

CAPÍTOL III

3.1 Anàlisi de la llibreria de doble híbrid amb el pGBT9-CK2 β -1

S'ha demostrat que a la cèl.lula la CK2 no només es troba a en la forma clàssica heterotetramèrica sinó que també les subunitats lliures poden estar interaccionant amb altres proteïnes i tenir altres funcions, a part de les descrites per l'holoenzim (Pinna and Meggio, 1997). Tot i que s'han descrit alguns casos de proteïnes que interaccionen amb les subunitats catalítiques CK2 α , la majoria de les proteïnes que interaccionen amb CK2 ho fan mitjançant la subunitat reguladora CK2 β (veure revisió Guerra and Issinger, 1999). La tècnica del doble híbrid és un bon sistema per identificar proteïnes que interaccionen o bé només amb una de les subunitats, o bé amb l'holoenzim. La identificació d'aquestes proteïnes "partners" de CK2 pot apropar-nos al coneixement de diferents funcions en que es pot trobar implicada la proteïna quinasa CK2.

Tal i com ja s'ha descrit en el treball 1, amb l'objectiu d'aïllar els diferents membres de la família multigènica de les subunitats reguladores CK2 β de blat de moro es va realitzar un anàlisi/crivellatge d'una llibreria doble híbrid de fulla estressada de blat de moro utilitzant el cDNA CK2 β -1 clonat en el vector d'expressió pGBT9 com a "bait". Com a resultat d'aquest anàlisi es van aïllar múltiples positius dels quals la major part corresponien a altres subunitats CK2 α o CK2 β , degut a la forta interacció descrita entre subunitats CK2 α/β i la propietat de dimerització de les subunitats CK2 β . No obstant, també es van identificar altres proteïnes que podrien ser possibles "partners" i/o substrats de CK2 i que es descriuen en aquest apartat.

Per l'anàlisi de la llibreria doble híbrid es va seguir el procés esquematitzat a la figura 23. Es va utilitzar el sistema MATCHMAKER Two-Hybrid original (Clontech) i la soca de *S.cerevisiae* HF7c, que conté com a gens "reporter" His3 i LacZ. La soca es va transformar de manera seqüencial. La primera transformació es va realitzar amb el plàsmid pGBT9-CK2 β 1, es va seleccionar els llevats en plaques SD-Trp. Després, aquest llevat seleccionat es va tornar a transformar amb 50 μ g de DNA de la llibreria de fulla estressada de blat de moro, construïda amb plàsmids pAD-GAL4. L'eficiència de transformació va ser de 350.000 clons analitzats.

