

UCH-FC
DOC-15
P 981
C. 1

**CARACTERIZACION BIOQUIMICA Y CELULAR DE ISOFORMAS DE LA
PROTEINAQUINASA CK1**

Tesis
entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Doctor en Ciencias con mención en Biología

Facultad de Ciencias



por

VICTOR MANUEL PULGAR AGUILA

Diciembre de 1999

Director de Tesis: Dr. Jorge E. Allende R.

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

VICTOR MANUEL PULGAR AGUILA

ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 2 de Septiembre de 1999.

Director de Tesis:

Dr. Jorge Allende R.

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Octavio Monasterio (Presidente)

Dra. Rosalba Lagos

Dr. Miguel Bronfmann

Dr. Ariel Orellana

Esta Tesis fue realizada en el Programa de Biología Celular y Molecular del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile bajo la dirección del Dr. Jorge Allende R.

A María Angélica, por su amor, lealtad y apoyo incondicional durante el transcurso de toda nuestra historia.

A mis hijos, Camila, Manuel, Benjamín y Joaquín, "los mejores tripulantes de mis sueños".

*“...Con la greda purpurina,
me enseñaste tu a crear
y me diste en tus canciones
todo el valle y todo el mar...”*

G. Mistral

A mis padres Víctor e Isidora.

AGRADECIMIENTOS

Al final de este trabajo deseo expresar mis agradecimientos a todas las personas que hicieron posible que éste llegara a buen término. En primer lugar al Dr. Jorge Allende por darme la oportunidad de trabajar en su grupo y proveer un ambiente en el que siempre existía un desafío. En forma muy especial a la Dra. Catherine Connelly, por ser un gran apoyo e impulso determinante en los momentos importantes, antes y después del doctorado.

A todas las personas que tuve la suerte de conocer en el Laboratorio Allende: Marta Gatica, Claudio Tapia, Vivian Wilhem, Marcelo Antonelli, Mónica Jimenez, Rowena Téllez, Germaine Jacob, Luciana Oliveira, Edio Maldonado, Francisco Romero, Verónica Burzio, Iris Korn, Guy Neckelmann, Julio Tapia, Patricio Rojas y Mónica Flores.

Al Dr. Raúl Aguirre, mi buen amigo, por el apoyo dentro y fuera del laboratorio.

A Monique Forton por incluirme entre sus "niños" y junto con Santiago Leyton ayudarme en la etapa de corrección y compaginación de esta Tesis.

Debo mencionar a la Dra. Eugenia Jedlicki, quien hace algunos años me ayudó a asomarme a una ventana de la ciencia.

Al Dr. Claudio Sunkel por acogerme en su laboratorio de la hermosa "cidade do Porto" y tratar de hacerme sentir como en casa.

A la Dra. Mari Armelin por ayudarme a ampliar mi visión en la ciencia y hacerlo a la vez con cariño, "...¡obrigado Mari!".

Al Dr. Lorenzo Pinna y Dr. Flavio Meggio por recibirme en sus laboratorios en la "bellissima Padova" y colaborar en forma directa en esta importante etapa de mi vida.

Entre ellos y las personas de sus grupos de trabajo encontré buenos amigos.

Debo agradecer el apoyo a este trabajo dado por FONDECYT mediante el otorgamiento de una Beca de Doctorado y la aprobación de los Proyectos 295003 y 4980010.

Finalmente deseo expresar mis agradecimientos a los miembros de la Comisión de Examen que revisó esta Tesis realizando un gran aporte a su forma final.

INDICE DE MATERIAS

	página
INDICE DE ESQUEMAS Y TABLAS.....	x
INDICE DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMEN.....	xvi
SUMMARY.....	xxi
INTRODUCCION	1
1. LA FOSFORILACION DE PROTEINAS.....	1
2. LA PROTEINAQUINASA CK1	5
3. ANTECEDENTES SOBRE LA FUNCION DE CK1	12
3.1 LA PROTEINAQUINASA CK1 DE LEVADURAS	12
3.2 POSIBLES FUNCIONES DE LA PROTEINAQUINASA CK1 DE EUCARIONTES SUPERIORES.....	15
4. LA SELECTIVIDAD DE SUSTRATO DE LA CK1.....	18
4.1 LA ESPECIFICIDAD DEL SITIO FOSFORILABLE DE LA PROTEINAQUINASA CK1.....	19
4.2. LOCALIZACION SUBCELULAR DE CK1.....	23
- APORTE DE LA TESIS EN RELACION CON LA ESPECIFICIDAD DEL SITIO FOSFORILABLE Y LA LOCALIZACION SUBCELULAR DE DIFERENTES ISOFORMAS CK1.....	26
- HIPOTESIS Y OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	26

MATERIALES Y METODOS	28
A. REACTIVOS	28
1. <i>Enzimas y reactivos de biología molecular</i>	28
2. <i>Reactivos y materiales para el cultivo de células</i>	29
3. <i>Péptidos</i>	30
4. <i>Oligonucleótidos</i>	30
B. METODOS	32
1. <i>Clonamiento de XICK1α en el vector pT7-7H6</i>	32
1.1. <i>Obtención del fragmento de DNA que contiene el gen de XICK1α</i>	32
1.2. <i>Ligación del fragmento que contiene el gen de CK1α al vector</i> <i>pT7-7H6</i>	32
1.3. <i>Obtención de células competentes</i>	33
1.4. <i>Transformación</i>	34
1.5. <i>Purificación de DNA de los plasmidios recombinantes</i>	35
2. <i>Generación de formas mutantes de XICK1α</i>	35
3. <i>Clonamiento de CK1α^{WT}, CK1α^{K46A} y CK1δ en los vectores pCEFL</i>	36
4. <i>Secuenciación directa de DNA por la técnica de PCR</i>	37
4.1. <i>Marcación del partidor</i>	37
4.2. <i>Reacción de secuenciación</i>	39
4.3. <i>Electroforesis en geles de poliacrilamida para análisis de secuencia</i> <i>de DNA</i>	39

5.	<i>Expresión en E. coli y purificación de CK1 α de Xenopus laevis</i>	
	<i>recombinante</i>	40
5.1.	<i>Expresión y purificación de GST-CK1</i>	40
5.2.	<i>Expresión en E. coli y purificación de His-CK1</i>	41
6.	<i>Microsecuenciación de proteínas</i>	42
7.	<i>Ensayos de la actividad enzimática de XICK1 α</i>	43
7.1.	<i>Ensayos para detectar serina fosforilada</i>	43
7.2.	<i>Ensayos para detectar fosfotirosina</i>	45
7.3.	<i>Reacción de autofosforilación</i>	46
8.	<i>Tratamiento de GST-CK1 con trombina</i>	46
9.	<i>Análisis de fosfoaminoácidos</i>	47
10.	<i>Digestión química con CNBr</i>	47
11.	<i>Western Blot e inmunoprecipitación</i>	48
12.	<i>Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS</i>	51
13.	<i>Cultivo de células</i>	52
13.1.	<i>Líneas celulares</i>	52
13.2.	<i>Condiciones generales</i>	52
13.3.	<i>Subcultivo de células</i>	53
14.	<i>Transfección de células en cultivo</i>	54
14.1.	<i>Procedimiento de transfección de células usando DEAE-dextrano</i>	54
14.2.	<i>Procedimiento de transfección de células usando Lipofectamina</i>	54
14.3.	<i>Determinación de la eficiencia de transfección</i>	55

15.	<i>Preparación de extractos celulares totales</i>	55
16.	<i>Inmunofluorescencia indirecta en células en cultivo</i>	56
16.1.	<i>Incubación con el primer anticuerpo</i>	57
16.2	<i>Incubación con el segundo anticuerpo</i>	57
16.3	<i>Marcación con ER-Tracker</i>	58
17.	<i>Detección de la fluorescencia de las proteínas transfectadas y adquisición de las imágenes</i>	58
18.	<i>Análisis estadístico</i>	58
RESULTADOS		60
SECCION A. CARACTERIZACION DE CK1α RECOMBINANTE DE <i>X. laevis</i>		60
1.	<i>CK1α de <i>X. laevis</i> expresada y purificada en bacterias: como una proteína de fusión con glutatión S-transferasa (GST-CK1) y como una proteína con 6 residuos histidina adicionales (His-CK1)</i>	60
2.	<i>GST-CK1 se comporta como una Proteínaquinasa CK1</i>	62
3.	<i>Fosforilación de fosfopéptidos por XICK1α</i>	70
4.	<i>GST-CK1 es capaz de fosforilar tirosina en péptidos sintéticos</i>	72
5.	<i>Poli(Glu⁸⁰:Tyr²⁰) como inhibidor y como sustrato alternativo de XICK1α</i>	76
6.	<i>Autofosforilación de XICK1α</i>	79
7.	<i>Generación de formas mutantes de XICK1α</i>	82

SECCION B.	ESTUDIOS DE LA ESPECIFICIDAD DEL SITIO	
	FOSFORILABLE POR CK1.....	84
1.	<i>La secuencia de consenso "clásica" para CK1 versus la secuencia de consenso obtenida de una "librería" de péptidos</i>	<i>84</i>
2.	<i>Análisis de los péptidos derivados de la librería versus los péptidos derivados de Inhibidor-2 con XICK1 α recombinante y CK1 purificada de hígado de rata.....</i>	<i>86</i>
3.	<i>Análisis cinético de la fosforilación de los péptidos</i>	<i>91</i>
4.	<i>Especificidad de sitio de diferentes isoformas de CK1</i>	<i>95</i>
4.1.	<i>Fosforilación de péptidos por CK1 α, CK1 δ y CK1 γ.....</i>	<i>95</i>
4.2.	<i>Fosforilación de fosfopéptidos por CK1 α, CK1 δ y CK1 γ.....</i>	<i>97</i>
4.3.	<i>Fosforilación de sustratos proteicos por CK1 α, CK1 δ y CK1 γ.....</i>	<i>100</i>
SECCION C.	ESTUDIOS DE LA EXPRESION <i>in vivo</i> DE CK1	103
1.	<i>Sobreexpresión de isoformas CK1 en células cos-7.....</i>	<i>103</i>
2.	<i>Localización subcelular de isoformas de CK1 en células cos-7.....</i>	<i>111</i>
2.1.	<i>Controles y marcadores de localización subcelular.....</i>	<i>121</i>
3.	<i>Relación entre el estado de proliferación celular, la actividad total CK1 y la localización subcelular de isoformas CK1.....</i>	<i>130</i>
	DISCUSION	137
	CONCLUSIONES	159
	BIBLIOGRAFIA.....	163

INDICE DE ESQUEMAS Y TABLAS

ESQUEMA 1.	<i>Alineamiento de secuencias aminoacídicas de representantes de la familia de proteínquinasas CK1 y otras proteínquinasas.....</i>	3
ESQUEMA 2.	<i>Estructura de miembros de la familia de proteínquinasas CK1.....</i>	10
ESQUEMA 3.	<i>Estructura tridimensional de CK1.....</i>	11
ESQUEMA 4.	<i>Especificidad de los anticuerpos antiisoformas de CK1....</i>	50
ESQUEMA 5.	<i>Interacción de proteínquinasas con péptidos sustratos....</i>	153
TABLA 1.	<i>Valores de K_m aparente para diferentes sustratos de CK1α.....</i>	66
TABLA 2.	<i>Fosforilación de péptidos por XICK1α y ratCK1.....</i>	88
TABLA 3.	<i>Constantes cinéticas de diversos sustratos peptídicos para XICK1α.....</i>	93
TABLA 4.	<i>Constantes cinéticas de diversos sustratos peptídicos para ratCK1α.....</i>	94
TABLA 5.	<i>Fosforilación de los péptidos derivados de Ser¹⁷⁴ de Inhibidor-2 y los péptidos derivados de la "librería" por diferentes isoformas de CK1.....</i>	96

