

4. La proteïna Rab17 de blat de moro.

4.1 Introducció.

Condicions ambientals adverses com la sequera, la salinitat del sòl o les baixes temperatures provoquen una situació de dèficit hídric en les cèl·lules que afecta al creixement i productivitat de les plantes. Les plantes han desenvolupat diferents estratègies per respondre a la disminució del seu potencial hídric com l'acumulació de soluts compatibles, canvis en el volum cel·lular o l'augment de la permeabilitat d'aigua entre d'altres. La reacció inicial a un dèficit hídric comporta diverses conseqüències com són el tancament dels estomes o la disminució de la fotosíntesi. Els canvis físics a nivell cel·lular activen una ruta de transducció de senyal transformant l'estrès físic en una resposta bioquímica. En aquesta via de transducció de senyal intervenen diversos missatgers secundaris com el calci i altres intermediaris com la ADP ribosa cíclica, proteïnes quinases i fosfatases fins arribar als factors de transcripció, que regulen l'expressió dels gens responsables de la resposta a estrès. (revisions: Ingram and Bartels, 1996; Hoesktra et al., 2001)

A més, en situacions de dèficit hídric es dona un augment espectacular de la hormona vegetal àcid abscísic (ABA). L'ABA no només està involucrat en la resposta a estrès hídric sinó que també modula el procés de formació i germinació de la llavor així com el creixement i desenvolupament de la planta (Campalans et al., 1999; Koorneef et al., 2002). A nivell de regulació gènica, l'ABA modula l'activació transcripcional d'un alt nombre de gens entre els que es troben gens que codifiquen per proteïnes de tipus LEA (**L**ate **E**mbrïogenesis **A**bundant) (Busk and Pagès, 1997). Les proteïnes LEA es van descriure per primera vegada en cotó (Galau et al., 1989), s'acumulen abundantment al final de l'embriogènesi i no es detecten en teixits vegetatius en condicions òptimes de potencial hídric, no obstant, sí que apareixen en condicions d'estrès hídric o salí o després d'incubació amb ABA exògen (Gómez et al., 1988; Mundy and Chua, 1988). Són predominantment citoplasmàtiques però també s'han descrit proteïnes nuclears, nucleolars i cloroplàstiques. En els últims anys, les proteïnes codificades per un gran nombre de gens com els *rab*, *em* o deshidrines que s'engloben dins de la família de les LEA (Skiver and Mundy, 1990). Tot i la divergència existent entre seqüències, totes elles tenen en comú l'alta hidrofilitat i termoestabilitat. La seva funció concreta roman desconeguda, l'alta concentració

d'aquestes proteïnes i la seva alta solubilitat (solubles fins i tot a 80°C) fa que es descartin possibles funcions enzimàtiques, estructurals, reguladores o de transport hídric o iònic. Es postula que la seva funció estaria relacionada amb la protecció de les cèl·lules i de les proteïnes a la sequera, mantenint l'estructura de les membranes, segregant ions, unint molècules d'aigua i actuant com a xaperones. Les proteïnes LEA s'han classificat en base a les similituds de seqüència, amb la idea de que aquesta similitud impliqui una estructura determinada i, per tant, potser una funció específica.

4.2 Característiques generals de la proteïna Rab17 de blat de moro.

Estudis sobre la regulació de l'expressió gènica durant l'embriogènesi en blat de moro mitjançant anàlisis bidimensional va permetre identificar proteïnes entre 23 i 25 kDa que s'indueïen ràpidament en embrions joves després de tractament amb ABA exogen. Aquestes proteïnes també apareixien en el embrió madur coincidint amb el període en que la concentració d' ABA arriba a nivells màxims i desapareixien a l'inici de la germinació (Sánchez-Martínez et al., 1986). Estudis posteriors van indicar que les formes més àcídiques corresponien a diferents graus de fosforilació d'una proteïna d'un pes molecular teòric de 17.1 kDa (Goday et al., 1988). El cDNA que codificava per aquesta proteïna es va aïllar i es va anomenar Rab17 (per **R**esponsive to **A**BA) (Vilardell et al., 1990).