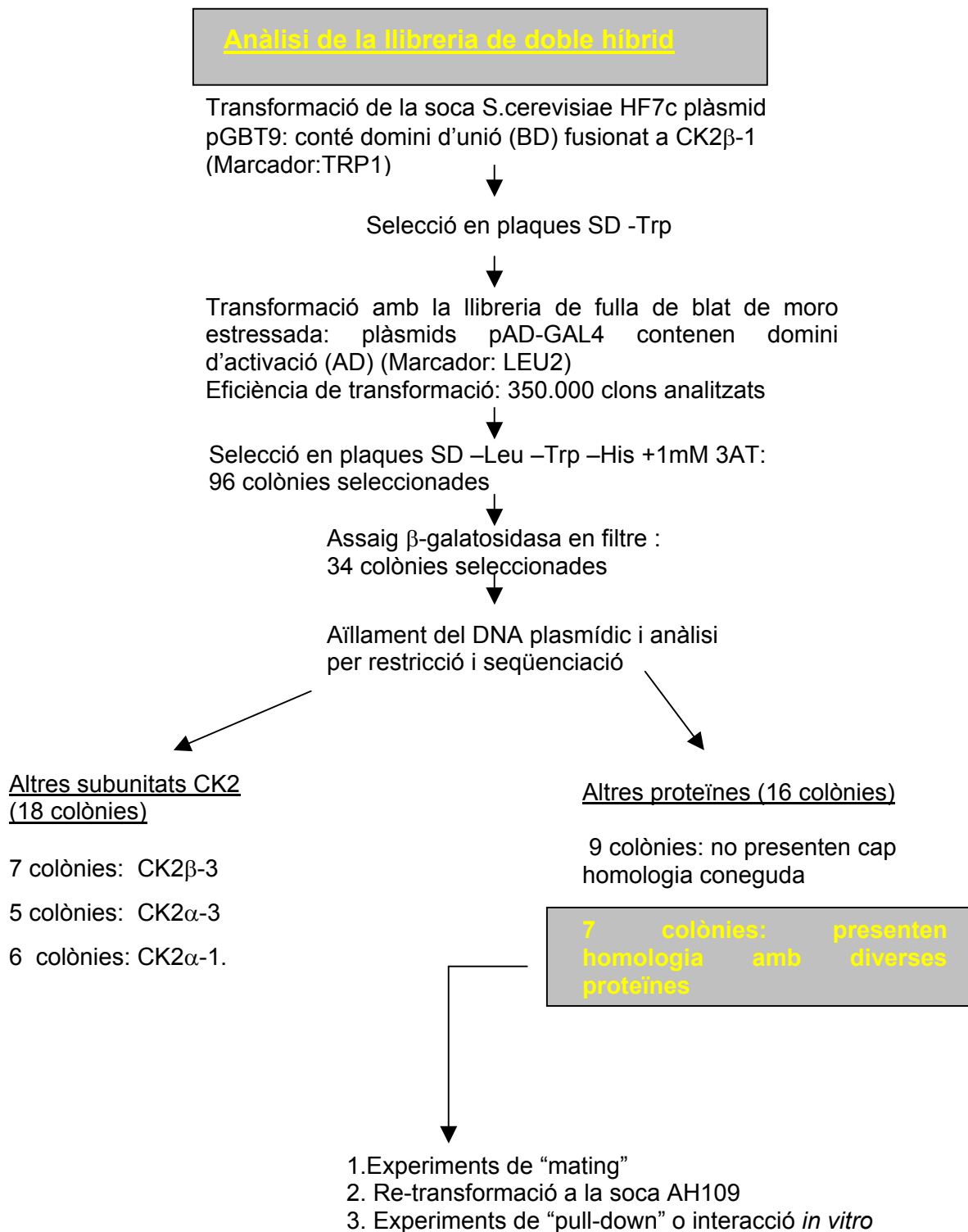


Figura 23: Esquema del procés seguit per l'anàlisi de la llibreria de doble híbrid de fulla estressada de blat de moro amb el plàsmid pGBT9-CK2β-1

Els positius van créixer en plaques selectives SD–Leu –Trip –His +1mM 3AT. Les colònies crescudes es van repicar en plaques màster SD–Leu –Trip –His +1mM 3AT. D'aquests positius, un total de 96 es va realitzar l'assaig β -galactosidasa en filtre. Després de l'assaig, que es mostra a la figura 24, només 34 es van considerar positius i van ser seleccionats per continuar amb l'anàlisi.

