

DISCUSSIÓ GENERAL

El treball realitzat en aquesta tesi es pot dividir en tres grans apartats, a la primera part es caracteritza la proteïna quinasa CK2 de blat de moro, a la segona, s'estudia la interacció, fosforilació i regulació de la proteïna Rab17 per la CK2 i a la tercera s'aïllen i es caracteritzen proteïnes que interaccionen amb la proteïna quinasa CK2.

Caracterització de la proteïna quinasa CK2 de blat de moro

En el primer capítol es presenta la caracterització de la proteïna quinasa CK2 de blat de moro. El primer objectiu era determinar la composició de l'holoenzim CK2 de blat de moro. En el treball 1 s'identifiquen tres subunitats reguladores CK2 β , i es demostra la seva funcionalitat així com l'existència d'una forma heterotetramèrica de CK2 en blat de moro, similar a la descrita per la resta dels organismes. La rellevància de l'aïllament de les subunitats reguladores es basa en que, durant molts anys, s'havia especulat sobre la presència de CK2 β en blat de moro. Les característiques de la subunitat catalítica CK2 α de blat de moro, que presenta major activitat específica i major estabilitat que la CK2 α humana, feien pensar que possiblement l'enzim de blat de moro podia ser monomèric, format únicament per la subunitat CK2 α . Aquesta alta activitat i estabilitat de la subunitat CK2 α de blat de moro sembla que es deguda a que és 60 aminoàcids més curta en el seu extrem carboxi-terminal que la subunitat CK2 α humana (Boldyreff et al., 1993), fet que explicaria també que sigui la única subunitat catalítica cristal·litzada sencera fins al moment (Niefind et al., 1998). Per una altra banda, l'ús d'anticossos animals contra la subunitat CK2 β no detectaven presència d'aquest tipus de subunitat en blat de moro (Dobrowlska et al., 1992). Això podria ser degut a que l'homologia entre les subunitats reguladores de plantes i les de llevat o mamífers no és tant alta com en el cas de les subunitats catalítiques CK2 α ; de fet, van ser necessaris experiments de tipus funcional com complementació en soques mutades de llevat per aïllar les primeres subunitats reguladores descrites en plantes, CK2B1 i CK2B2 d'*Arabidopsis* (Collinge and Walker, 1994).

Els resultats del treball 1 demostren que en blat de moro les subunitats CK2 α i CK2 β formen part de famílies multigèniques. Aquestes dades, juntament amb altres existents en plantes, recopilades en el treball 2, demostren que l'estructura de la CK2 en

plantes presenta característiques pròpies i diferents de les descrites per la CK2 d'animals. En animals s'han descrit dos tipus de subunitats catalítiques CK2 α i CK2 α' . CK2 α' és 41 aminoàcids més curta que CK2 α en el seu extrem carboxi terminal. En plantes, en canvi, s'han descrit tres subunitats catalítiques en blat de moro i quatre com a mínim en *Arabidopsis*, un cop finalitzat la seqüenciació del seu genoma. Totes les subunitats CK2 α de plantes tenen pràcticament la mateixa llargada (per exemple, en blat de moro, CK2 α -2 és només 1 aminoàcid més curta que CK2 α -1 i CK2 α -3) i l'alt grau d'homologia entre elles (més del 90%) es manté al llarg de tota la seqüència. Això suggereix que en plantes, les subunitats catalítiques estan agrupades en una família multigènica de 3 a 4 membres però formada per només un tipus de subunitat.

L'homologia entre les tres subunitats reguladores CK2 β aïllades en aquest treball (al voltant del 80%) no és tan alta com en el cas de les subunitats CK2 α . Tot i la seva major divergència, les subunitats CK2 β presenten una sèrie de dominis conservats en altres espècies com la zona àcida, la "destruction box" o el domini de dit de zinc. També contenen un extrem amino-terminal d'uns 90 aminoàcids, únicament descrit en subunitats reguladores de plantes que no presenta homologia amb cap altre proteïna i del que no es coneix la funció. Pel sistema del doble híbrid es va intentar esbrinar si aquests dominis estaven implicats en la interacció entre subunitats (apartat 1.4). Segons els resultats obtinguts sembla que el domini N-terminal no és essencial ni per la interacció amb les subunitats CK2 α , ni per la dimerització CK2 β -CK2 β , ni per la interacció amb determinats substrats o "partners" de CK2, com és el cas de Rab17 (capítol II). A més, també es demostra que la presència del domini N-terminal no dificulta la formació de l'heterotetràmer. Diferents treballs han demostrat que el domini de dit de zinc és el responsable de la dimerització entre subunitats CK2 β , així com que l'extrem C-terminal ("CK2 β tail") està implicat en les interaccions CK2 α/β i CK2 β/β (Chantalat et al., 1999; Niefind et al., 2001). A l'apartat 1.4, quan s'utilitza una construcció formada únicament per el domini de dit de zinc i l'extrem C-terminal, es detecta que aquest domini no és capaç d'interaccionar ni amb subunitats CK2 α ni CK2 β . Aquest resultat negatiu podria ser degut a que aquest domini és massa petit i potser inestable per poder interaccionar amb les altres subunitats, encara que tampoc es pot descartar que no sigui funcional.

L'estructura heterotetramèrica de l'holoenzim CK2 de blat de moro es va demostrar de diverses maneres. Per una banda, l'anàlisi per cromatografia analítica de l'holoenzim acoblada al sistema SMART SYSTEM (apartat 1.3) va permetre calcular el pes molecular teòric de l'holoenzim, molt similar al de l'holoenzim humà, fet que confirma l'estructura tetramèrica de la CK2 de blat de moro. Per una altra banda, l'holoenzim es va reconstituir barrejant quantitats equimolars de les subunitats CK2 α / β . L'autofosforilació de les subunitats CK2 β i l'estimulació de l'activitat catalítica de CK2 α sobre els substrats Rab17 i β -caseïna van confirmar la funcionalitat de l'heterotetràmer. Una diferència remarcable entre les subunitats reguladores CK2 β de blat de moro i les humanes es troba en que les de blat de moro presenten de 7 a 8 possibles llocs d'autofosforilació mentre que les subunitats humanes només en presenten 2. No es coneix la funcionalitat de l'autofosforilació CK2 però sembla que pot estar involucrada en la modulació de l'activitat enzimàtica (Lin et al., 1994). Per tant, l'estudi de l'autofosforilació en l'holoenzim de blat de moro podria ser de gran importància pel coneixement de la regulació de l'activitat de l'enzim.

