

CAPÍTOL IV:

Materials i mètodes

1. OBTENCIÓ DE CLONS PARCIALS DE LES SUBUNITATS **a** I **b** DE LA CK2 DE TABAC.

1.1 Amplificació de seqüències de cDNA mitjançant la reacció en cadena de la Taq polimerasa (PCR).

En la reacció en cadena de la polimerasa, es va utilitzar com a DNA motlle, cDNA preparat a partir d'un cultiu en creixement de cèl.lules BY-2 de tabac, que va ser proporcionat per la Dra. Nicole Chaubet (IBMP, CNRS, Strasbourg, França). Es van dissenyar oligonucleòtids degerats que corresponien a regions altament conservades en els gens coneguts per altres espècies (veure Fig 1 de l'apartat de Resultats d'aquest capítol). La seqüència dels oligonucleòtids utilitzats fou la següent:

- per a l'amplificació de la CK2 α ,
 - oligonucleòtid 5': corresponia a la seqüència d'aminoàcids DYWDYE localitzada entre les posicions 17 i 22 del gen ATCKA1 d'*Arabidopsis* i tenia la seqüència GCGGGATCCGANTA(C/T)TGGGA(C/T)GA(A/G).
 - oligonucleòtid 3': corresponia a la seqüència d'aminoàcids KPHNVMI, localitzada entre les posicions 153 i 159 del gen ATCKA1 d'*Arabidopsis*, i tenia la seqüència GCGGAATTCATCATNAC(G/A)TT(G/A)TGNGG(C/T).

- per a l'amplificació de la CK2 β ,
 - oligonucleòtid 5': corresponia a la seqüència d'aminoàcids DDYIQD, localitzada entre les posicions 117 i 122 del gen CKB1 d'*Arabidopsis*, amb seqüència GCGGGATCCGANGA(C/T)TA(C/T)AT(A/C/T)CA(A/G)GA(C/T).
 - oligonucleòtid 3': corresponia a la seqüència d'aminoàcids AEMLYG, localitzada entre les posicions 168 i 173 del gen CKB1 d'*Arabidopsis*, i tenia la seqüència GCGGAATTC(C/G)TANA(G/A)CAT(T/ C)TCNGC.

Per tal de facilitar el subclonatge dels productes de PCR en el vector pBlueScript II KS (+), aquests oligonucleòtids contenien dianes de restricció pels enzims BamHI (oligonucleòtids 5') i EcoRI (oligonucleòtids 3'). A més, per a estabilitzar l'*annealing*, la seqüència s'iniciava amb el triplet GCG.

Les concentracions finals dels components de la reacció de PCR van ser: 1 x amortidor Taq, 0.2 mM de cada dNTP, 1 μ M de cada oligonucleòtid i 2 U de Taq polimerasa, en un volum final de 50 μ l. La barreja de components es va cobrir amb 50 μ l d'oli mineral.

La reacció de PCR constava de les següents etapes:

hot start: 94°C 5 minuts
25 cicles de: 94°C 1 minut
 46°C 2 minuts
 72°C 6 minuts

El resultat de la reacció de PCR es va analitzar en una electroforesi en gel d'agarosa al 2%, tenyida amb bromur d'etidi i fotografiada sota llum ultraviolada.

1.2. Subclonatge dels productes de PCR

Els productes de PCR per a cada una de les reaccions es van preparar per a ser clonats al vector pBlueScript II KS(+), d'Stratagene (Fig 1). Les bandes corresponents es van purificar a partir d'una electroforesi preparativa, seguida d'electrolució a dins d'un sac de diàlisi. A continuació es van digerir amb els enzims de restricció BamHI i EcoRI a 37°C durant la nit. El plasmidi es va digerir amb els mateixos enzims i es va defosforilar amb 1 μ l de CIP a 37°C durant 20 minuts, seguit de 56°C durant 20 minuts més. Inserts i plasmidi es van fenolitzar i precipitar amb etanol.

La concentració dels inserts i del plasmidi es va estimar en un gel d'agarosa, comparant la intensitat de banda amb la d'una banda d'un marcador de longitud similar i quantitat coneguda. Alternativament, es van determinar a partir de l'Absorbància a 260 nm (1 u.a. equival a 50 μ g/ml de DNA doble cadena).

La reacció de lligació, amb T4 DNA lligasa, es va realitzar a una relació molar 1:3 (vector:insert), amb 20 ng de plasmidi, i es va dur a terme durant 6 hores a temperatura ambient. La reacció de lligació es va fenolitzar i precipitar amb etanol. El producte de la lligació es va introduir per electroporació (12.5 Kv/cm) a la soca d'*E. coli* DH5 α , amb un electroporador GenePulser II System, de BioRad. Finalment es va plaquejar sobre medi LB en presència de 75 μ g/ml d'ampicil·lina i 40 μ g/ml de X-gal i es van seleccionar varies colònies recombinants blanques de color blanc. La presència d'insert en les colònies seleccionades es va comprovar per digestió amb els enzims de restricció BamHI i EcoRI.

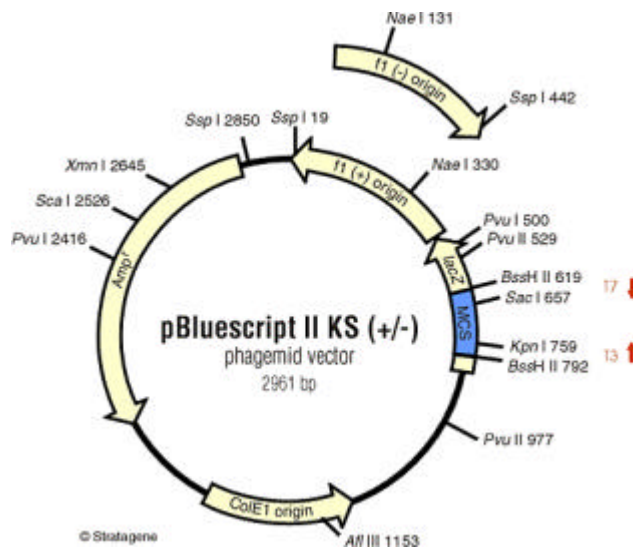


Fig 1: Mapa del vector *pBluescript II KS(+)*, utilitzat en el clonatge dels productes de PCR. (Extret de la web <http://www.stratagene.com>)

1.3. Seqüenciació i anàlisi dels productes de PCR

Els inserts dels plasmidis recombinants seleccionats es van seqüenciar al Servei de Seqüenciació de l'Institut de Biologie Moleculaire des Plantes, d'Estrasburg, França, on disposaven d'un seqüenciador automàtic ABI 373A Stretch, d'Applied Biosystems, amb detecció per fluorescència. La reacció de seqüenciació es va fer a partir de 0.5 µg de DNA, utilitzant com a encebadors de la reacció, oligonucleòtids complementaris als promotors T3 i T7, presents a la seqüència del vector.

Les seqüències es van analitzar fent ús de les eines blastn i blastx dels programes d'anàlisi de seqüències, disponibles a la web del European Molecular Biology Laboratory: <http://www.embl-heidelberg.de>.

2. ESTUDIS DE CROSS-HIBRIDACIÓ ENTRE ELS DIFERENTS PRODUCTES DE PCR CORRESPONENTS A LES SUBUNITATS **a** I **b**, DE LA CK2 DE TABAC: ESTABLIMENT DE LES CONDICIONS ÒPTIMES D'HIBRIDACIÓ.

2.1. Preparació de les mostres i transferència a membrana

Per al procediment experimental es van seguir les indicacions que apareixen al Current Protocols in Molecular Biology (Brown, 1994). Es va optar per a la utilització de membranes de niló carregades positivament (Schleicher and Schuell). Aquest tipus de membranes tenia l'avantatge d'unir el DNA de forma covalent a pH alcalí. La dilució dels DNAs en un tampó bàsic provocava, per una part, la seva desnaturalització i, per l'altra, facilitava la seva unió a la membrana.

A partir de DNA plasmídic que contenia els productes de PCR clonats (ntcka10, ntcka11, ntckb6, ntckb7 i ntckb8), es van fer les dilucions apropiades per a disposar finalment de 2 a 5 ng de cada un d'ells, en un volum final de 100 µl. Aquest volum contenia també concentracions finals de 0.4 M NaOH i 10 mM EDTA. Les mostres es van desnaturalitzar per calor a 100°C durant 10 minuts i seguidament van ser refredades en gel.

La membrana es va preparar per a la transferència submergint-la en aigua destil.lada durant 10 minuts. Es va col.locar la membrana en un aparell d'*Slot Blot* (model PR600, Hoefer Scientific Instruments) i es va connectar el sistema al buit. Els pous que havien de contenir les mostres es van rentar amb 500 µl d'aigua destil.lada i es va deixar que fossin succionats pel buit. A continuació, es van aplicar les mostres i quan van estar totalment succionades es van rentar els pous amb 500 µl de solució 0.4M NaOH. Amb aquest volum també succionat, es va desfer el buit, es va desmuntar l'aparell i, finalment, es va rentar la membrana amb 2 x SSC i es va deixar secar a l'aire.

2.2. Marcatge radioactiu de les sondes

Es van escollir com a sondes per a la hibridació, els productes de PCR ntcka10, per a la CK2 α , i ntckb8, per a la CK2 β . El marcatge radioactiu de les sondes es va realitzar segons el mètode de *random primer*, amb el *kit* comercial Prime-a-Gene (Promega, USA). 25 ng d'insert van ser desnaturalitzats per calor i es van incubar en presència de 1 x tampó de marcatge (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 200 mM Hepes pH 6.6 i 5.2 A₂₆₀ unitats/ml d'hexanucleòtids a l'atzar), 20 μ M de cada dNTP no marcat, 400 μ g/ml de BSA acetilada, 5 unitats de Klenow i 5 μ Ci de [α -32P]dCTP (3000 Ci/mmol; Amersham Pharmacia Biotech), en un volum final de 50 μ l, durant 2 hores a 37°C. La reacció s'aturava afegint-hi 2 μ l de 0.5M EDTA.

Per a l'eliminació dels nucleòtids i hexanucleòtids no incorporats en el DNA sintetitzat de nou, que podrien interferir en la hibridació, es van utilitzar les columnes de gel filtració MicroSpin Columns Sephacryl S-200 HR, d'Amersham Pharmacia Biotech. Seguint les instruccions del proveïdor, es va empaquetar la resina per centrifugació a 735 x g durant 1 minut. A continuació, es van aplicar els 50 μ l de la reacció de marcatge sobre la reina i es va centrifugar a 735 x g durant 2 minuts. El producte de la purificació es recollia en un tub eppendorf col.locat a la sortida de la columna.

El percentatge d'incorporació de nucleòtids, que era reflex del rendiment de la reacció de marcatge i de l'activitat específica de la sonda, es mesurava en un comptador de centelleig (model 1211 Minibeta, LKB): 2 μ l de la reacció de marcatge, abans i després de purificar, es dipositaven sobre paper d'intercanvi iònic DE81 (Whatman) i s'introduïen al comptador de centelleig. A partir del valor de cpm o comptes per minut, es calculaven els cpm totals de la sonda i també el rendiment del marcatge.

2.3. Hibridació, rentats i exposició. Determinació de la temperatura d'hibridació: càlcul de la T_m

Les membranes amb els DNAs immobilitzats es van pre-hibridar a 65°C durant 2 hores, en 10 ml de tampó 0.2 M Na₂HPO₄ pH 7.2, 1 mM EDTA, 1% BSA i 7% SDS. La hibridació es va realitzar en 10 ml del mateix tampó al qual se l'hi havia afegit la sonda marcada (cpm

totals > 20×10^6), prèviament desnaturalitzada per calor. La hibridació es va dur a terme a 65°C durant 16 hores.

Els primers rentats de les membranes es van realitzar a 65° amb una solució de 2 x SSC, 0.5% SDS, durant 1 hora, amb un canvi de solució. Seguidament, es van autoradiografiar per contacte amb una placa Imaging Screen Cassette-BI (Bio-Rad), durant 45 minuts i les imatges es van obtenir per lectura de la placa amb el sistema Molecular Imager System GS-525 (Bio-Rad), fent ús del software Molecular Analyst 1.5 (Bio-Rad).

A continuació, es va fer un segon rentat, de major estringència, amb una solució de 0.2 x SSC, 0.5 % SDS, a 65°C durant 1 hora, amb un canvi de solució. Les membranes es autoradiografiar i visualitzar de la mateixa manera que en el cas anterior.

Les condicions d'hibridació i rentat de les sondes ntcka10 i ntckb8, a 65°C , es resumeix en el següent esquema:

sonda	% G+C	Longitud sonda	Tm hibridació	Tm 1er rentat	Tm 2on rentat	severitat hibridació	severitat 1er rentat	severitat 2on rentat
ntcka10	38.8	427	90.1 °C	88.0 °C	71.4 °C	Tm - 25	Tm - 23	Tm - 6
ntckb8	45.7	164	90.6 °C	88.6 °C	72.0 °C	Tm - 25	Tm - 23	Tm - 7

3. CRIBATGE D'UNA BIBLIOTECA DE cDNA DE CÈL·LULES BY2 DE TABAC

3.1. Característiques de la biblioteca de cDNA utilitzada

El vector ZAP Express està dissenyat per permetre tant l'expressió procariota com eucariota. Conté 17 dianes de restricció úniques i permet clonar inserts de fins a 12 Kb de longitud. El cribatge es pot dur a terme utilitzant tant sondes de DNA com anticossos. Els fags que incorporen la construcció desitjada poden ser sotmesos posteriorment a excisió *in vivo* i els inserts es recuperen clonats en el fàgmid pBK-CMV, que és resistent a kanamicina. El fàgmid pBK-CMV conté l'origen de replicació del fag filamentós f1, que permet el rescat de DNA de cadena senzilla quan la soca hoste és co-infectada amb un fag *helper*. A la Figura 2 es mostra esquemàticament el diagrama de processos necessaris per al cribatge de la biblioteca, així com els mapes dels vectors ZAP Express i pBK-CMV.

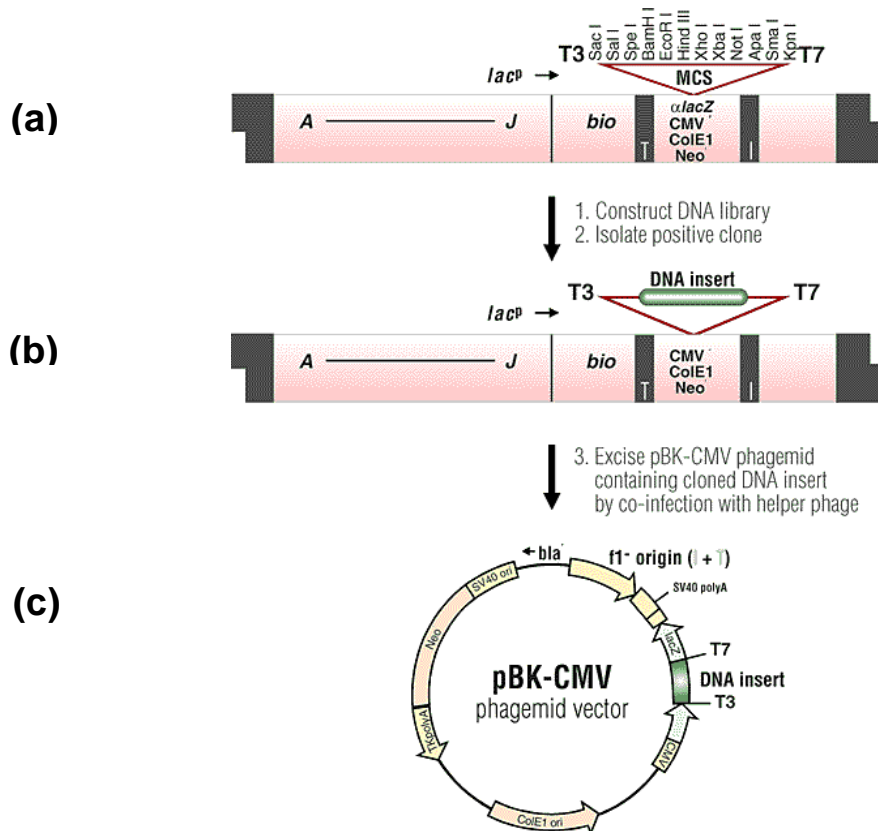


Fig 2 (pàgina anterior): Esquema dels processos que es van dur a terme durant el cribatge de la biblioteca. (a) Mapa del vector ZAP Express, (b) vector ZAP Express que conté un insert positiu d'interès, (c) mapa circular del vector pBK-CMV obtingut a partir de l'excisió *in vivo*. (extret de la web <http://www.stratagene.com>)

En aquesta tesi no es va preparar la biblioteca, per tant s'obvien els protocols de síntesi de cDNA, clonatge i empaquetament dels fags i es refereix, per a una extensa descripció, al manual d'instruccions del ZAP Express Predigested Vector Kit, d'Stratagene. Només es farà referència, per tant, al cribatge i posterior anàlisi dels clons obtinguts.

3.2. Les soques hoste XL1-Blue MRF' i XLOLR d'*E. coli*

Tots els processos que es van dur a terme durant el cribatge de la biblioteca utilitzaven la soca XL1-Blue MRF' d'*E.coli*, mentre que la soca XLOLR s'utilitzava únicament per a prevenir contaminacions de fag lambda en l'obtenció del fàgmid, una vegada assolida l'excisió *in vivo*.

3.2.1. Preparació de les cèl.lules hoste

Les dues soques hoste emprades es mantenien i preparaven de la mateixa manera. A partir d'un glicerinat conservat a -80°C , es preparava un cultiu en placa de LB sòlid que contenia de $12.5\ \mu\text{g/ml}$ de tetraciclina (per a la selecció de l'episoma F'). La placa podia guardar-se durant 1 setmana a 4°C .

El cultiu líquid de cèl.lules XL1-Blue MRF' es preparava per inoculació d'una colònia crescuda en placa de LB suplementat amb 0.2% maltosa (pes/volum) i $10\ \text{mM MgSO}_4$. Per a la soca XLOLR s'utilitzava medi NZY. S'incubava durant la nit a 30°C en agitació vigorosa, fins a una $\text{DO}_{600}=1-2$ unitats. Les cèl.lules es sedimentaven per centrifugació a $1000\ \text{g}$ durant 10 minuts i es resuspenien molt suaument en $10\ \text{mM MgSO}_4$. La DO final òptima depenia del procés on s'havia d'utilitzar i s'especificarà en cada cas concret.

3.3. Titolació de la biblioteca de cDNA

Es van preparar dues dilucions de la biblioteca (10^{-3} i 10^{-4}) en medi SM. Per a la infecció, es van barrejar 10 μ l de la dilució corresponent amb 200 μ l de cèl.lules XL1-Blue MRF' a una $DO_{600}=0.5$, i es va incubar a 37°C durant 20 minuts, per tal d'afavorir l'adhesió dels fags a la paret dels bacteris. A continuació, la barreja es va transferir a tubs estèrils de polipropilè de 15 ml i s'hi va afegir 3.5 ml de medi LB Top Agar preescalfat a 50°C. Es va vortexar durant 2 segons i, immediatament, es va abocar a plaques de LB sòlid que s'havien preescalfat durant 2 hores a 37°C, procurant que el medi quedés ben distribuït. Es van esperar uns 10 minuts fins que el medi se solidificués a sobre del LB sòlid de la placa i es va incubar en posició invertida durant 9 hores a 37°C.

Per a determinar el títol, en unitats formadores de plaques de lisi per ml (pfu/ml) es va aplicar la següent fórmula:

$$\frac{\text{Nombre de calves (pfu) x factor de dilució}}{\text{Volum plaquejat (\mu l)}} \times 1000 \mu\text{l / ml}$$

Es va calcular la mitjana de les dilucions plaquejades que no presentaven un creixement confluent.

3.4. Cribatge de la biblioteca

Es van realitzar, en total, tres cribatges per tal d'aïllar progressivament els fags recombinants que contenien els inserts positius d'interès.

3.4.1. Primer cribatge

- 3.4.1.1. PREPARACIÓ I CREIXEMENT DE LES PLAQUES DE LISI

En el primer cribatge es van plaquejar 50000 pfu per placa de Petri de 150 mm de diàmetre, per tenir un creixement en confluència. Es van preparar 20 plaques de Petri amb medi LB, per tal de rastrejar un total de 10^6 pfu.

Per a cada placa de Petri, s'infectaven 500 μ l de cèl.lules XL1-Blue MRF' fresques ($DO_{600}=0.5$), amb 10 μ l de la biblioteca diluïda per a contenir 50000 pfu. La infecció i

posterior sembrat es duien a terme tal i com s'ha descrit anteriorment, amb l'excepció que per a les plaques de Petri grans s'utilitzen 7 ml de medi LB Top Agar. Després de 9 hores d'incubació a 37°C, es mantenen a 4°C durant 2 hores, de manera que, per un costat s'inhibia el creixement de les plaques de lisi, i per l'altre s'evitava que part del medi sòlid de la placa quedés enganxat al filtre, durant la transferència.

- 3.4.1.2. Transferència de les plaques de lisi a filtres de nitrocel.lulosa i preparació per a la hibridació.

Es van utilitzar filtres de nitrocel.lulosa de 0.45 µm de porus i 150 mm de diàmetre (Millipore). Abans de començar la transferència es dibuixaven als filtres i a les plaques uns senyals de forma asimètrica, que servien per poder posteriorment identificar la posició dels fags positius. La transferència es va realitzar per duplicat, de manera que la primera sèrie de filtres es va destinar al cribatge de la subunitat alfa i la segona sèrie al de la subunitat beta. Per a la primera sèrie de filtres, el temps de transferència va ser de 1 minut, i per la segona sèrie de filtres va ser de 3 minuts.

A continuació, els filtres van ser sotmesos als següents tractaments:

- a) Desnaturalització per immersió en 1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH durant 2 minuts.
- b) Neutralització per immersió en 1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl, pH 8.0 durant 5 minuts.
- c) Rentat per immersió en 2 x SSC (0.3 M NaCl, 0.03M citrat sòdic, pH 8.0) durant 30 segons.

Seguidament es van deixar secar a l'aire sobre paper Whatman 3MM i el DNA va ser fixat a la membrana per incubació en una estufa a 80°C durant 2 hores. Les plaques d'agar es guardaven a 4°C mentre els filtres eren hibridats amb les sondes de DNA.

- 3.4.1.3. Hibridació del s fil tres amb la sonda marcada radioactivament.

Les sondes de cDNA, que corresponien als productes de PCR, es van marcar radioactivament amb [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP pel procediment de *random primer*, descrit a l'apartat 2.2. Els filtres es van col.locar en un recipient de vidre i es van pre-hibridar durant la nit, a 37°C, en 50 ml de solució de pre-hibridació (6 x SSC, 0.5% SDS, 50 % formamida, 5 X reactiu de Denhardt's i 100 µg/ml de DNA d'esperma de salmó desnaturalitzat per calor, a 100°C durant 5 minuts.

La hibridació es va realitzar en el mateix tampó, en el qual es va afegir la sonda marcada ($> 20 \times 10^6$ cpm totals), prèviament desnaturalitzada a 100°C durant 5 minuts. La hibridació es va mantenir durant 24 hores a 37°C i en agitació suau. Els rentants de la sonda van ser els següents:

- a) 1 rentat en 2 x SSC, 0.1% SDS durant 10 minuts a temperatura ambient,
- b) 2 rentats en 1 x SSC, 0.1% SDS durant 30 minuts a 50°C , i
- c) 1 rentat en 0.1 x SSC, 0.1% SDS durant 30 minuts a 50°C .

A continuació es van autoradiografiar els filtres a -80°C amb una placa intensificadora i es va procedir al revelat dels films.

- 3.4.1.4. Aïllament dels fags positius

Els senyals positius dels films de l'autoradiografia van permetre identificar i aïllar les plaques de lisi corresponents. Per tal d'encarar correctament les plaques amb el seu filtre, es van utilitzar les marques asimètriques que s'hi havien fet. Les plaques de lisi van ser extretes de la placa de Petri utilitzant una pipeta Pasteur o una punta per a pipeta de 1 ml invertida. Els blocs es dipositaven dins un tub eppendorf que contenia 1 ml de SM i una gota de cloroform, i es guardaven a 4°C .

3.4.2. Segon cribatge

En primer lloc es va determinar la concentració de cada bloc de fags obtingut en el primer cribatge, tal com s'ha descrit en el punt 3.3.

En el segon cribatge es van plaquejar un total de 500 pfu per placa de Petri de 75 mm de diàmetre. Per a cada positiu del primer cribatge es preparava una placa. La infecció i creixement dels fags, així com la preparació dels filtres i la hibridació, es van realitzar tal i com s'ha descrit als apartats anteriors. Els presumptes positius s'extreien del cultiu sòlid i es guardaven a 4°C .

3.4.3. Tercer cribatge

El tercer cribatge va permetre purificar totalment el/s fag/s positiu/s. Podia haver-se fet d'una forma equivalent al primer i segon cribatges, és a dir, mitjançant la transferència a filtres i posterior hibridació amb una sonda radioactiva. No obstant, a causa del gran nombre de positius que es van obtenir en el segon cribatge, vam preferir fer-ho mitjançant PCR.

- 3.4.3.1 Cribatge mitjançant PCR

Com a test previ al tercer cribatge es va realitzar una reacció de PCR sobre els presumptes positius del segon cribatge, per tal de poder discriminar de forma certera els falsos positius. L'alliberament del DNA contingut a l'interior dels fags es feia per escalfament a 70°C durant 5 minuts, seguit d'una centrifugació a 13000 rpm a 4°C durant 5 minuts. El sobrenedant d'aquesta centrifugació contenia el DNA de fag recombinant.

Es van utilitzar com encebadors, els oligonucleòtids degenerats descrits a l'apartat 1.1., que amplificaven un fragment de 450 parells de bases per als gens de la subunitat CK2 α i un fragment de 170 parells de bases per als gens de la subunitat CK2 β . Les concentracions finals dels components de la reacció de PCR eren: 10-100 ng de DNA motlle, 1 x amortidor Taq, 2.5 mM MgCl₂, 100 μ M de cada dNTP, 1 μ M de cada oligonucleòtid i 1 unitat de Taq polimerasa, en un volum final de 50 μ l. Sobre aquesta barreja s'afegien 50 μ l d'oli mineral. Les condicions de la reacció de PCR foren les següents:

hot start: 94°C 4 minuts
24 cicles: 94°C 1 minut
 46°C 30 segons
 72°C 1 minut
elongació: 72°C 6 minuts

Els productes de PCR es van analitzar mitjançant una electroforesi en gel d'agarosa al 2%. Els gels es van tenyr amb bromur d'etidi i es van fotografiar amb el sistema GelDoc 1000, de BioRad.

- 3.4.3.2. Aïllament dels fags positius individuals

A partir dels fags positius provinents del segon cribatge, es van preparar dilucions per a tenir aproximadament 20 pfu per placa de Petri. Es van escollir unes quantes calves a l'atzar i es va realitzar la reacció de PCR, fins a trobar un o més clons positius.

3.5. Excisió *in vivo* del vector pBK-CMV a partir del vector ZAP Express

L'excisió *in vivo* és un procés pel qual els inserts clonats en el fag lambda es recuperen formant part d'un fàgmid derivat del fag λ . L'excisió *in vivo* necessita de la presència d'una varietat de proteïnes que inclou les proteïnes derivades dels fags filamentosos, tipus M13. El fag λ esdevé accessible a aquestes proteïnes quan és coinfectat amb un fag *helper* M13. El fag *helper* que utilitza el sistema ZAP Express s'anomena ExAssist i té la propietat de contenir una mutació que li impedeix de replicar-se per sí sol en la soca d'*E.coli* XL0LR, la qual cosa permet la replicació del fàgmid recombinant sense el risc de contaminació per fag *helper*.

3.5.1. Amplificació del fag *helper* ExAssist

Una colònia de cèl.lules XL1-Blue MRF' crescudes en placa de LB sòlid amb tetraciclina, es va transferir a un tub estèril de 50 ml que contenia 10 ml de medi 2 x YT, i es va deixar créixer en agitació a 37°C fins a una DO_{600} de 0.3. A continuació, es va afegir el fag *helper* ExAssist a una multiplicitat d'infecció (MOI) de 20:1 (fag:cèl.lules). Per als càlculs es va tenir en compte que el títol del fag *helper* era 10^{11} pfu/ml i que a una DO_{600} de 0.3 li corresponia un nombre de 2.5×10^8 cèl.lules per ml de cultiu.

Es va incubar a 37°C durant 8 hores, i seguidament es va escalfar a 65°C durant 15 minuts per a destruir les cèl.lules. Es va centrifugar a 4000 rpm a 4°C durant 5 minuts per a precipitar les restes cel.lulars i, finalment, es va reservar el sobrenedant, que es va conservar a -80°C, en presència d'un 7% de DMSO.

La titolació del fag *helper* ExAssist es va realitzar tal com es descriu a l'apartat 3.

3.5.2. Amplificació dels fags recombinants positius

Per a una excisió *in vivo* eficient era necessari que els fags positius individuals tinguessin una concentració superior a 4×10^5 pfu/ml. El títol d'un fag aïllat era de l'ordre de 10^4 - 10^6 pfu/ml, depenent del creixement de la calva i, per tant, en molts cassos va ser necessari amplificar-los. El procediment seguit fou el següent:

300 µl de cèl.lules XL1-Blue MRF' a $DO_{600}=0.5$ (veure apartat 3.2.1.) es van infectar amb 5×10^4 pfu del fag a amplificar, a 37°C durant 15 minuts. S'afegien 3.5 ml de medi NZY Top Agar preescalfat a 50°C, i es plaquejava tal com s'ha descrit al punt 3.3. Les plaques es van incubar durant 8 hores a 37°C, fins a observar el creixement de les calves en confluència. A continuació, es van dipositar suaument a sobre de la placa 4 ml de medi SM, i es va deixar en agitació suau a 4°C durant la nit, per tal que els fags difonguessin cap al medi. El dia següent es va recuperar el medi i es va rentar la placa amb 2 ml de SM. Sobre els 6 ml de SM recollits s'afegia cloroform a una concentració final del 5%, i s'incubava a temperatura ambient durant 15 minuts. Les restes cel.lulars es sedimentaven per centrifugació a 500 g durant 10 minuts. El sobrenedant, que contenia el fag amplificat, es podia conservar a 4°C afegint un 0.3% de cloroform, o a -80°C aegint un 7% final de DMSO.

El fag amplificat es titolava tal com s'ha descrit a l'apartat 3.3.

3.5.3. Excisió *in vivo*

Es van infectar 200 µl de cèl.lules XL1-Blue MRF' ($DO_{600}=1.0$) simultàneament amb 250 µl de fag ($>10^5$ pfu) i amb 1 µl de fag *helper* ExAssist ($>10^6$ pfu), i es va incuba a 37°C durant 15 minuts. A continuació, es van afegir 3 ml de medi NZY i es va incubar durant 3 hores a 37°C. Al cap d'aquest temps, les cèl.lules XL1-Blue MRF' es van inactivar escalfant el cultiu a 65-70°C durant 20 minuts i les restes cel.lulars es van eliminar per centrifugació a 1000 g durant 15 minuts. El sobrenedant, que contenia el fàgmid pBK-CMV empaquetat en forma de fag filamentós, es va traspasar a tubs estèrils i era estable durant 1 o 2 mesos a 4°C.

Per a obtenir colònies del fàgmid, es van infectar 200 µl de cèl.lules XL0LR ($DO_{600}=1.0$) amb 100 µl o amb 10 µl de fàgmid, a 37°C durant 15 minuts. Es van afegir 300 µl de medi NZY i es va incubar a 37°C durant 45 minuts. Es van sembrar 200 µl d'aquesta mescla

sobre plaques de Petri amb medi LB sòlid i 50 µg/ml de kanamicina. Es van incubar durant la nit a 37°C. Les colònies que es van desenvolupar a la placa contenien el fàgmid de doble cadena pBK-CMV amb l'insert de DNA clonat. Per conservar-los indefinidament es va preparar un glicerinat d'alguna de les colònies, el qual es mantenia a -80°C.

3.6. Anàlisi dels clons positius obtinguts en el cribatge de la biblioteca de cDNA

3.6.1. Preparació i anàlisi del DNA del fàgmid pBK-CMV

Es va utilitzar el *kit* comercial GFX™ *Micro* Plasmid Prep Kit, d'Amersham Pharmacia Biotech. Aquest *kit* combina el mètode clàssic d'extracció del DNA per lisi alcalina de les cèl·lules bacterianes, amb una etapa de purificació del plasmidi a través de la seva unió per afinitat a una matriu de fibra de vidre, i posterior elució amb H₂O.

A partir del glicerinat, es va preparar un cultiu de nit de 3 ml de medi LB i 50 µg/ml de kanamicina, que es va incubar en agitació a 37°C. L'endemà es va extreure el DNA segons les instruccions del fabricant. El DNA plasmídic es va analitzar mitjançant electroforesis en gel d'agarosa al 1%. Els gels es van tenyir amb bromur d'etidi i es van fotografiar amb el sistema GelDoc 1000, de BioRad.