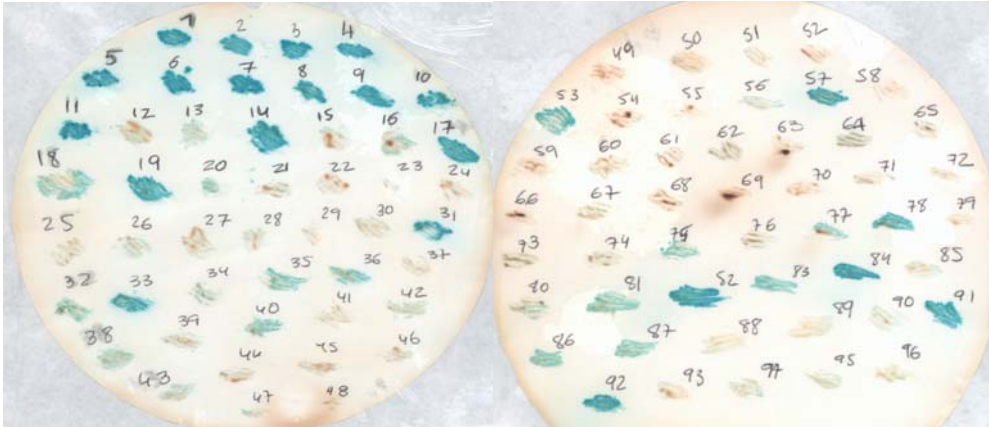


Figura 24: Assaig β -galactosidasa en filtre dels 96 clons aïllats de l'anàlisi /crivellatge de la llibreria de doble híbrid de fulla estressada de blat de moro utilitzant la subunitat reguladora CK2 β -1 com a "bait". Després de 8 hores de reacció colorimètrica es van seleccionar els 34 clons que presentaven color blau.

Dels 34 clons seleccionats es va extreure el DNA de llevat i després de transformar en *E.coli* es van separar els plàsmids pGBT9-CK2 β -1 dels plàsmids pAD-GAL4 de la llibreria, corresponents a les proteïnes "partners" aïllades. L'anàlisi per restricció amb diferents enzims indicava que molts dels cDNAs obtinguts eren repetits. Es va obtenir la seqüència de diversos positius que presentaven diferents patrons de restricció i es va comprovar que dels 34 clons analitzats, el 52% (18 en total) corresponien a altres subunitats CK2: 7 corresponien a CK2 β -3, 5 a CK2 α -3 i 6 a CK2 α -1. Per tant, només 16 dels clons aïllats corresponien a altres proteïnes que interaccionen amb la CK2. Es van comparar les seqüències obtingudes amb les dipositades al banc de dades utilitzant el programa BLAST i es va comprovar que 9 de les proteïnes aïllades podien corresponien a proteïnes no descrites ja que no presentaven homologia amb cap proteïna coneguda. Tot i que l'anàlisi de la interacció de la CK2 amb aquestes proteïnes podria ser de gran interès, es va optar per continuar la caracterització únicament amb les proteïnes que presentaven homologia amb proteïnes prèviament descrites.

3.2 Proteïnes que interaccionen amb CK2 β -1 de blat de moro

Per tant, l'anàlisi es van continuar amb 7 colònies seleccionades que presentaven homologia amb proteïnes conegudes. Per confirmar que realment es tractava de proteïnes que interaccionaven amb CK2, es van realitzar diverses aproximacions:

- Experiments de "mating": Consisteix en el creuament de dues soques de llevat, Y187 (MAT α) i H7Fc (MATa). Els plasmids pAD-GAL4 positius seleccionats es van transformar a la soca Y187 (MAT α) i es van seleccionar en plaques SD–Leu. El plàsmid pGBT9-CK2 β 1, amb el domini d'unió (BD) es van transformar a la soca H7Fc (MATa) i es va seleccionar en plaques SD–Trp. Per comprovar si existia interacció entre les dues proteïnes fusionades a BD i AD es va creuar les soques transformades, es va seleccionar en plaques SD –Leu –Trp –His +1mM 3AT i es va realitzar l'assaig β -galactosidasa. Un cop es va comprovar que els positius interaccionaven amb pGBT9-CK2 β 1, es va utilitzar aquest sistema per veure si hi havia interacció també amb les altres subunitats CK2 β , pGBT9-CK2 β 2 i pGBT9-CK2 β 3.
- Retransformació a la soca AH109: Es van retransformar els positius i pGBT9-CK2 β 1 per repetir la interacció de doble híbrid però utilitzant la soca AH109. Aquesta soca forma part del sistema MATCHMAKER Two-Hybrid 3 (Clontech) i conté tres gens "reporter" His3, Ade2 i LacZ. També es va comprovar la interacció en aquest sistema amb les altres subunitats CK2 β , pGBT9-CK2 β 2 i pGBT9-CK2 β 3.
- Assaig de "binding" in vitro o "pull-down": Els positius seleccionats van ser clonats en pauta en vectors d'expressió pET28 i es va fer la traducció *in vitro* amb [³⁵S]-Metionina utilitzant el sistema T7-TNT Quick coupled Transcription/ Translation system (Promega). Els assaigs de "pull-down" es van realitzar d'acord amb la metodologia descrita al treball 1.

