

1.3 Caracterització bioquímica de l'holoenzim recombinant CK2 de blat de moro (rmCK2)

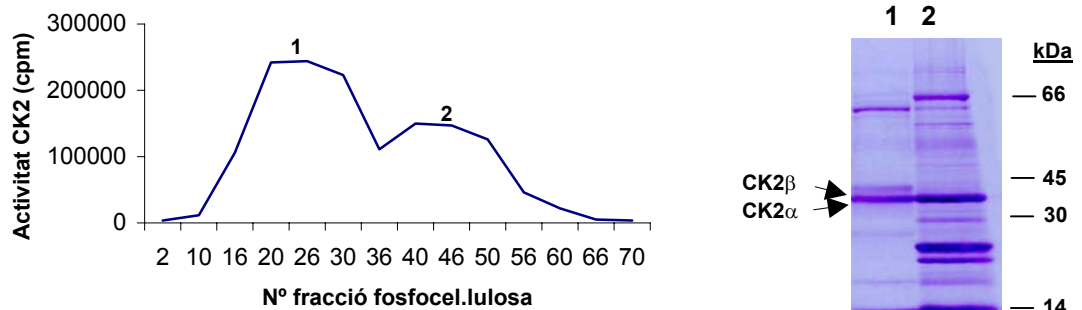
Amb l'objectiu de completar la caracterització de l'holoenzim CK2 es va dur a terme una purificació de la proteïna recombinant CK2 de blat de moro (rmCK2). L'holoenzim es va reconstituir *in vitro* a partir de les subunitats CK2 α -1 i CK2 β -1. La proteïna CK2 purificada es va utilitzar per l'anàlisi de l'estructura i la caracterització bioquímica a nivell d'activitat CK2.

La purificació es va dur a terme essencialment segons Grankoswki et al., (1991), a on es descriu la purificació de l'holoenzim humà (rhCK2). Es va utilitzar la subunitat CK2 α -1 clonada en el vector d'expressió pT7-7, cedida pel Prof. O.G. Issinger. La subunitat CK2 β -1 es va clonar al vector d'expressió pQE31, que expressa la proteïna fusionada a una cua d'histidines. Degut a l'alta insolubilitat de les subunitats reguladores CK2 β , les proteïnes recombinants CK2 α -1 i CK2 β -1 es van expressar per separat en *E.coli* i els pellets bacterians es van barrejar en una proporció 1CK2 α :3CK2 β per reconstituir l'holoenzim. En un primer pas de purificació es va realitzar una columna d'intercanvi aniònic (fosfocel·lulosa P11) i es van eluir les fraccions utilitzant un gradient de sal de 300 mM a 1 M NaCl. Es va fer un test d'activitat CK2 de les fraccions recollides i es van observar dos pics d'activitat: un primer pic, eluit a 400-450 mM NaCl i un segon pic, eluit a 600 mM NaCl. Les fraccions corresponents als punts d'activitat màxima de cada pic es van analitzar per tinció de Coomassie i per Western blot i es va comprovar que el primer pic contenia l'holoenzim reconstituït, es a dir, les subunitats CK2 α i CK2 β , mentre que el segon pic contenia només subunitats catalítiques CK2 α (Figura 6A). L'activitat màxima del primer pic (holoenzim) és superior a la del segon (CK2 α). Aquests resultats indiquen que l'holoenzim CK2 de blat de moro es pot reconstituir, tal i com s'ha descrit per l'holoenzim humà, i que la presència de la subunitat CK2 β augmenta l'activitat CK2. Les fraccions del primer pic, que contenien l'holoenzim CK2 es van reunir i degut a que les subunitats CK2 β estan fusionades a cues d'histidina es va purificar l'holoenzim CK2 utilitzant columnes de Níquel–agarosa i es va eluir la mostra utilitzant un gradient de 250mM a 1M imidazol. La forta interacció entre les subunitats CK2 α / β permet que les subunitats CK2 α co-purifiquin amb les CK2 β utilitzant aquest sistema tot i que no

