interacciones específicas entre determinadas subunidades catalíticas y reguladoras pueden modular (también específicamente) determinados procesos celulares. Esta cuestión no sólo incluye el conocer la identidad exacta de las moléculas que intervienen, sino también las señales que propician esta interacción y las dianas celulares cuyo estado de fosforilación (y funcionalidad) resultan modificadas consecuentemente.

AGRADECIMIENTOS

Las investigaciones en el laboratorio de los autores han sido financiadas por los proyectos PB92-0585 y PB95-0663 (DGICYT) y GRQ94-2001 (CIRIT, Generalitat de Catalunya).

8. REFERENCIAS

- Ariño, J.; C.W. Woon; D.L. Brautigan; T.B. Miller & G.L. Johnson (1988). Human liver phosphatase 2A: cDNA and amino acid sequence of two catalytic subunits isotopes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 4252-4256.
- Ariño, J.; E. Pérez-Callejón; N. Cunillera; M. Camps; F. Posas & A. Ferrer (1993). Protein phosphatases in higher plants: multiplicity of type 2A phosphatases in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, 21: 475-485.
- Becker, W.; H. Kentrup; S. Klumpp; J. E. Schultz & H. G. Joost (1994). Molecular cloning of a protein serine/threonine phosphatase containing a putative regulatory tetratricopeptide repeat domain. *J. Biol. Chem.*, 269: 22586-22592

- Beullens, M.; A. Van Eynde; M. Bollen & W. Stalmans (1993) Inactivation of nuclear inhibitory polypeptides of protein phosphatase-1 (NIPP-1) by protein kinase A. *J. Biol. Chem.*, 268: 13172-13177
- Bork, P.; N.P. Brown; H. Hegyi & Schultz, J. (1996) The protein phosphatase 2C (PP2C) superfamily: Detection of bacterial homologues. *Protein Science*, 5:1421-1425
- Cannon, J.F.; K.E. Clemens; P.A. Morcos; B.M. Nair; J.L. Pearson & M. Khalil (1995). Type 1 protein phosphatase systems of yeast. *Adv. Protein Phosphatases*, vol 9: 211-232
- Casamayor, A.; E. Perez-Callejon; G. Pujol; J. Ariño & A. Ferrer (1994). Molecular characterization of a fourth isoform of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 26: 523-528.
- Cegielska, A.; S. Shaffer; R. Derua; J. Goris & D. M. Virshup (1994) Different oligomeric forms of protein phosphatase 2A activate and inhibit simian virus 40 DNA replication. *Mol. Cell. Biol.*, 14: 4616-4623
- Chen, J. B.; L. Martin & D. L. Brautigan (1992) Regulation of protein serine-threonine phosphatase type-2A by tyrosine phosphorylation. *Science*, 257: 1261-1264
- Chen, M.X.; A.E. McPartlin; L. Brown; Y.H. Chen; H.M. Barker & P.T.W. Cohen. (1994). A novel human protein serine/threonine phosphatase, which possesses four tetratricopeptide repeat motifs and localizes to the nucleus. *EMBO J.*, 13: 4278-4290.
- Clotet, J.; F. Posas; A. Casamayor; I. Schaaf-Gerstenschläger & J. Ariño. (1991). The gene *DIS2S1* is essential in *Saccharomyces cerevisiae* and is involved in glycogen phosphorylase activation. *Curr. Genet.*, 19: 339-342.
- Clotet, J.; F. Posas; G.-Z. Hu; H. Ronne & J. Ariño. (1995). Role of protein phosphatase 2A in the control of glycogen metabolism in yeast. *Eur. J. Biochem.*, 229: 207-214.
- Clotet, J.; F. Posas; E. de Nadal & J. Ariño (1996) The N-terminal extension of protein phosphatase PPZ1 has an essential functional role. *J. Biol. Chem.*, 271: 26349-26355.
- Csortos, C.; S. Zolnierowicz; E. Bako; S.D. Durbin & A.A. DePaoli-Roach (1996). High complexity in the expression of the B' subunit of protein phosphatase 2A(0) - Evidence for the existence of at least seven novel isoforms. *J. Biol. Chem.*, 271: 2578-2588.