Cadascuna de les colònies aïllades es va anomenar amb el seu número seguit de 2h (per doble híbrid). Només un dels clons obtinguts era repetit (322h i 352h). A continuació es presenten els resultats obtinguts per la comprovació de l'interacció entre CK2 β -1 i les proteïnes 162h, 32/352h, 382h, 402h i 832h. La interacció entre CK2 i 912h es va estudiar de manera més detallada (apartat 3.3). Degut a que els resultats obtinguts a partir dels experiments de "mating" i dels de re-transformació en la soca AH109 són molt similars en tots els casos, només es mostren els assaigs X-Gal dels experiments de re-transformació en la soca AH109.

162h: el cDNA de 162h presenta 1250 pb i codifica per una proteïna parcial de 407 aminoàcids de pes molecular teòric 43.6 kDa, i pI 9.7. A la proteïna 162h es troben cinc llocs consens de fosforilació CK2. En l'anàlisi de la seva seqüència proteica trobem un domini anomenat TCP, de 180 aminoàcids, que presenta una estructura del tipus basic-Helix-Loop-Helix (b-HLH) propi de factors de transcripció com cycloidea (*cyc*) o teosinte branched1 (*tb1*). Aquest factors de la família TCP estan implicats en funcions de creixement i desenvolupament de les plantes (Cubas et al., 1999). A la figura 25 es mostra l'alineament segons el programa CLUSTALW entre la proteïna 162h amb una proteïna de 430 aminoàcids TCP3/cicloidea codificada per una EST d'arròs (número d'accés: AP003268.4). Entre ambdues proteïnes hi ha un 70% d'homologia. Experiments de "mating" i re-transformació en la soca AH109 mostren que 162h interacciona amb CK2- β 1 i amb les altres subunitats reguladores CK2 β -2 i CK2 β -3. L'assaig "pull-down" mostra també interacció, tot i que més feble, amb la subunitat catalítica CK2 α -2 (figura 25B)

A

```

162H 1 -----GTREKER-AQAEQLQIYHQQG--F
TCP3 1 MAGRELKLEEDKNQLSKGLDPWTSNPTASASTLHYLLQEKERAQQAEQLQIYQQQQGG

162H 23 SYLQHHGRQQQQQQPPRAAGAGPDG-VSSGESTPADALATAFVSGRIVRSAAGRKDRHS
TCP3 61 SFLQHRIRQPASR--GPGGGGGGGDGGSSGESTPVEALATAFGAGRIVRSAAGRKDRHS

162H 82 KVCTARGLRDRRVRLAAHTAIRFYDVQDRLGYDRPSKAVDWLLRNAKAAIDETPADRMEV
TCP3 119 KVCTARGLRDRRVRLAAHTAIRFYDVQDRLGYDRPSKAVDWLLRNAKAAIDETPDRAEA

162H 142 QPPTEAADATEP--AEQVTSTSPYRFCDPGG----AIGAMAGSFMPHSVGGADGGVSGS
TCP3 178 PPPAAASTEQPEATEQATSTS-YGFENTTGMTSAASAAAGSFLPHSLGADR--VSDS

162H 195 GNVKSLPSSSAAS--TTPTODEYRGSPPDLLSRTTINHQPQELCLTLQSNANSOHHQHHH
TCP3 235 --VKSLPSSSTASGAASAGHDEYRGSPPDLLSRTTSNQQPQELCLTLQSN-----

162H 253 QQQQQFGHVSPNOHGMISGAAGVQGWAAEHQQRMPSWQHASENGAGAGNGG---DSYMF
TCP3 284 --QHQLFSHVSNHHGMIS-SAGVPGWP-DHSQRMQAW-HAPENSTGDRGGGNGDCYMF

162H 310 GVPPRQGLDHQGGQLFSKGNFSPVAAG--RLRTWLDP--LAAIHQQPSAMAG-QVGFT
TCP3 339 AMPSRQG-LDQS--QLFSHGELQSSGRGWASARAWLDPLAVAAIHHQPSTMAAGQVGFG

162H 365 IWLAPARVHGVLAPRRGXMFRAGGARKQAIESDERTCLTTTTR
TCP3 396 HLVGGAGGGGFMG-----FLAPAAQRLEGE-EE--HGSEVIR

