

CAPÍTOL II

2.1 Interacció entre la proteïna Rab17 i proteïna quinasa CK2

Degut a que es coneixia que la proteïna Rab17 és fosforilada *in vitro* per la proteïna quinasa CK2 (Plana et al., 1990) es va utilitzar el sistema del doble híbrid i els assaigs de “binding” o “pull-down” per determinar si existia interacció física entre la proteïna Rab17 i l'enzim CK2. També es disposava d'una proteïna Rab17 mutada a la seqüència consens de fosforilació CK2 (mRab17) descrita a Jensen et al., (1998), a on els aminoàcids ⁸⁵EDD⁸⁷ havien sigut substituïts per ⁸⁵AAA⁸⁷ mitjançant mutagènesi dirigida.

Els cDNAs Rab17 i mRab17 es van clonar al vector d'expressió pGAD424, i les proteïnes es van expressar fusionades al domini d'activació (AD). Es disposava de diferents construccions amb les subunitats CK2 clonades al vector d'expressió pGBT9 (Capítol I). Es va utilitzar de nou la soca *S.cerevisiae* AH109, els transformants es van seleccionar en plaques selectives i es va realitzar assaig X-Gal en filtre (Figura 11A).

Utilitzant aquest sistema es va comprovar que tant la subunitat CK2 β -1 com la construcció que presenta el N-terminal de CK2 β -1 deleccionat, (del1) interaccionen amb Rab17 i mRab17. Aquests resultats indiquen que l'extrem N-terminal de la subunitat CK2 β no és essencial per la interacció amb el substrat Rab17 i que la disrupció de la seqüència consens de fosforilació CK2 no afecta a l'interacció Rab17/CK2 β . Respecte a les altres subunitats reguladores, es comprova que Rab17 interacciona amb CK2 β -1 i CK2 β -3 però no ho fa amb CK2 β -2. En canvi, no es va detectar interacció entre les proteïnes Rab17, mRab17 i cap de les subunitats catalítiques CK2 α .

La interacció entre Rab17, mRab17 i les subunitats CK2 també es va comprovar per assaigs de “binding” *in vitro* o “pull-down”. Els cDNAs Rab17 i mRab17 es van clonar en el vector d'expressió pET28 sota control d'un promotor T7 i es va fer la traducció *in vitro* en 25 μ l de reacció en presència de [³⁵S]-Metionina utilitzant el kit T7-TNT Quick coupled Transcription/Translation system (Promega). Les proteïnes traduïdes es van incubar amb resines de glutatió-agarosa que contenien CK2 β o CK2 α fusionades a GST. Un cop eluides les proteïnes de fusió GST de les resines, es van separar per SDS-PAGE. Es va comprovar que tant Rab17 i mRab17 interaccionen amb les subunitats CK2 β -1 i

Resultats

CK2 β -3 , però a diferència del sistema del doble híbrid, també es detecta interacció tot i que més feble, amb CK2 β -2 i CK2 α -2. (Figura 11B). Aquests resultats indiquen que no es pot descartar que Rab17 interacció tant amb subunitats catalítiques com amb les reguladores de l'holoenzim CK2.

