

## **CAPÍTOL II**

**Modulació de l'activitat CK2 durant el cicle de divisió cel.lular de les cèl.lules BY-2 de tabac.**

**Resum dels resultats presentats a l'article "Cell-cycle modulation of CK2 activity in tobacco BY-2 cells" *Plant Journal* (1997) 19, 665-666.**

En aquest treball es va estudiar l'expressió i l'activitat enzimàtica de la CK2 durant el cicle cel.lular i la corba de creixement de les cèl.lules BY-2 de tabac. Es van estudiar també els efectes que provocava en el cicle cel.lular la inhibició *in vivo* de l'activitat CK2, i es van determinar la concentració de poliamines lliures durant el cicle cel.lular i la corba de creixement.

Per abordar aquests estudis es van generar sondes de DNA específiques per a les subunitats  $\alpha$  i  $\beta$  de la CK2 de tabac, mitjançant l'amplificació per PCR de cDNA corresponent a la fase exponencial de creixement de les cèl.lules BY-2, i fent ús de oligonucleòtids degenerats per ambdues subunitats. L'obtenció i caracterització d'aquests clons es tracta al capítol 4 d'aquesta tesi.

Així mateix, es van expressar com a proteïnes de fusió amb la proteïna glutatió-S-transferasa (GST), les regions codificants dels gens ATCKA2 (Mizoguchi, 1993) i CKB2 (Collinge, 1994), corresponents a les subunitats CK2 $\alpha$  i CK2 $\beta$  d'*Arabidopsis* i que foren cedits pels Drs. K. Shinozaki (Tsukuba Life Science Center, Tsukuba, Japó) i J. C. Walker (Universitat de Missouri, Columbia, USA), respectivament. Mitjançant la immunització de conills amb les proteïnes de fusió, es van preparar anticossos específics contra les dues subunitats de la CK2, els quals reconeixien proteïnes de la mida esperada, 41 KDa, per a la CK2 $\alpha$ , i 29 KDa, per a la CK2 $\beta$ , en extractes totals de proteïna d'*Arabidopsis* i de tabac (Fig 1, a i b). L'especificitat de la immunoreacció es va comprovar en un experiment de competició, incubant els anticossos amb la proteïna utilitzada per a la immunització, com a etapa prèvia a la seva incubació amb els extractes de proteïna immobilitzats a membrana (Fig 1, c i d).

Per a l'estudi de l'expressió i l'activitat de la CK2 durant el cicle cel.lular es van realitzar experiments de sincronització de les cèl.lules BY-2 amb afidicolin. La determinació de l'activitat enzimàtica sobre el substrat caseïna i GTP, a intervals de 1 hora, va mostrar oscil.lacions al llarg del cicle cel.lular, que dibuixaven dos pics clars d'activitat durant un cicle complet (Fig 2, a). L'activitat CK2 ja era alta a la primera mesura, presa just després

del rentat de l'afidicolin, activitat que corresponia a l'inici de la fase S (*early S*). Aquest pic d'activitat es confirmava en la segona fase S de l'experiment, entre les hores 11 i 15, a la vegada que coincidia amb la inducció de l'expressió de la histona H4, que té lloc a la transició G1/S.

El segon pic d'activitat CK2 coincidia exactament amb el pic d'índex mitòtic, ja que l'activitat començava a augmentar a l'entrada de mitosi i assolía el valor màxim quan l'índex mitòtic era també màxim.

L'anàlisi de l'expressió de les subunitats de la CK2 a nivell de mRNA i de proteïna, per Northern blot i Western blot, respectivament, va demostrar que aquesta era constitutiva al llarg del cicle cel.lular (Fig 2, b i c). Aquests resultats demostraven que les oscil.lacions de l'activitat CK2 al llarg del cicle no eren degudes a una regulació transcripcional, ni a una diferent estabilitat dels mRNAs, ni tampoc existia regulació a nivell de la traducció.

