



Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Facultat de Ciències

Estudis estructurals, bioquímics i
funcionals de la proteïna quinasa CK2
de sistemes vegetals.

M. Carme Espunya Prat

Universitat Autònoma de Barcelona, abril de 2001.

Estudis estructurals, bioquímics i funcionals de la proteïna quinasa CK2 de sistemes vegetals.

Memòria de tesi doctoral presentada per Na M. Carme Espunya Prat per optar al grau de Doctora en Bioquímica i Biologia Molecular.

Aquest treball de recerca s'ha realitzat a la Unitat de Ciències del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, sota la direcció de la Dra. M. Carmen Martínez Gómez.

M. Carme Espunya Prat

M. Carmen Martínez Gómez

Universitat Autònoma de Barcelona, abril de 2001.

ATP	Adenosina-5'-trifosfat
ADC	Arginina descarboxilasa
AMPPNP	Adenilil imidofosfat
BCIP	Fosfat de 5-brom-4-clor-3-indolil
BSA	Albúmina de sèrum boví
CDK	Proteïna quinasa depenent de ciclina
cDNA	DNA còpia de RNA missatger
Ci	Curies
CK1 o CKI	Caseïna quinasa 1 o proteïna quinasa CK1
CK2 o CKII	Caseïna quinasa 2 o proteïna quinasa CK2
cpm	Comptes per minut
DEAE-cel.lulosa	Dietilaminoetil-cel.lulosa
DFMA	Difluorometilarginina
DFMO	Difluorometilornitina
DIG	Digoxigenina
DMSO	Dimetilsulfòxid
DNA	Àcid desoxiribonucleic
DNTPs	Desoxiribonucleòtids
DRB	5,6-dicloro-ribofuranosilbenzimidazol
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Àcid etilendiaminotetraacètic
eIF	Factor d'iniciació eucariòtic
GBF	Factor d'unió a la caixa G
GEF-CK	Caseïna quinasa de l'aparell de Golgi de la glàndula mamària
GSK-3	Glicogen sintasa 3
GTP	Guanina-5'-trifosfat
HMG	Proteïna del grup d'alta mobilitat
HSP	Proteïna de xoc tèrmic
IPTG	Isopropil-D-tiogalactopiranòsid
KDa	Kilodalton
Km	Constant de Michaelis-Menten
M	Molar
MAPK	Proteïna quinasa activada per mitògens

MGBG	Metilglioxal-bis-(guanilhidrazona)
Mr	Massa relativa
NBT	Nitroblau de tetrazoli
NLS	Senyal de localització nuclear
ODC	Ornitina descarboxilasa
pb	Parells de bases
PBS	Solució salina amortidora de fosfat
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
pfu	Unitats formadores de plaques de lisi
PKA o cAPK	Proteïna quinasa dependent de AMPc
PMSF	Fluorur de fenilmetilsulfonil
PP	Proteïna fosfatasa
RNA	Àcid ribonucleic
rpm	Revolucions per minut
SAMDC	Descarboxilasa de la S-adenosilmetionina
SDS	Dodecil Sulfat de Sodi
SDS-PAGE	Electroforesis de poliacrilamida en presència de SDS
SRF	Factor de resposta a sèrum
TBS	Solució salina amortidora de Tris
Tris	Tris(hidroximetil)aminoetà
U	Unitats enzimàtiques
Vmax	Velocitat màxima

INTRODUCCIÓ	1
PREFACI	3
1. LA PROTEÏNA QUINASA CK2	4
1.1. COMPOSICIÓ BIOQUÍMICA	4
1.2. ESTRUCTURA DE LA SUBUNITAT CK2 α	5
1.2.1. Característiques generals de la subunitat CK2 α	5
1.2.2. Estructura tridimensional de la subunitat CK2 α de <i>Zea mays</i>	6
1.3. ESTRUCTURA DE LA SUBUNITAT CK2 β	12
1.3.1. Característiques generals de la subunitat CK2 β	12
1.3.2. Estructura tridimensional de la subunitat CK2 β humana	13
1.4. FORMACIÓ DE L'HETEROTETRÀMER $\alpha_2\beta_2$: MECANISMES D'OLIGOMERITZACIÓ	16
1.5 LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR DE LA CK2	19
2. SUBSTRATS DE PROTEÏNA QUINASA CK2	21
3. INHIBIDORS DE L'ACTIVITAT CK2 <i>IN VITRO</i>	23
4. CK2 I PROLIFERACIÓ CEL·LULAR	25
5. LA CK2 DELS SISTEMES VEGETALS	27
6. LES POLIAMINES	30
6.1. LES POLIAMINES A LES PLANTES	30
6.2. POLIAMINES I CK2	31
7. EL CICLE CEL·LULAR DE LES PLANTES	33
7.1. GENERALITATS. REGULACIÓ DEL CICLE CEL·LULAR A LES PLANTES	33
7.2. UTILITZACIÓ DE LÍNIES CEL·LULARS DE PLANTES EN L'ESTUDI DEL CICLE CEL·LULAR: LA SINCRONITZACIÓ CEL·LULAR	37
OBJECTIUS	39

CAPÍTOL I: Identificació de dues formes moleculars diferents de la proteïna quinasa CK2 d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	43
1. RESUM DELS RESULTATS OBTINGUTS	45
2. CÒPIA DE L'ARTICLE "Identification of two different molecular forms of <i>Arabidopsis thaliana</i> casein kinase II" (1997) Plant Science <u>12</u>, 131-142	49
CAPÍTOL II: Modulació de l'activitat CK2 durant el cicle de divisió cel·lular de les cèl·lules BY-2 de tabac	61
1. RESUM DELS RESULTATS OBTINGUTS	63
2. CÒPIA DE L'ARTICLE "Cell cycle modulation of CK2 activity in tobacco BY-2 cells" (1999) Plant Journal <u>19</u>, 655-666	67
CAPÍTOL III: Estudi del patró d'expressió de la proteïna quinasa CK2 en diferents òrgans vegetals en desenvolupament, per hibridació <i>in situ</i>	81
CAPÍTOL III: Materials i Mètodes	83
1. OBTENCIÓ DEL TEIXIT VEGETAL	85
1.1. ESTERILITZACIÓ DE LES LLAVORS D' <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> I DE <i>RAPHANUS SATIVUS</i>	85
1.2. GERMINACIÓ I CREIXEMENT D' <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> EN TERRA. RECOL·LECCIÓ DEL MATERIAL	85
1.3. GERMINACIÓ I CREIXEMENT DE <i>RAPHANUS SATIVUS</i> EN MEDI LÍQUID. INDUCCIÓ DE LA FORMACIÓ D'ARRELS LATERALS	86
2. PREPARACIÓ DEL TEIXIT: FIXACIÓ I INCLUSIÓ EN PARAFINA	86
2.1. FIXACIÓ DEL TEIXIT	86
2.2. INCLUSIÓ DE LES MOSTRES EN PARAFINA	87
3. OBTENCIÓ DE SECCIONS DE LES MOSTRES INCLOSES EN PARAFINA	88
3.1. PREPARACIÓ DELS PORTAOBJECTES	88
3.2. TALL DE LES MOSTRES INCLOSES EN PARAFINA. ÚS DEL MICROTOM	88
4. PRE-TRACTAMENT DE LES SECCIONS DE TEIXIT	89
5. PREPARACIÓ DE LES SONDES. HIBRIDACIÓ	90
5.1. SÍNTESI DE LES RIBOSONDES	90
5.2. HIBRIDACIÓ I RENTATS	91

6. DETECCIÓ DELS HÍBRIDS	92
CAPÍTOL III: Resultats	93
1. HIBRIDACIÓ <i>IN SITU</i> SOBRE SECCIONS DE MERISTEM APICAL VEGETATIU DE <i>RAPHANUS SATIVUS</i>	95
2. HIBRIDACIÓ <i>IN SITU</i> SOBRE SECCIONS DE FLORS D'<i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	97
3. HIBRIDACIÓ <i>IN SITU</i> SOBRE SECCIONS D'ARREL DE <i>RAPHANUS SATIVUS</i>	104
4. HIBRIDACIÓ <i>IN SITU</i> SOBRE SECCIONS DE FULLA D'<i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	110
CAPÍTOL III: Discussió	115
CAPÍTOL IV: Obtenció i caracterització de diferents cDNAs corresponents a les subunitats a i b de la proteïna quinasa CK2 de tabac	121
CAPÍTOL IV: Materials i mètodes	123
1. OBTENCIÓ DE CLONS PARCIALS DE LES SUBUNITATS a I b DE LA CK2 DE TABAC	125
1.1. AMPLIFICACIÓ DE SEQÜÈNCIES DE cDNA MITJANÇANT PCR	125
1.2. SUBCLONATGE DELS PRODUCTES DE PCR	126
1.3. SEQÜENCIACIÓ I ANÀLISI DELS PRODUCTES DE PCR	127
2. ESTUDIS DE CROSS-HIBRIDACIÓ ENTRE ELS DIFERENTS PRODUCTES DE PCR CORRESPONENTS A LES SUBUNITATS a I b DE LA CK2 DE TABAC: ESTABLIMENT DE LES CONDICIONS ÒPTIMES D'HIBRIDACIÓ	128
2.1. PREPARACIÓ DE LES MOSTRES I TRANSFERÈNCIA A MEMBRANA	128
2.2. MARCATGE RADIOACTIU DE LES SONDES	129
2.3. HIBRIDACIÓ, RENTATS I EXPOSICIÓ. DETERMINACIÓ DE LA TEMPERATURA D'HIBRIDACIÓ: CÀLCUL DE LA T_m	129
3. CRIBATGE D'UNA BIBLIOTECA DE cDNA DE CÈL.LULES BY-2 DE TABAC	131
3.1. CARACTERÍSTIQUES DE LA BIBLIOTECA DE cDNA UTILITZADA	131
3.2. LES SOQUES HOSTE XL1-BLUE MRF' I XL0LR D' <i>E.COLI</i>	132
3.2.1. Preparació de les cèl.lules hoste	132
3.3. TITOLACIÓ DE LA BIBLIOTECA DE cDNA	133

3.4. CRIBATGE DE LA BIBLIOTECA	133
3.4.1. Primer cribatge	133
3.4.1.1. Preparació i creixement de les plaques de lisi	133
3.4.1.2. Transferència de les plaques de lisi a filtres de nitrocel.lulosa i preparació per a la hibridació	134
3.4.1.3. Hibridació dels filtres amb la sonda marcada radioactivament	134
3.4.1.4. Aïllament dels fags positius	135
3.4.2. Segon cribatge	135
3.4.3. Tercer cribatge	136
3.4.3.1. Cribatge mitjançant PCR	136
3.4.3.2. Aïllament dels fags positius individuals	137
3.5. EXCISIÓ <i>IN VIVO</i> DEL VECTOR pBK-CMV A PARTIR DEL VECTOR ZAP-EXPRESS	137
3.5.1. Amplificació del fag <i>helper</i> ExAssist	137
3.5.2. Amplificació dels fags recombinants positius	138
3.5.3. Excisió <i>in vivo</i>	138
3.6. ANÀLISI DELS CLONS POSITIUS OBTINGUTS EN EL CRIBATGE DE LA BIBLIOTECA DE cDNA	139
3.6.1. Preparació i anàlisi del DNA del fàgmid pBK-CMV	139
3.6.2. Seqüenciació dels inserts	140
3.6.3. Anàlisi de les seqüències i comparació amb les seqüències introduïdes als bancs de dades	140
COMPOSICIÓ DELS MEDIS DE CULTIU	141
CAPÍTOL IV: Resultats	143
1. OBTENCIÓ DE CLONS PARCIALS DELS GENS DE LES SUBUNITATS a i b DE LA CK2 DE TABAC	145
2. CROSS-HIBRIDACIÓ ENTRE ELS DIFERENTS PRODUCTES DE PCR CORRESPONENTS A LES SUBUNITATS a i b DE LA CK2 DE TABAC	149
3. CRIBATGE DE LA BIBLIOTECA DE cDNA. OBTENCIÓ DELS CLONS POSITIUS I SEQÜENCIACIÓ	151
3.1. SEQÜENCIACIÓ I CARACTERITZACIÓ DELS cDNAs AÏLLATS PER A LA SUBUNITAT CK2 α	152
3.2. SEQÜENCIACIÓ I CARACTERITZACIÓ DEL cDNA AÏLLAT PER A LA SUBUNITAT CK2 β	162
CAPÍTOL IV: Discussió	167
1. CARACTERÍSTIQUES MÉS IMPORTANTS DE LES CADENES POLIPEPTÍDIQUES CORRESPONENTS A LA SUBUNITAT CK2a DE TABAC	169
2. CARACTERÍSTIQUES MÉS IMPORTANTS DE LES CADENES POLIPEPTÍDIQUES CORRESPONENTS A LA SUBUNITAT CK2b DE TABAC	176