La caracterització bioquímica de la CK2 de blat de moro va permetre determinar les diferències entre aquest holoenzim i l'humà (apartat 1.3). Segons els càlculs de les K_m , la CK2 de blat de moro presenta una afinitat molt similar tant per ATP com per GTP mentre que l'holoenzim humà presenta major afinitat pel ATP. En canvi, no es va trobar diferències entre els valors de V_{max} . Aquestes dades es confirmen també amb els experiments de competició entre ATP i GTP no-radioactiu, ja que el GTP competeix millor amb l'ATP en el cas de l'enzim de blat de moro. Els valors de K_{cat} per la subunitat catalítica de blat de moro CK2 α són molt similars per tant per ATP com per GTP, en canvi, els holoenzims de blat de moro i l'humà presenten un valor de K_{cat} dues vegades superior per ATP que per GTP. El paràmetre K_m/K_{cat} defineix l'eficàcia catalítica d'un enzim. Si es comparen els valors obtinguts per la subunitat catalítica i l'holoenzim de blat de moro es comprova que aquest paràmetre és 14 vegades superior en la subunitat CK2 α que en l'holoenzim per ATP, mentre que per GTP l'activació de la subunitat CK2 α només és 8 vegades més gran. No obstant, degut a que es tracta d'experiments *in vitro*, no es coneix encara el significat fisiològic d'aquests resultats, ja que caldria conèixer la concentració *in*

vivo d'ATP i GTP als teixits, i sembla que aquesta concentració varia depenent del teixit, òrganol o tipus cel.lular del que es tracta.

L'efecte de la inhibició per heparina és diferent entre l'holoenzim de blat de moro i l'humà. El càlcul del paràmetre IC_{50} és 10 vegades superior per l'holoenzim humà que pel de blat de moro. També l'activació per polisina té efectes diferents sobre els dos holoenzims ja que per doblar l'activitat enzimàtica de la CK2 de blat de moro es necessita una concentració de polilisina 5 vegades superior a la utilitzada per l'assaig amb CK2 humana. Per tant, es pot concloure que l'holoenzim CK2 de blat de moro és més sensible a l'efecte inhibitor de l'heparina però és més insensible a l'estimulació per polilisina que l'holoenzim CK2 humà. Aquest comportament pot ser degut a diferències estructurals entre els dos holoenzims, es a dir, que l'estructura de l'holoenzim de blat de moro difereixi en certs aspectes a la descrita per l'holoenzim humà (Niefind et al., 2001). Sembla que quan la CK2 s'incuba en presència de moduladors que poden afectar a la seva activitat (com heparina o polilisina) s'indueixen canvis conformacionals en l'estructura de l'enzim (O.G. Issinger, comunicació personal). Per tant, les diferències en activitat CK2 degudes a heparina o polilisina poden indicar diferències estructurals entre els dos holoenzims.

La concentració de sal a la que presenten màxima activitat és 100 mM NaCl en el cas de la CK2 humana mentre que es troba entre 50-100 mM per la CK2 de blat de moro. També es va determinar l'efecte de diferents concentracions d'urea sobre l'estabilitat dels dos enzims. Fins a concentració 0.8 M urea no s'observen diferències entre els dos holoenzims, tots dos conserven l'activitat inicial. A 2M urea la CK2 de blat de moro es més sensible que la humana i a 4M urea l'holoenzim de blat de moro ja ha perdut completament l'activitat mentre que l'humà conserva encara un 14% d'activitat. Per tant, l'estructura de l'holoenzim de blat de moro és molt més sensible a sals i a agents desnaturalitzants com la urea que l'humà.

Els resultats dels anàlisis bioquímics de l'holoenzim de blat de moro indiquen que aquest és més sensible a heparina, més insensible a l'estimulació per polilisina i més sensible a sal i a agents desnaturalitzants com la urea que l'holoenzim humà. Dades prèvies indicaven que la subunitat CK2 α de blat de moro és molt més estable i presenta major activitat catalítica que la subunitat CK2 α humana. En canvi, les dades obtingudes

en aquest estudi demostren que l'holoenzim de blat de moro és més inestable que l'holoenzim humà. Aquesta major inestabilitat es pot atribuir a diferències importants en la seva estructura molecular. Les subunitats reguladores de blat de moro són 20 aminoàcids més curtes en el seu extrem carboxi-terminal que la subunitat CK2 β humana. S'ha demostrat que en la subunitat CK2 β humana els últims 33 aminoàcids estan implicats en la interacció amb les subunitats CK2 α (Leroy et al. 1999). Per tant, la manca de 20 d'aquests 30 aminoàcids podria explicar que, en el cas de l'holoenzim de blat de moro, l'interacció entre les subunitats CK2 α i CK2 β sigui més dèbil que en el cas de l'holoenzim humà. En conclusió, podria ser que l'enzim CK2 es trobi en blat de moro en les dues formes purificades originàriament (Dobrowlska et al., 1992): la forma CK2A, que correspon a l'enzim heterotetramèric i la forma CK2B, que correspon al monòmer, la subunitat CK2 α catalítica. Resultaria interessant conèixer si, *in vivo* en cèl·lules de blat de moro, la inestabilitat de l'holoenzim CK2 repercuteix en que es trobin un major nombre de formes CK2 α lliures respecte a l'holoenzim; al revés del cas de les cèl·lules animals, on la CK2 en forma d'holoenzim és majoritària respecte a les subunitats lliures.