```

B

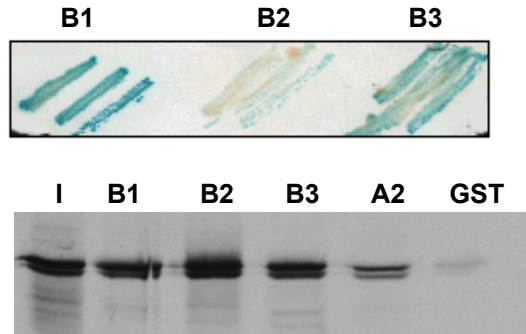


Figura 25: Interacció entre la proteïna 162h i la proteïna quinasa CK2. A: Alineament entre la proteïna 162h i la proteïna TCP3/cicloidea codificada per una EST d'arròs (AP003268.4). C: Assaig β -galactosidasa en filtre d'interacció entre 162h i CK2 β -1, CK2 β -2 i CK2- β 3 realitzat a la soca AH109 i assaig "pull-down" d'interacció entre 162h i les proteïnes CK2 β -1, CK2 β -2, CK2- β 3 i CK2 α -2 fusionades a GST i GST sola (control). L'input (I) representa el 10% de les proteïnes marcades.

322h (i 352h): el cDNA de 322h presenta 1260 pb i codifica per una proteïna de 234 aminoàcids de pes molecular teòric 26.4 kDa, i pI 9.5. A la proteïna 322h es troben quatre llocs consens de fosforilació CK2. A l'extrem amino terminal conté un domini de 70 aminoàcids del tipus RRM (RNA recognition motif) i al extrem carboxi terminal una zona rica en glicines i arginines característica del dominis GAR. Aquest dos tipus de dominis s'ha trobat en diverses proteïnes d'unió a RNA com hnRNPs o snRNPs, indicant que

probablement 322h és una proteïna d'unió a RNA. A la figura 26A es mostra l'alineament entre la proteïna 322h i una proteïna d'unió a factors d'export de RNA (RNA and export factor binding 2-I-like protein) d'*Arabidopsis thaliana* (número d'accés: AB015475.1) amb la que presenta un 70% d'homologia. Aquestes proteïnes són del tipus hnRNP-like, estan descrites en llevat, *Xenopus*, *C.elegans* i ratolí i s'uneixen a proteïnes implicades en l'export de RNAs del nucli a citoplasma (Stutz et al., 2000) Experiments de "mating" i retransformació en la soca AH109 van confirmar que 322h interaccionava amb CK2- β 1 i CK2- β -3, però no es va detectar interacció amb CK2- β -2. Tampoc l'assaig "pull-down" mostra interacció amb CK2- β -2, però sí una lleu interacció amb la subunitat catalítica CK2 α -2 (Figura 26B)

A

```

322H 1  MSGLDMSLDDLIKQS-KSR----PKDNPASLSSGPGPTRRNNPNRKSTRSAPYQSAKAPD
REFBP 1  MSTGLDMSLDDMIAKNRKSRGGAGPARGTCSSSGPGPTRRNNPNRKSTRSAPYQSAKAPD

322H 56  SPYGVYSKHDRSEDHRSLAKARSLETGTKLHIFNLDSGVTIEDVQELFSEEVGELKRYSMN
REFBP 61  STWGHDMSDRSEDHRSGRSSAGIETGTKLYITSNLDYGVMNEDIKELFAEVGELKRYTVH

322H 116  YDKDGRSKGTVEVVFARKVDALDAIKRYQWCLLDGKPMNLELIGNVEPPPPPVTHSRP
REFBP 121  FDRSGRSKGTAEVVYSRRGDALAAVKKYNDVQLDGKPMKIEIVCTNLQTAAAP---SGRP

322H 176  LQNYNDIHSSMPQSORGGORRAPGRGGGGRRRPGKGPADRNRTTISAADLDALDKYHA
REFBP 178  ANGNSNGGQGRGGQORGGGRGGGGRGGGGRRRPGKGPAEK----ISAEDLDALDKYHS

322H 236  VKEE--
REFBP 234  GDMETN