La proteïna Rab17 de blat de moro és una proteïna LEA del tipus 2 o deshidrina. És una proteïna de 168 aminoàcids, altament hidrofílica i termoestable, molt bàsica (pI 9.4), rica en glicines i que no presenta cap cisteïna o triptòfan. La seqüència aminoacídica de la Rab17 està representada a la figura 8. La proteïna presenta els dominis conservats descrits per les LEA del tipus 2 (Dure et al., 1989):

-Segment Y: o domini DEYGNP, situat a l'extrem amino terminal. Presenta homologia amb zones d'unió a nucleòtid de les xaperones de plantes i bacteries, fet que suggereix que les proteïnes LEA del tipus 2 podrien tenir un paper com a xaperones moleculars per l'estabilització d'estructures i molècules durant l'estrès (Close, 1996). No obstant, no hi ha cap prova funcional de que puguin unir molècules nucleotídiques.

-Segment S: o "cluster " o repetició rica en serines (SGSSSSSSS), darrera de la que es troba una seqüència consens de fosforilació CK2 (SEDD).

-Segments K: o dominis rics en lisines. Dues repeticions imperfectes riques en lisines (KKGIKEIKELP) es troben situades a l'extrem carboxi terminal. Aquests dominis s'han descrit com zones que poden formar hèlix alfa amfipàtiques que permetrien interaccions hidrofòbiques amb proteïnes parcialment desnaturalitzades o membranes. S'ha demostrat que aquest dominis no són senyals de localització nuclear (NLS). En canvi, la seqüència RRKK (aminoàcids 92-95) sembla ser una NLS tot i que de caràcter dèbil, indicant l'existència d'altres seqüències implicades en la translocació de la proteïna a nucli (Jensen et al., 1998).

```

1  M E Y G Q Q G Q R G H G A T G H V D Q Y G N P V G G V E H G 30
31 T G G M R H G T G T T G G M G Q L G E H G G A G M G G G Q F 60
61 Q P A R E E H K T G G I L H R S G S S S S S S S E D D G M G 90
91 G R R K K G I K E K I K E K L P G G H K D D Q H A T A T T G 120
121 G A Y G Q Q G H T G S A Y G Q Q G H T G G A Y A T G T E G T 150
151 G E K K G I M D K I K E K L P G Q H 163

```

Figura 8: Seqüència aminoacídica de la proteïna Rab17. El segment Y està representat en taronja, el segment S en vermell i els dos segments K en blau. En verd, el consens de fosforilació CK2. En groc es marquen els residus RRKK implicats en la translocació de la proteïna a nucli.

4.3 Estudis funcionals previs amb la proteïna Rab17 de blat de moro.

Estudis de Northern blot van indicar que el mRNA de Rab17 s'acumula no només en embrions madurs i en joves tractats amb ABA sinó també en teixits vegetatius en condicions d'estrès hídric, osmòtic i després de tractament amb ABA exògen (Pla et al., 1989; Jensen et al., 1994). Estudis d'hibridació *in situ* i immunocitoquímica indiquen que tant el mRNA com la proteïna Rab17 es troben en tots els tipus cel.lulars d'embrió (Goday et al., 1994).

Anàlisis de fraccionament subcel.lular i bidimensionals van demostrar que la Rab17 es troba en forma fosforilada o defosforilada tant en nucli com en citoplasma, encara que hi ha amb una major proporció de formes fosforilades a citoplasma respecte a nucli (Goday et al., 1994). Estudis de fosforilació *in vitro* van indicar que la Rab17 és un substrat de la proteïna quinasa CK2, i que el seu lloc de fosforilació és el "cluster" de serines (Plana et al., 1990).

A la seqüència de Rab17 a continuació del “cluster” de serines i el consens de fosforilació CK2 es troba una zona bàsica rica en lisines (aminoàcids 93-111). La proteïna nucleolar humana Nopp140 presenta 10 dominis molt similars, formats per “clusters” de serines seguides també d’una zona rica en lisines (Figura 9). Nopp140 va ser descrita com una “NLS-binding protein” (proteïna d’unió a seqüències de localització nuclear) (Meier and Blobel, 1990). Es va postular que Nopp140 podria fer funcions de xaperona, involucrada en l’import i export de proteïnes des del nucleol al nucli i citoplasma (Meier and Blobel, 1992). Partint d’aquesta similitud, es va demostrar que Rab17 també tenia la capacitat de Nopp140 de unir-se a pèptids NLS *in vitro* (Godoy et al., 1994). En ambdós casos la unió a NLS és dependent de fosforilació, i només es dona quan les proteïnes estan fosforilades. Més tard, es va demostrar que Nopp140 interacciona i és fosforilada per la proteïna quinasa CK2 (Li et al., 1997). Per tant, totes aquestes característiques comuns van fer pensar en la hipòtesi de que la proteïna Rab17 presentés funcions similars a les de Nopp140.

```
Rab17
76  S G S S S S S S S E D D G M G G R R K K G I K E K I K E K L P G
Nopp140
127  E S S S S E E S S E E E E E K D K K K K P P Q Q K A V K P Q A K
170  S E S E S D S S S E D E A P Q T Q K F K A A A T A A K A P T K A
479  S S D S E S S S S E E E K K T P K S K A T P K P Q A G K A N G V
524  S S S S S S S D S E K E E S N D K K R K S E D A E E E E D E E S
```

