

## **INTRODUCCIÓ**

### 1. Les proteïnes quinases .

Tots els éssers vius han desenvolupat diverses i sofisticades estratègies de senyalització per tal de reconèixer i respondre a les condicions ambientals que els envolten. La fosforilació reversible de proteïnes és un dels mecanismes més comuns i universals de transducció de senyal intracel·lular ja que es dona tant en organismes eucariotes com procariotes. A més, està involucrat en nombrosos processos fisiològics i patològics. La fosforilació/defosforilació d'una proteïna pot afectar severament a la seva activitat, localització cel·lular i interacció amb altres proteïnes així com també pot donar lloc a canvis que afectin a la seva estructura terciària o quaternària. Aquest procés està catalitzat per les proteïnes quinases i contrarestat per les proteïnes fosfatases que es consideren "peces" reguladores essencials dels mecanismes cel·lulars. S'estima que entre un 3 i un 5% dels gens funcionals eucariotes codifiquen per proteïnes quinases i que al voltant d'un 30% de les proteïnes es modifiquen post-traduccionament per fosforilació, indicant la importància d'aquest procés en la regulació i metabolisme cel·lular.

Les proteïnes quinases són enzims que catalitzen la transferència del fosfat  $\gamma$  d'un nucleòsid trifosfat a un aminoàcid d'una proteïna o pèptid (substrat). La unió que es forma és un enllaç covalent de tipus fosfomonoèster. Totes utilitzen ATP com a donador de grups fosfat, amb una  $K_m$  inferior a  $100 \mu M$ , tot i que en alguns casos també poden utilitzar GTP. A més, aquests enzims necessiten la presència de cations divalents ( $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$ ) per realitzar la seva funció (Roach, 1984).

En general, les proteïnes quinases es classifiquen en tres grans grups en base a la seva especificitat de substrat:

**1-PSKs: serina/treonina quinases**, fosforilen residus de serina o treonina.

(Existeix també una petita subfamília de PSKs amb especificitat dual, es a dir que pot fosforilar residus de serina/treonina i tirosina).

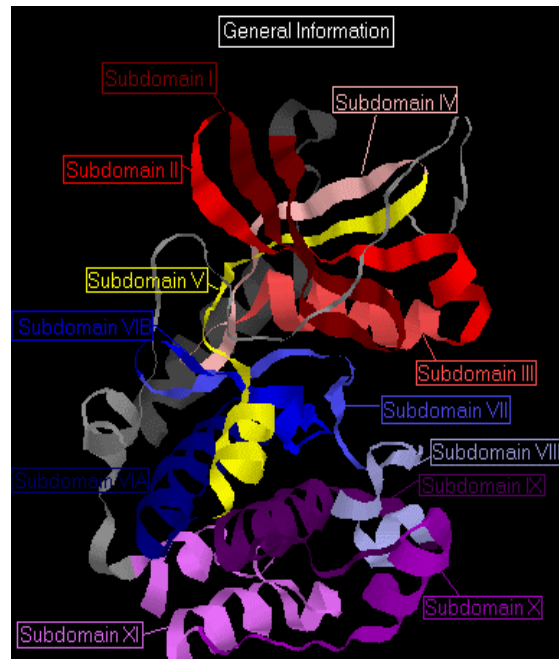
**2-PTKs: tirosina quinases**, fosforilen residus de tirosina.

**3-PHKs: histidina quinases**, fosforilen residus d'histidina.

Les PSKs i les PTKs són estructuralment semblants i podrien provenir d'un origen ancestral comú mentre que les PHKs formen una família prèvia en l'evolució, amb un origen i una estructura diferent a PSKs i PTKs. Les PHKs també s'anomenen "sistema de dos components" ja que estan formades per un sensor histidina quinasa i una segona molècula reguladora de la resposta. Durant anys, es pensava que les PSKs i les PTKs eren exclusives de eucariotes mentre que les PHKs estaven restringides a procariotes. No obstant, actualment, en que els nombre de quinases descrites augmenta exponencialment cada dia, aquesta afirmació ja no és del tot certa ja que s'han descrit PSKs a procariotes com *Mixococcus* (Munoz-Dorado et al., 1993) i les PHKs ja no es consideren exclusives de bacteries sinó que també s'han trobat a plantes, llevat i protozous. (Chang et al., 1993; Shieh et al., 1997; Schuster et al., 1996)