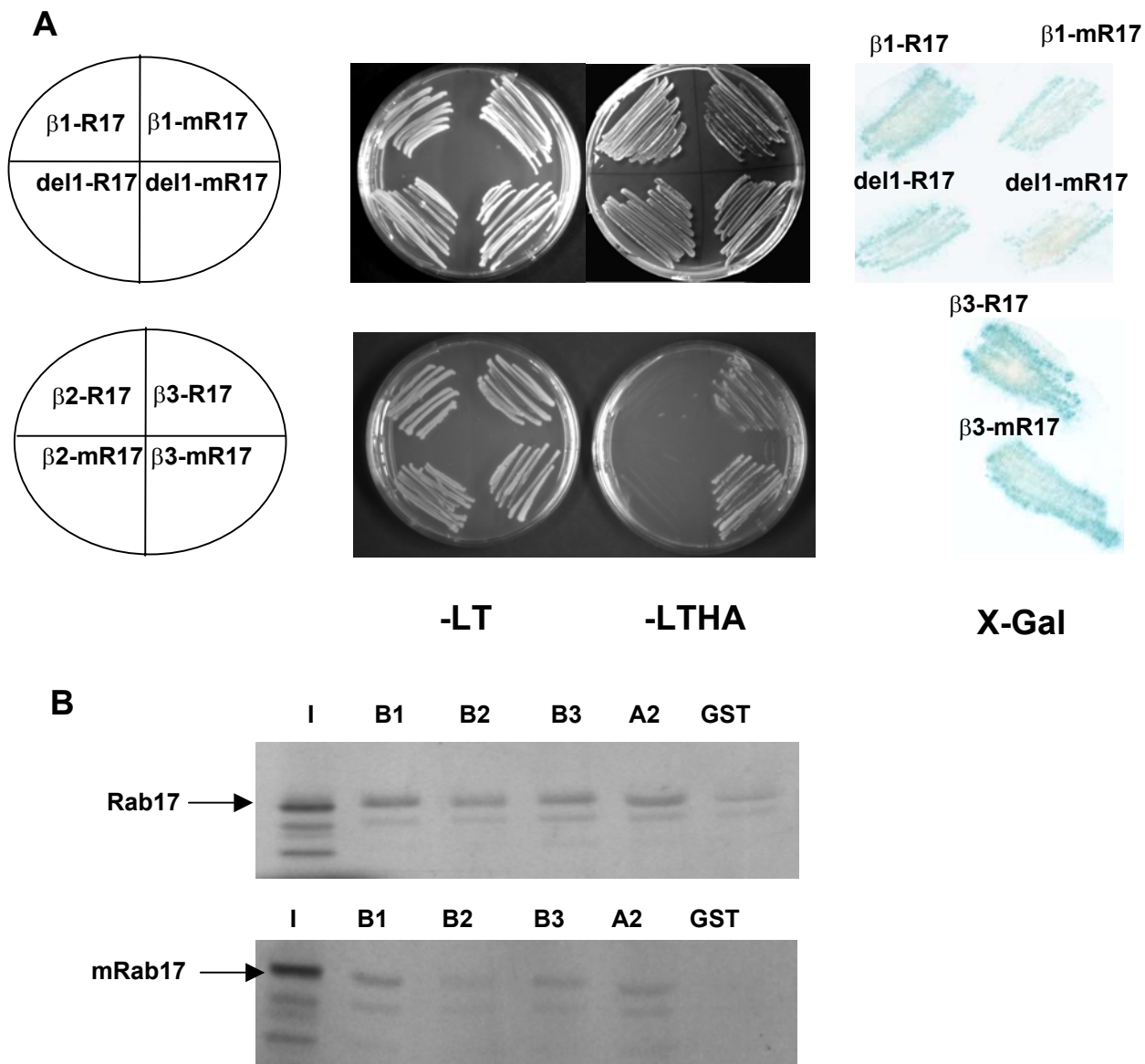


Figura 11: Interacció entre la proteïna Rab17 i proteïna quinasa CK2 segons el sistema de doble híbrid i assaigs “pull down”. Panel A: Selecció dels llevats transformats en plaques -Leu -Trp i plaques -Leu -Trp- His -Ade. Assaigs X-Gal en filtre. Panel B: L'autoradiografia mostra interacció en les proteïnes Rab17 i mRab17 traduïdes *in vitro* i marcades amb ^{35}S -Metionina i les proteïnes expressades fusionades a GST: CK2 β -1, CK2 β -2, CK2 β -3 i CK2 α -2. l'input (I) representa el 10% de les proteïnes marcades.

2.2 Fosforilació de la proteïna Rab17 per la proteïna quinasa CK2.

Per l'estudi de la fosforilació de la proteïna Rab17 per la proteïna quinasa CK2 com a primera aproximació es van realitzar assaigs de fosforilació *in vitro* utilitzant proteïnes recombinants de blat de moro Rab17, mRab17 (mutada a la seqüència consens de fosforilació CK2), CK2 α i holoenzim CK2 reconstituït amb CK2 α i CK2 β -GST sobrexpressades en *E.coli* (Figura 12). S'ha demostrat al treball 1 que la fusió a GST de les subunitats CK2 β no afecta a la reconstitució de l'holoenzim, que és capaç d'autofosforilarse i fosforilar Rab17. Així, en els assaigs de fosforilació *in vitro* realitzats amb l'holoenzim reconstituït apareixen dues bandes que corresponen a l'autofosforilació de CK2 en les subunitats reguladores: les bandes de pes molecular al voltant de 60 kDa, que són les proteïnes de fusió CK2 β -GST i les bandes d'uns 30 kDa que corresponen a les subunitats CK2 β sense GST, ja que es coneix que la proteïna GST no es fosforila per CK2.