```

B

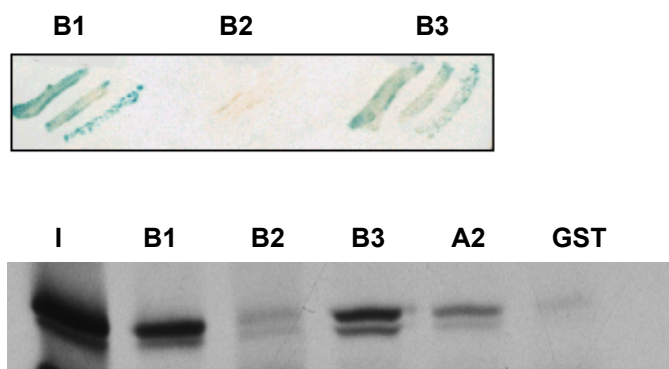


Figura 26: Interacció entre la proteïna 322h/352h i la proteïna quinasa CK2. A.: Alineament entre la proteïna 322h i la proteïna d'unió a factors d'export de RNA (REF-BP) d'*Arabidopsis thaliana* (número d'accés: AB015475.1) B: Assaig β -galactosidasa en filtre d'interacció entre 322h i CK2 β -1, CK2 β -2 i CK2 β -3 realitzat a la soca AH109 i assaig "pull-down" d'interacció entre 322h i les proteïnes CK2 β -1, CK2 β -2, CK2 β -3 i CK2 α -2 fusionades a GST i GST sola (control). L'input (I) representa el 10% de les proteïnes marcades.

Resultats

382h: el cDNA de 382h presenta 1300 pb i codifica per una proteïna de 385 aminoàcids, pes molecular teòric de 44.4 kDa i pI 8.9. A la proteïna 382h es troba un únic lloc consens de fosforilació CK2. Presenta un 82% homologia a la proteïna replicasa d'*Arabidopsis thaliana* (Cerutti et al., 1993). Replicasa o RecA és una proteïna molt conservada entre espècies. És essencial per la recombinació homòloga i està implicada en el procés de reparació de DNA recombinacional. RecA té varies activitats: fa filaments, pot unir-se a DNA de cadena senzilla i doble, pot unir i hidrolitzar ATP, i presenta activitat recombinasa. A la figura 27A es mostra l'alineament entre la proteïna 382h i la proteïna RecA d'*Arabidopsis thaliana*, número d'accés M98039.1. Experiments de mating i retransformació en la soca AH109 (Figura 27B) van confirmar que 322h interaccionava amb CK2-β1, i CK2β-3, però no es va detectar interacció amb CK2β-2. L'assaig "pull-down" mostra una interacció molt feble amb CK2β-2 i amb la subunitat catalítica CK2α-2 (Figura 27B).