L'existència de diferents isoformes tant de subunitats CK2 α com CK2 β en blat de moro podria venir lligada a una especialització de funcions així com a una expressió gènica diferencial. Per aquest motiu, es va analitzar l'expressió dels diferents gens CK2 α/β al llarg del desenvolupament de l'embrió i en diferents teixits de la planta. Trobem diferències a nivell d'expressió dels gens CK2 β , sembla que CK2 β -1 s'expressa preferentment a estadis finals de desenvolupament, mentre que CK2 β -2 i CK2 β -3 ho fan a estadis mitjans i primerencs respectivament. Es coneix que el substrat Rab17 s'expressa a estadis finals de desenvolupament embrionari i a teixits vegetatius en situacions d'estrès hídric. L'expressió tardana de CK2 β -1 al desenvolupament va fer pensar que Rab17 podria interaccionar i estar fosforilada *in vivo* per l'holoenzim CK2 format amb subunitats CK2 β -1. No obstant, no s'ha pogut confirmar aquesta hipòtesi ja que no s'observa cap alteració de l'expressió de CK2 β -1 en teixits vegetatius en situació d'estrès hídric, i per una altra banda, experiments de fosforilació *in vitro* i d'interacció per doble híbrid realitzats al capítol II van demostrar que tant l'holoenzim recombinant reconstituït amb CK2 β -1 (abundant en estadis embrionaris tardans) com amb CK2 β -3 (estadis primerencs) podien interaccionar i fosforilar Rab17. En quan a l'expressió de les subunitats

catalítiques, totes les isoformes CK2 α s'expressen de manera semblant, preferentment a estadis primerencs i mitjans del desenvolupament. El mateix resultat s'ha descrit per CK2 α animals (Hu and Rubin, 1990; Maridor et al., 1990) i suggereix que CK2 està implicada en processos de proliferació i desenvolupament de la planta.

Els experiments de doble híbrid confirmats per assaigs "pull-down" mostren que existeixen interaccions preferencials entre les subunitats CK2 α /CK2 β , CK2 β /CK2 β mentre que no es detecten interaccions entre subunitats CK2 α . Aquestes dades indiquen que l'estructura de l'holoenzim de blat de moro coincideix amb les descrites per l'holoenzim humà, a on les subunitats CK2 α interaccionen fortament amb subunitats CK2 β però no poden dimeritzar entre elles, però que sí que existeixen dímers CK2 β /CK2 β (Gietz et al., 1995; Niefind et al., 2001). Les interaccions detectades entre els dímers CK2 β /CK2 β són més fluïxes que entre subunitats CK2 α /CK2 β . Les subunitats catalítiques CK2 α presenten un 96% d'homologia entre elles, per tant, les diferències d'interacció detectades entre CK2 α / β són sorprenents, especialment en el cas de la interacció lleu detectada entre CK2 α -1/CK2 β -2. Per comprendre millor aquests resultats serien necessaris experiments de mutagènesi dirigida dels aminoàcids involucrats en les interaccions específiques entre subunitats. També existeixen interaccions preferencials a l'hora de formar els dímers CK2 β /CK2 β . Sembla que CK2 β -2 és incapaç d'interaccionar amb un altre subunitat CK2 β -2. Aquesta subunitat és l'única que presenta un canvi d'un residu conservat en la zona de dit de zinc, la responsable de la dimerització CK2 β -CK2 β (Chantalat et al., 1999). Per tant, podria ser que aquest canvi de Val²¹² per Ala²¹² sigui la causa de que no es puguin formar homodímers CK2 β -2/CK2 β -2.

Els estudis de funcionalitat utilitzant diferents soques de llevat mutant indiquen que les subunitats reguladores de blat de moro poden complementar la funció realitzada per les subunitats CK2 β de llevat, tot i que entre llevat i blat de moro les subunitats CK2 β presentin una homologia a nivell d'aminoàcid de només el 40%. En llevat, la delecció dels dos gens que codifiquen per les subunitats catalítiques CK2 α / α' és letal per l'organisme (Padmanabha et al., 1990). A la soca YDH8, les subunitats catalítiques estan mutades i la viabilitat depèn de l'al·lel *cka2-8* regulat per temperatura, que permet al llevat créixer a 30°C però no a 37°C. Aquest fenotip pot ser revertit no només per subunitats catalítiques

d'altres espècies (Bidwai et al., 1992), sinó també per subunitats reguladores com les d'*Arabidopsis* i de llevat (Collinge and Walker, 1996; Sugano et al., 1998). La sobreexpressió de les tres subunitats reguladores CK2 β de blat moro en YDH8 també pot restaurar la funció de l'al·lel *cka2-8* a 37°C, indicant que les CK2 β aïllades no només són estructurals sinó també funcionals. El mecanisme exacte pel qual aquesta complementació entre diferents subunitats es dona no es coneix amb certesa, podria ser degut a l'estabilització de les subunitats CK2 α , o modificació de l'especificitat per determinats substrats, propietats conegudes de les subunitats CK2 β . La delecció d'una o dues de les subunitats CK2 β en llevat comporta un fenotip de hipersensibilitat a sal (Bidwai et al., 1995; de Nadal et al., 1999). A la soca mutant MAR1 (*ckb1* Δ) la sobreexpressió de les tres subunitats reguladores CK2 β de blat moro reverteix el fenotip de hipersensibilitat a sal. En llevat *wild-type*, la sobreexpressió de les CK2 β augmenta la tolerància a sal. No obstant, es desconeix el mecanisme a través del qual la CK2 actua regulant la concentració salina cel·lular. Recentment però, s'ha trobat que les subunitats catalítiques també estan involucrades en aquest procés, ja que la sobreexpressió de subunitats CK2 α de plantes en llevat també augmenta la tolerància a sal (Kanohou et al., 2000).

Estudi de la regulació de la proteïna Rab17 per la proteïna quinasa CK2

La proteïna Rab17 de blat de moro és una proteïna del tipus LEA (Late Embryogenesis Abundant) involucrada en la resposta de les plantes a estrès hídric (Vilardell et al., 1990). És una de les proteïnes més fosforilades de l'embrió madur, i es troba tant a nucli com a citoplasma de totes les cèl.lules d'embrió (Goday et al., 1994). Conté un "cluster" de vuit serines que és fosforilat *in vitro* per la proteïna quinasa CK2 (Plana et al., 1990).