Es demostra que la subunitat catalítica CK2 α és capaç de fosforilar *in vitro* la proteïna Rab17 i l'holoenzim CK2 reconstituït amb la subunitat CK2 β 1 augmenta aquesta fosforilació. Quan s'utilitza com a substrat la proteïna mRab17 ni la subunitat catalítica CK2 α ni l'holoenzim CK2 reconstituït amb CK2 β -1 fosforilen la proteïna, indicant que aquesta seqüència consens de fosforilació CK2 és el lloc d'inici d'una fosforilació seqüencial del "cluster" de serines localitzat abans d'aquest consens (Figura 12, esquerra). Es va reconstituir l'holoenzim utilitzant les altres dues subunitats CK2 β , CK2 β -2 i CK2 β -3 i es van fer assaigs de fosforilació *in vitro* utilitzant Rab17 i mRab17 com a substrats. Es comprova que l'holoenzim reconstituït amb CK2 β -3 es comporta com amb CK2 β -1, es a dir, que augmenta la fosforilació de Rab17. En canvi quan s'utilitza la subunitat CK2 β -2 pràcticament no s'observa fosforilació de Rab17. Tampoc els holoenzims reconstituïts amb CK2 β -2 i CK2 β -3 fosforilen mRab17 (Figura 12, dreta). Aquests resultats concorden amb els obtinguts pel sistema del doble híbrid, a on Rab17 interacciona amb les subunitats CK2 β -1 i CK2 β -3 però no amb CK2 β -2.

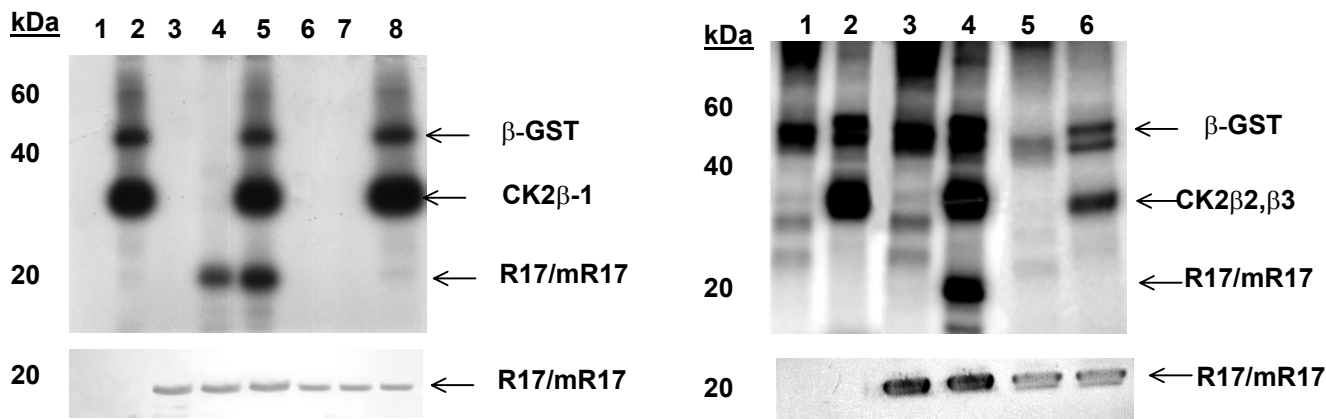


Figura 12: Fosforilació in vitro de la proteïna Rab17 per la proteïna quinasa CK2.

Panel esquerra: Autoradiografia, carril 1: CK2 α -1, carril 2: CK2 α -1, CK2 β 1-GST, carril 3: Rab17 carril 4: CK2 α -1, Rab17 carril 5: CK2 α -1,CK2 β 1-GST, Rab17, carril 6: mRab17, carril 7: CK2 α -1, mRab17 carril 8: CK2 α -1,CK2 β 1-GST, mRab17. A sota es mostra el Western blot de les mateixes mostres realitzat amb l'anticòs anti-Rab17.