DISCUSSIÓ GENERAL	187
1. LA PROTEÏNA QUINASA CK2 EN PLANTES D' <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> : IDENTIFICACIÓ DE DUES FORMES MOLECULARS D'AQUESTA PROTEÏNA	189
2. LA PROTEÏNA QUINASA CK2 EN ELS PROCESSOS DE DIVISIÓ CEL.LULAR I DE DIFERENCIACIÓ EN ELS SISTEMES VEGETALS: MODULACIÓ DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA DURANT EL CICLE CEL.LULAR I REGULACIÓ DE LA SEVA EXPRESSIÓ EN ESTADIS DE PROLIFERACIÓ	193
2.1. MODULACIÓ DE L'ACTIVITAT CK2 DURANT EL CICLE CEL.LULAR DE LES CÈL.LULES BY-2 DE TABAC	193
2.2. REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ I DE L'ACTIVITAT CK2 EN ESTADIS DE PROLIFERACIÓ CEL.LULAR	196
2.2.1. Activitat i expressió de la proteïna quinasa CK2 en la corba de creixement de les cèl.lules BY-2	196
2.2.2. Regulació post-transcripcional de la proteïna quinasa CK2 durant la divisió cel.lular: les poliamines	197
2.2.3. Estudi del patró d'expressió de la proteïna quinasa CK2 en diferents òrgans vegetals d' <i>Arabidopsis thaliana</i> i <i>Raphanus sativus</i> , per hibridació <i>in situ</i>	199
3. CARACTERÍSTIQUES PRÒPIES I CARACTERÍSTIQUES GENERALS DE LES CADENES POLIPEPTÍDIQUES DE LES SUBUNITATS CK2a I CK2b DE PLANTES EN COMPARACIÓ A LES D'ALTRES ORGANISMES, EN BASE A LES SEQÜÈNCIES OBTINGUDES EN EL CRIBATGE D'UNA BIBLIOTECA DE cDNA DE TABAC	201
3.1. LA SUBUNITAT CATALÍTICA CK2 α	201
3.2. LA SUBUNITAT REGULADORA CK2 β	203
CONCLUSIONS	207
BIBLIOGRAFIA	213

INTRODUCCIÓ

PREFACI

La senyalització a través de processos de fosforilació/defosforilació per part de proteïna quinases es troba implicada en tots els aspectes de la funció cel·lular, inclosos la divisió i el creixement. Dins d'aquest context, la proteïna quinasa CK2, anteriorment coneguda com caseïna quinasa II, és una Ser/Thr fosfotransferasa multifuncional, amb un alt grau de conservació al llarg de l'evolució i ubiqüitària en els organismes eucariotes i els llevats (per a una revisió extensa, consultar Guerra, 1999; Pinna, 1997; Allende, 1995; Pinna, 1990). Pot ser definida com una proteïna quinasa independent de nucleòtid cíclic que fosforila preferencialment proteïnes àcídiques, com les caseïnes i la fosvitina però no proteïnes bàsiques, com la histona i la protamina. Com moltes altres proteïna quinases, la CK2 va prendre el nom del substrat utilitzat en les reaccions de fosforilació *in vitro*, la caseïna. De fet, en diversos sistemes estudiats, s'han aïllat dues caseïna quinases diferents, designades com a CK1 i CK2, d'acord a l'ordre d'elució que mostren en una cromatografia de DEAE-cel·lulosa, utilitzada convencionalment durant la purificació enzimàtica (Hathaway, 1979). Malgrat el seu nom, cap d'elles té la caseïna com a substrat fisiològic, sinó que és una altra caseïna quinasa, la GEF-CK, específica de la glàndula mamària, la responsable de fosforilar la caseïna *in vivo*.

Hi ha tres aspectes que es consideren característics de la CK2 i que permeten diferenciar-la de la CK1. La CK2 pot utilitzar tant ATP com GTP com a donadors de fosfat, fosforila residus de Serina i Treonina, dins de la seqüència consens S/TXXE/D, i la seva activitat es veu inhibida per concentracions baixes d'heparina i 2,3-difosfoglicerat. La CK1, en canvi, únicament utilitza ATP com a donador de fosfat, fosforila solament residus de Serina i és insensible als inhibidors mencionats de la CK2.

La CK2 disposa d'un gran nombre de substrats biològics, implicats en la transcripció i replicació del DNA, en el processament del RNA i la traducció, i en el metabolisme cel·lular. Intervé en els processos de transducció de senyal relacionats amb la proliferació i el creixement de cèl·lules tumorals, on la localització subcel·lular de la proteïna es considera en part responsable de la seva funció dins la cèl·lula. Considerant que la CK2 pertany al grup de les Ser/Thr quinases que aparentment no requereix un missatger secundari o un activador de l'activitat enzimàtica, la seva funció exacta dins la cèl·lula, així com la seva regulació, romanen després de molts d'anys d'investigació un enigma.

1. LA PROTEÏNA QUINASA CK2

1.1. Composició bioquímica

La proteïna quinasa CK2 és, en la seva forma més freqüentment descrita, un enzim oligomèric (Mr = 130-150 KDa), format per dos tipus de subunitats, la subunitat catalítica α (CK2 α , Mr = 36-44 KDa), codificada per un o dos gens diferents (α i α'), i la subunitat reguladora β (CK2 β , Mr = 24-26 KDa), codificada en la majoria de sistemes per un sol gen. Aquests dos tipus de subunitats s'organitzen en les diferents combinacions possibles en un tetràmer del tipus $\alpha_2\beta_2$.

En els últims anys, però, s'han descrit nombroses variants d'aquesta estructura considerada com la més clàssica. En primer lloc, en diverses espècies no animals s'ha demostrat que existeix heterogeneïtat en la subunitat CK2 β , i se n'han pogut clonar dos gens per a *Saccharomyces cerevisiae* (Bidway, 1994), quatre per a *Arabidopsis thaliana* (Collinge, 1994; Sugano, 1998; CKB4 dipositada als bancs de dades fruit del programa de seqüenciació del genoma d'*Arabidopsis*, per Rounsley, 1998), tres per a *Zea mays* (Riera, 2001), dos per a *Drosophila melanogaster* (Saxena, 1987; Bidway, 1999), i en aquesta tesi es presenta la seqüència de tres clons parcials corresponents a la CK2 β de *Nicotiana tabacum*. La massa relativa d'algunes d'aquestes subunitats és quelcom superior a l'esperada, com per exemple les de llevat que són de 32 i 41 KDa, i les de *Arabidopsis* i *Zea mays* que oscil·len entre 29.5 i 32.3 KDa.

En segon lloc, en diversos sistemes biològics s'han aïllat formes monomèriques de CK2 α lliures. Aquestes formes són actives catalíticament i sembla que serien especialment abundants o més estables en els sistemes vegetals, tot i que també hi són presents formes oligomèriques actives. Així, s'han descrit formes monomèriques en el blat de moro (Dobrowolska, 1992), en *Arabidopsis* (Espunya, 1997) i en el bròquil (Klimczak, 1994). A *Dyctiostelium discoideum*, en canvi, únicament s'ha pogut purificar una forma monomèrica (Ospina, 1992).

En tercer lloc, en cèl·lules humanes, s'ha observat que la CK2 β és sintetitzada en excés respecte a la CK2 α , de manera que la fracció que no s'associa a la CK2 α per formar el tetràmer, és degradada ràpidament per un sistema no lisosomal independent d'ATP

(Lüscher, 1994) i que alguns autors han relacionat amb el sistema d'ubiquitinació i proteòlisi al proteosoma. Per altra banda, nombrosos estudis demostren que tant la CK2 α com la CK2 β poden interaccionar amb proteïnes alienes al tetràmer, entre les quals destaquen, la HSP90, la proteïna fosfatasa PP2A, el factor eIF-2, la grp94/endoplasmínia i la nucleolina, per a la CK2 α , i la p53, la proteïna ribosomal L5, la A-Raf, la Mos i la topoisomerasa II, per a la CK2 β (per a una revisió, veure Grein, 1999). Es postula que la CK2 β pugui regular la funció d'altres proteïna quinases amb qui interacciona. De fet, s'ha vist que la interacció amb la proteïna quinasa A-Raf provoca una estimulació de l'activitat catalítica (Haggeman, 1997), mentre que la interacció amb la proteïna Mos, provoca l'efecte contrari (Chen, 1997).

En conjunt, tots aquestes aspectes amplien la visió que es tenia històricament de la CK2 com un enzim exclusivament tetràmeric, compost de subunitat α i subunitat β , i es suggereixen cada vegada més noves possibles funcions addicionals per a les subunitats que la conformen.

1.2. Estructura de la subunitat CK2 α

1.2.1. Característiques generals de la subunitat CK2 α

La subunitat catalítica CK2 α es troba codificada en la majoria d'espècies per un o dos gens diferents (α i α'), que generen productes proteics d'entre 332 i 420 aminoàcids. El seu domini catalític consta d'uns 300 aminoàcids de longitud que manifesten una gran homologia evolutiva, i conté els motius estructurals necessaris per a l'activitat enzimàtica. La distribució del domini catalític de les proteïna quinases en onze subdominis es manté d'una forma molt conservada a la CK2, si bé amb lleugeres modificacions que determinen les característiques pròpies de la proteïna. Dos dels residus més conservats a les proteïna quinases, l'Alanina⁶⁶ i la Fenilalanina¹⁷⁶, han estat substituïts a la CK2 per Valina⁶⁶ i Triptòfan¹⁷⁶. Aquestes substitucions s'han relacionat amb la capacitat de la CK2 de poder utilitzar tant GTP com ATP com a donadors del grup fosfat. Una altra de les modificacions que presenta la CK2 és la presència d'una regió de caràcter bàsic ric en Lisines, amb seqüència ⁷⁴KKKKIKR⁸⁰, que contràriament és acídica en la majoria de proteïna quinases. Aquest motiu té una gran relevància estructural i funcional, que es relaciona amb la seva

capacitat d'establir interaccions electrostàtiques amb residus bàsics de la subunitat CK β i dels substrats. Al capítol 4 d'aquesta tesi es farà èmfasi en la descripció dels motius estructurals característics d'aquesta proteïna.

1.2.2. Estructura tridimensional de la subunitat CK2 α de *Zea mays*

La resolució a 2.1 Å, per cristal·lografia de raigs X, de l'estructura tridimensional de la subunitat CK2 α recombinant del blat de moro (rmCK2 α), en presència d'ATP i Mg²⁺, descriu una arquitectura bilobulada, comparable a les estructures conegudes per altres proteïna quinases, com la cAPK (proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic) i la CDK2 (proteïna quinasa 2 dependent de ciclina), i comprèn en el seu conjunt nou fulles β i dotze hèlix α (Niefind, 1998). La Fig 1 mostra una visió global de l'estructura de la rmCK2 α , que s'ha representat seguint un gradient de colors, amb l'extrem N-terminal de la proteïna colorejat en blau i l'extrem C-terminal colorejat en vermell. Es pot observar que el lòbul més petit correspon a la part N-terminal de la proteïna, i comprèn cinc fulles β i una hèlix α fins al residu 117 de la proteïna, mentre que el lòbul més gran correspon a la part C-terminal i està format principalment per hèlix α . La interfase entre els dos lòbuls configura el nucli del centre actiu de la proteïna i conté quatre fulles β . La molècula té aproximadament la forma d'una mongeta amb unes dimensions de 67x50x42 Å.

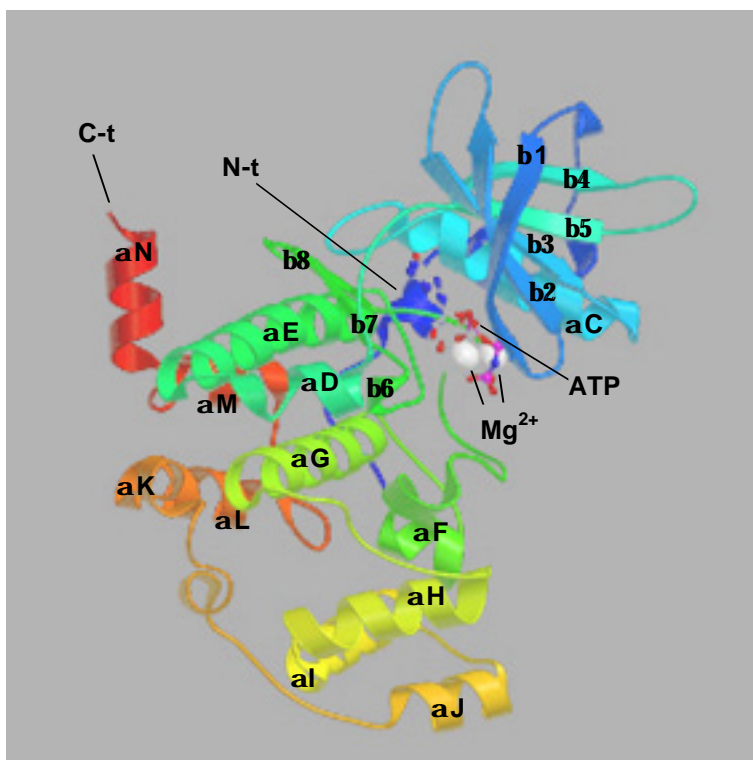


Fig 1 : Visió global de l'estructura d la rmCK2a (CK2a recombinant de blat de moro). Per a facilitar la interpretació, s'ha colorejat en blau l'extrem N-terminal i en vermell, el C-terminal. Les dues boles blanques de la zona interlobular corresponene a àtoms de Mg^{2+} i les boletes vermelles imiten l'esquelet de la molècula d'ATP. La fulla **b9** no és visible des d'aquesta orientació perquè es situa per darrera dels àtoms de Mg^{2+} . Extret de la web Protein Kinase Resource, disponible a <http://www.sdsc.edu/kinases>

L'alineament de la seqüència d'aminoàcids de la CK2α amb les proteïna quinases cAPK i CDK2, mostra que es manté la distribució topològica de les estructures secundàries (Fig 2).