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	<i>Expresión en E.coli y purificación de XICK1 α</i>	63
Figura 2.	<i>Efecto de la liberación de XICK1 α desde la proteína de fusión</i>	64
Figura 3.	<i>Propiedades de GT-CK1 e His-CK1</i>	67
Figura 4.	<i>Efecto de GST sobre la actividad de GST-CK1</i>	69
Figura 5.	<i>Fosforilación de fosfopéptidos por XICK1 α</i>	71
Figura 6.	<i>Efecto de diferentes polipéptidos ácidos sobre la actividad de XICK1 α</i>	73
Figura 7.	<i>Inhibición competitiva de GST-CK1 por poli(Glu⁸⁰:Tyr²⁰)</i>	75
Figura 8.	<i>Fosforilación de péptidos sintéticos que contienen tirosina por XICK1 α</i>	77
Figura 9.	<i>Autofosforilación de XICK1 α</i>	81
Figura 10.	<i>Secuencias de consenso descritas para la familia de proteinaquinasas CK1</i>	85
Figura 11.	<i>Fosforilación de diferentes péptidos por CK1</i>	90
Figura 12.	<i>Efecto de la sustitución de Asp \rightarrow Ala en la posición n-3 del péptido sustrato sobre la actividad de CK1 α, CK1 δ y CK1 γ</i>	98
Figura 13.	<i>Fosforilación de fosfopéptidos por CK1 α, CK1 δ y CK1 γ</i>	99
Figura 14.	<i>Fosforilación de sustratos proteicos por CK1 α, CK1 δ y CK1 γ</i>	101
Figura 15.	<i>Clonamiento de XICK1 α y CK1 δ humana en los vectores de expresión eucarióticos pCEFL</i>	105

Figura 16.	<i>Expresión de isoformas CK1 en células en cultivo.....</i>	106
Figura 17.	<i>Actividad CK1 en células en cultivo que expresan XICK1α y CK1δ.....</i>	109
Figura 18.	<i>Marcación metabólica con ^{32}P de células en cultivo transfectadas con isoformas de CK1.....</i>	112
Figura 19.	<i>Isoformas de CK1 presentes en células cos-7.....</i>	114
Figura 20.	<i>Distribución subcelular de isoformas CK1 endógenas en células en cultivo.....</i>	116
Figura 21.	<i>Localización subcelular de las isoformas CK1α^{WT}, CK1α^{K46A} y CK1δ en células cos-7.....</i>	120
Figura 22.	<i>Localización subcelular de la isoforma CK1α y CK1δ transfectadas en células cos-7.....</i>	122
Figura 23.	<i>Controles de los anticuerpos antiCK1α, antiCK1δ y antiHA.....</i>	125
Figura 24.	<i>Marcadores de localización subcelular en células cos-7.....</i>	128
Figura 25.	<i>Efecto de la estimulación con suero sobre la actividad total CK1 en células en cultivo.....</i>	131
Figura 26.	<i>Localización subcelular de CK1α y CK1δ en células en distintos estados de proliferación.....</i>	133

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP	adenosina 5' monofosfato
ATP	adenosina 5' trifosfato
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato
GSK3	glucógeno sintetasa quinasa-3
cAMP	adenosina 3'-5' monofosfato cíclico
Cdk	quinasa dependiente de ciclinas
Ci	curie
cpm	cuentas por minuto
dATP	2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	2'-desoxicitidina 5'-trifosfato
dGTP	2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato
dTTP	2'-desoxitimidina 5'-trifosfato
ddATP	2', 3'-didesoxiadenosina 5'-trifosfato
ddCTP	2', 3'-didesoxicitidina 5'-trifosfato
ddGTP	2', 3'-didesoxiguanosina 5'-trifosfato
ddTTP	2', 3'-didesoxitimidina 5'-trifosfato
DEAE	dietilamino etil
DNA	ácido desoxiribonucleico
DTT	ditiotreitól
<i>I</i> ₅₀	concentración de inhibidor que corresponde al 50% de la actividad

IPTG	isopropil- β -D-tiogalactosido
kDa	kiloDalton
mA	miliamper
MAPK	quinasa activada por estímulos mitogénicos
NBT	azul de nitrotetrazolio
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	fenilmetilsulfonil fluoruro
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecilsulfato de sodio
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N, N, N', N', tetrametiletildiamina
Tris	tris-(hidroximetil)-aminoetano
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosido

Se usará la nomenclatura de una letra al escribir las secuencias y la de tres letras al nombrar los aminoácidos:

A	Ala	alanina
C	Cys	cisteína
D	Asp	ácido aspártico
E	Glu	ácido glutámico
F	Phe	fenilalanina
G	Gly	glicina

H	His	histidina
I	Ile	isoleucina
K	Lys	lisina
L	Leu	leucina
M	Met	metionina
N	Asn	asparragina
P	Pro	prolina
Q	Gln	glutamina
R	Arg	arginina
S	Ser	serina
T	Thr	treonina
V	Val	valina
W	Trp	triptófano
Y	Tyr	tirosina
X	simboliza cualquier aminoácido	
X _p	aminoácido fosforilado	

RESUMEN

La proteínaquinasa CK1 (caseína quinasa-1) es una enzima monómerica cuya actividad se ha encontrado ampliamente distribuída en tejidos y células eucarióticas. Es una quinasa con especificidad por residuos de serina y treonina inmersos en ambientes acídicos ó precedidos por residuos previamente fosforilados. En eucariontes superiores se ha descrito el clonamiento de varias isoformas de quinasas "tipo" CK1 que permite definir a CK1 como una familia de isoformas que a la fecha consta de siete miembros (α , β , γ_1 , γ_2 , γ_3 , δ y ϵ). Existen evidencias basadas en la complementación de mutaciones en levaduras que indican que algunas de estas isoformas estarían involucradas en fenómenos de regulación del ciclo celular y reparación de DNA. Sin embargo el papel específico de cada isoforma CK1, sus propiedades y los componentes celulares que controlarían su expresión y actividad son aún desconocidos. La distribución y abundancia relativa de las isoformas en diferentes tipos celulares o tejidos tampoco han sido aclaradas.

En este trabajo se realizó la caracterización bioquímica de la isoforma α de la CK1 de *Xenopus laevis* producida en forma recombinante en *E. coli* como una proteína de fusión con glutatión S-transferasa (GST-CK1) y como una proteína con 6 residuos de histidina adicionales (His-CK1). Ambas formas expresadas de esta enzima recombinante poseen propiedades similares a las descritas para la enzima nativa (que aún en preparaciones altamente purificadas corresponde a mezclas de varias isoformas), con valores de K_m aparente para ATP, caseína y el péptido sustrato

RRKDLHDDEEDEAMSITA. similares a los reportados para CK1 aislada desde diferentes tejidos animales. Se determinó el efecto de un inhibidor específico de esta familia de quinasas sobre la actividad de His-CK1 y GST-CK1 observándose un valor de I_{50} de 50 μ M, uno de los más bajos determinados para algún miembro de esta familia de enzimas. Entre las propiedades estudiadas destaca la capacidad de esta enzima de fosforilar residuos de tirosina inmersos en ambientes ácidos, se determinó esta propiedad con el uso del copolímero al azar sintético poli(Glu⁸⁰:Tyr²⁰) y de los péptidos **RRREEEYEEEE** y **EEEEYFVFGRRK** observándose que sólo poli(Glu⁸⁰:Tyr²⁰) y el péptido **RRREEEYEEEE** son capaces de actuar como sustratos. Esta propiedad ha sido descrita para la enzima CK1 α de *X. laevis* (durante esta tesis) y en forma simultánea para algunas de las isoformas CK1 de levaduras. Dada la gran relevancia de la fosforilación en residuos de tirosina en las vías de transducción de señales y la participación de fosfotirosina en interacciones proteína-proteína, estas propiedades determinadas para la enzima CK1 α de *X. laevis*, aunque de menor grado que la fosforilación de serinas ó treoninas, revisten gran importancia en el análisis de la(s) probable(s) función(es) de estas enzimas. Se demostró además, la capacidad de esta enzima de autofosforilarse en varios sitios presentes en al menos tres polipéptidos identificados por proteólisis en la secuencia primaria de CK1 α .

Se debe mencionar que las diversas isoformas de CK1 han sido aisladas y clasificadas en base a estudios de clonamiento de las diferentes especies presentes en diversas genotecas, en base a secuencias conservadas y presentes en la isoforma CK1 α , la primera isoforma de la familia clonada. Al disponer de una isoforma CK1 en

particular (CK1 α) clonada en nuestro laboratorio y producida en forma recombinante, nos interesó realizar un estudio comparativo de la especificidad de sustrato *in vitro* de esta familia de quinasas. En la gran mayoría de los estudios previos se han usado preparaciones de enzima CK1 nativa obtenida desde tejidos animales. En el curso de esta tesis se usó una preparación de CK1 altamente purificada de hígado de rata y se demostró que esta preparación contiene varias isoformas de esta familia de enzimas. Con el uso de anticuerpos específicos generados contra determinadas isoformas se demostró que la preparación de hígado contenía las isoformas CK1 α , CK1 δ y CK1 γ . Estas isoformas inmunoprecipitadas fueron también usadas en los estudios de especificidad de sustrato.

Durante el transcurso de esta tesis otros autores describieron mediante el uso de una "librería" de péptidos (técnicamente equivalente a una genoteca de DNA), la determinación de las secuencias supuestamente óptimas de fosforilación para CK1 δ y CK1 γ . Los resultados de este estudio fueron sorprendentes debido a que estas secuencias no correspondían a las determinadas previamente usando preparaciones de enzima nativa. Una explicación posible de esta discrepancia era que las diferentes isoformas CK1 presentaran drásticas diferencias en la especificidad del sitio fosforilable. Un importante aporte de esta tesis fue el análisis comparativo de la especificidad de fosforilación entre la CK1 α recombinante y una preparación de enzima nativa purificada desde hígado de rata. El análisis detallado de los requerimientos de secuencia primaria para una óptima fosforilación por CK1 en diversos sustratos peptídicos acídicos, incluidas las secuencias seleccionadas por la "librería", permitió determinar el estricto

requerimiento de un grupo de residuos ácidos (aspártico ó glutámico) entre las posiciones *n-3* hasta *n-6* N-terminales al residuo fosforilable. Se analizó además el aporte de cada uno de estos residuos ácidos a la eficiencia de fosforilación del sustrato peptídico. Con estos resultados se concluyó que las diferentes isoformas CK1 analizadas poseen una especificidad del sitio fosforilable similar, aunque no idéntica, contribuyendo a la solución de la controversia planteada en la literatura con respecto a la especificidad del sitio fosforilable de la familia de quinasas CK1.