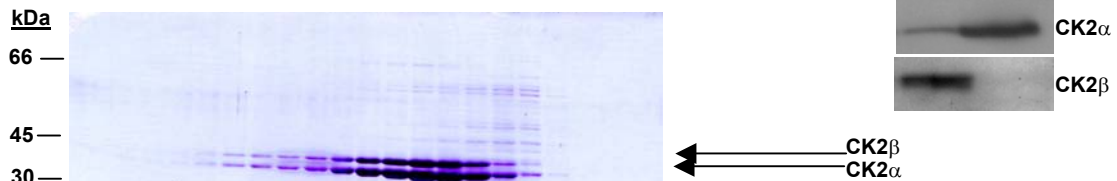
Resultats

presentin cues d'histidina (Figura 6B). Una proteïna d'uns 14 kDa co-purifica amb l'holoenzim CK2, per tant, va ser necessari un darrer pas de purificació. Es va utilitzar una columna de gel filtració Superosa 6, acoblada a un sistema d'HPLC i es va eluir la mostra a 1 M NaCl (Figura 6C, esquerra). Després de concentrar la mostra mitjançant una segona columna de Niquel-agarosa, l'holoenzim recombinant CK2 de blat de moro es va obtenir a una puresa del 95% i a una concentració de 1mg/ml i es va utilitzar per posteriors anàlisis (Figura 6C, dreta).

A



B



C

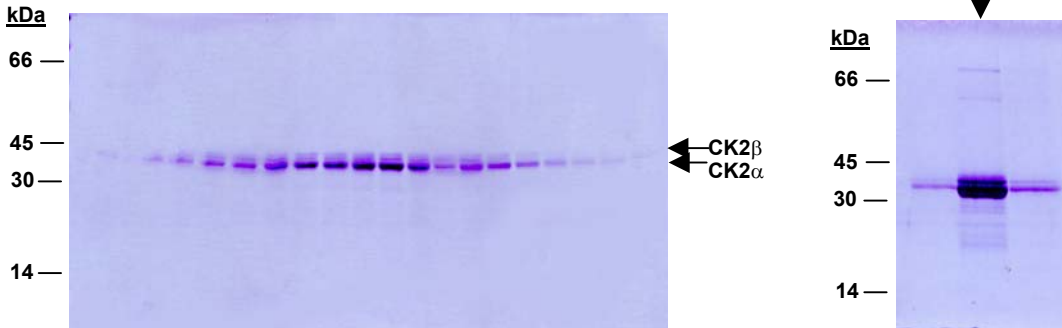


Figura 6: Purificació de l'holoenzim recombinant CK2 de blat de moro (rmCK2). Panel A: Activitat CK2 de les fraccions eluides de la columna de fosfoce.lulosa P11. Dreta: Tinció de Commassie i Western blot utilitzant anticossos contra les subunitats CK2α i CK2β de blat de moro. carril 1: fracció de màxima activitat del pic 1, carril 2: fracció de màxima activitat del pic 2. Panel B: Tinció de Commassie del perfil d'elució de la columna de Ni-agarosa eluida en un gradient d'imidazol. Panel C: Tinció de Commassie del perfil d'elució de la columna Superosa 6. A la dreta, tinció de Commassie de la proteïna purificada i concentrada rmCK2.

Per comprovar que l'holoenzim CK2 de blat de moro està format per un tetràmer de dues subunitats catalítiques CK2 α i dues reguladores CK2 β , es va utilitzar una cromatografia analítica acoblada al sistema SMART SYSTEM de Pharmacia. Aquest sistema, basat en una cromatografia de gel filtració, Superosa 6, permet conèixer de manera molt acurada el pes molecular de les proteïnes. Per tant, aquest anàlisi es va realitzar amb l'objectiu de conèixer l'estat d'agregació de l'holoenzim, es a dir, comprovar si realment l'holoenzim es reconstitueix en forma de tetràmer o bé es troba en altres formes: trímer, dímer o monòmer. Com a patrons, es van utilitzar l'holoenzim CK2 humà i la subunitat catalítica CK2 α de blat de moro de les que es coneix exactament el pes molecular. Després de analitzar l'holoenzim CK2 de blat de moro, es van comparar els perfils d'elució d'aquestes proteïnes. L'holoenzim CK2 de blat de moro presentava un perfil molt semblant a l'holoenzim CK2 humà, mentre que el monòmer CK2 α presentava un pes molecular molt inferior. Per tant es va concloure que l'holoenzim CK2 de blat de moro té una estructura tetramèrica, de pes molecular molt similar, una mica superior, a l'holoenzim CK2 humà. (Figura 7).