A continuació, calia verificar que els plasmidis contenien un insert clonat. Per al clonatge dels cDNAs durant la preparació de la biblioteca de cDNA es van utilitzar els enzims de restricció EcoRI, pel costat 5', i XhoI, pel costat 3'. Per tant, la digestió doble del DNA plasmídic mitjançant aquests enzims havia d'alliberar l'insert clonat. Les digestions es van dur a terme a 37°C durant un mínim de 2 hores, amb 2 unitats d'enzim per µg de DNA. El resultat de la digestió es va analitzar mitjançant electroforesis en gel d'agarosa al 1%.

També es va realitzar un senzill mapa de restricció dels inserts per tal de esbrinar si tots els clons positius eren diferents o alguns d'ells es troben doblement representats a la biblioteca. Si el mapa de restricció era idèntic per a dos clons, es considerava que podia tractar-se del mateix gen. El resultat de la digestió s'analitzava mitjançant electroforesi en gel d'agarosa al 1%.

3.6.2. Seqüenciació dels inserts

Per a la reacció de seqüenciació es va utilitzar el *kit* "Thermo Sequenase II dye terminator cycle sequencing premix", d'Amersham Pharmacia Biotech, que seguia la metodologia de Sanger amb una polimerasa termoestable que permetia una reacció de seqüenciació cíclica. El marcatge dels fragments es realitzava amb 4 fluorocroms, un per a cada base, que estaven localitzats en els ddNTPs finalitzadors. Els oligonucleòtids que es van utilitzar en una primera fase, eren complementaris als promotors T3 o T7, i van permetre la lectura dels extrems 5' i 3' dels inserts. En una segona fase de seqüenciació, es van dissenyar oligonucleòtids interns específics per a cada insert, per tal d'avançar cap a l'interior. En tots els casos es van llegir les dues cadenes de cada gen, per evitar possibles indeterminacions en la seqüència.

La barreja de la reacció de seqüenciació contenia: 0.1-1 µg de DNA, 2 µl del reactiu Thermo Sequenase II i 5 pmols d'oligonucleòtid, en un volum final de 10 µl. Les condicions de la reacció de seqüenciació foren les següents:

hot start: 96°C 1 minut
30 cicles: 96°C 30 segons
50°C 15 segons
60°C 1 minut

Seguidament, s'aturava la reacció dipositant els 10 µl de producte sobre 1 µl d'amortidor acetat sòdic/EDTA, subministrat pel mateix kit, i es precipitava DNA amb etanol durant 15 minuts en gel.

Els productes de la seqüenciació es portaven a seqüenciar al Servei de Seqüenciació de DNA de la Universitat Autònoma de Barcelona, que disposa d'un seqüenciador automàtic ABI 373A Stretch, d'Applied Biosystems.

3.6.3. Anàlisi de les seqüències i comparació amb les seqüències introduïdes als bancs de dades

Per a l'anàlisi de les seqüències dels gens obtinguts, es va utilitzar el programa The Biology Workbench desenvolupat pel Grup de Biologia Computacional del National Center for Supercomputing Applications (NCSA), de la Universitat d'Illinois, USA. Aquest programa es troba disponible a Internet (<http://biology.ncsa.uiuc.edu>), i és d'ús lliure. Disposa d'eines

per a la comparació de seqüències introduïdes, entre elles i amb seqüències dels bancs de dades, generació de mapes de restricció, búsqueda de marcs oberts de lectura, búsqueda de seqüències introduïdes als bancs de dades a partir de paraules clau, generació d'arbres filogenètics, etc.

COMPOSICIÓ DELS MEDIS DE CULTIU

Medi LB: 10 g NaCl, 10 g triptona, 5 g extracte de llevat, pH 7.0, per a 1 litre de cultiu

Medi LB sòlid: 20 g agar en 1 litre de medi LB.

Medi LB Top Agar: 0.7% (pes/volum) agarosa en medi LB.

Medi NZY: 5 g NaCl, 2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 5 g extracte de llevat i 10 g hidrolitzat de caseïna o casaminoàcids, pH 7.5, per a 1 litre de cultiu

Medi NZY Top Agar: 0.7% (pes/volum) agarosa en medi NZY.

Medi SM: 5.8 g NaCl, 2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 50 ml 1M Tris-HCl pH 7.5 i 5 ml 2% (pes/volum) gelatina, per a 1 litre de cultiu

Medi 2 x YT: 10 g NaCl, 10 g extracte de llevat i 16 g triptona, pH 7.5, per a 1 litre de cultiu

CAPÍTOL IV:

Resultats

1. OBTENCIÓ DE CLONS PARCIALS DELS GENS DE LES SUBUNITATS **a** I **b** DE LA CK2 DE TABAC.

La primera necessitat que va sorgir en l'estudi del paper de la CK2 en el cicle cel·lular va ser la d'obtenir sondes específiques i homòlogues per als gens de les subunitats alfa i beta de la CK2 de tabac. Fins aquell moment, únicament s'havien clonat en plantes, dos gens corresponents a la CK2 α (Mizoguchi, 1993) i dos corresponents a la CK2 β (Collinge, 1994), d'*Arabidopsis thaliana*, i un gen corresponent a la CK2 α del blat de moro (Dobrowolska, 1991).

Per abordar aquest objectiu, es va optar per l'aplicació de la tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR), utilitzant oligonucleòtids degenerats corresponents a regions altament conservades en els gens clonats per a altres espècies (Fig 1). Així es va prendre com a base per al seu disseny, la comparació de les seqüències proteiques corresponents a les subunitats CK2 α i CK2 β de diferents espècies, que apareixen a Mizoguchi, et al. (1993) i Collinge, et al (1994), respectivament.

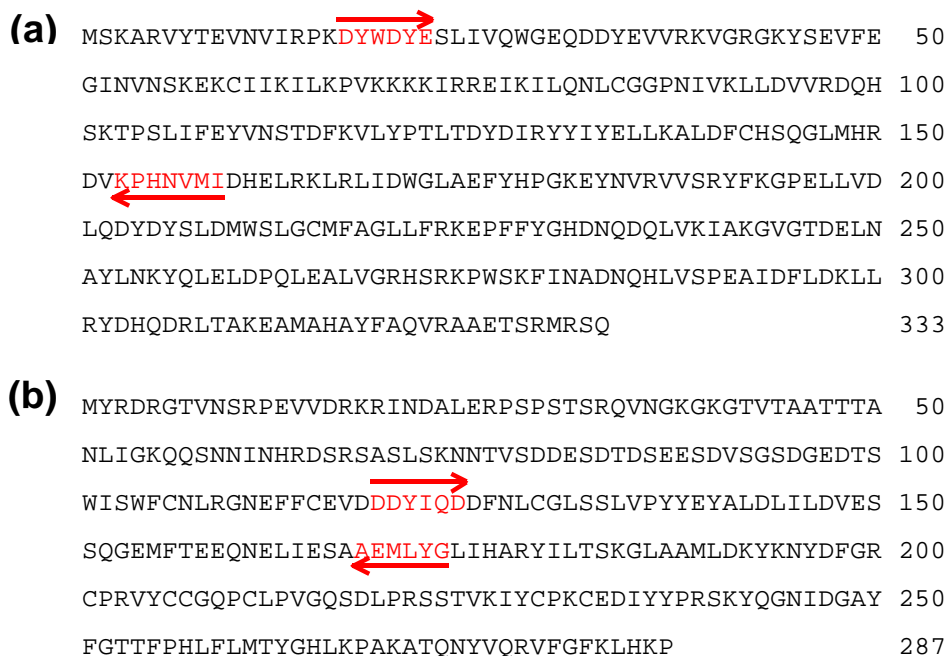


Fig 1: Seqüències polipeptídiques de les proteïnes ATCKA1 (a) i ATCKB1 (b), d'*Arabidopsis*. Les fletxes i els residus en vermell indiquen la posició i seqüència dels oligonucleòtids utilitzats en l'amplificació dels gens de tabac.

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) es va fer sobre cDNA obtingut a partir de les cèl·lules BY-2 de tabac en creixement exponencial, i va donar com a resultat l'amplificació d'una banda de 450 pb per a CK2 α i una banda de 170 pb per a CK2 β . Aquesta longitud era la que s'esperava en base a la distància, en parells de bases, que separa els oligonucleòtids utilitzats en l'amplificació. A la Figura 2 es mostra el resultat de l'amplificació.

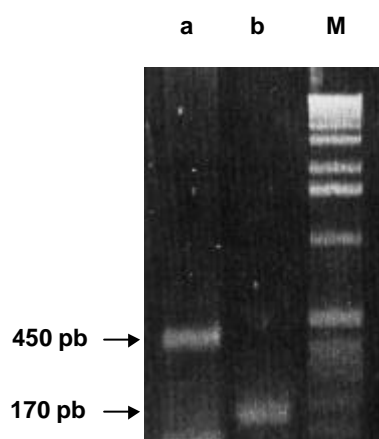


Fig 2: Electroforesis en gel d'agarosa dels productes de l'amplificació per PCR. (a) Amplificació amb encebadors específics per a la CK2 α . (b) Amplificació amb encebadors específics per a la CK2 β . M és el marcador de pes molecular 1Kb DNA Extension Ladder, de Gibco.

Els productes de PCR obtinguts es van subclonar en el vector pBluescript, utilitzant les dianes BamHI i EcoRI que s'havien introduït amb els encebadors. El clonatge es va verificar per doble digestió amb aquests dos enzims de restricció. Dels clons positius, se'n van seleccionar dos per a la CK2 α , que es van anomenar ntcka10 i ntcka11, i tres per a la CK2 β , que es van anomenar ntckb6, ntckb7 i ntckb8. Aquest cinc clons es van seqüenciar i a partir de la seqüència de nucleòtids es va deduir la seqüència d'aminoàcids corresponent, en els tres marcs de lectura possibles. La seva comparació amb les seqüències de proteïnes presents als bancs de dades va confirmar que els productes de PCR clonats corresponien a les subunitats α i β de la CK2. En la Figura 3, es mostra la seqüència de nucleòtids dels cinc clons i la seqüència d'aminoàcids deduïda per a cadascun d'ells.

Fig 3 (pàgina següent): Seqüència de nucleòtids dels clons parcials de les subunitats α (a) i β (b) de la CK2 de tabac. En negreta s'indica la seqüència d'aminoàcids dedulda.

(a)

ntcka10

5' GAATATTGGGATTATGAAGCCCTTACTGTTCAATGGGGTGATCAGGATGACTATGAGGTT
 E Y W D Y E A L T V Q W G D Q D D Y E V
 GTTCGAAAGTTGGAAGAGGAAAATATAGTGAAGTTTTTGAAGGTATAAATGTTAACAGC
 V R K V G R G K Y S E V F E G I N V N S
 AACGAAAAGTGCATAATCAAGATCCTGAAACCTGTCAAGAAGAAAAAGATCAAGAGAGAG
 N E K C I I K I L K P V K K K K I K R E
 ATCAAAATCTTGCAGAACCTCTGTGGCGGACCAAACATTGTCAAACCTCCTTGATATTGTC
 I K I L Q N L C G G P N I V K L L D I V
 AGAGATCAGCACTCAAAAACCTCAAGCTTAATTTTTGAGTATGTGAACAGTACAGATTTT
 R D Q H S K T P S L I F E Y V N S T D F
 AAAGTACTGTACCCTACATTAACAGATTATGACATCCGGTACTACATATATGAGCTTCTC
 K V L Y P T L T D Y D I R Y Y I Y E L L
 AAGGCACTAGACTATTGTCATTCACAGGGAATAATGCATAGA 3'
 K A L D Y C H S Q G I M H R

ntcka11

5' GAATATTGGGATTACGAATCCCTTACTGTTCAATGGGGCGATCAGGATGACTATGAGGTT
 E Y W D Y E S L T V Q W G D Q D D Y E V
 GTTCGAAAGTTGGGAGAGGAAAATACAGTGAAGTTTTTGAAGGTATAAATGTTAACAGC
 V R K V G R G K Y S E V F E G I N V N S
 AACGAGAAGTGCATAATCAAGATCCTGAAACCTGTTAAGAAGAAAAAGGATCAAAAAGAGAG
 N E K C I I K I L K P V K K K K I K R E
 ATAAAGATATTGCAAAACCTCTGTGGTGGACCAAACATTGTCAAACCTCCTTGATATTGTC
 I K I L Q N L C G G P N I V K L L D I V
 AGAGATCAGCATTCAAAAACCTCAAGCTTGATTTTTGAGTACGTGAACAGCACTGATTTT
 R D Q H S K T P S L I F E Y V N S T D F
 AAAGTTTTGTACCCAACGCTAACGGATTATGACATACGGTACTACATATATGAGCTTCTC
 K V L Y P T L T D Y D I R Y Y I Y E L L
 AAGGCGCTAGATTATTGTCATTCACAGGGAATAATGCATAGA 3'
 K A L D Y C H S Q G I M H R

(b)

ntckb6

5' GATGACTACATTACAGGATGATTTTAACCTCTGTGGATTGAGCAGTCAAGTTCCATACTAT
 D D Y I Q D D F N L C G L S S Q V P Y Y
 GACTTTGCACTTGATCTAATCCTTGATGTTGAATCCTCGCATGGTGATATGTTCACTGAA
 D F A L D L I L D V E S S H G D M F T E
 GGGCAGAATGAATTGGTTGAATCAGCGGAGATGCTGTACGGC 3'
 G Q N E L V E S A E M L Y G

ntckb7

5' GAGGATTATATTCTAGATGATTTTAACCTCTGTGGATTGAGCAGTCAAGTTCCCTACTAT
 D D Y I Q D D F N L C G L S S Q V P Y Y
 GACTATGCGCTTGACCTCATCCTTGATGTTGAATCCTCCCACGAGGAGCAGAATGAATTA
 D Y A L D L I L D V E S S H E E Q N E L
 GTTGAATCGGCAGCGGAAATGTTGTACGGC 3'
 V E S A A E M L Y G

ntckb8

5' GATGATTACATACAGGACGATTTTAATCTCTGTGGATTGAGCAGTCAAGTTCCCTACTAT
 D D Y I Q D D F N L C G L S S Q V P Y Y
 GACTATGCGCTTGACCTCATCCTTGATGTTGAATCCTCCCATGGTGATATGTTACAGAG
 D Y A L D L O L D V E S S H G D M F T E
 GAGCAGAATGAATTGGTTGAGTCGGCAGCGGAGATGCTGTACGGC 3'
 E Q N E L V E S A A E M L Y G

Tot i tractar-se de clons parcials d'aquests gens, les homologies de seqüència entre ells eren prou altes, la qual cosa reforçava la teoria que aquestes famílies es troben molt conservades al llarg de l'evolució. En concret, els gens *ntcka10* i *ntcka11* presentaven una homologia superior al 93% amb les proteïnes CK2 α de blat de moro i d'*Arabidopsis*, mentre que pels gens *ntckb6*, *ntckb7* i *ntckb8* les homologies es trobaven entre el 87 i el 92%, respecte les seqüències d'*Arabidopsis*, i baixaven al 53-62% respecte la CK2 β humana. A la Figura 4 es mostra un alineament a nivell de seqüència proteica, dels clons parcials dels gens de la CK2 de tabac, amb les seqüències dels seus homòlegs aïllats d'*Arabidopsis*.

(a)	atcka1	MSKARVYTEVNVIRPKDYWDYESLIVQWGEQDDYEVVRKVGKGYSEVFE	50
	atcka2D.....N.....	
	ntcka10E.....A.T.....D.....	
	ntcka11E.....T.....D.....	
	atcka1	GINVNSKEKCI IKILKPVKKKKIRREIKILQNLCCGGPNIVKLLDVVRDQH	100
	atcka2	...M.N.....E.....	
	ntcka10N.....K.....I.....	
	ntcka11N.....K.....I.....	
	atcka1	SKTPSLIFEYVNSTDFKVLVYPTLTDYDIRYYIYELLKALDFCHSQGLMHR	150
	atcka2I.....	
	ntcka10Y.....I.....	
	ntcka11Y.....I.....	
(b)	atckb1	SWISWFCNLRGNEFFCEVDDDDYIQDDFNLCGLSSLVPPYIYALDLILDVE	150
	atckb2HQ.....D.....	
	atckb3D.....E.....GQ.....D.....D	
	atckb4E.....GQ.....D.....	
	ntckb6Q.....DF.....	
	ntckb7Q.....D.....	
	ntckb8Q.....D.....	
	atckb1	SSQGEMFTEEQNELIESAAEMLYGLIHARYILTSKGLAAMLDKYKNYDFG	200
	atckb2	..H.....M.....F.....S.....	
	atckb3	A.NS....D..H.MV.....V.....T..M...TE....C...	
	atckb4	..N.D.....H.MV.....V.....T..M...ME.....	
	ntckb6	..H.D....G....V.-.....	
	ntckb7	..H-----V.....	
	ntckb8	..H.D.....V.....	

Fig 4: Alineament de les seqüències dels clons parcials de les subunitats a i b de la CK2 de tabac, amb les seves homòlogues d'*Arabidopsis thaliana*. (a) Alineaments per a la CK2a.. (b) Alineaments per a la CK2b.

2. CROSS-HIBRIDACIÓ ENTRE ELS DIFERENTS PRODUCTES DE PCR CORRESPONENTS A LES SUBUNITATS **a** I **b**, DE LA CK2 DE TABAC.

Amb l'objectiu d'optimitzar les condicions d'hibridació de les sondes preparades a partir dels productes de PCR corresponents a les subunitats α i β de la CK2 de tabac, es va realitzar un experiment de *cross*-hibridació. La finalitat de l'experiment era, en primer lloc, establir les condicions d'hibridació que asseguressin la detecció, a la biblioteca corresponent, de tots els tipus de trànscrips existents per a cadascuna de les subunitats (*cross*-hibridació positiva) i, en segon lloc, comprovar si era possible de discriminar la hibridació entre els diferents trànscrips i aconseguir, d'aquesta manera, la hibridació homòloga de la sonda de cDNA únicament amb el seu trànscrip complementari (*cross*-hibridació negativa).

L'ús de sondes de cDNA radioactives sintetitzades a partir dels productes de PCR ntcka10 i ntckb8, va posar de manifest que, sota condicions de rentat a baixa estringència, al voltant de $T_m - 25$, era possible detectar la hibridació de totes les diferents formes aïllades pels gens de les subunitats CK2 α i CK2 β (Fig 5, a i b, esquerra).

Per contra, els rentats a una estringència alta, de $T_m - 7$, permetien discriminar entre alguns dels productes per a la CK2 β , però no entre els dos productes corresponents a la subunitat CK2 α (Fig 5, a i b, dreta).

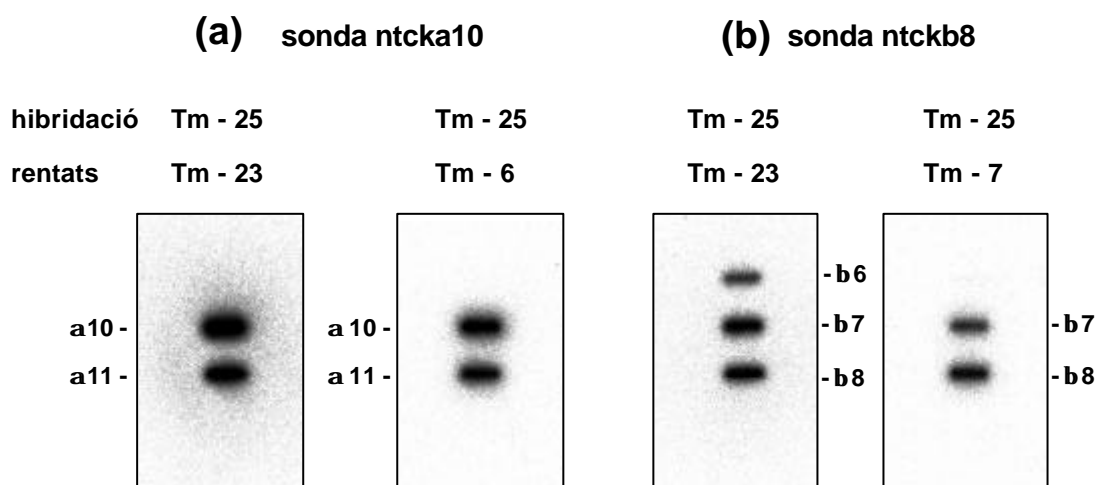


Fig 5 (pàgina anterior): Slot blot i cross-hibridació a diferents condicions d'estrिंगència. Els DNAs corresponents als productes de PCR per a les subunitats CK2a i CK2b es van immobilitzar en una membrana de niló mitjançant la tècnica de l'slot blot i es van hibridar amb les sondes ntcka10 i ntckb8, respectivament. Els rentats a baixa estrिंगència es van fer a 65°C en 2xSSC, 0.5% SDS, i els rentats a alta estrिंगència a 65°C en 0.2xSSC, 0.5%SDS. (a) Sonda ntcka10. (b) Sonda ntckb8.

El fet que les identitats entre els productes ntckb7 i ntckb8 (91.9%) siguin més altes que entre ntckb6 i ntckb8 (91.3%) i que també ho sigui el percentatge de G+C de ntckb7 (43.6%) en comparació amb el de ntckb6 (42.2%), davant el 45.7% de ntckb8, podria explicar perquè l'hibrid ntckb7-ntckb8 és el més estable termodinàmicament. Aquestes variacions, encara que petites, podrien esdevenir significatives a causa de la curta longitud dels productes de PCR corresponents a les subunitats CK2β.

En relació als productes ntcka10 i ntcka11 per a la CK2α, les identitats són del 96.7% en una longitud de 427 parells de bases, sobre un 38.8% de G+C per a ntcka10 i un 37.7% de G+C per a ntcka11. Aquests valors en el seu conjunt contribuïrien en fer els híbrids molt més estables.

3. CRIBATGE DE LA BIBLIOTECA DE cDNA. OBTENCIÓ DELS CLONS POSITIUS I SEQÜENCIACIÓ

Amb l'objectiu d'obtenir els cDNAs complets corresponents als gens per a les subunitats α i β de la CK2, es va realitzar el cribatge d'una biblioteca de cDNA preparada a partir de la línia cel.lular BY-2 de tabac en creixement exponencial, i utilitzant com a sondes, els clons parcials obtinguts per PCR. Aquesta biblioteca va ser proporcionada per la Dra. Nicole Chaubet (IBMP, CNRS, Strasbourg, França) i havia estat construïda utilitzant el sistema ZAP Express (Stratagene).

L'escrutini de la biblioteca de cDNA va permetre aïllar 4 clons positius per a la subunitat α , que es van anomenar $\alpha 45$, $\alpha 52$, $\alpha 54$ i $\alpha 59$, i 1 clo positiu per a la subunitat β , que es va anomenar $\beta 4$.

La doble digestió dels vectors recombinants amb els enzims de restricció EcoRI i XhoI va confirmar la presència d'inserts de diferent longitud a cada un d'ells (Fig 6).

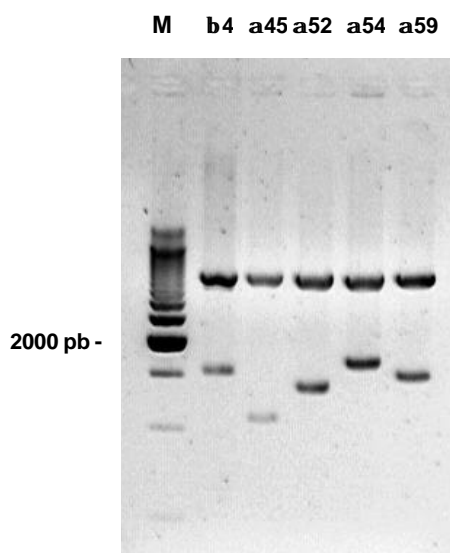


Fig 6: Doble digestió dels vectors recombinants pBK-CMV amb EcoRI i XhoI.

M és el marcador de pes molecular 500 bp, de Gibco.

3.1. Seqüenciació i caracterització dels cDNAs aïllats per a la subunitat CK2a

De l'anàlisi del mapa de restricció dels quatre cDNAs aïllats per a la CK2 α , realitzat amb els enzims EcoRI, XhoI, KpnI, BamHI i PstI, se'n desprenia que tots ells contenien una diana interna per a PstI. Els clons 54 i 59 en presentaven, a més, una per a EcoRI, i el clo 45, una per a XhoI. Per tant, el clo 45, el clo 54 i els clons 52 o 59 podien correspondre a diferents gens. Els clons 52 i 59 mostraven el mateix mapa de restricció, per la qual cosa es va pensar que podia tractar-se del mateix gen. La presència i posició d'aquestes dianes de restricció va ser confirmada posteriorment per seqüenciació. Tanmateix, el fet que continguessin un insert de diferent longitud es devia a una diferent longitud de les parts no codificants clonades. A la Fig 7 s'il·lustren en forma d'esquema, els mapes de restricció obtinguts pels clons CK2 α 45, CK2 α 54 i CK2 α 59, i l'estratègia de seqüenciació seguida.

La comparació de les seqüències de nucleòtids de les parts 3' no codificants dels clons 52 i 59, revelava una identitat del 100%, mentre que les dels clons 45 i 54 eren substancialment diferents. Això demostrava que els clons 52 i 59 corresponien a un mateix gen. Per aquest motiu, es va prescindir de continuar la seqüenciació del clo 52.

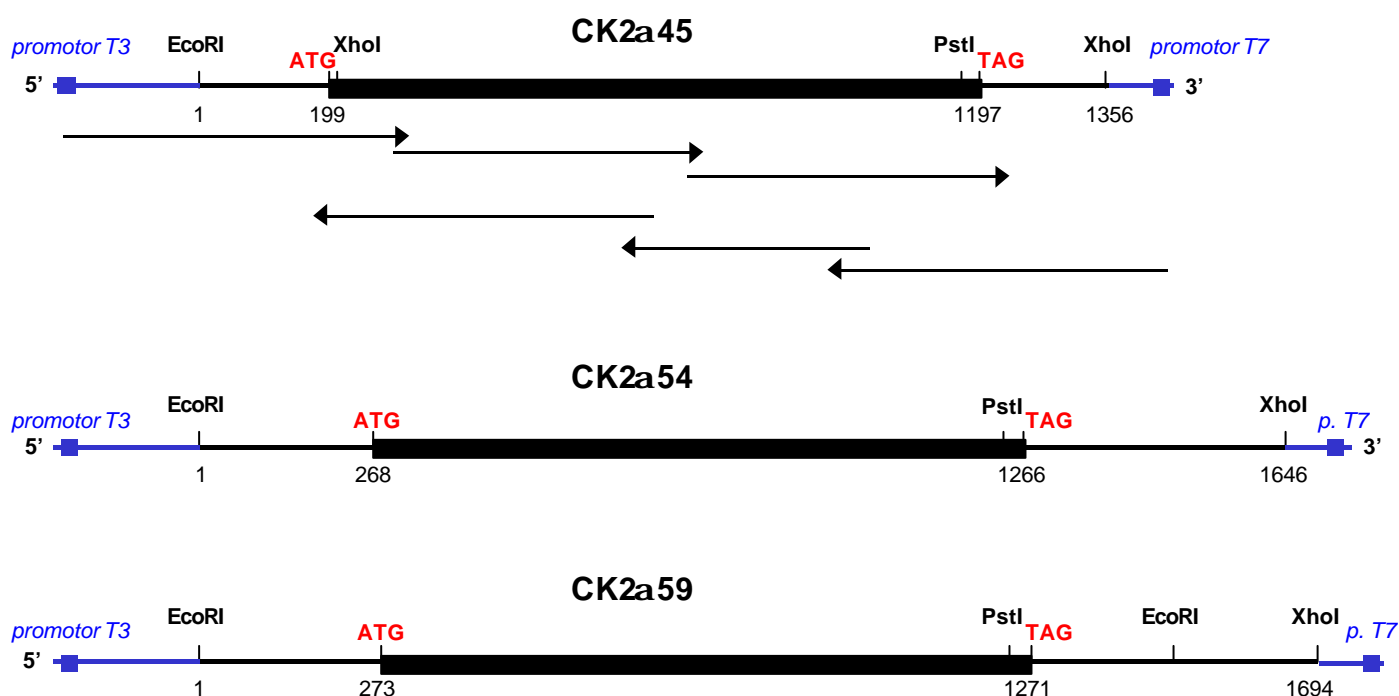


Fig 7 (pàgina anterior): Mapa de restricció i estratègia de seqüenciació dels clons CK2 α 45, CK2 α 54 i CK2 α 59, de tabac. Es representa en negre l'insert clonat i en blau la seqüència del plasmidi que flanqueja l'insert. La ratlla negra prima representa les parts 5' i 3' no codificants, i la ratlla gruixuda la part codificant per a cada cDNA. En vermell s'han representat els codons d'inici, ATG, i final, TAG, de la traducció. Les fletxes indiquen la posició dels oligonucleòtids utilitzats per a la seqüenciació. Es van utilitzar els mateixos oligonucleòtids per a la seqüenciació dels tres clons, i, per tant, s'indica la seva posició només en un d'ells. La numeració utilitzada correspon a la seqüència de nucleòtids dels inserts.

La seqüenciació completa dels clons CK2 α 45, CK2 α 54 i CK2 α 59, va permetre caracteritzar tres cDNAs de 1356, 1646 i 1694 parells de bases de longitud, respectivament, que contenien marcs oberts de lectura (ORF) que codificaven per proteïnes de 333 aminoàcids en els tres cassos (Fig 8). Les masses moleculars deduïdes eren de 39.4 kDa per a les tres proteïnes. Els cDNAs es trobaven poliadenilats, si bé cap d'ells contenia el senyal consens de poliadenilació AATAAA. En comparar les seqüències completes dels cDNAs amb els productes de PCR (veure punt 1 d'aquest mateix capítol), es va concloure que el clo CK2 α 45 corresponia al producte de PCR "ntcka11" i que els clons CK2 α 54 i CK2 α 59 corresponien al producte de PCR "ntcka 10".