Per tal de verificar aquests resultats, es va realitzar un experiment de sincronització doble amb afidicolin i propizamida. Amb aquest tractament, les cèl.lules queden bloquejades a prometafase. Les activitats enzimàtiques, mesurades utilitzant el pèptid específic RRRDDDTDDD com a substrat i GTP com a donador de fosfat, seguien el perfil descrit anteriorment per a la sincronització amb afidicolin sola. Així, s'observaven dos pics d'activitat CK2, a mitosi i a G1/S, aquest últim coincidint amb la inducció de l'expressió de la histona H4 (Fig 3).

A continuació, es va estudiar la regulació de la CK2 durant la corba de creixement de les cèl.lules BY-2, amb una durada de 7 dies, al final del quals s'obté la saturació del cultiu. En aquesta línia cel.lular, la proliferació cel.lular comença molt ràpidament després del subcultiu i s'assoleixen índex mitòtics del 5 al 8% entre el primer i quart dies de cultiu. L'activitat CK2, mesurada a intervals de 24 hores, va revelar que aquesta augmentava molt ràpidament durant les primeres 24 hores i després disminuïa progressivament (Fig 4, a).

Les dades d'activitat, però, es corresponien només parcialment amb els resultats de Northern i Western blot. La transcripció dels gens de les dues subunitats augmentava fins el tercer dia de cultiu, i posteriorment disminuïa, coincidint amb la davallada de l'índex mitòtic (Fig 4, b). L'anàlisi per Western blot revelava que els polipèptids de la subunitat CK2 $\alpha$  es detectaven al llarg de tota la corba de creixement, fins i tot en la fase

estacionària, mentre que els polipèptids de la CK2 $\beta$  es detectaven únicament durant els dos primers dies de cultiu (Fig 4, c). El perfil d'activitat CK2, que presenta el valor màxim el dia 1, coincideix perfectament amb l'increment de polipèptid per a la subunitat  $\beta$ , la qual cosa suggereix que aquesta subunitat pot representar el regulador fisiològic més important de l'activitat CK2 a les plantes, tal com passa en els animals. No obstant, la subunitat CK2 $\alpha$  sola té una activitat catalítica *in vitro* considerable el dia 3 després del subcultiu, quan la subunitat CK2 $\beta$  ja ha desaparegut. A més, el valor d'activitat del dia 3 és comparable amb el que presenta el dia 0, just després del subcultiu. Aquestes dades suggereixen que pugui existir un mecanisme post-transcripcional que regularia l'activitat CK2 de forma addicional a la presència de subunitat  $\beta$ , i que seria responsable de la inactivació de l'enzim a partir del quart dia de cultiu.

El següent objectiu que ens vam plantejar va ser el d'estudiar els efectes que provocava sobre el cicle cel.lular la inhibició *in vivo* de l'activitat CK2. Es disposava de l'inhibidor específic 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole (cedit pel Dr. D. Shugar, Universitat de Warsaw, Polònia), que va mostrar un efecte inhibitori de la CK2 recombinant d'*Arabidopsis* del 99%, amb una  $K_i = 0.5 \mu\text{M}$ , equivalent a la descrita pel llevat (Fig 5).

L'inhibidor es va afegir a diferents etapes del cicle, en cultius sincronitzats amb afidicolin sola o amb afidicolin i propizamida, per tal de poder assegurar que els efectes observats no depenien del punt on es bloquejava el cicle ni de la droga utilitzada per a la sincronització, sinó que eren efectes reals provocats per la inhibició de l'activitat CK2. Independentment de l'etapa del cicle on s'afegia l'inhibidor, l'activitat CK2 dels extractes cel.lulars quedava inhibida completament i es bloquejava la progressió del cicle cel.lular. No obstant, s'observaven diferents fenotips cel.lulars com a conseqüència de l'arrest en diferents punts del cicle, i que es detallen a continuació.

L'addició de l'inhibidor a la primera part de la fase S (hora 0, just després del rentat de l'afidicolin), impedia que les cèl.lules completessin la replicació del DNA i aquestes morien en un màxim de 8 hores. El fenotip d'arrest que s'observava era de cèl.lules en fase S (Fig 6, a i b).