Al segon capítol d'aquesta tesi s'estudia la interacció, fosforilació i regulació de la proteïna Rab17 per la CK2. Pel sistema del doble híbrid es detecta interacció entre dues de les subunitats reguladores, CK2 β -1 i CK2 β -3 i la proteïna Rab17. En canvi, no es detecta interacció de la Rab17 amb CK2 β -2 ni amb cap de les subunitats catalítiques. Els estudis de fosforilació *in vitro* utilitzant l'holoenzim CK2 reconstituït amb les tres subunitats reguladores concorden amb els resultats obtinguts per doble híbrid, ja que indiquen que de nou només CK2 β -1 i CK2 β -3 estimulen l'activitat de CK2 α sobre Rab17. Com s'ha demostrat prèviament, CK2 β -2 interacciona més dèbilment amb les subunitats catalítiques que les altres subunitats CK2 β -1, CK2 β -3 i és incapaç de formar homodímers CK2 β -2/CK2 β -2. Aquest fet podria afectar a l'activitat quan forma part de l'holoenzim o a la interacció amb altres proteïnes, no obstant, al capítol III es demostra que CK2 β -2 es capaç d'interaccionar amb altres proteïnes, possibles "partners" de CK2, aïllades pel sistema de doble híbrid. L'assaig de "pull-down" sí que detecta una lleu interacció entre Rab17 i CK2 β -2 i CK2 α -2, per tant, no es pot descartar que Rab17 interaccioni tant amb CK2 β -2 com amb l'holoenzim, però tant dèbilment que sigui indetectable pel sistema del doble híbrid.

També la versió del1 que prové de CK2 β -1, a la que li manca l'extrem amino-terminal, interacciona amb Rab17. Per tant, sembla que aquest domini no és essencial per la interacció entre CK2 i altres proteïnes, al menys en el cas de Rab17. Degut a que s'havia comprovat que aquest domini tampoc sembla essencial per la reconstitució de l'holoenzim, calen altres tipus d'experiments per determinar la funcionalitat del domini N-terminal en plantes.

Es van obtenir els mateixos resultats d'interacció per doble híbrid quan es va utilitzar la proteïna mRab17, mutada en la seqüència consens de fosforilació CK2, aquest resultat indica que la interacció CK2β/Rab17 és independent de l'integritat del consens de fosforilació CK2. Es va demostrar prèviament que la proteïna mRab17 no es fosforila quan es sobreexpressa en llevat mentre que quan es sobreexpressa la proteïna Rab17 aquesta sí que es pot fosforilar (Mercè Figueras, tesi doctoral). Per tant, segons els resultats obtinguts en el sistema de doble híbrid, CK2β-1 i CK2β-3 poden interaccionar amb formes fosforilades (Rab17) i no-fosforilades (mRab17) , indicant que la interacció CK2β/Rab17 és independent de l'estat de fosforilació de Rab17.

En anàlisis bidimensionals previs de la proteïna Rab17 fosforilada s'observa un patró de varis "spots" de pes molecular molt semblant amb diferent punt isoelèctric, corresponents a proteïnes amb diferent nombre de fosfats incorporats (Jensen et al., 1998). En els assaigs de fosforilació *in vitro*, l'absència de fosforilació a la forma mutada mRab17 indica que probablement la fosforilació al "cluster" de serines (aminoàcids 77 al 88) es realitza de forma seqüencial tal i com s'esquematitza a la figura 1: la fosforilació s'inicia a la serina 85 inclosa dins del consens de fosforilació CK2, que s'acidifica i permet la fosforilació del següent residu i així progressivament fins la fosforilació de la serina 77.

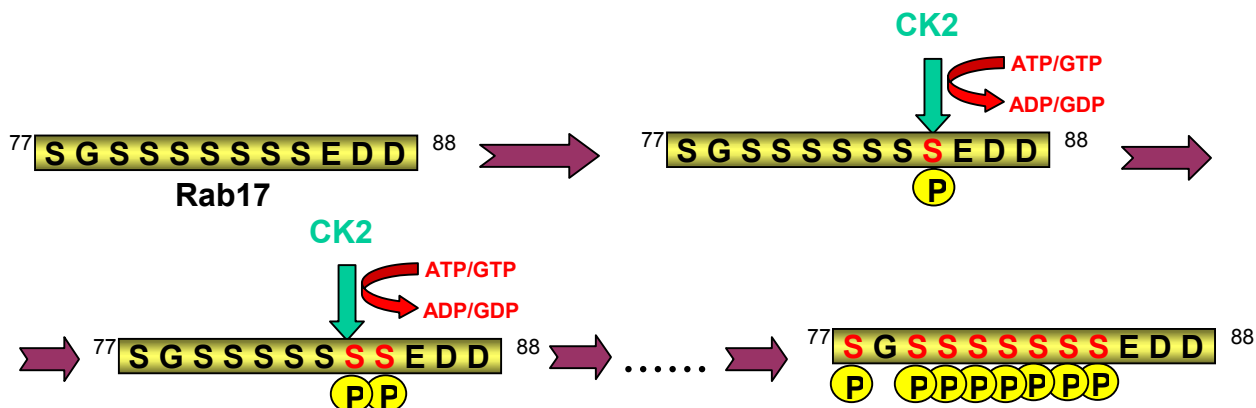


Figura 1: Mecanisme de fosforilació seqüencial del "cluster" de serines de la proteïna Rab17 per la proteïna quinasa CK2: La fosforilació s'inicia a la serina 85 inclosa dins del consens de fosforilació CK2, que s'acidifica i permet la fosforilació del següent residu i així progressivament fins la fosforilació de la serina 77.

S'ha descrit que quan la CK2 interacciona amb proteïnes mutades en la seva seqüència consens de fosforilació CK2 (com en el cas de mRab17) aquesta interacció és més forta que amb les proteïnes *wild-type* i pot afectar a l'activitat CK2, com succeeix l'interacció entre CK2 i la proteïna FAF1 mutada a la seqüència consens de fosforilació CK2 (Guerra et al., 2001). Això seria degut a que la proteïna mutada es queda "anclada" a l'enzim ja que interacciona amb l'enzim però no pot ser fosforilada i altera la catàlisi enzimàtica. En assaigs de fosforilació *in vitro* en que s'ha utilitzat la proteïna mutada mRab17, s'observa una disminució de l'autofosforilació de l'enzim, comparada amb l'autofosforilació detectada en els assaigs amb Rab17, per tant, podria ser que la interacció de les subunitats CK2 β amb mRab17 estigués afectant l'activitat CK2.