El hecho que no existan grandes diferencias en la especificidad del sitio fosforilable por parte de las isoformas CK1 analizadas indica que, puestas en el contexto celular adecuado, todas las CK1 son capaces de fosforilar los mismos sustratos. La accesibilidad al sustrato, con seguridad, determinará la fosforilación por CK1 por lo que nos interesó obtener evidencias sobre la localización subcelular de las diferentes isoformas CK1 en células en cultivo. Mediante experimentos de inmunofluorescencia indirecta, con el uso de los anticuerpos específicos de isoformas CK1 se obtuvieron evidencias que indican que las isoformas CK1 α , CK1 δ y CK1 γ poseen una distribución celular diferente en células *cos-7*. CK1 α y CK1 γ se encuentran presentes en el citoplasma mientras que CK1 δ posee una mayor presencia en el núcleo. La transfección transiente de proteínas etiquetadas con epitopos permitió analizar la distribución intracelular de las isoformas CK1 α y CK1 δ . Usando marcadores apropiados se determinó que CK1 α es una proteína mayoritariamente citoplasmática, mientras que CK1 δ se observa en citoplasma y núcleo. Por otro lado, en fibroblastos de ratón en cultivo se determinó que la distribución subcelular de CK1 δ se ve afectada por las

condiciones de crecimiento celular. La localización nuclear de esta isoforma se observa predominantemente en células en activa proliferación, lo que señalaría un papel para esta isoforma en fenómenos nucleares.

En este trabajo se realizó por primera vez, un análisis comparativo de dos aspectos que resultan determinantes de la función de la familia de proteínquinasas CK1 como son la especificidad del sitio fosforilable y la distribución subcelular de las diferentes isoformas. Las evidencias obtenidas indican que las diferentes isoformas CK1 poseen una especificidad del sitio fosforilable similar, lo que sugiere que en general, en ausencia de regulación, éstas podrían fosforilar los mismos sustratos. Se debe tener en cuenta que la eficiencia de la fosforilación de estos sustratos podría ser diferente entre estas quinasas. El hecho que las isoformas CK1 posean una localización subcelular relativamente diferente indica que la accesibilidad al sustrato sería diferente para estas enzimas, señalando un importante punto que determinará la función de esta familia de proteínquinasas.

SUMMARY

Protein kinase CK1 (casein kinase-1) is a monomeric enzyme whose activity has been found widely distributed in tissues and eucaryotic cells. CK1 is a kinase with specificity for serine and threonine residues immersed in an acidic environment or preceded by previously phosphorylated residues. In higher eucaryotes, the cloning of several CK1-like forms has led to the recognition of CK1 as a family containing seven isoforms (α , β , γ_1 , γ_2 , γ_3 , δ y ϵ). Recent evidence based in the complementation of mutations in yeast, indicates that some CK1 isoforms are involved in the regulation of cell cycle and DNA repair. However the specific role and properties of each isoform, and the cellular components that regulate its expression and activity are as yet unknown. The distribution and relative abundance of the isoforms in different cell types also remains to be defined.

In this work the characterization of the α isoform of CK1 from *Xenopus laevis* produced in *E. coli* as a recombinant enzyme fused to glutathione S-transferase (GST-CK1) or as an histidine tagged enzyme (His-CK1) was undertaken. Both expressed forms of this recombinant enzyme display properties similar to the native enzyme with apparent K_m values for ATP, β -casein and the substrate peptide **RRKDLHDDEEDEAMSITA**, as compared to the reported values for CK1 isolated from different animal tissues. The effect of CK1-7, an specific inhibitor for this family of kinases, was determined obtaining an I_{50} value of 50 μ M, one of the lowest reported for members of this protein kinase family. An remarkable property determined with the

use of the random copolymer poly(Glu⁸⁰:Tyr²⁰) and the peptides **RRREEEYEEEE** y **EEEEYFVFGRRK** was the ability of CK1 to phosphorylate tyrosine residues immersed in specific acidic environments. Indeed poly(Glu⁸⁰:Tyr²⁰) and the peptide **RRREEEYEEEE** behaved as substrates. This property has been described for the enzyme CK1 α from *X. laevis* (this work) and simultaneously for some yeast isoforms of CK1. Because of the important role played by phosphorylated tyrosine residues in signal transduction and in protein-protein interactions, this determined capacity of CK1 to phosphorylate tyrosines (although with less efficiency than serine or threonine) may be of relevance in relation to as yet unclear functions of this family of enzymes. Also the ability of this enzyme to autophosphorylate in several sites was demonstrated, since at least three distinct polypeptides were obtained by proteolysis of the autophosphorylated species.

It is pertinent to note that the diverse isoforms described for CK1 have been identified in recent years by cloning experiments in which cDNA libraries from different species were searched for conserved sequences presents in CK1 α , the first member to be cloned. With the availability of a single CK1 isoform (CK1 α) cloned in our laboratory and produced in recombinant form we were interested in making a comparative study of the *in vitro* substrate specificity of this family of kinases. Most of the previous studies on substrate specificity of CK1 have been carried out with native enzyme purified from animal tissues. During the work described in this thesis a highly purified preparation of CK1 from rat liver was used for this study of substrate specificity and by this analysis was shown to contain several isoforms from this family. Specific antisera raised against

specific CK1 isoforms indicate that the liver preparation contained the CK1 α , CK1 δ and CK1 γ isoforms. These immunoprecipitated isoforms were used also in the substrate specificity studies.

Also during the course of this thesis another research group, using a method involving peptide libraries (a technique similar to cloning from a gene library), described optimal sequences for phosphorylation by CK1 δ and CK1 γ . The sequences reported by this selection technique contained specificity determinants surprisingly different from those previously found for this enzyme, with a reduced number and altered location of acidic groups surrounding the phosphorylatable serine (Lib δ : **MAEFDTGSIIIFFAKKK** γ Lib γ : **MAYYDAASIIIFFAKKK**). An plausible explanation was that different isoforms of CK1 displayed different site specificity. An important contribution of this thesis was a re-examination and the comparison of site specificity between recombinant CK1 α , and the preparation of native CK1 purified from rat liver. With the detailed analysis of primary sequence requirements for optimal CK1 phosphorylation using many peptide substrates that included the sequences reported by the library, the strict requirement of a group of acidic residues (aspartic or glutamic) was determined for positions $n-3$ to $n-6$ N-terminals to phosphorylatable residue, the peptide **IGDDDDAYSIIIFFA** being a very good substrate. Also studied was the contribution of each acidic residue in this group towards the efficiency of phosphorylation of the peptide substrate. One of the main conclusions of this part of the work was that the CK1 isoforms analyzed possess similar, but not identical, phosphorylatable site specificity.

With this analysis we also contributed to resolve the controversial information present in literature dealing with phosphorylatable site specificity of protein kinase CK1 family.

As we demonstrated, no great differences seems to exist in the phosphorylatable site specificity between the CK1 isoforms analyzed, making possible that, in the appropriate cellular context, all members of this family of kinases phosphorylate the same substrates. In this respect, the substrate accesibility would then be critically important in the determination of CK1 phosphorylation and we were prompted therefore to analyze the subcellular localization of differents isoforms in culture cells. With indirect immunofluorescence experiments using isoform-specific antisera evidence was obtained related to the different subcellular localization of CK1 α , CK1 δ and CK1 γ isoforms in *cos-7* cells. CK1 α and CK1 γ are present in cytoplasm while CK1 δ clearly shows a higher presence in nucleus. The intracellular distribution of CK1 α and CK1 δ isoforms was also analyzed by transient transfection of *cos-7* cells with epitope-tagged CK1 proteins. It was seen that over-expressed CK1 α is a mostly cytoplasmatic protein while CK1 δ is present in cytoplasm and nucleus. Moreover in mouse fibroblasts it was determined that the subcellular distribution of CK1 δ is affected by growth conditions. Nuclear localization of this enzyme is observed predominantly in cells in active proliferation, showing a possible role of this isoform in nuclear phenomena.

Therefore, this thesis presents a comparative analysis of two determinant aspects of the function of the protein kinase CK1 family: the phosphorylatable site specificity and the subcellular distribution of different isoforms. The evidence obtained indicates that different CK1 isoforms possess similar site specificity suggesting, in absence of

additional regulatory events, these isoforms are capable of phosphorylating similar substrates. The apparent different subcellular localization of certain of these enzyme forms could therefore determine different substrate accessibility, pointing out an important aspect for the determination of the function of this emerging protein kinase family.

INTRODUCCION

1. LA FOSFORILACION DE PROTEINAS.

La fosforilación es la modificación postraduccionaI más importante que emplean las células para regular la actividad biológica de sus proteínas. Esta modificación es realizada por las enzimas llamadas proteínasquinasas. Entre los diversos mecanismos de regulación en que participan las proteínasquinasas se encuentran, entre otros, la transducción de señales inducidas por agentes mitogénicos, la transformación oncogénica y el control de la expresión génica, todos ellos íntimamente relacionados con diferenciación y otros procesos fundamentales. La importancia de la fosforilación de proteínas en estos procesos ha impulsado el interés en la identificación y caracterización de las quinasas responsables de la regulación de la proliferación y diferenciación celular.

Las proteínasquinasas conforman la mayor familia de proteínas identificada a la fecha y consta de más de 400 miembros (Hanks y Quinn, 1991; Hanks y Hunter, 1995). Según el residuo aminoacídico modificado en la reacción de fosforilación, las proteínasquinasas se dividen en serina/treonina quinasas, tirosina quinasas y enzimas que fosforilan ambos tipos de residuos (serina/treonina y tirosina), las quinasas de especificidad dual. Las serinas/treonina quinasas corresponden al mayor grupo de quinasas identificadas y muchas de ellas se han relacionado con la transducción de las señales que suceden a los estímulos mitogénicos, conformando cascadas de fosforilación que transducen estas señales al interior de la célula. La fosforilación en residuos de tirosina se observa en un número menor de proteínas que la fosforilación en serinas ó treoninas y se relaciona directamente con estímulos mitogénicos ya que la gran mayoría

de estas quinasas se encuentran en el dominio citosólico de los receptores para factores de crecimiento. Las quinasas de especificidad dual corresponden a un reducido grupo dentro de esta familia y se relacionan con importantes puntos de regulación dentro de las cascadas de fosforilación que regulan el ciclo celular. Se debe mencionar la existencia de un grupo de proteínquinasas llamadas histidina quinasas, que catalizan la transferencia de grupos fosforilo sobre residuos de ácido aspártico (derivan su nombre de una autofosforilación en histidina durante una etapa intermedia de la catálisis), estas quinasas están involucradas en sistemas regulatorios de bacterias (Hanks y Hunter, 1995).

Las serina/treonina quinasas se han agrupado en subfamilias, varias de ellas según el tipo de segundo mensajero que las regula, por ejemplo las quinasas dependientes de nucleótidos cíclicos, dependientes de calcio y fosfolípidos, dependientes de calcio y calmodulina. Dentro de las serina/treonina quinasas existen algunas que no presentan este tipo de regulación y a este grupo de quinasas independientes de segundos mensajeros pertenecen las proteínquinasas CK1 y CK2.

Las proteínquinasas CK1 y CK2 (previamente llamadas caseínquinasas CKI y CKII) presentan como característica común la capacidad de fosforilar residuos rodeados de aminoácidos ácidos (Tuazon y Traugh, 1991; Issinger, 1993). Derivan su nombre del uso tradicional de caseína como sustrato para ensayos *in vitro* y del orden de elución en una columna de DEAE-celulosa.