Figura 9: Alineament entre els dominis conservats de Rab17 i quatre dels 10 presents en la proteïna Nopp140 humana

Al nostre laboratori s’han realitzat estudis funcionals de la proteïna Rab17 mitjançant la producció de plantes transgèniques *Arabidopsis thaliana* que sobreexpressen diferents versions de la proteïna Rab17 de blat de moro sota control d’un promotor constitutiu (Mercè Figueras, Tesi Doctoral). Es van obtenir plantes que sobreexpressen la proteïna Rab17 *wild-type* i altres que contenen una versió de Rab17 mutada en el consens de fosforilació CK2, a on els aminoàcids ⁸⁵EDD⁸⁷ s’han substituït per ⁸⁵AAA⁸⁷ mitjançant mutagènesi dirigida (Jensen et al., 1998). No es van observar diferències fenotípiques en quan a la forma de les fulles, temps de floració o formació de les siliques entres les plantes transgèniques i les control no transformades. No obstant, assaigs de germinació de les llavors en condicions d’estrès osmòtic (100mM NaCl) van mostrar diferències en la capacitat de germinació. Així, les plantes que

sobrexpressaven la proteïna Rab17 *wild-type* presentaven un fenotip de parada de la germinació, mentre que sobreexpressaven la proteïna Rab17 però mutada en el seu consens de fosforilació CK2 es comportaven com les plantes control i eren capaces de germinar en presència de sal (Figura 10). Aquests resultats eren un punt de partida interessant per l'estudi més detallat de la possible regulació per fosforilació per la proteïna quinasa CK2 de funció/funcions de Rab17 en el procés de germinació.