(a) *N. tabacum* CK2a45

GAATTCGGCACGAGCTTTTCTTAAATGTTGAGTGAGTTGTGCCAGTAAAGTAGTAGTACTGG	66
CGGTGGCGTCGTACAGAAGCTGGGCCACTTCTCCTCTAGCCTGCGCCTTCTTCGTTGCCCGGCA	132
CTACGGCCCGTTCCGAAATCCGACACCTCAATCAACAACCTCTCAGTATCTAATTTTGGATAAAGCC	198
<u>ATGCTAAAGCTCGAGTATACACCGATATCAATGTGCTTCGCCCTAGGGAATATTGGGATTACGAA</u>	264
<u>M S K A R V Y T D I N V L R P R E Y W D Y E</u>	22
<u>TCCCTTACTGTTCAATGGGGCGATCAGGATGACTATGAGGTTGTTCCGAAAGTTGGGAGAGGAAAA</u>	330
<u>S L T V Q W G D Q D D Y E V V R K V G R G K</u>	44
<u>TACAGTGAAGTTTTGAAGGTATAAATGTTAACAGCAACGAGAAGTGCATAATCAAGATCCTGAAA</u>	396
<u>Y S E V F E G I N V N S N E K C I I K I L K</u>	66
<u>CCTGTTAAGAAGAAAAAGATCAAAAGAGAGATAAAGATATTGCAAAACCTCTGTGGTGGACCAAAAC</u>	462
<u>P V K K K K I K R E I K I L Q N L C G G P N</u>	88
<u>ATTGTCAAACCTCCTTGATATTGTCAGAGATCAGCATTCAAACCTCCAAGCTTGATTTTTGAGTAC</u>	528
<u>I V K L L D I V R D Q H S K T P S L I F E Y</u>	110
<u>GTGAACAGCACTGATTTCAAAGTTTTGTACCCAACGCTAACCGATTATGACATACGGTACTACATA</u>	594
<u>V N S T D F K V L Y P T L T D Y D I R Y Y I</u>	132
<u>TATGAGCTTCTCAAGGCGCTAGATTATTGTCATTACAGGGAATAATGCATAGAGATGTCAAGCCC</u>	660
<u>Y E L L K A L D Y C H S Q G I M H R D V K P</u>	154
<u>CATAATGTTATGATAGACCATGAACTGCGGAAGCTTCGCTTGATAGATTGGGGTCTTGCTGAATTT</u>	726
<u>H N V M I D H E L R K L R L I D W G L A E F</u>	176
<u>TACCATCCAGGGAAAGAGTATAATGTCCTGTGCTTCAAGATACTTCAAGGGCCCTGAACCTCTA</u>	792
<u>Y H P G K E Y N V R V A S R Y F K G P E L L</u>	198
<u>GTTGACTTGCAAGACTATGACTATTCTTTGGACATGTGGAGCCTTGGCTGCATGTTTGCAGGAATG</u>	858
<u>V D L Q D Y D Y S L D M W S L G C M F A G M</u>	220
<u>ATCTTTCGCAAGGAACCTTTCTTTTATGGTCATGATAATCAGGATCAGCTCGTCAAAATTGCAAAG</u>	924
<u>I F R K E P F F Y G H D N Q D Q L V K I A K</u>	242
<u>GTACTTGGGACAGATGAGTTGAACGCATATTTGCACAAGTATCAATTAGAGCTTGATCCTCAGCTA</u>	990
<u>V L G T D E L N A Y L H K Y Q L E L D P Q L</u>	264
<u>GAGGCTATGGTTGGGAGACACAGTAGGAAGCCATGGTCCAAATTTATTAATGCAGACAATCAGCAT</u>	1056
<u>E A M V G R H S R K P W S K F I N A D N Q H</u>	286
<u>CTAGTGTACCAGAGGCTATAGATTTTCTTGACAAGCTTCTTCGTTATGATCATCAGTCTAGACTT</u>	1122
<u>L V S P E A I D F L D K L L R Y D H Q S R L</u>	308
<u>ACAGCAAAGAAGCAATGGCCCATCCATATTTCTTGCAAGTGAGGGCTGCAGAAACTAGCAGGATG</u>	1188
<u>T A K E A M A H P Y F L Q V R A A E T S R M</u>	330
<u>AGGACACAGTAGCTTCTTGTCTTGCTGTCAATGGGAAGAAAGAAAACCTATGGCGTGATGTA</u>	1254
<u>R T Q</u>	333
CCATTTGAATCCTTGTTAAGTAACATTTGTGGAAACTCGTAGTTGAACTCGAGTATTAACATCTAC	1320
CGAATTTGGGAAATACAGAATTTTATTTTCAGAAA	1356

(b) *N. tabacum* CK2a54

GAATTCGGCACGAGCTCCTCTCCACTTACCTTTGAAATCATCCATATTCTGTACTACTGAGGATCG	66
CTGTTGATTACGTCACCGGCGGTGGCTTCACATGGAAAATGCTGCCTTCAATTTCTTCTAGTGTGT	132
GCCCGTCTTGTGTGCTTATCGTGCACCTCTTGCTCACCTCCTGACCTCCTACAGCTCGTCTGCTACT	198
TCTGCCACCGGAAATTTCTGTCGGTTTTGGTAAGATCAACAGCTCTGAACCGGTGATTGACGGTAAA	264
ACTATGTCAAAAGCTCGTGTTTACACCGATGTTAATGTCCTTCGCCCGAGGGAATATTGGGATTAT	330
<u>M S K A R V Y T D V N V L R P R E Y W D Y</u>	21
<u>GAAGCCCTTACTGTTCAATGGGGTGATCAGGATGACTATGAGGTTGTTAGGAAAGTTGGAAGAGGA</u>	396
<u>E A L T V Q W G D Q D D Y E V V R K V G R G</u>	43
<u>AAATATAGTGAAGTTTTTGAAGGTATAAATGTTAACAGCCATGAAAAGTGCATAATCAAGATCCTG</u>	462
<u>K Y S E V F E G I N V N S H E K C I I K I L</u>	65
<u>AAACCTGTTAAGAAGAAAAAGATCAAGAGAGAGATAAAAAATCTTGCAGAACCTCTGTGGGGACCA</u>	528
<u>K P V K K K K I K R E I K I L Q N L C G G P</u>	87
<u>AACATTGTCAAACCTCTTGATATTGTCAGAGATCAGCACTCAAAAACCTCAAGCTTAATTTTTGAG</u>	594
<u>N I V K L L D I V R D Q H S K T P S L I F E</u>	109
<u>TATGTGAACAGTACAGATTTCAAAGTACTGTACCCAACATTAACAGATTATGACATCCGGTACTAC</u>	660
<u>Y V N S T D F K V L Y P T L T D Y D I R Y Y</u>	131
<u>ATATATGAGCTTCTCAAGGCACTAGACTATTGTCATTCAAGGAATAATGCATAGAGATGTCAAG</u>	726
<u>I Y E L L K A L D Y C H S Q G I M H R D V K</u>	153
<u>CCACATAATGTTATGATAGACCATGAATTGCGGAAGCTTCGCTTGATAGACTGGGGTCTTGCTGAA</u>	792
<u>P H N V M I D H E L R K L R L I D W G L A E</u>	175
<u>TTTTACCATCCAGGAAAGGAATATAATGTTCTGTTGGCTTCAAGATACTTCAAGGCCCTGAACTT</u>	858
<u>F Y H P G K E Y N V R V A S R Y F K G P E L</u>	197
<u>CTGTTGACTTGAAGACTATGACTATTCTTTGGACATGTGGAGTCTTGGATGCATGTTGACAGGA</u>	924
<u>L V D L Q D Y D Y S L D M W S L G C M F A G</u>	219
<u>ATGATTTCCGCAAGAACCTTTCTTTATGGTCATGATAACCAGGATCAGCTTGTCAAATTTGCT</u>	990
<u>M I F R K E P F F Y G H D N Q D Q L V K I A</u>	241
<u>AAGGTAAGTGGAACTGATGAGTTGAATGCATATCTGCACAAGTATCAACTAGAACTTGCCTCAG</u>	1056
<u>K V L G T D E L N A Y L H K Y Q L E L D P Q</u>	263
<u>CTGGAGGCTATGGTTGGGAGACACAGTAGGAAGCCATGGTCCAAATTTATAAATGCAGATAATCAG</u>	1122
<u>L E A M V G R H S R K P W S K F I N A D N Q</u>	285
<u>CATTTAGTGTCCGAGAGGCTATAGATTTTCTTGACAAGCTTCTCCGTTATGACCATCAGGATAGA</u>	1188
<u>H L V S P E A I D F L D K L L R Y D H Q D R</u>	307
<u>CTTACAGCAAGAGAAGCAATGGCCATCCTTATTTCTGCAAGTGAGGGCTGCAGAGAATAGCAGG</u>	1254
<u>L T A R E A M A H P Y F L Q V R A A E N S R</u>	329
<u>ATGAGGACGCAGTAGTTGTAGTGGTCTTACTGGGAAAGAAGAAATGGTGGTGAATGTAGCATATA</u>	1320
<u>M R T Q</u>	333
TTTCTCTTTCATCTACTTGGATTAAAGTACGGGGTAAGATGAACTTAGAGGGCAGAATTTTCATCA	1386
TGAAACATTTTCATGAGCAATTGGTTTCATAAATCTACCTCTCATGACCTTGTGACGATTGCCAAT	1452
GTCCCCCTGCTGATTATGAATTATCTTCATTAGTCTTCATATTTTTTTGTATCCAAAACCATCTT	1518
CCATGTGGGGAGTGTATTGTTTGAAGAATTGAAATTTACCGAAGCTTTTTTAACCGAGGAACTTTGCC	1584
AAGTTGTCCACTGCCTTGACGCTGTCACATACTGGTAGAATGCATTGCGTCGTTGGTCGAAA	1646

(c) *N. tabacum* CK2a59

GAATTCGGCACGAGTTCTCCTCTCCTCTACCTTTGAAATCATCTACTTCACTATAAATTATACTGAG	66
AATCGCTGTTGATTACTTCACCGCGGGTGGCTTCACATGGAAGATGCTGCCTTCAATTTCTTCTAG	132
TGTGCGCCGTCCTTGTGCTTATCGTGCACCTCTTGCCTCACCTCCTGACCTCCTACAGCCCGTCG	198
CTACTTCTGCTACCGGAAATTTCTGTCAGTTTTGGTAAGATCAACAGCTCTGAACCAGTGATTGACG	264
GTAAAATTATGTCGAAAGCTCGTGTTTACACCGATGTCAATGTGCTTCGCCCGAGGAATATTGGG	330
M S K A R V Y T D V N V L R P R E Y W D	20
<u>ATTATGAAGCCCTTACTGTTCAATGGGGTGATCAGGATGACTATGAGGTTGTTCCGAAAAGTTGGAA</u>	396
Y E A L T V Q W G D Q D D Y E V V R K V G R	42
<u>GAGGAAAATATAGTGAAGTTTTTGAAGGTATAAATGTTAACAGCAACGAAAAGTGCATAATCAAGA</u>	462
G K Y S E V F E G I N V N S N E K C I I K I	64
<u>TCCTGAAACCTGTCAAGAAGAAAAAGATCAAGAGAGAGATCAAAATCTTGCAGAACCTCTGTGGCG</u>	528
L K P V K K K K I K R E I K I L Q N L C G G	86
<u>GACCAAACATTGTCAAACCTCTTGATATTGTCAAGAGATCAGCACTCAAAAACCTCCAAGCTTAATTT</u>	594
P N I V K L L D I V R D Q H S K T P S L I F	108
<u>TTGAGTATGTGAACAGTACAGATTTCAAAGTACTGTACCCTACATTAACAGATTATGACATCCGGT</u>	660
E Y V N S T D F K V L Y P T L T D Y D I R Y	130
<u>ACTACATATATGAGCTTCTCAAGGCACTAGACTATTGTCAATTCACAGGAATAATGCATAGAGATG</u>	726
Y I Y E L L K A L D Y C H S Q G I M H R D V	152
<u>TCAAGCCACATAATGTTATGATAGACCATGAATGCGGAAGCTTCGCTTGATAGACTGGGGTCTTG</u>	792
K P H N V M I D H E L R K L R L I D W G L A	174
<u>CTGAATTTTACCATCCAGGAAAGGAATATAATGTTCTGTTGGCTTCAAGATACTTCAAGGGCCCGG</u>	858
E F Y H P G K E Y N V R V A S R Y F K G P E	196
<u>AACTTCTTGTGACTTGCAAGACTATGACTATTCTTTGGACATGTGGAGTCTTGGATGCATGTTTG</u>	924
L L V D L Q D Y D Y S L D M W S L G C M F A	218
<u>CAGGAATGATTTTCCGGAAGGAACCTTTCTTCTATGGTCATGATAACCAGGATCAGCTTGTCAAAA</u>	990
G M I F R K E P F F Y G H D N Q D Q L V K I	240
<u>TTGCTAAGGTAAGTACTTGAAGTATGAGTTGAATGCATATCTGCACAAGTATCAACTAGAACTTGATC</u>	1056
A K V L G T D E L N A Y L H K Y Q L E L D P	262
<u>CTCAGCTGGAGGCTATGGTTGGGAGACACAGTAGGAAGCCATGGTCCAAATTTATAAATGCAGATA</u>	1122
Q L E A M V G R H S R K P W S K F I N A D N	284
<u>ATCAGCATTTAGTGTGCCAGAGGCTATAGATTTTCTTGACAAGCTTCTCCGTTATGACCATCAGG</u>	1188
Q H L V S P E A I D F L D K L L R Y D H Q D	306
<u>ATAGACTTACAGCAAGAGAAGCAATGGCCCATCTTATTTCTGCAAGTGAGGGCTGCAGAGAATA</u>	1254
R L T A R E A M A H P Y F L Q V R A A E N S	328
<u>GCAGGATGAGGACGCAGTAGCCAGTTGTATTGGTCTTACCAGGAAAGAAAATATGGTGTAAATG</u>	1320
R M R T Q	333
TAGCATACATTGCTCTCTTTCATCTATTTGGATTAAAGTACAGGATAAGTTGAACCTTAAGAGGGCAG	1386
AATTTTCATCATGGAGCATTTTCATGAGCAATTGGTTTCATAAATCTACCTCTCATGACCTTGTGAC	1452
GATTGCCTATGTTCCCCCTGCCGATTATGAATTCTTTCATTAGTCTTCATATTTTTGTATCCAAA	1518
GCCATCTTCCATGTGGAGTGTATTGTTTGGAAATTGCAATTTACTGAAGCTTTTTTACTGAGAACT	1584
TTGCCAAGTTGACGTTGTGGCACATACTGGTAGAGTGCATTGCTTCATCATTGAGCCAGCTTGT	1650
GTGTACTTTTACTTGGATATATAAGCTCTCTTTTTTGTTCAAA	1694

Fig 8: Seqüències de nucleòtids i seqüències d'aminoàcids deduïdes (en negreta) dels cDNAs corresponents als clons CK2a45 (a), CK2a54 (b) i CK2a59 (c). La part subratllada correspon a la zona codificant dels gens. A la dreta s'indica la numeració de la seqüència de nucleòtids, i en negreta la d'aminoàcids.

Per als clons CK2 α 54 i CK2 α 59 es va calcular que existien més d'un 90% d'identitats en les parts 5' i 3' no codificants, i que la part codificant diferia tan sols en un aminoàcid i un 1.8% de nucleòtids. No obstant, els segments no codificants del clo 59 eren sensiblement més llargs que els del clo 54. Atès que *Nicotiana tabacum* conté un genoma amfidiplòid resultat de la combinació dels genomes de *Nicotiana sylvestris* i *Nicotiana tomentosiformis*, es podia concloure que els clons 54 i 59 corresponien a varietats al·lèliques de un mateix gen que es van originar en els dos genomes ancestrals. A la Figura 9 es mostra l'alineament a nivell de seqüència de nucleòtids i de seqüència d'aminoàcids dels tres cDNAs, en el qual es pot copsar la gran identitat que existeix a nivell nucleotídic entre els clons 54 i 59. Per altra banda, els clons 45 i 59 són idèntics en un 98.5% d'aminoàcids i els nucleòtids que conformen el ORF ho són en un 92.8%. Els extrems 5' i 3' no codificants presenten unes identitats del 64.6% i el 59.3%, respectivament.

(a)

CK2a 59 (CKA2)	1	GAATTCGGCAGGAGTTCCTCTCTCTACCTTTGAAATCATCTACTTCACTATAATTAT
CK2a 54	1	GAATTCGGCAGGAGCTCCTCTCTCACT-TACCTTTGAAATCATCCATATT-CTGACT---
CK2a 45 (CKA1)	1	GAATTCGGCAGGAGCTTTTCTT-----AAAATGTTGAGTGAGTGTGCC---
CK2a 59 (CKA2)	61	ACTGAGAATCGCTGTTGATTACTTTCACCGGCGGTGGCTTCACATGGAAGATGCTGCCTTC
CK2a 54	56	ACTGAGGATCGCTGTTGATTACGTCACCGGCGGTGGCTTCACATGGAAAATGCTGCCTTC
CK2a 45 (CKA1)	45	AGTAAAG-----TAGTAGTGTACTGGCGGTGGCGTCTGTAACAAGAAGCTGG-GCCAC
CK2a 59 (CKA2)	121	AATTTCTTCTAGTGTGCGCGCTCCTTGTGCTTATCGTGCACCTCTTGCCTCACCTCCTG
CK2a 54	116	AATTTCTTCTAGTGTGCGCGCTCCTTGTGCTTATCGTGCACCTCTTGCCTCACCTCCTG
CK2a 45 (CKA1)	96	TTCTCTCTAGCCTGCGCTTCTTTCGTTGCCGGCA-----
CK2a 59 (CKA2)	181	ACCTCCTACAGCCCGTCTGCTACTTCTGCTACCGGAAATTTTCGTCAAGTTTTGGTAAGATCA
CK2a 54	176	ACCTCCTACAGCTCGTCTGCTACTTCTGCCACCGGAAATTTTCGTCAAGTTTTGGTAAGATCA
CK2a 45 (CKA1)	133	-----CTACGGCCCGT-----TCGAAATTCGACACCTCA-----ATCA
CK2a 59 (CKA2)	241	ACAGCTCTGAACCAAGTGAATTGACGGTAAAAATTATGTCGAAAGCTCGTGTTTACACCGATG
CK2a 54	236	ACAGCTCTGAACCGGTGAATTGACGGTAAAACTATGTCGAAAGCTCGTGTTTACACCGATG
CK2a 45 (CKA1)	167	ACAACCTCTCAATATCTAATTGCGATAAAGCCATGTCGAAAGCTCGAGTATACACCGATA
CK2a 59 (CKA2)	301	TCAATGTGCTTCGCCCGAGGGAATATTGGGATTATGAAGCCCTTACTGTTCAATGGGGTG
CK2a 54	296	TCAATGTGCTTCGCCCGAGGGAATATTGGGATTATGAAGCCCTTACTGTTCAATGGGGTG
CK2a 45 (CKA1)	227	TCAATGTGCTTCGCCCTAGGGAATATTGGGATTACGAATCCCTTACTGTTCAATGGGGCG
CK2a 59 (CKA2)	361	ATCAGGATGACTATGAGGTTGTTTCGGAAAGTTGGAAGAGGAAAATATAGTGAAGTTTTTG
CK2a 54	356	ATCAGGATGACTATGAGGTTGTTTCGGAAAGTTGGAAGAGGAAAATATAGTGAAGTTTTTG
CK2a 45 (CKA1)	287	ATCAGGATGACTATGAGGTTGTTTCGGAAAGTTGGCAGAGGAAAATAAGTGAAGTTTTTG
CK2a 59 (CKA2)	421	AAGGTATAAATGTTAACAGCAACGAAAAGTGCATAATCAAGATCCTGAAACCTGTCAAGA
CK2a 54	416	AAGGTATAAATGTTAACAGCAATGAAAAGTGCATAATCAAGATCCTGAAACCTGTAAAGA
CK2a 45 (CKA1)	347	AAGGTATAAATGTTAACAGCAACGAAGTGCATAATCAAGATCCTGAAACCTGTAAAGA

CK2a 59 (CKA2)	481	AGAAAAAGATCAAGAGAGAGATCAAAATCTTGCAGAACCTCTGTGGCGGACCAAACATTG
CK2a 54	476	AGAAAAAGATCAAGAGAGAGATAAAATCTTGCAGAACCTCTGTGGCGGACCAAACATTG
CK2a 45 (CKA1)	407	AGAAAAAGATCAAAAGAGAGATAAAATATTTGCAAAACCTCTGTGGTGGACCAAACATTG
CK2a 59 (CKA2)	541	TCAAACCTCTTGATATTGTTCAGAGATCAGCACTCAAAAACCTCAAGCTTAATTTTTGAGT
CK2a 54	536	TCAAACCTCTTGATATTGTTCAGAGATCAGCACTCAAAAACCTCAAGCTTAATTTTTGAGT
CK2a 45 (CKA1)	467	TCAAACCTCTTGATATTGTTCAGAGATCAGCACTCAAAAACCTCAAGCTTATTTTTGAGT
CK2a 59 (CKA2)	601	ATGTGAACAGTACAGATTTCAAAGTACTGTACCCACATTAACAGATTATGACATCCGGT
CK2a 54	596	ATGTGAACAGTACAGATTTCAAAGTACTGTACCCAAACATTAACAGATTATGACATCCGGT
CK2a 45 (CKA1)	527	ACGTGAACAGCACTGATTTCAAAGTATTTGTACCCAACGCTAACCGATTATGACATACGGT
CK2a 59 (CKA2)	661	ACTACATATATGAGCTTCTCAAGGCACTAGACTATTGTCAATTCACAGGGAATAATGCATA
CK2a 54	656	ACTACATATATGAGCTTCTCAAGGCACTAGACTATTGTCAATTCACAAGGAATAATGCATA
CK2a 45 (CKA1)	587	ACTACATATATGAGCTTCTCAAGGCGCTAGATTATTGTCAATTCACAGGGAATAATGCATA
CK2a 59 (CKA2)	721	GAGATGTCAAGCCACATAATGTTATGATAGACCATGAATTGCGGAAGCTTCGCTTGATAG
CK2a 54	716	GAGATGTCAAGCCACATAATGTTATGATAGACCATGAATTGCGGAAGCTTCGCTTGATAG
CK2a 45 (CKA1)	647	GAGATGTCAAGCCACATAATGTTATGATAGACCATGAATGCGGAAGCTTCGCTTGATAG
CK2a 59 (CKA2)	781	ACTGGGGTCTTGCTGAATTTTACCATCCAGGAAAGGAATATAATGTTTCGTGTGGCTTCAA
CK2a 54	776	ACTGGGGTCTTGCTGAATTTTACCATCCAGGAAAGGAATATAATGTTTCGTGTGGCTTCAA
CK2a 45 (CKA1)	707	ACTGGGGTCTTGCTGAATTTTACCATCCAGGAAAGGATATAATGTTTCGTGTGGCTTCAA
CK2a 59 (CKA2)	841	GATACTTCAAGGGCCCGAACTTCTTGTGACTTGCAAGACTATGACTATTCCTTTGGACA
CK2a 54	836	GATACTTCAAGGGCCCTGAACCTTCTTGTGACTTGCAAGACTATGACTATTCCTTTGGACA
CK2a 45 (CKA1)	767	GATACTTCAAGGGCCCTGAACCTTCTAGTTGACTTGCAAGACTATGACTATTCCTTTGGACA
CK2a 59 (CKA2)	901	TGTGGAGTCTTGGATGCATGTTTGCAGGAATGATTTTCCGCAAGGAACCTTTCTTTATG
CK2a 54	896	TGTGGAGTCTTGGATGCATGTTTGCAGGAATGATTTTCCGCAAGGAACCTTTCTTTATG
CK2a 45 (CKA1)	827	TGTGGAGCTTGGCTGCATGTTTGCAGGAATGATCTTTCGCAAGGAACCTTTCTTTATG
CK2a 59 (CKA2)	961	GTCATGATAACCAGGATCAGCTTGTCAAAAATGCTAAGGTACTTGGAACTGATGAGTTGA
CK2a 54	956	GTCATGATAACCAGGATCAGCTTGTCAAAAATGCTAAGGTACTTGGAACTGATGAGTTGA
CK2a 45 (CKA1)	887	GTCATGATAATCAGGATCAGCTCGTCAAAAATGCAAAAGGTACTTGGACAGATGAGTTGA
CK2a 59 (CKA2)	1021	ATGCATATCTGCACAAGTATCAACTAGAACCTTGATCCTCAGCTGGAGGCTATGGTTGGGA
CK2a 54	1016	ATGCATATCTGCACAAGTATCAACTAGAACCTTGATCCTCAGCTGGAGGCTATGGTTGGGA
CK2a 45 (CKA1)	947	ACGCATATCTGCACAAGTATCAATTAGAGCTTGATCCTCAGCTAGAGGCTATGGTTGGGA
CK2a 59 (CKA2)	1081	GACACAGTAGGAAGCCATGGTCAAATTTATAAATGCAGATAATCAGCATTTAGTGTCCG
CK2a 54	1076	GACACAGTAGGAAGCCATGGTCAAATTTATAAATGCAGATAATCAGCATTTAGTGTCCG
CK2a 45 (CKA1)	1007	GACACAGTAGGAAGCCATGGTCAAATTTATAAATGCAGATAATCAGCATTTAGTGTCCG
CK2a 59 (CKA2)	1141	CAGAGGCTATAGATTTTCTTGACAAGCTTCTCCGTTATGACCATCAGGATAGACTTACAG
CK2a 54	1136	CAGAGGCTATAGATTTTCTTGACAAGCTTCTCCGTTATGACCATCAGGATAGACTTACAG
CK2a 45 (CKA1)	1067	CAGAGGCTATAGATTTTCTTGACAAGCTTCTCCGTTATGATCATCAGTCTAGACTTACAG
CK2a 59 (CKA2)	1201	CAAGAGAAGCAATGGCCCATCCTTATTTCTGCAAGTGAGGGCTGCAGAGAATAGCAGGA
CK2a 54	1196	CAAGAGAAGCAATGGCCCATCCTTATTTCTGCAAGTGAGGGCTGCAGAGAATAGCAGGA
CK2a 45 (CKA1)	1127	CAAAAGAAGCAATGGCCCATCAATATTTCTGCAAGTGAGGGCTGCAGAAACTAGCAGGA
CK2a 59 (CKA2)	1261	TGAGGACGCAGTAGCAG-TTGTATTGGTC----TTACCGGAAAGAAGAAA-TATGGT
CK2a 54	1256	TGAGGACGCAGTAGCAG-----TTGTAGTGGTC----TTACTGGAAAGAAGAAAT-GGTGGT
CK2a 45 (CKA1)	1187	TGAGGACACAGTAGCAGTTTCTTGTCTTGCTTGTCTGCAATGGGAAGAAGAAAATATGGC

CK2a 59 (CKA2) 1315 GTAATGTAGCATA CATTGCTCTCTTCATCTATTTGGATTAAAGTACAGGATAAGTTGAAC
 CK2a 54 1306 GTAATGTAGCATATATTTCTCTCTTCATCTACTTGGATTAAAGTACGGGGTAAGATGAAC
 CK2a 45 (CKA1) 1247 GTGATGTACCATTGGAATCTTGTTAAGTACATTTGTGGAAACTCGT----AGTTGAAC

CK2a 59 (CKA2) 1375 TTAAGAGGGCAGAATTTTCATCATGGAGCATTTTCATGAGCAATTGGTTTCATAAACTACC
 CK2a 54 1366 TTAAGAGGGCAGAATTTTCATCATGAAACATTTTCATGAGCAATTGGTTTCATAAACTACC
 CK2a 45 (CKA1) 1303 TCGAGTATTAACATCTACCGAATTTGGGAAATA CAGAATTTTATTTTCAG-----

CK2a 59 (CKA2) 1435 TCTCATGACCTTGTGTGACGATTGCCATATGTTCCCCCTGCCGATTATGAATTCTCTTCATT
 CK2a 54 1425 TCTCATGACCTTGTGTGACGATTGCCAAATGTTCCCCCTGCTGATTATGAATTCTCTTCATT
 CK2a 45 (CKA1) -----

CK2a 59 (CKA2) 1495 AGTCTTCATATTTTT--GTATCCAAAGCCATCTTCCATGTG--GAGTGTATTGTTTGAGA
 CK2a 54 1485 AGTCTTCATATTTTTTTGTATCCAAACCATCTTCCATGTGGGAGTGTATTGTTTGAGA
 CK2a 45 (CKA1) -----

CK2a 59 (CKA2) 1551 ATTGCAATTTACGGAAGCTTTTTTA--CTGAGAACTTTGCCAAGTTGACGTTGTGGCACAT
 CK2a 54 1545 ATTGCAATTTACCGAAGCTTTTTTAACCGAGAACTTTGCCAAGTTGTC-----
 CK2a 45 (CKA1) -----

CK2a 59 (CKA2) 1610 ACTGGTAGAGTGCATGTGCTTCATCATTCAGCCAGCTTGTTCGTACTTTATTACTTGCAT
 CK2a 54 1593 -----CACTGCCCTTGACGCT--GTCA--CATACTGCTAGAAATGCATTGCGTCTGCT
 CK2a 45 (CKA1) -----

CK2a 59 (CKA2) 1670 ATATAAGCTCTCTTTTTTGTTCGA
 CK2a 54 1638 -----TGGTGG
 CK2a 45 (CKA1) -----

(b)

CK2a 59 (CKA2) 1 MSKARVYTDVNLRPREYWDYEALTVQWGDQDDYEVVRKVGRGKYSEVFEGINVNSNEK
 CK2a 54 1 MSKARVYTDVNLRPREYWDYEALTVQWGDQDDYEVVRKVGRGKYSEVFEGINVNSHEK
 CK2a 45 (CKA1) 1 MSKARVYTDVNLRPREYWDYESLTVQWGDQDDYEVVRKVGRGKYSEVFEGINVNSNEK

CK2a 59 (CKA2) 61 CIKILKPVKKKIKREIKILQNLCCGPNIVKLLDIVRDQHSKTPSLIFEYVNSTDFKVL
 CK2a 54 61 CIKILKPVKKKIKREIKILQNLCCGPNIVKLLDIVRDQHSKTPSLIFEYVNSTDFKVL
 CK2a 45 (CKA1) 61 CIKILKPVKKKIKREIKILQNLCCGPNIVKLLDIVRDQHSKTPSLIFEYVNSTDFKVL

CK2a 59 (CKA2) 121 YTLTDYDIRYYIYELLKALDYCHSQGIMHRDVKPHNVMIDHELKRLRLIDWGLAEFYHP
 CK2a 54 121 YTLTDYDIRYYIYELLKALDYCHSQGIMHRDVKPHNVMIDHELKRLRLIDWGLAEFYHP
 CK2a 45 (CKA1) 121 YTLTDYDIRYYIYELLKALDYCHSQGIMHRDVKPHNVMIDHELKRLRLIDWGLAEFYHP

CK2a 59 (CKA2) 181 GEYNVRVASRYFKGPELLVDLQDYDYSLDMWSLGCMFAGMIFRKEPFFYGHNDQDLVK
 CK2a 54 181 GEYNVRVASRYFKGPELLVDLQDYDYSLDMWSLGCMFAGMIFRKEPFFYGHNDQDLVK
 CK2a 45 (CKA1) 181 GEYNVRVASRYFKGPELLVDLQDYDYSLDMWSLGCMFAGMIFRKEPFFYGHNDQDLVK

CK2a 59 (CKA2) 241 IKVLGTDELNAYLHKYQLELDPQLEAMVGRHSRKPWSKFINADNQHLVSPEAIDFLDKL
 CK2a 54 241 IKVLGTDELNAYLHKYQLELDPQLEAMVGRHSRKPWSKFINADNQHLVSPEAIDFLDKL
 CK2a 45 (CKA1) 241 IKVLGTDELNAYLHKYQLELDPQLEAMVGRHSRKPWSKFINADNQHLVSPEAIDFLDKL

CK2a 59 (CKA2) 301 LRYDHQDRLTAREAMAHPHYFLQVRAAENSRRMTO
 CK2a 54 301 LRYDHQDRLTAREAMAHPHYFLQVRAAENSRRMTO
 CK2a 45 (CKA1) 301 LRYDHQSRLTAREAMAHPHYFLQVRAAETSRRMTO

Fig 9 (pàg 147 a 149): Comparació dels clons CK2a45, CK2a54 i CK2a59. (a) Alineament de la seqüència de nucleòtids. Els triplets en vermell assenyalen el codó d'iniciació, ATG, i de finalització, TAG. (b) Alineament de la seqüència d'aminoàcids.

La comparació de les seqüències d'aminoàcids deduïdes dels clons CK2 α 45 i CK2 α 54 amb les proteïnes introduïdes als bancs de dades, va permetre identificar-les com a homòlegs de la subunitat CK2 α . Particularment, les homologies més altes, superiors al 90%, s'observaven amb les proteïnes de les plantes, *Arabidopsis* i *Zea mays*. A la Taula 1 es presenta un sumari de les identitats calculades entre les seqüències d'aminoàcids de diferents espècies. De l'anàlisi de les identitats se'n pot concloure que la proteïna *N. tabacum* 45 correspon a la forma comunment anomenada CKA1 o α , mentre que *N. tabacum* 59 correspondria a la forma CKA2 o α' .

CK2a																	
N. tabacum 45	100	N. tabacum CKA1 (clo 45)															
N. tabacum 59	98.5	100	N. tabacum CKA2 (clo 59)														
A. thaliana CKA1	93.1	92.8	100	A. thaliana CKA1													
A. thaliana CKA2	93.7	93.7	94.3	100	A. thaliana CKA2												
Z. mays CKA1	92.8	93.7	89.8	91.0	100	Z. mays CKA1											
Z. mays CKA2	93.7	95.2	90.7	91.9	96.1	100	Z. mays CKA2										
Z. mays CKA3	92.2	93.7	89.5	90.7	97.3	95.5	100	Z. mays CKA3									
H. sapiens CKA1	65.0	64.5	61.6	62.9	65.0	65.2	65.0	100	H. sapiens CKA1								
H. sapiens CKA2	68.3	68.6	65.1	67.4	68.9	68.8	68.6	74.5	100	H. sapiens CKA2							
X. laevis	71.2	71.5	68.1	69.5	72.3	71.8	72.3	85.7	81.8	100	X. laevis						
D. melanogaster	73.7	74.6	71.0	71.9	73.1	74.7	73.5	75.2	76.9	83.4	100	D. melanogaster					
D. discoideum	66.8	67.6	65.9	67.1	67.8	67.6	67.2	56.4	60.8	62.3	65.0	100	D. discoideum				
S. cerevisiae CKA1	55.3	54.8	52.6	53.4	54.9	54.4	54.9	49.7	55.6	54.9	56.6	50.9	100	S. cerevisiae CKA1			
S. cerevisiae CKA2	56.9	56.6	54.3	55.7	56.8	56.4	57.5	48.4	53.9	53.6	54.9	57.2	52.0	100	S. cerevisiae CKA2		
S. pombe	67.5	67.8	65.2	67.0	67.7	67.8	67.4	54.4	59.8	60.7	62.3	63.8	55.1	59.7	100	S. pombe	
T. parva	52.1	52.8	50.2	50.5	53.4	52.8	52.9	46.3	49.4	51.1	51.9	50.7	40.7	45.6	50.0	100	T. parva

Taula 1: Percentatges d'identitat a nivell de seqüència d'aminoàcids entre les CK2a de diferents espècies, calculats amb el programa ALIGN. Pels càlculs s'han pres com a base les seqüències enteres de les proteïnes, sense discriminar les particularitats pròpies d'algunes d'elles, com extrems N- o C- terminals més llargs. Això fa que alguns valors siguin diferents dels presentats per altres autors, com Guerra (1999).

Les dades sobre les identitats a nivell de seqüència d'aminoàcids han permès construir un arbre filogenètic on es mostra l'origen evolutiu de les CK2 α de les diferents espècies comparades (Fig 10). L'arbre que es presenta s'ha generat, a partir de l'alineament de les seqüències proteiques de diferents espècies, amb el programa DRAWTREE que forma part del paquet de programes per anàlisis filogenètics PHYLIP (Felsenstein, 1993). És un arbre "no arrelat" (unrooted) i en la representació gràfica que es mostra, la longitud de les branques no reflexa les distàncies evolutives entre les diferents proteïnes, sinó que únicament indica les relacions filogenètiques entre elles.

S'observen tres grans grups evolutius independents: un per a les proteïnes de les plantes, un altre per a les dels vertebrats i insectes, i un tercer grup, per als organismes unicel·lulars (llevats i protozous). La subunitat α de *D. discoideum* no s'adscriu a cap d'aquests tres grups. La CK2 d'aquesta espècie té estructura exclusivament monomèrica, i no s'ha demostrat que en aquesta espècie existeixi subunitat β . Atès que a les plantes la CK2 també pot ser monomèrica, és factible situar la proteïna de *D. discoideum* més propera a les corresponents proteïnes vegetals que a les de la resta d'espècies.