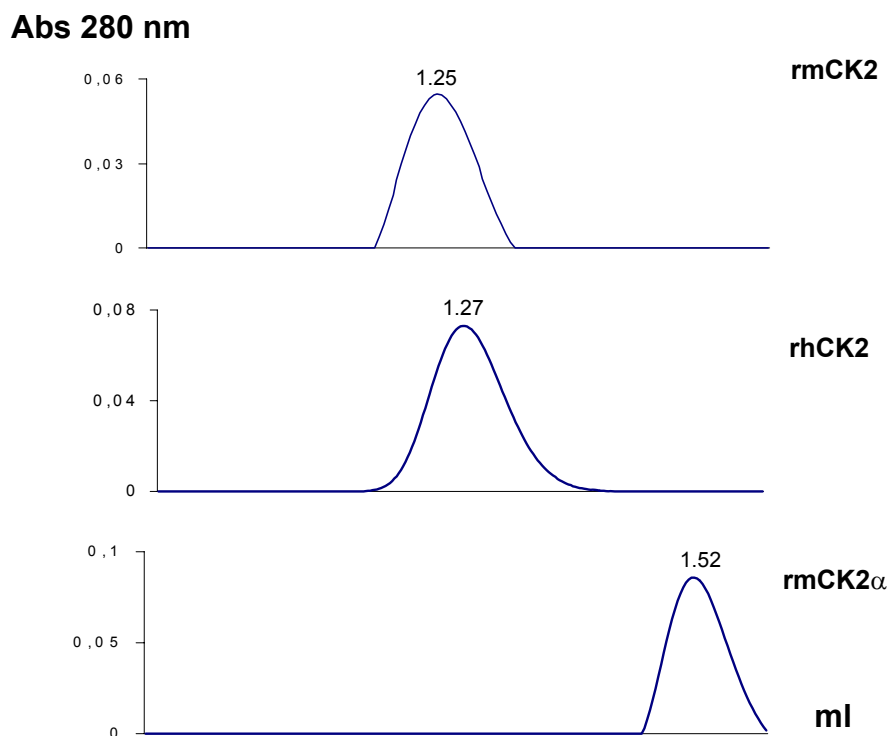


Figura 7: Cromatografia analítica acoblada al sistema SMART SYTEM de Pharmacia. Perfil d'elució (en ml) de l'holoenzim CK2 de blat de moro (1.25 ml), l'holoenzim CK2 humà (1.27 ml) i la subunitat catalítica CK2 α (1.52 ml).

Resultats

Per a la caracterització bioquímica a nivell d'activitat de la proteïna quinasa CK2 de blat de moro, es van calcular les constants cinètiques K_m , K_{cat} i V_{max} per ATP i GTP i es van realitzar assaigs d'activitat CK2 amb l'holoenzim CK2 de blat de moro (rmCK2) i amb l'holoenzim CK2 humà (rhCK2) en presència d'heparina, polilisina, NaCl, urea i competició ATP/GTP.

Si es compara les K_m per ATP de rmCK2 i de rhCK2, els valors són 4.5 μM i 5.8 μM respectivament. En canvi, quan el donador de fosfat és el GTP la K_m per blat de moro (6.2 μM) és bastant inferior a la de rhCK2 (11.3 μM). Aquestes dades indiquen que l'holoenzim CK2 de blat de moro pot utilitzar ATP i GTP gairebé amb la mateixa afinitat (K_m 4.5 μM per ATP i 6.2 μM per GTP), en canvi, l'holoenzim humà presenta més afinitat per ATP que per GTP. No s'observen diferències a nivell de V_{max} .