Les proteïnes quinases poden ser monomèriques o oligomèriques i contenen dos tipus de dominis: els catalítics, altament conservats, i els reguladors, que són més divergents. Els dominis catalítics (o dominis quinasa) són els responsables de la transferència de fosfat, de la unió dels co-substrats o donadors de fosfat (ATP o GTP), i de la interacció amb les proteïnes substrat. Tenen una grandària de 250 a 300 aminoàcids i alternen regions molt conservades amb altres de més divergents. En total s'han descrit 12 regions conservades o subdominis que presenten alguns residus invariables (Hanks and Quinn, 1991). Estudis de mutagènesi dirigida d'aquests residus conservats i la cristal·lització de dominis catalítics de proteïnes quinases ha permès demostrar la importància d'aquests residus en la catàlisi així com que totes les proteïnes quinases presenten un mecanisme general comú de transferència de fosfat (Wei et al., 1994). Els cristalls obtinguts de dominis quinasa mostren estructures tridimensionals topològicament molt similars entre ells. En general, totes les subunitats catalítiques de les proteïnes quinases d'eucariotes presenten una estructura bilobal, amb una fulla- $\beta$  a l'extrem amino terminal, vàries hèlix- $\alpha$  al carboxi terminal i el centre actiu situat entre les dues regions, tal com es mostra a la figura 1. Les diferències entre els residus propers al centre actiu permeten determinar de quin tipus de quinases es tracta, PSKs o PTKs.

Els dominis reguladors són molt més variables que els catalítics, poden contenir llocs d'unió a altres proteïnes o d'anclatge a membrana i semblen ser els responsables de la diversitat de funcions entre diferents proteïnes quinases.



**Figura 1: Estructura tridimensional de la subunitat catalítica de la PKA, la primera proteïna quinasa cristalitzada (Knighton et al., 1991).** Presenta una estructura bilobal, amb una fulla- $\beta$  a l'extrem amino terminal (en vermell), varies hèlix- $\alpha$  al carboxi terminal (en lila) i el seti actiu situat al centre (en blau). S'indiquen els 12 subdominis catalítics. Imatge extreta de <http://pkr.sdsc.edu/>

La classificació de la superfamília de les proteïnes quinases d'eucariotes es basa en l'anàlisi filogenètic de l'alineament dels seus dominis catalítics (Hanks and Hunter, 1995). Esta formada per quinases del tipus PSKs i PTKs ja que les PHKs degut al seu origen evolutiu diferent no s'han inclòs dins de la superfamília de les proteïnes quinases d'eucariotes. Entre el gran nombre de membres d'aquesta superfamília existeix gran diversitat d'estructures, modes de regulació i especificitats de substrat. Està subdividida segons famílies o grups:

- **Grup ACG:** inclou quinases dependents de nucleòtid cíclic o fosfolípids (PKA, PKG, PKC) i proteïnes ribosomals S6 quinases.
- **Grup CaMK:** inclou quinases dependents de calci/calmodulina i altres enzims relacionats.
- **Grup CMGC:** inclou diverses famílies com CDKs, MAPKs, GSK-3 i CK2.
- **Grup PTKs convencionals:** compren nombroses tirosines quinases citoplasmàtiques i receptors.
- **Altres:** Raf quinases, quinases dependents de DNA, entre d'altres.