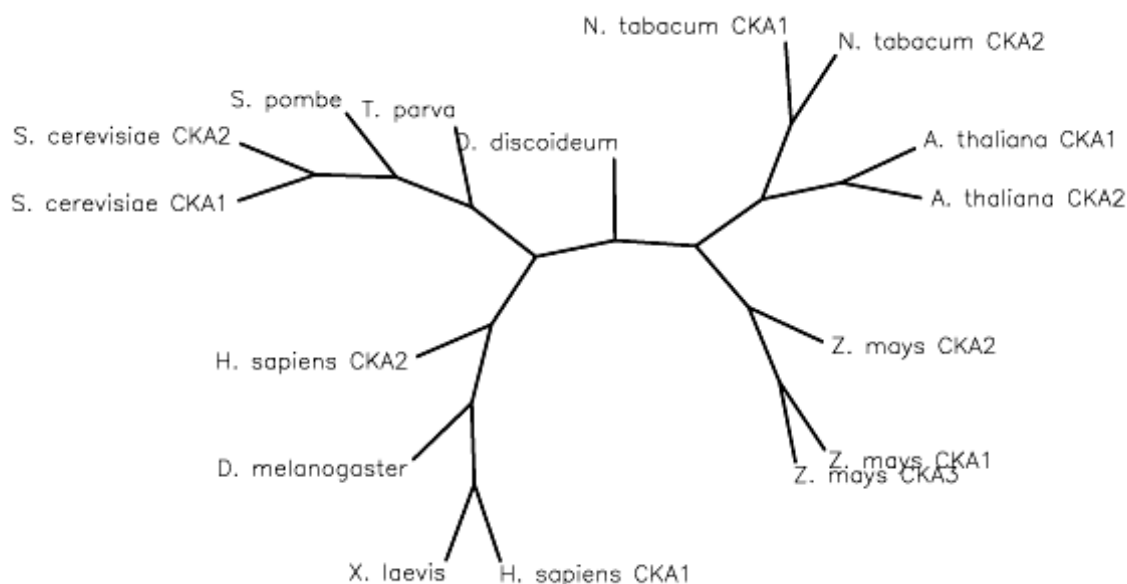


Fig 10: Arbre filogenètic no arrelat (unrooted) construït a partir de les seqüències de la subunitat CK2a de diferents espècies. S'ha utilitzat el programa DRAWTREE del paquet de software per anàlisis filogenètiques PHYLIP.

3.2. Seqüenciació i caracterització del cDNA aïllat per a la subunitat CK2b

La seqüenciació completa de l'insert del clo recombinant aïllat per a la subunitat CK2 β va revelar la presència d'un cDNA de 1528 pb, que contenia un marc obert de lectura de 275 aminoàcids, al qual li corresponia una massa molecular deduïda de 30.8 KDa. A la Fig 11 es mostra un esquema d'aquest cDNA i l'estratègia de seqüenciació que es va seguir. Aquest cDNA corresponia al producte de PCR "ntckb7", descrit a l'apartat 1 d'aquest capítol.

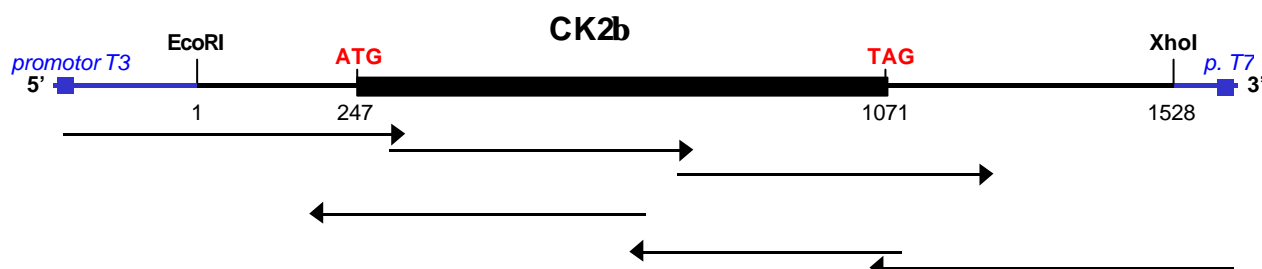


Fig 11: Estructura del cDNA i estratègia de seqüenciació del clo corresponent a la subunitat CK2b de tabac. Es representa en negre l'insert clonat i en blau la seqüència del plasmidi que flanqueja l'insert. La ratlla negra prima representa les parts 5' i 3' no codificants, i la ratlla gruixuda la part codificant del cDNA. En vermell s'han representat els codons d'inici, ATG, i final, TAG, de la traducció. Les fletxes indiquen la posició dels oligonucleòtids utilitzats per a la seqüenciació. La numeració utilitzada correspon a la seqüència de nucleòtids de l'insert.

La seqüència de nucleòtids i la d'aminoàcids es presenten a continuació (Fig 12):

GAATTCGGCACGAGACCAACTTCTCTTTGTCCCTTCTCTCCCACTTTCCCCTTCTCTATTGTAGC	66
CGAAACCTAATTATCTTCGTCTACCCGATTCTCTCTCTCTCTACACACACACACAGTTCCT	132
TGCTCTTCTCTCAAAATCTAGGATTTCTCAGCTTCAGAGTCTCTCCAATTTCAATTTCAAGCTACT	198
ATATGCAGATATAAATATAGTAGCAACAAATTGATATATTGTAGAAGAAATGTATAGAGATCGAGG	264
	M Y R D R G
<u>AGGAGGAGGTGGCGGAGGAGGACCGTTGGATCGGAAACGAATCAACGATGCGTTGGATAAGCACTT</u>	330
<u>G G G G G G G P L D R K R I N D A L D K H L</u>	28
<u>AGAGAAGTTATCACCGTCAACATCTAGGTCTTTGAAGGATAAAGCTGTTCCGTCTACCTCCGCCTC</u>	396
<u>E K L S P S T S R S L K D K A V P S T S A S</u>	50
<u>CGCGGTGGTGGTGGTGGAAAATCGCATTTTGATCATCGCAACACCAGCAAAAATAAGTGCCTGA</u>	462
<u>A G G G G G K S H F D H R N T S K N K C S D</u>	72
<u>TGAGGAATCTGAAACGGACAGTGAAGAGTCTGATGTTAGTGGTTCTGATGGGGATGATACTTCATG</u>	528
<u>E E S E T D S E E S D V S G S D G D D T S W</u>	94
<u>GATTCCTGGTTTTGTAACCTGCGTGGTAATGAGTCTTCTGTGAAGTTGATGATGATTACATTCA</u>	594
<u>I S W F C N L R G N E F F C E V D D D Y I Q</u>	116
<u>AGATGATTTTAACTCTGTGGATTGAGCAGTCAAGTTCCTACTATGACTATGCGCTTGACCTCAT</u>	660
<u>D D F N L C G L S S Q V P Y Y D Y A L D L I</u>	138
<u>CCTTGATGTTGAATCCTCCCATGAGGAGCAGAATGAATTAGTTGAATCGGCAGCAGAGATGTTATA</u>	726
<u>L D V E S S H E E Q N E L V E S A A E M L Y</u>	160
<u>TGGTTTGATTCATGTTCCGGTACATTTTGACTACCAAGGGAATGGCCGCAATGTTGGAGAAGTACAA</u>	792
<u>G L I H V R Y I L T T K G M A A M L E K Y K</u>	182
<u>AACTACGACTTTGGAAGATGCCCGGAGTTTATGTCAGTGGACAGCCTTGCTTCTCTGTTGGTCA</u>	858
<u>N Y D F G R C P R V Y C S G Q P C L P V G Q</u>	204
<u>ATCAGATATTCGCGCTCAAGTACTGTAAAAATATACTGTCCCAAGTGTGAGGACATTTATTACCC</u>	924
<u>S D I P R S S T V K I Y C P K C E D I Y Y P</u>	226
<u>CCGATCAAAGTACCAAGGCAATATTGACGGGGCTTACTTTGGGACAAACATTTCTCATCTCTTCTT</u>	990
<u>R S K Y Q G N I D G A Y F G T T F P H L F L</u>	248
<u>GATGACTTATGGACACCTCAAGCCGCAAAAACCAACACAAAATTATACTCCCAGGGTGTTTGGTTT</u>	1056
<u>M T Y G H L K P Q K P T Q N Y T P R V F G F</u>	270
<u>CAAGATCCACAAGACTTGACAGTGAAGCCGTTGTGAAGAGATCATATTTTCTGCCAGTAATGATTC</u>	1122
<u>K I H K T</u>	275
ATACCTGGCTTTTGATGTACAATTCGTATGGTAGAGGCAGTTGAAGAAGAGGAGCTCTTGATAAT	1188
GATGAAAAATTGTTCTTCGTATGGAAGGCAGCTTGGGCCAATCTGTCAAGTGAATTTGTTCCC	1254
AAAATATCGTCGTAAATTTACAAGAGCTTTGTAAGCTTAATTTCTTACCAGTTTGAGAATGGATTT	1320
ATGTTTCTCATCAACCACTTTTCGTGGCTGTCCGTTGATCCTTTGATCTAGCTTCTGAACTTACC	1386
ACTACCATTTTCCAACAGAGGTACTCATCAGGATCTAGACTAGTGTACGTCGGGGTTTCACCCCTT	1452
CTTTGTAGGACAAATTTCCAGTTGTAATGATGTGATTGTATCGAAATGTTATCCAAGCTAAAGTTG	1518
TATGCTGAAA	1528

Fig 12: Seqüència de nucleòtids i seqüència d'aminoàcids deduïda (en negreta) del cDNA aïllat per a la subunitat CK2 b de tabac. La part subratllada correspon a la zona codificant del gen. A la dreta s'indica la numeració de la seqüència de nucleòtids, i en negreta, la d'aminoàcids.

La comparació d'aquesta seqüència amb les proteïnes introduïdes als bancs de dades, va identificar-la com a homòloga de la subunitat CK2 β . Les identitats més grans a nivell de seqüència d'aminoàcids les presentava amb les 4 isoformes d'*Arabidopsis* i les 3 de *Z. mays*, essent màxima amb els gens CKB4 d'*Arabidopsis* i CKB3 de *Z. mays*. També s'observava una homologia significativa amb el gen *stellate* de *Drosophila*, tal com ocorre amb les altres espècies analitzades. A la Taula 2 es presenta un sumari de les identitats calculades entre les seqüències d'aminoàcids de diferents espècies.

CK2b																	
	N. tabacum																
N. tabacum	100	A. thaliana CKB1															
A. thal. CKB1	74.6	100	A. thaliana CKB2														
A. thal. CKB2	72.6	81.0	100	A. thaliana CKB3													
A. thal. CKB3	72.9	66.1	65.9	100	A. thaliana CKB4												
A. thal. CKB4	75.9	69.0	67.0	86.7	100	Z. mays CKB1											
Z. mays CKB1	71.0	70.7	70.6	63.2	65.4	100	Z. mays CKB2										
Z. mays CKB2	71.4	69.3	67.7	66.2	66.7	69.2	100	Z. mays CKB3									
Z. mays CKB3	76.9	71.9	72.0	70.3	72.3	70.4	74.6	100	H. sapiens								
H. sapiens	39.3	37.1	37.7	37.5	37.7	37.8	40.5	39.2	100	D. melanogaster CKB1							
D. mel. CKB1	38.0	35.8	36.1	37.5	37.4	36.6	38.7	37.9	87.9	100	D. melanogaster CKB2						
D. mel. CKB2	33.6	33.5	33.8	33.3	32.1	33.8	35.7	33.4	60.2	58.4	100	S. cerevisiae CKB1					
S. cere. CKB1	28.3	29.7	30.2	28.4	27.3	39.0	31.1	28.9	36.5	34.8	34.1	100	S. cerevisiae CKB2				
S. cere. CKB2	33.1	34.9	34.2	35.5	35.4	33.5	35.2	33.7	38.8	38.2	38.5	35.9	100	S. pombe			
S. pombe	37.5	35.4	36.6	37.5	37.8	36.4	38.5	38.4	53.2	53.4	44.2	35.6	44.4	100	C. albicans		
C. albicans	26.9	25.6	25.1	25.5	25.9	26.1	27.3	26.6	32.7	32.7	32.0	40.6	28.6	32.2	100	D. mel. stell.	
D. mel. stell.	27.8	27.3	27.5	27.7	26.7	28.8	29.4	29.1	35.8	34.9	33.0	23.6	29.1	35.3	24.5	100	

Taula 11: Percentatge d'identitats a nivell de seqüència d'aminoàcids entre les subunitats CK2 β de diferents espècies i el producte del gen *stellate* de *Drosophila*. Per als càlculs s'ha utilitzat el programa ALIGN.

A partir dels percentatges d'identitats i de l'alineament de les seqüències de la CK2 β de diferents espècies, s'ha construït un arbre filogenètic que es mostra a la Figura 13. Com en el cas de l'arbre per a subunitat CK2 α , s'ha utilitzat el programa DRAWTREE del paquet de software PHYLIP (Felsenstein, 1993). L'arbre que es presenta és "no arrelat" (unrooted) i la longitud de les branques no reflexa les distàncies evolutives entre les diferents CK2 β , sinó que únicament indica les relacions filogenètiques.

Les CK2 β de les plantes formen un grup evolutiu propi i independent del de la resta d'espècies. Aquesta observació ve recolzada pel fet que les identitats entre les seqüències

de les plantes són superiors al 60%, mentre que les calculades entre les seqüències de les plantes i les de la resta d'espècies oscil·len entre el 30 i el 40%, i en les espècies més allunyades són, fins i tot, inferiors al 30%. Les formes CKB1 i CKB2 d'*Arabidopsis*, divergeixen de les formes CKB3 i CKB4, tot i pertànyer al mateix grup evolutiu. La subunitat β de *N. tabacum* que hem clonat se situa evolutivament a prop de CKB3 i CKB4 d'*Arabidopsis* i de CKB2 i CKB3 de *Z. mays*, amb les quals mostra les identitats més altes. Per altra banda, les diferents proteïnes de llevats també serien evolutivament properes, així com les dels vertebrats i insectes.

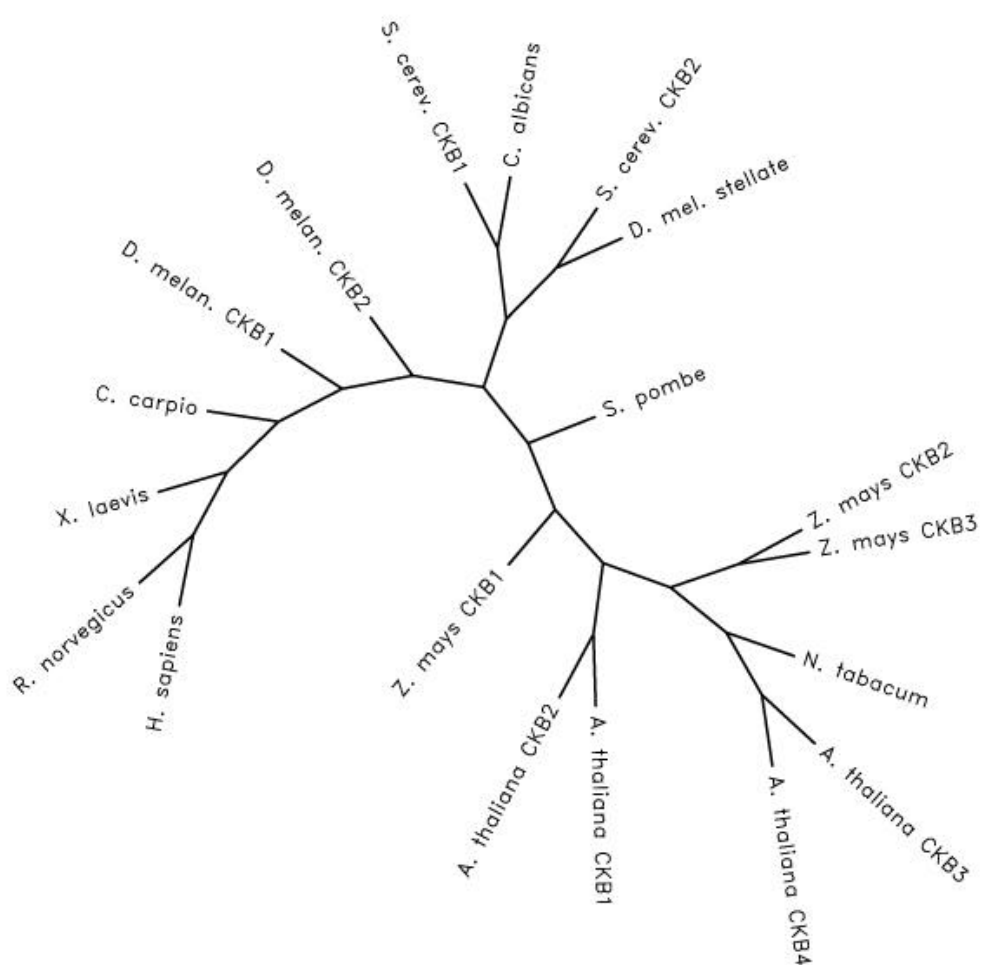


Fig 13: Arbre filogenètic no arrelat (unrooted) construït a partir de les seqüències de la subunitat CK2b de diferents espècies. S'ha utilitzat el programa DRAWTREE del paquet de software per anàlisis filogenètiques PHYLIP.

CAPÍTOL IV:

Discussió

A partir del cribatge d'una biblioteca de cDNA de cèl.lules BY-2 de tabac en creixement exponencial, es van aïllar dos cDNAs diferents amb homologia per a la subunitat α de la CK2, i un cDNA amb homologia per a la subunitat β . Les característiques de les seqüències obtingudes en comparació a les descrites per a les mateixes proteïnes d'altres espècies es discuteixen a continuació.

1. CARACTERÍSTIQUES MÉS IMPORTANTS DE LES CADENES POLIPEPTÍDIQUES CORRESPONENTS A LA SUBUNITAT CK2 α DE TABAC

Les subunitats catalítiques de la CK2 pertanyen, juntament amb les CDKs (quinases dependents de ciclina), les MAP quinases i la GSK-3 (glicogen sintasa 3), al grup de la superfamília de proteïna quinases eucariotes, conegut com a quinases CMCG. Les quinases presenten un domini catalític de uns 250 a 300 aminoàcids de longitud, dins el qual s'hi distingeixen onze onze subdominis amb patrons característics de residus altament conservats (Hanks, 1988). Per motius de simplificació es discutiran només les característiques de les proteïna quinases CK2, posant èmfasi en les característiques pròpies de les formes vegetals.

A la Fig 1 es presenta un alineament a nivell de seqüència d'aminoàcids de les CK2 α més representatives introduïdes als bancs de dades, juntament amb les dues de *N. tabacum* obtingudes en aquesta tesi. Per a facilitar la presentació i la interpretació de l'alineament no s'ha cregut oportú construir-lo a partir de totes les seqüències conegudes, un total de 26 en el moment de la preparació d'aquesta tesi. En conseqüència s'ha escollit un exemple representatiu de cada nivell taxonòmic i totes les seqüències conegudes de les espècies vegetals. Totes les CK2 α mantenen perfectament conservats 13 dels 15 residus invariables que es troben a les seqüències de les diferents proteïna quinases CMCG. Aquests residus s'han marcat amb triangles a la Fig 1.

CAPÍTOL IV: Discussió

H. sapiens CKA1 -----
 N. tabacum CKA1 -----
 N. tabacum CKA2 -----
 A. thaliana CKA1 -----
 A. thaliana CKA2 -----
 Z. mays CKA1 -----
 Z. mays CKA2 -----
 Z. mays CKA3 -----
 H. sapiens CKA2 -----
 X. laevis -----
 D. melanogaster -----
 D. discoideum -----
 S. cerevisiae CKA1 -----
 S. cerevisiae CKA2 -----
 S. pombe -----
 T. parva 1 MIYRYKFKYKIITYLFAII IHKSYCIEFHKYINQYNLSFVKPINNKDIIYRLKRDYQLNKK

H. sapiens CKA1 1 -----MSGPVP-SRAR-----VYTDVNTHRPREYWDYES-HVV
 N. tabacum CKA1 1 -----MSKAR-----VYTDINVLRPREYWDYES-LTV
 N. tabacum CKA2 1 -----MSKAR-----VYTDVNVLRPREYWDYEA-LTV
 A. thaliana CKA1 1 -----MSKAR-----VYTEVNVIRPKTYWDYES-LIV
 A. thaliana CKA2 1 -----MSKAR-----VYTDVNVIRPKTYWDYES-LNV
 Z. mays CKA1 1 -----MSKAR-----VYTDVNVLRPKKEYWDYEA-LTV
 Z. mays CKA2 1 -----MSKAR-----VYTDVNVLRPKKEYWDYEA-LTV
 Z. mays CKA3 1 -----MSKAR-----VYTDVNVLRPKKEYWDYEA-LTV
 H. sapiens CKA2 1 -----MPGPAAGSRAR-----VYAEVNSLRPREYWDYEA-HVP
 X. laevis 1 -----MSGPVP-SRAR-----VYTDVNTHRPREYWDYES-HVV
 D. melanogaster 1 -----MT--LP-SAR-----VYTDVNAHKPDEYWDYEN-YVV
 D. discoideum 1 -----MNHSSKKNKRNILRNKAR-----VYQDVNLHKPKKEYWNYEA-LNV
 S. cerevisiae CKA1 1 -----MKCRVWSEAR-----VYININKORTEEYWDYEN-TVI
 S. cerevisiae CKA2 1 -----MPLPPSTLNQKSNRVYSVAR-----VYKNAACEERPEYWDYEQGVTI
 S. pombe 1 -----MNQTEAAPVVSVSR-----VYAHVNEEMPPEYWDYEN-MQE
 T. parva 61 EENGIFNQPIILNMDQMDLVDTDKSRKYPADLKIILPKTVADVNSKKGPPEYWDYEN-ITL

I
II
III

▼▼▼
▼▲
▼

H. sapiens CKA1 32 EWGN-QDDYQLVRKLRGKGYSEVFEAINTTNNKRVVVKILKPVKPKKIKREIKILENLR-
 N. tabacum CKA1 27 QWGD-QDDYEVVRKVGGRKGYSEVFEGINVNSNEKCIKIKILKPVKPKKIKREIKILQNLIC-
 N. tabacum CKA2 27 QWGD-QDDYEVVRKVGGRKGYSEVFEGINVNSNEKCIKIKILKPVKPKKIKREIKILQNLIC-
 A. thaliana CKA1 27 QWGE-QDDYEVVRKVGGRKGYSEVFEGINVNSKTEKCIKIKILKPVKPKKIKREIKILQNLIC-
 A. thaliana CKA2 27 QWGE-QDDYEVVRKVGGRKGYSEVFEGINVNNNEKCIKIKILKPVKPKKIKREIKILQNLIC-
 Z. mays CKA1 27 QWGE-QDDYEVVRKVGGRKGYSEVFEGINVNNNEKCIKIKILKPVKPKKIKREIKILQNLIC-
 Z. mays CKA2 27 QWGE-QDDYEVVRKVGGRKGYSEVFEGINVNNNEKCIKIKILKPVKPKKIKREIKILQNLIC-
 Z. mays CKA3 27 QWGE-QDNYEVVRKVGGRKGYSEVFEGINVNNNEKCIKIKILKPVKPKKIKREIKILQNLIC-
 H. sapiens CKA2 33 SWGN-QDDYQLVRKLRGKGYSEVFEAINTTNNKRVVVKILKPVKPKKIKREIKILENLR-
 X. laevis 32 EWGN-QDDYQLVRKLRGKGYSEVFEAINTTNNKRVVVKILKPVKPKKIKREIKILENLR-
 D. melanogaster 30 DWGN-QDDYQLVRKLRGKGYSEVFEAINTTTTEKCVKILKPVKPKKIKREIKILENLR-
 D. discoideum 40 KWET-QDDYEIIIRKLRGKGYSEVFEGANIKNNEKCVIKVLKPVKPKKIKREIKILQNLIC-
 S. cerevisiae CKA1 32 DWSTNIKDYEDENKVGGRKGYSEVFQGVKIDSKVKIIVIKMLKPVKPKKIKREIKITDLSN
 S. cerevisiae CKA2 43 DWGK-ISNYEIIIRKLRGKGYSEVFSGRCLVNNCKCVIKVLKPVKPKKIKREIKILQNLIC-
 S. pombe 36 VFCY-QDNYEIIIRKVGGRKGYSEVFEGINVLNNSKCIKIKVLKPVKPKKIKREIKILQNLIC-
 T. parva 120 KWNV-EDSYEIVRKLGRGKGYSEVFEGINVTIKKCVIKILKPVKPKKIKREIKILQNLIC-

CAPÍTOL IV: Discussió

		IV	
H. sapiens CKA1	90	-----	GGPNIITLADIVKDPVSRTPALV
N. tabacum CKA1	85	-----	GGPNIIVKLLDIVRDQHSKTPSLI
N. tabacum CKA2	85	-----	GGPNIIVKLLDIVRDQHSKTPSLI
A. thaliana CKA1	85	-----	GGPNIIVKLLDIVRDQHSKTPSLI
A. thaliana CKA2	85	-----	GGPNIIVKLLDIVRDQHSKTPSLI
Z. mays CKA1	85	-----	GGPNIIVKLLDIVRDQHSKTPSLI
Z. mays CKA2	85	-----	GGPNIIVKLLDIVRDQHSKTPSLI
Z. mays CKA3	85	-----	GGPNIIVKLLDIVRDQHSKTPSLI
H. sapiens CKA2	91	-----	GGTNIITKLLDIVKDPVSKTPALV
X. laevis	90	-----	GGPNIITLADIVKDPVSRTPALV
D. melanogaster	88	-----	GGTNIITLAVKDPVSRTPALI
D. discoideum	98	-----	GGPNIITLVDVVRDQHSKTPSLI
S. cerevisiae CKA1	92	EKVPPTTLPFQKDQYYTNQKEDVLKFI RPYIFDQPHN	GHANTLHLFDI IKDPI SKTP ALV
S. cerevisiae CKA2	101	-----	GGPNIIVGLVDIVQDASKTPALI
S. pombe	94	-----	GGPNIISLLDIVRDPESKTPSLI
T. parva	178	-----	GGPNIIVKLLDIVKDPVSRTPSLI

		V	VI	
H. sapiens CKA1	113	FEFVNNTDFKQLYQITLTDYDIRFYMIEILKALDYCHS	MGIMHRDVKPHNVMIDH	EHKRLR
N. tabacum CKA1	108	FEYVNSTDFKVL YPTLTDYDIRYYIYELLKALDYCHS	QGIMHRDVKPHNVMIDH	EIRKLR
N. tabacum CKA2	108	FEYVNSTDFKVL YPTLTDYDIRYYIYELLKALDYCHS	QGIMHRDVKPHNVMIDH	EIRKLR
A. thaliana CKA1	108	FEYVNSTDFKVL YPTLTDYDIRYYIYELLKALDYCHS	QGIMHRDVKPHNVMIDH	EIRKLR
A. thaliana CKA2	108	FEYVNSTDFKVL YPTLTDYDIRYYIYELLKALDYCHS	QGIMHRDVKPHNVMIDH	EIRKLR
Z. mays CKA1	108	FEYVNTDFKVL YPTLTDYDIRYYIYELLKALDYCHS	QGIMHRDVKPHNVMIDH	EIRKLR
Z. mays CKA2	108	FEFVNNTDFKVL YPTLTDYDIRYYIYELLKALDYCHS	QGIMHRDVKPHNVMIDH	EIRKLR
Z. mays CKA3	108	FEYVNTDFKVL YPTLTDYDIRYYIYELLKALDYCHS	QGIMHRDVKPHNVMIDH	EIRKLR
H. sapiens CKA2	114	FEYVNTDFKQLYQITLTDYDIRFYMIEYELLKALDYCHS	MGIMHRDVKPHNVMIDH	QOKKLR
X. laevis	113	FEFVNNTDFKQLYQITLTDYDIRFYMIEILKALDYCHS	MGIMHRDVKPHNVMIDH	EHRKLR
D. melanogaster	111	FEFVNNTDFKQLYQITLTDYDIRYYIYELLKALDYCHS	MGIMHRDVKPHNVMIDH	EHRKLR
D. discoideum	121	FEYVNTDFKQLSPTLTDYDIRYYIYELLKALDYCHS	MGIMHRDVKPHNVMIDH	QOKKLR
S. cerevisiae CKA1	152	FEYVDNDFRILYKLTLDYIRFYMIEYELLKALDYCHS	MGIMHRDVKPHNVMIDH	KNKKLR
S. cerevisiae CKA2	124	FEETKNVDFRILYPTLTDYDIRYYIYELLKALDYCHS	MGIMHRDVKPHNVMIDH	PTEKLR
S. pombe	117	FEFVDNDFRILYPTLTDYDIRYYIYELLKALDYCHS	MGIMHRDVKPHNVMIDH	KKRKLR
T. parva	201	FEFVNNTDFKQLYPTLTDYDIRYYIYELLKALDYCHS	MGIMHRDVKPHNVMIDH	EKKILR

		VII	VIII	IX
H. sapiens CKA1	173	LIDWGLAEFYHPCQ EYNVRVASRYFKGPELLVDYQMYDYSLDMWSLGCMLASMI FRKEPF		
N. tabacum CKA1	168	LIDWGLAEFYHPCQ EYNVRVASRYFKGPELLVDLQDYDYSLDMWSLGCMFAGMI FRKEPF		
N. tabacum CKA2	168	LIDWGLAEFYHPCQ EYNVRVASRYFKGPELLVDLQDYDYSLDMWSLGCMFAGMI FRKEPF		
A. thaliana CKA1	168	LIDWGLAEFYHPCQ EYNVRVVSRYFKGPELLVDLQDYDYSLDMWSLGCMFAGMI FRKEPF		
A. thaliana CKA2	168	LIDWGLAEFYHPCQ EYNVRVASRYFKGPELLVDLQDYDYSLDMWSLGCMFAGMI FRKEPF		
Z. mays CKA1	168	LIDWGLAEFYHPCQ EYNVRVASRYFKGPELLVDLQDYDYSLDMWSLGCMFAGMI FRKEPF		
Z. mays CKA2	168	LIDWGLAEFYHPCQ EYNVRVASRYFKGPELLVDLQDYDYSLDMWSLGCMFAGMI FRKEPF		
Z. mays CKA3	168	LIDWGLAEFYHPCQ EYNVRVASRYFKGPELLVDLQDYDYSLDMWSLGCMFAGMI FRKEPF		
H. sapiens CKA2	174	LIDWGLAEFYHPCQ EYNVRVASRYFKGPELLVDYQMYDYSLDMWSLGCMLASMI FRKEPF		
X. laevis	173	LIDWGLAEFYHPCQ EYNVRVASRYFKGPELLVDYQMYDYSLDMWSLGCMLASMI FRKEPF		
D. melanogaster	171	LIDWGLAEFYHPCQ EYNVRVASRYFKGPELLVDYQMYDYSLDMWSLGCMLASMI FRKEPF		
D. discoideum	181	LIDWGLAEFYHPCQ EYNVRVASRYFKGPELLVDYQMYDYSLDMWSLGCMFAGMI FRKEPF		
S. cerevisiae CKA1	212	LIDWGLAEFYHPCQ EYNVRVASRYFKGPELLVDYQMYDYSLD LWSFGTMLASMI FRKEPF		
S. cerevisiae CKA2	184	LIDWGLAEFYHPCQ EYNVRVASRYFKGPELLVDYQMYDYSLD LWSVGCMLAAIVFKKEPF		
S. pombe	177	LIDWGLAEFYHPCQ EYNVRVASRYFKGPELLVDYQMYDYSLD LWSVGMFAALIFKKDTF		
T. parva	261	LIDWGLAEFYHPCQ EYSVRVATRYFKGPELLVDYQMYDYSLD LWSIGCMLAGIIFKEPF		

CAPÍTOL IV: Discussió

X

H. sapiens CKA1	233	FHGH	NDQLVRIAKVLGTE	LDYDYIDKYN	IELDP	RFNDI	IGRHSRKRWERFVHSENQHL
N. tabacum CKA1	228	FYGH	NDQLVKIAKVLGTDEL	NAYIHKYQ	LELDP	QLEAMVGRHSRKPWSKFINADNQHL	
N. tabacum CKA2	228	FYGH	NDQLVKIAKVLGTDEL	NAYIHKYQ	LELDP	QLEAMVGRHSRKPWSKFINADNQHL	
A. thaliana CKA1	228	FYGH	NDQLVKIAKVLGTDEL	NAYINKYQ	LELDP	QLEALVGRHSRKPWSKFINADNQHL	
A. thaliana CKA2	228	FYGH	NDQLVKIAKVLGTDEL	NAYINKYQ	LELDP	QLEALVGRHSRKPWSKFINADNRHL	
Z. mays CKA1	228	FYGH	NDQLVKIAKVLGTD	GLNVYLNKYR	IELDP	QLEALVGRHSRKPWLKFMNADNQHL	
Z. mays CKA2	228	FYGH	NDQLVKIAKVLGTD	GLNAYINKYH	IELDP	QLEALVGRHSRKPWSKFMNADNQHL	
Z. mays CKA3	228	FYGH	NDQLVKIAKVLGTD	GLNVYLNKYR	IELDP	QLEALVGRHSRKPWTKFINADNQHL	
H. sapiens CKA2	234	FHGH	NDQLVRIAKVLGTE	ELYCYLKYH	IDLDP	HFNDIIGRHSRKRWFENFIHSENQHL	
X. laevis	233	FHGH	NDQLVRIAKVLGTE	LDYDYIDKYN	IELDP	RFNDIIGRHSRKRWERFVHSENQHL	
D. melanogaster	231	FHGH	NDQLVRIAKVLGTE	ELYAYIDKYN	IDLDP	RFNDIIGRHSRKRWERFVHSDNQHL	
D. discoideum	241	FHGH	NDQLVKIVKILGTE	EFYAYIDKYG	IVVDHT	ILSLIGKHPKPKPWSRFITKENQHL	
S. cerevisiae CKA1	272	FHGT	SNIDQLVKIVKVLGTS	DFEKYLLKYE	ITLPR	EFYDMD-QYIRKPPWHRFINDGNKHL	
S. cerevisiae CKA2	244	EKGS	SNPDQLVKIATVLGTE	KELLGKYLKYG	LHLPS	EYDNIRDFTKKSWTHFITSETKLA	
S. pombe	237	FRGR	NDQLVKIAKVLGTDEL	FAYVQKYO	IVLDR	QYDNIIQOYPKRDWYSFVNRDNRSL	
T. parva	321	FYGH	NDQLVKIAKVLGTE	DLHRYFEKYG	LKFAP	AYQELIGNHSKKPWTKFWHHENQHL	

