

RESULTATS

CAPÍTOL I

1.1 Resum en català del treball 1:

Maize protein kinase CK2: regulation and functionality of three beta subunits. **Marta Riera**, *Giovanna Peracchia*, *Eulalia de Nadal*, *Joaquin Ariño* and *Montserrat Pagès*. *Plant J.* 2001, 25: 365-374.

Durant molts anys, l'estructura de la proteïna quinasa CK2 en blat de moro ha estat motiu de controvèrsia. Dades bioquímiques i cristal·logràfiques prèvies indicaven que, a diferència de tots els altres organismes, l'enzim CK2 de blat de moro podia estar format únicament per subunitats catalítiques CK2 α . L'objectiu del treball va ser determinar la composició de la proteïna quinasa CK2 de blat de moro.

Per tal de comprovar l'existència de subunitats CK2 β en blat de moro es va fer un anàlisi/crivellatge de cDNA d'una llibreria de fulla estressada de blat de moro utilitzant com a sonda una EST de blat de moro de 582 pb que presentava un 75% d'homologia amb la subunitat CK2B1 de *Arabidopsis thaliana*. Com a resultat d'aquest anàlisi es va aïllar un primer cDNA que es va anomenar CK2 β -1. L'alineament de la seqüència aminoacídica de CK2 β -1 amb la de CK2 β d'altres espècies indica que tant CK2 β -1 com les CK2 β de *Arabidopsis thaliana* són les úniques que presenten una regió d'uns 90 aminoàcids en el seu l'extrem N-terminal que no té cap homologia amb cap proteïna coneguda. A la resta de la seqüència, CK2 β -1 és molt semblant a les CK2 β prèviament descrites, excepte en la regió C-terminal, a on tant CK2 β -1 com les CK2 β de *Arabidopsis thaliana* són uns 22 aminoàcids més curtes que les CK2 β d'altres organismes, com llevat, *Drosophila melanogaster* o humans.

L'anàlisi de Southern blot utilitzant el cDNA complet de CK2 β -1 com a sonda, va indicar que probablement CK2 β -1 pertanyia a una família multigènica. Amb l'objectiu de trobar nous membres d'aquesta família es van realitzar dues aproximacions: per una banda, es va repetir l'anàlisi de cDNA de la llibreria però en condicions de baixa

astringència i utilitzant el cDNA CK2 β -1 complert com a sonda. Com a resultat es va aïllar un nou cDNA que es va anomenar CK2 β -2.

Per una altra banda, es va realitzar un anàlisi de doble híbrid amb la llibreria de fulla estressada de blat de moro utilitzant el cDNA CK2 β -1 clonat en el vector d'expressió pGBT9 com a "bait". Aquest anàlisi va permetre aïllar un tercer cDNA que corresponia a una altra subunitat reguladora (CK2 β -3) així com una nova subunitat catalítica que es va anomenar CK2 α -3.

El patró d'expressió de les diferents subunitats CK2 α/β va ser caracteritzat per Northern blot en diferents teixits i al llarg del desenvolupament de l'embrió utilitzant sondes específiques per cadascuna de les sis isoformes (tres subunitats CK2 α i tres CK2 β). Per les subunitats reguladores CK2 β es van utilitzar com a sondes els fragments N-terminal mentre que per les catalítiques CK2 α es van utilitzar els extrems 3' no codificants. Els resultats obtinguts indiquen que les subunitats CK2 α s'expressen de manera gairebé constitutiva al llarg de l'embriogènesi del blat de moro, mentre que existeixen diferències en l'expressió de les CK2 β durant el desenvolupament embrionari: CK2 β -1 sembla més majoritària d'estadis tardans del desenvolupament, CK2 β -2 d'estadis intermitgts i CK2 β -3 de estadis primerencs. A més, totes les isoformes CK2 α i CK2 β s'expressen en fulles i arrels i no s'observen canvis en la seva expressió en condicions d'estrès hídric.

El sistema del doble híbrid de llevat i els assaigs de interacció "pull-down" es van utilitzar per determinar si existien interaccions específiques entre les diferents isoformes CK2 α i CK2 β . Pel sistema doble híbrid es comprova que totes les subunitats CK2 α poden interaccionar amb totes les CK2 β encara que amb diferents nivells d'intensitat. Les interaccions entre les subunitats CK2 β són més febles que entre CK2 α i CK2 β i existeix una especificitat d'interacció. Així, la interacció entre CK2 β -1/CK2 β -1 i CK2 β -1/CK2 β -2 és molt feble, no hi ha interacció entre CK2 β -2/CK2 β -2 i les interaccions més fortes són CK2 β -1/CK2 β -3 i CK2 β -3/CK2 β -3. Amb aquest sistema no es detecta interacció entre subunitats CK2 α . Els assaigs de interacció "pull-down" van servir per corroborar els resultats obtinguts amb el sistema de doble híbrid.

Finalment, la funcionalitat de les subunitats CK2 β de blat de moro es va comprovar mitjançant dues aproximacions: en la primera, les tres subunitats CK2 β es va expressar com a proteïnes de fusió amb la GST i l'enzim es va reconstituir utilitzant CK2 α -2 recombinant i les tres CK2 β -GST. L'autofosforilació de les subunitats CK2 β demostra la funcionalitat del holoenzim i que les CK2 β de blat de moro presenten unes propietats similars a les prèviament descrites per la CK2 animal com l'estimulació de l'activitat CK2 α sobre un substrat endogen, com és la proteïna Rab17.

Per una altre banda, estudis de complementació en llevat van corroborar la funcionalitat de les CK2 β de blat de moro. La sobreexpressió de CK2 β -1 a la soca termosensible YDH8 comporta una reversió d'aquest fenotip. També es va comprovar que la sobreexpressió de CK2 β -1 així com de les altres CK2 β (CK2 β -2, CK2 β -3) en llevat augmenten la tolerància del llevat a LiCl, tal com prèviament s'havia descrit per la sobreexpressió de les CK2 β de llevat. La sobreexpressió de les tres CK2 β en un llevat mutant al que se li havia deleccionat una subunitat beta (CK2b1 Δ) és capaç de complementar aquesta mutació i a més de revertir el fenotip de hipersensibilitat a sal del llevat mutant, per tant es pot concloure que la sobreexpressió d'aquestes subunitats en llevat comporta un fenotip de tolerància a salinitat.