Donador de fosfat: ATP				
	K_m	K_{cat}	K_m/K_{cat}	V_{max}
rmCK2 α	13	0.81	16.05	0.24
rmCK2	4.5	4	1.125	0.84
rhCK2	5.8	2.8	2.07	0.64
Donador de fosfat: GTP				
	K_m	K_{cat}	K_m/K_{cat}	V_{max}
rmCK2 α	22	0,88	25	0,269
rmCK2	6.2	2	3.1	0,42
rhCK2	11.3	1.8	6.27	0,38

Taula I: Determinació de les constants cinètiques pels holoenzims CK2 de blat de moro (rmCK2) i humà (rhCK2). Els valors per la subunitat CK2 α de blat de moro (rmCK2 α) estan extrets de Niefind et al., (1999). Els valors de K_m estan expressats en μM , els de K_{cat} en sec^{-1} i els de V_{max} en $\mu\text{M min}^{-1}$

Es va comparar l'efecte de l'heparina, un inhibidor clàssic de l'activitat CK2, en l'activitat dels dos holoenzims (Figura 8A). El 50% de l'activitat de l'holoenzim humà s'inhibeix en presència de 5 μg d'heparina, mentre que el mateix efecte s'obté en l'holoenzim de blat de moro amb només 0.5 μg d'heparina. Per tant, els resultats obtinguts indiquen que la CK2 de blat de moro és clarament més sensible al tractament amb heparina que la CK2 humana. Les poliamines com l'espermina, l'espermidina, o les polilisinines s'han descrit com estimuladores de l'activitat CK2. Es van incubar els dos holoenzims amb quantitats creixents de polilisina (de 0.05 μg a 2 μg). S'observa que

l'holoenzím CK2 humà és capaç de doblar la seva activitat en presència de 0.1 µg de polilisina. En canvi, calen 0.5 µg de polilisina per obtenir el mateix increment d'activitat en blat de moro (Figura 8B). També es va mesurar l'activitat dels enzims a diferents concentracions de sal (Figura 8C). L'holoenzím CK2 humà presenta l'activitat màxima a 0.1 M NaCl, mentre que el de blat de moro la presenta al voltant de 0.05 M NaCl. A 0.2 M NaCl l'holoenzím humà encara presenta el 60% d'activitat mentre que l'activitat del de blat de moro s'ha reduït al 20%. Per tant, es pot concloure que l'holoenzím de blat de moro és més sensible a la sal que l'humà.