XI

H. sapiens CKA1	293	VS	-PEALDFLDKLLRYDHQ	SRLTAREAMHPYFY	TVVKDQ	ARMGSSSMPGGSTPVSSANM
N. tabacum CKA1	288	VS	-PEALDFLDKLLRYDHQ	SRLTAKEAMAHYP	FLOVRA	AAETSRMRTQ-----
N. tabacum CKA2	288	VS	-PEALDFLDKLLRYDHQ	SRLTAREAMAHYP	FLOVRA	AAENSRMRTQ-----
A. thaliana CKA1	288	VS	-PEALDFLDKLLRYDHQ	SRLTAKEAMAHYP	FAQVRA	AAETSRMRSQ-----
A. thaliana CKA2	288	VS	-PEALDFLDKLLRYDHQ	SRLTAKEAMAHYP	FAQVRA	AAESSRMRTQ-----
Z. mays CKA1	288	VS	-PEALDFLDKLLRYDHQ	SRLTAREAMHPYF	QOVRA	AAENSRTRA-----
Z. mays CKA2	288	VS	-PEALDFLDKLLRYDHQ	SRLTAREAMAHYP	FLOVRA	AVENSRTRPQ-----
Z. mays CKA3	288	VS	-PEALDFLDKLLRYDHQ	SRLTAREAMHPYF	QOVRA	AAENSTTRA-----
H. sapiens CKA2	294	VS	-PEALDILDKLLRYDHQ	SRLTAKEAMHPYF	YPVKEQ	SQPCADNAVLS SGLTAAR--
X. laevis	293	VS	-PEALDFLDKLLRYDHQ	SRLTAREAMHPYF	YPVVKDQ	SRMAALICPVAAHPSVAPV-
D. melanogaster	291	VS	-PEALDFLDKLLRYDHQ	SRLTAREAMHPYF	LPVNGQ	MNPNNQQ-----
D. discoideum	301	AV	-PEALDFLEKLLRYDPA	ERLTAREAMHPYF	KPLSH	-----
S. cerevisiae CKA1	331	SGND	ETIDLDNLLRYDHQ	SRLTAKEAMGHP	WFAP	IREQIEK-----
S. cerevisiae CKA2	304	VP	--EVVDLDNLLRYDHQ	SRLTAKEAMDK	EFKTK	FE-----
S. pombe	297	AN	-DEALDILNRLRYDHQ	SRLTCQEA	MHPYF	QVLK-----
T. parva	381	VS	-PEVMDLDRMLVYDHT	KRIITPLEAM	HPPFNE	IKNNSV-----

H. sapiens CKA1	352	MSGISSVPTPSPLG	PLAGSPVIAAANPLGMPV	PAAAGAQQ
N. tabacum CKA1		-----	-----	-----
N. tabacum CKA2		-----	-----	-----
A. thaliana CKA1		-----	-----	-----
A. thaliana CKA2		-----	-----	-----
Z. mays CKA1		-----	-----	-----
Z. mays CKA2		-----	-----	-----
Z. mays CKA3		-----	-----	-----
H. sapiens CKA2		-----	-----	-----
X. laevis		-----	-----	-----
D. melanogaster		-----	-----	-----
D. discoideum		-----	-----	-----
S. cerevisiae CKA1		-----	-----	-----
S. cerevisiae CKA2		-----	-----	-----
S. pombe		-----	-----	-----
T. parva		-----	-----	-----

Fig 1 (pàgina anterior): Alineament a nivell de seqüència d'aminoàcids de les CK2 més representatives introduïdes als bancs de dades, juntament amb les dues de *N. tabacum* obtingudes en aquesta tesi. En números romans s'indiquen els subdominis del domini catalític. Els triangles vermells indiquen la posició dels tretze residus conservats respecte a les proteïna quinases de la família CMCG, mentre que els triangles blaus indiquen els dos residus característics de les CK2 α . Les seqüències s'han obtingut dels bancs de dades SWISSPROT, TrEMBLnew i GENPEPT i s'han comparat amb el programa CLUSTALW. S'han marcat amb fons negre els residus idèntics i amb gris els residus conservats.

Les CK2 α d'espècies vegetals, *N. tabacum*, *A. thaliana* i *Z. mays* mantenen la distribució en onze subdominis del domini catalític i la totalitat dels motius estructurals reportats a la bibliografia com a responsables de les propietats funcionals d'aquesta proteïna. De fet, les identitats a nivell d'aminoàcids entre les seqüències de les CK2 α de les plantes amb les de les altres espècies poden considerar-se molt altes i són superiors al 60%, excepte per a *S. cerevisiae* i *T. parva* que no arriben al 60%. El domini catalític és on s'observa l'homologia més alta entre les diferents seqüències. Les variacions no afecten a cap del residus considerats com a fonamentals per a la seva funció, posant-se de manifest una vegada més que la subunitat catalítica de la CK2 és una proteïna molt conservada a nivell evolutiu. Tot i això, són interessants de remarcar la baixa homologia que existeix a l'extrem N-terminal, anterior al domini catalític, i l'homologia pràcticament nul·la de l'extrem C-terminal de la proteïna. Aquest extrem C-terminal és més curt en les CK2 α vegetals que en la CKA1 humana i d'altres espècies, si bé aquesta peculiaritat també es troba a les proteïnes CKA2 dels vertebrats superiors, insectes i llevats. A continuació, es fa un repàs de les característiques estructurals dels onze subdominis de la CK2 α . La numeració a què es fa referència correspon a la seqüència de la forma CKA1 humana.

A. El **subdomini I** o *loop* de Glicines (GX₁GX₂X₃G), és un seqüència completament conservada, ⁴⁶**GRGKYSEV**⁵⁶, en les CK2. Està implicat en la unió del fosfat de l'ATP i en el reconeixement del substrat. Les CK2 han substituït la tercera Glicina del subdomini per una Serina. Les dues Glicines conservades i la Valina són comunes a la majoria de proteïna quinases, però la Tirosina és típica de la família de les CDKs,

coincidència que posaria de manifest la relació evolutiva que existeix entre el grup de les CDKs i la CK2 α .

- B. Als **subdominis II i VII** s'hi situen 2 residus característics de les CK2 i diferents dels corresponents residus de les altres proteïna quinases. En el subdomini II s'hi troben bé una Valina⁶⁶, en les proteïnes de les espècies animals, bé una Isoleucina⁶⁶, en les proteïnes dels llevats, plantes i *Dictyostelium*, en tots els cassos reemplaçant una Alanina, conservada en les altres proteïna quinases. Es desconeix el sentit evolutiu d'aquesta divergència. Per altra banda, en el subdomini VII, la Fenilalanina¹⁷⁶ està substituïda per un Triptòfan a les CK2. Es creu que aquestes dues substitucions podrien ser fonamentals per a explicar la propietat única de la CK2 de poder utilitzar el GTP com a donador de fosfat. Experiments de mutagènesi dirigida han demostrat que la substitució d'aquests dos residus pels residus típics resulten en un augment de la Km per a GTP.

També s'ha especulat que aquests dos residus generarien un entorn lleugerament més hidrofòbic que permetria la competició pel seti d'unió del nucleòtid, de compostos anàlegs al donador de fosfat, com l'inhibidor específic DRB i els seus derivats halogenats, com el 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole (Pinna, 1990). Per altra banda, els dos residus podrien ser necessaris per a l'estimulació de l'activitat CK2 com a conseqüència de la interacció amb la subunitat β (Jakobi, 1992). Per altra banda, es creu que les dues substitucions.

- C. La **regió bàsica** situada entre els subdominis II i III, de seqüència ⁷⁴**KKKKIKR**⁸⁰ en la majoria de les espècies, i que contràriament és àcida en la majoria de proteïna quinases, es postula que podria establir interaccions electrostàtiques amb regions àcides de les proteïnes o pèptids substrat i/o de la subunitat beta i/o d'inhibidors polianiónics, com l'heparina. Les CK2 α de tabac i de blat de moro conserven tots els residus de la seqüència bàsica, mentre que les proteïnes CKA2 d'*Arabidopsis* i de llevat presenten algunes substitucions no conservatives que podrien modificar lleugerament la càrrega electrostàtica de la regió.

Les interaccions electrostàtiques que s'estableixen entre aquesta regió bàsica i una regió àcida de la subunitat β (residus 55 a 70), serien responsables de la inhibició de l'activitat catalítica sobre el substrat calmodulina en absència d'efectors policatiònics

(Sarno, 1998; Krehan, 1999). Pel que fa a la interacció amb inhibidors de naturalesa polianiónica, com l'heparina, experiments de mutagènesi dirigida han demostrat que la substitució d'algunes de les Lisines de la regió per Glutàmics resulta en una disminució dràstica de l'afinitat de la proteïna per l'heparina (Hu, 1990; Gatica, 1994). Aquest resultat vindria recolzat per l'observació que la proteïna CKA2 de llevat presenta dues substitucions no conservatives en la regió i que la sensibilitat de la proteïna nativa a l'heparina és sensiblement inferior (Padmanabha, 1987).

També s'ha vist que a través d'aquesta regió bàsica hi ha interacció amb la proteïna *heat shock* 90 (Miyata, 1995) i amb la nucleolina (Li, 1996). Per últim, aquesta regió compleix els cànons d'un senyal de localització nuclear (NLS), de manera que podria ser la responsable de la localització de la CK2 al nucli.

- D. En el **subdomini VI**, la seqüència $^{156}\text{DX}_1\text{KX}_2\text{X}_3\text{N}^{161}$ forma part del *loop* catalític i es relaciona amb el reconeixement de regions acídiques del pèptid substrat (Pinna, 1990). El residu X_3 és un residu acídic en les Ser/Thr quinases, però en la CK2 és un residu d'Histidina. A més, aquest residu forma part d'un grup de quatre Histidines equidistants (posicions 146, 152, 158 i 164), separades entre elles per cinc residus i englobades entre residus bàsics (posicions 140 i 170). Entre els subdominis VI i VII, hi destaca el motiu $^{166}\text{HEXRKL}^{171}$, implicat a la unió a la proteïna serina/treonina fosfatasa PP2A (Hériché, 1997). Les proteïnes vegetals conserven perfectament aquestes dues seqüències.
- E. Una altra característica de la CK2 α és que pot ser fosforilada per la proteïna quinasa p34^{cdc2}. S'ha observat que la Treonina³⁴⁴ i la Treonina³⁶⁰, situades a l'extrem C-terminal de la CKA1 humana, són fosforilades per la p34^{cdc2} de forma específica a la fase M del cicle cel.lular (Litchfield, 1992). En cap altra espècie estudiada s'ha pogut determinar una fosforilació semblant per part d'aquesta quinasa. Curiosament, l'extrem C-terminal de la proteïna CKA1 humana i també la del conill i el pollastre, és excepcionalment més extens que en les altres espècies i, fins i tot que en la mateixa CKA2 humana. Això ha fet sospitar que la CKA1 pugui estar involucrada en alguna funció especialitzada exclusiva dels vertebrats més superiors (Pinna, 1990). Les proteïnes vegetals, amb un extrem C-terminal més curt, no presenten en la seva seqüència d'aminoàcids aquestes dianes de fosforilació, i no es disposa de dades sobre si la fosforilació per part de la proteïna quinasa p34^{cdc2} es dona en altres residus.

F. La subunitat CK2 α és susceptible d'autofosforilar-se, malgrat que el seti de fosforilació no ha estat identificat. La seqüència ¹²⁷**TLTDYD**¹³² obeeix doblement la seqüència consens d'(auto)fosforilació per CK2, S/TXXD/E. És conservada als vertebrats superiors i a les plantes, però presenta substancials modificacions en les seqüències dels llevats, essent-ne totalment absent en la CKA2 de *S. cerevisiae*. A l'extrem C-terminal, hi destaca el grup ³¹⁴**TAR/KE**³¹⁷ que també compliria el consens d'autofosforilació.

2. CARACTERÍSTIQUES MÉS IMPORTANTS DE LES CADENES POLIPEPTÍDIQUES CORRESPONENTS A LA SUBUNITAT CK2 β DE TABAC

La subunitat CK2 β exerceix importants funcions dins de l'estructura quaternària de la CK2. Per una part, proporciona estabilitat a la subunitat CK2 α , i per l'altra, modula l'activitat i especificitat de substrat. Malgrat la seva importància a nivell funcional, la CK2 β no presenta homologia amb cap altra proteïna coneguda, amb l'excepció del producte del gen *stellate* de *Drosophila*, amb qui exhibeix una identitat del 35%.

La comparació a nivell de seqüència d'aminoàcids de les CK2 β de diferents espècies i del producte del gen *stellate* de *Drosophila* (Fig 2), permet diferenciar una sèrie d'elements estructurals comuns que són responsables de les propietats bioquímiques i funcionals d'aquesta subunitat. No obstant, existeixen diferències remarcables entre les CK2 β d'animals i llevats, respecte les de les plantes, que estimulen a la discussió. En primer lloc, copsa l'existència d'un extrem N-terminal molt extens a les seqüències de les plantes, d'entre 79 i 90 aminoàcids més llarg, i d'un extrem C-terminal 20 aminoàcids més curt, en comparació a proteïna humana. En conjunt, les identitats de les CK2 β de plantes són altes quan es comparen entre elles i estarien compreses entre el 65.9 i el 86.7%, però baixen substancialment quan es comparen amb les d'animals i llevats, a causa de l'extensió de l'extrem N-terminal. La proteïna CK2 β de *N. tabacum* mostra un 72.6-75.9% d'identitat amb les corresponents CK2 β d' *A. thaliana*, essent la CKB4 amb qui mostra la identitat més alta. Tanmateix, algunes de les regions característiques de les CK2 β descrites a la bibliografia mostren variacions no conservatives o són absents a les plantes.

(a)

N. tabacum	1	MYRDRGGG	---	GGGG	-----	GPLDRKRINDALDKHLEKLSPS	---	TSRSL	---	KDKAVP
A. thaliana CKB1	1	MYRDRGTV	---	NSRP	-----	EVVDRKRINDALE	---	RPSPS	---	TSRQVNGKCKGTV
A. thaliana CKB2	1	MYRERGMV	---	GSKS	-----	EVVDRKRINEIHDN	---	RPSHS	---	MSQPVNGKCK
A. thaliana CKB3	1	MYKERSGG	---	GGGGSSRSEILGGA	---	DRKRINDALNKKLEKSSSTTT	---	TSRVFSSKDK	---	VT
A. thaliana CKB4	1	MYKDRSGGGIMGGGGSSRSEILGGA	---	DRKRINDALDKHLKSSPS	---	---	---	TSRVFTSKDKD	---	---
Z. mays CKB1	1	MHRDRG	-V-	SAAA	-----	IPGDRKRIGEPMD	---	RSSPS	---	TSWGFSG
Z. mays CKB2	1	M	---	---	-----	DRKRINDALEKHLERSSPS	---	---	---	TSRGVVSKE
Z. mays CKB3	1	MYKQGGAG	---	GGAG	-----	LDRKRINDALDKHLEKAVASPS	---	TSRGSAGG	---	GR

N. tabacum	46	---	S-	TSASAGGGGGK	-----	SHFDHRNTSKNKC	---	SD	---	EESETDSEESDVS
A. thaliana CKB1	44	TAATT	TANLIG	---	KQSNINHRDSRSASLSKNNTVSD	---	DES	---	DES	TDSEESDVS
A. thaliana CKB2	42	---	S-	TSVLMG	---	KQLHDK	---	ESSRSGSISKTNI	---	SDAVDISD
A. thaliana CKB3	57	DPFS	SFTST	---	K	---	TQL	---	P	---
A. thaliana CKB4	57	SVPS	-TSTA	---	K	---	---	---	---	---
Z. mays CKB1	40	---	-	KERIGVG	---	KQPEMPRSGGGSTAMSKSK	---	LSD	---	A-
Z. mays CKB2	30	---	-	RERLAAG	---	KLP	---	SSLGKAE	---	VSD
Z. mays CKB3	45	---	-	DHRLVPS	---	SV	---	SSIPKG	---	RCSE

(b)

N. tabacum	41	DKAVPST	SASAGGGGGKSHFDHRNTSKNKCSD	---	EESETDSEESDVS	SGSDGDDT	---	SWI
A. thaliana CKB1	49	TANLIG	KQSNINHRDSRSASLSKNNTVSD	---	DES	TDSEESDVS	SGSDGDDT	---
A. thaliana CKB2	45	TSVLMG	KQLHDK	---	ESSRSGSISKTNI	ISDAVDISD	TDSEESDVS	SGSDGDDT
A. thaliana CKB3	51	SKDKDP	SFTST	---	KTQL	---	PD	---
A. thaliana CKB4	52	SKDKD	SVPSTSTA	---	KSQLHSR	---	SPD	---
Z. mays CKB1	44	GVGK	QPEMPRSGG	---	GSTAMSKSK	---	LSDA	---
Z. mays CKB2	27	S	---	KERERLAAGK	---	LPSSLGKAE	---	VSDG
Z. mays CKB3	41	GGGRD	HHRLVPS	---	SVSSIPKGR	---	CSEG	---
H. sapiens	1	---	---	---	---	---	---	MSSSEEV
R. norvegicus	1	---	---	---	---	---	---	MSSSEEV
C. carpio	1	---	---	---	---	---	---	MSSSEEV
X. laevis	1	---	---	---	---	---	---	MSSSEEV
D. melan. CKB1	1	---	---	---	---	---	---	MSSSEEV
D. melan. CKB2	1	---	---	---	---	---	---	MTDSDS
S. cerev. CKB1	1	---	---	---	---	---	---	MSQEFVEDYSRTGSSDDEDS
S. cerev. CKB2	1	---	---	---	---	---	---	MGRSENVGTVTREGSRVEQDDVLMDDSDSSEYVD
S. pombe	1	---	---	---	---	---	---	MQLYSSESESDDSQ
C. albicans	1	---	---	---	---	---	---	MPSDPEED
D. mel. stellat	1	---	---	---	---	---	---	MSSSQNNNS

N. tabacum	96	SWFCNLRGNEFFCEVDDDYIQDDFNLCGLSSQVPYYDYALDLILD	---	VESS	---	HEEQN
A. thaliana CKB1	103	SWFCNLRGNEFFCEVDDDYIQDDFNLCGLSSQVPYYDYALDLILD	---	VESS	---	QGFTEEQN
A. thaliana CKB2	98	SWFCNLRGNEFFCEVDDDYIQDDFNLCGLSHQVPYYDYALDLILD	---	VESS	---	HGEMFTEEQN
A. thaliana CKB3	92	SWFCNLRGNDFFCEVDEDDYIQDDFNLCGLSGQVPYYDYALDLILD	---	VDASN	---	SEMFTDQHQ
A. thaliana CKB4	98	SWFCNLRGNEFFCEVDEDDYIQDDFNLCGLSGQVPYYDYALDLILD	---	VESS	---	NGDMFTEEQHQ
Z. mays CKB1	92	SWFCNLRGNEFFCEVDDDYIQDDFNLCGLSNQVPYYDYALDLILD	---	VESS	---	HGDMLTEEQN
Z. mays CKB2	74	SWFCNLRGNEFFCEIDDDYIQDDFNLCGLSNQVPYYDYALDLILD	---	IESS	---	NDDGFTEEQN
Z. mays CKB3	89	SWFCNLRGNEFFCEVDDDYIQDDFNLCGLSSQVPYYDYALDLILD	---	IESS	---	HGDMFTEEQN
H. sapiens	11	SWFCNLRGNEFFCEVDEDDYIQDDFNLCGLNEQVPYYDYALDMILD	---	LEP	---	DEELEDNPNQS
R. norvegicus	11	SWFCNLRGNEFFCEVDEDDYIQDDFNLCGLNEQVPYYDYALDMILD	---	LEP	---	DEELEDNPNQS

C. carpio 11 SWFCGLRGNEFFCEVDEEDYIQDKFNLTGLNEQVPHYRQALDMILD-LEPDEELEDNPNQS
X. laevis 11 SWFCGLRGNEFFCEVDEEDYIQDKFNLTGLNEQVPHYRQALDMILD-LEPDEELEDNPNQS
D. melan. CKB1 11 TWFCGLRGNEFFCEVDEEDYIQDKFNLTGLNEQVPHYRQALDMILD-LEPEDELEDNPNQS
D. melan. CKB2 11 HWFCQQRGNEFFCEVDEEYIQDKFNLTGLNDSNVKNYKCALEVILD-LNPGSASED-PAEP
S. cerev. CKB1 28 PSFCSRFGHEYFCQVPTFEFIEDDFNMTSLSQEVPHYRKALDLILDLEAMSDEEDEDV
S. cerev. CKB2 40 DLFLGRKGHEYFCDVDEPEYITDRFNLMNLOKTVSKFSYVVQYIVDDLDDSIENMTHARL
S. pombe 18 DWFLGLKGNEFFCEVDEDFIQDRFNLTGLSHEVPHYSQSLDLILD-VLDPD---LPEEVQ
C. albicans 14 QQLCELFGHDYFVQVSQDFIEDDFNLTGLSSQVPPYREALYTIIDYQVETAEDHNTDNTT
D. mel. stellat 13 DWFLGIKGNQFLCRVPTDYVQDTFNQMG-----EYFSEILDVILK-P-----VIDSSS

N. tabacum 150 E-----LVESAAEMLYGLIHVRYILTITKGMAMLEK
A. thaliana CKB1 162 E-----LIESAAEMLYGLIHARYILTSKGLAAMLDK
A. thaliana CKB2 157 E-----LIESAAEMLYGMIHARFILTSKGLASMLDK
A. thaliana CKB3 151 E-----MVESAAEMLYGLIHVRYILTITKGMAMTEK
A. thaliana CKB4 157 E-----MVESAAEMLYGLIHVRYILTITKGMAMMEK
Z. mays CKB1 151 E-----LIESAAEMLYGLIHVRYIITSKGLSAMLDK
Z. mays CKB2 133 E-----LIESAAEMLYGLIHARYILTSKGLAAMLEK
Z. mays CKB3 148 E-----LVESAAEMLYGLIHARYILTSKGLAAMLEK
H. sapiens 70 D-----LIEQAAEMLYGLIHARYILTNRGIAQMLEK
R. norvegicus 70 D-----LIEQAAEMLYGLIHARYILTNRGIAQMLEK
C. carpio 70 D-----LIEQAAEMLYGLIHARYILTNRGIAQMLEK
X. laevis 70 D-----LIEQAAEMLYGLIHARYILTNRGIAQMLEK
D. melan. CKB1 70 D-----MTEQAAEMLYGLIHARYILTNRGIAQMLEK
D. melan. CKB2 69 E-----LIEASAEKLYGLIHARFILTNRGIELMLDK
S. cerev. CKB1 88 EEDEVDQEMQSNQDGHDEGKRRNKSPVVNKSIIIEHAAEQLYGLIHARFILTKPGLOAMAEK
S. cerev. CKB2 100 E-----QLESDSRKLYGLIHARYIITIKGLQKMYAK
S. pombe 74 D-----EVEASARHLYGLIHARYILTAQGLYKMLEK
C. albicans 74 TN-----TSNNNDSRNGTSKRNASLPNKALLAHSAAELLYGLIHARYIVSKQGLTAMASK
D. mel. stellat 61 G-----LLYGDEKKWYGMIHARYIRSERGLIAMHRK

N. tabacum 181 YKN-YDFGRCPRVYCSGQPCLPVGQSDIPRSSSTVKIYCPKCEDIYYPRSKYQGNIDGAYF
A. thaliana CKB1 193 YKN-YDFGRCPRVYCCGQPCLPVGQSDIPRSSSTVKIYCPKCEDIYYPRSKYQGNIDGAYF
A. thaliana CKB2 188 YKN-YDFGRCPRVYCCGQPCLPVGQSDIPRSTVKIYCPKCEDVYYPRSKYQGNIDGAYF
A. thaliana CKB3 182 YKN-CDFGRCPRVFCGQSCPLPVGQSDIPRSSSTVKIYCPKCEDISYPRSKYQGNIDGAYF
A. thaliana CKB4 188 YKN-YDFGRCPRVFCGQSCPLPVGQSDIPRSSSTVKIYCPKCEDIYYPRSKYQGNIDGAYF
Z. mays CKB1 182 YRN-VEFGRCPRVNCSSGQPCLPVGQSDVPRSSSTVKIYCPKCEDIYTPRSKYLSNIDGTYF
Z. mays CKB2 164 FKNYYDFGRCPRVYCCGQPCLPAGQSDVPRSSSTVKIYCPKCEELNYPRSKYQGNIDGSYF
Z. mays CKB3 179 YRN-YDFGRCPRVYCCGQPCLPVGXSDIHRSSSTVKIYCPKCEDIYYPRSKYQGNIDGAYF
H. sapiens 101 YQQ-GDFGYCPRVYCENQPMPLPIGLSDIPGEAMVKLYCPKCMDVYTPKSSRHHHTDGAYF
R. norvegicus 101 YQQ-GDFGYCPRVYCENQPMPLPIGLSDIPGEAMVKLYCPKCMDVYTPKSSRHHHTDGAYF
C. carpio 101 YQQ-GDFGYCPRVYCENQPMPLPIGLSDIPGEAMVKLYCPKCMDVYTPKSSRHHHTDGAYF
X. laevis 101 YQQ-GDFGYCPRVYCENQPMPLPIGLSDIPGEAMVKLYCPKCMDVYTPKSSRHHHTDGAYF
D. melan. CKB1 101 YQT-GDFGHCPRVYCESQPMLPLGLSDIPGEAMVKTYCPKCIDVYTPKSSRHHHTDGAYF
D. melan. CKB2 99 YNK-GEFGTCPRAFCHSQPVLPIGLSDNPGEDMVRIYCPKCNVYTPKASRHSNLDGAF
S. cerev. CKB1 148 FDH-KEFGTCPRYYCNGMQLLPVGLSDIVGKHTVRLYCPSCODLYLPQSSRFLCLEGAFW
S. cerev. CKB2 131 YKE-ADFGRCPRVYCNLQQLLPVGLHDIPGIDCVKLYCPSCEDLYIPKSSRHSIDGAYF
S. pombe 105 YKK-CDFGHCPRVLCNGQPMLPVGLSDIAHAKSVKLYCPKCEDVYTPKSORHASIDGAYF
C. albicans 129 FER-NDFGSCPRYFCDGMHLIPVGS TDVPGQETVRLFCPCNDIYIPSSRYLNIDGAF
D. mel. stellat 92 YLR-GDFGSCPNISCDRQNTLPVGLSAVWGKSTVKIHCPRCKSNEHPKSD--TQLDGAMF

N. tabacum 240 GTTFPHLFLMTYGHLLKPKQ-----KPTQNYTIPRVFGFKIHKT-----
A. thaliana CKB1 252 GTTFPHLFLMTYGHLLKPA-----KATQNYVQRVFGFKLHKP-----
A. thaliana CKB2 247 GTTFPHLFLMTYGHLLKPKQ-----KASQSYTORVFGFKLHKP-----
A. thaliana CKB3 241 GTTFPHLFLMTYGNLLKPKQ-----KPTQSYVVKIFGFKVHKP-----

A. thaliana CKB4	247	GTTFPHLFLMAYGNMKPQ-----KPAQNYVPKIFGFKVHNKQ-----
Z. mays CKB1	241	GTTFPHLFLMTYPHLKPQ-----KPLQQYVPRVFGFKIRKP-----
Z. mays CKB2	224	GTTFPHLFLMTYPHLKPQ-----KPSQQYTPRVFGFKLHKPS-----
Z. mays CKB3	238	GTTFPHLFLMTYEHLPKQ-----KLSQRYVPRVFGFKLHKP-----
H. sapiens	160	GTGFPHMLFMVHPEYRPK-----RPAHQFVPRLYGFKIHPMAYQLQLQAASNFKS-PV
R. norvegicus	160	GTGFPHMLFMVHPEYRPK-----RPAHQFVPRLYGFKIHPMAYQLQLQAASNFKS-PV
C. carpio	160	GTGFPHMLFMVHPEYRPK-----RPAHQFVPRLYGFKIHPMAYQLQLQAASSFKS-PV
X. laevis	160	GTGFPHMLFMVHPEYRPK-----RPAHQFVPRLYGFKIHPMAYQLQLQAASNFKS-PV
D. melan. CKB1	160	GTGFPHMLFMVHPEYRPK-----RPTNQFVPRLYGFKIHSLAYQIQQLQAAANFKM-PL
D. melan. CKB2	158	GTGFPHMFFMEKPDARPK-----RAKQKFVPRLYGFKIHPMAYRTAAEIQKDVMTMPV
S. cerev. CKB1	207	GTSFPGVFLKHFKELEEY---VERKSKESEYELKVFGRINDEAVSGPRMKWLRQYPSTE
S. cerev. CKB2	190	GTSFPGMFLQAFDMVPK-----HPTKRYVPKIFGFELHKQAQLTRWQELQRLKLVK
S. pombe	164	GTSFPHMLFQVPELAVP-----KSOERYIPRIFGFKVHSYSATFKKQDVYKEKQKKR
C. albicans	188	GTTFPGLLVKMFPEIENQCRIRITKFSQNDGLKIFGFKINELSATGPRMKWLRMHPETE
D. mel. stellat	149	GPSFPDIFFSLLPNLTSP-----LDD-----PRT-----
N. tabacum		-----
A. thaliana CKB1		-----
A. thaliana CKB2		-----
A. thaliana CKB3		-----
A. thaliana CKB4		-----
Z. mays CKB1		-----
Z. mays CKB2		-----
Z. mays CKB3		-----
H. sapiens	212	KTIR-----
R. norvegicus	212	KTIR-----
C. carpio	212	KAIR-----
X. laevis	212	KTMR-----
D. melan. CKB1	212	RAKN-----
D. melan. CKB2	211	GEIDSPSHI-----
S. cerev. CKB1	263	EDWEEFAKC-----EFETPAV-----
S. cerev. CKB2	243	LESKDVDLTKSGGFKT-----
S. pombe	217	LQGAEAESKNKLAIT-----
C. albicans	248	GEKQELTHVNIMFQLATYMKTKRMEEDDEEEDEVEEEDDDRTMASE
D. mel. stellat		-----

Fig 2: Alineament de la seqüència d'aminoàcids de les CK2b de diferents espècies.

D'un total de 26 seqüències diferents disponibles als bancs de dades, s'han escollit les seqüències d'aquelles espècies que s'han considerat més representatives a nivell taxonòmic i totes les conegudes de plantes. (a) Alineament de l'extrem N-terminal de les CK2b de les plantes. (b) Alineament de les seqüències completes, a excepció del fragment comparat a la part (a). La fletxa al primer bloc de l'alineament (b) indica la continuació de l'alineament de les seqüències de plantes, després del de l'extensió de l'extrem N-terminal. Les seqüències s'han obtingut dels bancs de dades SWISSPROT, TrEMBLnew i GENPEPT i s'han comparat fent ús del programa CLUSTALW. S'han marcat amb fons negre els residus idèntics i amb gris els residus conservats.

L'anàlisi global de l'estructura primària de la proteïna porta a la idea de què la CK2 β pugui haver-se format com una proteïna modular construïda amb dominis funcionals interdependents, separats per regions de connexió. A continuació, es presenta una sinopsi de les característiques estructurals més rellevants de les CK2 β de plantes, i en particular, de la proteïna de *N. tabacum*, en relació a la forma humana (Fig 3). En la cadena polipeptídica es poden distingir nou regions:

1. **Regió A'**. Comprèn l'extensió de l'extrem N-terminal, que a la proteïna de *N. tabacum* consta de 85 aminoàcids addicionals. Aquesta regió no presenta homologia amb cap altra proteïna introduïda als bancs de dades i és exclusiva de les subunitats β de les CK2 de plantes. A la Fig 2 (a), es pot remarcar que en aquesta extensió es distingeixen tres regions molt conservades, que es descriuen seguidament.

