

CLONACIÓ D'UN NOU TIPUS DE PROTEÏNA FOSFATASA EN LLEVAT

Antonio Casamayor, Francesc Posas i Joaquim Ariño
Dept. de Bioquímica i Biologia Molecular. Fac. Veterinària,
Universitat Autònoma Barcelona

RESUM

Hem amplificat per PCR (Polymerase Chain Reaction) fragments de DNA genòmic de llevat amb característiques estructurals de Ser/Thr fosfatases, fent servir oligonucleòtids que codifiquen seqüències conservades entre les fosfatases tipus 1, 2A i 2B. Un fragment amplificat de 215 pb va ser utilitzat per analitzar una biblioteca de DNA genòmic. La seqüència d'un clon positiu obtingut revela un ORF de 2.076 pb que codifica per una proteïna de 692 aminoàcids. L'extrem carboxi-terminal de la proteïna es troba estructuralment relacionat amb les fosfatases tipus 1, mentre que la meitat NH₂-terminal no es relaciona amb cap seqüència de fosfatasa. Aquesta regió és molt rica en residus serina i en aminoàcids bàsics. Així, el producte del gen pot representar un nou tipus de proteïna fosfatasa. El gen corresponent, que anomenem *PPZ1*, es troba en el cromosoma XIII i s'expressa com un mRNA de 2,7 kbp. La seva disrupció no dona com a resultat cap fenotip evident. La presència en extractes de llevat d'una proteïna de 75 kDa que es reconeguda per anticossos desenvolupats contra el gen expressat en bacteris va ser detectada mitjançant experiments d'immunoblot.

INTRODUCCIÓ

El creixement cel·lular, el control del metabolisme, la resposta a estímuls externs i la biosíntesi de proteïnes, entre d'altres processos cel·lulars, estan controlats per reaccions de fosforilació de les proteïnes en residus de serina i treonina [1,2]. L'estat de fosforilació d'una proteïna és el resultat de la integració de les activitats proteïna quinasa i proteïna fosfatasa (PP).

Les tècniques enzimològiques i de química de proteïnes van permetre identificar 4 tipus majoritaris d'activitats Ser/Thr PP: tipus 1 i tipus 2A, 2B i 2C [3]. Els cDNA que codifiquen les seves subunitats catalítiques han estat clonats i això ha fet evident que les PP tipus 1, 2A i 2B estan molt relacionades estructuralment. A més a més, l'anàlisi de diverses biblioteques de cDNA de mamífers i de *Drosophila* ha permès identificar nous tipus de PP (PP-V, PP-X, etc.), la funció de les quals encara no es coneix.

La presència d'activitats PP en llevat és coneguda des de fa anys [4]. Evidències obtingudes recentment van suggerir que aquests enzims eren molt semblants als dels mamífers. Així, el gen *DIS2S1* de *S. cerevisiae* codifica una PP que és 81% idèntica a la PP-1 de conill, mentre que s'ha identificat dos gens que són un 73% idèntics a la subunitat catalítica de la PP-2A d'humans [5,6]. Alguns d'aquests gens són essencials per a la cèl·lula perquè estant involucrats en el control del cicle cel·lular [7,8].

Tenint en compte aquests antecedents, decidírem esbrinar si en llevat podien existir nous tipus de Ser/Thr fosfatases, tot i aprofitant les tècniques de PCR.

MATERIALS I METODES

Les seqüències dels oligonucleòtids utilitzats, MP-1s i MP-3as, són respectivament: 5'-GGGAATTCGA(CT)(CAT)(GC)(CT)(AGC)TGGTC(ATG)GA(TC)CC-3', i 5'-CCAAGCTT(CT)(CA)(GA)(CA)(GA)TA(GA)TT(GT)GG(CAGT)GC 3' on les seqüències subratllades corresponen a llocs de restricció EcoRI i HindIII afegits per facilitar el clonatge.

La soca de *S. cerevisiae* M5 (*MAT α /MAT α* , homozigòtica per *leu2-3/112 ura 3-53 trp1*) va ser utilitzada per a la preparació de DNA genòmic i experiments de disrupció gènica. La seqüència nucleotídica del DNA clonat s'esbrinà pel mètode dels dideoxinucleòtids, mitjançant l'ús de "primers" fluorescents, a un seqüenciador automàtic Applied Biosystem 373A.