La proteïna Rab17 no està present en embrions joves mentre que és molt abundant i altament fosforilada en embrions madurs. La Rab17 endògena es va immunoprecipitar d'extractes d'embrió madur fosforilats utilitzant ATP o GTP. Als extractes joves que no contenen Rab17 endògena s'hi va afegir Rab17 recombinant i es va immunoprecipitar fosforilada. Aquests experiments indiquen que Rab17 es fosforila per una proteïna quinasa present tant en extractes joves com en madurs, capaç d'utilitzar ATP o GTP com a donadors de fosfat. Totes les dades indiquen que es tracta de la proteïna quinasa CK2.

Dades prèvies indicaven que la fosforilació per CK2 podia estar regulant la relocalització cel·lular de la proteïna Rab17 (Jensen et al., 1998). Amb aquest objectiu es va estudiar la localització en cèl·lules de ceba de les proteïnes Rab17, mRab17 (mutada en el consens de fosforilació CK2), m2-Rab17 (mutada en el consens de localització nuclear NLS), doble mutada m3-Rab17 (mutada en el consens CK2 i en el consens NLS), i de les subunitats CK2 α i CK2 β fusionades a la proteïna GFP. Es va observar que mentre que Rab17, m2-Rab17 i CK2 β es trobaven distribuïdes per citoplasma i nucli però excloses del nucleol, mRab17 i CK2 α s'acumulaven a nucli i majoritàriament a nucleol. La doble mutada m3-Rab17 es troba tant a citoplasma com nucli i nucleol.

Els resultats obtinguts indiquen que les formes de Rab17 que no es poden fosforilar per CK2 (mRab17 i m3-Rab17) s'acumulen a nucleol mentre que no trobem

formes fosforilades (Rab17 i m2-Rab17) nucleolars. Aquesta localització a nucleol de mRab17 no s'havia observat quan es van realitzar els estudis de localització cel.lular en ceba i en plantes transgèniques d'*Arabidopsis* ja que en aquest cas els estudis estaven realitzats amb les proteïnes Rab17, mRab17, m2-Rab17 i m3-Rab17 fusionades a la proteïna GUS (β -glucosidasa) (Jensen et al., 1998). Una possible explicació de l'absència a nucleol de la proteïna de fusió mRab17-GUS seria que degut a la grandària de la proteïna GUS (68 KDa) no presentés la conformació adequada per ser translocada a nucleol. Aquest fet s'ha descrit en altres proteïnes nucleolars com la MA16, que es localitza a nucleol fusionada a GFP però no ho fa quan està fusionada a GUS-GFP (Elisenda Gendra, tesi doctoral); o la proteïna FAF1, que presenta localització nucleolar quan s'utilitza immunofluorescència però queda exclosa del nucleol quan es transfecta cèl.lules amb la proteïna fusionada a l'epítot FLAG (Guerra et al., 2001). La construcció m2-Rab17, mutada en la seqüència NLS, presenta una localització citoplasmàtica i nuclear molt similar a la Rab17 *wild type*, indicant que la seqüència RRKK és una NLS dèbil, ja que la mutació d'aquesta seqüència no és suficient per retenir la proteïna Rab17 a citoplasma, suggerint que existeixen altres regions implicades en la translocació a nucli de Rab17. No obstant, els resultats amb la doble mutada m3-Rab17 mostren un menor marcatge a nucleol respecte mRab17, això podria indicar que la seqüència RRKK podria ser important per la translocació de la proteïna de nucli a nucleol. Donant suport a aquesta hipòtesi trobem que s'han descrit seqüències de caràcter bàsic riques en arginines i lisines que poden ser seqüències de localització nucleolar (NOS) com les trobades a la proteïna mdm2 i coilina (Lohrum et al., 2000; Hebert et al., 2000)

Per una altre banda, els estudis realitzats amb les diferents subunitats catalítiques mostren una clara localització nucleolar en forma de patró puntejat fluorescent de les subunitats CK2 α . Les subunitats reguladores, en canvi, mostren una distribució molt més general , presents en citoplasma i nucli però no acumulades al nucleol.

En el nucleol de les cèl.lules eucariotes tenen lloc molts dels processos involucrats en la biogènesi de ribosomes com la transcripció del rDNA, el processament del rRNA i l'assemblatge pre-ribosomal (Brown and Shaw, 1998). La presència i l'activitat CK2 s'ha detectat a nucleol, proposant-se que podria estar implicada, entre d'altres processos, en la

regulació del metabolisme del rDNA i del cicle cel.lular (Pfaff and Anderer 1988). També una localització nucleolar d'"speckels" fluorescents molt brillants com en el cas de CK2 α -2 de blat de moro, s'ha descrit per subunitats CK2 α en cèl.lules animals sotmeses a tractament d'estrès per "heat-shock" (Gerber et al., 2000). Anàlisis proteòmic recents han identificat un gran nombre de proteïnes nucleolars, indicant que, a més de en els processos esmentats, el nucleol també pot estar implicat en moltes altres funcions, per exemple, es postula que podria ser un lloc d'emmagatzament de proteïnes que estarien retingudes en aquest orgànel amb l'objectiu d'inhibir la seva funció (Visitin and Amon, 2000).

En el cas de la Rab17 no és conegut quin és el compartiment cel.lular a on aquesta proteïna es fosforila, el que si coneixem és que hi ha més alt nombre de formes fosforilades a citoplasma que a nucli (Goday et al., 1994). Existeixen diverses possibilitats que explicarien el mecanisme de regulació de la Rab17 per fosforilació CK2. S'ha demostrat que Rab17 interacciona amb les subunitats CK2 β i ambdues proteïnes estan localitzades tant a nucli com a citoplasma. Podria ser que Rab17 actués com una xaperona i transportés les subunitats CK2 β des de citoplasma a nucli. D'aquesta manera, una vegada al nucli, la interacció Rab17/CK2 β es pot desfer ja que les subunitats CK2 α de nucli poden competir amb Rab17 per interaccionar amb CK2 β i reconstituir l'holoenzim. La CK2 nuclear pot fosforilar Rab17 que un cop fosforilada pot sortir del nucli o bé sola o bé formant oligomers o interaccionant amb altres proteïnes. S'ha demostrat que les formes no fosforilades de Rab17 són més inestables que les fosforilades, per tant, aquestes formes no fosforilades poden dirigir-se al nucleol, on hi ha una gran acumulació de subunitats CK2 α . No obstant, el pas pel nucleol de la Rab17 seria un procés molt dinàmic ja que es fosforilaria i molt ràpidament s'alliberaria al nucli i al citoplasma, on podria realitzar la seva funció. Aquesta hipòtesi explicaria els resultats obtinguts, ja que la forma no fosforilada de Rab17 (mRab17) queda retinguda a nucleol, probablement per inhibir la seva funció, indicant que la fosforilació per CK2 pot regular la funció i la translocació de nucleol a nucli i citoplasma de Rab17.