- A la CK2 β de tabac, a les proteïnes CKB3 i CKB4 d' *Arabidopsis*, i a la CKB3 de *Z. mays*, destaca una regió rica en residus de Glicina, situada a les primeres posicions de l'extrem N-terminal. Aquest motiu conté 8 Glicines a la proteïna de tabac, 6 a la CKB3 i 7 a la CKB4 d'*Arabidopsis*, i 5 a la CKB3 de *Z. mays*. La Glicina és l'aminoàcid que presenta una estructura més senzilla pel fet que la seva cadena lateral és un àtom d'hidrogen. El petit volum que ocupa li confereix una flexibilitat única en l'estructura de les proteïnes perquè li permet acoplar-se a cavitats on altres residus no es podrien acomodar. No es pot assegurar el significat que pot tenir aquest grup de glicines, però es coneix que una de les modificacions que poden experimentar les proteïnes per afavorir el seu anclatge a membranes, és la miristoïlació, o unió covalent de miristat, un àcid greixós C14, a residus de Glicina situats en els 9 primers residus de l'extrem N-terminal. En aquests moments i a falta de més dades, aquesta hipòtesi no és descartable.

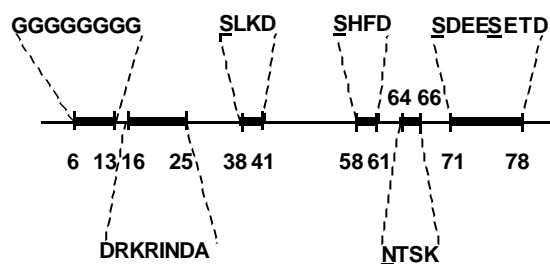
- El motiu ¹⁶DRKRIND/EAIL/HD/E/N²⁵ (els residus subratllats són els més freqüents a la posició), també seria propi de les CK2 β de plantes i, fins el moment, no hi ha cap dada que permeti especular sobre la seva importància estructural. No obstant, destaca la presència en aquest motiu de 3 residus bàsics, RKR, situats a prop de residus àcids.

- L'extrem C-terminal d'aquesta extensió (posicions 71 a 85 de la CK2 β de tabac) és ric en residus de Serina i en residus àcids. Existeixen a dins d'aquest motiu diverses seqüències consens d'(auto)fosforilació (S/T-X-X-D/E) per CK2, que es descriuran en detall més endavant.

A més d'aquests tres regions descrites, alguns residus puntuals també es mantenen perfectament conservats en l'extensió N-terminal de la majoria de les vuit seqüències de plantes analitzades, i són: la Tirosina², la Lisina³ o Arginina³, l'Aspàrtic⁴ o Glutàmic⁴, i l'Arginina⁵. Els residus de les posicions 3 a 5, descriuen una alternança de residu bàsic-àcid-bàsic. Més endavant, hi destacarien la Lisina³⁰ o Arginina³⁰, les Serina^{32,34,36}, la Treonina³⁵, les Lisines^{40,42,57}, les Serines^{66, 70} i la Lisina⁶⁹. Els residus amb càrrega elèctrica són els més conservats i segurament col.laboraren a mantenir la càrrega electrostàtica de l'extrem N-terminal. Les diverses Serines i Treonines conservades no formen part de seqüències consens d'(auto)fosforilació. No obstant, la CK2 β de tabac, però no les d'*Arabidopsis* ni les de *Z. mays*, presenta dos setis que compleixen el consens mínim d'autofosforilació, concretament a les posicions 38 a 41 i 58 a 61.

Per últim, la CK2 β de tabac conté el grup ⁶⁴NTS⁶⁶, que compleix la seqüència consens de glicosilació NXS/T, on l'Asparagina és comunment el residu glicosilat, si bé menys freqüentment també ho poden estar els residus de Serina i Treonina. Malgrat la presència del triplet consens, no es pot afirmar que la glicosilació sigui real perquè aquesta depèn del plegament de la proteïna. No obstant, els aminoàcids que componen aquest grup són polars i es troben flanquejats per residus amb càrrega elèctrica, Arginina⁶³ i Lisina⁶⁷, per la qual cosa és factible que aquest fragment de la cadena polipeptídica es trobi accessible al medi.

(a)



(b)

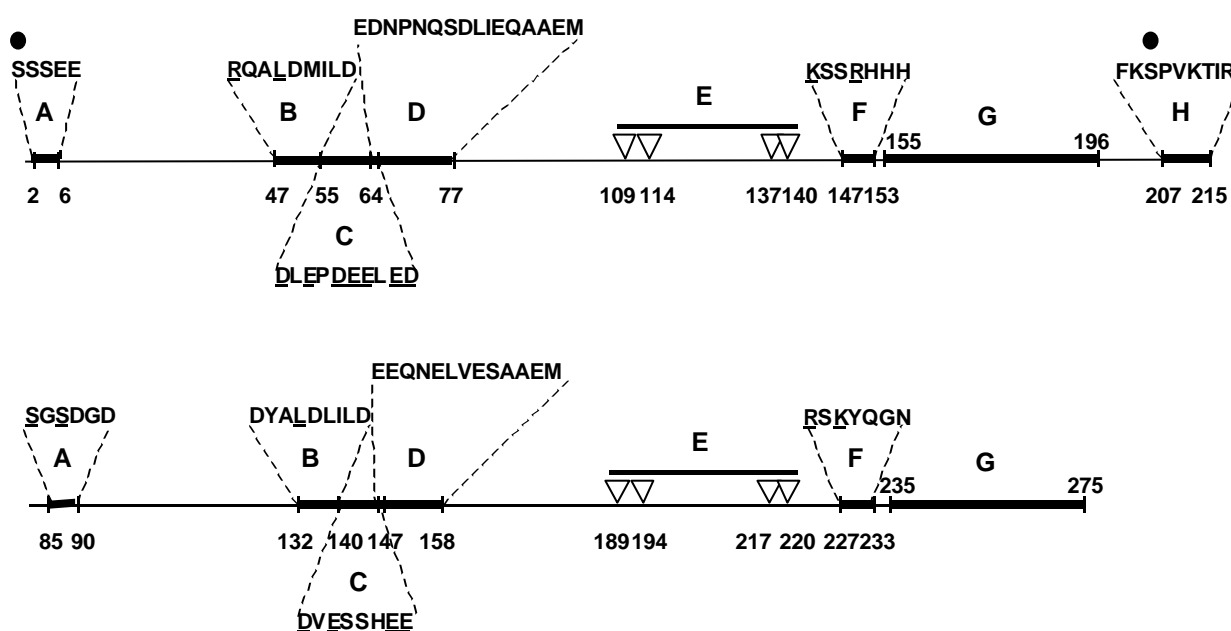


Fig 3 Sinopsi de les característiques estructurals més rellevants de la CK2b. (a)

Esquema de l'extrem N-terminal de la CK2b de tabac, que correspon a la descripció del punt A'. (b) Esquema de la CK2b humana (superior) i comparació amb l'esquema de la forma de tabac (inferior). Cadascuna d'elles manté la numeració pròpia de la seva seqüència. S'han assenyalat 7 dominis, que corresponen als punts d' A a H, del text: domini A, autofosforilació; domini B, motiu homòleg a la destruction box; domini C, regió acídica; domini D, similar a un domini d'unió a calci; domini E, dit d'unió a Zinc; domini F, senyal de localització nuclear; domini G, dimerització **b-b** i interacció **a-b**; domini H, conté la Serina fosforilada per la quinasa p34^{cdc2}. (Adaptat de Blanquet, 2000).

2. **Regió A.** En les proteïnes d'organismes vertebrats i en CKB1 de *Drosophila*, s'observa un motiu curt en posició adjacent a la Metionina¹ que inclou 3 residus de Serina i compleix la seqüència consens d'(auto)fosforilació per CK2. De fet, s'ha demostrat que únicament la primera Serina es troba realment fosforilada, tant *in vitro* com *in vivo* (Meggio, 1989; Meggio, 1993). No es coneix encara amb certesa el significat fisiològic de l'autofosforilació, malgrat les diverses estratègies utilitzades per diferents autors, amb l'objectiu d'anular-la. Per exemple, s'han mutat les Serines^{2,3} per Glicines^{2,3} i també s'han eliminat els 4 primers aminoàcids del motiu, però no s'ha pogut demostrar que l'absència d'autofosforilació afecti ni a la construcció de l'heterotetràmer ni a la capacitat d'activació de la subunitat CK2 α (Meggio, 1993).

Pel que fa a les seqüències de les plantes, el corresponent seti d'autofosforilació es localitzaria en una posició interna (residus 85 a 90 en la proteïna de tabac), degut a l'extrem N-terminal més llarg. Si bé el motiu no és idèntic al dels seus homòlegs d'animals i llevats, sí que compliria la seqüència consens. A més, existeixen altres motius que només són presents a les proteïnes de les plantes, tals com el ⁷⁵SD/ETD⁷⁸ i el ⁸⁷SD/EGD/E⁹⁰, aquest últim encaixant perfectament amb la seqüència consens de autofosforilació de les CK2 β dels vertebrats. Més endavant, a les posicions 143, 144 i 154, s'hi trobarien altres grups de residus exclusius de les seqüències de les plantes, que també complirien el consens. No obstant, i malgrat l'abundància de possibles setis d'autofosforilació, la bibliografia no reporta evidències de la seva existència en les CK2 de plantes, ni tampoc nosaltres vam poder obtenir la fosforilació de la CK2 β d'*Arabidopsis*, tal i com s'ha discutit al capítol I d'aquesta tesi.

3. **Regió B.** Aquest domini posseeix una gran similitud amb la *destruction box* (caixa de destrucció), característica de les ciclines i amb seqüència consens RXXLXX(L/I)XN (Glotzer, 1991). La CK2 β de tabac presenta la seqüència ¹³²DYALDLILD¹⁴⁰ i la de la forma humana és ⁴⁷RQALDMILD⁵⁵, on la Lisina⁵⁰ és considerat el residu més important per la funcionalitat de la caixa. Es creu que la subunitat β és una proteïna funcionalment similar a les ciclines pel fet que, com elles, regula l'activitat de la subunitat catalítica. La *destruction box* és el senyal de reconeixement per a la ubiquïtinació de les ciclines i la seva posterior proteòlisi al proteasoma. Aquestes semblances entre les dues proteïnes, unit al fet que la CK2 β s'ha detectat unida al proteasoma, han fet pensar en la possibilitat que la subunitat β fos degradada per un sistema equivalent al de les ciclines en diferents moments de la divisió cel·lular i que aquest fos el mecanisme de control de la regulació (Allende, 1995).

Tanmateix s'ha discutit la possibilitat de què la seva unió a la subunitat α servís per a protegir-la contra la degradació proteolítica via ubiquïtinació (Issinger, 1993).

4. **Regió C.** Aquesta regió, que comprèn els aminoàcids 55 a 64 de la CK2 β humana i és rica en residus àcids, ha estat descrita com a responsable de la modulació de l'activitat enzimàtica de la CK2 per les poliamines. En concret, els 10 residus compresos entre les posicions 55 i 64 contenen 7 residus d'Aspàrtic o de Glutàmic, dels quals els més importants serien els Glutàmics de les posicions 60, 61 i 63. Aquests residus poden unir directament una molècula d'espermina, provocant un canvi conformacional a l'holoenzim que deriva en una estimulació de l'activitat enzimàtica (Leroy, 1997). Altres autors han postulat que aquesta regió àcida, i particularment els residus Aspàrtic⁵⁵ i Glutàmic⁵⁷ tindrien també una funció d'inhibició de l'activitat catalítica, la qual podria ser contrarestada mitjançant la unió d'efectors catiònics com la polilisina (Boldyreff, 1993; Meggio, 1994; Leroy, 1999). Aquests efectes podrien ocórrer a causa d'interaccions electrostàtiques entre aquesta regió àcida i la corresponent regió bàsica situada en el centre actiu de la subunitat CK2 α , interaccions que, a més, col·laborarien en afavorir l'estabilitat de l'holoenzim (Krehan, 1996; Sarno, 1998). D'altra banda, s'ha demostrat també que aquesta regió intervé en la unió del tetràmer a la membrana plasmàtica (Sarrouilhe, 1998).

Malgrat que la regió àcida és absolutament conservada en animals i llevats, en tabac, *Arabidopsis* i *Z. mays* només es conserven un residu d'Aspàrtic i un de Glutàmic en la posició que esperaríem com a "correcte", la 140 i la 142, respectivament, mentre que la resta són residus aliens al consens. A més, la CK2 β de tabac, però no les d'*Arabidopsis* ni les de *Z. mays* presenta una delecció de 5 aminoàcids, que correspondrien a les posicions 60 a 64 de la proteïna humana, que curiosament són els que poden unir una molècula d'espermina. No obstant, més a la dreta s'hi troben tres residus de Glutàmic^{146,147,150}, que podrien hipotèticament substituir la regió anteriorment citada.

5. **Regió D.** La regió compresa entre els residus 62 i 77 de la CK2 β humana presenta característiques que recorden el domini d'unió a calci de la tubulina (Serrano, 1986). Les CK2 β de les plantes conserven només parcialment els residus que formen aquest motiu.

6. **Regió E.** Hi destaquen quatre residus de Cisteïna, la distribució de les quals respon als requeriments d'un motiu d'unió a metall, CPX₃CX₂₂CPXC, reminiscent d'un *zinc finger* (dit de zinc), característica comuna a moltes proteïnes que uneixen DNA (Vallée, 1990). A

les seqüències analitzades, comprèn els residus en posició 109, 114, 137 i 140 de la CK2 β humana, i 189, 194, 217 i 220 de la CK2 β de tabac. Es conserven perfectament en totes les proteïnes comparades, incloses les vuit de plantes i el gen *stellate* de *Drosophila*. En tots els casos, la primera i tercera Cisteïnes del motiu mostren en la posició dreta adjacent, un residu de Prolina, el qual pot introduir canvis bruscos en la direcció de la cadena.

7. **Regió F.** La CK2 β d'animals i llevats presenta dos possibles senyals de localització nuclear (NLS), situats a la part C-terminal. Els requeriments consens d'una seqüència d'aminoàcids per esdevenir una NLS són que formin part d'un motiu curt i ric en residus carregats positivament, Lisines, Arginines i Histidines, i que estructuralment estigui orientat cap a l'exterior de la proteïna (Boulikas, 1996; Issinger, 1993). A la proteïna humana es distingeixen dos possibles NLS, situats en les posicions 147 a 153 i 175 a 179, respectivament. Les CK2 β de plantes, no obstant, no presenten consens per a NLS tan clares. Únicament els residus de les posicions 271 a 274 de l'extrem C-terminal podrien recordar una NLS, però en qualsevol cas seria molt curta i no es coneix si seria suficient com per actuar de senyal de localització nuclear.

8. **Regió G.** El segment de l'extrem C-terminal que comprèn els residus 155 a 196 (per alguns autors engloba fins el residu 215) de la CK2 β humana és responsable de la dimerització β - β , de l'associació amb la CK2 α , de la protecció contra la desnaturalització i la proteòlisi i de la regulació positiva de l'activitat enzimàtica (Boldyreff, 1993, 1996; Krehan, 1996; Marin, 1997). En particular, la regió entre els residus 155 i 167 està implicada en la dimerització β - β i el motiu 172 a 196 és fonamental per a l'estabilitat de l'holoenzim i, a més, a través d'ell interacciona amb la proteïna A-raf, un dels substrats de la CK2 (Boldyreff, 1997). L'extrem C-terminal de les CK2 β de plantes conté la totalitat de la regió G amb una homologia molt alta respecte les altres espècies analitzades.

9. **Regió H.** L'extrem C-terminal de la CK2 β humana conté la Serina²⁰⁹ que pot ser fosforilada tan *in vitro* com *in vivo* per la p34^{cdc2} (Litchfield, 1992). No es coneix exactament quina conseqüència fisiològica pot tenir la fosforilació d'aquesta Serina, si bé es coneix que no és essencial per a la reconstitució de l'holoenzim actiu (Meggio, 1993). Arran de l'escurçament de les CK2 β de plantes, aquest residu no hi és present.

DISCUSSIÓ GENERAL

1. La proteïna quinasa CK2 en plantes d' *Arabidopsis thaliana*: identificació de dues formes moleculars d'aquesta proteïna.

En aquest treball es pretenia estudiar i descriure les característiques bioquímiques de la proteïna quinasa CK2 de plantes d' *Arabidopsis thaliana*. Fins aquell moment els estudis sobre la CK2 de plantes s'havien focalitzat principalment en la producció de les corresponents proteïnes recombinants, a partir de l'expressió dels gens de les subunitats α i β , i la reconstitució *in vitro* de l'holoenzim actiu (Klimczak, 1995; Boldyreff, 1993b). Aquesta aproximació, si bé aportava valuosa informació, en alguns cassos discrepava de les característiques observades en la proteïna purificada de la planta. Tanmateix, en aquest tipus d'estudis tampoc es reflectia l'efecte que podia tenir sobre l'organització estructural de l'enzim l'heterogeneïtat gènica per a ambdues subunitats, descrita fins aquell moment únicament a *Arabidopsis*.

Existien, alhora, pocs treballs que descriguessin les propietats de la CK2 aïllada de sistemes vegetals. En contrast amb les CK2 animals, s'havien aïllat del blat, el blat de moro i el bròquil, formes enzimàtiques d'estructura monomèrica, compostes únicament de subunitat catalítica que, en el cas del blat de moro i el bròquil, coexistien amb formes d'alt pes molecular, presumiblement tetramètriques. No obstant, en cap cas s'havia pogut identificar la naturalesa dels polipèptids associats a la subunitat catalítica (Yan, 1982; Dobrowolska, 1992; Klimczak, 1994).

En el treball que es discuteix a continuació es va aconseguir, a través de la cromatografia líquida com a tècnica separativa, i d'assatjos d'activitat enzimàtica i *Western blot* com a tècniques analítiques, aïllar i caracteritzar a nivell bioquímic i molecular la CK2 d'*Arabidopsis*. Es va demostrar que, en aquesta espècie, coexisteixen dues formes moleculars diferents, que es van anomenar CKIIA i CKIIB. Els assatjos de *Western blot* van revelar que la forma CKIIA estava constituïda per dues cadenes polipeptídiques, amb masses moleculars similars a les de les subunitats α i β , mentre que la forma CKIIB estava constituïda per una única cadena polipeptídica, amb una massa molecular similar a la de la subunitat α . Aquests resultats suggerien que la forma CKIIA presentava una naturalesa oligomèrica, amb estructura del tipus $\alpha_2\beta_2$, i que la forma CKIIB tenia naturalesa monomèrica. La determinació de la massa molecular d'aquesta última, per cromatografia de filtració en gel, va confirmar que estava formada per una única subunitat catalítica.

Mitjançant la combinació de diversos tipus de reïnes cromatogràfiques, es va establir un protocol de separació i purificació parcial de les dues isoformes. Breument, consistia, en primer lloc, en una cromatografia de bescanvi iònic en DEAE-Sepharosa, que permetia separar les dues isoformes entre elles, ja que eluïen a forces iòniques diferents, a la vegada que s'aïllaven de la proteïna quinasa CKI, que no s'enganxava a la reïna en les condicions experimentals utilitzades. A continuació, la forma CKIIA es purificava en una cromatografia de bescanvi iònic en reïna de fosfocel·lulosa, d'on n'eluïa a força iònica elevada. La CKIIB no s'unia a la reïna de fosfocel·lulosa, de manera que aquesta etapa servia, a més, per obtenir una fracció enriquida en CKIIA i lliure de contaminació per CKIIB. Per la seva part, la CKIIB es purificava en una cromatografia de bescanvi iònic protein-Pak Q AP-1 per a HPLC.

Seguint aquest protocol de purificació es van aïllar dues isoformes de la CK2 d'*Arabidopsis*, CKIIA i CKIIB, amb una grau de purificació de 89 i 79 vegades i activitats específiques de 855 i 91 U/mg de proteïna, respectivament. Les fraccions que es van obtenir es trobaven clarament enriquides en activitats del tipus CK2, segons els criteris que defineixen aquesta activitat: fosforilació de caseïna, inhibició de l'activitat a baixes concentracions d'heparina, possibilitat d'utilitzar GTP com a donador de fosfat i fosforilació del pèptid específic RRRDDDSDDD. Les constants enzimàtiques calculades eren similars a les conegudes per la proteïna purificada d'altres espècies.

Una altra dada que va confirmar la composició polipeptídica de les dues isoformes va ser el comportament davant el substrat calmodulina. Es coneixia des de feia temps que la subunitat CK2 α sola fosforilava significativament millor la calmodulina que els heterotetràmers $\alpha_2\beta_2$ (Bidwai, 1993). Aquesta observació suggeria que la subunitat CK2 β exercia un paper inhibitor de l'activitat enzimàtica en front aquest substrat, a través d'un mecanisme que es va demostrar estar mediat per la regió N-terminal d'aquesta subunitat, concretament pel *loop* acídic (residus 55 a 64) i el seti d'autofosforilació (residus 2 a 6) (Meggio, 1994). La inhibició de l'activitat enzimàtica de l'heterotetràmer podia revertir-se en presència de compostos policatiónics, principalment la polilisina, possiblement a través de canvis conformacionals provocats per la modificació de les interaccions electrostàtiques entre els diferents components de la reacció enzimàtica. Efectivament, les isoformes de la CK2 d'*Arabidopsis*, CKIIA i CKIIB, es comportaven com formes oligomèrica i monomèrica, respectivament, pel que fa al seu comportament envers aquest substrat. La fosforilació de calmodulina per part de la CKIIA era pràcticament nul·la en absència de polilisina i

s'estimulava 25 vegades en la seva presència. Per contra, la forma CKIIB era capaç de fosforilar amb eficiència aquest substrat en absència de polilisina.

Els nostres resultats van revelar, a més, que algunes característiques bioquímiques de la CK2 d'*Arabidopsis* divergien significativament de les propietats clàssiques descrites per les CK2 d'espècies animals, i que eren: el comportament cromatogràfic, l'estabilitat de l'enzim, la resposta a la polilisina i l'autofosforilació.

En primer lloc, la forma CKIIB exhibia un comportament cromatogràfic atípic, ja que no s'unia a la reïna de fosfocel·lulosa en presència de concentracions moderades de salt (0-250 mM NaCl), mentre que la CKIIA s'hi unia completament en les mateixes condicions experimentals. La càrrega electrostàtica global de les dues isoformes pot variar substancialment en absència de subunitat β i pensem que aquesta diferència pot provocar uns requeriments de força iònica més alts per part de les formes monomèriques amb la finalitat d'adoptar la conformació adequada per a la seva unió a la reïna.

En segon lloc, la forma oligomèrica CKIIA era molt inestable en tant que enzim parcialment purificat. Aquest fet dificultava l'estudi de la seva activitat a mesura que s'avançava en la purificació. Una observació similar va ser descrita per la forma oligomèrica recombinant reconstituïda de la CK2 d'*Arabidopsis* i la forma oligomèrica purificada del bròquil (Klimczak, 1995). Possiblement, les formes oligomèriques de les CK2 de plantes tenen un caràcter hidrofòbic més accentuat respecte les formes monomèriques, però, al mateix temps, l'alta inestabilitat podria reflectir la capacitat que tenen les subunitats lliures d'interaccionar amb altres proteïnes. Als animals, en canvi, la subunitat CK2 β augmenta l'estabilitat i l'activitat de la subunitat CK2 α davant la majoria de substrats. Addicionalment, la interacció de les seves subunitats amb altres proteïnes, com la topoisomerasa II i la HSP90, deriva en una major estimulació de l'activitat enzimàtica i impedeix la formació d'agregats de CK2 (Bojanowski, 1993; Miyata, 1995).

En tercer lloc, tant la CKIIA com la CKIIB són sensibles al pèptid de polilisina, que estimula la seva capacitat de fosforilar la caseïna, i que és una característica que també s'observa en les CK2 animals. De forma contradictòria, la isoforma que es mostra més sensible a la polilisina és la CKIIB (estimulació de 25 vegades en front de 3 vegades per la forma oligomèrica), malgrat l'absència de subunitat β en la seva estructura. Aquest comportament va ser descrit també per la forma monomèrica CKIIB purificada del blat de moro (Dobrowolska, 1992), però difereix del de l'enzim monomèric recombinant (Boldyreff,

1993b). Els autors van suggerir que aquest diferent comportament podia relacionar-se amb l'existència de diferents gens que codifiquessin per la subunitat α o a modificacions post-traduccionals. Una hipòtesi addicional que suggerim a partir dels nostres resultats, és que les interaccions que estableix la subunitat α amb altres proteïnes, que són presents als extractes vegetals però no en els bacteris, podrien derivar en reestructuracions conformacionals que justificuessin la gran sensibilitat a la polilisina. La co-purificació de les formes monomèriques CKIIB del blat de moro i *Arabidopsis* amb un substrat endogen de 15 kDa de massa molecular, que a més era un excel·lent substrat endogen, defensarien aquesta hipòtesi.

L'última característica pròpia de les CK2 que no es va observar en *Arabidopsis* fou l'autofosforilació. La incorporació d'un grup fosfat a la subunitat CK2 β és una característica comú de les CK2 oligomèriques d'animals i pot ser estimulada per poliamines, mentre que la reacció en presència d'alguns polications com la polilisina, la poliarginina i la protamina afavoreix l'autofosforilació de la subunitat CK2 α , en detriment de la CK2 β . La reacció d'autofosforilació realitzada amb les dues isoformes, CKIIA i CKIIB, d'*Arabidopsis*, en absència i en presència dels efectors protamina i espermina, va donar resultats negatius. Val a dir que, fins el moment, no s'ha pogut reproduir l'autofosforilació en cap de les subunitats dels enzims d'espècies vegetals, per la qual cosa s'hipotitza que aquest fenomen, o bé no es doni en les espècies vegetals, o bé estigui regulat de diferent manera respecte els animals. Les seqüències polipeptídiques de les subunitats CK2 β conegudes de plantes, *Arabidopsis* (Collinge, 1994; Sugano, 1998) i en aquesta tesi es presenta la seqüència d'una β de tabac, presenten un extrem N-terminal uns 80 aminoàcids addicionals respecte les seves homòlogues d'animals. L'existència d'aquesta extensió podria hipotèticament afectar de forma dràstica l'estructura tridimensional del conjunt de la proteïna i en particular emmascarar el seti d'autofosforilació, típicament situat en les Serines^{2,3}. Per altra banda, estudis mutacionals han demostrat la importància del *loop* acídic 55-64 en l'autofosforilació (Boldyreff, 1994b), però aquesta regió, en les CK2 β de plantes, es troba lleugerament desplaçada respecte la seva posició canònica i presenta canvis en alguns dels seus aminoàcids, com la Prolina 58, un aminoàcid clau d'aquesta regió (Hinrichs, 1995). Val a dir, però, que l'autofosforilació, malgrat ser una característica comuna de la família de les CK2, no és imprescindible per a la reconstitució de l'heterotetràmer actiu (Meggio, 1993), i es desconeix el significat fisiològic que pot tenir.

2. La proteïna quinasa CK2 en els processos de divisió cel.lular i de diferenciació en els sistemes vegetals: modulació de l'activitat enzimàtica durant el cicle cel.lular i regulació de la seva expressió en estadis de proliferació.

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

L'objectiu d'aquest treball era estudiar si la proteïna quinasa CK2 es trobava implicada en la regulació del cicle cel.lular de les plantes, prenent com a base estudis preliminars duts a terme en cèl.lules animals que evidenciaven la seva participació en xarxes de transducció de senyal de proteïna quinases que controlen la progressió del cicle cel.lular (Litchfield, 1993; Pinna, 1997). Es volia determinar, en primer lloc, si existien variacions de l'activitat enzimàtica durant el cicle cel.lular de les cèl.lules vegetals i, en cas afirmatiu, determinar en quines etapes es requeria la presència de l'enzim funcional. En segon lloc, estàvem interessades en estudiar la regulació de l'expressió de la proteïna durant aquest procés, a nivell transcripcional i post-transcripcional per a les dues subunitats. Per a realitzar aquests estudis es va escollir com a sistema vegetal experimental, la línia cel.lular BY-2 de tabac, que és altament sincronitzable (Nagata, 1992; Combettes, 1999).

En el moment d'abordar aquest objectiu, existien a la literatura diversos treballs que, mitjançant estudis genètics o per microinjecció d'anticossos específics, havien descrit que la CK2 era requerida a punts específics del cicle cel.lular de mamífers i llevats. No obstant, aquest era el primer treball realitzat en plantes i també el primer en qualsevol organisme que analitzava en detall l'evolució de l'activitat enzimàtica al llarg del cicle i n'estudiava la correlació amb els nivells de mRNA i proteïna.

A *S.cerevisiae*, la producció de mutants de CK2 sensibles a temperatura va revelar que aquest enzim era necessari per a la progressió a través de G1, en un punt situat entre l'*start point* i l'inici de la fase S (Hanna, 1995). Els autors constataren que les seves dades no permetien discriminar entre l'*start point* i l'inici de la replicació a la transició G1/S i que, conseqüentment, no es podien descartar punts addicionals de control anteriors a G1. En mamífers, la microinjecció d'anticossos contra la subunitat CK2 β arrestava les cèl.lules a G0/G1, G1 i G1/S (Pepperkok, 1994) i també s'havia descrit un augment de l'activitat

enzimàtica abans i durant la fase S en fibroblasts humans estimulats amb sèrum (Carroll, 1989).

Les nostres dades experimentals van demostrar que en cèl.lules sincronitzades de tabac, en divisió activa, l'activitat CK2 oscil.lava cíclicament, amb pics d'activitat a la transició G1/S o entrada de fase S, i a la fase M. El primer pic d'activitat començava exactament al mateix temps que la inducció de l'expressió de la histona H4, que té lloc a la transició G1/S, i assolía el seu valor màxim just abans o al punt de l'arrest causat per la sincronització amb afidicolin, a l'entrada a fase S. No obstant, l'expressió global d'ambdues subunitats era constitutiva al llarg del cicle, car no es detectaven variacions dels nivells de mRNA i proteïna, per la qual cosa es va pensar que la regulació de l'activitat CK2 podia respondre a modificacions post-traduccionals. Cal tenir present, però, que no s'ha estudiat l'expressió individualitzada de cada un dels gens de la família multigènica i, per tant, les nostres conclusions d'expressió constitutiva han de ser interpretades amb reserva.

La inhibició *in vivo* de l'activitat CK2 mitjançant la incubació de les cèl.lules sincronitzades de tabac amb l'inhibidor específic 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, va corroborar la necessitat d'aquesta activitat en diferents punts del cicle cel.lular, que es podien correlacionar amb els pics d'activitat prèviament descrits. Especialment interessant fou l'efecte de l'inhibidor afegit a cèl.lules en fase G1, que derivava en la inhibició de l'activitat a G1/S. En contraposició a l'efecte de l'inhibidor afegit a fase S i a fase G2, en què les cèl.lules quedaven arrestades i morien al cap de poc temps, l'addició a fase G1 no suposava la mort cel.lular ni tampoc impedia l'inici de la replicació del DNA, si bé el procés s'avortava abans d'arribar al màxim observat en absència d'inhibidor. L'aturada de la replicació coincidia exactament amb l'inici del pic d'activitat enzimàtica a G1/S. L'observació morfològica d'aquestes cèl.lules revelava que el material genètic havia condensat i recordava una profase, però paradigmàticament, la membrana nuclear no s'havia trencat. Aquest resultat demostrava que l'addició de l'inhibidor a G1 provocava la condensació prematura de la cromatina en el nucli en replicació i suggeria que la CK2 podia estar implicada en el checkpoint G2/M que normalment impedeix l'entrada a la profase fins que la replicació s'hagi acomplert amb èxit.

Una hipòtesi que plantegem és que un senyal generat per la CK2 a G1/S, com per exemple la fosforilació de proteïnes reguladores, iniciï una cascada de senyalització que acabi controlant, en últim terme, el checkpoint G2/M. Una possibilitat, encara no demostrada,

seria que la funció de la CK2 a G1/S fos formar part del sistema de senyalització que regula mitjançant la fosforilació, l'import de proteïnes cap al nucli. Existeixen dades que avalarien aquesta hipòtesi: en diverses proteïnes, els setis de fosforilació per CK2 es localitzen en una posició contigua a seqüències de localització nuclear (NLS), alhora que té lloc una redistribució intracel·lular que ve precedida de la fosforilació per CK2 (Kakinoki, 1997; Litchfield, 1993; Meisner, 1991).

Dues proteïnes que exerceixen una funció crucial en el control del cicle cel·lular, la p34^{cdc2} i la p53, són fosforilades per CK2 específicament a G1/S en cèl·lules animals però no s'ha demostrat que això pugui afectar la seva localització subcel·lular (Koenig, 1997; Russo, 1992). A més, la p34^{cdc2} és un element clau del checkpoint G2/M i la p53 ho és tant del checkpoint G2/M com del G1/S. Ara bé, seria arriscat extrapolar aquestes dades als sistemes vegetals, perquè fins el moment no s'ha clonat cap homòleg de p53 de plantes i els homòlegs de p34^{cdc2} aïllats de plantes superiors no contenen la seqüència concens de fosforilació per CK2. Un altre candidat en les cèl·lules vegetals podria ser la ciclina mitòtica CycB1, la qual, en contrast amb les seves homòlogues d'animals presenta un senyal de localització nuclear en la regió N-terminal de la cadena polipeptídica, amb un senyal de fosforilació per CK2 adjacent (Renaudin, 1998).