Quan l'inhibidor s'afegia a la fase G2 del cicle (hora 4 després del rentat de l'afidicolin) la letalitat era del 100% en només 2 hores i cap de les cèl·lules era capaç de començar la mitosi. La morfologia nuclear era de nucli en G2 (Fig 6, c i d).

L'efecte més sorprenent s'observava quan l'inhibidor s'afegia a la fase G1 (hora 10 després del rentat de l'afidicolin). En aquest cas, les cèl·lules podien iniciar la replicació al mateix temps i amb el mateix pendent que un cultiu control (sense inhibidor), però al cap de 3 hores d'haver-la començat, el procés s'avortava. El fenotip d'arrest que s'observava recordava al d'una profase, ja que la cromatina havia condensat, però amb la diferència que no s'havia trencat la membrana nuclear (Fig 6, e-i). A més, les cèl·lules romanien viables fins i tot al cap de 24 hores d'haver afegit l'inhibidor. Aquest resultat revelava que l'addició de l'inhibidor a G1 provocava una inhibició de l'activitat CK2 a G1/S, així com una condensació prematura de la cromatina en els nuclis en replicació, i suggeria que podia afectar el funcionament del *checkpoint* de G2/M.

Com a primera aproximació en l'estudi dels mecanismes post-traduccionals responsables de la modulació de l'activitat CK2 durant el cicle cel·lular, es van determinar les concentracions de poliamines lliures, espermina, espermidina i putrescina, en extractes cel·lulars sincronitzats i en la corba de creixement. Les poliamines són els moduladors post-traduccionals de la CK2 més potents i es troben implicades en el manteniment de l'estructura de la proteïna i en l'estimulació de l'activitat enzimàtica.

En cèl·lules sincronitzades amb afidicolin, el contingut de poliamines oscil·lava durant el cicle cel·lular (Fig 7, a). Breument, les concentracions de les tres poliamines analitzades eren altes després del rentat de l'afidicolin, disminuïen a G2, tornaven a augmentar paral·lelament a l'índex mitòtic, disminuïen a la segona part de la mitosi i augmentaven una altra vegada a G1/S. Aquests resultats es van confirmar en experiments de sincronització doble (Fig 7, b) i, en conjunt, mostraven paral·lelismes amb els pics d'activitat CK2 (Fig 2).

A la corba de creixement, s'observava un increment considerable del contingut de poliamines lliures, com a resposta al subcultiu en medi fresc (Fig 7, c). Les concentracions eren màximes els dies 1 i 2 després del subcultiu, paral·lelament al pic d'activitat CK2 i a la presència de polipèptid  $\beta$  detectada per Western blot. Aquest resultat suggeria que hi havia una inducció de la síntesi de poliamines lliures en resposta al subcultiu en medi fresc, tal com s'havia també observat amb l'activitat CK2.

## Cell-cycle modulation of CK2 activity in tobacco BY-2 cells<sup>†</sup>

M. Carme Espunya<sup>1</sup>, Bruno Combettes<sup>2</sup>, Josep Dot<sup>3</sup>,  
Nicole Chaubet-Gigot<sup>2</sup> and M. Carmen Martínez<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular,  
Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de  
Ciencias, and <sup>2</sup>Facultad de Medicina, 08193 Bellaterra,  
Barcelona, Spain, and

<sup>3</sup>Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Centre  
National de la Recherche Scientifique, 12 Rue du Général  
Zimmer, 67084 Strasbourg Cedex, France

### Summary

Protein kinase CK2 is an ubiquitous Ser/Thr kinase essential for cell growth. We have used the highly synchronizable tobacco BY-2 cell line to investigate whether CK2 activity and expression are regulated in a cell cycle phase-dependent manner in higher plants. Specific cDNA probes for tobacco CK2 $\alpha$  and  $\beta$  subunits, respectively, and polyclonal antibodies recognising  $\alpha$  and  $\beta$  subunits separately, were obtained to determine mRNA and protein levels of both subunits. Our results show that CK2 activity oscillates throughout the cell cycle, peaking at G1/S and M phases, due to a post-translational regulation of the tetrameric enzyme. Additional levels of control of CK2 expression operate in relation to the proliferative state of the cells, including differential accumulation of  $\alpha$  and  $\beta$  transcripts and post-transcriptional regulation of protein levels ( $\beta$  subunit). Moreover, *in vivo* inhibition of CK2 activity corroborates the requirement of the functional CK2 to progress through the cell division cycle, and suggests that CK2 might play an important role at the G2/M checkpoint.