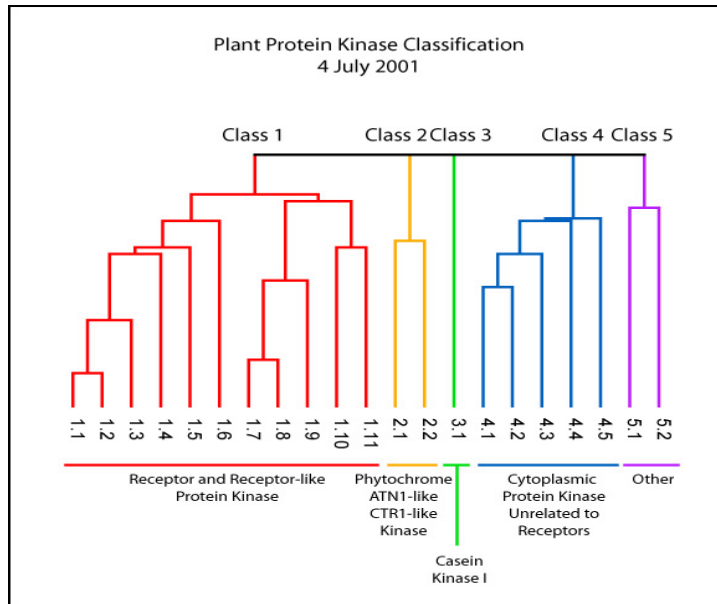
### **2. Les proteïnes quinases de plantes.**

Com a organismes sèssils, les plantes han hagut de desenvolupar mecanismes propis que les defensin davant de factors externs desfavorables com són les temperatures extremes (fred o sequera), la salinitat del sòl, llum, agents invasors patògens o deprivació de nutrients (Bonhert et al., 1995). La fosforilació de proteïnes és un mecanisme que participa en el procés de resposta biològica a totes aquestes senyals extracel·lulars. En els darrers anys, l'estudi dels mecanismes de transducció de senyals en plantes ha donat lloc a la identificació, per una banda, de sensors i receptors cel·lulars capaços de percebre les senyals externes i per una altra banda, de gens "diana", com els factors de transcripció, que coordinen les respostes intracel·lulars a aquests estímuls (McCarthy and Chory, 2000). En canvi, el que continua essent desconegut en moltes d'aquestes vies és la identificació dels components reguladors o intermediaris que uneixen aquests sensors/receptors amb els gens "diana" i altres respostes cel·lulars.

En l'actualitat, als bancs de dades es troben més de 1.200 seqüències corresponents a proteïnes quinases de plantes. Malauradament, la majoria d'aquestes seqüències donen una informació purament descriptiva ja que són molt poques d'entre totes aquestes quinases les que han estat caracteritzades i encara menys de les que es coneix la funció. Al comparar les dades existents sobre proteïnes quinases de plantes amb la d'altres eucariotes trobem interessants paral·lelismes però també contradiccions que fan difícil classificar les quinases de plantes dins dels grups establerts presentats anteriorment per la superfamília de les proteïnes quinases d'eucariotes (Stone and Walker, 1995). Així doncs, recentment s'ha presentat una classificació sistemàtica de totes aquestes proteïnes basada en comparacions de seqüències dels dominis catalítics mitjançant el programa BLAST. Aquesta classificació es pot trobar a la pàgina web <http://plantsp.sdsc.edu/> i està representada a la figura 2. Totes les proteïnes quinases de plantes queden incloses dins d'aquestes cinc classes:

- **Classe 1:** inclou receptors quinases i "receptors-like" quinases. Està subdividit en 11 subgrups.
- **Classe 2:** inclou quinases del fitocrom, "ATN-1 like", "CTR-1 like". Conté 2 subgrups.

- **Classe 3:** proteïnes quinases tipus caseïna quinasa 1.
- **Classe 4:** proteïnes quinases citoplasmàtiques no relacionades amb receptors. Conté 5 subgrups.
- **Classe 5:** conté 2 subgrups de altres quinases.