Probablement, la fosforilació per CK2 és un pas necessari per desfer l'interacció entre CK2 β i Rab17 i en determinades situacions com en condicions d'estrès, alliberar

Rab17 al nucleoplasma i/o citoplasma, a on desenvoluparia la seva funció. Per tant, la interacció demostrada entre CK2 i mRab17 pot ser important a nivell fisiològic pel transport i/o regulació de la funció de Rab17. Existeixen evidències que indiquen que les regions riques en serines seguides de zones bàsiques estan implicades en l'activació transcripcional probablement per interacció amb factors de transcripció basal (Isaac et al., 1998) per tant, les proteïnes que contenen aquests dominis com Nopp140 o Rab17 han d'estar sotmeses a una estricta regulació.

S'ha descrit que la Rab17 en la seva forma fosforilada presenta la capacitat d'unir pèptids NLS *in vitro* (Goday et al., 1994). Per tant una altra possible entrada de Rab17 de citoplasma a nucli seria a través d'interacció amb proteïnes que contenen seqüències NLS. També es coneixen varies proteïnes nucleolars amb capacitat d'unir seqüències NLS i que es mouen repetidament de citoplasma a nucli i viceversa, com la nucleolina, B23, Nopp140 o NAP57 que interaccionen i són fosforilades per la proteïna quinasa CK2 (Li et al. 1996; Li et al. 1997; Meier and Blobel, 1994). Per tant, es podria considerar que una de les funcions de Rab17 un cop fosforilada per la CK2 actués com a xaperona acompanyant altres molècules (portadores de seqüències NLS) o formant oligòmers a través de nucleoplasma i/o citoplasma. Hi ha clars indicis que la proteïna Rab17 pot oligomeritzar, l'anàlisi per western blot mostra formes que podrien correspondre a dimers o trimers i que són resistents a condicions desnaturalitzants com SDS o urea, no obstant, anàlisi de doble híbrid realitzats amb Rab17 no detecten dimerització entre proteïnes Rab17. Resultats molt similars s'han obtingut per la proteïna Nopp140 (Isaac et al., 1998). Per altra banda, es coneix moltes proteïnes bàsiques entren al nucli per difusió i retenció més que per transport actiu, per tant, degut al seu caràcter bàsic (pI 9.4) i al seu baix pes molecular no es pot descartar que Rab17 entri al nucli i nucleol directament. Una representació esquemàtica com la fosforilació per CK2 estaria regulant la localització subcel·lular de Rab17 es mostra a la figura 2.

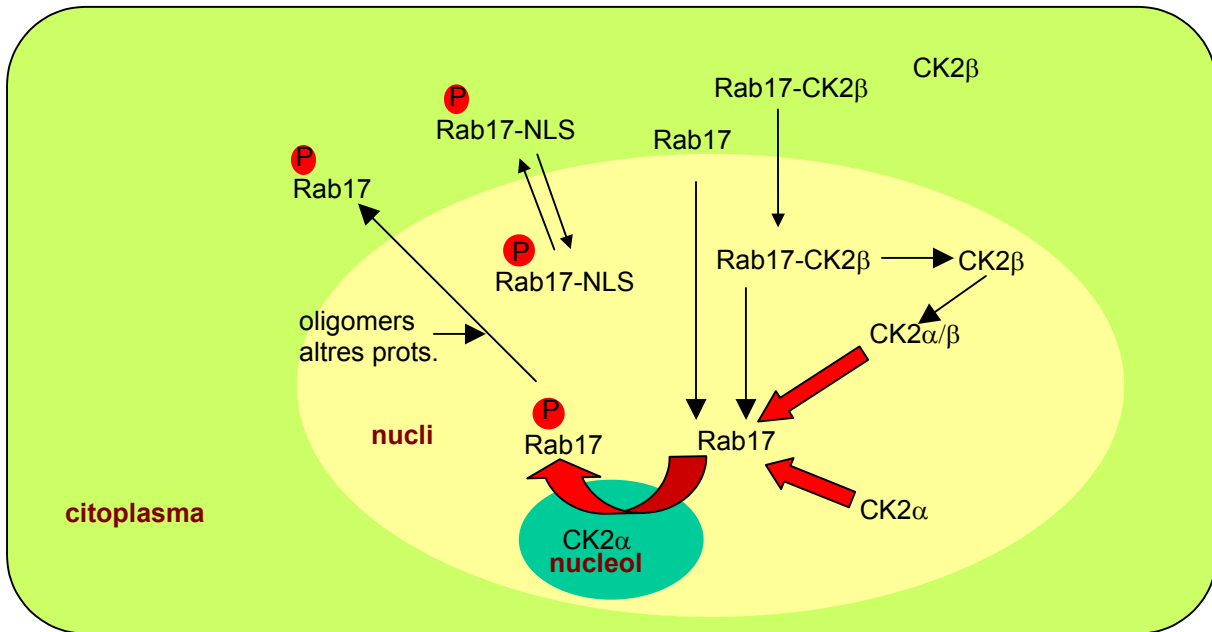


Figura 2: Hipòtesi sobre la localització subcel·lular de Rab17 regulada per la fosforilació per la proteïna quinasa CK2. La proteïna Rab17 no fosforilada es transloca de citoplasma a nucli o bé sola o bé interaccionant amb subunitats CK2β. Al nucli, Rab17 es fosforila per l'holoenzim CK2 i/o CK2α, i s'allibera a citoplasma. Aquest transport de nucli a citoplasma pot ser en forma d'oligòmers o bé interaccionant amb altres proteïnes, en una possible funció xaperona de Rab17. La Rab17 que no es fosforila a nucli es dirigeix a nucleol a on ràpidament es fosforila per la subunitat CK2α i és alliberada a nucli i citoplasma. A més, la Rab17 fosforilada també pot translocar-se de citoplasma a nucli i a la inversa interaccionant amb proteïnes que contenen seqüències NLS.