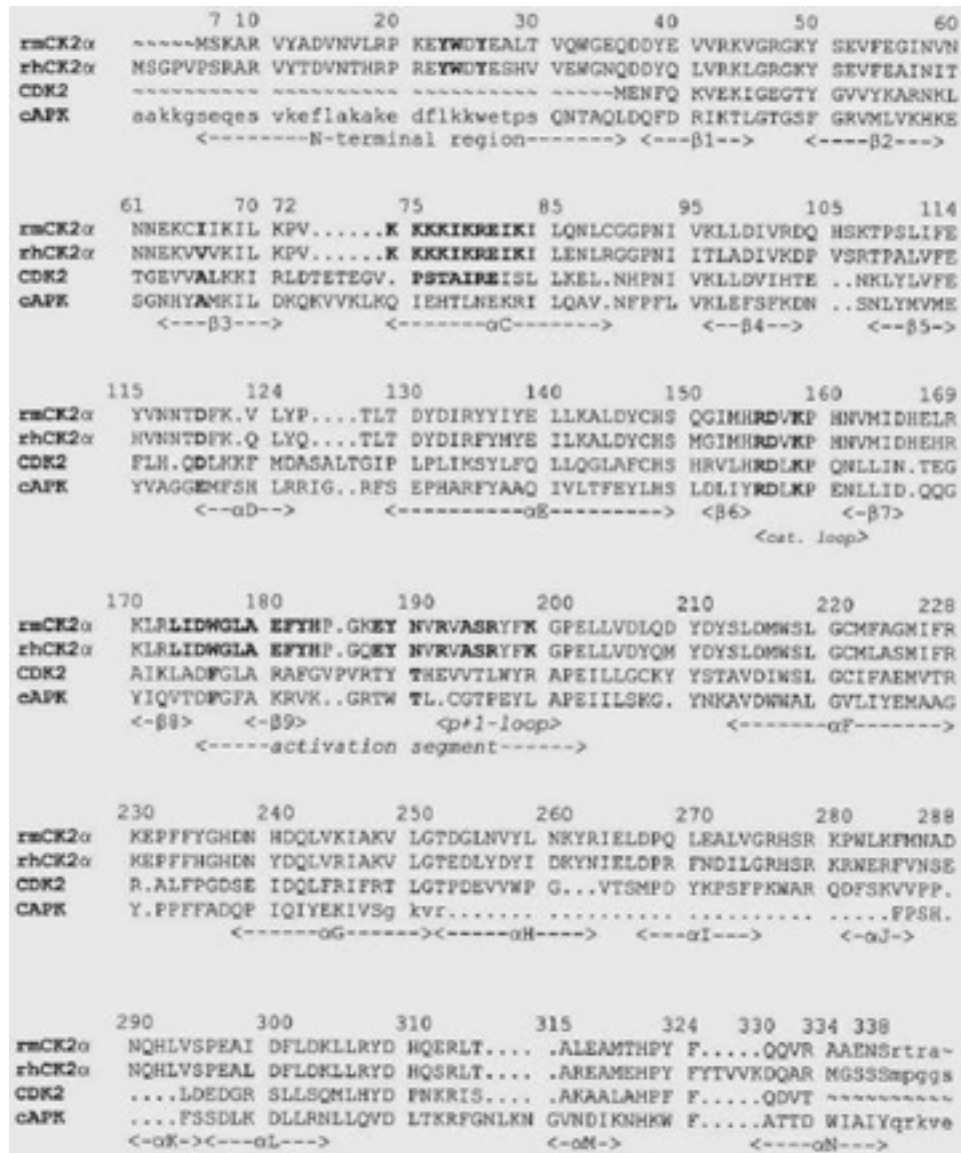


Fig 2: Alineament de seqüència múltiple basat en l'estructura topològica de la rmCK2α (recombinant de blat de moro), la rhCK2α (recombinant humana), la cAPK (proteïna quinasa dependent d'AMPc) i la CDK2 (proteïna quinasa 2 dependent de ciclina). Per motius de presentació es van eliminar els extrems C-terminal de la rhCK2α i de la cAPK. Les posicions importants es marquen a la figura en negreta i a sota de la seqüència s'indica el tipus de plegament. Extret de Niefind i col., 1998.

Un dels aspectes més interessants de la resolució del cristall de la $rmCK2\alpha$ és que aquesta quinasa es troba, de forma constitutiva, en conformació oberta o activa. En altres quinases, com per exemple la CDK2, la conformació activa ha de complir dos requisits estructurals. En primer lloc, el segment d'activació, que a la $CK2\alpha$ s'estén entre els residus Asp¹⁷⁵ i Glu²⁰¹, ha d'estar estructurat de manera que el seu plegament no impedeixi que les molècules de substrat i de cosubstrat puguin accedir al centre actiu de l'enzim. Aquest punt ha estat intensament estudiat en la CDK2 humana (De Bondt, 1993; Jeffrey, 1995), en la qual la conformació activa s'aconsegueix en produir-se un canvi conformacional provocat per la unió de la ciclina A al segment d'activació. En segon lloc, la part inicial de l'hèlix αC , que és crítica per al reconeixement del substrat en les proteïna quinases, ha d'estar favorablement alineada amb el centre actiu. La CDK2 compleix aquest requisit gràcies a un canvi conformacional que sofreix la corresponent hèlix αC després d'interaccionar amb la ciclina A. La $CK2\alpha$ conté en aquesta hèlix αC el bloc ric en Lisines KKKKIKREIK (residus 74 a 83), que és probablement el segment més característic de tota l'estructura. Aquest segment ha estat implicat per diferents autors en moltes de les característiques importants de la proteïna, tals com el reconeixement del substrat, la inhibició de l'activitat enzimàtica per heparina, l'autoinhibició per interacció amb el corresponent bloc àcid de la $CK2\beta$ i, finalment, la translocació al nucli, ja que conté un senyal canònic de localització nuclear (Pinna, 1997).

Considerant que, contràriament al que succeeix amb la CDK2, que necessita unir-se amb la ciclina per a ser activa enzimàticament, la $CK2\alpha$ és activa en absència de la subunitat $CK2\beta$ (Dobrowolska, 1992; Espunya, 1997), es pot pensar que la mateixa $CK2\alpha$ contingui en la seva seqüència els determinants moleculars necessaris per a la seva regulació. L'estructura tridimensional de la $rmCK2\alpha$ mostra que l'extrem N-terminal (residus 7 a 36), més extens que el de la CDK2, podria jugar un paper essencial en l'estabilització de la conformació activa, mitjançant els contactes que estableix amb el segment d'activació i amb el bloc ric en Lisines de l'hèlix αC . De fet, el bloc ric en Lisines pot alinear-se estructuralment al motiu PSTAIRE de la CDK2 en conformació activa, que és essencial per al reconeixement i unió de la CDK2 a la ciclina A (Jeffrey, 1995). Concretament, l'estructura de la $rmCK2\alpha$ mostra interaccions que confirmen aquesta hipòtesi: interaccions de tipus iònic de la Lisina⁷⁶ i la Isoleucina⁷⁸ de l'hèlix αC amb el Glutàmic²⁷ i el Triptòfan³³ de l'extrem N-terminal, i de la Lisina⁷⁹ a la vegada amb el Glutàmic²⁷ i la Lisina²⁹, a través d'enllaços per pont d'hidrogen.

El centre actiu de la $\text{rmCK2}\alpha$ comprèn una regió extensa compartida entre els dos lòbuls de l'estructura i inclou diversos motius que, en conjunt, determinen el caràcter actiu de la proteïna: el motiu d'ancoratge del fosfat, en el *loop* entre les fulles $\beta 1$ i $\beta 2$ (de Glicina⁴⁶ a Serina⁵¹); el bloc bàsic ric en Lisines estructurat en l'hèlix α C (de Lisina⁷⁴ a Lisina⁸³); el *loop* catalític entre les fulles $\beta 6$ i $\beta 7$ (d'Arginina¹⁵⁵ a Aspàtic¹⁶¹); i el segment d'activació que inclou la fulla $\beta 8$ i el *loop* p+1 (de Leucina¹⁷³ a Glutàmic²⁰¹). A continuació es descriuen algunes característiques d'aquestes estructures:

- El seti d'unió del nucleòtid és una estructura molt conservada a les proteïna quinases i es caracteritza per mantenir invariables una sèrie de residus claus per a la fixació de la ribosa i del fosfat, i per la generació d'una butxaca hidrofòbica necessària per a la unió de l'adenina. Les molècules de fosfat del nucleòtid s'uneixen a la proteïna a través del *loop* ric en Glicines, GRGKYS, (residus 46 a 51), que connecta les fulles $\beta 1$ i $\beta 2$. La interacció entre la Glicina⁴⁸ i el fosfat en posició β , derivaria en una aproximació espacial del fosfat en posició γ cap a la Serina acceptora, pertanyent al substrat (Chaillot, 2000). Dins d'aquest motiu destaca la Tirosina⁵⁰, que és típica del grup de quinases CDK. La fosforilació d'aquest residu per acció de la proteïna quinasa "wee" resulta en la inhibició de les CDKs. Es desconeix el paper funcional de la Tirosina⁵⁰ en les $\text{CK2}\alpha$, però la seva conservació evidencia la relació evolutiva que existeix entre la $\text{CK2}\alpha$ i les CDKs.

La ribosa del nucleòtid interacciona amb la proteïna a través d'un enllaç per pont d'hidrogen amb una molècula d'aigua, la qual a la vegada forma un altre pont d'hidrogen amb l'Asparagina¹⁸ de l'hèlix α D.

La majoria d'interaccions que permeten la unió del nucleòtid són enllaços per pont d'hidrogen, específics i diferents segons la base del nucleòtid. Aquesta hipòtesi ha estat confirmada a partir de la cocristal·lització de la forma $\text{rmCK2}\alpha$ complexada amb els anàlegs de nucleòtid, AMPPNP i GMPPNP (imidofosfat d'adenilil i de guanilil), en presència de Mg^{2+} (Niefind, 1999). Segons aquest treball, la base del nucleòtid estableix enllaços per pont d'hidrogen amb residus que connecten la fulla $\beta 5$ amb l'hèlix α D. El nombre d'enllaços que s'estableixen és el mateix independentment de la base (adenina o guanina), fet que explicaria perquè la CK2 pot utilitzar amb similar eficàcia els dos nucleòtids. Per mutagènesi dirigida s'ha demostrat que un dels residus claus implicats en la dualitat de cosubstrat és l'Asparagina¹¹⁸ (Srinivasan, 1999).

La resolució del cristall ha confirmat la presència de dos àtoms de Mg^{2+} propers als fosfats, un dels quals es complexaria amb l'ATP mentre que l'altre tindria la funció de neutralitzar càrregues negatives localitzades a l'entorn del centre actiu (Niefind, 1999).

- Com s'ha comentat anteriorment, el bloc ric en Lisines $^{74}KKKKIKREIK^{83}$ interacciona amb el segment d'activació a través d'enllaços per pont d'hidrogen i es creu que podria jugar un paper essencial en l'estabilització de la conformació activa de la proteïna. Aquesta regió, a més, ha estat implicada en la interacció amb les proteïnes o pèptids substrat, i també amb la subunitat CK2 β i l'inhibidor heparina (Allende, 1995).
- Una posició molt conservada és l'Arginina¹⁵⁵, situada en el *loop* catalític, i que interacciona amb un residu del segment d'activació, que és una Treonina fosforilada en les cAPKs i en les CDK2s, i una Asparagina¹⁸⁹ en la CK2. L'Arginina del *loop* catalític precedeix en aquestes quinases un residu d'Aspàtic (posició 156), característica per la qual es coneixen amb el nom de "RD" quinases (Johnson, 1996).
- L'inici del segment d'activació conté una de les empremtes més conservades i característiques de la CK2, el bloc $^{173}LIDWGLAEFYH^{184}$. La Fenilalanina¹⁸¹ i la Histidina¹⁸³ d'aquest bloc interaccionen amb residus de l'extrem N-terminal de la proteïna, la Tirosina²³, el Triptòfan²⁴ i la Tirosina²⁶. Aquestes interaccions col.laborarien a estabilitzar la conformació activa de la proteïna, i equivaldrien estructuralment a l'efecte de la ciclina A sobre la CDK2.

El Triptòfan¹⁷⁶, és un residu exclusiu de les CK2 α , ja que la resta de Ser/Thr quinases mantenen una Fenilalanina en la posició. El Triptòfan¹⁷⁶ ha estat implicat en la capacitat de les CK2 d'utilitzar tant ATP com GTP com a donadors del grup fosfat. A l'estructura, es troba internament constret per un pont d'hidrogen amb la Leucina¹⁷³, col.laborant una vegada més en el manteniment de la conformació oberta. El segment d'activació juga un paper molt important en el mecanisme catalític. A més de contenir el Triptòfan¹⁷⁶, la Isoleucina¹⁷⁴ és part de la butxaca hidrofòbica que acull la base del nucleòtid i l'Aspàtic¹⁷⁵ es troba implicat en la quelació d'un ió de Magnesi.

La regió C-terminal del segment d'activació és conegut amb el nom de *loop* p+1. Per anàlisis mutacionals, es coneix que tres dels seus residus, Arginina¹⁹¹, Arginina¹⁹⁵ i Lisina¹⁹⁸ estan implicats en el reconeixement del substrat (Sarno, 1996).

1.3. Estructura de la subunitat CK2b

1.3.1. Característiques generals de la subunitat CK2β

Típicament, la CK2β dels vertebrats i insectes consta de 215 aminoàcids, que presenten un alt grau d'homologia. Les formes descrites per als llevats i les plantes són lleugerament més grans, ja que presenten insercions internes, en el cas dels llevats, o un extrem N-terminal més extens, en el cas de les plantes, si bé a les plantes l'extrem C-terminal és lleugerament més curt. La subunitat CK2β no comparteix similitud de seqüència amb cap altra proteïna coneguda, si s'exceptua el producte del gen *stellate* de *Drosophila* (Bozzetti, 1995), la funció del qual és desconeguda. A nivell de seqüència d'aminoàcids cal destacar una sèrie de motius que es relacionen amb les propietats bioquímiques i funcionals. Breument, la regió N-terminal conté dos setis d'autofosforilació, Serina^{2,3} i, més endavant, un domini acídic entre els residus 51 i 80, que és responsable de la inhibició de l'activitat catalítica sobre alguns substrats i pot unir efectors policatiònics, com les poliamines. La part central de la proteïna conté quatre residus de Cisteïna conservats (posicions 109, 114, 137 i 140) ordenats en una seqüència que compleix els requeriments per a un motiu d'unió a zinc. L'extrem C-terminal presenta una acumulació de càrregues positives i es relaciona directament amb la interacció amb la subunitat CK2α. En el capítol 4 es fa èmfasi en la descripció dels motius estructurals i es discuteix la seva conservació evolutiva en diferents espècies.