### Introduction

Protein kinase CK2, formerly known as casein kinase II, is a Ser/Thr kinase widely distributed in living cells. The classical reported structure is that of a tetrameric enzyme,  $\alpha_2\beta_2$ , where  $\alpha$  is the catalytic subunit and  $\beta$  is the regulatory subunit, that acts by modulating both substrate specificity and response to different effectors of the holoenzyme. The catalytic subunit is coded by two genes ( $\alpha$  and  $\alpha'$ ) in most eukaryotes, whilst the  $\beta$  subunit is a single-copy gene in all organisms analysed to date, except for *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana* (Bidway *et al.*, 1994; Collinge and Walker, 1994; Sugano

*et al.*, 1998). However, in the last few years, several variants of this classical structure have been found in a variety of biological systems. First, free monomeric CK2 $\alpha$  is relatively common in higher plants (Dobrowolska *et al.*, 1992; Espunya and Martínez, 1997; Klimczak and Cashmore, 1994) and has also been reported in other eukaryotes (Ospina *et al.*, 1992). Second, associations of CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$  with other distinct polypeptides have been reported (Boldyreff and Issinger, 1997; Chen *et al.*, 1997; Hériché *et al.*, 1997; Willert *et al.*, 1997), suggesting roles in the cell other than subunits of the tetrameric CK2.

This complex structural situation makes it difficult to study the biological function of CK2. Most of the polypeptides found in association with the  $\alpha$  subunit are also its substrates, but they show a wide range of functional characteristics and, to date, the specific biological role of CK2 is still obscure. One of the functions generally attributed to CK2 is as a key regulator of cell growth. This was originally based on the observation that CK2 activity was elevated in rapidly dividing human cells and in proliferating tumour tissue (Issinger, 1993). Furthermore, CK2 activity increased after serum stimulation in human fibroblasts (Carroll and Marshak, 1989) and in response to stimulation of cells by mitogens, although these last effects have been difficult to reproduce (Litchfield *et al.*, 1994). In addition, many CK2 substrates are growth regulatory proteins, such as oncogenes, tumour suppressor protein p53, serum response factor, topoisomerase, etc. (Allende and Allende, 1995; Meisner and Czech, 1991).

More direct evidence of the involvement of CK2 in cell cycle control has come from *Saccharomyces cerevisiae* mutants and from microinjection experiments in different experimental cell systems. Disruption of CKA1 and CKA2 genes in *S. cerevisiae* resulted in a complete loss of viability with a phenotype of cell-cycle arrest (Padmanabha *et al.*, 1990). Furthermore, *S. cerevisiae* mutant strains temperature-sensitive for CK2 $\alpha$  exhibited a dual arrest phenotype at the restrictive temperature, at G1 and G2/M phases of the cell cycle (Hanna *et al.*, 1995). In mammalian cells, microinjection of antibodies and antisense oligonucleotides against  $\beta$  subunit into G0-synchronised human fibroblasts inhibits cell cycle progression in response to serum stimulation and provokes cell arrest at G0, early G1 and G1/S phases of the cell cycle (Pepperkok *et al.*, 1994).

In plants, CK2 has been barely studied and no systematic work has been done to investigate its involvement in cell proliferation. One cDNA encoding the catalytic subunit in maize (Dobrowolska *et al.*, 1991) and two in *A. thaliana* (Mizoguchi *et al.*, 1993) have been reported. In addition, three cDNAs corresponding to regulatory subunit homologues have been cloned from *A. thaliana* (Collinge and

Received 18 June 1999; accepted 21 July 1999.