Estudis previs de sobreexpressió de Rab17 en *Arabidopsis* mostren que en condicions d'estrès osmòtic (100 mM NaCl) la sobreexpressió de Rab17 és capaç de retardar i pràcticament aturar l'inici de la germinació mentre que les plantes que sobreexpressen les formes de Rab17 mutades en el consens de fosforilació CK2 es comporten com les control i germinen de manera normal (veure Introducció). Aquest resultat indicava que una possible funció de Rab17 en el procés d'inici de la germinació podria estar regulada per fosforilació per la proteïna quinasa CK2. La proteïna Rab17 s'expressa a estadis tardans de l'embriogènesi, durant el procés de dessecació de l'embrió, per tant podria ser que Rab17 estès implicada en l'inhibició del creixement en teixits embrionaris, en germinació i en inducció/o manteniment de la dormància de l'embrió durant la dessecació. Probablement, tant la fosforilació com la dessecació de l'embrió (incloent estrès osmòtic) són necessàries per la funció de la proteïna Rab17. Els

mutants vivípars de blat de moro VP1 tenen nivells normals d' ABA però són insensibles al tractament amb ABA exògena, no realitzen el procés de dessecació i germinen prematurament (McCarthy et al., 1991). En aquests mutants es detecten nivells molt baixos de proteïna Rab17 durant la embriogènesis (Pla et al., 1989) donant suport a la hipòtesi de la funció proposada per Rab17 en el control de l'inici de la germinació. Per tant, l'integració de les dades prèvies amb les obtingudes en aquesta tesi indiquen una funció important de Rab17 en la regulació de l'inici de la germinació, en una situació d'estrès, que pot estar regulada per fosforilació per CK2.

S'ha descrit varies proteïnes involucrades amb processos de creixement cel·lular que són fosforilades i/o interaccionen amb la proteïna quinasa CK2, com p53 (Filhol et al., 1992), c-Raf (Janosch et al., 1996), c-Mos (Chen et al., 1997) o Nopp140 (Li et al., 1997). Concretament, la proteïna nucleolar Nopp140 presenta moltes característiques comuns a la proteïna Rab17, que s'enumeren a continuació:

- Totes dues presenten dominis amb estructura molt similar, "clusters" de serines seguits per consens de fosforilació CK2 i zones bàsiques.
- Interaccionen amb la proteïna quinasa CK2 preferentment a través de la subunitat CK2 β , però també es detecta una lleu interacció amb subunitats CK2 α .
- Es fosforilen amb més eficiència per l'holoenzim CK2 que per la subunitat CK2 α .
- Presenten la propietat d'unir pèptids NLS *in vitro*.
- S'han descrit formes oligomèriques però no es detecta formació de dimers pel sistema de doble híbrid.
- Nopp140 és una proteïna nucleolar que es mou entre citoplasma i nucli. S'ha postulat que una de les funcions d'aquesta proteïna seria actuar com a xaperona transportant molècules de nucli a citoplasma. Rab17 es localitza a nucli i citoplasma i formes no fosforilades s'han detectat a nucleol.
- Nopp140 s'ha descrit com una proteïna inhibidora del creixement ja que quan es sobreexpressa en llevat es produeix una aturada del creixement.

(Meier, 1996). La sobreexpressió de Rab17 en *Arabidopsis* en condicions d'estrès osmòtic és capaç de retardar i pràcticament aturar l'inici de la germinació.

Per tant, en base a totes aquestes similituds, podria ser que Rab17 i Nopp140 estiguessin implicades en funcions similars.

Aïllament de proteïnes que interaccionen amb la proteïna quinasa CK2 de blat de moro.

Una de les característiques més rellevants de la proteïna quinasa CK2 és la seva capacitat d'interaccionar i/o fosforilar un gran nombre de proteïnes descrites (més de 160) implicades en gairebé tots els processos cel·lulars, però, tot i així, encara no s'ha determinat quina és la funció fisiològica exacte d'aquest enzim. Una bona aproximació per estudiar la funció i regulació de la CK2 es basa en examinar l'associació de l'enzim amb altres proteïnes cel·lulars. 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. Com es mostra al capítol III, es va realitzar un anàlisi/crivellatge d'una llibreria doble híbrid de fulla estressada de blat de moro utilitzant la subunitat reguladora CK2 β -1 com a "bait". Un cop aïllades les possibles proteïnes "partners" de CK2 β -1 es va comprovar si també interaccionaven amb les altres subunitats reguladores (CK2 β -2, CK2 β -3) o amb les subunitats catalítiques. Com a resultat d'aquest crivellatge es van aïllar i analitzar diverses proteïnes entre les que trobem tres factors de transcripció (de tipus TCP, homeodomain i GATA/dit de zinc), una proteïna d'unió a RNA, la proteïna RecA de reparació del DNA i una proteïna amb un domini J d'unió a DNA. És interessant el fet de que en tots els casos es tracti de proteïnes de localització nuclear implicades en diversos processos de regulació gènica.

La proteïna 322h 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 domini 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 tracta d'una proteïna d'unió a RNA. Presenta una proteïna d'unió a factors d'export de RNA (RNA export factor binding protein) d'*Arabidopsis thaliana*. Aquest proteïnes són del tipus hnRNP-like, estan descrites en llevat, *Xenopus*, *C.elegans* i ratolí i s'uneixen a proteïnes que estan implicades en l'export de RNAs del nucli a citoplasma (Stutz et al., 2000). Com passa en el cas la interacció entre CK2 i Rab17, sembla que 322h interacciona específicament amb les subunitats CK2 β -1 i CK2 β -3 però no amb la subunitat CK2 β -2. Es detecta una lleugera interacció amb CK2 α -2. S'ha descrit que la proteïna

quinasa CK2 interacciona i/o fosforila diverses proteïnes involucrades en la regulació del metabolisme del RNA, com RNA polimerasa I i II, el factor d'inici de la traducció eIF-2 o proteïnes ribosomals com L5.