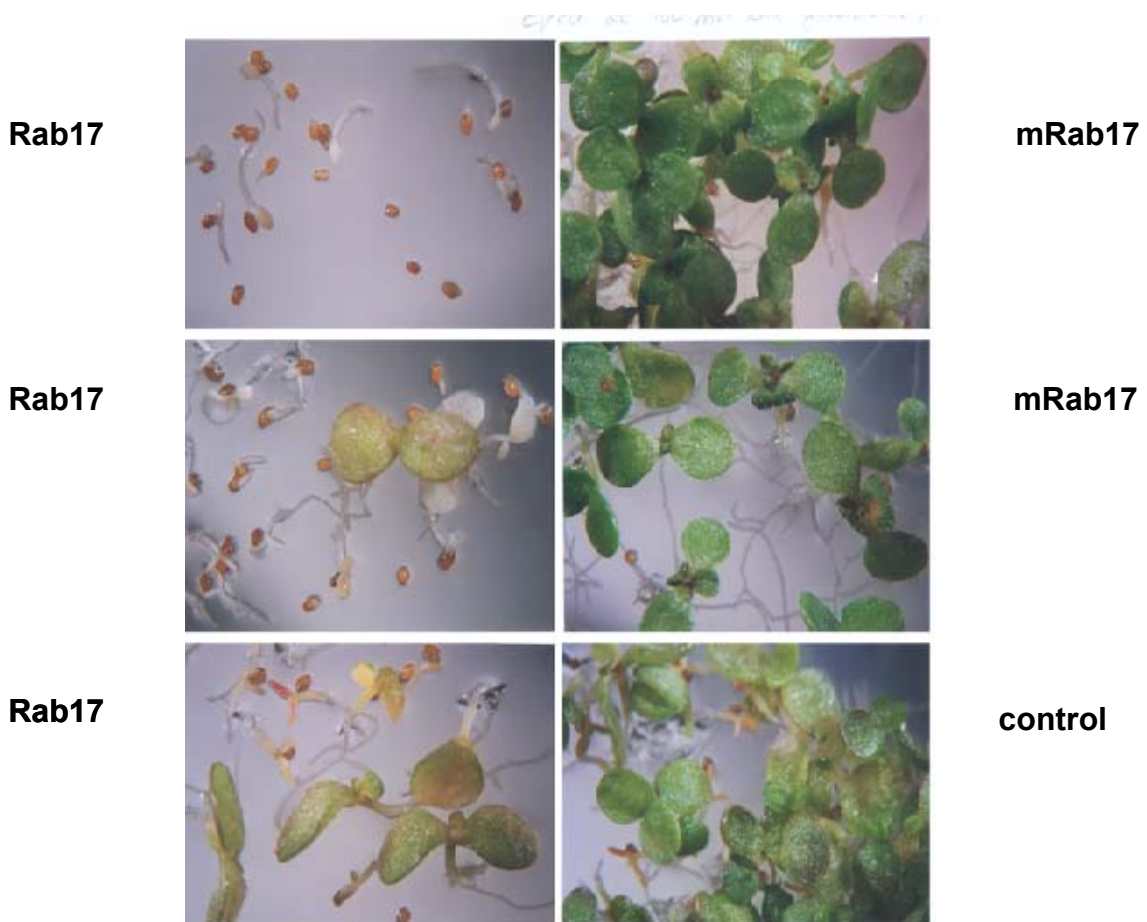


Figura 10: Assaig de germinació en presència de 100 mM NaCl de plantes transgèniques que sobreexpressen Rab17 *wild type* (Rab17), Rab17 mutada en el consens de fosforilació CK2 (mRab17) i plantes no transformades (control).

OBJECTIUS

A l'inici d'aquesta tesi es van plantejar els següents objectius:

- **Caracterització molecular de la proteïna quinasa CK2 de blat de moro:**

Degut a que prèviament no s'havien descrit subunitats reguladores CK2 β en blat de moro, el primer objectiu d'aquest treball va ser determinar l'existència d'aquest tipus de subunitat en blat de moro. Una vegada es van identificar les tres subunitats reguladores CK2 β , ens vam proposar estudiar l'expressió gènica de les diferents subunitats CK2 α/β , així com la possible especificitat d'interacció entre elles. Un altre objectiu va ser la purificació de l'holoenzim CK2 i la seva caracterització bioquímica. A nivell estructural, ens vam proposar conèixer els dominis de les subunitats CK2 β implicats en les interaccions amb les altres subunitats i/o amb altres proteïnes. Un altre objectiu era demostrar la funcionalitat de les subunitats CK2 β de blat de moro mitjançant estudis de complementació en llevat.

- **Estudi de la regulació de la proteïna Rab17 per la proteïna quinasa CK2 de blat de moro**

Dades prèvies obtingudes al nostre grup indicaven una possible regulació de la proteïna Rab17 per fosforilació per CK2 (Plana et al., 1990; Goday et al., 1994; Jensen et al. 1998). Amb el fi d'esbrinar la funcionalitat d'aquesta fosforilació, en primer lloc es va voler determinar si existia interacció física entre la proteïna quinasa CK2 i la proteïna Rab17 mitjançant l'aproximació del sistema del doble híbrid i l'anàlisi de "pull-down". Un segon objectiu era l'estudi de la fosforilació *in vitro* de la proteïna amb els holoenzims reconstituïts amb les diferents subunitats CK2 β i la demostració de la fosforilació de la Rab17 per la CK2 en extractes de blat de moro. També ens vam proposar l'estudi de la localització subcel·lular de la Rab17 i de diferents versions mutades de Rab17 així com de les subunitats CK2 α/β fusionades a la proteïna de fusió GFP per tal de determinar si existia una localització subcel·lular depenent de fosforilació i o co-localització Rab17/CK2.

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

La identificació de proteïnes que interaccionen amb la proteïna quinasa CK2 de blat de moro pot ser de gran utilitat per avançar en el coneixement de la funció i la regulació de la CK2 en plantes. Amb aquest finalitat, es vam proposar realitzar un anàlisi/crivellatge de una llibreria de doble híbrid de fulla estressada de blat de moro utilitzant la subunitat reguladora CK2 β -1 com a "bait".