**Figura 2: Classificació de les proteïnes quinases de plantes.** Extreta de la pàgina web <http://plantsp.sdsc.edu/>

En aquesta classificació es troben moltes de les proteïnes quinases involucrades en els processos cel·lulars comuns a tots els organismes i que també s'han descrit en plantes, com es el cas MAPKs (mitogen-activated protein kinases), CDKs (cyclin-dependent kinases), SNF-1 (sucrose non fermenting 1), GSK-3 (glycogen synthase kinase-3) o de CK2 (casein kinase 2), el tema d'estudi d'aquesta tesi.

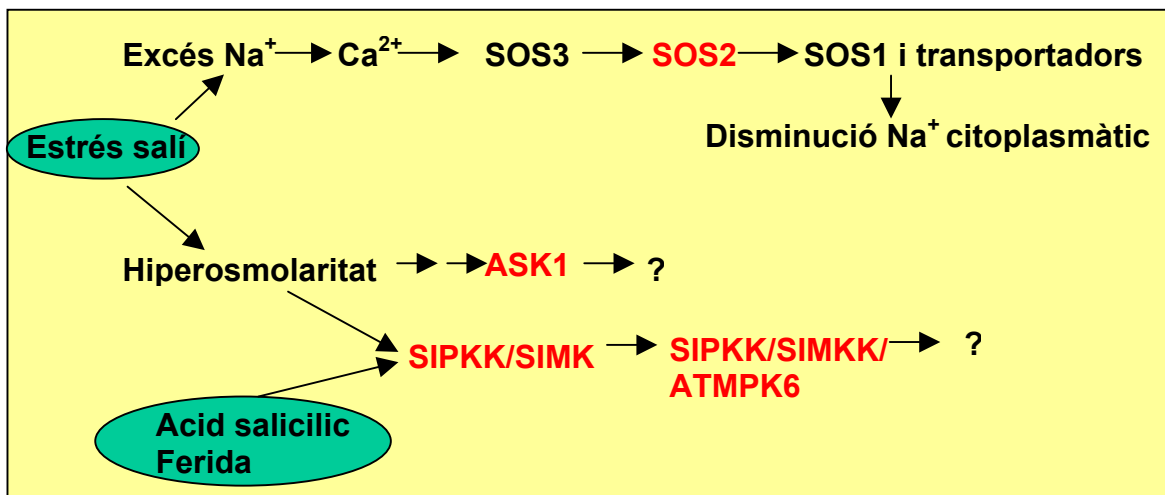
No obstant, una de les principals característiques de les proteïnes quinases de plantes és que moltes de les PSKs clàssiques àmpliament descrites en animals, com és el cas de les regulades per segons missatgers com AMPc (PKA), GMPc (PKG), DAG i Ca<sup>2+</sup> (PKC) no han estat mai descrites en plantes. Això no vol dir que aquests segons missatgers no siguin importants pels mecanismes de transducció de senyals en cèl·lules vegetals. De fet, és possible que existeixin quinases regulades per AMPc; per exemple, la família de PVPK-1, que va ser la primera quinasa descrita en plantes, (Lawton et al., 1989) presenta certa similitud de seqüència en el seu domini catalític amb les PKA. També, tot i l'absència de PKC clàssiques, les alteracions en la concentració de Ca<sup>2+</sup> intracel·lular en cèl·lules vegetals venen sovint acompanyades de

canvis en el nivell de fosforilació de moltes proteïnes. Aquesta fosforilacions les duen a terme majoritàriament les CDPKs (o quinases dependents de  $\text{Ca}^{2+}$ ). Les CDPKs formen una gran superfamília en plantes i se n'han descrit diverses formes: citoplasmàtiques, associades a membranes o a citoesquelet (Harmon et al., 2000). A diferència de les descrites en animals, la majoria de les CDPKs de plantes són dependents de calci però independents de calmodulina, fosfolípids o diacilglicerol, tot i que s'han descrit algun cas de quinases que uneixen calmodulina en plantes (Watillon et al., 1995).