Panel dret: Autoradiografia, carril 1: CK2 α -1, CK2 β 2-GST carril 2: CK2 α -1, CK2 β 3-GST carril 3: CK2 α -1, CK2 β 2-GST, Rab17 carril 4: CK2 α -1, CK2 β 3-GST, Rab17 carril 5: CK2 α -1, CK2 β 2-GST, mRab17 carril 6: CK2 α -1, CK2 β 3-GST, mRab17. A sota es mostra el Western blot de les mateixes mostres realitzat amb l'anticòs anti-Rab17.

La Rab17 és la proteïna més abundant i més fosforilada de l'embrió madur de 60 DAP (**D**ays **A**fter **P**ollination) i no està present en embrions joves (10-20 DAP), tal i com es mostra en l'anàlisi per Western blot realitzat al llarg de l'embriogènesi de blat de moro amb anticòs anti-Rab17 (Figura 13). A més de la banda de 20 kDa, es detecten bandes a 40 i 60 kDa que poden correspondre a dímers i trímers de la Rab17. Prèviament s'havia descrit que la capacitat de formar agregats de la Rab17 i que les formes oligomèriques es mantenen en condicions desnaturalitzants com SDS-PAGE o 4M urea (Mercè Figueras, tesi doctoral).

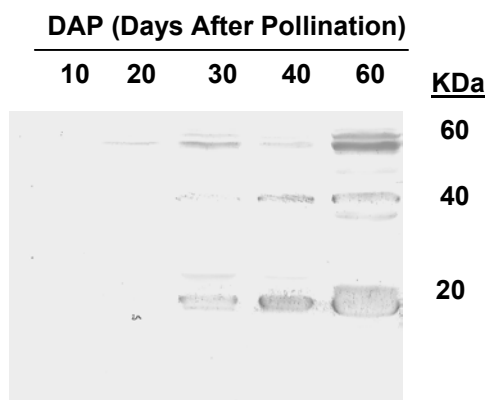


Figura 13: Acumulació de la proteïna Rab17 durant l'embriogènesi de blat de moro. Western blot amb l'anticòs anti-Rab17 d'extractes totals d'embrió de 20, 30, 40 i 60 DAP

Per l'estudi de la fosforilació de la proteïna Rab17 a la planta, es van utilitzar extractes proteics d'embrió madur (60 DAP) i d'embrió jove (15 DAP) i es van fer assaigs de fosforilació *in vitro* amb γ -³²GTP com a donador de fosfat (Figura 14A). També es va afegir Rab17 recombinant a extractes d'embrió jove i madur (carrils 2 i 4). A l'extracte d'embrió madur s'observa una banda fosforilada a l'alçada de 20 KDa, corresponent a la Rab17 endògena (carril 3). Aquesta banda no està present en l'embrió jove o 15 DAP (carril 1). La Rab17 exògena afegida està fosforilada tant en extractes joves com en madurs (carrils 2 i 4). D'aquestes dades es conclou que la proteïna Rab17 es fosforila en embrió madur per una proteïna quinasa capaç de utilitzar GTP com a donador de fosfat. Aquesta proteïna quinasa per tant, pot fosforilar tant la Rab17 endògena com la recombinant i està present en extractes joves i madurs de blat de moro.

Finalment, extractes d'embrió jove (15 DAP) i madur (60 DAP) es van fosforilar *in vitro* utilitzant γ -³²ATP i es van immunoprecipitar utilitzant anticòs anti-Rab17 (Figura 14 B,C). La immunoprecipitació de l'embrió madur mostra que la Rab17 endògena es fosforila també utilitzant ATP (Figura 14B). En extractes joves, la banda corresponent a Rab17 només apareix en el cas en que s'ha afegit Rab17 exògena (Figura 14C, carril 3).

De totes aquestes dades es pot concloure que tant la Rab17 endògena de blat de moro com la proteïna Rab17 recombinant es fosforilen per una proteïna quinasa present en els extractes joves i madurs de blat de moro capaç d'utilitzar tant ATP com GTP, com a donadors de fosfat, probablement, la proteïna quinasa CK2.