Sobre la base de la estructura primaria de los dominios catalíticos de las proteínquinasas identificadas, éstas se han ordenado en diferentes grupos dentro de un árbol filogenético (Hanks y Quinn, 1991; Hanks y Hunter, 1995). Se ha observado que

<i>X1CK1α</i>	MASSSGSKAEFIVGGKYKLV	20
<i>bCK1α</i>	MASSSGSKAEFIVGGKYKLV	20
<i>rCK1αL</i>	MASSSGSKAEFIVGGKYKLV	20
<i>gCK1αL</i>	MASSSGSKAEFIVGGKYKLV	20
<i>hCK1δ</i>	MELRVGNRYRLG	12
<i>HRR25</i>	MDLRVGRKFRIG	12
<i>rCK1γ1</i>	MDHSNREKDDRRQRTTKTMAQRNTHCSRPSGTSTSSGVLVMPGNFRVG	47
<i>YCK1</i>	MSMPIASTTLAVNNLTNINGNANENVQANKQLHHQAVDSPAASSMTATTAANSNSNSSRRDDSTIVGLHYKIG	72
<i>PKA</i>	MGNAAAAGKQSESVKEFLAKAKEDFLKKWETPSQNTAQLDQDFDRIK	48
<i>CK2α</i>	MSGPVPSPRARVYTDVNTHRPRDYWDYESHVVEWGNQDDYQLV	42
<i>Cdk2</i>	MENFQKV	7

	I	II	III	IV	
<i>X1CK1α</i>	RKIGSGSFGDIYLAINITNGEEVAVKLESQ--KARHPQLLYESKLYKILQGGV-GIPHIRWYGQEKDYNV-L				88
<i>bCK1α</i>	RKIGSGSFGDIYLAINITNGEEVAVKLESQ--KARHPQLLYESKLYKILQGGV-GIPHIRWYGQEKDYNV-L				88
<i>rCK1αL</i>	RKIGSGSFGDIYLAINITNGEEVAVKLESQ--KARHPQLLYESKLYKILQGGV-GIPHIRWYGQEKDYNV-L				88
<i>gCK1αL</i>	RKIGSGSFGDIYLAINITNGEEVAVKLESQ--KARHPQLLYESKLYKILQGGV-GIPHIRWYGQEKDYNV-L				88
<i>hCK1δ</i>	RKIGSGSFGDIYLGTDIAAGEEVAIKLECV--KTKHPQLHIESKLYKIMMGGV-GIPTIRWCGAEGDYNV-M				80
<i>HRR25</i>	RKIGSGSFGDIYHGTNLSGEEVAIKLESI--RSRHPQLDYESRVYRYSLGGV-GIPFIRWFGREGEYNA-M				80
<i>rCK1γ1</i>	KKIGCGNFGEIIRLGNLYTNEYVAIKLEPI--KSRAPQLHLEYRKYQLGSAGEGLPQVYVYFGPCGKYNA-M				116
<i>YCK1</i>	KKIGEGSEFVLFEGTNMINGVPAIKFEPR--KTEAPQLRDEYKTYKILNGTP-NIPYAYYFGQEGHLNI-L				140
<i>PKA</i>	.TLTGTGSFGRVMLVKHKEGSGNHYAMKILDKQKVVKLQIEHTLNEKRILQAVNFPFLVKLEFSFKDNSNLYM				120
<i>CK2α</i>	RKLGRGKYSEVFEAINITNNEKVVVKILKPVKKKKIKREIKILENLRGGPNIITLADIVKDPVSRTPALVFE				114
<i>Cdk2</i>	EKIGEGTYGVVYKARNKLTGEVVALKKIRLDTETEGVPSTAIRESLLKELNHPNIVKLLDVIHTENKLY-L				78

	V	VIa	VIb	
<i>X1CK1α</i>	VMDLL-GPSLEDLNFCS--RRFTMKTVMMLADQMISRIEYVHTKNFIHRDIKPDNFMGI--GRHCNK----			152
<i>bCK1α</i>	VMDLL-GPSLEDLNFCS--RRFTMKTVMMLADQMISRIEYVHTKNFIHRDIKPDNFMGI--GRHCNK----			152
<i>rCK1αL</i>	VMDLL-GPSLEDLNFCS--RRFTMKTVMMLADQMISRIEYVHTKNFIHRDIKPDNFMGI--GRHCNKCL			156
<i>gCK1αL</i>	VMDLL-GPSLEDLNFCS--RRFTMKTVMMLADQMISRIEYVHTKNFIHRDIKPDNFMGI--GRHCNKCL			156
<i>hCK1δ</i>	VMEEL-GPSLEDLNFCS--RKFSLKTVLLLADQMISRIEYIHSKNFIHRDVKPDNFMGL--GKKGNL----			144
<i>HRR25</i>	VIDL-GPSLEDLNFYCH--RRFSEKTVIMLALQMFECRIQYIHGRSFIHRDIKPDNFMGV--GRRGST----			144
<i>rCK1γ1</i>	VLELL-GPSLEDLFDLDCD--RTFTLKTVMIAIQLLSRMEYVHSKNLIYRDVKNPENFLIGRQGNKKEHV----			182
<i>YCK1</i>	VIDL-GPSLEDLFDWCG--RKFSVKTVVQVAVQMIFLIEDLHAHDLIYRDIKPDNFIIGREGQPDANN----			206
<i>PKA</i>	VMEYVAGGEMFSLRRIG--RFSEPHARFYAAQIVLTFEYLHSLDLIYRDLKPENLLIDQ-----QGY----			183
<i>CK2α</i>	HVNTDFKQLYQTLTDYDIRFMYEILKA-----LDYCHSMGIMHRDVKPHNVMIDHEHRKL-----			172
<i>Cdk2</i>	VFEFLH-QDLKKEMDASALTGIPLPLIKSYLFQLLQGLAFCHSHRVLHRDLKPNLLINT-----EGA----			140

ESQUEMA 1: *Alineamiento de secuencias aminoacídicas de representantes de la familia de proteínas CK1 y otras proteínas.*

Se muestra el alineamiento entre las secuencias de las isoformas de CK1 *X1CK1α*, *CK1α* de *X. laevis*; *bCK1α*, *CK1α* de bovino; *rCK1αL*, *CK1αL* de rata; *gCK1αL*, *CK1αL* de pollo; *hCK1δ*, *CK1δ* humana; *HRR25*, isoforma de CK1 de *S. cerevisiae*; *rCK1γ1*, *CK1γ1* de rata; *YCK1*, isoforma de CK1 de *S. cerevisiae*; *PKA*, proteínas dependiente de cAMP (Knighton y col., 1991); *CK2α*, subunidad catalítica de la proteínas CK2 (Jedlicki y col., 1992); *Cdk2*, proteínas dependiente de ciclinas 2 (De Bondt y col., 1993). Se indica en números romanos las 12 regiones conservadas en todas las proteínas analizadas según Hanks y Hunter (1995). Se destacan en negro las regiones totalmente conservadas en la familia CK1 y que distinguen a esta familia de otras proteínas según Graves y col., (1993).

	VII	VIII	
<i>X1CK1a</i>	-----LFLIDFGLAKKYRDNRTROHIPPYREDKNLTGTARYASINAHLGIEQSR		200
<i>bCK1a</i>	-----LFLIDFGLAKKYRDNRTROHIPPYREDKNLTGTARYASINAHLGIEQSR		200
<i>rCK1L</i>	PVGKRRSMTVSPSQDPSFSGLNQLFLIDFGLAKKYRDNRTROHIPPYREDKNLTGTARYASINAHLGIEQSR		228
<i>gCK1aL</i>	PVGKRRSMTVSTSQDPSFSGLNQLFLIDFGLAKKYRDNRTROHIPPYREDKNLTGTARYASINAHLGIEQSR		228
<i>hCK1δ</i>	-----VYIIDFGLAKKYRDARTHQHIPYRENKNLTGTARYASINAHLGIEQSR		188
<i>HRR25</i>	-----VHVIDFGLSKKYRDFNTHRHIPPYRENKSLTGTARYASVNTHLGIEQSR		188
<i>rCK1y1</i>	-----IHII DFGLAKEYIDPETKKHIPYREHKSLTGTARYMSINTHLGKEQSR		230
<i>YCK1</i>	-----IHII DFGLAKEYIDPETKKHIPYREHKSLTGTARYMSINTHLGKEQSR		230
<i>PKA</i>	-----IQVTDGFAKRVKGRWTWTLG-----TPEYLAPEIILSKGYNK		221
<i>CK2a</i>	-----RLIDWGLAEFYHPGQYNNRVAS-----RYFKGPELLVDYQMYD		211
<i>Cdk2</i>	-----IKLADFGLARAFGVPVRTYTHEVV-----TLWYRAPEIILGCKYYS		181

	IX	X	XI	
<i>X1CK1a</i>	RDDMESLGYVLMYFNRTSLPWQGLKAATKKQKYEKISEKKMSTPVEVLCKGFPAEFAMYLNYCRGLRFEEAP			272
<i>bCK1a</i>	RDDMESLGYVLMYFNRTSLPWQGLKAATKKQKYEKISEKKMSTPVEVLCKGFPAEFAMYLNYCRGLRFEEAP			272
<i>rCK1aL</i>	RDDMESLGYVLMYFNRTSLPWQGLKAATKKQKYEKISEKKMSTPVEVLCKGFPAEFAMYLNYCRGLRFEEAP			300
<i>gCK1aL</i>	RDDMESLGYVLMYFNRTSLPWQGLKAATKKQKYEKISEKKMSTPVEVLCKGFPAEFAMYLNYCRGLRFEEAP			300
<i>hCK1δ</i>	RDDLESGLGYVLMYFNLSLQGLKAATKKQKYERISEKKMSTPIEVLCKGYPSEFATYLNFCRSLRFDDKP			260
<i>HRR25</i>	RDDLESGLGYVLIYFCKGSLPWQGLKAATKKQKYDRIMEKKNVSVETLCSGLPLEFQEYMAACKNKKFDEKP			260
<i>rCK1y1</i>	RDDLEALGHMFMYFLRGSPLPWQGLKADTLKERYQKIGDTRKSTPIEALCENFPEEMTYLRYVRRLDFFFKP			302
<i>YCK1</i>	RDDMEALGHVFFYFLRGHLPWQGLKAPNNKQKYEKIGEKKRSTNVYDLAQGLPVQFGRYLEIVRSLSFEECP			336
<i>PKA</i>	AVDWWALGVLIYEMAAGYPPFFA---DQPIQIYEKIVSGK-----VRFPSSHSSDLKD			271
<i>CK2a</i>	YSLDMWSLGCMLASMI FRKEPFFHGHNDYDQLVRIAKVLGTELDYDYIDKYNIELDPRFNDLGRHSRKRWE			283
<i>Cdk2</i>	TAVDIWSLGCIFAEMVTRR-ALFPGDSEIDQLFRI FRTLGT PDEVVWPGVTSMPDYKPSFPKWARQDFSKVV			262