\*For correspondence (fax +34 93 5811264;  
e-mail carmen.martinez@uab.es).

<sup>†</sup>This manuscript is dedicated to the memory of Dr Claude Gigot.

Walker, 1994; Sugano *et al.*, 1998), indicating a degree of complexity in this gene family not found in animal systems. In the present work, we have used the tobacco BY-2 cells to investigate CK2 activity and CK2 genes expression throughout the cell division cycle. BY-2 cells are highly synchronizable and therefore a suitable system to study the control of cell division cycle in plants. Using a PCR-based approach, we have generated specific DNA probes for tobacco CK2 $\alpha$  and  $\beta$  subunits, respectively, that allowed us to determine their mRNA levels in relation to the proliferative state of the cells. Furthermore, we have obtained polyclonal antibodies specific for the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits separately, that were used to quantify the levels of both proteins in the cell fractions. Our results show that CK2 activity oscillates throughout the cell cycle, peaking at G1/S and M phases, due to a post-translational regulation of the tetrameric enzyme. Additional levels of control of CK2 expression operate in relation to the proliferative state of the cells, including increased accumulation of  $\alpha$  and  $\beta$  transcripts when cells go from a resting to a proliferating state and post-transcriptional regulation of protein levels ( $\beta$  subunit) at the stationary phase. Moreover, *in vivo* inhibition of CK2 activity corroborates the requirement of functional CK2 to progress through the cell division cycle and suggests that CK2 might play an important role at the G2/M checkpoint.

## Results

### *Isolation of partial clones for tobacco CK2 $\alpha$ and $\beta$ homologues and generation of specific antibodies*

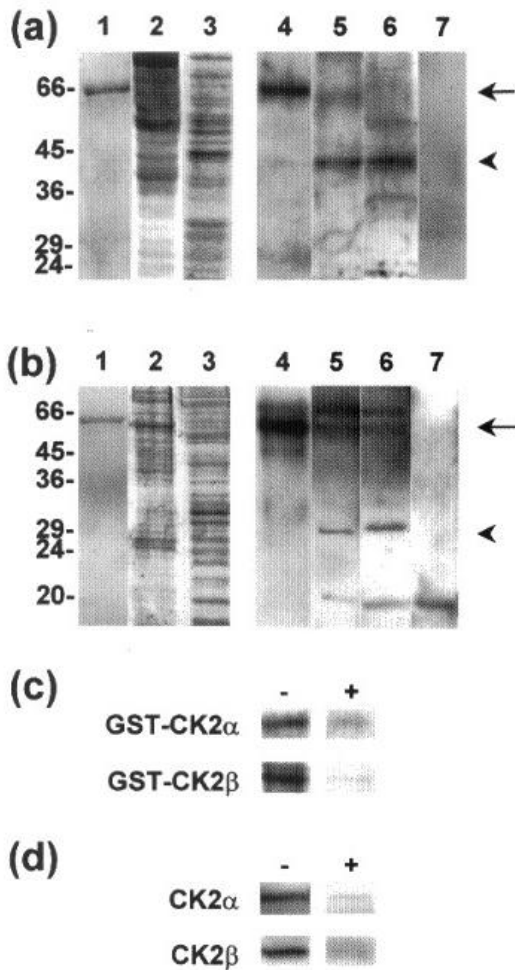
In order to have homologous probes to analyse CK2 mRNA levels throughout the cell cycle, we first undertook the cloning of partial sequences corresponding to the tobacco CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$  subunits. Sequences from human, yeast, *Drosophila*, *C. elegans*, *Xenopus* and *A. thaliana* were aligned, and degenerated oligonucleotides were designed based on the sequence of the most conserved regions. PCR amplification was performed on cDNA from exponentially growing BY-2 cells and gave one unique product of the expected size in each of the two separate reactions set up with specific primers for CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$  subunits. The deduced amino acid sequence of several inserts demonstrated the presence of two different clones with homology to the CK2 $\alpha$  subunit (91–95% identity to *Arabidopsis* CK2 $\alpha$  subunits and 97% identity between them), and three different clones with homology to the CK2 $\beta$  subunit (82–94% identity to *Arabidopsis* CK2 $\beta$  subunits and 83–94% identity between them) (results not shown), confirming the heterogeneity of both CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$  subunits in higher plants. For subsequent studies, one clone corresponding to the  $\alpha$  subunit homologue (*ntcka11*) and one to the  $\beta$  subunit homologue (*ntckb62*)

were used as probes in Northern analysis. In the conditions used for hybridisation and washing, the probes reveal all the members of the  $\alpha$  and  $\beta$  gene families, respectively.