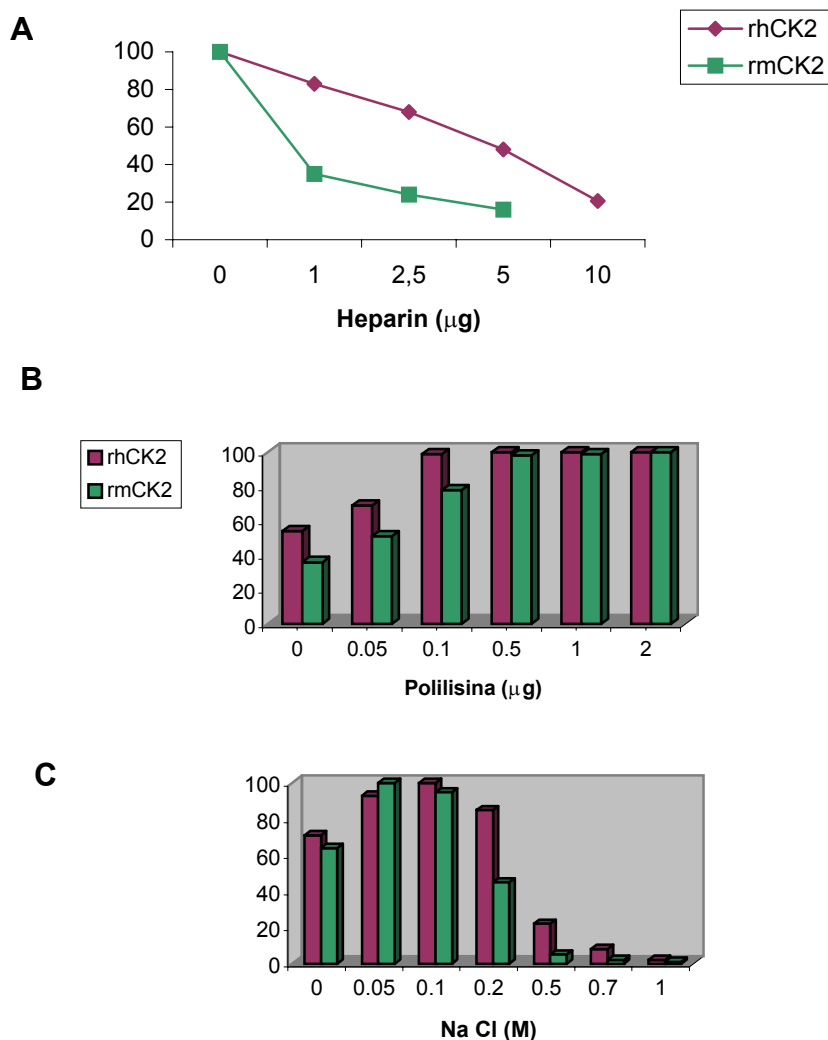


Figura 8: Efecte de inhibidors i estimuladors sobre l'activitat de l'holoenzím CK2 de blat de moro (rmCK2) i l'holoenzím CK2 humà (rhCK2). Representacions gràfica de l'activitat (en %) de l'rmCK2 (en verd) i de rhCK2 (en vermell) en concentracions creixents d'heparina (Panel A), polilisina (Panel B) i NaCl (Panel C).

Resultats

Per comprovar l'especificitat dual per co-substrat que presenten els enzims CK2 l'activitat enzimàtica es va mesurar en presència de (i) només ATP com a donador de fosfat (ii) afegint un segon donador de fosfat, GTP no radioactiu. Es comprova que el GTP competeix millor pel ATP en el cas de l'holoenzim de blat de moro que per l'holoenzim humà (Figura 9A). També es va determinar l'efecte de diferents concentracions d'un agent desnaturalitzant com l'urea sobre l'estabilitat dels dos enzims, (Figura 9B). Degut a que l'activitat específica dels dos enzims era diferent (0.06 pmol/min/ng de l'holoenzim humà i 0.2 pmol/min/ng del de blat de moro) els experiments es van realitzar a dues concentracions de proteïna diferents però amb les mateixes unitats d'enzim i no es va observar diferències significatives. Fins a una concentració de 0.8 M d'urea no s'observen diferències entre els dos holoenzims, tots dos conserven l'activitat inicial. A 2 M d'urea la CK2 de blat de moro perd el 64% d'activitat mentre que la humana només perd el 34%. A 4M urea l'holoenzim de blat de moro ha perdut completament l'activitat mentre que l'humà ha perdut un 86%, indicant que l'holoenzim de blat de moro és més sensible a urea que l'holoenzim humà.