<i>X1CK1a</i>	DYMYLRQLFRILFRTLNHQYDYTFDWTMLKQKAAQQAASSSGGQQQAQTPTGKQTDKSKSNMKG		335
<i>bCK1a</i>	DYMYLRQLFRILFRTLNHQYDYTFDWTMLKQKAAQQAASSSGGQQQAQTPTG-----F		324
<i>rCK1aL</i>	DYMYLRQLFRILFRTLNHQYDYTFDWTMLKQKAAQQAASSSGGQQQAQTPTG-----F		352
<i>gCK1aL</i>	DYMYLRQLFRILFRTLNHQYDYTFDWTMLKQKAAQQAASSSGGQQQAQTPTGKQTDKSKSNMKG		363
<i>hCK1δ</i>	DYSYLRQLFRILFHRQGFSDYVFDWNMLKFGASRAADDAERERRDRERLRHSRNPATRGLPSTDSGRLRG		332
<i>HRR25</i>	DYLFARLRFKDLSEIKLEYHNDHLDFTWMLRYTKAMVEKQRDLLEKGLNANSNAASASNSTDNKSETFNKI		332
<i>rCK1y1</i>	DYEYLRNLFTDLFERKGYTFDYAYDWVGRPIPTVGVSHVDSGASAITRESHTHRDRPSQQQPLRNQPRSLT		374
<i>YCK1</i>	DYEGYRKLKLLSVLDDLGETADGQYDWMKLNDRGWDLNINKKPNLHGYPNPNNEKSRKRNKQLQMQQLQ		408
<i>PKA</i>	LLRNLLQVDLTKRFNGLKNGVNDIKNHKWEATDWDIAIYQRKVEAPFIPKFKGPGDTSNFDYEEEEEIRVSI		343
<i>CK2a</i>	REVSSENQHLVSPALDFLDKLLRYDHQTRLTAREAMDHPYFYPIVKDQSRMAALICPVAHPSVAPV		350
<i>Cdk2</i>	PPLDEDGRSLLSQMLHYDPNKRISAKAALAHPPFQDVTKVPVHLRL		298

<i>hCK1δ</i>	TQEVAPPTPLTPTSHANTSPRPVSGMERERKVSMLRHRGAPVNISSSDLTGRQDTSRMSTSQIPGRVASSG		404
<i>HRR25</i>	KLLAMKPPQQVQSSQPQPQQLQQQPNGQRPNYYPELLQQQQRDSQEQQQQVPMATTRAKFPTHFYHKN		404
<i>rCK1y1</i>	AEFVFLAPLSHPPAPT		390
<i>YCK1</i>	MQQLQQQQQQQYQKTEADMNRNSQYKPKLDPTSYEAYQHQTQOKYLOEQQKROQQQKLEQQQLQEQQLQQQ		480
<i>PKA</i>	EKCGKEFTEF		351

<i>hCK1δ</i>	LQSVVHR		415
<i>HRR25</i>	EDKHNPSPPEIKQQTILNNAASSLPEELLNALDKGMENLRQQQTQYPPQINSNNENTNQASVPPQMRSNPQ		476
<i>YCK1</i>	QQQQQLRATGQPPSQPQAQTQSQQFGARYQPQQQPSAALRTPEQHNDNSSLASHKGFQKLGCC		538

<i>HRR25</i>	QPPQDKPAGQSIWL		490
--------------	----------------	--	-----

CK1 y CK2 no pertenecen a la misma familia: CK2 estaría más relacionada con otras quinasas como glicógenosintetasa quinasa (GSK3), las quinasas dependientes de ciclinas (CDK) y las quinasas activadas por mitógenos (MAPK). CK1 en cambio conforma una subfamilia que ocupa una región única en el árbol filogenético de las quinasas debido a que existe más de un 50% de identidad entre sus miembros y menos de un 25% de identidad con cualquier otra quinasa conocida. En el Esquema 1 se muestra un alineamiento de secuencia primaria entre representantes de la familia CK1 y otras quinasas.

2. LA PROTEINAQUINASA CK1

La proteínquinasa CK1 es una enzima ampliamente distribuída en células eucarióticas, su actividad ha sido encontrada en núcleo, citoplasma y fracciones de membrana celulares (Tuazon y Traugh, 1991; Issinger, 1993; Gross y Anderson, 1998). Aunque se conoce a CK1 como una Ser/Thr quinasa, se ha demostrado que algunas especies de levaduras y *Xenopus laevis* fosforilan, con baja eficiencia, residuos de tirosina en péptidos sintéticos (Hoekstra y col., 1994; Pulgar y col., 1996).

La proteínquinasa CK1 se encuentra entre el reducido grupo de proteínquinasas que han sido cristalizadas, mostrando una estructura tridimensional muy similar a la descrita para otras quinasas: una estructura bilobular con el sitio activo definido por un bolsillo en la región entre ambos lóbulos (ver adelante, Esquema 3).

Existe un gran número de proteínas que son fosforiladas por CK1, entre ellas p53 (Milne, 1992), inhibidor-2 de fosfatasa 1 (Agostinis y col., 1992), aminoacil-tRNA sintetasas (Tuazon y Traugh, 1991), antígeno T grande del virus SV40 (Cegielska y

Virshup, 1993), el receptor de insulina (Rapuano y Rosen, 1991), receptor de TNF (Beyaert *y col.*, 1995), el receptor muscarínico m3 acoplado a proteína G (Tobin *y col.*, 1997), glicógeno sintetasa (Roach, 1990), la fosfoproteína DARP32 (Desdouits *y col.*, 1995), I κ B α (Cegielska *y col.*, 1998), CREM (de Groot *y col.*, 1993) y Ets-1 (Cegielska *y col.*, 1998). Estos sustratos han sido identificados principalmente *in vitro* y sólo en algunos casos se ha determinado la fosforilación *in vivo* y el efecto de esta fosforilación sobre la actividad biológica de la proteína sustrato. Como ejemplos se pueden citar la inhibición de la actividad de la enzima glicógeno sintetasa (Vila *y col.*, 1989), la inhibición de aminoacil tRNA sintetasas (Tuazon y Traugh, 1991) y la inhibición de la función de la proteína T grande del virus SV40 en la replicación del genoma viral (Cegielska y Virshup, 1993).

CK1 se ha aislado como un monómero activo y se ha observado una gran variación en las publicaciones sobre su masa molecular, en un rango desde 26 a 60 kDa. La razón para esta variación se debe a la existencia, en células de mamíferos, de múltiples isoformas de CK1 codificadas por genes diferentes relacionados estructuralmente. Las primeras evidencias de la diversidad y redundancia de esta familia de proteínas se obtuvieron con el clonamiento de cuatro isoformas desde una genoteca de cerebro de bovino, denominadas CK1 α , β , γ y δ (Rowles *y col.*, 1991). A la fecha se han identificado las isoformas CK1 α en bovino, humano (Tapia *y col.*, 1994; Fish *y col.*, 1995), rata (Zhang *y col.*, 1996), *Xenopus laevis* (Pulgar *y col.*, 1996), ratón (McInnes y Leder, 1997), conejo, pollo (Green y Bennet, 1998) y *Drosophila melanogaster* (Santos *y col.*, 1996); CK1 β en bovino (Rowles *y col.*, 1991), CK1 γ se ha encontrado como una

subfamilia que comprende CK1 γ_1 , γ_2 y γ_3 y se ha identificado en rata (Zhai y col., 1995) y γ_2 y γ_3 en humano (Kitabayashi y col., 1997; Kusuda y col., 1998); CK1 δ en rata (Graves y col., 1993) y humano (Kusuda y col., 1996), y finalmente CK1 ϵ que ha sido identificado en rata (Fish y col., 1995) y *D. melanogaster* (Kloss y col., 1998). En algunos casos se ha determinado la existencia de subisoformas generadas por procesamiento alternativo, como en el caso de CK1 α en que se han identificado cuatro proteínas productos del mismo gen: CK1 α , CK1 α S, CK1 α L y CK1 α LS (Green y Bennet, 1998; Burzio y col., 1998, no publicado); mientras que en el caso de CK1 γ se ha identificado la subisoforma CK1 γ_3 L (Zhai y col., 1995). Las quinasas CK1 α L y CK1 α LS (ver Esquema 2B), representan uno de los pocos casos en que existe una inserción dentro del altamente conservado dominio catalítico, esta inserción alteraría el ángulo entre los lóbulos amino y carboxilo terminales afectando así la actividad catalítica de la quinasa. CK1 α L de rata posee claras diferencias con CK1 α presentando mayor actividad contra algunos sustratos *in vitro* (Zhang y col., 1996). Los genes para CK1 α y β codifican proteínas entre 35 y 38 kDa mientras que las isoformas γ , δ y ϵ son de mayor tamaño y varían su masa molecular entre 45 y 55 kDa.

Se han descrito cuatro formas diferentes de CK1 en *Arabidopsis thaliana* (Klimeczak y col., 1995), una forma de 37 kDa en *Plasmodium falciparum* (Barik y col., 1997) y una familia de tres formas con masas moleculares entre 28 a 45 kDa en el protozoo *Paramecium tetraurelia* (Walczak y col., 1993).

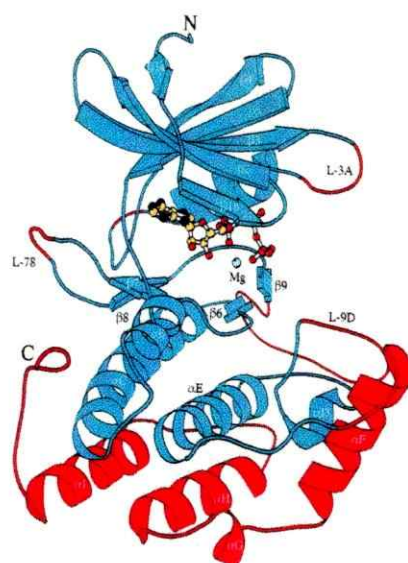
En levaduras se han reportado nueve genes que codifican para isoformas de la proteínaquinasa CK1. En *Saccharomyces cerevisiae* se han identificado *hrr25*, *YCKII*

(*CKI2*), *YCKI2 (CKI1)* y *YCKI3* que codifican para proteínas con masas moleculares entre 55 y 62 kDa. En *Schizosaccharomyces pombe* se han identificado los genes *hhp1⁺*, *hhp2⁺*, *cki1⁺*, *cki2⁺* y *cki3⁺* que codifican para proteínas con masas moleculares entre 45 y 50 kDa. La generación de mutantes para estas enzimas en ambos tipos de levaduras, ha permitido un análisis más detallado de su función *in vivo*. Los fenotipos de los mutantes *hhp1⁻*, *hhp2⁻* y *hrr25⁻* se han asociado con defectos en algunos mecanismos de reparación de DNA y son parcialmente complementados por las isoformas de mamíferos CK1δ, CK1ε (Fish y col., 1995) y CK1γ (Zhai y col., 1995). Esta relación de CK1 con fenómenos de reparación de DNA se ha observado también con CK1α de *D. melanogaster* (Santos y col., 1996) en cuyo caso se ve un incremento de actividad después de irradiar con radiación γ, y representa una fuerte evidencia de un papel de estas quinasas en un proceso biológico específico.