Funcionalment, la CK2β no té activitat catalítica per sí sola, però afecta l'estabilitat, l'especificitat i l'activitat de la subunitat catalítica. Per a tots els substrats coneguts, excepte per a la calmodulina, la CK2β estimula l'activitat enzimàtica de la subunitat CK2α en un factor de 5 a 10 vegades (Cochet, 1983; Filhol, 1991). En el cas de la calmodulina, la presència de la subunitat CK2β inhibeix l'activitat catalítica (Meggio, 1992). Diversos estudis atribueixen a l'extrem C-terminal de la CK2β els efectes activadors, i a la zona acídica (residus 55 a 64), l'efecte inhibidor. Aquesta dualitat activadora-inhibidora sembla estar condicionada i podria revertir-se, per la presència de compostos estimuladors de naturalesa policatiònica, els més importants dels quals són la polilisina i les poliamines.

1.3.2. Estructura tridimensional de la subunitat CK2 β humana

Els esforços dels últims anys per a l'estudi de l'estructura i funció de la CK2 β han desembocat en la resolució de l'estructura tridimensional de la CK2 β humana (residus 1 a 182) (Chantalat, 1999a, 1999b). Els autors destaquen l'extrema propensió de la proteïna entera (215 residus) a agregar-se de forma irreversible i a degradar-se espontàniament, generant un producte majoritari de 182 aminoàcids. La proteïna truncada de 182 residus forma dímers en solució i és capaç d'interaccionar amb la subunitat CK2 α , si bé amb una afinitat reduïda. Aquestes observacions confirmen el model d'oligomerització proposat per Gietz (1995) segons el qual, l'establiment dels contactes β - β forma el nucli principal d'organització del tetràmer. Per altra part, la baixa afinitat amb què la CK2 β truncada s'uneix a la CK2 α corroboraria els treballs que impliquen l'extrem C-terminal en la unió amb la subunitat CK2 α .

El monòmer de CK2 β és una molècula ovoide de dimensions 57x34x35 Å que conté un total de 6 hèlix α i 3 fulles β . Està organitzat en 2 dominis, el primer dels quals conté solament hèlix α (de α 1 a α 5), mentre que el segon conté 3 fulles β antiparaleles i una hèlix α (α 6). El plegament del segon domini està estructuralment relacionat amb el plegament del TFIIIS (factor d'elongació de la transcripció II), malgrat que les dues proteïnes presenten només un 10% d'homologia de seqüència (Qian, 1993). Aquest domini conté quatre Cisteïnes en posicions molt conservades (Cys¹⁰⁹, Cys¹¹⁴, Cys¹³⁷, Cys¹⁴⁰), que coordinen un àtom de Zn²⁺, utilitzant un motiu estructural (3 fulles β antiparaleles) conegut com a "dit de zinc".

La unitat cristal·lina és el dímer, que adopta una forma de mitja lluna, on els dos monòmers s'encaren a través del segon domini i contacten a través d'una interfase formada pel dit de zinc (Fig 3, a). Aquesta distribució topològica, en el seu conjunt, no mostra homologia amb cap altra proteïna coneguda, característica que també s'observa en la seqüència d'aminoàcids.

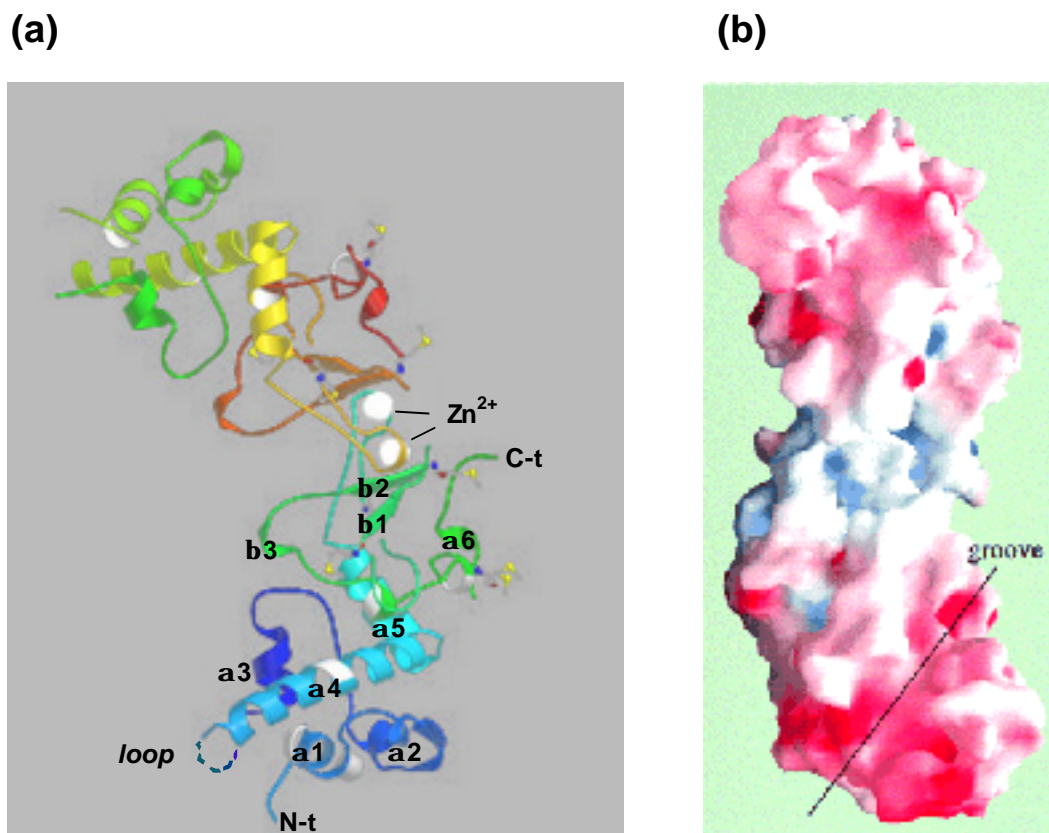


Fig 3: (a) Representació de l'estructura tridimensional de l'homodímer de CK2b. Per qüestions d'interpretació només estan numerades les hèlix *a* i les fulles *b* d'un dels monòmers. El primer domini del monòmer s'ha colorejat en blau i el segon domini en verd. Els àtoms de Zn^{2+} es representen amb boles de color blanc. En un traç discontinu es marca l'orientació aproximada del loop acídic entre les hèlix *a3* i *a4*, segons Chantalat i col, 1999. Representació extreta de la web Protein Kinase Resource, disponible a <http://www.sdsc.edu/kinases>

(b): Superfície molecular de l'homodímer de CK2b, colorejada en base al potencial electrostàtic, on el blau representa residus bàsics i el vermell representa residus àcids. L'orientació de l'estructura permet apreciar la caverna àcida dels extrems del dímer. Extret de Chantalat i col. 1999.

El Domini I comprèn els residus 5 a 104 i es troba enterament estructurat en 5 hèlix α . Les hèlix α_4 (residus 66 a 87) i α_5 (residus 91 a 102) es disposen en forma de L, formant un angle de 95° , de manera que pràcticament no interaccionen entre elles. En contrast, les hèlix α_1 , α_2 i α_3 envolten l'hèlix α_4 i permeten que la regió àcida (residus 55 a 66) s'orienti cap a l'exterior, en forma de *loop* entre les hèlix α_3 i α_4 . L'extrem N-terminal, també orientat vers l'exterior, es plega contra l'hèlix 4 i estableix contactes amb el *loop* àcidic.

La distribució dels residus d'aquest domini a la superfície de la molècula mostra que els dos extrems del dímer tenen un caràcter marcadament àcidic (Fig 3, b). La característica més important d'aquesta regió és la seva arquitectura en forma d'una gran cavitat allargada o canal, formada per les hèlix α_1 i α_3 , el *loop* àcidic i la part N-terminal de l'hèlix α_4 . A la seva superfície s'hi trobarien 6 residus de Glutàmic i 5 d'Aspàrtic, aportats pel *loop* i per les hèlix α_3 i α_4 , mentre que 4 residus hidrofòbics de l'hèlix α_1 delinearien un costat de la canal. Atès que el *loop* àcidic es mostra molt flexible i mòbil, es creu que la unió de cations, tals com components alifàtics catiònics o dominis bàsics d'altres proteïnes, pot alterar les magnituds i la forma de la caverna. Per altra banda, el segment Arginina⁴⁷-Aspàrtic⁵⁵, conegut per la seva similitud de seqüència amb la *destruction box* de les ciclines, es troba localitzat a l'hèlix α_3 , estratègicament situat a la superfície de la proteïna. De la mateixa manera, els setis d'autofosforilació (Serina²⁻³) situats a l'extrem N-terminal també apareixen exposats a la superfície i podrien establir contactes tant amb el centre catalític de la subunitat α com amb la regió àcida de la CK2 β (Boldyreff, 1994).

El Domini II comprèn els residus 105 a 161 i està estructurat en tres fulles β antiparal·leles que conformen el motiu d'unió de zinc, i l'hèlix α_6 (residus 163 a 170). En conjunt, els residus del motiu d'unió a zinc generen un ambient marcadament hidrofòbic que afavoreix l'establiment de múltiples interaccions entre els dos protòmers a través dels residus d'aquest domini. A l'extrem C-terminal, l'hèlix α_6 interacciona amb l'hèlix α_5 del Domini I i amb la fulla β_1 del Domini II. Els últims residus de la molècula cristal·litzada (171 a 182), implicats en la interacció amb la subunitat CK2 α , s'extenen cap a l'exterior i no interaccionen amb el cos principal de la proteïna.

1.4. Formació de l'heterotetràmera $\alpha_2\beta_2$. Mecanismes d'oligomerització.

El mecanisme d'interacció entre les dues subunitats per donar lloc a l'heterotetràmer funcional i estable ha estat objecte d'estudis intensos, duts a terme des de diferents aproximacions, principalment aplicant tècniques immunològiques (Gietz, 1995; Krehan, 1996) i fent ús del sistema del doble híbrid (Gietz, 1995; Kusk, 1995; Boldyreff, 1996; Litchfield, 1996; Kusk, 1999; Riera, 2001).

Els estudis immunològics han demostrat que la CK2 de mamífer pot existir com un homotetràmer ($\alpha_2\beta_2$ o $\alpha'\beta_2$) o com un heterotetràmer ($\alpha\alpha'\beta_2$) (Gietz, 1995). Krehan i col. (1996) van demostrar que la regió compresa entre les posicions 65 i 80 de la subunitat α (que conté el domini bàsic ric en Lisines), interacciona amb la regió compresa entre les posicions 55 i 70 de la subunitat β (que conté el domini àcid). El bloqueig d'aquestes regions mitjançant la unió d'anticossos específics preparats contra els seus pèptids, impedeix la reconstitució de l'holoenzim actiu.

L'aplicació de les tècniques del doble híbrid han permès determinar que l'holoenzim es forma com a resultat de les interaccions entre les subunitats α i β , i també entre les dues subunitats β , aquesta última confirmada per cristal·lografia de raigs X. L'oligomerització seguiria un procés seqüencial segons el qual, la dimerització de la subunitat β seria un prerequisit i precediria l'ensamblatge de la subunitat α . Les dues subunitats α no interaccionarien entre elles o ho farien de forma marginal. A més, es reforça la visió de la subunitat β com una proteïna modular organitzada en 2 dominis interdependents, on el cos principal de la proteïna estaria implicat en la formació de l'homodímer (residus 20-165), mentre que l'extrem C-terminal seria responsable de la unió a la subunitat α (residus 152-193) (Kusk, 1995; Kusk, 1999), si bé altres autors acoten als residus 156-165, la mínima seqüència necessària per a la dimerització β - β (Boldyreff, 1996). Altres treballs corroborarien la implicació de l'extrem C-terminal en la interacció amb la CK2 α (Litchfield, 1996) i l'estabilitat de l'holoenzim (Kusk, 1999; Chantalat, 1999). Els intents de formació del tetràmer a partir d'una CK2 β truncada, mancada de l'extrem C-terminal (residus 183-215), van resultar nuls, la qual cosa indicava que en aquest segment existeixen determinants moleculars que són necessaris per a la interacció amb la subunitat α (Leroy, 1999). Recentement, s'ha demostrat en *Zea mays*, que les diferents subunitats CK2 β interaccionen entre elles amb diferent intensitat (Riera, 2001). Les interaccions més

fortes s'observen entre dues subunitats CKB3 i entre CKB3 amb CKB1, mentre que CKB1 interacciona dèbilment amb ella mateixa i amb CKB2, però CKB2 no pot fer-ho amb una altra CKB2.

Per altra banda, s'han detectat interaccions intramoleculares en la subunitat CK2 β , que podrien aportar certa rigidesa al monòmer estructural i serien la base per a la dimerització. Aquestes interaccions s'establirien entre el bloc de residus 132-145 i el bloc 155-165, i possiblement generarien un *loop* en una regió localitzada a prop del dit de zinc, estructurada en les fulles β 2 i β 3 i en l'hèlix α 6 (Kusk, 1999). Aquestes interaccions s'afegirien a les descrites prèviament entre l'extrem N-terminal i els residus 55-57 (Boldyreff, 1994). L'extrem C-terminal, en canvi, es mantindria més flexible i lliure per poder interaccionar amb la subunitat CK2 α o amb altres proteïnes.

Les regions de la cadena polipeptídica de la CK2 β que intervenen en les interaccions descrites anteriorment, es mostren de forma esquemàtica a la Fig 4.