El DNA genòmic de la soca M5 va ser preparat com es descriu en [9], i per l'amplificació vàrem fer servir 0,2 µg. Les condicions utilitzades van ser: 94°C durant 2 min, 50°C durant 2 min, i 72°C durant 2 min. Després de 30 cicles, el DNA amplificat es va digerir amb una mescla de EcoRI i HindIII i va ser separat en gel d'agarosa. Els fragments d'una mida apropiada (200-250 pb) es van purificar i lligar al vector Bluescript SK(+) prèviament digerit amb EcoRI i HindIII.

Els experiments de Southern blot es van realitzar amb 10 µg de DNA genòmic. L'hibridització es va portar a terme a 65°C en 5xSSC, 0,1%SDS, i els filtres van ser rentats a 55°C en 0,1xSSC, 0,1%SDS. El sistema emprat fou el de detecció de DNA mitjançant marcatge amb digoxigenina (Boehringer Mannheim).

El RNA total va ser preparat com es descriu en [9]. Les sondes de DNA utilitzades pels experiments de Northern blot van ser marcades amb ³²P pel mètode de "random priming". Les hibriditzacions es van fer a 42°C en 5xSSC i amb formamida al 50%. Els rentats es realitzaven a 55°C en 0,1xSSC i 0,1% SDS.

La disruptió del gen *PPZ1* es va fer mitjançant la tècnica de "one-step gene disruption" [10]. Els anticossos contra la proteïna PPZ1 es van obtenir prèvia expressió en *E. coli* d'una part substancial d'aquesta (aa 118-692) fent servir el vector pT7-7.

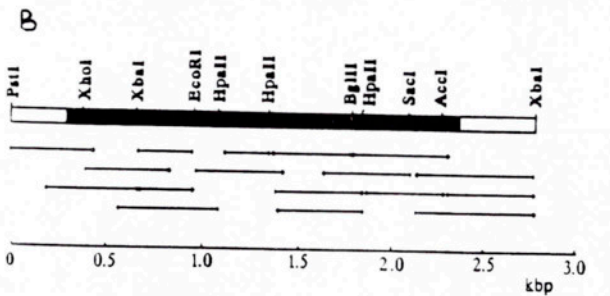
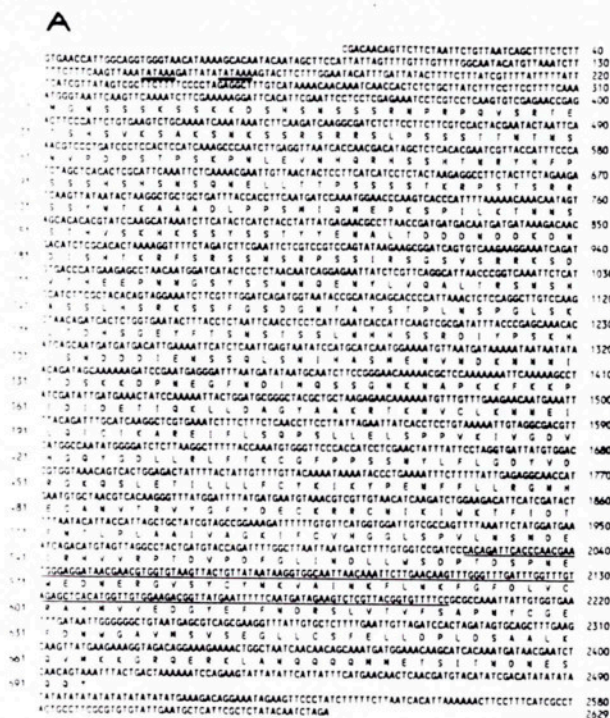


Figura 1.- A) Seqüència de nucleòtids i seqüència deduida d' aminoàcids del gen *PPZ1*. La seqüència que correspon al fragment ST4-2 es troba subratllada i les presumpes caixes TATA ho estan doblement. B) Estratègia de seqüenciació del gen *PPZ1*. Només s'indiquen els centres de restricció rellevants en el procés de subclonació.

posseeix gran quantitat d' aminoàcids bàsics ($pl=10.3$) en contraposició amb la meitat C-terminal ($pl=5.6$).

La funció de la meitat amino-terminal d'aquesta proteïna es desconeguda. Es coneix, però, que en cèl·lules de mamífer i en llevat, l'activitat Ser/Thr fosfatasa pot ser regulada mitjançant la interacció de la subunitat catalítica amb proteïnes reguladores. No podem excloure la possibilitat de que una mateixa molècula contingui les dues funcions. De fet, les subunitats catalítiques de les fosfatases tipus 2B es

RESULTATS I DISCUSIÓ

Aïllament del gen que codifica

PP-Z1. Una de les seqüències amplificades per PCR del DNA genòmic de llevat és l'anomenada ST13-2, de 215 pb. Els experiments de Southern blot, utilitzant ST13-2 com a sonda, van indicar que hibriditzava amb un fragment PstI-PstI d'unes 4.5 Kpb.