Todos los miembros de la familia de proteínasquinasas CK1 poseen una región amino terminal entre 9 y 76 aminoácidos, a continuación un dominio quinasa altamente análogo de alrededor de 300 residuos en el que se encuentran las 12 regiones conservadas que identifican a todas las quinasas (Hanks y Hunter, 1995), y una región carboxilo terminal muy variable tanto en secuencia como en tamaño que varía entre 24 a más de 200 aminoácidos (ver Esquema 1 y Esquema 2.A). Esta región carboxilo terminal ha sido recientemente involucrada en la regulación de la actividad enzimática de algunas isoformas de CK1 ya que contiene sitios de autofosforilación que al ser modificados reducen la actividad catalítica (Rivers y col., 1998). Dentro del dominio quinasa existen cuatro regiones que se han identificado como características de la

familia CK1: L⁹²LGPSLEDLF¹⁰¹, H¹⁷²IPYR¹⁷⁶, E¹⁹⁷QSRRDD²⁰³ y L²¹⁹PWQGLKA²²⁶, aquí numeradas según la secuencia de CK1 α de *X. laevis*. Estas secuencias están conservadas en todas las isoformas CK1 descritas. Las isoformas CK1 α , β , δ , ϵ de eucariotes superiores y HRR25 y hhp1 de levaduras poseen una posible secuencia de localización nuclear T²²⁸KK/RQKY²³³ cuya funcionalidad aún no ha sido establecida. HRR25, YCK1 y YCK2 poseen una región, en sus C-termini, con una alta proporción de residuos glutamina, y esta región está también presente en CK1 α pero es mucho más corta. Las regiones ricas en glutamina han sido relacionadas con dominios que favorecen la interacción con otras proteínas. Todos los miembros de la familia CK1 analizadas son proteínas altamente básicas con un punto isoelectrico pI \geq 9.0.

Como se mencionó anteriormente, a la fecha se ha reportado la estructura tridimensional de dos miembros de la familia CK1, Cki1 de *S. pombe* (Xu y col., 1995) y CK1 δ de rata (Longenecker y col., 1996). Ambas han sido cristalizadas como proteínas truncas que carecen de la región carboxilo terminal (Cki1 Δ 298 y CK1 δ Δ 307), modificadas para facilitar la cristalización y evitar la autofosforilación de este segmento. Como otras proteínasquinasas (Knighton y col., 1991; De Bondt y col., 1993; Johnson y col., 1996), el dominio catalítico de CK1 está compuesto de dos lóbulos, uno N-terminal compuesto principalmente de estructuras de tipo sábanas plisadas beta antiparalelas y un lóbulo de mayor tamaño C-terminal compuesto principalmente de alfa hélices. En el Esquema 3 se muestra la estructura tridimensional de Cki1. Entre ambos lóbulos existe una hendidura donde se localiza el complejo MgATP. Cki1 posee una estructura similar a la conformación "cerrada" de las proteínaquinasas PKA y CDC2 con diferencias que



ESQUEMA 3: *Estructura tridimensional de CK1.*

Se muestra un diagrama de cintas de la estructura de Cki1, la isoforma de CK1 de *S. pombe* que ha sido cristalizada. Se observa que la estructura consta de dos dominios, uno en que predomina la estructura de sábana plisada de tipo β (dominio β) y uno en que predominan las hélices α (dominio α). El complejo MgATP se ubica en la hendidura entre ambos dominios. Se indica la nomenclatura adoptada para designar las estructuras de sábana plisada β (β 1a- β 9), las hélices α (α B- α I) y las "vueltas" (L-3a, L-78, L-9D). En esta figura se muestra en azul las regiones de Cki1 con mayor similitud, en estructura tridimensional, a la proteínaquinasa dependiente de cAMP (r.m.s. < 2,5 Å). Reproducido de Xu y col., 1995.

ayudan a explicar la preferencia de CK1 por sustratos previamente fosforilados. Recientemente se ha reportado la cristalización de CK1 δ de rata incluyendo la región C-terminal (Longenecker *y col.*, 1998) y aunque no fue posible obtener coordenadas para esta región, se obtuvieron evidencias que indican que este segmento participaría en la posible dimerización de esta isoforma de CK1, contribuyendo así con un potencial mecanismo de regulación de la actividad catalítica de estas enzimas.

3. ANTECEDENTES SOBRE LA FUNCION DE CK1

3.1. LA PROTEINAQUINASA CK1 EN LEVADURAS

Diversos estudios realizados en levaduras han permitido obtener evidencias de las probables funciones que cumplen las diferentes isoformas de CK1. Entre estos estudios se encuentra la generación de mutantes para estas enzimas y los estudios de complementación de estos mutantes con isoformas de CK1 de mamíferos, por ejemplo CK1 δ , CK1 ϵ y CK1 γ .

Entre los genes que codifican isoformas CK1 en levaduras, los mejor caracterizados son *hrr25*, *YCK1*, *YCK2* y *YCK3*. *Hrr25* fue aislado en una búsqueda de mutantes con una sensibilidad aumentada a la expresión constitutiva de la endonucleasa HO, al tratamiento con agentes alquilantes, o a la radiación ionizante de tipo X, todos tratamientos que inducen la ruptura de las hebras del DNA (Hoekstra *y col.*, 1991). El fenotipo asociado a *HRR25* involucra defectos en una gran cantidad de procesos celulares que incluyen meiosis, mitosis, segregación cromosómica y retardo del ciclo celular en G₂. Las evidencias indican que estos defectos se deben a alteraciones en

algunos puntos de revisión ("checkpoints") del ciclo celular, las que interfieren con la capacidad de estos mutantes para responder a la ruptura de hebras en el DNA, lo anterior probablemente asociado con eventos de recombinación en meiosis y algunos tipos de reparación de DNA (Hoekstra *y col.*, 1991).

Una función similar se le ha asignado a los genes de *S. pombe* *hhp1* y *hhp2* (Dhillon y Hoekstra, 1994). Recientemente se ha demostrado que HRR25 se asocia con y fosforila SBF, un factor de transcripción involucrado no sólo en la respuesta transcripcional al daño al DNA sino también en la transcripción de algunas de las ciclinas que participan en la fase G₁ del ciclo celular (Ho *y col.*, 1997). La evidencia anterior sugiere que HRR25 puede estar involucrado en la progresión normal del ciclo celular además de participar en la respuesta al daño del DNA. HRR25 y YCK3 en conjunto, son esenciales para la supervivencia celular (Wang *y col.*, 1996), dado que la eliminación de ambos genes es letal. Estas formas de CK1 son proteínas predominantemente nucleares y esta localización es absolutamente requerida para su función. Recientemente se demostró que al inhibir la actividad quinasa correspondiente a la isoforma de CK1 HRR25, es posible suprimir el defecto en el vía secretora presente en el mutante *sec12* de *S. cerevisiae*. Lo anterior ha permitido relacionar a HRR25 en la regulación negativa del proceso de generación de vesículas en el retículo endoplásmico (Murakami *y col.*, 1999).

YCK1 y YCK2 contribuyen con la mayor parte de la actividad CK1 en *S. cerevisiae* (Robinson *y col.*, 1993). La interrupción de ambos genes resulta en un fenotipo letal (Robinson *y col.*, 1992). El análisis de la función de YCK2 ha permitido relacionarlo con el proceso de yemación, con la morfogénesis y citoquinesis (Robinson *y*

col., 1993). Estudios de complementación han permitido relacionar estas isoformas con el reingreso al ciclo celular posterior a la realimentación con nutrientes y con algunos aspectos de la endo y exocitosis (Wang *y col.*, 1996). Además, la actividad de YCK1 y YCK2 se ha relacionado con el tráfico vesicular y un nuevo complejo de adaptadores de clatrina ha sido involucrado en este proceso (Panek *y col.*, 1997). Estas isoformas de CK1 poseen un sitio de isoprenilación en sus C-termini que es esencial para su función (Robinson *y col.*, 1993; Vancura *y col.*, 1994; Wang *y col.*, 1996). Estudios de fraccionamiento subcelular indican que estas enzimas se encuentran exclusivamente en la fracción de membranas lo que sugiere, según algunos autores, que se encuentran estrechamente unidas a la cara interior de la membrana plasmática (Vancura *y col.*, 1994; Wang *y col.*, 1992 y 1994). Se ha demostrado que la fosforilación por YCK1 y YCK2 de la bomba H^+ -ATPase presente en la membrana plasmática afectan la regulación por glucosa de este transportador (Estrada *y col.*, 1996).

El análisis de los estudios genéticos en levaduras permite hacer dos grandes observaciones con respecto a las funciones celulares de CK1. Primero, estas isoformas están probablemente involucradas en las cascadas de regulación que controlan varios puntos de revisión del ciclo celular incluyendo G_0/G_1 , S (daño al DNA) y mitosis. Segundo, la localización subcelular de estas isoformas es de gran importancia para su función.

3.2. POSIBLES FUNCIONES DE LA PROTEINAQUINASA CK1 DE EUKARIOTES SUPERIORES

Debido al alto grado de conservación de secuencia entre las isoformas CK1 de levaduras y eucariotes superiores (especialmente en el dominio quinasa), es probable que las conclusiones indicadas anteriormente se apliquen a todos los miembros de la familia CK1. El estudio de estas quinasas en eucariotes superiores ha sido más lento y con seguridad resultará en una visión más compleja y diversa.

Como se mencionó anteriormente, a la fecha se han clonado siete isoformas distintas de CK1 en eucariotes superiores. Desde el punto de vista de su actividad enzimática, todas son enzimas con preferencia por sustratos ácidos como caseína y que usan sólo ATP como dador de grupos fosfato (Tuazon y Traugh, 1991). Poseen diferente sensibilidad a inhibidores como heparina y *N*-(2-aminoetil)-5-cloro-isoquinolina-8-sulfonamida (CK1-7), un inhibidor específico de la familia de quinasas CK1 (Chijiwa y *col.*, 1989).

Los genes para CK1 α , δ , ϵ y γ_2 han sido mapeados en cromosomas humanos en las posiciones 13q13.1-14.1 (Tapia y *col.*, 1994; Fish y *col.*, 1995), 17q25.2-25.3 (Fish y *col.*, 1995), 22q13.3-13.1 (Fish y *col.*, 1995) y 19p13.3 (Kitabayashi y *col.*, 1997) respectivamente.

Hasta el momento las únicas evidencias que relacionan a alguna isoforma CK1 de mamíferos con las correspondientes de levaduras son los estudios de complementación de los mutantes con defectos en la reparación de DNA. Se ha demostrado que CK1 γ_1 y CK1 γ_3 son capaces de restaurar parcialmente el crecimiento y

morfología normal de los mutantes de *S. Cerevisiae* YCK1⁻ y YCK2⁻ (Zhai y col., 1995) mientras que CK1 δ y CK1 ϵ , pero no CK1 α , complementan a *S. cerevisiae* hrr25 Δ (Fish y col., 1995). Esta complementación sugiere que algunas isoformas CK1 de mamíferos pueden realizar funciones similares aunque no idénticas, a las isoformas CK1 de levaduras.

Recientemente se ha demostrado que el extremo carboxilo terminal de CK1 ϵ es altamente fosforilado y esto resulta inhibitorio de su actividad. La activación de esta isoforma es posible por proteólisis limitada ó por desfosforilación de este segmento de 123 residuos (Cegielska y col., 1998). *In vivo* CK1 ϵ y CK1 δ se encuentran en un estado totalmente fosforilado e inactivo y su activación es posible en presencia de diversas proteínas fosfatasa (Rivers y col., 1998). Esta regulación por autofosforilación/desfosforilación, inicialmente identificado *in vitro* para CK1 δ (Graves y Roach, 1995), constituye uno de los pocos mecanismos conocidos de regulación de la actividad de las proteínaquinasas CK1.