- Cyert, M.S. (1993). The function of Ca^{+2} /calmodulin-regulated phosphatases in yeast. *Adv. Protein Phosphatases*, vol. 7, 429-443.
- Damuni, Z.; M. Li; H. Xiong & A. Makkinje (1995). Regulation of protein phosphatase 2A by phosphorylation and heat-stable inhibitors. *Adv. Protein Phosphatases*, vol. 9, 233-248.
- Dixon, J. E. (1996). Protein tyrosine phosphatases: their roles in signal transduction. *Recent Prog. Horm. Res.* 51: 405-414
- Dobrowsky, R.T.; Alter, N. & Hannun, Y.A. (1994). Ceramide-activated protein phosphatase: biochemistry and biology. *Adv. Protein Phosphatases*, vol. 8: 27-39.
- Doonan, J.H. & N. R. Morris (1989). The *bimG* gene of *Aspergillus nidulans*, required for completion of anaphase, encodes a homolog of mammalian phosphoprotein phosphatase 1. *Cell*, 57: 987-996
- Ferrando, A.; S.J. Kron; G. Rios; G.R. Fink & R. Serrano (1995) Regulation of cation transport in *Saccharomyces cerevisiae* by the salt tolerance gene *HAL3*. *Mol. Cell. Biol.*, 15: 5470-5481
- François, J.M.; S. Thompson-Jaeger; J. Skroch; U. Zellenka; W. Spevak & K. Tatchell (1992) GAC1 may encode a regulatory subunit for protein phosphatase type 1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, 11: 87-96
- Goldberg, J.; H. B. Huang; Y. G. Kwon; P. Greengard; A. C. Nairn & J. Kuriyan (1995). Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. *Nature*, 376: 745-753
- Griffith, J. P.; J. L. Kim; E. E. Kim; M. D. Sintchak; J. A. Thomson *et al.* (1995). X-ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilin-immunosuppressant FKBP12-FK506 complex. *Cell*, 82: 507-522
- Haro, R.; B. Garciadeblas & A. Rodriguez-Navarro (1991). A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett.*, 291: 189-191
- Healy, A.M.; S. Zolnierowicz; A. E. Stapleton; M. Goebel; A. A. DePaoli-Roach & J. R. Pringle (1991). CDC55, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in cellular morphogenesis: identification, characterization, and homology to the B subunit of mammalian type 2A protein phosphatase. *Mol. Cell. Biol.*, 11: 5767-5780.
- Herskowitz, I. (1995) MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell*, 80: 187-197.

- Hisamoto, N.; K. Sugimoto & K. Matsumoto (1994) The Glc7 type 1 protein phosphatase is required for cell cycle progression in G2/M. *Mol. Cell. Biol.* 14: 3158-3165.
- Hisamoto, N.; D.L. Frederick, K. Sugimoto; K. Tatchell & K. Matsumoto (1995). The *EGP1* gene may be a positive regulator of protein phosphatase type 1 in the growth control of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 15: 3767-3776.
- Honkanen, R. E.; J. Zwiller; S. L. Daily; B. S. Khatra; M. Dukelow & A. L. Boynton (1991). Identification, purification, and characterization of a novel serine/threonine protein phosphatase from bovine brain . *J. Biol. Chem.*, 266: 6614-6619
- Hubbard, M.J. & P. Cohen (1993). On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends Biochem. Sci.*, 18: 172-177.
- Hughes, V.; Muller.A.; M.J. Stark & P.T. Cohen (1993). Both isoforms of protein phosphatase Z are essential for the maintenance of cell size and integrity in *Saccharomyces cerevisiae* in response to osmotic stress. *Eur. J. Biochem.* 216: 269-279.
- Lee, K.S.; L.K. Hines & D.E. Levin (1993). A pair of functionally redundant yeast genes (PPZ1 and PPZ2) encoding type 1-related protein phosphatases function within the PKC1-mediated pathway. *Mol. Cell. Biol.* 13: 5843-5853.
- Leung, J.; Bouvier-Durand.M.; P.-C. Morris; D. Guerrier; F. Cheddor & J. Giraudat (1994). Arabidopsis ABA response gene ABI1: Features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science*, 264: 1448-1452.
- Li, M.; A. Makkinje & Z. Damuni (1996). Molecular identification of I-1(PP2A), a novel potent heat-stable inhibitor protein of protein phosphatase 2A. *Biochemistry*, 35: 6998-7002.
- Loh, C.; K.T.-Y., Shaw; J. Carew; J.P.B. Viola; C. Luo; B.A. Perrino & A. Rao (1996). Calcineurin binds the transcription factor NFAT1 and reversibly regulates its activity. *J. Biol. Chem.*, 271: 10884-10891.
- Maeda, T.; S. M. Wurgler-Murphy & H. Saito (1994) A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature*, 369: 242-245.
- Mendoza, I.; F. Rubio; A. Rodríguez-Navarro & J.M. Pardo. (1994). The protein phosphatase calcineurin is essential for salt tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 269: 8792-8796.
- Meyer, K.; M.P. Leube & E. Grill. (1994). A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 264: 1452-1455.