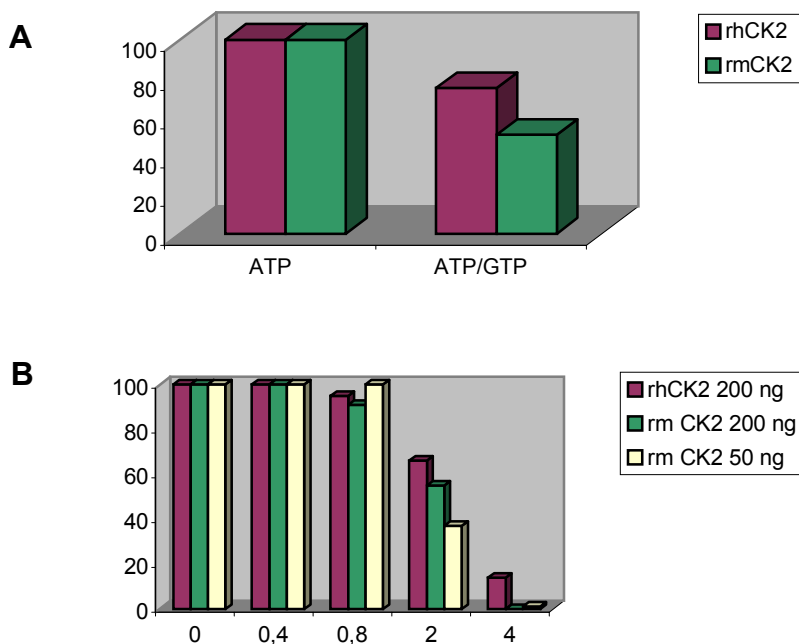


Figura 9: Altres efectes sobre l'activitat de l'holoenzim CK2 de blat de moro (rmCK2) i l'holoenzim CK2 humà (rhCK2). Panel A: Representació gràfica de l'activitat (en %) de l'rmCK2 (en verd) i de rhCK2 (en vermell) només amb ATP com donador de fosfat (esquerra) i en presència del competidor GTP (dreta). Panel B: Representació gràfica de l'activitat (en %) de l'rmCK2 (en verd 200 ng i en groc 50 ng) i de rhCK2 (en vermell 200 ng) en concentracions creixents d'urea.

1.4. Interacció entre els diferents dominis de CK2 β i les subunitats CK2 α i CK2 β

Les subunitats reguladores CK2 β de plantes presenten tres dominis diferenciats: L'extrem N-terminal, d'uns 90 aminoàcids que no es troba en subunitats CK2 β d'altres organismes. No es coneix la funcionalitat d'aquest domini i no presenta homologia amb cap altre proteïna coneguda. A més, també contenen altres dominis conservats com el domini acídic i el domini de dit de zinc.

Es va utilitzar el sistema del doble híbrid per estudiar la funcionalitat dels dominis de les subunitats CK2 β en la interacció entre les diferents subunitats CK2. Aquest sistema s'utilitza per detectar interacció entre dues proteïnes. El cDNA d'una de les proteïnes d'interès es clona en un vector d'expressió que conté el domini d'unió (binding domain, BD, aminoàcids 1-147 de la proteïna GAL4 de llevat) i s'expressa com a proteïna de fusió amb el domini BD. Un segon gen es clona en el vector d'expressió que conté el domini d'activació o AD, (aminoàcids 768-881 de la proteïna GAL4 de llevat). Quan les proteïnes de fusió interaccionen BD i AD s'aproximen i poden activar la transcripció dels gens "reporter". La soca *S.cerevisiae* AH109 conté tres gens "reporter": His3, Ade1 i X-Gal.

A més d'utilitzar les construccions descrites al treball 1, es van obtenir mitjançant PCR diferents construccions de la subunitat CK2 β -1, esquematitzades a la figura 10, que es van clonar en el vector d'expressió pGBT9. A la delecció 1 de CK2 β -1 (del1) li manca el domini N-terminal (80 aminoàcids). A la construcció del 2 se li han deleccionat el domini N-terminal i el domini acídic central (180 aminoàcids) es a dir, consta només del domini de dit de zinc. La soca *S.cerevisiae* AH109 es va co-transformar amb els diferents plàsmids que contenien les proteïnes d'interès fusionades a dominis d'unió o d'activació i els transformants es van seleccionar en plaques selectives i es va realitzar assaig X-Gal en filtre. (Figura 10).

S'observa interacció entre pGBT9-CK2 β -1/ pGAD424-CK2 β -1, pGBT9-CK2 β -1/ pGAD424-CK2 α -2, pGBT9-del1/pGAD424-CK2 β -1 i pGBT9-del1/pGAD424-CK2 α -2. Per tant, sembla que la delecció de l'extrem N-terminal de CK2 β (del1) no afecta ni a la

Resultats

interacció amb les subunitats catalítiques CK2 α ni a la dimerització CK2 β /CK2 β , indicant que aquesta regió no és essencial per la reconstitució de l'holoenzim. En canvi, quan s'utilitza la construcció del2 que només conté el domini de dit de zinc no es suficient per interaccionar amb les altres subunitats CK2