També s'ha demostrat la intervenció de la proteïna quinasa CK2 en processos de reparació de DNA danyat (Teitz et al., 1990) i la seva interacció amb diferents membres d'aquesta maquinaria com la DNA topoisomerasa II (Bojanoswki et al., 1993) o la DNA ligasa (Prigent et al., 1992). La proteïna 382h presenta homologia amb la proteïna replicasa o RecA. 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. En aquest cas sembla que la interacció es dona únicament a través de les subunitats reguladores CK2 β -1 i CK2 β -3 i no es detecta interacció entre 382h i subunitats catalítiques.

Diverses proteïnes amb funció xaperona com HSP90 (Miyata and Yahara, 1992) o grp94/endoplasmínia (Riera et al., 1999) interaccionen amb CK2. La proteïna 402h presenta homologia amb la proteïna de blat AHM1, que és una proteïna que es troba unida a la matriu nuclear. (Morisawa et al., 2000). 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. 402h interacciona amb les tres subunitats reguladores CK2 β -1 i CK2 β -3 i no es detecta interacció entre 382h i subunitats catalítiques.

S'ha descrit varis factors de transcripció involucrats en processos de creixement/desenvolupament cel·lular que són fosforilats i/o interaccionen amb la proteïna quinasa CK2, com c-Mos (Chen et al., 1997), c-Jun, p53 (Filhol et al., 1992), entre d'altres. Dues de les proteïnes aïllades (162h i 832h) podrien correspondre a factors de transcripció implicats en aquests tipus de processos. La proteïna 162h conté un domini d'uns 200 aminoàcids que presenta una estructura del tipus basic-Helix-Loop-Helix (b-HLH) i sembla estar implicat en unió a DNA i dimerització. Aquest domini és propi de factors de transcripció de la família TCP, únicament han estat descrits en plantes, com *cycloidea* (cyc) o *teosinte branched1* (tb1). S'expressen preferentment en teixits

proliferatius i es creu que estan implicats en funcions de creixement, divisió cel·lular i desenvolupament de les plantes (Cubas et al., 1999). El fet que 162h interaccioni amb CK2 tant amb les subunitats catalítiques com reguladores i que presenti cinc llocs de fosforilació CK2 fa pensar que podria ser un possible substrat de CK2 i/o que la seva activació transcripcional podria estar regulada per fosforilació. La proteïna 832h presenta només una sola zona conservada, un domini de 81 aminoàcids del tipus homeobox-homeodomain, propi de factors de transcripció de tipus homeodomain (HD), implicats en funcions de creixement i desenvolupament de les plantes (Schena et al., 1992).

La interacció que es va analitzar més detalladament va ser la trobada entre la proteïna 912h i la proteïna quinasa CK2. Els resultats obtinguts indiquen que 912h interacciona fortament amb les tres subunitats reguladores CK2 β i amb la subunitat catalítica CK2 α -2, suggerint una possible interacció amb l'holoenzim CK2. A més, es va demostrar que la proteïna 912h és substrat de CK2 ja que es fosforila tant per la subunitat CK2 α sola i com quan s'utilitza l'holoenzim CK2. Els estudis de l'expressió de 912h indiquen que aquest gen no s'indueix significativament en resposta a diferents tipus d'estrès. En canvi, després de sotmetre les plantes a condicions de "Short day" (16 hores fosc/ 8 hores llum) sí que s'observa una major expressió de 912h en les hores de llum respecte a fosc. Per últim, la localització subcel·lular de la proteïna 912h fusionada a GFP indica que presenta una distribució casi exclusivament nuclear i absent de nucleols.

La proteïna 912h presenta un domini d'unió al DNA del tipus GATA/dit de zinc. Aquest domini està format per quatre cisteïnes coordinant un ió de zinc que s'uneix específicament a la seqüència de DNA (A/T)GATA(A/G). Els motius GATA són del tipus LRE (Light Responsive Elements) i es troben en molts promotors de gens regulats per llum. S'ha demostrat que aquests motius són necessaris per l'activitat transcripcional regulada per llum (Millar and Kay, 1996). La majoria dels factors del tipus GATA/dit de zinc presenten dos dominis de dit de zinc com és el cas de la família CONSTANS. Les proteïnes CONSTANS presenten una funció relacionada amb la inducció de la floració durant fotoperíodes llargs (Puterill et al., 1995). No obstant, també s'han descrit factors amb motiu GATA i amb un únic dit de zinc. Un exemple és el cas del factor de transcripció ZIM (**Z**inc-finger protein expressed in **I**nflorescence **M**eristem), d' *Arabidopsis thaliana*,

amb el que 912h presenta un 65% d'homologia. ZIM conté un únic dit de zinc i s'expressa durant la fase reproductiva de la planta. Es creu que està implicat en processos de inflorescència i desenvolupament de la floració (Nishii et al., 2000).

Una funció fisiològica clara de la CK2 en la regulació de la transducció de senyal de la llum i del creixement de la planta s'ha demostrat en plantes transgèniques d'*Arabidopsis thaliana* que expressen el gen antisentit de la subunitat catalítica CK2 α (Lee et al., 1999). La proteïna quinasa CK2 interacciona i fosforila diversos tipus de factors de transcripció que s'uneixen a promotors de resposta a llum. La fosforilació d'aquests factors pot afectar a la seva unió al DNA de diferents maneres: o bé estimulants-la, com en el cas de GBF-1 o HY5 (Klimczac et al., 1995; Hardtke et al., 2000) o bé inhibint-la com per factors transactivadors com AT-1 o ATBP-1 (Datta et al., 1989; Tjaden et al., 1994). A més, la sobreexpressió de una de les subunitats reguladores (CK2B3) en *Arabidopsis* ha demostrat que CK2 està involucrada en la regulació del ritme circadià en *Arabidopsis* (Sugano et al., 1999). De nou, aquesta regulació comporta interacció amb/ i fosforilació de factors de transcripció essencials en la regulació del ritme circadià com CCA-1 o LHY (Sugano et al., 1998; Sugano et al., 1999)

En resum, la caracterització de les proteïnes aïllades en aquest treball pot ser un punt d'inici interessant per avançar en el coneixement de la funció de la proteïna quinasa CK2 en plantes.