We also produced polyclonal antibodies against CK2 $\alpha$  and  $\beta$  subunits separately (see Experimental procedures) to be able to quantify the levels of both proteins by Western analysis. CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$  antibodies recognised a single band of the expected size (41 000 Da and 29 000 Da, respectively) in both *Arabidopsis* and BY-2 cell extracts (Figure 1a,b, lanes 5 and 6, respectively), that were not detected using the pre-immune sera (Figure 1a,b, lane 7). Those immunoreactions were specific because the binding of the antibodies could be competed with the protein used for immunisation (Figure 1c,d).

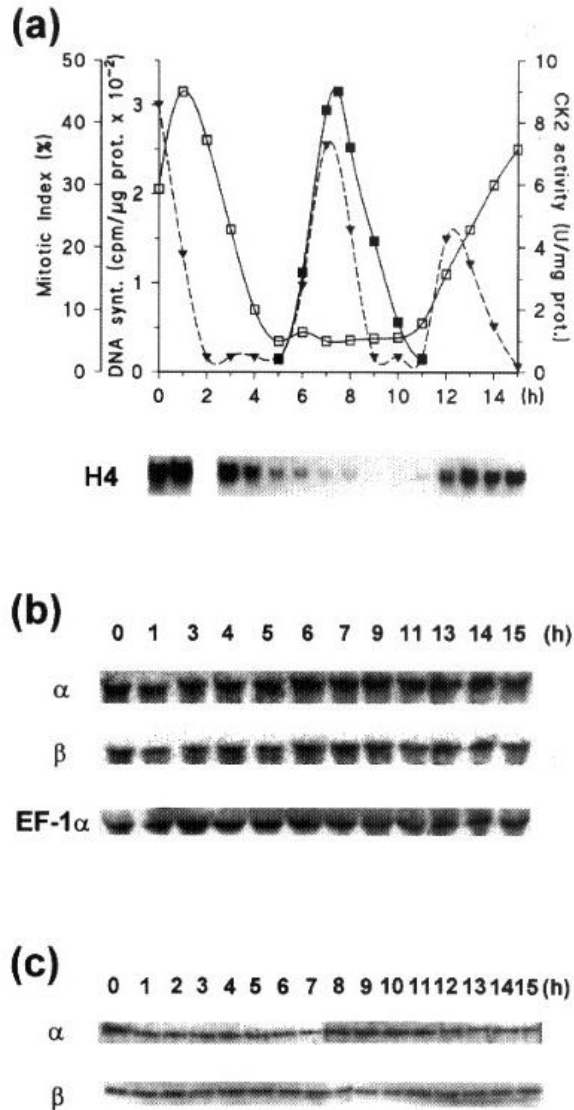
### *Cell-cycle regulation of CK2 in tobacco BY-2 cells*