Tot i que en el cas de les plantes no s'han descrit fins al moment quinases del grup 2 o PTKs, la fosforilació en tirosines existeix i és important. Per exemple, s'han descrit un gran nombre de quinases de la família de les MAPK que són activades per fosforilació en tirosina però no s'ha demostrat encara que siguin les MAPKK les responsables d'aquesta fosforilació. No obstant, pel sistema de doble híbrid i per complementació en llevats mutants s'ha demostrat interacció entre MAPKKs i MAPKs d'*Arabidopsis* (Ichimura et al., 1998). Les proteïnes MAPKs estan molt conservades evolutivament i sembla que les vies MAPK de plantes funcionen com cascades d'activació semblants a les descrites en animals, no obstant, no s'ha descrit cap via MAPK *in vivo* en plantes ni tampoc cap substrat d'aquestes quinases. Sí que es coneix que les vies MAPK de plantes són activades per hormones, en resposta a estrès o a patògens (Tena et al., 2001). Els receptors tirosina quinasa o RTK tampoc s'han descrit en plantes tot i que la seva funció podria ser substituïda per RLK (o receptors-like kinases). Tal i com s'indica a la classificació representada a la figura 2 s'han descrit un alt nombre de RLK en plantes. Al igual que les RTKs, presenten dominis transmembrana però amb activitat serina/treonina quinasa enlloc de tirosina quinasa (Lease et al., 1998). En contrapartida al gran nombre de RLKs descrites, es coneixen molt poques dades funcionals sobre elles, així, algunes estan implicades en diferents processos de senyalització, com el cas de BR1, receptor de brasinoesteroids (Li et al., 1997)

També les PHKs (o "sistemes de dos-components"), no descrites en animals, són essencials per la transducció de senyal en resposta a estímuls externs en plantes. Un exemple seria ETR1, una proteïna amb domini transmembrana amb activitat histidina quinasa que funciona com a receptor d'etilè i regulador negatiu de la via de transducció d'aquesta hormona vegetal (Urao et al., 2000)

En resposta enfront d'invasió patògena s'activen diverses vies de transducció de senyals a on participen diferents proteïnes quinases com RLKs, MAPKs o CDPKs que donen lloc a una resposta hipersensitiva de resistència als patògens. No obstant, no s'han identificat els components intermediaris entre aquestes proteïnes quinases i la resposta cel·lular (Romeis, 2001). També s'està demostrant la funcionalitat de moltes proteïnes quinases en les respostes als diferents tipus d'estrès en plantes. Per exemple, en resposta a estrès hídric i salí en *Arabidopsis* s'activen diferents vies de proteïnes quinases com la via SOS, la via ASK1 i múltiples vies MAPKs (Figura 3).



**Figura 3: Activació de diferents cascades de proteïnes quinases en resposta a estrès salí.** L'excés de  $\text{Na}^+$  al medi provoca un canvi en la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic que es detecta per SOS3, una proteïna de unió a calci. SOS3 interacciona i activa la proteïna quinasa SOS2 que regula l'activitat transportadora d'ions de SOS1 i altres transportadors disminuint el  $\text{Na}^+$  citosòlic. També l'estrès salí causa hiperosmolaritat, que activa la proteïna quinasa ASK1 i múltiples vies MAPKs (es mostra només una d'elles). Els interrogants indiquen que els gens diana d'aquestes vies encara no s'han identificat. (esquema extret de Zhu, 2001)

En resum, sembla clar que moltes de les molècules implicades en la percepció de senyals en plantes tenen origen diferent de les d'animals. En els darrers anys, la genètica reversa o l'anàlisi de mutants ha permès identificar els components moleculars de moltes de les vies de transducció de senyals. En el futur, per conèixer la funció de les proteïnes quinases dintre de les diferents vies caldrà combinar l'aproximació genètica amb la bioquímica: per una banda, l'anàlisi funcional de mutants "loss-of-function", dobles i triples mutants i per altra banda, noves tècniques de fosfoproteòmica com anàlisis bidimensionals, espectrometria de masses i altres aproximacions bioquímiques seran essencials per determinar quines són les funcions de les proteïnes quinases i quines les proteïnes fosforilades per elles.