Aquesta informació va ésser utilitzada pel clonatge del gen sencer. Es va construir en pUC19 una biblioteca de DNA genòmic digerit amb PstI d'entre 4 i 5 kpb i el seu anàlisi es va dur a terme fent servir la sonda ST13-2. El DNA de l'únic clon positiu obtingut va ser mapejat i subclonat en M13. El fragment clonat conté un ORF de 2.076 pb, codificant un polipèptid de 692 residus amb una massa molecular de 77,418 kDa i $pl=8.4$, que anomenem PPZ1. Trobem dos elements TATA situats a les posicions -151 i -164 (Fig 1).

La proteïna codificada per aquest gen presenta interessants característiques: a) Té un tamany major que la de les subunitats catalítiques de les Ser/Thr fosfatases de llevat, *Drosophila*, mamífers i plantes. b) La meitat carboxi-terminal de la proteïna mostra una identitat del 64% amb la proteïna fosfatasa tipus 1 trobada en *S. cerevisiae*, *DIS2S1* (74% si es consideren els carvis conservatius). c) La regió compresa entre els aminoàcid 1 i 319, que no mostra similituts amb cap de les PP, és molt rica en residus Ser (26% dels aminoàcids i 80% del total de serines). Moltes d'aquestes serines es troben en seqüències adients per fosforilació per la proteïna quinasa dependent d'AMPc de llevat. A més a més, aquesta regió

caracteritzen per una extensió C-terminal d'uns 200 aminoàcids que conté el domini d'unió a la calmodulina, i que serveix com a element regulador. Una possible funció de la primera meitat de PPZ1 podria ser la de reguladora de l'activitat del domini catalític, mitjançant la fosforilació reversible de residus de serina.

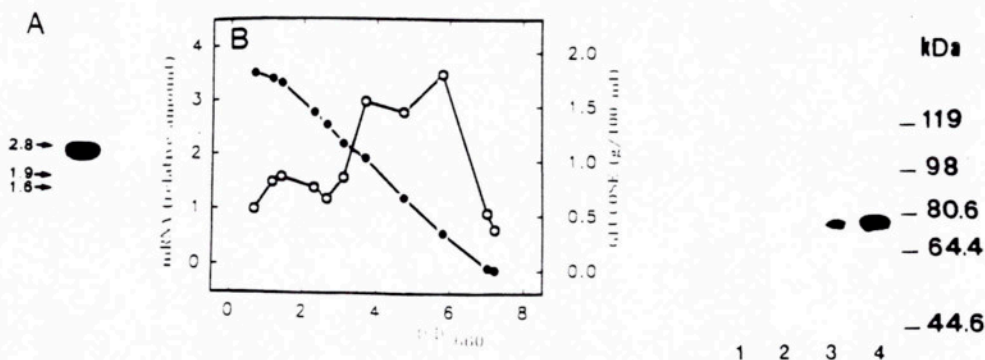


Figura 2.- Expressió del mRNA de PPZ1. A) Northern blot fent servir 5 μ de RNA poli(A)⁺. B) Variació dels nivells de RNAm de la PPZ1 durant el cultiu (o—o) Quantitat relativa de RNAm estimada mitjançant densitometria d'experiments de Northern blot. (●—●) Concentració de glucosa en el medi de cultiu.

Figura 3.- Identificació de la proteïna PPZ1 mitjançant Western blot en extractes de llevat. 1 i 2) Serum preimmune 3 i 4) Serum anti-PPZ1. Les mostres 2 i 4 corresponen a una soca que conté el gen PPZ1 en multicòpia.