Tobacco BY-2 cells were synchronised with aphidicolin, according to the protocol originally developed by Nagata *et al.* (1992). After removing aphidicolin, cells were harvested every hour and DNA synthesis and mitotic index were monitored to identify S- and M-phase, respectively. A mitotic index higher than 40% was obtained in a typical experiment (Figure 2a). Determination of CK2 enzymatic activity at 1 h time intervals in synchronised cells showed that it oscillated throughout the cell cycle, with two clear peaks of activity during one complete cycle (Figure 2a, dashed line). CK2 activity was already high at the time of releasing the cells from aphidicolin (early S), suggesting that the first peak occurred before that point. This was corroborated by observing the second S-phase (S') in the same experiment and by comparing the appearance of CK2 activity with the pattern of histone H4 expression. Histone H4 mRNA accumulation is induced at G1/S and remains high during S-phase (Reichheld *et al.*, 1995) and we observed that CK2 activity started to rise exactly at the same time as H4 induction, although it was restricted to a much narrower window. From these results we concluded that the first peak of CK2 activity occurred before the point of aphidicolin block, i.e. in G1/S or very early S, showing very low values afterwards (during most S-phase). The second peak of CK2 activity was strictly coincidental with the peak of mitotic index, indicating that CK2 activity rises at the entry to M-phase and peaks in M-phase. Analysis of mRNA accumulation for both subunits ( $\alpha$  and  $\beta$ ) revealed steady levels throughout the cell cycle (Figure 2b), indicating that the changes in CK2 activity were not due to a transcriptional control of the gene expression. Furthermore, Figure 2(c) shows steady levels of CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$  polypeptides throughout the cell cycle, which suggests that neither differential mRNA stability or translational control are responsible for the oscillations in CK2 activity.



**Figure 1.** Specificity of the antibodies against CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$  subunits. Western blot analysis with the antisera produced against the recombinant proteins GST-CK2 $\alpha'$  (dilution 1:5000) (a) and GST-CK2 $\beta'$  (dilution 1:1000) (b). Protein samples were electrophoresed on either 10% PAGE-SDS (a) or 12.5% PAGE-SDS (b). Left panels (lanes 1–3) shows the Coomassie-blue stained membranes and right panels (lanes 4–7) the blot analysis. Bacterially produced GST-CK2 $\alpha'$  and GST-CK2 $\beta'$  (lanes 1 and 4) and 15  $\mu$ g of crude protein extracts from *Arabidopsis* plants (lanes 2 and 5) or tobacco BY-2 cells (lanes 3 and 6) were used. Lane 7 represents the blot analysis of BY-2 cell extracts using the pre-immune sera. The positions of the molecular markers are indicated in kDa on the left margin. Arrows indicate the positions of the GST-CK2 $\alpha'$  and GST-CK2 $\beta'$  proteins, respectively, and arrowheads the positions of the specific bands of the expected size, respectively. (c) and (d) show competition experiments for the antibodies binding. The corresponding fusion proteins (c) or 15  $\mu$ g of BY-2 crude extract cells (d) were loaded on the gel and the membranes incubated with the corresponding antibodies pre-incubated (+) or not (-) with 30  $\mu$ g of the protein used for immunisation.

In order to confirm the results shown above and rule out a secondary effect from the aphidicolin treatment, we performed a double synchronisation experiment by adding propyzamide to cells 5 h after the release from the aphidicolin block. With this treatment, cells are blocked at



**Figure 2.** Time course of CK2 activity and expression in synchronously dividing BY-2 cells after release from aphidicolin block. Cells arrested with aphidicolin ( $3 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) were released from the block (0 h) and grown synchronously for one complete cell cycle. (a)  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation ( $\square$ ), mitotic index ( $\blacksquare$ ), CK2 activity ( $\blacktriangledown$ , dashed line) and transcript levels of histone H4. (b) Northern blot analysis (20  $\mu$ g total RNA in each lane) showing transcript levels for  $\alpha$  (*ntckb11* probe) and  $\beta$  subunits (*ntckb62* probe), and for the loading control (EF-1 $\alpha$ ). (c) Western blot analysis showing protein levels for CK2 $\alpha$  and  $\beta$  subunits. Protein samples (15  $\mu$ g) were subjected to 10% PAGE-SDS electrophoresis in duplicate and the membranes separately developed with the corresponding  $\alpha$  or  $\beta$  antibodies in the same conditions as in Figure 1. CK2 activity was monitored by measuring  $^{32}\text{P}$  incorporation into  $\beta$ -casein using [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]-GTP as phosphate donor.

prometaphase (Samuels *et al.*, 1998) and resume the cycle when the drug is thoroughly washed off. We achieved typically 80% mitotic index using this protocol. To ensure