A

```

382H      1  -----M PMAV S AVTASH LALSF PARSRR-----RR AAPRAAAGGLTARARLR
REPLICASE 1  DSQVLVLS LKLNPS SFTPLS PLFPFT E C S S F S PSLRFSSCYSRR L YSPVTVYAAKKLSHKIS

382H      44  CEFVAG C GNGALS GEDD PRLV DRQKVL DAAMNDINNSFGKGSVTRLGSAGGAFVETFPSSG
REPLICASE 61  SEFDDR- I NGALS P DADSRFLDROKAL E AAMNDINSSFGKGSVTRLGSAGGALVETFS S G

382H      104  CLTLD FALGGGLPKGRVVEVYGPES S GKTTLALHAIAE I QKLGGNAM L GDAEHAFDP A M S
REPLICASE 120  I L T L D L A L G G G L P K G R V V E I Y G P E S S G K T T L A L H A I A E V Q K L G G N A M L V D A E H A F D P A Y S

382H      164  KALGVD I ENLIVCQPDNGEMALE T ADRMCRSGA T DLIC T DSVSALT PRAEIEGEIGMQOM
REPLICASE 180  KALGVDV ENLIVCQPDNGEMALE T ADRMCRSGA V D L I C V D S V S A L T P R A E I E G E I G M Q O M

382H      224  GLQARLMSQALRKMSGNASKAGCTL MFLN Q I R Y K I G V E Y G N P E V T S G G I A L K F F A S V R L E
REPLICASE 240  G L Q A R L M S Q A L R K M S G N A S K A G C T L I F L N Q I R Y K I G V E Y G N P E V T S G G I A L K F F A S V R L E

382H      284  IRLI G K I K S A K G D E D I G V K V R V R V Q K S K V S R P Y K Q A E F E I I F G E G V S K L G C V L D C A E I M D
REPLICASE 300  I R S A G K I K S S K G D E D I G L R A R V R V Q K S K V S R P Y K Q A E F E I M F G E G V S K L G C V L D C A E I M E

382H      344  VVAKKGSWYSYQRYKMGQGREKALQYL- R R P T I C D E I E R W F E L -----
REPLICASE 360  V V V K K G S W Y S Y E D Q R L G Q G R E K A L Q H L R E N P A I Q D E I E K K V R L L M L D G E V H R S T P L M S S

382H
REPLICASE 420  -----
SSSASHREEEEEEDSLDDFQ

```

B

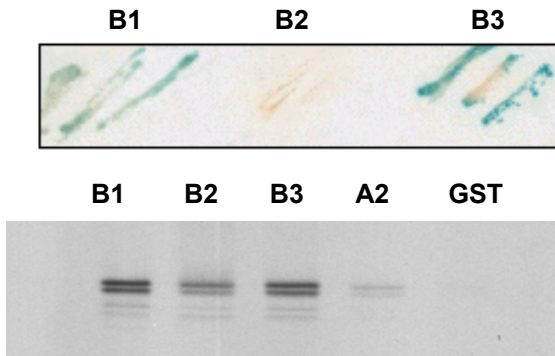


Figura 27(pàgina anterior): Interacció entre la proteïna 382h i la proteïna quinasa CK2. A. Alineament entre la proteïna 382h i la proteïna RecA d' *Arabidopsis thaliana*, número d'accés M98039.1 B: Assaig β -galactosidasa en filtre d'interacció entre 382h i CK2 β -1, CK2 β -2 i CK2 β -3 realitzat a la soca AH109. Assaig "pull-down" d'interacció entre 382h i les proteïnes CK2 β -1, CK2 β -2, CK2 β -3 i CK2 α -2 fusionades a GST i GST sola (control)

402h: el cDNA de 402h presenta 1328 pb i codifica per una proteïna de 237 aminoàcids de pes molecular teòric 25 kDa i pI 6.9. 402h conté un domini J d'unió a DNA, que s'ha descrit en algunes proteïnes de plantes que poden actuar com a co-xaperones. Presenta homologia amb dues regions de la proteïna de blat AHM1, que és una proteïna que es troba unida a la matriu nuclear, per la que s'han postulat diverses funcions relacionades amb l'export/import de proteïnes nuclears (Morisawa et al., 2000). A la figura 28A es mostra l'alineament entre els dominis N-terminal i C-terminal de les proteïnes 402h i AHM1 de blat (nº d'accès AB030708.1. Mitjançant l'assaig "pull-down" (Figura 28B) es detecten fortes interaccions amb les subunitats reguladores i una interacció més feble amb la subunitat catalítica CK2 α -2.

A

```

402H 1  MDFSAGGSGSGGGGGGAGDGRAQAERWLEIAEKLLAASDLVGCKRFAERALEADPLLPGA
AHM1 1  -----MDPAAAAARRQADKWMMSVAEKLLMAKDLEGCKEFSSQATAADPRTPGA

402H 61  DEILAVADVLLASQS-MGESGHQDPLAIIQLPPGVNPD--QASVSRFFRRLALLLGP RN P
AHM1 49  EDLYAAADVLLASQRRRLENGKEDPYAVLGLDEAMPASRLPDVVHSKFRRLSLLLNRSH P

402H 118  ----HHGAEMALRLVNDAMAFLS
AHM1 109  DRPGSVYVAEAARLVADAMAFLS

402H 167  FWTACPFCCYVHQYPRDLFGRALKCPNEGCRRGFWLLRSDPTTVXPGLILYHCAWGFPP
AHM1 332  FWTLCCKGCSHIHQYDRLYEARKLKCSS-CHQPFVAEAMAEPPPITVPGTDMYYCTWGFPP