Existen evidencias que indican que miembros de la familia de quinasas CK1 estarían implicados en las cascadas de señales que siguen a la activación de receptores de membrana. Se ha demostrado que CK1 fosforila el receptor de insulina (Rapuno y Rosen, 1991), el receptor de progesterona (Chauchereau y col., 1992), el receptor de TNF p75 (Beyaert y col., 1995), el receptor muscarínico m3 acoplado a proteína G (Tobin y col., 1997) y en una forma directa ó indirecta al receptor acoplado a proteína G del factor α en *S. cerevisiae* (Hicke y col., 1998). En el caso del receptor de TNF p75, se ha asociado la actividad CK1 con la regulación negativa de la señal derivada del

receptor que lleva a apoptosis. En el caso del receptor m3, esta fosforilación, por CK1 α en este caso, es dependiente del agonista y podría representar una vía alternativa para la fosforilación del receptor, dependiente de estímulo. En el caso del receptor del factor α , la fosforilación también regula en forma negativa el receptor ya que es necesaria para la ubiquitinización e internalización a la vía endocítica.

En este contexto se debe señalar que se ha identificado a CK1 γ_2 como una proteína que interactúa en forma constitutiva con Nck, una proteína que no posee actividad catalítica intrínseca pero presenta dominios SH2 y SH3, y que actuaría como una proteína adaptadora que media la transducción de señales iniciadas por receptores tirosina quinasas (Lussier y Larose, 1997). Lo anterior ubicaría a un miembro de la familia CK1 en las vías de señales río abajo de los receptores tirosina quinasas.

Recientemente se ha identificado a CK1 ϵ de *D. melanogaster* como el gen responsable de la mutación *dbt* que altera los tiempos de duración del ritmo circadiano en estos organismos (Kloss y col., 1998). En estos mutantes se elimina la mayoría de la expresión de CK1 ϵ , se anula la expresión rítmica de los genes *per* y *tim*, y se acumula PER hipofosforilado. En moscas tipo silvestre la expresión de CK1 ϵ no oscila y es expresado en los mismos tejidos que TIM y PER. Se describe la asociación física de CK1 ϵ con PER lo que sugiere que esta asociación regula el estado de fosforilación y acumulación de PER.

4. LA SELECTIVIDAD DE SUSTRATO DE LA CK1

La superfamilia de enzimas de las proteínquinasas comparte con las proteínas fosfatasas la responsabilidad de regular, en forma concertada, virtualmente cada tipo de función celular. Debido a que los sustratos modificados son proteínas y que se deben modificar sólo algunos de los potenciales sitios presentes en la proteína blanco, las proteínquinasas deben poseer una gran selectividad, aún mayor que las proteínas fosfatasas.

Las evidencias disponibles indican que las proteínquinasas, con algunas importantes excepciones, son en general enzimas pleiotrópicas que actúan sobre un amplio espectro de proteínas sustrato con estructuras variables y a menudo implicadas en diferentes funciones. Lo anterior apoya la idea que la mayoría de las proteínquinasas son capaces de reconocer ciertas características estructurales que rodean los aminoácidos blanco, en todas sus proteínas sustrato; esto implicaría que no se requiere la integridad del sustrato ya que el reconocimiento se basa en determinantes estructurales locales compartidos por todos los sustratos de una quinasa dada (Pinna y Ruzzene, 1996). La validez de este concepto ha sido probada con una variedad de proteínquinasas para las cuales se ha observado que pequeños péptidos que reproducen los sitios aceptores de fosfato pueden ser fosforilados con parámetros cinéticos comparables a los de la proteína sustrato intacta.

La secuencia de consenso de una quinasa dada se obtiene en forma teórica al ubicar los determinantes de especificidad en el lugar donde presentan su máxima efectividad, relativos al residuo blanco. Esto genera una visión de lo que se considera la estructura primaria de cualquier sitio fosforilable con una eficiencia "razonable" por esa

quinasa. De acuerdo a la convención adoptada (Kennelly y Krebs, 1991) la secuencia de consenso incluye el residuo blanco, posición $n \pm 0$, y las posiciones relativas $n-1$, -2 , -3 / $n+1$, $+2$, $+3$, etc..., es decir ${}^2\text{HN}-\text{X}^{-3}\text{X}^{-2}\text{X}^{-1}-\text{S/T/Y}-\text{X}^{+1}\text{X}^{+2}\text{X}^{+3}-\text{COOH}$.

Esta especificidad del sitio fosforilable no es la única herramienta que asegura la selectividad de una proteínaquinasa. Se ha demostrado que la compartimentalización y la asociación específica a sitios intracelulares mediada por determinantes estructurales presentes fuera del dominio catalítico, juegan un papel crucial para aumentar la selectividad de estas enzimas. Como ejemplo de lo anterior se puede mencionar la existencia de proteínas que unen a la subunidad regulatoria de la proteínaquinasa A, las AKAP's (Klussmann *y col.*, 1999).

4.1. LA ESPECIFICIDAD DEL SITIO FOSFORILABLE DE LA PROTEINAQUINASA CK1.

- FUNDAMENTO DEL PRIMER Y SEGUNDO OBJETIVO DE ESTA TESIS

Desde el punto de vista de su especificidad de sitio, es decir los requerimientos de estructura primaria que hacen que una secuencia determinada sea fosforilada por CK1, los primeros estudios que analizaron los sitios modificados por CK1 en caseína (Meggio *y col.*, 1979; Donella Deana *y col.*, 1985) y el posterior uso como sustratos de péptidos sintéticos de secuencia definida (Flotow *y col.*, 1990; Meggio *y col.*, 1991; Meggio *y col.*, 1992), permitieron clasificar a CK1 como una quinasa dirigida por un aminoácido previamente fosforilado. Lo anterior resulta de gran importancia en el fenómeno de fosforilación jerárquica en el cual la fosforilación de un sitio por otra

quinasa crea un sitio de reconocimiento para CK1. Este es el caso de la fosforilación de Ser⁷ en glicógeno sintetasa la que al ser fosforilada por la quinasa dependiente de cAMP permite la fosforilación por CK1 en el residuo Ser¹⁰ (Roach, 1990). La secuencia de consenso determinada, para este tipo de fosforilación, fue definida por un residuo de serina ó treonina fosforilado ubicado en posición -3 N-terminal al aminoácido blanco: Sp/Tp⁻³-X⁻²-X⁻¹-S/T. Con posterioridad se demostró que un residuo ácido, aspártico ó glutámico, era incapaz de reemplazar en forma efectiva a los residuos fosforilados como determinante de la especificidad (Meggio y col., 1992). Dado que existían diversos sitios fosforilados por CK1 que no poseían como requerimiento de secuencia la presencia de un residuo fosforilado, se analizó la eficiencia como sustratos de ciertos péptidos que poseían un grupo de residuos ácidos N-terminal al residuo blanco. Se determinó que estos péptidos, la mayoría derivados del inhibidor-2 de la proteína fosfatasa 1, poseían una alta eficiencia como sustratos, comparables en término de K_m y V_{max} con los fosfopéptidos que presentaban fosfoserina en la posición -3 (Marin y col., 1994; Flotow y col., 1991). Estos estudios permitieron concluir que un residuo fosforilado puede ser reemplazado por múltiples cadenas laterales acídicas (especialmente las de ácido aspártico), es decir que (E/D)_nXXS/T puede ser también una secuencia de consenso. Se debe destacar que todos los estudios de especificidad de sustrato de CK1 se habían realizado con preparaciones de enzima nativa aislada y purificada de tejidos ó células en cultivo que sin duda contenían mezclas de las diferentes isoformas. Sólo recientemente con el clonamiento de diferentes isoformas de CK1 entre los años 1993 a la fecha se ha abordado el problema de si existen diferencias en la especificidad de sitio entre las isoformas CK1.

Con el uso de péptidos sintéticos se han obtenido evidencias que algunas isoformas de la familia de proteínquinasas CK1 poseen actividad tirosinaquinasa (Hoekstra *y col.*, 1994; Pulgar *y col.*, 1996). Esta actividad, aunque menor que la actividad de fosforilación de serina/treonina, permite incluir a esta enzima en el reducido grupo de las quinasas de especificidad dual. También se ha detectado la autofosforilación en tirosina, en el caso de las isoformas Hhp1, Hhp2, Cki1 de levaduras (Hoekstra *y col.*, 1994) y CK1 α de *X. laevis* (Pulgar *y col.*, 1996). Esta autofosforilación podría tener gran importancia en la regulación de la actividad catalítica y/o distribución subcelular de estas enzimas ya que permitiría la interacción con dominios SH2 presentes en otras proteínas.

Una estrategia experimental diferente al uso de los péptidos sustrato sintéticos ha permitido analizar la especificidad de sustrato de quinasas seleccionando, entre miles de secuencias, aquella que posee los requerimientos de secuencia primaria necesarios para ser fosforilada. Esta aproximación usa una "librería" de péptidos que poseen degeneraciones de secuencia entre las posiciones $n-4$ hasta $n+4$ (Songyang *y col.*, 1994; Songyang *y col.*, 1995) que son incubados con la quinasa en presencia de ATP. Una vez fosforilados, los fosfopéptidos son aislados por una resina específica para fosfopéptidos y su posterior secuenciación permite la identificación de una secuencia virtual que representaría el sustrato óptimo para la quinasa usada. Este método, sin embargo, no permite determinar la secuencia de un péptido real que sea preferido sobre todos los péptidos posibles, sino más bien la secuencia virtual de un péptido teórico construido de un mosaico de las secuencias disponibles en la librería. Al comparar los resultados

obtenidos con la librería de péptidos y los obtenidos con los métodos tradicionales se ha encontrado en general una buena correlación entre las secuencias determinadas, lo que comprueba la validez de este método. Lo anterior ha demostrado ser válido tanto para tirosinaquinasas (Songyang *y col.*, 1995), como para diversas serina/treonina quinasas como PKA, CDC2, CDK2, Cam quinasa II, CK2, Erk1 y NIMA (Songyang *y col.*, 1996).

Al analizar las ventajas y debilidades de este nuevo método, comentadas en la revisión de Pinna y Ruzzene (1996), se observa una sobreestimación de la afinidad (K_m) comparada con la velocidad de fosforilación y una tendencia a seleccionar determinantes de especificidad (por ejemplo residuos básicos o ácidos) en posiciones donde no son realmente importantes si es que están también presentes en las posiciones claves.

En los estudios descritos (Songyang *y col.*, 1996) se usó para analizar la especificidad de sustrato de dos miembros de la familia CK1, una "librería orientada" de péptidos que poseía la siguiente secuencia matriz: MA-X-X-X-X-X-S-I-X-X-X-X-AKKK. Se destacan en este caso las posiciones invariables con las letras M (metionina), A (alanina), S (serina), I (isoleucina) y K (lisina), mientras que la letra X indica las posiciones en que se incorpora al azar cualquiera de los 20 aminoácidos posibles. Usando esta "librería" se determinó la secuencia de consenso óptima para CK1 δ y CK1 γ recombinantes como MA-EFDTG-SI-IFFF-AKKK y MA-YYDAA-SI-IFFF-AKKK, respectivamente (Songyang *y col.* 1996). Estas secuencias presentaban discrepancias con las secuencias de consenso reportadas con anterioridad: poseían sólo un residuo ácido en posición -3 y el grupo de residuos hidrofóbicos IFFF, C-terminales a la serina

fosforilable, no se encontraba en las secuencias de consenso analizadas previamente para CK1. Esta discrepancia fue analizada al sintetizar los péptidos correspondientes a las secuencias reportadas de la librería y comparar su eficiencia como sustratos con los péptidos derivados de la proteína Inhibidor-2 de fosfatasa-1 (Pulgar *y col.*, 1999) y este análisis constituye una parte importante de esta Tesis.