- Nickels, J.T. & J.R. Broach (1996). A ceramide-activated protein phosphatase mediates ceramide-induced G(1) arrest of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.*, 10: 382-394.
- Ohkura, H.; N. Kinoshita; S. Miyatani; T. Toda & M. Yanagida (1989). The fission yeast *dis2+* gene required for chromosome disjoining encodes one of two putative type 1 protein phosphatases. *Cell*, 57: 997-1007
- Pérez-Callejón, E.; A. Casamayor; G. Pujol; E. Clua; A. Ferrer & J. Ariño (1993) Isolation and molecular cloning of two isoforms of PPX in *A. thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, 23: 1177-1185.
- Pitcher, J.A.; E. S. Payne; C. Csontos; A. A. DePaoli-Roach & R. J. Lefkowitz (1995) The G-protein-coupled receptor phosphatase: a protein phosphatase type 2A with a distinct subcellular distribution and substrate specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 92: 8343-8347.
- Posas, F.; M. Camps & J. Ariño (1995a). The PPZ protein phosphatases are important determinants of salt tolerance in yeast cells. *J. Biol. Chem.*, 270: 13036-13041.
- Posas, F.; M. Bollen; W. Stalmans & J. Ariño (1995b) Biochemical characterization of recombinant yeast PPZ1, a protein phosphatase involved in salt tolerance. *FEBS Lett.*, 368: 39-44.
- Posas, F.; A. Casamayor & J. Ariño (1993). The PPZ protein phosphatases are involved in the maintenance of osmotic stability of yeast cells. *FEBS Lett.*, 318: 282-286.
- Posas, F.; A. Casamayor; N. Morral & J. Ariño (1992). Molecular cloning and analysis of a yeast protein phosphatase with an unusual amino-terminal region. *J. Biol. Chem.*, 267: 11734-11740.
- Sneddon, A. A.; P. T.W. Cohen & M. J. Stark (1990). *Saccharomyces cerevisiae* protein phosphatase 2A performs an essential cellular function and is encoded by two genes. *EMBO J.*, 9: 4339-4346.
- Shenolikar, S. (1994). Protein Serine/Threonine phosphatases-New avenues for cells regulation. *Annu. Rev. Cell. Biol.*, 10: 55-86.
- Smith, R.D. & J.C. Walker (1993). Expression of multiple type 1 phosphoprotein phosphatases in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 21: 307-316.
- Smith, R.D. & J.C. Walker (1996). Plant protein phosphatases. *Annu Rev Plant Physiol*, 47: 101-125.

- Stone, S.R.; J. Hoofstenge & B.A. Hemmings (1987). Molecular cloning of cDNAs encoding two isoforms of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A. *Biochemistry*, 26: 7215-7220.
- Tu, J.L.; W.J. Song & M. Carlson (1996). Protein phosphatase type 1 interacts with proteins required for meiosis and other cellular processes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 16: 4199-4206.
- Van Eynde, A.; S. Wera; M. Beullens; S. Torrekens; F. Van Leuven; W. Stalmans & M. Boller (1995). Molecular cloning of NIPP-1, a nuclear inhibitor of protein phosphatase-1, reveals homology with polypeptides involved in RNA processing. *J. Biol. Chem.*, 270: 28068-28074.
- Van Hoof, C.; X. Cayla; M. Bosch; W. Merlevede & J. Goris (1994). PTPA adjust the phosphotyrosyl phosphatase activity of PP2A. *Adv. Protein Phosphatases*, vol 8, 283-310.
- Van Zyl, W.; W. Huang; A. A. Sneddon; M. Stark; S. Camier; M. Werner; C. Marck; A. Sentenac & J. R. Broach (1992). Inactivation of the protein phosphatase 2A regulatory subunit A results in morphological and transcriptional defects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 12: 4946-4959.
- Yoshida, T.; T. Toda & M. Yanagida (1994) A calcineurin-like gene *ppb1+* in fission yeast: mutant defects in cytokinesis, cell polarity, mating and spindle pole body positioning. *J. Cell. Sci.*, 107: 1725-1735.
- Zolnierowicz, S.; B. Favre & B.A. Hemmings (1994) Carboxyl methylation- A new regulatory mechanism for an old enzyme, protein phosphatase 2A. *Adv. Protein Phosphatases*, vol. 8, 355-370.
- Zolnierowicz, S.; C. Van Hoof; N. Andjelkovic; P. Cron; I. Stevens; W. Merlevede; J. Goris & B.A. Hemmings (1996). The variable subunit associated with protein phosphatase 2A(0) defines a novel multimember family of regulatory subunits. *Biochem J.*, 317: 187-194.