```

B

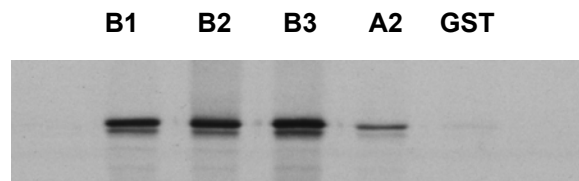


Figura 28: Interacció entre la proteïna 402h i la proteïna quinasa CK2. A: Alineament entre la proteïna 402h i la proteïna AHM1 de blat de moro. B: Assaig β -galactosidasa en filtre d'interacció entre 402h i CK2 β -1, CK2 β -2 i CK2 β -3 realitzat a la soca AH109. Assaig "pull-down" d'interacció entre 402h i les proteïnes CK2 β -1, CK2 β -2, CK2 β -3 i CK2 α -2 fusionades a GST i GST sola (control)

Resultats

832h: el cDNA de 832h presenta 1250 pb i codifica per una proteïna de 144 aminoàcids. En l'anàlisi de la seva seqüència proteica trobem només una sola zona conservada, un domini de 81 aminoàcids propi de factors de transcripció de tipus homeodomain (HD), implicats en funcions de creixement i desenvolupament de les plantes (Schena et al., 1992). A la proteïna 83 es troben dos llocs consens de fosforilació CK2. A la figura 29A es mostra l'alineament entre el domini homeodomain de la proteïna 832h i el mateix domini la proteïna homeodomain d'*Arabidopsis thaliana* (nº d'accés O23208). Experiments de mating i re-transformació en la soca AH109 (Figura 29B) mostren que 832h interacciona amb CK2- β 1 i amb les altres subunitats reguladores CK2 β -2 i CK2 β -3. Mitjançant l'assaig "pull-down" es detecta també interacció amb la subunitat catalítica CK2 α -2 (Figura 29B)

A

```
832H 59 KKRRLTDEQVEMLELSEFREERKLETGRRVHLAAELGLDPKQVAVWFQRRRARHRSKILLEE
HD    56 RKRRLTDEQVNMLEMSFGDEHKLESERKDRLLAAELGLDPRQVAVWVFQNRARRWKNRLEE

832H 119 EFAKLRQAHDAAALHKCFLET
HD    116 EYNKLNKSHDNVVVDKCRLES
```

B

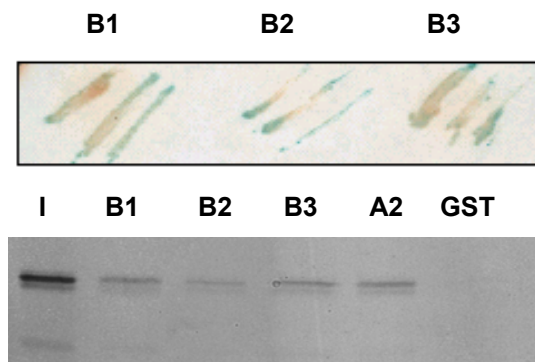


Figura 29: Interacció entre la proteïna 832h i la proteïna quinasa CK2. A: Alineament entre el domini homeodomain de la proteïna 832h i el mateix domini la proteïna homeodomain d'*Arabidopsis thaliana* (nº d'accés O23208) B: Assaig β -galactosidasa en filtre d'interacció entre 832h i CK2 β -1, CK2 β -2 i CK2- β 3 realitzat a la soca AH109. Assaig "pull-down" d'interacció entre 832h i les proteïnes CK2 β -1, CK2 β -2, CK2- β 3 i CK2 α -2 fusionades a GST i GST sola (control) L'input (I) representa el 10% de les proteïnes marcades.