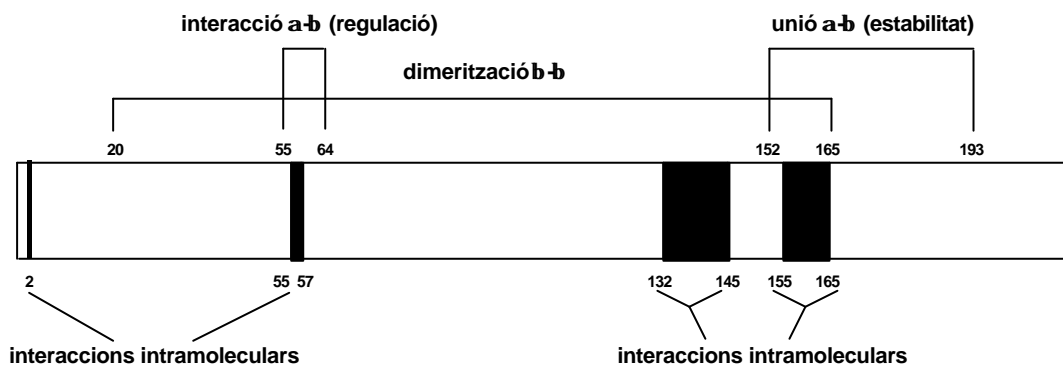


Fig 4: Esquema de les regions implicades en les interaccions intramoleculares i intermoleculares de les subunitats CK2 β i CK2 α , i en la dimerització b-b. Adaptat de Kusk i col., 1999.

En altres estudis, s'han descrit estructures supramoleculares, que es formarien per agregació de l'holoenzim de CK2, donant com a resultat la generació de polímers d'alt pes molecular en condicions saturants de substrat i de cofactors (Valero, 1995). En dependència de la concentració de salt, existeixen tres tipus d'estructures supramoleculares, que són les següents: en forma d'anell, en forma de filaments primis i en forma de filaments gruixuts. La més estable, i també la més activa, és la forma d'anell compost de quatre unitats d'holoenzim, $(\alpha_2\beta_2)_4$, i es formaria a condicions de salt fisiològiques. Els filaments primis es formen per polimerització de protòmers $\alpha_2\beta_2$ i els filaments gruixuts, per polimerització dels anells $(\alpha_2\beta_2)_4$. Es postula que l'associació-dissociació dels protòmers $\alpha_2\beta_2$ seria conseqüència d'una regulació alostèrica per efectors, tals com el clorur de magnesi o les poliamines. De fet, el clorur de magnesi produeix el mateix efecte que l'espermina, i poden substituir-se un per l'altre, per estimular l'activitat catalítica de l'enzim (Hathaway, 1984). Atès que la unió de poliamines a la CK2 s'estableix a través del domini acídic de la CK2 β , aquest estudi reforçaria la teoria segons la qual la CK2 β governaria clarament l'organització molecular i l'activitat de l'enzim en el seu conjunt.

La cristallització d'un complex tetramèric format per la subunitat CK2 α de blat de moro i un pèptid de 23-mer corresponent a l'extrem C-terminal de la subunitat CK2 β humana (residus 181-203), ha aportat un cert grau de controvèrsia sobre el mecanisme d'oligomerització i l'arquitectura final de l'holoenzim (Battistutta, 2000). El cristall obtingut consta de dos tetràmers $\alpha_2\beta(181-203)_2$, on cada tetràmer conté dues cadenes α i dos pèptids β . Els dos tetràmers del cristall es pleguen de manera idèntica. Cada pèptid β interacciona amb les dues cadenes α : els residus de les subunitats α implicats en les interaccions amb el pèptid β pertanyen a les 5 fulles β i a l'hèlix α C del lòbul corresponent a la regió N-terminal, per a una de les cadenes α , i a l'hèlix α D del segon lòbul per a l'altra cadena α . En el model d'holoenzim que proposen els autors, les subunitats β es posicionen en el costat oposat al centre catalític de la subunitat α , el qual es manté accessible als substrats i cosubstrats.

Segons aquest model, la subunitat β promou la dimerització de la subunitat α , a través dels respectius centres actius. Les cadenes α interaccionen entre elles a través d'unions electrostàtiques entre residus de les fulles β 1 i β 2 i del *loop* d'ancoratge del fosfat d'una de les cadenes, residus de l'hèlix α D i del *loop* catalític, de l'altra. De totes elles, la interacció

més important, perquè possiblement regula l'activitat enzimàtica, és la que s'estableix entre l'Arginina⁴⁷ (*loop* d'ancoratge del fosfat) d'una cadena i la Histidina¹⁶⁰ (*loop* catalític) de l'altra. Com a conseqüència d'aquesta interacció, l'Arginina⁴⁷ queda orientada vers el seti d'unió d'ATP de l'altra cadena α , i és capaç d'interaccionar amb el nucleòtid unit a l'altra cadena. Curiosament, el segment d'activació (residus 175-201) no està implicat en la dimerització i manté la mateixa conformació oberta que s'observa en el monòmer, fent possible l'accés al centre actiu del substrat i l'ATP.

Com a resultat de la dimerització de la subunitat α , els dos centres actius es situen tan a prop l'un de l'altre que és estèricament impossible la unió simultània de dues molècules de substrat. No obstant i a causa d'aquesta proximitat, els centres actius poden fosforilar simultàneament dos residus posicionats a una distància apropiada (adjacents o separats per un residu) a dins de la mateixa molècula de substrat.

1.5. Localització subcel.lular de la CK2

La localització subcel.lular de la CK2 és un dels temes més intensament estudiats des de diferents aproximacions, ja que es creu que la funció biològica de l'enzim es troba condicionada per canvis en la seva localització durant els diferents processos cel.lulars (Faust, 2000; Issinger, 1993).

Basant-se en tècniques de fraccionament subcel.lular, alguns autors descriuen la CK2 com un enzim predominantment citoplasmàtic (Girault, 1990), mentre que per altres es localitza majoritàriament al nucli (Filhol, 1990). Mitjançant tècniques immunocitoquímiques, Yu i col. (1991) van observar a les cèl.lules HeLa que les subunitats α i β es localitzaven en el citoplasma durant la interfase i es distribuïen per tota la cèl.lula durant la mitosi. En canvi, la subunitat α' es localitzava en el nucli durant la fase G1 del cicle cel.lular i en el citoplasma durant la fase S. Aquests resultats demostraven que les diferents subunitats catalítiques es distribuïen de forma asimètrica a la cèl.lula, en dependència a la fase del cicle cel.lular. Segons altres estudis, la subunitat CK2 α es transloca al nucli durant la transició G1/S on hi roman durant tot el cicle cel.lular (McKendrick, 1999). En resposta a andrògens o a factors de creixement, la CK2 transloca del citoplasma al nucli on s'uneix a la cromatina i a la matriu nuclear (Tawfic, 1994)

La presència a les subunitats α d'un domini bàsic ric en Lisines, que presenta característiques de senyal de localització nuclear (NLS), podria ser responsable de la translocació de la proteïna del citoplasma al nucli. La subunitat CK2 β podria ser transportada al nucli a través de la unió amb la proteïna transportadora NOPP140 (Li, 1997).

La CK2 també ha estat localitzada a la membrana citoplasmàtica, a l'aparell de Golgi, al reticle endoplasmàtic, als mitocondris i al citoesquelet, on fosforila substrats específics d'aquests orgànuls. L'associació de la CK2 a la membrana citoplasmàtica es realitza a través del domini àcid de la subunitat β , que també pot unir poliamines (Sarrouilhe, 1998).

La translocació de la CK2 al nucli ha estat relacionada *in vivo* amb un augment de la concentració de poliamines. La sobreexpressió de l'ODC (ornitina descarboxilasa), que resulta en un augment dels nivells de poliamines, provoca una estimulació de l'activitat i a la vegada la translocació de les dues subunitats de la CK2 al nucli (Shore, 1997).

Al blat de moro, la subunitat CK2 α ha estat immunolocalitzada tant al citoplasma com al nucli (Peracchia, 1999). La seva translocació al nucli es troba determinada per la presència del NLS anteriorment descrit. Al pèsol, diferents formes estructurals de la CK2 han estat aïllades (Zhang, 1993). L'holoenzim de CK2 del citoplasma presenta estructura heterodimèrica, $\alpha\alpha'\beta_2$, mentre que al nucli és homodimèrica, $\alpha_2\beta_2$. Al bròquil, la CK2 citoplasmàtica és majoritàriament monomèrica, composta únicament per subunitat α , mentre que al nucli la forma majoritària seria l'oligomèrica, $\alpha_2\beta_2$ (Klimczak, 1994).

2. SUBSTRATS DE LA PROTEÏNA QUINASA CK2

La CK2 fosforila residus de Serina i Treonina en seqüències de caràcter acídic presents en pèptids i proteïnes. La mínima seqüència consens de fosforilació per CK2 és S/TXXD/E, on X són residus no bàsics. El residu àcid situat 3 posicions a la dreta de la Ser o Thr fosforilables pot ser substituït per una fosfoserina, una fosfotreonina o una fosfotirosina, com a resultat de la fosforilació del substrat per altres proteïna quinases (Roach, 1991).

Més de 160 proteïnes han estat descrites com a substrats de la CK2 i el seu nombre segueix augmentant (per a una revisió, consultar Blanquet, 2000; Pinna, 1997). Aquests substrats poden classificar-se a grans trets en enzims que controlen la síntesis de DNA i RNA, en factors de transcripció i de traducció, en proteïnes implicades en el creixement cel.lular, la proliferació i la diferenciació i en proteïnes implicades en rutes de transducció de senyals. Només en alguns cassos es coneix l'efecte fisiològic que provoca la fosforilació per la CK2. Per exemple, se sap que la fosforilació d'alguns factors de transcripció, com el productes del protooncògens c-Jun i c-Myb, afecta la seva translocació al nucli i inhibeix la unió a seqüències específiques de DNA (Lin, 1992; Lüscher, 1990).

Per altra banda, existeixen diverses proteïnes que interaccionen amb la subunitat β . Entre elles s'hi inclouen la A-Raf, la proteïna ribosomal L5, la Nopp140, la cadena pesada de la ferritina, la catepsina C, la HSP70, la calmodulina, la p53 i la Raf-1 (Pinna, 1997). En la majoria de cassos no es coneix quin efecte produeix la unió d'aquestes proteïnes, però es creu que poden afectar les propietats reguladores de la subunitat β i, per tant, alterar l'activitat catalítica de l'enzim.

Un altre substrat de la CK2, la proteïna fosfatasa PP2A, interacciona i és fosforilada únicament per la forma monomèrica de la CK2, constituïda per subunitat α lliure de subunitat β . A més, s'ha demostrat que la presència de subunitat β impedeix la unió de la fosfatasa i, per tant, la seva fosforilació (Hériché, 1997).

A les plantes, la CK2 fosforila factors de transcripció implicats en la regulació de l'expressió de gens regulats per la llum, com el GBF1 (Klimczak, 1992), l'AT-1 (Roux, 1993) i el factor Opaque 2 (Ciceri, 1997). També fosforila proteïnes implicades en la regulació dels ritmes circadians, com la CCA1 (Sugano, 1999). Al blat moro, CK2 fosforila la proteïna RAB-17, induïble per àcid absíctic i per condicions d'estrés hídric (Plana, 1991).

A continuació es llisten alguns dels substrats més importants de la CK2. Per a un llistat complet, es pot consultar la revisió de Pinna i col., 1997.

Proteïnes implicades en la síntesi de DNA i RNA

DNA lligasa
DNA repair helicasa
DNA topoisomerasa I i II
PolyA polimerasa
RNA polimerasa I, II i III

Proteïnes implicades en transducció de senyal i en síntesi proteica

Acetyl-CoA-carboxilasa	p53
c-abl	p65 vesícules sinàptiques
calmodulina	PKA (subunitat R2)
calnexina	PKC
calsequestrina	PP2A
CDC37	PP2C
DARPP-32	Proteosoma
Dynamin 1	Prot ribosomal L5
EF-1	PTP1B
eIF-2, -3, -5	PTP1
Furina	RAB-17
GAP-43	Receptor canal Ca
Glicogen sintasa	Receptor IGF-2
grp94/endoplasmina	Receptor d'insulina
HASPP28	Receptor lipoproteïna LD
HSP90	Receptor Man 6-P
Inhibidor fosfatasa 2	Receptor Vit D
IRS-1	Stathmin
Ornitina descarboxilasa	Synaptotagmin
p34cdc2	

Proteïnes víriques

gp120, p41 del HIV
p51, p66 del HIV
p24, p17 del HIV
Prot Vpu
Rev del HIV

Factors de transcripció i proteïnes associades

AT-1	IkB α
BTF3	IkB β
c-Erb A	IRF-1
c-Fos	Max
c-Jun	mUBF
c-Myb	Sp1
c-Myc	SRF
Cut protein	Tan-1
CREB	TF3B
GBF-1	

Proteïnes del citoesquelet

Clatrina
Espectrina
Fibrinogen
MAP-1A, MAP-B
Miosina
Tau
Troponina-T
Tubulina
Vitronectina

Altres proteïnes nuclears i nucleolars

NAP 57
Nopp 140
Nucleolina
Nucleoplasmina
p85s6k
Prot HMG
Prot matriu nuclear
Prot nucleolar B23

Altres proteïnes vegetals

CCA1
RAB17

3. INHIBIDORS DE L'ACTIVITAT CK2 IN VITRO

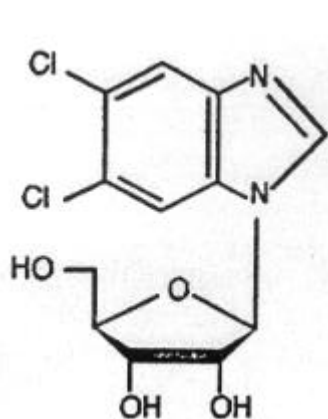
Els compostos inhibidors de l'activitat CK2 poden classificar-se en tres categories: els inhibidors alostèrics, els anàlegs de substrats acceptors de fosfat i els anàlegs de substrats donadors de fosfat. Dins el primer grup s'hi inclouen compostos de naturalesa polianiónica, com l'heparina i el 2,3-difosfoglicerat (Hathaway, 1984). El segon grup inclou pèptids sintètics rics en àcid glutàmic i tirosina, per exemple, el pèptid EEEEEYEEEEEEE (Sarno, 1999). El tercer grup inclou compostos sintètics, tals com el DRB i els seus derivats (Shugar, 1994).