Expressió de PP-Z1. El tamany del mRNA de PP-Z1 és de 2,7 kb, segons els experiments de Northern blot (Fig. 2a). La quantitat d'aquests mRNA varia al llarg del cultiu, augmentant 3-4 vegades quan s'ha consumit la meitat de la glucosa del medi de cultiu i retornant als nivells inicials quan aquesta s'ha consumit totalment (Fig. 2b). La proteïna va poder ser detectada mitjançant anticossos en experiments d'immunoblot i apareix amb un pes molecular de 75 kDa, en estreta concordància amb el valor previst. La identitat d'aquesta proteïna va ser corroborada pel fet que es pot detectar un increment en la seva quantitat quan es fan servir extractes cel·lulars d'una soca que conté el gen PPZ1 en un plasmídic multicòpia (Fig. 3)

Disrupció del gen PP-Z1. Per a poder estudiar la funció del producte del gen, vàrem eliminar fragments de la regió codificant, insertant en el seu lloc els gens de *S. cerevisiae* TRP1 o URA3 (Fig. 5). Les cèl·lules diploides de M5 van ésser transformades i seleccionades en els medis adients. Posteriorment es va induir l'esperulació i les espores foren separades per micromanipulació. Les quatre espores de cada tetrada resultaren ser viables, indicant que el producte del gen no és essencial pel creixement de *S. cerevisiae*. Les cèl·lules haploides mutades no es distingeixen de les isogèniques quan comparem la capacitat de

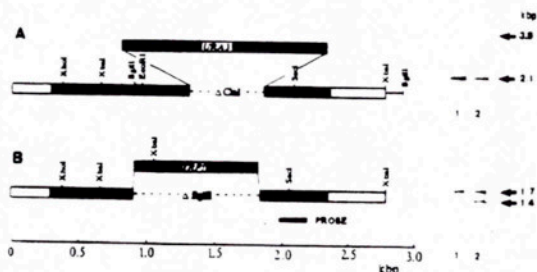


Figura 4.- Disrupció del gen PPZ1. Parts substancials del gen PPZ1 varen ser eliminades i substituïdes pels gens URA3 (A) o TRP1 (B). Una vegada transformada la soca diploide adient, es va preparar DNA genòmic dels transformants estables *trp1⁻* o *ura3⁻* i es va procedir a l'anàlisi per Southern blot. 1) Soca salvatge 2) Diploide heterozigòtic amb una còpia de PPZ1 interrompuda.

creixement en un medi amb font de carbó no fermentable, ni en la sensibilitat al factor- α o al shock tèrmic. A més a més, les cèl·lules diploides homozigòtiques per la disrupció són capaç d'esporejar normalment. Una de les explicacions per la manca d'un fenotip evident podria ser la existència d'un segon gen capaç de complementar funcionalment les funcions de *PPZ1*. De fet, existeixen evidències [11] que suggereixen que aquest segon gen existeix i que la seva seqüència pot ésser força semblant. El nostre laboratori esta adreçant els seus esforços a la clonació i identificació d'aquest segon gen.

REFERENCIES

- 1.- Walsh, D.A.; Newsholme, P.; Cawley, K.C.; Van Patten, S.M. i Angelos, K.L. (1991) *Physiological Reviews* 71, 285-304.
- 2.- Cohen, P. (1989) *Annu. Rev. Biochem.* 58, 453-508.
- 3.- Ingebritsen, T.S. i Cohen, P. (1983) *Science* 221, 331-338.
- 4.- Holzer, H. (1987) *Adv. Prot. Phosphatases* 4, 153-164.
- 5.- Ohkura, H.; Kinoshita, N.; Miyatani, S.; Toda, T. i Yanagida, M. (1989) *Cell* 57, 997-1007.
- 6.- Sneddon, A.A.; Cohen, P.T.W. i Stark, M.J.R. (1990) *EMBO J.* 9, 4339-4346.
- 7.- Sneddon, A.A. i Stark, M.J.R. (1991) *Adv. Prot. Phosphatases* 6, 307-330.
- 8.- Clotet, J.; Posas, F.; Casamayor, A.; Schaaff-Gerstenlager, I. i Arino, J. (1991) *Curr. Genet.* 19, 339-342.
- 9.- Sherman, F.; Fink, G.R. and Hicks, J.B. (1986) in "Methods in Yeast Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- 10.- Rothstein, R.J. (1983) *Methods Enzymol.* 101, 212-211.
- 11.- Da Cruz e Silva, E.F.; Hughes, V.; Mc. Donald, P.; Stark, M.J.R. i Cohen, P.T.W. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1089, 269-272.

Agraïments: Aquest treball a tingut el suport de la D.G.I.C.Y.T. (Projecte PB-0313) i d'una "Acción Integrada Hispano-Alemana". F.P. gaudeix d'una beca F.P.I. del M.E.C. Els autors agraeixen la col·laboració de M. Camps, A. Vlalta, N. Morral i X. Estivill.