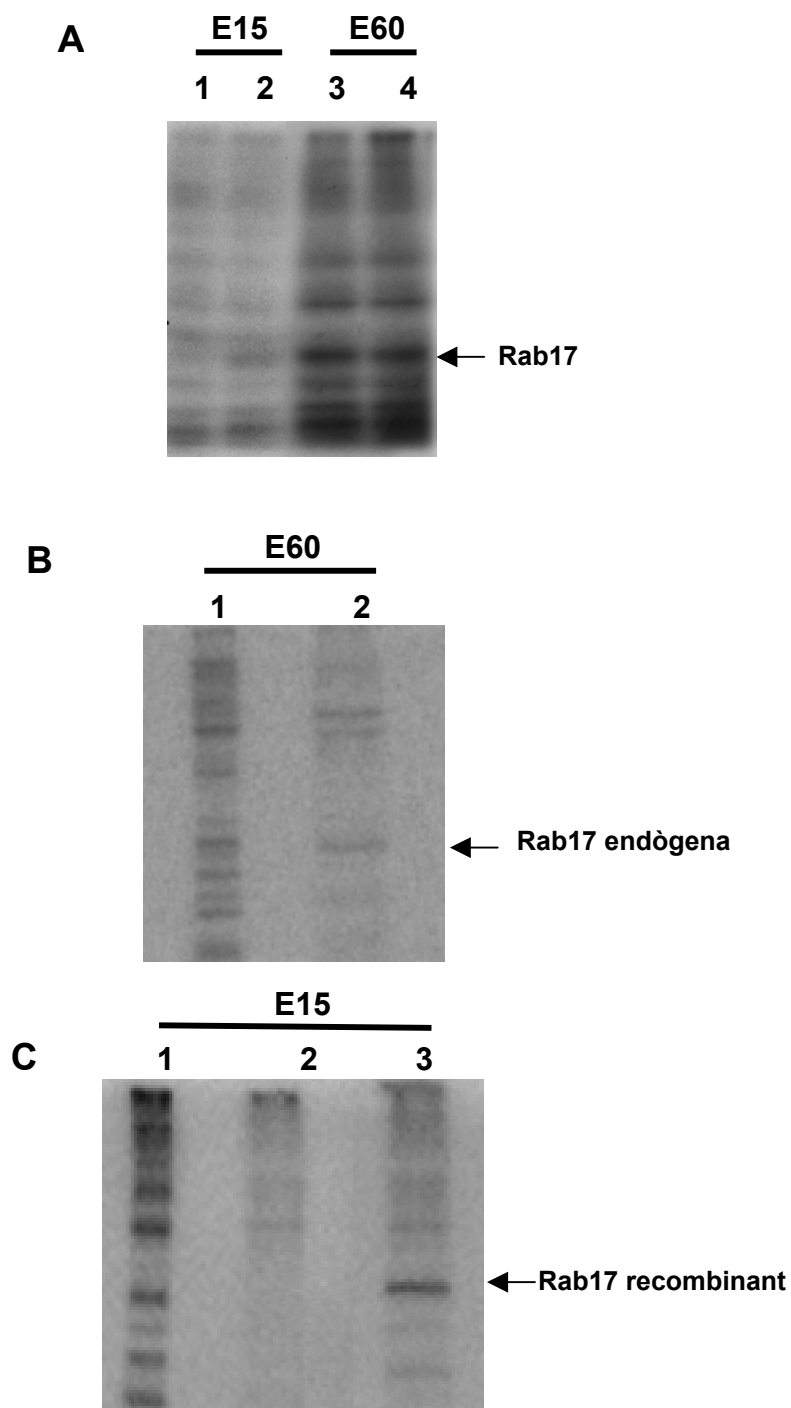


Figura 14: Assaig de fosforilació d'extractes d'embrió utilitzant γ -³²GTP i immunoprecipitació de la proteïna Rab17 fosforilada utilitzant γ -³²ATP. Panel A. Carril 1: extracte 15 DAP fosforilat, carril 2: extracte 15 DAP fosforilat i i 1 μ g Rab17 recombinant. carril 3: extracte 60 DAP fosforilat, carril 4: extracte 60 DAP fosforilat i i 1 μ g Rab17 recombinant. Panel B. Carril 1: extracte 60 DAP fosforilat, carril 2: extracte 60 DAP fosforilat i immunoprecipitat amb anticòs anti-Rab17. Panel C. Carril 1: extracte 15 DAP fosforilat, carril 2: immunoprecipitació extracte 15 DAP fosforilat, utilitzant l'anticòs anti-Rab17, carril 3: immunoprecipitació extracte 15 DAP fosforilat i 1 μ g Rab17 recombinant.