L'heparina és l'inhibidor utilitzat de forma rutinària en les reaccions *in vitro* d'activitat CK2. El valor de I_{50} per a l'heparina és de l'ordre de 10^{-9} M i pel 2,3-difosfoglicerat és 10^{-3} M.

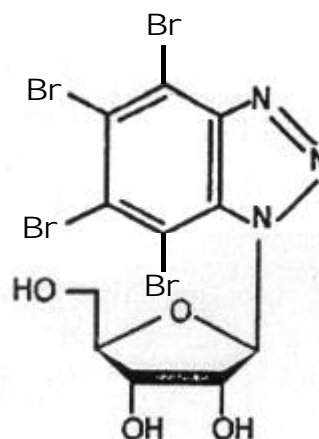
El mode d'acció dels compostos anàlegs a l'acceptor de fosfat, és generalment per competició amb el substrat, i són efectius i selectius per a la CK2 a concentracions molt baixes, de l'ordre de 10^{-8} M. El caràcter inhibidor d'aquests pèptids és consistent amb el fet que les Tirosines poden unir-se però no són fosforilades per la CK2, excepte en circumstàncies molt concretes. S'ha descrit que en la immunofilina nucleolar Fpr3 de *Saccharomyces cerevisiae*, la prèvia fosforilació d'una Serina en posició +2 respecte d'una Tirosina, fa possible la seva fosforilació, encara que a una K_m molt alta (Wilson, 1997).

L'habilitat de la CK2 d'utilitzar tant GTP com ATP com a donadors de fosfat, a diferència de la resta de proteïna quinases, s'ha utilitzat com un avantatge per al disseny d'inhibidors específics anàlegs al donador de fosfat. De fet, la CK2 és insensible a l'estaurosporina, un inhibidor d'ampli espectre de proteïna quinases, la qual cosa implica que el seti d'unió de l'ATP a la CK2 té característiques especials que poden ser aprofitades per a dissenyar inhibidors específics (Meggio, 1995). Entre aquests inhibidors, s'hi troben els derivats halogenats del benzimidazol i el benzotriazol, el més conegut dels quals és el 5,6-dicloro-1-(β -D-ribofuranosil)-benzimidazol o DRB, amb valors de K_i per a CK1 i CK2 de 20-30 μ M i que, per tant, presenta l'inconvenient de no poder discriminar entre les dues caseïna quinases (Shugar, 1994). S'ha vist que és possible augmentar l'especificitat i sensibilitat dels derivats benzimidazol per a la CK2, augmentant la talla (brom en preferència al clor) i el nombre de substituents halogenats. Així, el derivat 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazol, que s'ha utilitzat en aquesta tesi per a estudiar els efectes de la inhibició de la CK2 en el cicle cel·lular de les plantes, presenta una K_i de 0.5 μ M per la CK2 de llevat i de 100 μ M per a la

CK1, mentre que altres quinases com la PKA i la PKC no es veuen afectades. L'estructura del DRB i del seu derivat tetrabromo es mostren a la Fig 5.



DRB



4,5,6,7-tetrabromobenzotriazol

Fig 5: Estructura química dels inhibidors de CK2 5,6-dicloro-1-(b-D-ribofuranosil)-benzimidazol (DRB) i del 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazol.

4. CK2 I PROLIFERACIÓ CEL·LULAR

Hi ha contrastades evidències que suggereixen que la CK2 es troba implicada en els processos que controlen la divisió i diferenciació cel·lulars dels sistemes vius. Un important nombre de substrats de la CK2 són proteïnes relacionades amb la divisió cel·lular i el creixement, com per exemple, la p34^{cdc2}, la p53, oncògens i enzims de la transcripció (Meisner, 1991). A més, l'activitat CK2 és elevada en cèl·lules en divisió ràpida i en teixits tumorals (Issinger, 1993). També s'observa un augment de l'activitat CK2 en resposta a l'estimulació cel·lular amb sèrum (Carroll, 1989), i en resposta a compostos mitogènics, malgrat que aquests efectes són difícils de reproduir experimentalment (Litchfield, 1994).

Dades genètiques demostren que la CK2 és essencial per a la viabilitat cel·lular de *Saccharomyces cerevisiae*, ja que la disrupció dels dos gens de la subunitat CK2 α és letal (Padmanabha, 1990). Els autors relacionen la CK2 amb el control del cicle cel·lular, en observar que les cèl·lules augmenten considerablement de llargada i volum, tot i que han deixat de dividir-se, la qual cosa suggereix que el metabolisme i el creixement continuen encara durant un temps indeterminat. A més, una proporció important de cèl·lules arrestades presenten una morfologia que recorda el fenotip d'alguns mutants del cicle cel·lular dels llevats.

La relació filogenètica entre la CK2 i les CDKs és un altre aspecte destacable en aquest punt. Ambdues proteïnes pertanyen a la família de proteïna quinases CMCG, juntament amb les MAP quinases i la glicogen sintasa 3. A més, en cèl·lules HeLa, la CK2 és capaç de fosforilar la Ser³⁹ de la p34^{cdc2} durant la fase G1 del cicle cel·lular (Russo, 1992), mentre que en cèl·lules de carcinoma epidèrmic humà, la p34^{cdc2} fosforila tant la CK2 α (4 Ser/Thr fosforilades a l'extrem C-terminal), com la CK2 β (Ser²⁰⁹) durant la mitosi (Litchfield, 1992). Aquestes dades suggereixen una probable relació funcional entre les dues proteïnes que s'afegiria a la ja coneguda relació filogenètica.

També s'ha descrit que la microinjecció de CK2 a oòcits de *Xenopus* accelera la maduració meiótica, la qual és induïda pel factor promotor de la maduració (MPF) (Mulner-Lorillon, 1990). En fibroblasts primaris humans, la inhibició *in vivo* de la CK2 mitjançant la microinjecció d'oligonucleòtids i d'anticossos contra la subunitat CK2 β , té diferents efectes segons si aquests han estat dirigits al citoplasma o al nucli de les cèl·lules. En resposta a l'estimulació de les cèl·lules amb sèrum, la CK2 és necessària al citoplasma per a la

transició G0/G1 i G1/S, i al nucli per a la transició G0/G1 i per a la progressió al llarg de G1 (Pepperkok, 1994). Aquests resultats es confirmen en cèl.lules HeLa, on l'activitat CK2 és alta a la fase G1 i disminueix progressivament fins a anul.lar-se a G2/M (Marshak, 1994). Aquests treballs introdueixen un punt de controvèrsia en relació a altres resultats obtinguts en mamífers. En fibroblasts primaris humans, no s'observen fluctuacions de l'activitat enzimàtica durant el cicle cel.lular (Bosc, 1999), però, en canvi, es detecten canvis en la relació de concentracions de les dues subunitats, ja que en l'estadi quiescent la CK2 α excedeix en 10 vegades la concentració de CK2 β , mentre que durant el cicle cel.lular aquesta relació és aproximadament equimolar (Schmidt-Spaniol, 1993).

Com s'ha comentat anteriorment, la subunitat CK2 β estabilitza la CK2, estimula l'activitat enzimàtica i determina l'especificitat de substrat. En cèl.lules limfoides en creixement exponencial, la subunitat CK2 β se sintetitza en excés respecte la subunitat CK2 α . Una fracció important d'ella és degradada durant la primera hora després de la síntesi, mentre que la resta es complexa amb les subunitats α i/o α' per a formar l'holoenzim (Lüscher, 1994).

En llevats, en soques mutants per a la CK2 α sensibles a temperatura, l'aplicació de la temperatura restrictiva provoca un arrest a la fase G1 i a la transició G2/M (Hanna, 1995). Els resultats sobre la relació de la CK2 amb el cicle cel.lular de les plantes es presenten en aquesta tesi i, per tant, seran exposats en el capítol corresponent.

5. LA CK2 DELS SISTEMES VEGETALS

Les propietats bioquímiques i estructurals que presenten les CK2 de plantes permeten deduir, com a mínim, dues característiques destacables que les diferenciarien de les seves homòlogues d'animals i llevat.

En primer lloc, l'existència de formes monomèriques, compostes únicament per subunitat catalítica, CK2 α (Mr 40 KDa), ha estat descrita en el blat de moro (Dobrowolska, 1992), el bròquil (Klimczak, 1994) i *Arabidopsis thaliana* (Espunya, 1997). Aquestes formes coexisteixen amb la forma tetramèrica clàssica $\alpha_2\beta_2$. Les dues isoformes presenten un comportament cromatogràfic prou diferent que permet la seva separació, purificació i caracterització bioquímica. En canvi, a altres espècies vegetals, com a *Marchantia polymorfa* (Kanekatsu, 1993), al pèsol (Zhang, 1993) i al blat (Yan, 1982), s'han aïllat únicament formes tetramèriques. En tots els cassos, les diferents isoformes purificades compleixen els requeriments bioquímics bàsics de la CK2: utilització de caseïna com a substrat *in vitro*, dualitat GTP/ATP en l'ús de nucleòtid i inhibició de l'activitat enzimàtica a baixes concentracions d'heparina.

La segona característica, exclusiva de les CK2 de plantes, és l'existència d'un extrem N-terminal molt llarg (aproximadament 80 aminoàcids) a les subunitats β , situat per davant de la corresponent Metionina¹ de la resta d'espècies. Aquesta extensió fa que la massa molecular de les CK2 β de plantes sigui significativament superior, uns 30 KDa versus 24-26 KDa. No es coneix el sentit evolutiu ni funcional que això pot significar.

També és característic de les plantes, si bé no exclusiu, l'heterogeneïtat de la subunitat CK2 β . De fet, la subunitat CK2 β de llevat i, recentment, s'ha descrit que també la de *Drosophila*, està codificada per dos gens. En plantes, existeixen quatre gens diferents per a la CK2 β d'*Arabidopsis* (Collinge, 1994; Sugano, 1998; Rounsley, 1998), tres per a *Zea mays* (Riera, 2001), i en aquesta tesi es presenta la seqüència de tres clons parcials per a la CK2 β de tabac.

Respecte a la subunitat CK2 α , se n'han aïllat tres gens al blat de moro (Dobrowolska, 1991; Peracchia, 1999; Riera, 2001), dos a *Arabidopsis* (Mizoguchi, 1993) i en aquesta tesi es presenta la seqüència de dos cDNAs per a la CK2 α de tabac. És lògic especular que puguin existir *in vivo* múltiples isoenzims, tan monomèrics com oligomèrics, fruit de les

diferents combinacions possibles entre els productes gènics per a les dues subunitats, l'expressió dels quals pogués estar relacionada amb una especialització funcional en els diferents teixits i/o tipus cel·lulars de les plantes.

En recolzament d'aquesta hipòtesi, s'ha vist que les tres subunitats β del blat de moro s'expressen seqüencialment durant el desenvolupament embrionari: mentre que la proteïna CK2 β -3 s'expressaria a l'inici del desenvolupament, CK2 β -2 ho faria en estadis intermitjos i CK2 β -1 en estadis més tardans (Riera, 2001). En planta adulta, els diferents gens no s'expressen per igual a tots els teixits vegetals. A *Arabidopsis*, els dos gens corresponents a la subunitat CK2 α , ATCKA1 i ATCKA2 s'expressen a la fulla, la flor i l'arrel amb aproximadament igual intensitat, però ATCKA2 s'expressa també a la tija (Mizoguchi, 1993). Quant a la subunitat CK2 β , el gen CKB1 s'expressa a nivells similars en rosetes i arrels, mentre que la CKB2 s'expressa més a les rosetes (Collinge, 1994). No s'ha estudiat el perfil d'expressió dels gens CKB3 i CKB4 d'*Arabidopsis*.

Funcionalment, la CK2 de les plantes s'ha relacionat amb la regulació de la transcripció de gens induïts per llum. En diversos treballs s'ha estudiat el significat fisiològic que poden tenir les reaccions de fosforilació/defosforilació en les rutes de transducció de senyal desencadenades pels estímuls lumínics. El factor GBF1 d'*Arabidopsis*, que s'uneix a la seqüència G-box del promotor de gens induïts per la llum, és fosforilat *in vitro* per la CK2 oligomèrica de bròquil, estimulant-se d'aquesta manera la seva unió al DNA (Klimczak, 1992). El mateix resultat es va obtenir quan el factor GBF1 era fosforilat per la proteïna oligomèrica recombinant d'*Arabidopsis* (Klimczak, 1995).

També al bròquil, s'ha vist que el grup de proteïnes d'alta mobilitat (HMG-proteïnes, subgrup d), que són components estructurals de la cromatina eucariota, co-purifiquen i són fosforilades per la CK2 amb una eficiència molt alta, fins i tot en presència de substrats exògens. Les proteïnes HMG poden unir-se a regions AT de promotors de gens induïts per la llum, sense que la fosforilació per CK2 afecti la seva afinitat al DNA (Klimczak, 1994).