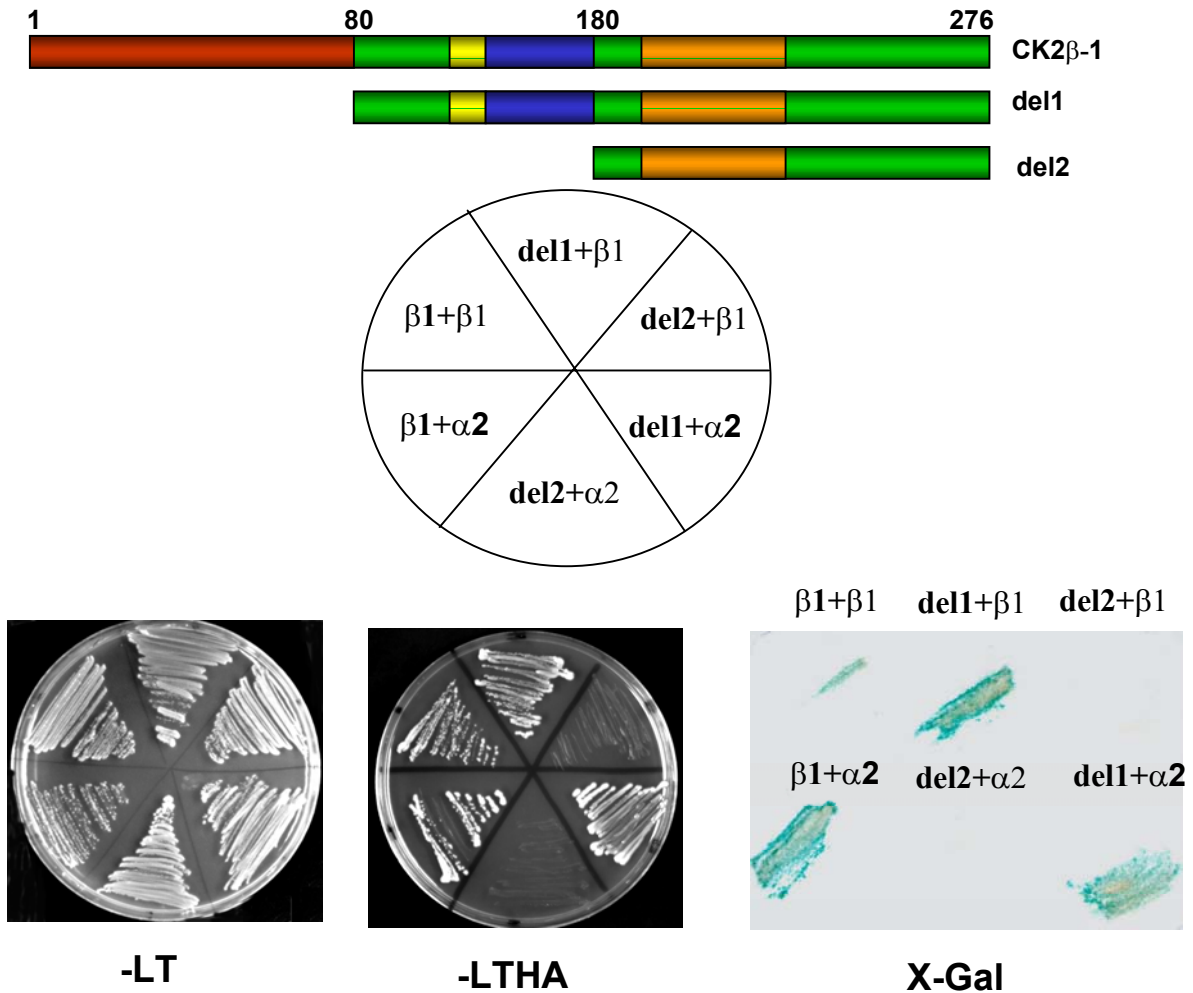


Figura 10: Interacció entre els diferents dominis de CK2 β i les subunitats CK2 α i CK2 β . Panel A: Esquema de les construccions clonades en el vector pGBT9 utilitzades a l'experiment. Panel B: Selecció dels llevats transformats en plaques -Leu -Trp i plaques -Leu -Trp- His -Ade .Assaigs X-Gal en filtre. β 1+ β 1:pGBT9- β 1/pGAD424-CK2 β -1, del1+ β 1:pGBT9-del1/pGAD424-CK2 β -1, del2+ β 1:pGBT9-del2/pGAD424-CK2 β -1, β 1+ α 2:pGBT9- β 1/pGAD424-CK2 α -2, del1+ α 2:pGBT9-del1/pGAD424-CK2 α -2, del2+ α 2:pGBT9-del2/pGAD424-CK2 α -2.