Pel que fa a la fase M, un candidat ferm per a ser diana de la CK2 és la topoisomerasa II, que és el component estructural més important de l'esquelet dels cromosomes en metafase i és essencial en la segregació de les cromàtides germanes i en l'anafase. La topoisomerasa II de llevat és un excel·lent substrat *in vitro* de la CK2, i és fosforilada *in vivo* i hiperfosforilada durant la mitosi de cèl·lules animals i de llevat (Ishida, 1996), si bé, de nou, no es tenen dades en sistemes vegetals.

A la vegada, també és conegut que, en mamífers, la compartimentalització subcel·lular de la CK2 varia al llarg del cicle cel·lular (Pepperkok, 1994), de manera que la proteïna podria exercir diferents funcions, segons la seva localització i la identitat i disponibilitat de substrats a les diferents fases del cicle.

2.2. Regulació de l'expressió i de l'activitat de la proteïna quinasa CK2 en estadis de proliferació cel.lular.

Aquest aspecte de la regulació de la CK2 es va estudiar des de dues aproximacions experimentals diferents que van derivar en resultats coincidents i conclusius. Per una banda, es va analitzar la seva activitat i expressió durant la corba de creixement de les cèl.lules BY-2 de tabac i, per l'altra, es va establir el patró d'expressió dels gens de les dues subunitats en diferents òrgans vegetals mitjançant la tècnica d'hibridació *in situ*. Els resultats obtinguts van demostrar que l'activitat i l'expressió gènica de la CK2 augmenten quan s'entra a un estadi de proliferació des d'un estadi no proliferatiu. També s'inclou en aquest apartat l'estudi de la funció de les poliamines en l'activació i l'estabilització de la CK2 durant la proliferació cel.lular.

2.2.1. Activitat i expressió de la proteïna quinasa CK2 en la corba de creixement de les cèl.lules BY-2.

La determinació del perfil d'activitat enzimàtica durant la corba de creixement de les cèl.lules BY-2 mostrava un augment considerable de l'activitat a l'entrada a la fase exponencial de creixement, si bé aquest increment només podia correlacionar-se parcialment amb l'augment dels nivells de mRNA per a les dues subunitats. Existia, en canvi, una correlació molt més evident entre el pic d'activitat enzimàtica i la quantitat de polipèptid CK2 β detectada als extractes proteics. La quantitat de polipèptid CK2 α roman constant durant tota la corba, fins i tot a la fase estacionària, quan tant l'activitat enzimàtica com la subunitat CK2 β havien desaparegut. Aquests resultats suggerien que la CK2 β jugava un paper crucial en el control de l'activitat CK2 a les plantes, tal com s'havia demostrat prèviament en animals i llevat.

L'observació que els nivells de mRNA i de proteïna per a la subunitat CK2 β no coincidien exactament, feia entreveure que podia existir una regulació per mecanismes post-transcripcionals que podien ser rellevants en el control de la sortida des de l'estadi proliferatiu cap a la fase estacionària. En aquest sentit, es podia pensar en una repressió de la traducció del corresponent mRNA o també en una contínua i ràpida degradació de la proteïna. Existeixen a la literatura diversos treballs que avalarien ambdues hipòtesis. En cèl.lules humanes en creixement exponencial, la CK2 β és sintetitzada en excés respecte la

subunitat CK2 α , i una part substancial d'ella és degradada durant la primera hora després de la síntesi (Luscher, 1994). Per contra, en un altre treball es descriu que en teixits tumorals, s'han detectat nivells alts de CK2 β i que un excés d'aquesta subunitat pot ser nociu per a la cèl.lula (Stalter, 1994).

La cadena polipeptídica de la CK2 β conté element comuns a la ruta de degradació per ubiquïtinació, com la caixa de destrucció de ciclins i seqüències PEST, si bé la funcionalitat d'aquestes seqüències no ha estat demostrada. Proposem que la degradació de la subunitat CK2 β podria complir amb la finalitat de permetre que la subunitat catalítica CK2 α interaccionés amb altres proteïnes reguladores, resultant en una inhibició de la proliferació i hauria esdevingut, per tant, un dels mecanismes usats per aquest enzim per a controlar la velocitat de proliferació cel.lular. Aquesta idea es recolzaria en el treball que descriu que l'associació de la CK2 α amb la proteïna fosfatasa 2A, en absència de subunitat CK2 β , regula negativament la proliferació cel.lular (Hériché, 1997).

En aquest punt voldria fer esment d'un aspecte que podria semblar aparentment contradictori respecte el primer capítol presentat en aquesta tesi. En els organismes vegetals s'ha considerat una característica generalitzada la coexistència de formes monomèriques i tetramèriques de la CK2. El tipus d'estudis realitzats amb les cèl.lules BY-2 no permet discriminar entre les dues isoformes, l'existència de les quals tampoc no ha estat confirmada en aquest sistema. Creiem que en els extractes crus de proteïna o extractes totals les dues isoformes, si hi són presents, són funcionalment actives, car la pèrdua d'activitat de la forma oligomèrica d'*Arabidopsis* tenia lloc en avançar en la seva purificació. Per a discriminar entre les dues isoformes, es proposaria realitzar estudis d'immunoprecipitació sobre els extractes totals per tal d'aïllar les formes funcionalment actives en els punts d'interès.

2.2.2. Regulació post-transcripcional de la proteïna quinasa CK2 durant la divisió cel.lular: les poliamines.

Com a primer pas d'un estudi més exhaustiu sobre els mecanismes responsables de la regulació post-transcripcional de la CK2, es va comparar l'evolució de l'activitat catalítica de la CK2 amb el contingut de poliamines lliures, durant la corba de creixement i durant la progressió de 1 cicle complet de divisió cel.lular a les cèl.lules BY-2. Malgrat que els nostres resultats no són conclusius, mostren una clara correlació entre els pics d'activitat

enzimàtica i valors alts de la concentració de poliamines. Durant el cicle de divisió cel.lular, a partir dels experiments de sincronització simple i doble, s'observa que les tres poliamines analitzades incrementen aproximadament 3 vegades el seu contingut i l'activitat enzimàtica s'estimula 5 vegades, quan les cèl.lules progressen de G2 cap a M. En progressar de G1 cap a S, l'increment en poliamines és de 1.5-1.8 vegades i s'estimula l'activitat en 3 vegades. Respecte a la corba de creixement, l'activitat CK2 s'estimula en 4 o 5 vegades en rescatar les cèl.lules de la fase estacionària, al mateix temps que augmenten els nivells de poliamines lliures.

Els nostres resultats van demostrar també que existeix una clara coincidència entre els nivells alts de poliamines i la presència de polipèptid CK2 β . Dit d'una altra manera, el polipèptid β desapareix quan els nivells de poliamines són molt baixos. Altres autors havien descrit un augment marcat dels nivells proteics de CK2 β en presència de poliamines i van suggerir que aquests compostos podrien actuar estabilitzant la proteïna (Shore, 1997). La regió N-terminal de la subunitat β conté un domini d'unió a poliamines (Leroy, 1997), localitzat en una posició propera a la seqüència amb similitud a la caixa de destrucció de ciclins. A partir dels nostres resultats proposem que les poliamines podrien induir canvis conformacionals que eventualment emmascararien la caixa de destrucció, prevenint la ubiquitinació i, en conseqüència retardant la degradació del polipèptid. Segons aquesta hipòtesi, la superació d'un cert llindar en el contingut de poliamines podria ser indispensable per a l'estabilització de la subunitat CK2 β . Durant el cicle de divisió cel.lular, plasmat en els experiments de sincronització, es detecten nivells estables de polipèptid CK2 β , a la vegada que la concentració de poliamines, malgrat presenti oscil.lacions, mai no baixa als nivells detectats a la fase estacionària de la corba de creixement. Aquest mecanisme de regulació podria constituir, a la vegada, un factor de retroalimentació positiva en la regulació de l'activitat CK2 per poliamines, ja que s'ha vist que la forma tetramèrica $\alpha_2\beta_2$ és estimulada allostèricament per aquests compostos (Valero, 1995).

Creiem, no obstant, que es requereixen més estudis per tal de validar aquesta hipòtesi i, sobretot, per aclarir si és el contingut total de poliamines, referint-se al nombre global de càrregues positives, o el contingut d'una d'elles en particular, el que determina l'estabilitat i l'activitat de la CK2. Per exemple, en els dies 0 i 3 de la corba de creixement de les cèl.lules BY-2, l'activitat enzimàtica és pràcticament igual, però al dia 0 es detecta polipèptid β mentre que al dia 3 és indetectable. En analitzar els continguts de les tres poliamines per separat, s'observa que entre els dies 0 i 3, la concentració de putrescina ha

disminuït un 65% i la d'espermina un 30%, mentre que la concentració d'espermidina roman constant. És lògic pensar que la disminució tan accentuada de la concentració de putrescina i espermina pugui explicar la inestabilitat de la subunitat CK2 β en aquest punt.

2.2.3. Estudi del patró d'expressió de la proteïna quinasa CK2 en diferents òrgans vegetals d'Arabidopsis thaliana i Raphanus sativus, per hibridació in situ.

La segona aproximació que es va seguir per a l'estudi de l'expressió de la CK2 en relació amb la proliferació cel.lular, fou la determinació del patró d'expressió temporal i espacial dels seus, mitjançant la hibridació *in situ* de sondes de mRNA sobre diferents òrgans de la planta: flor, fulla, arrel i meristem vegetatiu apical de la tija. Estudis previs havien demostrat que l'expressió de la subunitat CK2 α no era constant en tots els òrgans de la planta d'*Arabidopsis*, sinó que era més elevada en flors, arrels i fulles (Mizoguchi, 1993). La determinació, per *Northern blot*, de l'expressió de la subunitat CK2 β en *Arabidopsis*, que es presenta com a resultat obtingut en aquesta tesi, demostrava que aquesta és significativament més alta en la fulla i la flor (Espunya, 1997).

Els resultats que es van obtenir mostraven un perfil d'expressió equivalent per a les dues subunitats de la CK2 en tots els òrgans analitzats. A més, es podia concloure que la CK2 es troba regulada a nivell transcripcional durant el desenvolupament de la planta i s'expressa majoritàriament en tipus cel.lulars en divisió o amb competència per a la divisió. Així, es va observar que l'expressió era alta en els meristems i els procàmiums dels diferents òrgans estudiats, i en els estams, les anteres, el gineceu i els òvuls de la flor en desenvolupament, tots ells en activa proliferació cel.lular. Creiem que aquests resultats poden correlacionar-se amb la inducció de l'expressió per a les dues subunitats que s'observa a la fase exponencial de la corba de creixement de les cèl.lules BY-2 i que es manté constant durant el cicle cel.lular, plasmat en els experiments de sincronització.

L'expressió es detectava també en cèl.lules diferenciades, com les del pericicle i el parènquima estel.lar del teixit vascular de l'arrel. Aquestes cèl.lules mantenen la capacitat de reemprendre la divisió cel.lular per a generar arrels laterals. En certa manera, l'expressió de la CK2 en aquestes cèl.lules equivaldria a l'expressió basal que s'observa en cèl.lules BY-2 en fase estacionària que, en subcultivar-les en medi fresc, reactiven el cicle de divisió. La inducció de l'expressió que es detectava quan les arrels eren incubades amb

auxina per a induir la formació d'arrels laterals, equivaldria a l'estimulació de l'expressió que s'observa en la fase exponencial de les BY-2.

Al llarg del desenvolupament i la maduració dels òrgans de la planta, l'expressió de la CK2 decreixia paulatinament, i esdevenia pràcticament nul·la a partir del moment en què les cèl·lules assolien la plena diferenciació i aturaven el creixement, tal com es va observar en el còrtex de les arrels, i en els sèpals i les anteres de les flors. Aquestes dades suggereixen que, possiblement, aquestes cèl·lules hagin sortit del cicle de divisió cel·lular i hagin perdut la competència per a la divisió.

Per últim, l'expressió de les dues subunitats de la CK2 a la fulla es detecta en el procàmbium i en tipus cel·lulars amb funció fotosintètica: el mesòfil i el parènquima esponjat. Existeixen a la bibliografia alguns treballs que posen de manifest la implicació de la CK2 en la funció fotosintètica. Així, l'ATP sintasa fotosintètica i algunes ribonucleases del cloroplast són fosforilades per la CK2 (Kanekatsu, 1995; 1997), i la sotaexpressió de la CK2 α a *Arabidopsis* provoca una disminució de les dimensions finals de les fulles mentre que les flors i les arrels no es veuen alterades, a la vegada que es demostra que la CK2 actua com a regulador de l'expressió de gens regulats per la llum (Lee, 1999). Aquestes observacions, unides al fet que la fulla és l'òrgan de la planta on la CK2 s'expressa a uns nivells més elevats, corroborarien la importància d'aquesta proteïna en el desenvolupament i fisiologia de la fulla.

3. Característiques pròpies i característiques generals de les cadenes polipeptídiques de les subunitats CK2a i CK2b de plantes en comparació a les d'altres organismes, en base a les seqüències obtingudes en el cribatge d'una biblioteca de cDNA de tabac.

Mitjançant el cribatge d'una biblioteca de cDNA preparada a partir de cèl·lules BY-2 de tabac en fase exponencial de creixement, es van obtenir dos clons diferents amb homologia per a la subunitat CK2 α i un clo amb homologia per a la subunitat CK2 β . A continuació es fa un resum dels aspectes més destacats de les seqüències obtingudes.

3.1. La subunitat catalítica CK2 α

Les subunitats catalítiques de la CK2 pertanyen, juntament amb les CDKs (quinases dependents de ciclina), les MAP quinases i la GSK-3 (glicogen sintasa 3), al grup CMCG de proteïna quinases eurariotes. Les proteïna quinases presenten un domini catalític d'entre 250 i 300 aminoàcids de longitud que es pot estructurar en onze subdominis que contenen patrons característics de residus altament conservats (Hanks, 1988). Per motius de simplificació es discuteixen només les característiques particulars de les proteïna quinases CK2, posant èmfasi en les característiques pròpies de les formes vegetals.

Les CK2 α conegudes d'espècies vegetals, *N. tabacum*, *A. thaliana* i *Z. mays*, mantenen conservats la distribució en 11 subdominis i gairebé la totalitat dels motius estructurals reportats a la bibliografia i considerats responsables de les propietats funcionals de la proteïna. Les identitats de seqüència d'aminoàcids entre les formes d'origen vegetal superen el 90%, i són superiors al 70% quan es comparen amb les d'origen animal. Les variacions no afecten a cap dels residus considerats com a fonamentals per a la seva funció, posant-se de manifest una vegada més la gran conservació de la CK2 α a nivell evolutiu. Les característiques més importants de les seqüències obtingudes són les següents (la numeració utilitzada per als residus d'aminoàcids correspon a les posicions en la seqüència de la forma CKA1 humana):

a) els subdominis del domini catalític.

- El subdomini I conté la seqüència ⁴⁶GRGKYSEV⁵³, conservada en totes les formes conegudes de la CK2, incloses les de plantes. Està implicat en la unió del fosfat en posició β de l'ATP i en el reconeixement del substrat. Es troba estructurat en forma de *loop* entre les fulles β 1 i β 2, que configuren el centre actiu de la proteïna. La Tirosina ⁵⁰ és un residu típic de les proteïnes CDKs. La seva conservació posa de manifest la relació evolutiva que existeix entre les dues proteïna quinases.
- Als subdominis II i VII s'hi situen dos residus característics de la CK2. Per un costat, la posició 66 presenta una Valina en les proteïnes d'animals i una Isoleucina en les de plantes, llevat i *Dictyostelium*, que reemplacen una Alanina, conservada en les altres proteïna quinases de la mateixa família. Més endavant, la Fenilalanina ¹⁷⁶ del subdomini VII, conservada a totes les proteïna quinases, es troba substituïda a les CK2 per un Triptòfan i forma part del *loop* d'activació en conformació oberta. Aquestes dues substitucions han estat relacionades amb la capacitat única de la CK2 d'utilitzar el GTP com a donador de fosfat.
- Entre els subdominis II i III de la CK2, s'hi localitza una regió bàsica, de seqüència ⁷⁴KKKKIKR⁸⁰ a la majoria de les espècies, que contràriament és acídica en altres quinases de la família. Les CK2 α de tabac i de blat de moro conserven tots els residus, però les dues proteïnes d'Arabidopsis han substituït la Lisina ⁷⁹ per una Arginina, i CKA1 ha substituït, a més, la Lisina ⁷⁷ per un Glutàmic, substitucions que, en conjunt, poden modificar lleugerament la càrrega electrostàtica de la seqüència. Diversos estudis han postulat que aquesta regió pot establir interaccions electrostàtiques amb regions acídiques dels substrats i/o d'inhibidors policatiònics, com l'heparina. També es troba implicada en la interacció amb la subunitat CK2 β . Aquesta seqüència compleix, a més, els cànons d'un senyal de localització nuclear i es creu que pot ser responsable de la translocació de la proteïna al nucli. Estructuralment, forma part de l'hèlix α C, que s'ha descrit com a responsable de la conformació oberta i activa de la proteïna, estabilitzada per múltiples interaccions electrostàtiques amb l'extrem N-terminal i el segment d'activació.

- En el subdomini VI, la seqüència $^{156}\text{DX}_1\text{KX}_2\text{X}_3\text{N}^{161}$ forma el *loop* catalític del centre actiu de la CK2, que es troba implicat en la unió del substrat. El residu X_8 és un residu acídic en les Ser/Thr quinases però en la CK2 ha estat substituït per una Histidina.
- Els subdominis VII i VIII s'estructuren formant el segment d'activació del centre actiu i alguns dels residus estan implicats en el reconeixement del substrat.

b) els extrems N- i C-terminal.

L'extrem N-terminal de les CK2 α de plantes és lleugerament més curt que el de les altres espècies comparades. Es manté, però, l'homologia de seqüència en alguns blocs de residus, implicats estructuralment en l'establiment d'interaccions amb el centre actiu que provoquen l'estabilització de la conformació oberta i activa de la subunitat.

Els últims residus de l'extrem C-terminal de les formes vegetals presenten una homologia alta en comparar-les entre elles, però nul·la en comparar-los amb altres espècies. Si bé no s'ha descrit que aquests residus exerceixin una funció determinada, la forma CKA1 humana presenta un extrem C-terminal més extens i conté dues Treonines que són fosforilades per la p34^{cdc2} a la fase M del cicle cel·lular. Aquestes seqüències consens de fosforilació per part de la p34^{cdc2} es troben absents a les CK2 vegetals.

3.2. La subunitat reguladora CK2 β

La seqüenciació del clo obtingut a partir del criatge de la biblioteca de cDNA de tabac, va corroborar l'observació feta anteriorment per a les seqüències de la CK2 β d'*Arabidopsis thaliana* sobre la presència d'un extrem N-terminal considerablement més llarg en comparació al de les altres espècies, i permet hipotitzar que aquesta sigui una característica comú i única de les subunitats reguladores de les CK2 de plantes, sense que, de moment, es pugui confirmar que això afecti l'estructura tridimensional i/o la funció de la proteïna.

Ahora, existeixen a la resta de la cadena polipeptídica de les formes vegetals, diferències en motius estructurals importants per a la funcionalitat de la proteïna. Entre elles, caldria destacar-ne les següents:

- El seti d'autofosforilació situat a les formes animals a l'extrem N-terminal de la proteïna (²SSSEE⁶), ocupa una posició interna a les plantes i no es conserva completament, si bé compleix la seqüència concens d'autofosforilació i existeixen altres setis addicionals adjacents a ella. Això, unit al fet que mai s'ha pogut observar autofosforilació d'una CK2 β vegetal, permet hipotitzar que l'extensió N-terminal pugui emascarar aquests setis, prevenint l'autofosforilació. Per altra part, d'acord amb l'estructura del cristall obtingut per a la CK2 β humana, les Serines^{2,3} del seti d'autofosforilació es troben conformacionalment exposades a la superfície de la proteïna, i interaccionen amb la regió acídica 55-64 de la mateixa subunitat i amb el centre catalític de la subunitat CK2 α . Es desconeix si a les plantes aquestes interaccions poden veure's alterades.
- La seqüència amb homologia amb la caixa de destrucció de ciclins, ⁴⁷RXXLXX(L/I)XN⁵⁵, conserva invariable la Leucina⁵⁰ a les formes vegetals. Aquest és el residu més important per a la ubiquitinació de les ciclins i la posterior degradació al proteosoma.
- La regió acídica localitzada entre les posicions 55 i 64, implicada en la modulació de l'activitat enzimàtica per poliamines i en l'associació de la proteïna a membranes, es troba només parcialment conservada en les formes vegetals, i la CK2 β de tabac presenta en aquesta regió una delecció de cinc aminoàcids. No obstant, més a la dreta s'hi troben tres residus àcids que podrien hipotèticament substituir la regió anteriorment citada.
- Els quatre residus de Cisteïna en les posicions 109, 114, 137 i 140, es conserven en totes les seqüències analitzades. Aquests residus formen part del motiu d'unió a zinc, i intervien en la coordinació del metall.
- L'extrem C-terminal ha estat implicat en la dimerització de la subunitat β , en l'associació amb la subunitat catalítica, en la protecció contra la desnaturalització i la proteòlisi i en la estimulació de l'activitat enzimàtica. L'extrem C-terminal de les CK2 β de plantes és sensiblement més curt en comparació als seus homòlegs d'animals i llevat, però engloba la totalitat del segment de la regió que és funcional.

- Per últim, les CK2 β dels vertebrats superiors, contenen la Serina²⁰⁹ que pot ser fosforilada tant *in vitro* com *in vivo* per la p34^{cdc2}. Les plantes, llevats i la resta d'animals no presenten aquest residu.

A grans trets, la comparació a nivell de seqüència d'aminoàcids de les subunitats CK2 β de plantes amb les d'altres espècies no vegetals, posa de manifest que si bé l'homologia és alta i es conserven la majoria de regions funcionalment importants, aquestes presenten algunes variacions en la seva seqüència i posició. Creiem que la proteïna pot sofrir lleugeres modificacions conformacionals que poden afectar l'ensamblatge amb la subunitat catalítica, com a conseqüència de les interaccions que s'estableixin entre l'extensió de l'extrem N-terminal i la resta de la cadena polipeptídica. La determinació de l'estructura tridimensional de la subunitat CK2 β de plantes, sola o formant part de l'holoenzim, col.laboraria en gran mesura a augmentar el coneixement del significat evolutiu i funcional de les propietats úniques de les CK2 de plantes.

CONCLUSIONS

La proteïna quinasa CK2 existeix a *Arabidopsis* organitzada en dues isoformes actives enzimàticament, les quals s'han aïllat per cromatografia líquida. La forma CKIIA té estructura oligomèrica i està composta de subunitat α i de subunitat β , mentre que la forma CKIIB és monomèrica i es compon únicament de subunitat α . La coexistència de dues isoformes, amb diferent estructura i massa molecular, sembla ser una característica pròpia de les CK2 de plantes. Hem detectat una inestabilitat de l'activitat enzimàtica en la proteïna oligomèrica parcialment purificada, mentre que la forma monomèrica presenta una activitat enzimàtica més estable.

1. La forma monomèrica CKIIB mostra el comportament típic observat en les subunitats α recombinants d'animals, de poder fosforilar el substrat calmodulina en absència de polilisina. En canvi, la forma oligomèrica CKIIA, com les formes oligomèriques d'altres espècies, únicament fosforila la calmodulina en presència de polilisina. Per altra part, la forma CKIIB copurifica amb una proteïna de 15 KDa que, a més, és un substrat endogen.
2. Les dues isoformes, CKIIA i CKIIB, d'*Arabidopsis* presenten les principals característiques bioquímiques pròpies de les CK2 de tots els sistemes vius: són capaces d'utilitzar tant GTP com ATP com a molècules donadores de fosfat, la seva activitat és inhibida per heparina, i fosforilen tant el substrat caseïna com el pèptid específic RRRDDDSDDD. La CKIIB d'*Arabidopsis* divergeix, però, en què no s'uneix a la reïna de bescanvi iònic de fosfocel·lulosa i presenta una baixa estimulació per polilisina.
3. A diferència de les CK2 animals, les dues isoformes CKIIA i CKIIB d'*Arabidopsis*, no s'autofosforilen en cap de les seves subunitats. Proposem que l'existència d'una extensió d'uns 80 aminoàcids a l'extrem N-terminal de la subunitat β , pròpia de les espècies vegetals, podria afectar de forma dràstica l'estructura tridimensional del conjunt de la proteïna, i emmascar el seti d'autofosforilació, típicament situat a l'extrem N-terminal (posicions 2 i 3 a la CK2 humana, posicions 92 i 94 a CKB1 d'*Arabidopsis*).

4. En cultius sincronitzats de cèl·lules BY-2 de tabac, l'expressió global de les subunitats α i β de la CK2 és constitutiva al llarg del cicle cel·lular. L'activitat enzimàtica, però, sofreix oscil·lacions al llarg del cicle i mostra pics d'activitat a la transició G1/S i a Mitosi. La determinació de la concentració de poliamines lliures ha demostrat que existeixen variacions al llarg del cicle cel·lular que podrien ser en part responsables de les oscil·lacions d'activitat.

5. La inhibició *in vivo* de l'activitat CK2, amb l'inhibidor específic 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, corrobora que aquesta activitat és necessària a G1/S i a Mitosi. El bloqueig del cicle cel·lular a les fases S i G2 provoca la mort de les cèl·lules en un interval curt de temps. L'addició de l'inhibidor a la fase G1 no és letal per a les cèl·lules, sinó que aquestes inicien la replicació en el moment previst, però no són capaces de completar-la perquè condensen prematurament la cromatina. A partir d'aquestes dades, proposem que un senyal generat per la CK2 a G1/S, com la fosforilació de proteïnes reguladores, podria iniciar una cascada de senyalització que acabés controlant en últim terme el *checkpoint* G2/M.

6. L'anàlisi de l'expressió i activitat de la CK2 en la corba de creixement de les cèl·lules BY-2, conjuntament amb l'establiment del patró d'expressió de la CK2 en diferents òrgans vegetals per hibridació *in situ*, ha revelat que l'activitat i l'expressió gènica de la CK2 augmenten quan s'entra a un estadi de proliferació des d'un estadi no proliferatiu.

7. A l'entrada a un estadi de proliferació cel·lular, representat per l'entrada a la fase exponencial de les cèl·lules BY-2, el perfil d'activitat CK2 coincideix amb la presència de polipèptid per a la subunitat β i amb un augment notable de la concentració de poliamines.

8. Proposem que les poliamines exerceixen un doble efecte sobre la CK2, quan la seva concentració supera un cert llindar: són estimuladors al·lostèrics de l'activitat enzimàtica i impedeixen la degradació de la subunitat β , afavorint l'estabilització de l'holotetràmer.

9. Per hibridació *in situ* sobre diferents òrgans vegetals s'ha demostrat que l'expressió de les subunitats α i β de la CK2 segueix perfils equivalents. La CK2 es troba regulada a nivell transcripcional durant el desenvolupament de la planta i s'expressa majoritàriament en tipus cel.lulars en divisió i en cèl.lules diferenciades que mantenen la competència per a la divisió. La inducció de la divisió cel.lular per auxines augmenta l'expressió. La CK2 es detecta també a tipus cel.lulars amb funció fotosintètica. L'expressió de la CK2 s'atura quan les cèl.lules han assolit la plena diferenciació i han aturat el creixement.

10. El cribatge d'una biblioteca de cDNA de tabac ha demostrat que en aquesta espècie existeixen com a mínim dos gens que codifiquen per a proteïnes de 39.4 KDa amb homologia amb la subunitat α i un gen que codifica per a una proteïna de 30.8 KDa amb homologia amb la subunitat β .

11. Les seqüències obtingudes per a la subunitat α conserven els motius estructurals característics d'aquesta subunitat, posant-se de manifest una gran conservació a nivell evolutiu. La seqüència obtinguda per a la subunitat β , en concordància al que s'ha descrit per a *Arabidopsis* i *Zea mays*, conté un extrem N-terminal més llarg que en les espècies no vegetals. Concluïm que l'existència d'aquesta prolongació és una característica pròpia de les subunitats CK2 β vegetals i proposem que el seu plegament pot afectar dràsticament l'estructura tridimensional global de l'enzim, així com alguna de les seves propietats bioquímiques, com l'autofosforilació.

BIBLIOGRAFIA

- Allende, J. E. i Allende, C. C.** (1995) Protein kinase CK2: an enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation. *FASEB J.* **9**, 313-323.
- Andersen, S. E., Bastola, D. R. i Minocha, S. C.** (1998) Metabolism of polyamines in transgenic cells of carrot expressing a mouse ornithine decarboxylase cDNA. *Plant Physiol.* **116**, 299-307.
- Bastola, D. R. i Minocha, S. C.** (1995) Increased putrescine biosynthesis through transfer of mouse ornithine decarboxylase cDNA in carrot promotes somatic embryogenesis. *Plant Physiol.* **109**, 63-71.
- Battistutta, R., Sarno, S., De Moliner, E., Marin, O., Issinger, O.-G., Zanotti, G. i Pinna, L. A.** (2000) The crystal structure of the complex of *Zea mays* α subunit provides the clue to the architecture of protein kinase CK2 holoenzyme. *Eur. J. Biochem.* **267**, 5184-5190.
- Bidway, A. P., Reed, J. C. i Glover, C. V. C.** (1993) Phosphorylation of calmodulin by the catalytic subunit of casein kinase II is inhibited by the regulatory subunit. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**, 265-270.
- Bidway, A. P., Reed, J. C. i Glover, C. V. C.** (1994) Casein kinase II of *Saccharomyces cerevisiae* contains two distinct regulatory subunits, β and β' . *Arch. Biochem. Biophys.* **309**, 348-355.
- Bidway, A. P., Zhao, W. i Glover, C. V. C.** (1999) A gene located at 56F1-2 in *Drosophila melanogaster* encodes a novel metazoan beta-like subunit of casein kinase II. *Mol. Cell. Biol. Res. Commun.* **1**, 21-28.
- Blanquet, P. R.** (2000) Casein kinase 2 as a potentially important enzyme in the nervous system. *Progress in Neurobiology*, **60**, 211-246.
- Bojanowski, K., Filhol, O., Cochet, C., Chambaz, E. M. i Larsen, A. K.** (1993) DNA topoisomerase II and casein kinase II associate in a molecular complex that is catalytically active. *J. Biol. Chem.* **268**, 22920-22926.

- Boldyreff, B., Meggio, F., Pinna, L. A. i Issinger, O.-G.** (1993a) Reconstitution of normal and hyperactivated forms of casein kinase-2 by variably mutated β -subunits. *Biochemistry* **32**, 12672-12677.
- Boldyreff, B., Meggio, G., Dobrowolska, G., Pinna, L. A. i Issinger, O.-G.** (1993b) Expression and characterization of a recombinant maize CK-2 α subunit. *Biochem. Biophys. Acta* **1173**, 32-38.
- Boldyreff, B., Meggio, F., Pinna, L. A. i Issinger, O.-G.** (1994a) Protein kinase CK2 structure-function relationship: effects of the β subunit on reconstitution and activity. *Cell Mol. Biol. Res.*, **40**, 391-399.
- Boldyreff, B., Meggio, F., Pinna, L. A. i Issinger, O.-G.** (1994b) Efficient autophosphorylation and phosphorylation of the β -subunit by casein kinase-2 require the integrity of an acidic cluster 50 residues downstream from the phosphoacceptor site. *J. Biol. Chem.* **269**, 4827-4831.
- Boldyreff, B., Mietens, U. i Issinger, O.-G.** (1996) Structure of protein kinase CK2: dimerization of the human β -subunit. *FEBS Lett.* **379**, 153-156.
- Boldyreff, B. i Issinger, O.-G.** (1997) A-Raf kinase is a new interacting partner of protein kinase CK2 β -subunit. *FEBS Lett.* **403**, 197-199.
- Bosc, D. G., Lüscher, B. i Litchfield, D. W.** (1999) Expression and regulation of protein kinase CK2 during the cell cycle. *Mol. Cell. Biochem.* **191**, 213-222.
- Boulikas, T.** (1996) Nuclear import of protein kinases and cyclins. *J. Cell. Biochem.* **60**, 61-82.
- Bowman, J.** (1994) *Arabidopsis*: an atlas of morphology and development. First Edition. Springer-Verlag New York. USA.
- Bozzetti, M. P., Massari, S., Finelli, P., Meggio, F., Pinna, L. A., Boldyreff, B., Issinger, O.-G., Palumbo, G., Ciriaco, C., Bonaccorsi, S. i Pimpinelli, S.** (1995) The Ste locus, a component of the parasitic cry-Ste system of *Drosophila melanogaster*, encodes a protein that forms crystals in primary spermatocytes and mimics

properties of the β subunit of casein kinase 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6067-6071.

Brown, T (2000) Dot and Slot Blotting of DNA. *In* Current Protocols in Molecular Biology (F.A. Ausbel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith and K. Struhl, eds.) Supplement 21, pp. 2.9.15-2.9.20. John Wiley & Sons, New York.

Carroll, D. i Marshak, D. R. (1989) Serum-stimulated cell growth causes oscillations in casein kinase II activity. *J. Biol. Chem.* **264**, 7345-7348.

Chabouté, M. E., Combettes, B., Clément, B., Chaubet, N. i Gigot, C. (1998) Molecular characterization of tobacco ribonucleotide reductase RNR1 and RNR2 cDNAs and cell cycle-regulated expression in synchronized plant cells. *Plant Mol. Biol.* **38**, 797-806.