Un estudi més recent descriu que la subunitat CKB3 d'*Arabidopsis* interacciona, tant *in vitro* com *in vivo*, amb la proteïna associada al rellotge circadià CCA1, que actua com a factor de transcripció (Myb-like) regulant l'expressió del gen Lhcb*3 del fotosistema II (Sugano, 1998). La transcripció de CCA1 i de LHcb*3 segueix ritmes circadians, i augmenta en

resposta a la llum. La interacció de CCA1 amb CKB3 estimula la seva unió al promotor del gen *Lhcb*3*. A més, les proteïnes oligomèriques recombinants, $CKA1_2CKB3_2$ i $CKA1_2CKB1_2$ són capaces de fosforilar CCA1 *in vitro*, la qual cosa suggereix que la CK2 pot intervenir en la regulació de CCA1 a nivell postranscripcional. La sobreexpressió del gen CKB3 en aquest mateix sistema ha demostrat la implicació de la CK2 en la regulació dels ritmes circadians. A més de provocar un augment de l'activitat CK2, la sobreexpressió de CKB3 avança les oscil·lacions circadianes de l'expressió de CCA1 i de LHY, aquesta última implicada en l'elongació de l'hipocotil. El procés de la floració en resposta al fotoperíode també sofreix variacions, ja que les plantes transformants floreixen abans que les silvestres, independentment d'haver estat sotmeses a un fotoperíode curt o llarg. (Sugano, 1999).

La sotaexpressió dels gens de la $CK2\alpha$ a *Arabidopsis*, assolida mitjançant la transformació amb la corresponent construcció antisentit, provoca una disminució de la mida de les fulles, mentre que la resta d'òrgans de la planta no es veuen afectats (Lee, 1999). Tanmateix, en els transformants s'observa una alteració de l'expressió de tres gens induïts per la llum, els gens *cab*, *chs* i *rbcS*. L'expressió dels tres gens augmenta en presència de llum vermella, tant en les plantes silvestres com en les transformades. No obstant, els transformants mostren una major expressió del gen *chs* a la foscor, i una major expressió dels gens *cab* i *rbcS* després d'il·luminar-los amb llum vermella. En canvi, l'expressió de *chs* després del tractament amb llum vermella és la mateixa en les plantes silvestres i en les transformades. Aquestes dades suggereixen que la CK2 podria actuar regulant l'expressió d'aquests tres gens, a través d'un mecanisme pel qual, la fosforilació de factors de transcripció, com el GBF1 i l'AT-1, alteraria la seva unió a seqüències específiques, la G-box o l'AT1-box, presents als promotors d'aquests gens.

6. LES POLIAMINES

6.1. Les poliamines a les plantes

Les poliamines són compostos essencials per al creixement i la diferenciació a tots els organismes (per a una revisió, consultar Walden, 1997). Les poliamines més importants a nivell fisiològic són la putrescina, l'espermidina i l'espermina, essent la putrescina precursora de les altres dues. A les plantes, la biosíntesi de putrescina té lloc a través de dues rutes alternatives: directament des de l'ornitina per acció de l'ornitina descarboxilasa (ODC), o indirectament des de l'arginina per acció de l'arginina descarboxilasa (ADC), a través de l'intermediari agmatina. L'ODC és el primer enzim de la ruta de biosíntesi de poliamines, i el punt de regulació més important. A més, l'activitat enzimàtica de la S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC) és responsable de proveir grups aminopropil per a la síntesi d'espermidina i espermina, per acció de l'espermidina i espermina sintases, respectivament. La S-adenosilmetionina (SAM) és alhora un precursor de la biosíntesi d'etilè i de poliamines, de manera que es considera clau en la regulació de les dues rutes perquè pot decantar l'equilibri cap a la biosíntesi d'un o l'altre tipus de compost, en funció de les necessitats fisiològiques (Pandey, 2000; Andersen, 1998).

Es disposa des de fa anys d'inhibidors que perturben la síntesi de les poliamines a les plantes, com la difluorometilornitina (DFMO) i la difluorometilarginina (DFMA) que són inhibidors irreversibles de l'ODC i l'ADC, respectivament. A més, el metilglixal-bis(guanilhidrazona) (MGBG) és inhibidor de la SAMDC. A la Fig 6 es mostra un esquema de la biosíntesi de les poliamines biògenes a les plantes.

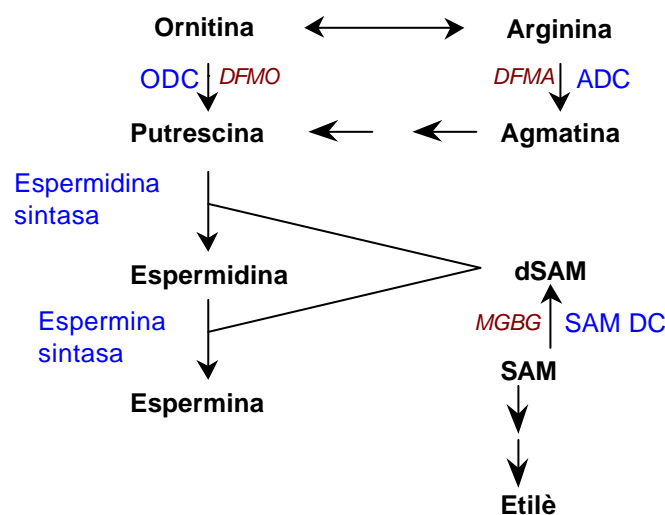


Fig 6 (pàgina anterior): Biosíntesi de les poliamines putrescina, espermidina i espermina a les plantes. En color blau s'han indicat els enzims que catalitzen les rutes i, en vermell, els inhibidors enzimàtics. ADC, arginina descarboxilasa; ODC, ornitina descarboxilasa; SAMDC, S-adenosilmetionina descarboxilasa; dSAM, S-adenosilmetionina descarboxilada; SAM, S-adenosilmetionina; DFMA, difluorometilarginina; DFMO, difluorometilornitina; MGBG, metilglioxal-bis(guanilhidrazona). Adaptat de Walden, 1997.

Les poliamines són presents a totes les cèl·lules vegetals, en forma lliure o formant conjugats amb l'àcid hidroxicinnàmic, els quals poden arribar a representar el 90% del contingut total de poliamines. Nombrosos estudis han demostrat que les poliamines lliures, intervenen en diferents processos biològics, tals com l'embriogènesi somàtica, la regulació del creixement en resposta a la inducció per la llum, l'organogènesi, el desenvolupament del fruit, la formació del pol·len, el desenvolupament floral, la senescència i la resposta a diferents tipus d'estrés físic i biològic (Evans, 1989; Walden, 1997). No obstant, la implicació de les poliamines en tots aquests processos s'ha demostrat en base a la variació dels nivells de poliamines lliures, i inhibint-ne la biosíntesi *in vivo*. Per aquest motiu, alguns autors es qüestionen si les variacions dels nivells de poliamines estan directa i indirectament implicats en aquests processos, és a dir, si poden considerar-se responsables o si són simplement una conseqüència d'aquests efectes (Bastola, 1995).

6.2. Poliamines i CK2

Es coneix des de fa molts anys el caràcter estimulador de les poliamines sobre l'activitat enzimàtica de la CK2 (Cochet, 1981; Hathaway, 1984). Estudis *in vitro* han demostrat que les poliamines es comporten com activadors alostèrics de la CK2. L'estimulació per poliamines depèn estrictament de la presència de la subunitat CK2 β i es creu que actuen de forma sinèrgica amb el Mg²⁺ fisiològic per a conferir la màxima activitat catalítica a la CK2 (Leroy, 1997). L'espermina és la poliamina que exerceix un paper activador més acusat, seguida de l'espermidina i per últim de la putrescina. A més, l'espermina és la poliamina més abundant als sistemes vius.

S'ha identificat un motiu d'unió a poliamines a la seqüència de la subunitat CK2 β , constituït per residus de caràcter àcid (entre Aspàrtic⁵¹ i Tirosina⁸⁰), i que implica principalment els

residus de Glutàmic^{60, 61, 63} (Leroy, 1997). Aquesta regió àcida està també implicada en la interacció electrostàtica amb la regió bàsica de la subunitat CK α , coneguda com a motiu ric en Lisines. Aquestes dues coincidències han suggerit la hipòtesi segons la qual, les poliamines i la regió bàsica de la subunitat α podrien competir per a la interacció amb la regió àcida de la subunitat β . En presència d'altres concentracions de poliamines, la seva unió a la subunitat β provocaria un canvi conformacional de l'holoenzim, de manera que el centre actiu de la subunitat α , que inclou el motiu ric en Lisines, quedaria accessible per a unir els substrats d'una manera més eficaç, la qual cosa derivaria, en últim terme, en un augment de l'activitat enzimàtica (Leroy, 1997). L'espermina exerceix també un efecte estabilitzador de l'estructura supramolecular de la CK2 en forma d'anell compost per quatre molècules de l'holoenzim (Valero, 1995).

Per altra banda, s'especula que podria existir una relació funcional entre les poliamines i la CK2. L'expressió de l'ODC, l'enzim clau en la biosíntesi de les poliamines, és baixa en teixits sans, mentre que en condicions tumorals i en cèl.lules amb activitat mitòtica alta, augmenten tant la seva expressió com l'activitat enzimàtica, tal i com també s'ha observat per a la CK2 (Shore, 1997).

En un dels pocs estudis realitzats *in vivo*, la sobreexpressió de l'ODC provoca un augment de la concentració de poliamines, a la vegada que s'observa una estimulació important de l'activitat CK2 i la translocació de les dues subunitats de la quinasa des del citoplasma cap al nucli (Shore, 1997). En presència de l'inhibidor específic de l'ODC, el DFMO, es redueixen tant la concentració de poliamines intracel.lulars com l'activitat CK2.

L'ODC ha estat descrita com un substrat fisiològic de la CK2 (Reddy, 1996). L'ODC presenta una seqüència consens de fosforilació per CK2 i és fosforilada *in vitro* a la Ser³⁰³ a una Km similar a la calculada per altres substrats cel.lulars. No obstant, la fosforilació per CK2 no té cap efecte sobre l'activitat de l'ODC. Curiosament, l'ODC pot ser fosforilada per altres quinases que no han estat identificades, fosforilació que resulta en un augment de l'eficiència catalítica i de l'estabilitat de l'enzim, el qual esdevé menys susceptible a la proteòlisi intracel.lular.

En conjunt, aquests treballs suggereixen que les poliamines regulen la CK2 en un triple sentit: estimulant-ne l'activitat enzimàtica, determinant-ne la seva localització subcel.lular i estabilitzant l'holotetràmer actiu.

7. EL CICLE CEL·LULAR DE LES PLANTES

7.1. Generalitats. Regulació del cicle cel·lular a les plantes

Es defineix com cicle de divisió cel·lular el període comprès entre dues divisions cel·lulars, i engloba el conjunt de processos que permeten de forma seqüencial i controlada la replicació del genoma i la segregació dels cromosomes en dos nuclis germans, que es completa amb la citoquinesi.

El cicle cel·lular es divideix fonamentalment en 2 parts, la interfase i la mitosi. Durant la interfase, el DNA es distribueix de forma difusa dins el nucli de les cèl·lules i la cromatina es troba descondensada. S'hi duen a terme els processos necessaris per a la síntesi de la maquinària cel·lular. Seqüencialment, la interfase comprèn el *gap* G1, la fase S i el *gap* G2. La fase o *gap* G1 suposa l'entrada al cicle cel·lular des d'un estadi de diferenciació o des d'una divisió completada amb anterioritat, i implica la preparació de la cèl·lula per a la divisió. Durant la fase S té lloc la replicació del DNA, la qual finalitza amb la fase G2 on té lloc la reorganització dels microtúbuls. En la mitosi es duu a terme la segregació del cromosomes i la partició en les dues cèl·lules filles.

Existeixen al llarg del cicle cel·lular dos punts de control coneguts amb el nom de *checkpoints*, que tenen la funció d'aturar el cicle cel·lular en cas de detectar alguna anomalia. El *checkpoint* G1/S, que rep el nom de *restriction point* en els animals i de *START* en els llevats, assegura que la maquinària cel·lular està a punt per a la replicació del genoma, que tindrà lloc durant la fase S. El *checkpoint* G2/M s'encarrega de comprovar que el DNA s'ha replicat correctament i que no ha sofert danys durant el procés.

Les plantes, a diferència de la resta d'organismes eucariotes, mostren perfils de desenvolupament i de morfogènesi determinats per divisions cel·lulars post-embrionals, les quals tenen lloc principalment en regions especialitzades, anomenades meristems. A més, en resposta a diferents estímuls externs o interns, la majoria de cèl·lules vegetals diferenciades retenen la capacitat de desdiferenciar-se, per a reestablir la divisió cel·lular i, fins i tot, generar una planta completa. Aquesta gran plasticitat del programa de desenvolupament dels organismes vegetals, conegut també com a totipotencialitat, respon a factors mediambientals que han estat probablement establerts al llarg de l'evolució, amb

l'objectiu de compensar la immobilitat que els impedeix escapar de les condicions adverses.

El cicle cel.lular de les plantes, representat esquemàticament a la Fig 7, presenta la característica de permetre que les cèl.lules surtin del cicle i es diferenciïn, en dos punts, en G1 i en G2.

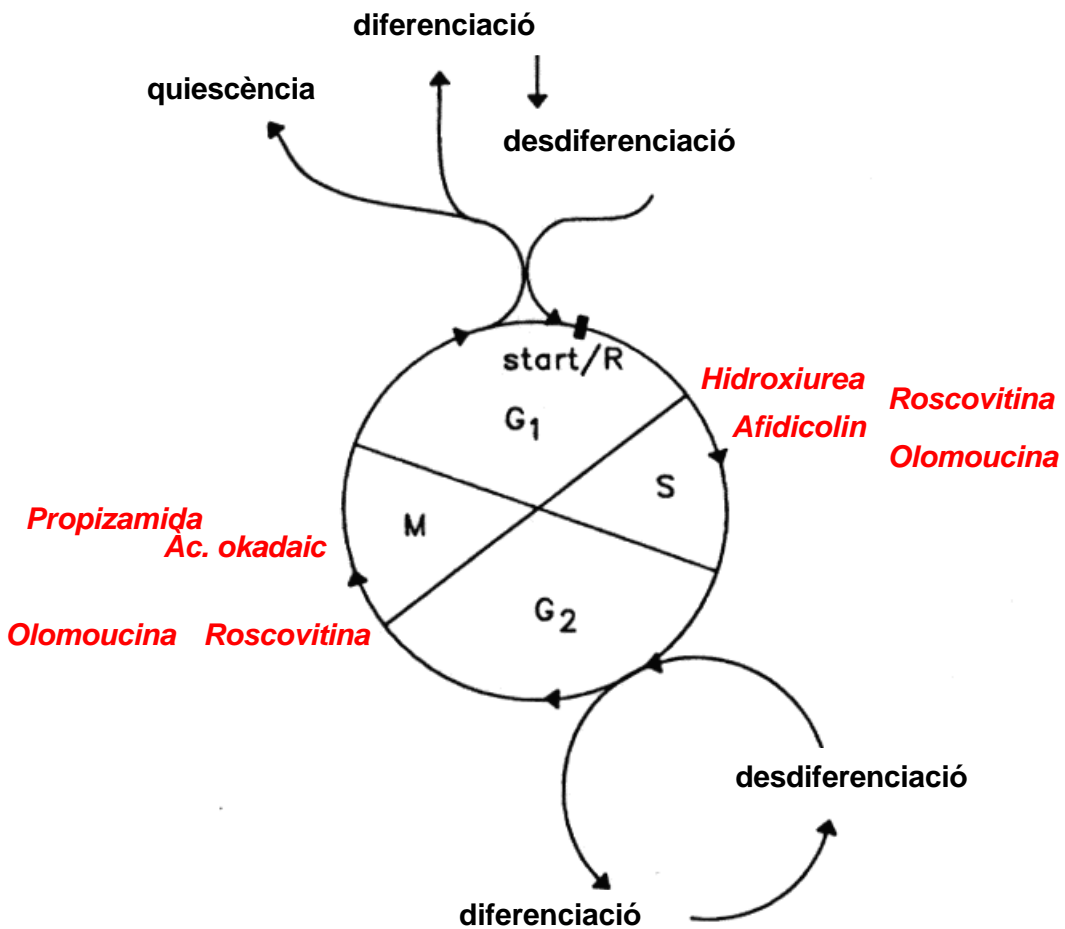


Fig 7: Representació esquemàtica del cicle cel.lular de les plantes. En vermell s'han indicat els compostos químics que s'utilitzen experimentalment per al bloqueig del cicle en una fase concreta, i que es descriuen al punt 7.2.

Molts elements reguladors del cicle cel.lular han estat conservats evolutivament arreu dels organismes eucariotes. Entre les proteïnes reguladores del cicle cel.lular a les plantes, clonades fins el moment, les més destacades són les següents:

- Les histones.

Representen el grup més abundant de les proteïnes implicades en l'organització de la cromatina per a la formació dels nucleosomes després de la replicació. S'agrupen en 5 classes, H1, H2A, H2B, H3 i H4, codificades per famílies multigèniques. La seva expressió és concomitant a la replicació del DNA, per tant, s'inicia a la transició G1/S i és màxima a la fase S (Reichheld, 1995).

- Les quinases de dependents de ciclina (CDKs).

Les CDKs són un grup de Ser/Thr quinases heterodimèriques, formades per una subunitat catalítica, la quinasa de dependents de ciclina (CDK), codificada pel gen *cdc2*, i una subunitat activadora, la ciclina, imprescindible per a què la subunitat catalítica sigui fisiològicament activa (Mironov, 1999). En els sistemes vegetals on s'ha estudiat, existeixen diferents classes de ciclins (per exemple, a *Arabidopsis* se n'han identificat 15), agrupades en els subtipus A, B i D, que presenten diferents patrons d'expressió al llarg de les fases del cicle cel.lular, així com variable localització subcel.lular (Renaudin, 1996). Així, a les plantes, les ciclins A s'expressen en fase S i G2/M, les ciclins B en G2 i M, i les ciclins D en G1.

- Les ribonucleòtids reductases (RNR).

Catalitzen la síntesi dels dNTPs que seran incorporats al DNA durant la replicació. La seva expressió és màxima a l'inici de la fase S i la inducció de la seva expressió és anterior a l'expressió de les histones (Chabouté, 1998).

- La DNA polimerasa α .

Es troba implicada en la iniciació de la replicació del DNA a través de la síntesi dels fragments d'Okasaki. La seva expressió és màxima a G1/S (Ito, 1998).

- L'antigen nuclear de proliferació nuclear o *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA).

El PCNA és un cofactor de la DNA polimerasa δ , implicat en l'elongació de les cadenes de DNA durant la replicació. La seva expressió s'inicia a G1/S i és màxima a la fase S (Kodama, 1991).

- El retinoblastoma.

El retinoblastoma és una proteïna supressora de tumors que controla l'entrada a la divisió cel.lular. En la seva forma hipofosforilada, es troba unit a factors de transcripció (E2F-type) impedit l'expressió de gens específics de fase S. El retinoblastoma fosforilat és incapaç de formar complexos amb els factors de transcripció E2F, de manera que una vegada lliures poden activar la fase S. La proteïna quinasa que fosforila el retinoblastoma és la CDK complexada amb la ciclina D. Les ciclines D, clonades de plantes, contenen una seqüència consens d'unió a retinoblastoma, el motiu LXCXE (Soni, 1995).

- Les proteïna quinases activades per mitògens o *mitogen activated protein kinases* (MAPKs).

Les MAPKs comprenen una família de Ser/Thr quinases que s'activen en resposta a estímuls mitogènics. Són actives durant la mitosi, on fosforilen proteïnes associades als microtúbuls (Ito, 1998).

- La topoisomerasa II.

És un enzim implicat en la topologia del DNA i és essencial per la condensació de la cromatina, la formació dels cromosomes en la metafase i la separació de les cromàtides germanes durant l'anafase. La seva expressió és màxima a G2/M (Ito, 1998).

Com s'ha comentat anteriorment, la CK2 ha estat comparada amb les CDKs, tant en l'aspecte funcional com estructural. Ambdues pertanyen a la mateixa família de Ser/Thr quinases, les CMCG quinases, i la seva activitat es troba condicionada per la presència d'una subunitat reguladora, la CK2 β i la ciclina, respectivament. La seqüència polipeptídica de les ciclines conté un motiu consens per a la ubiquïtinació, la caixa de destrucció de ciclins o *cyclin box*, que determina la seva degradació proteolítica al proteosoma. Malgrat que no s'ha demostrat a nivell experimental que la subunitat CK2 β pugui ser degradada per un mecanisme similar al de les ciclines, el cert és que conté en la seva seqüència els aminoàcids fonamentals per a complir el consens de la *cyclin box*.

7.2. Utilització de línies cel.lulars de plantes en l'estudi del cicle cel.lular: la sincronització cel.lular.

En l'estudi de processos biològics complexos, com la proliferació cel.lular, calen sistemes experimentals que permetin l'observació de les reaccions aparegudes en resposta a l'aplicació d'estímuls físico-químics externs. Per a la correcta interpretació d'aquestes respostes, és imprescindible l'acompliment de dos requisits: en primer lloc, que el sistema experimental romangui aïllat de qualsevol factor extern que pogués alterar el seu comportament més enllà de l'estímul i, en segon lloc, que la població de cèl.lules diana sigui el màxim d'homogènia possible, per tal d'eliminar possibles respostes condicionades per les característiques pròpies de cada tipus cel.lular.

Per a l'estudi del cicle cel.lular de les plantes és necessari poder identificar i situar en el temps el processos bioquímics i moleculars que hi tenen lloc. Davant la inviabilitat d'utilitzar organismes vegetals enters, és convenient la utilització de cultius cel.lulars sincronitzables. Els mètodes de sincronització més eficaços es basen en el bloqueig del cicle cel.lular en una fase concreta del cicle, aconseguida mitjançant la incubació de la suspensió cel.lular amb diversos compostos químics o drogues, que inhibeixen etapes claus per a la regulació del cicle cel.lular. La incubació d'una suspensió cel.lular amb una d'aquestes drogues, resulta en una acumulació de cèl.lules en l'etapa del cicle, anterior al punt de bloqueig. Una vegada eliminada la droga del medi, i atès que el seu efecte és reversible, les cèl.lules reemprenen la divisió, però ara d'una manera sincronitzada.

Les drogues més freqüentment utilitzades en els sistemes vegetals, per la seva eficàcia en proporcionar percentatges de sincronització més alts, poden agrupar-se en:

- compostos que bloquegen enzims específics de la fase S del cicle i etapes properes (G1/S, inici de fase S, S tardana):
 - (i) afidicolin, que inhibeix la DNA polimerasa α (Ikegami, 1978).
 - (ii) hidroxidurea, que inhibeix la ribonucleòtid reductasa (Slater, 1973).
- compostos que bloquegen enzims que actuen durant la mitosi, implicats en la polimerització dels microtúbuls, i que causen el seu efecte entre la profase i la metafase:

- (i) àcid okadaic (Hasezawa, 1992).
 - (ii) propizamida (Nagata, 1992).
- compostos que bloquegen l'activitat dels complexos CDK-ciclina, implicats alhora en els checkpoints G1/S i G2/M:
 - (i) olomoucina (Glab, 1994).
 - (ii) roscovitina (Planchais, 1997).

La sincronia de la suspensió cel·lular s'evalua mesurant dos paràmetres: 1) la incorporació de timidina tritiada al DNA, amb la qual cosa s'obté una mesura de la replicació del DNA i, per tant, de cèl·lules en fase S; i 2) per quantificació de nuclis mitòtics tenyint les cèl·lules amb un colorant específic per a àcids nucleics. Alternativament, es pot aplicar la citometria de flux per a determinar les proporcions relatives de cèl·lules en G1, S o G2, a intervals periòdics durant el cicle. La sincronització de suspensions cel·lulars de plantes ha estat aplicada a les espècies, *Carantheus rosaceus*, *Arabidopsis*, ordi, arròs i tabac. Els millors resultats, però, en relació al grau de sincronia que es pot assolir i a la reproducibilitat experimental, s'han obtingut amb la línia BY-2 (bright-yellow-2) de tabac (Nagata, 1992).

La línia BY-2 de tabac, desenvolupada a partir de cèl·lules del mesòfil de fulla, es caracteritza per tenir una velocitat de creixement força elevada, amb un temps de generació mitjà (temps que separa dues mitosis) d'unes 13 hores. La corba de creixement té una durada de 7 dies, al final del quals s'obté la saturació del cultiu. Quan les cèl·lules es divideixen, formen filaments unicapa de fins a 20 cèl·lules. La dilució del cultiu saturat en medi de cultiu fresc fragmenta espontàniament els filaments en porcions de 2 a 4 cèl·lules. El mètode més comunament utilitzat per a la sincronització de les cèl·lules BY-2, és l'arrest de la replicació del DNA a l'inici de la fase S, mitjançant l'afidicolin. Amb aquest mètode, es poden assolir percentatges de sincronització del 40-50%. És possible d'aconseguir nivells de sincronització de fins al 80-90%, mitjançant l'ús combinat de dues drogues, la propizamida i l'afidicolin, de manera la incubació amb propizamida d'un cultiu de cèl·lules prèviament sincronitzades amb afidicolin, provoca un bloqueig a prometafase (per a una revisió sobre el manteniment de la línia BY-2 i la metodologia de sincronització, consultar Combettes, 1999; Nagata, 1999).

OBJECTIUS

A l'inici d'aquesta tesi, hi havia molt pocs estudis fets sobre la proteïna quinasa CK2 d'espècies vegetals. En diversos treballs, es postulava que en les plantes coexistien formes monomèriques de la proteïna amb formes oligomèriques, en contra del que s'havia observat en les espècies animals i de llevat estudiades. També hi havia una certa controvèrsia en relació a l'existència de subunitat β a les CK2 vegetals, ja que s'havien clonat dos gens d'*Arabidopsis* que codificaven per aquesta subunitat, però no hi havia estudis bioquímics que demostrassin l'existència de la forma tetramèrica $\alpha_2\beta_2$.

Diversos estudis realitzats en cèl·lules animals i de llevat evidenciaven que la CK2 podia ser un component important de les vies de senyalització de la divisió cel·lular, si bé en alguns casos els resultats obtinguts eren contradictoris. Pel que fa a les CK2 de plantes, no hi havia dades sobre la regulació de l'expressió de les subunitats de la CK2 en relació a la proliferació cel·lular.

En aquest context, ens vam plantejar realitzar una caracterització de la proteïna quinasa CK2 de sistemes vegetals, així com l'obtenció de sondes moleculars que ens permetessin l'estudi de la seva expressió en relació a la divisió cel·lular. En concret, els objectius que es van plantejar per a la realització d'aquesta tesi doctoral foren els següents:

1. Purificar i caracteritzar a nivell bioquímic la proteïna quinasa CK2 d'*Arabidopsis thaliana*.
2. Estudiar la regulació de la proteïna quinasa CK2 a l'entrada a un estadi de proliferació cel·lular des d'un estadi no proliferatiu, en cultius cel·lulars vegetals.
3. Estudiar la regulació de la proteïna quinasa CK2 durant el cicle cel·lular dels sistemes vegetals. Determinar l'expressió de les dues subunitats i l'activitat enzimàtica de la CK2 en cèl·lules sincronitzades.
4. Determinar el patró d'expressió espacial i temporal de les dues subunitats de la CK2 en diferents estadis del desenvolupament de la planta.