Chaillot, D., Declerck, N., Niefind, K., Schomburg, D., Chardot, T. i Meunier, J. C. (2000) Mutation of recombinant catalytic subunit α of the protein kinase CK2 that affects catalytic efficiency and specificity. *Protein Engin.* **13**, 291-298.

Chantalat, L., Leroy, D., Filhol, O., Quitaine, N., Chambaz, E. M., Cochet, C. i Dideberg, O. (1999a) Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the regulatory subunit of human protein kinase CK2. *Acta Cryst. D* **55**, 895-897.

Chantalat, L., Leroy, D., Filhol, O., Nueda, A., Benitez, M. J., Chambaz, E. M., Cochet, C. i Dideberg, O. (1999b) Crystal structure of the human protein kinase CK2 regulatory subunit reveals its zinc finger-mediated dimerization. *Embo J.* **18**, 2930-2940.

Chen, M., Li, D., Krebs, E. G. i Cooper, J. A. (1997) The casein kinase 2 β subunit binds to Mos and inhibits Mos activity. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 1904-1912.

Chen-Wu, J., Padmanabha, R. i Glover, C. (1988) Isolation, sequencing and disruption of the CKA1 gene encoding the alpha subunit of yeast casein kinase II. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 4981-4990.

- Ciceri, P., Gianazza, E., Lazzari, B., Lippoli, G., Ganga, A., Hoschek, G., Schmidt, R. J. i Viotti, A.** (1997) Phosphorylation of Opaque 2 changes diurnally and impacts its DNA binding activity. *Plant Cell* **9**, 97-108.
- Cochet, C., Job, D., Pirollet, F. i Chambaz, E. M.** (1981) Cyclic nucleotide independent casein kinase (G type) in bovine adrenal cortex. Purification and properties of two molecular forms. *Biochem. Biophys. Acta* **658**, 191-201.
- Cochet, C i Chambaz, E. M.** (1983) Oligomeric structure and catalytic activity of G type casein kinase. *J. Biol. Chem.* **258**, 1403-1406.
- Collinge, M. A. i Walker, J. C.** (1994) Isolation of an *Arabidopsis thaliana* casein kinase II β subunit by complementation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Mol. Biol.* **25**, 649-658.
- Combettes, B., Reichheld, J. P., Chabouté, M. E., Philipps, G., Shen, W. H. i Chaubet-Gigot, N.** (1999) Study of phase-specific gene expression in synchronized tobacco cells. *Meth. Cell Sci.* **21**, 109-121.
- De Bondt, H. L., Rosenblatt, J., Jancarik, J., Jones, H. D., Morgan, D. O. i Kim, S. H.** (1993) Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature*, **363**, 595-602.
- Dobrowolska, G., Boldyreff, B. i Issinger, O.-G.** (1991) Cloning and sequencing of the casein kinase 2 α subunit from *Zea Mays*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1129**, 139-140.
- Dobrowolska, G., Meggio, F., Szczegielniak, J., Musynska, G. i Pinna, L. A.** (1992) Purification and characterization of maize seedling casein kinase IIB, a monomeric enzyme immunologically related to the α subunit of animal casein kinase-2. *Eur. J. Biochem.* **204**, 299-303.
- Dobrowolska, G., Lozeman, F. J., Li, D. i Krebs, E. G.** (1999) CK2, a protein kinase of the next millenium. *Mol. Cell. Biochem.* **191**, 3-12.
- Donnelly, P. M., Bonetta, D., Tsukaya, H., Dengler, R. E. i Dengler, N. G.** (1999) Cell cycling and cell enlargement in developing leaves of *Arabidopsis*. *Dev. Biol.* **215**, 407-419.

- Drews, G. N., Bowman, J. L. i Meyerowitz, E. M.** (1991) Negative regulation of the *Arabidopsis* homeotic gene *AGAMOUS* by the *APETALA2* product. *Cell* **65**, 991-1002.
- Espunya, M. C. i Martínez, M. C.** (1997) Identification of two different molecular forms of *Arabidopsis thaliana* casein kinase II. *Plant Sci.* **124**, 131-142.
- Espunya, M. C., Combettes, B., Dot, J., Chaubet-Gigot, N. i Martínez, M. C.** (1999) Cell-cycle modulation of CK2 activity in tobacco BY-2 cells. *Plant J.* **19**, 655-666.
- Evans, P. T. i Malmberg, R. L.** (1989) Do polyamines have roles in plant development? *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**, 235-269.
- Faust, M. i Monternarh, M.** (2000) Subcellular localization of protein kinase CK2: a key to its function?. *Cell Tissue Res.* **301**, 329-340.
- Felsenstein, J.** (1993) PHYLIP (Phylogeny Interference Package) versió 3.5c. Distribuït per l'autor. Departament de Genètica, Universitat de Washington, Seattle, USA.
- Ferreira, P., Hemerly, A., Engler, J., Bergounioux, C., Burssens, S., Van Montagu, M., Engler, G. i Inzé, D.** (1994) Three discrete classes of *Arabidopsis* cyclins are expressed during different intervals of the cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11313-11317.
- Filhol, O., Cochet, C. i Chambaz, E. M.** (1990) Cytoplasmic and nuclear distribution of casein kinase II: characterization of the enzyme uptake by bovine adrenocortical nuclear preparation. *Biochemistry* **29**, 9928-9936.
- Filhol, O., Cochet, C., Wedegaertner, P., Gill, G. N. i Chambaz, E. M.** (1991) Coexpression of both alpha and beta subunits is required for assembly of regulated casein kinase II. *Biochemistry* **30**, 11133-11140.
- Gatica, M., Jedlicki, A., Allende, C. C. i Allende, J. E.** (1994) Activity of the E⁷⁵E⁷⁶ mutant of the α subunit of casein kinase II from *Xenopus laevis*. *FEBS Lett.* **339**, 93-96.
- Gietz, R. D., Graham, K. C. i Litchfield, D. W.** (1995) Interactions between the subunits of casein kinase II. *J. Biol. Chem.* **270**, 13017-13021.

- Girault, A. J., Hemmings, H. C., Zorn, H., Gustafson, E. L. i Greengard, P.** (1990) Characterization in mammalian brain of a DARPP-32 serine kinase identical to casein kinase II. *J. Neurochem.* **55**, 1172-1783.
- Glab, A., Labidi, B., Qin, L. X. Trehin, C., Bergounioux, C. i Meijer, L.** (1994) Olomoucine, an inhibitor of the cdc2/cdk2 kinases activity blocks plant cells at the G1 to S and G2 to M cell cycle transitions. *FEBS Lett.* **353**, 207-211.
- Glotzer, M., Murray, A. W. i Kirschner, M. W.** (1991) Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*, **349**, 132-138.
- Gould, K. L., i Nurse, P.** (1989) Tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2 protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature* **342**, 39-45.
- Grein, S., Raymond, K., Cochet, C., Pyerin, W., Chambaz, E. M. i Filhol, O.** (1999) Searching interaction partners of protein kinase CK2 β subunit by two-hybrid screening. *Mol. Cell. Biochem.* **191**, 105-109.
- Guerra, B. i Issinger, O.-G.** (1999a) Protein kinase CK2 and its role in cellular proliferation, development and pathology. *Electrophoresis* **20**, 391-408.
- Guerra, B. Boldyreff, B., Sarno, S., Cesaro, L., Issinger, O.-G. i Pinna, L. A** (1999b) CK2: a protein kinase in need of control. *Pharmacol. Ther.* **82**, 303-313.
- Hagemann, C., Kalmes, A., Wixler, V., Wixler, L., Schuster, T. i Rapp, U.R.** (1997) The regulatory subunit of protein kinase CK2 is a specific A-Raf activator. *FEBS Lett* **403**, 200-202.
- Hanks, S. K., Quinn, A. M. i Hunter, T.** (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**, 42-52.
- Hanna, D. E., Rethinaswamy, A. i Glover, C. V. C.** (1995) Casein kinase II is required for cell cycle progression during G1 and G2/M in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **270**, 25905-25914.
- Hathaway, G. M. i Traugh, J. A.** (1979) Cyclic nucleotide independent protein kinases from rabbit reticulocytes. Purification of casein kinases. *J. Biol. Chem.* **254**, 762-768.

- Hathaway, G. M. i Traugh, J. A.** (1984) Kinetics of activation of casein kinase 2 by polyamines and reversal of 2,3-bisphosphoglycerate inhibition. *J. Biol. Chem.* **259**, 7011-7015.
- Hasezawa, S. i Nagata, T.** (1992) Okadaic acid as a probe to analyse the cell cycle progression in plant cells. *Bot. Acta* **105**, 63-69.
- Hériché, J.-K., Lebrin, F., Rabilloud, T., Leroy, D., Chambaz, E. M. i Golberg, Y.** (1997) Regulation of protein phosphatase 2A by direct interaction with casein kinase 2 α . *Science* **276**, 954-958.
- Hemerly, A. S., Ferreira, P., Engler, J., Van Montagu, M., Engler, G. i Inzé, D.** (1993) *cdc2a* expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division. *Plant Cell* **5**, 1711-1723.
- Hinrichs, M. V., Gatica, M., Allende, C. C. i Allende, J. E.** (1995) Site-directed mutants of the β subunit of protein kinase CK2 demonstrate the important role of Pro-58. *FEBS Lett.* **368**, 211-214.
- Hu, E., i Rubin, C. S.** (1990) Expression of wild-type and mutated forms of the catalytic (α) subunit of *Caenorhabditis elegans* casein kinase II in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **265**, 20609-20615.
- Ikegami, S., Taguchi, T. i Ohashi, M.** (1978) Aphidicolin prevents mitotic cell division by interfering with the activity of DNA polymerase α . *Nature* **275**, 458-460.
- Ishida, R., Iwai, M., Marsd, K. L., Austin, C. A., Yano, T., Shibata, M., Nozaki, N. i Hara, A.** (1996) Threonine 1342 in human topoisomerase II alpha is phosphorylated throughout the cell cycle. *J. Biol. Chem.* **271**, 30077-30082.
- Issinger, O.-G.** (1993) Casein kinases: pleiotropic mediators of cellular regulation. *Pharmac. Ther.* **59**, 1-30.
- Ito, M.** (1998) Cell cycle-dependent gene expression. In: Francis, D., Dudits, D. and Inzé, D. (eds), Plant cell division, pp 165-186. London: Portland Press Ltd.

- Jakobi, R., i Traugh, J. A.** (1992) Characterization of the phosphotransferase domain of casein kinase II by site-directed mutagenesis and expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **267**, 23894-23902.
- Johnson, L. N., Noble, M. E. M. i Owen, D. J.** (1996) Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* **85**, 149-158.
- Kakinoki, Y., Somers, J. i Brautigan, D. L.** (1997) Multisite phosphorylation and the nuclear localization of phosphatase inhibitor 2-green fluorescent protein fusion protein during S phase of the cell growth cycle. *J. Biol. Chem.* **272**, 32308-32314.
- Kanekatsu, M. i Ohtsuki, K.** (1993) Biochemical characterization of casein kinases (CK-II) from cultured cells of the livewort, *Marchantia polymorpha*. *Plant Cell. Physiol.* **34**, 627-631.
- Kanekatsu, M., Ezumi, A., Nakamura, T. i Ohtsuki, K.** (1995) Chloroplast ribonucleoproteins (RNPs) as phosphate acceptors for casein kinase II: purification by ssDNA-cellulose column chromatography. *Plant Cell Physiol.* **36**, 1649-1656.
- Kanekatsu, M. i Hiroshi, S.** (1997) Phosphorylation of chloroplast ATP synthase by casein kinase II (CK-II) (abstract no. 700). *Plant Physiol.* **114**, S-148.
- Kerk, N. M., Jiang, K. i Feldman, L. J.** (2000) Auxin metabolism in the root apical meristem. *Plant Physiol.* **122**, 925-932.
- Klimczak, L. J., Schindler, U. i Cashmore, A. R.** (1992) DNA binding activity of the Arabidopsis G-box binding factor GBF1 is stimulated by phosphorylation by casein kinase II from broccoli. *Plant Cell* **4**, 87-98.
- Klimczak, L. J. i Cashmore, A. R.** (1994) Microheterogeneous cytosolic high-mobility group proteins from broccoli co-purify with and are phosphorylated by casein kinase II. *Plant Physiol.* **105**, 911-919.
- Klimczak, L. J., Collinge, M. A., Farini, D., Giuliano, G., Walker, J. C. i Cashmore, A. R.** (1995) Reconstitution of arabidopsis casein kinase II from recombinant subunits and phosphorylation of transcription factor GBF1. *Plant Cell* **7**, 105-115.

- Kodama, H., Ito, M., Ohnishi, N., Suzuka, I. i Komamine, A.** (1991) Molecular cloning of the gene for plant proliferating-cell nuclear antigen and expression of this gene during the cell cycle in synchronized cultures of *Catharantus roseus* cells. *Eur. J. Biochem* **197**, 495-503.
- Koenig, M. G., Sturm, D., Prowald, A., Issinger, O.-G. i Montenarh, M.** (1997) Interaction of p53 with protein kinase CK2 during SV40 induced entrance of quiescent cells into the cell cycle. *Int. J. Oncology* **10**, 405-411.
- Krehan A., Lorenz, P., Plana-Coll, M. i Pyerin, W.** (1996) Interaction sites between catalytic and regulatory subunits in human protein kinase CK2 holoenzymes as indicated by chemical cross-linking and immunological investigations. *Biochemistry* **35**, 4966-4975.
- Krehan A. i Pyerin, W.** (1999) Intermolecular contact sites in protein kinase CK2. *Mol. Cell. Biochem.* **191**, 21-28.
- Kusk, M., Bendixen, C., Duno, M., Westergaard, O. i Thomsen, B.** (1995) Genetic dissection of intersubunit contacts within human protein kinase CK2. *J. Mol. Biol.* **253**, 703-711.
- Kusk, M., Ahmed, R., Thomsen, B., Bendixen, C., Issinger, O.-G. i Boldyreff, B.** (1999) Interactions of protein kinase CK2 β subunit within the holoenzyme and with other proteins. *Mol. Cell. Biochem.* **191**, 51-58.
- Lee, Y., Lloyd, A. M. i Roux, S. J.** (1999) Antisense expression of the CK2 α -subunit gene in *Arabidopsis*. Effects on light-regulated gene expression and plant growth. *Plant Physiol.* **119**, 989-1000.
- Leroy, D., Valero, E., Filhol, O., Heriché, J. K., Goldberg, Y., Chambaz, E. M. i Cochet, C.** (1994) Modulation of the molecular organization and activity of casein kinase 2 by naturally occurring polyamines. *Cell. Mol. Biol. Res.* **40**, 441-453.
- Leroy, D., Heriche, J. K., Filhol, O., Chambaz, E. M. i Cochet, C.** (1997) Binding of polyamines to an autonomous domain of the regulatory subunit of protein kinase CK2 induces a conformational change in the holoenzyme. A proposed role for the kinase stimulation. *J. Biol. Chem.* **272**, 20820-20827.

- Leroy, D., Filhol, O., Quintaine, N., Sarrouilhe, D., LoueMackenback, P., Chambaz, E.M. i Cochet, C.** (1999) Dissecting subdomains involved in multiple functions of the CK2 beta subunit. *Mol. Cell. Biochem.* **191**, 43-50.
- Li, D., Dobrowolska, G. i Krebs, E. G.** (1996) The physical association of casein kinase 2 with nucleolin. *J. Biol. Chem.* **271**, 15662-15668.
- Li, D., Meier, U. T., Dobrowolska, G. i Krebs, E. G.** (1997) Specific interaction between casein kinase 2 and the nucleolar protein Nopp140. *J. Biol. Chem.* **272**, 3773-3779.
- Lin, A., Frost, J., Deng, T., Smeal, T., Al-Alawi, N. i Karin, M.** (1992) Casein kinase II is a negative regulator of c-Jun DNA binding and AP-1 activity. *Cell* **70**, 777-789.
- Lin, W. J., Sheu, G. T. i Traugh, L. A** (1994) Effects of autophosphorylation on casein kinase II activity: Evidence from mutations in the β subunit. *Biochemistry* **33**, 6998-7004.
- Liso, B. R., Innocenti, A. M., Bitonti, M. B. i Arrigoni, O.** (1988) Ascorbic acid-induced progression of quiescent centre cells from G1 to S phase. *New Phytol.* **110**, 469-471.
- Litchfield, D. W., Lüscher, B., Lozeman F J., Eisenman, R. N. i Krebs, E. G.** (1992) Phosphorylation of casein kinase 2 by p34^{cdc2} *in vitro* and at mitosis. *J. Biol. Chem.* **267**, 13943-13951.
- Litchfield, D. W. i Luscher, B.** (1993) Casein kinase II in signal transduction and cell cycle regulation. *Mol. Cell. Biochem.* **127-128**, 187-199.
- Litchfield, D. W., Dobrowolska, G. i Krebs, E. G.** (1994) Regulation of casein kinase II by growth factors: a reevaluation. *Cell. Mol. Biol. Res.* **40**, 373-381.
- Litchfield, D. W., Slominski, E., Lewenza, S., Narvey, M., Bosc, D. G. i Gietz, R. D.** (1996) Analysis of interactions between the subunits of protein kinase CK2. *Biochem. Cell. Biol.* **74**, 541-547.
- Lüscher, B. Christenson, E., Litchfield, D. W., Krebs, E. G. i Eiseman, R. N.** (1990) Myb DNA binding inhibited by phosphorylation at a site deleted during oncogenic activation. *Nature* **344**, 517-521.

- Lüscher, B. i Litchfield, D. W.** (1994) Biosynthesis of casein kinase II in lymphoid cells. *Eur. J. Biochem.* **220**, 521-526.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. i Sambrook, J.** (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Marin, O., Meggio, F., Sarno, S. i Pinna, L. A.** (1997) Physical dissection of the structural elements responsible for regulatory properties and intersubunit interactions of protein kinase CK2 β -subunit. *Biochemistry* **36**, 7192-7198.
- Marshak, D. R. i Russo, G. L.** (1994) Regulation of protein kinase CKII during the cell division cycle. *Cell. Mol. Biol. Res.* **40**, 513-517.
- Martínez, M. C., Jorgensen, J.-E., Lawton, M. A., Lamb, C. J. i Doerner, P. W.** (1992) Spatial pattern of *cdc2* expression in relation to meristem activity and cell proliferation during plant development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 7360-7364.
- McKendrick, L., Milne, D. i Meek, D.** (1999) Protein kinase CK2-dependent regulation of p53 function: Evidence that the phosphorylation status of the serine 386 (CK2) site of p53 is constitutive and stable. *Mol. Cell. Biochem.* **191**, 187-199.
- Meggio, F., Perich, J. W., Meyer, H. E., Hoffmann-Posorske, E., Lennon, D. P. W., Johns, R. B. i Pinna, L. A.** (1989) Synthetic fragments of β -casein as model substrates for liver and mammary gland casein kinases. *Eur. J. Biochem.* **186**, 459-464.
- Meggio, F., Boldyreff, B., Marin, O., Pinna, L. A. i Issinger, O.-G.** (1992) Role of the β subunit of casein kinase-2 on the stability and specificity of the recombinant reconstituted holoenzyme. *Eur. J. Biochem.* **204**, 293-297.
- Meggio, F., Boldyreff, B., Issinger, O.-G. i Pinna, L. A.** (1993) The autophosphorylation and p34^{cdc2} sites of casein kinase 2 β subunit are not essential for reconstituting the fully active heterotetrameric holoenzyme. *Biochem. Biophys. Acta.* **1164**, 223-225.
- Meggio, F., Boldyreff, B., Issinger, O.-G. i Pinna, L. A.** (1994) Casein kinase 2 down-regulation and activation by polybasic peptides are mediated by acidic residues in

the 55-64 region of the β -subunit. A study with calmodulin as phosphorylatable substrate. *Biochemistry* **33**, 4336-4342.

Meggio, F., Donella-Deana, A., Ruzzene, M., Brunati, A. M., Cesaro, L., Guerra, B., Meyer, T., Mett, H., Fabbro, D., Furet, P., Dobrowolska, G. i Pinna, L. A. (1995) Different susceptibility of protein kinases to staurosporine inhibition. Kinetic studies and molecular bases for the resistance of protein kinase CK2. *Eur. J. Biochem.* **234**, 317-322.

Meisner, H. i Czech, M. P. (1991) Phosphorylation of transcriptional factors and cell cycle dependent proteins by casein kinase II. *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**, 474-483.

Meyerowitz, E. M. (1997) Genetic control of cell division patterns in developing plants. *Cell* **88**, 299-308.

Mironov, V., De Veylder, L., Van Montagu, M. i Inzé, D. (1999) Cyclin-dependent kinases and cell division in plants- The nexus. *Plant Cell* **11**, 509-521.

Miyata, Y. i Yahara, Y. (1995) Interaction between casein kinase 2 and the 90-kDa stress protein, HSP90. *Biochemistry* **34**, 8123-8129.

Mizoguchi, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Hayashida, N., Kamada, H. i Shinozaki, K. (1993) Cloning and characterization of two cDNAs encoding casein kinase II catalytic subunits in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **21**, 279-289.

Mulner-Lorillon, O., Cormier, P., Labbe J. -C., Doree, M., Poulhe, R., Osborne, H. i Belle, R. (1990) M-phase specific cdc2 protein kinase phosphorylates the beta subunit of casein kinase II and increases casein kinase II activity. *Eur. J. Biochem.* **193**, 529-534.

Murray, A. i Hunt, T. (1993) *The Cell Cycle: an introduction*. Oxford University Press, USA.

Nagata, T., Nemoto, Y. i Hasezawa, S. (1992) Tobacco BY-2 cell line as the HeLa cell in the cell biology of higher plants. *Int. Rev. Cytol.* **132**, 1-30.

Nagata, T. i Kumagai, F. (1999) Plant cell biology through the window of the highly synchronized tobacco BY-2 cell line. *Meth. Cell Sci.* **21**, 123-127.

- Niefind, K., Guerra, B., Pinna, L. A., Issinger, O.-G. i Schomburg, D.** (1998) Crystal structure of the catalytic subunit of protein kinase CK2 from *Zea mays* at 2.1 Å resolution. *Embo J.* **17**, 2451-2462.
- Niefind, K., Pütter, M., Guerra, B., Issinger, O.-G. i Schomburg, D.** (1999) GTP plus water mimic ATP in the active site of protein kinase CK2. *Nature Struct. Biol.* **6**, 1100-1103.
- Ole-Moi Yoi, O. K.** (1995) Casein kinase II in theileriosis. *Science* **267**, 834-836.
- Ospina, B., Núñez, A. i Fernández-Renart, M.** (1992) Purification of a soluble casein kinase II from *Dictyostelium discoideum* lacking the β subunit: regulation during proliferation and differentiation. *Mol. Cell. Biochem.* **118**, 49-60.
- Padmanabha, R. i Glover, C.** (1987) Casein kinase II of yeast contains two distinct α polypeptides and an unusually large β subunit. *J. Biol. Chem.* **262**, 1829-1835.
- Padmanabha, R., Chen-Wu, J. L., Hanna, D. E. i Glover, C. V.** (1990) Isolation, sequencing and disruption of the yeast CKA2 gene: Casein kinase II is essential for viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 4089-4099.
- Pandey, S., Ranade, S. A., Nagar, P. K. i Kumar, N.** (2000) Role of polyamines and ethylene as modulators of plant senescence. *J. Biosci.* **25**, 291-299.
- Pepperkok, R., Lorenz, P., Ansorge, W. i Pyerin, W.** (1994) Casein kinase II is required for transition of G0/G1, early G1, and G1/S phases of the cell cycle. *J. Biol. Chem.* **269**, 6986-6991.
- Peracchia, G., Jensen, A. B., Culiáñez-Macià, F. A., Grosset, J., Goday, A., Issinger, O.-G. i Pagès, M.** (1999) Characterization, subcellular localization and nuclear targeting of casein kinase 2 from *Zea mays*. *Plant Mol. Biol.* **40**, 199-211.
- Pinna, L. A.** (1990) Casein kinase 2: an "eminence grise" in cellular regulation. *Biochim. Biophys. Acta* **104**, 267-284.
- Pinna, L. A. i Meggio, F.** (1997) Protein kinase CK2 ("casein kinase-2") and its implication in cell division and proliferation. *Progr. Cell Cycle Res.* **3**, 77-97.

- Plana, M., Itarte, E., Eritja, R., Goday, A., Pagès, M. i Martínez, M. C.** (1991) Phosphorylation of maize RAB-17 protein by casein kinase 2. *J. Biol. Chem.* **266**, 22510-22514.
- Planchais, S., Glab, A., Trehin, C., Perennes, C., Bureau, J. M., Meijer, L. i Bergounioux, C.** (1997) Roscovitine, a novel cyclin dependent kinase inhibitor characterises restriction point and G2M transition in Tobacco BY2 cell suspension. *Plant J.* **12**, 191-202.
- Qian, X., Gozani, S. N., Yoon, H., Jeon, C. J., Agarwal, K. i Weiss, M. A.** (1993) Novel zinc finger motif in the basal transcriptional machinery: three-dimensional NMR studies of the nucleic acid binding domain of transcriptional elongation factor TFIIS. *Biochemistry* **32**, 9944-9959.
- Raman, C., Kuo, A., Deshane, J., Litchfield, D. W. i Kimberly, R.** (1998) Regulation of casein kinase 2 by direct interaction with cell surface receptor CD5. *J. Biol. Chem.* **273**, 19183-19189.
- Reddy, S. G. McIlheran, S. M. Cochran, B. J., Worth, L. L., Bishop, L. A., Brown, P. J., Knutson, V. P. i Haddox, M. K.** (1996) Multisite phosphorylation of ornithine decarboxylase in transformed macrophages results in increased intracellular enzyme stability and catalytic efficiency. *J. Biol. Chem.* **271**, 24945-24953.
- Reichheld, J. P., Sonobe, S., Clément, B., Chaubet, N. i Gigot, C.** (1995) Cell cycle-regulated gene expression in synchronized plant cells. *Plant J.* **7**, 245-252.
- Reichheld, J. P., Chaubet, N., Shen W. H., Renaudin, J. P. i Gigot, C.** (1996) Multiple A-type cyclins express sequentially during the cell cycle in *Nicotiana tabacum* BY2 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 13819-13824.
- Renaudin, J.-P., Doonan, J. H., Freeman, D., Hashimoto, J., Hirt, H., Inzé, D., Jacobs, T., Kouchi, H., Rouzé, P., Sauter, M., Savouré, A., Sorrell, D. A., Sundaresan, V. i Murray, J. A. H.** (1996) Plant cyclins: A unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organisation. *Plant Mol. Biol.* **32**, 1003-1018.
- Renaudin, J.-P., Savouré, A., Philippe, H., Van Montagu, M., Inzé, D. i Rouzé, P.** (1998) Characterization and classification of plant cyclin sequences related to A- and B-

type cyclins. In Plant Cell Division (Francis, D., Dudits, D. and Inzé, D., eds) London: Portland Press Ltd, pp. 67-98.

- Riera, M., Peracchia, G., de Nadal, E., Ariño, J. i Pagès, M.** (2001) Maize protein kinase CK2: regulation and functionality of three β regulatory subunits. *Plant J.* **25**, 365-374.
- Roach, P. J.** (1991) Multisite and hierarchal protein phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **266**, 14139-14142.
- Rounsley, S. D., Kaul, S., Lin, X., Ketchum, K. A., Crosby, M. L., Brandon, R. C., Sykes, S. M., Mason, T. M., Kerlavage, A. R., Adams, M. D., Somerville, C. R. i Venter, J. C.** (1998) Putative casein kinase II beta-4 chain. Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases. Accession number O80507.
- Roux, S. J.** (1993) Casein kinase-2-type protein kinases in plants: possible targets of polyamine action during growth regulation? *Plant Growth Reg.* **12**, 189-193.
- Russo, G. L., Vandenberg, M. T., Yu, I. J., Bae, Y. S., Franza, B. R. J. i Marshak, D. R.** (1992) Casein kinase II phosphorylates p34^{cdc2} kinase in G1 phase of the HeLa cell division cycle. *J. Biol. Chem.* **267**, 20317-20325.
- Sarno, S., Vaglio, P., Meggio, F., Issinger, O.-G. i Pinna, L. A.** (1996) Protein kinase CK2 mutants defective in substrate recognition. Purification and kinetic analysis. *J. Biol. Chem.* **271**, 10595-10601.
- Sarno, S., Marin, O., Ghisellini, P., Meggio, F. i Pinna, L. A.** (1998) Biochemical evidence that the N-terminal segments of the α subunit and the β subunit play interchangeable roles in the activation of protein kinase CK2. *FEBS Lett.* **441**, 29-33.
- Sarrouilhe, D., Filhol, O., Leroy, D., Bonello, G., Baudry, M., Chambaz, E. M. i Cochet, C.** (1998) The tight association of protein kinase CK2 with plasma membranes is mediated by a specific domain of its regulatory β -subunit. *Biochim. Biophys. Acta* **1403**, 199-210.

- Saxena, A., Padmanabha, R. i Glover, C. V. C.** (1987) Isolation and sequencing of cDNA clones encoding alpha and beta subunits of *Drosophila melanogaster* casein kinase II. *Mol Cell. Biol.* **7**, 3409-3417.
- Schmidt-Spaniol, L., Grimm, B. i Issinger, O.-G.** (1993) Subcellular localization of protein kinase CK-2 α - and β -subunits in synchronized cells from primary human fibroblasts and established cell lines. *Cell. Mol. Biol. Res.* **39**, 761-772.
- Serrano, L., Valencia, A., Caballero, R. i Avila, J.** (1986) Localization of the high-affinity calcium-binding site on tubulin molecule. *J. Biol. Chem.* **261**, 7076-7081.
- Shore, L. J., Peralta-Soler, A. i Gilmour, S. K.** (1997) Ornithine decarboxylase expression leads to translocation and activation of protein kinase CK2 *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **272**, 12536-12543.
- Shugar, D.** (1994) Development of inhibitors of protein kinases CKI and CKII and some related aspects, including donor and acceptor specificities and viral protein kinases. *Cell. Mol. Biol. Res.* **40**, 411-419.
- Slater, M. L.** (1973) Effect of reversible inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis on the yeast cell cycle. *J. Bacteriol.* **113**, 263-270.
- Smyth, D. R., Bowman, J. L. i Meyerowitz, E. M.** (1990) Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2**, 755-767.
- Soni, R., Carmichael, J. P., Shah, Z. H. i Murray, J. A. H.** (1995) A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. *Plant Cell* **7**, 85-103.
- Srinivasan, N., Antonelli, M., Jacob, G., Korn, I., Romero, F., Jedlicki, A., Dhanaraj, V., Sayed, M., Blundell T. L., Allende, C. C. i Allende J. E.** (1999) Structural interpretation of site-directed mutagenesis and specificity of the catalytic subunit of protein kinase CK2 using comparative modelling. *Protein Engin.* **12**, 119-127.
- Stalter, G., Siemer, S., Becht, E., Ziegler, M., Remberger, K. i Issinger, O.-G.** (1994) Asymmetric expression of protein kinase CK2 subunits in human kidney tumors. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **202**, 141-147.

- Steeves, T. A. i Sussex, I. M.** (1989) Patterns in plant development. Second Edition. Cambridge University Press. USA.
- Sugano, S., Andronis, C., Green, R. M., Wang, Z. Y. i Tobin, E. M.** (1998) Protein kinase CK2 interacts with and phosphorylates the *Arabidopsis* circadian clock-associated protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 11020-11025.
- Sugano, S., Andronis, C., Ong, M. S., Green, R. M. i Tobin, E. M.** (1999) The protein kinase CK2 is involved in regulation of circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 12362-12366.
- Tawfic, S. i Ahmed, K.** (1994) Growth stimulus-mediated differential translocation of casein kinase 2 to the nuclear matrix. *J. Biol. Chem.* **269**, 24615-24620.
- Valero, E., De Bonis, S., Filhol, O., Wade, R. H., Langowski, J., Chambaz, E. M. i Cochet, C.** (1995) Quaternary structure of casein kinase 2: characterization of multiple oligomeric states and relation with its catalytic activity. *J. Biol. Chem.* **270**, 8345-8352.
- Vallée, B. L. i Auld, D. S.** (1990) Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry* **29**, 5647-5659.
- Walden, R., Cordeiro, A. i Tiburcio, A. F.** (1997) Polyamines-small molecules triggering pathways in plant-growth and development. *Plant Physiol.* **113**, 1009-1013.
- Wilson, L. K., Dhillon, N., Thorner, J. i Martin, G. S.** (1997) Casein kinase II catalyzes tyrosine phosphorylation of the yeast nucleolar immunophilin Fpr3. *J. Biol. Chem.* **272**, 12961-12967.
- Yan, T. F. i Tao, M.** (1982) Purification and characterization of a wheat germ protein kinase. *J. Biol. Chem.* **257**, 7037-7043.
- Yu, I. J., Spector, D. L., Bae, Y. S. i Marshak, D. R.** (1991) Immunocytochemical localization of casein kinase II during interphase and mitosis. *J. Cell. Biol.* **114**, 1217-1232.
- Zhang, S., Jin, C.-D. i Roux, S. J.** (1993) Casein kinase II-type protein kinase from pea cytoplasm and its inactivation by alkaline phosphatase *in vitro*. *Plant Physiol.* **103**, 955-962.