4.2. LOCALIZACION SUBCELULAR DE CK1.

- FUNDAMENTO DEL TERCER OBJETIVO DE ESTA TESIS

La actividad caseína quinasa se ha reportado presente en fracciones de membranas, citosólicas, nucleares e incluso asociada a membranas de organelos como mitocondrias (Clari *y col.*, 1994) y retículo endoplásmico (Kosmopoulou *y col.*, 1994) de las células estudiadas. Dada la diversidad de la familia CK1, los primeros estudios han analizado el conjunto de la actividad CK1 representada en sus múltiples isoformas usando sondas no específicas. Sólo recientemente, se ha comenzado el análisis de las diferentes isoformas por separado, pero hasta la fecha no existe un análisis comparativo de la localización de diferentes isoformas CK1 en eucariotes superiores.

Los primeros estudios identificaron una actividad CK1 presente en todos los tejidos probados y por fraccionamiento subcelular, principalmente en el citosol de hígado de rata (Singh y Huang, 1985). Usando un antisuero antiCK1 de levaduras se identificó en células de mamíferos en cultivo, una CK1 de 45 kDa que se asociaba preferentemente a nucleólo (Grankowski e Issinger, 1990).

Por inmunofluorescencia y usando un anticuerpo policlonal específico de la isoforma CK1 α , se ha demostrado que, en células CHO, CK1 α posee una localización

dependiente del ciclo celular. Durante la interfase CK1 α se asocia con vesículas presentes en el citoplasmasma y el centrosoma, mientras que en mitosis CK1 α está asociada al huso mitótico (Brockman *y col.*, 1992). Esta isoforma de CK1 parece asociarse, en células LLC-PK de riñón de porcino, con un subset específico de vesículas presentes en el citoplasma y que poseen marcadores tanto de retículo endoplásmico como de aparato de Golgi. Además en células neuronales CK1 α se encuentra asociada con vesículas sinápticas pequeñas y puede fosforilar un grupo de proteínas asociadas a estas vesículas (Gross *y col.*, 1995). La asociación de CK1 α con el huso mitótico se ha observado también en oocitos de ratón donde se ha mostrado además que anticuerpos antiCK1 α bloquean la mitosis (Gross *y col.*, 1997). Usando este mismo anticuerpo antiCK1 α se ha mostrado que CK1 α transita desde citoplasma a núcleo, en células BHK, sólo al estar asociada al factor de transcripción NF-AT4 (Zhu *y col.*, 1998). Esta asociación regula la exposición de la señal de localización nuclear de NF-AT4 y el transporte del mismo al núcleo.

Con respecto a la localización de otras isoformas CK1, se ha descrito recientemente, por fraccionamiento subcelular, que CK1 ϵ transfectada en células *cos-1* se detecta en preparaciones de núcleo, citosol y fracciones de membranas (Cegielska y Virshup, 1998). Por otro lado, la actividad de CK1 γ_1 y γ_3 sobreexpresadas en cepas de *S. cerevisiae* se detecta principalmente en las fracciones particulada y enriquecida en membranas, lo que indicaría que las enzimas de la subfamilia CK1 γ se encontrarían asociadas a membranas (Zhai *y col.*, 1995).

En general, los antecedentes disponibles en levaduras y, en menor medida en eucariotes superiores, indican que la distribución subcelular juega un importante papel en la función de las diferentes isoformas de CK1. Los estudios realizados aportan evidencias de una localización en general citoplasmática para una de las isoformas cortas de CK1, CK1 α . En este contexto, CK1 α podría interactuar con receptores de membrana y proteínas de la maquinaria de síntesis de proteínas que se han mostrado como sustratos de CK1. Bajo la influencia de ciertos estímulos aún no analizados, como por ejemplo el estado proliferativo celular, la distribución de esta isoforma CK1 podría cambiar. Existen evidencias que indican que isoformas de CK1 más largas, como CK1 ϵ y CK1 γ , pueden asociarse a membranas y otros compartimientos. La complementación de mutantes de levaduras con defectos en funciones principalmente nucleares, reparación de DNA por ejemplo, por las isoformas CK1 δ , CK1 ϵ y CK1 γ permite esperar la presencia de estas isoformas en el núcleo.

Hasta la fecha no existe un estudio comparativo de la localización subcelular de distintas isoformas de esta familia de proteínasas. La parte final del trabajo de esta Tesis corresponde a la sobreexpresión en células en cultivo de dos representantes de la familia CK1, CK1 α y CK1 δ , y el estudio de su distribución subcelular.

APORTE DE LA TESIS EN RELACION CON LA ESPECIFICIDAD DEL SITIO FOSFORILABLE Y LA LOCALIZACION SUBCELULAR DE DIFERENTES ISOFORMAS CK1.

Hasta el inicio de esta Tesis no existía ningún estudio realizado con isoformas recombinantes de CK1 y todos los estudios previos fueron realizados con enzimas nativas purificadas desde diversos tejidos animales. La obtención de la isoforma CK1 α de *X. laevis* recombinante, 100% homóloga a CK1 α humana y CK1 α de bovino, presentó la oportunidad de reanalizar en detalle las características de esta isoforma independiente de las otras 6 isoformas descritas. Este análisis de caracterización constituye uno de los importantes aportes de esta Tesis.

En estrecha relación con la oportunidad de caracterizar isoformas CK1 en forma independiente se analizó la localización subcelular de dos isoformas CK1 en particular, CK1 α y CK1 δ . Durante la marcha de la Tesis otros autores informaron la localización de CK1 α y estos resultados están de acuerdo con los resultados obtenidos en esta Tesis.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS ESPECIFICOS

Teniendo como hipótesis de trabajo que la selectividad de sustrato de la familia de isoformas CK1 estaría dada por la especificidad del sitio fosforilable y por la accesibilidad de estas enzimas al sustrato, se espera con este trabajo contribuir al conocimiento que existe de la familia de proteínquinasas CK1. Para esto se estudiarán las propiedades de una isoforma en particular, CK1 α de *X. laevis*, recombinante producida en *E. coli*, y se realizará una comparación de la especificidad del sitio

fosforilable entre esta isoforma y las otras isoformas CK1 δ y CK1 γ de la familia. Para abordar el punto de si la accesibilidad al sustrato es diferente entre isoformas CK1 se analizará la localización subcelular de representantes de esta familia en células en cultivo.

Con base en los antecedentes reportados con anterioridad se propone como hipótesis de trabajo la siguiente:

La selectividad de sustrato de las isoformas CK1 estaría dada por la especificidad del sitio fosforilable y la accesibilidad al sustrato. La especificidad del sitio fosforilable de CK1 depende de estructuras sutilmente distintas en la distribución de cargas negativas en la proteína sustrato, mientras que la accesibilidad al sustrato está determinada por una localización subcelular diferente.

Dentro de este contexto se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Objetivo específico 1: Caracterizar la enzima CK1 α recombinante de *Xenopus laevis* con respecto a sus propiedades generales *in vitro*.
- Objetivo específico 2: Comparar la especificidad del sitio fosforilable de CK1 α versus una preparación de CK1 nativa que contiene múltiples isoformas (ratCK1).
- Objetivo específico 3: Analizar la distribución subcelular de las isoformas CK1 α , CK1 δ y CK1 γ en células en cultivo y de las isoformas CK1 α y CK1 δ sobreexpresadas en estas células.

MATERIALES Y METODOS

A. REACTIVOS

1. *Enzimas y reactivos de biología molecular.*

Las sales, ácidos, bases, detergentes y solventes usados fueron de grado analítico o de biología molecular y adquiridos en Sigma, Merck y Fluka.

Las enzimas de restricción, *Taq* DNA polimerasa, T4 polinucleótidoquinasa, T4 DNA ligasa, fosfatasa alcalina de intestino de ternera, X-Gal, IPTG, azul de nitro tetrazolio (NBT), 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP), agarosa, sistemas de purificación de DNA Wizard PCR Preps y DNA Clean Up fueron obtenidos de Promega. Los inhibidores de proteasas leupeptina, antipaina, pepstatina, aprotinina, PMSF y los reactivos *p*-formaldehído, formaldehído, azul de bromofenol, azul de Coomassie, rojo Ponceau-S, Tween-20, DEAE-dextrano, β -caseína no desfosforilada, membranas de PVDF (Immobilon) y Ampicilina fueron adquiridos de Sigma. Los reactivos para preparar medios de cultivo para bacterias Bactotripton, Extracto de Levadura y Bacto Agar fueron adquiridos de Difco Laboratories. Bromuro de Etidio, fenol, estándar DNA ladder se obtuvieron de Boehringer Mannheim. La heparina se obtuvo de Fisher Scientific. El reactivo de Bradford para la determinación de proteínas y los estándares preteñidos se obtuvieron de Bio-Rad. Las membranas de nitrocelulosa se obtuvieron de Schleicher & Schuell. Pliegos de papel 3M y papel de fosfocelulosa se obtuvieron de Whatman. Las películas autoradiográficas X-OMAT se adquirieron de Kodak. El nitrógeno líquido se obtuvo de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de

Chile. Los isótopos radiactivos [γ - ^{32}P]ATP, [α - ^{32}P]ATP y ^{32}P -ortofosfato fueron obtenidos en ICN. La resina de Glutación-Sefarosa fue obtenida de Pharmacia y la resina de Níquel-NTA-Agarosa fue obtenida de Qiagen.

2. *Reactivos y materiales para el cultivo de células.*

El medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DME) conteniendo 4500 mg/ml de glucosa, el DEAE-dextrano y DMSO HybriMax fueron adquiridos de Sigma. El medio de cultivo DME conteniendo 4500 mg/ml de dextrosa y deficiente en fosfato fue adquirido de ICN. El suero fetal de bovino caracterizado fue obtenido de HyClone. El suero fetal de bovino dializado, lipofectamina (LipofectAmineTM) y los antibióticos penicilina y estreptomina fueron de Gibco BRL. El anticuerpo antiinmunoglobulinas de ratón conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC), el anticuerpo antiinmunoglobulinas de conejo conjugado a tetrametil isotiocianato de rodamina (TRITC) y el medio de montaje para inmunofluorescencia fueron obtenidos de DAKO. Los anticuerpos antiHA y antiT-SV40 fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology Inc. ER-TrackerTM Blue-White DPX fue obtenido de Molecular Probes. Los filtros de 47 mm y 0,2 μm Supor-200 fueron obtenidos de GelmanSciences y aparatos de filtración desechables fueron obtenidos de Nalgene.

El material de plástico como frascos de poliestireno y placas de cultivo de 30, 60, 100 y 150 mm fueron adquiridos de Falcon, Greiner Labortechnik y Bibby Sterilin Ltd. Las pipetas plásticas desechables fueron adquiridas de Merck. Los frascos de vidrio utilizados fueron Duran Schott. Todo el material utilizado se lavó con una solución de

cloro, detergente RBS y abundante agua destilada. La mayoría del material se esterilizó con radiación y en la Comisión Chilena de Energía Nuclear y se reutilizó .

3. *Péptidos*

El péptido **GRHCNKLFLIDFGLAKKY** usado para generar el anticuerpo antiCK1 α fue sintetizado por el Dr. Sandor Pongor, ICGEB Trieste, Italia. Los péptidos sustrato **RRKDLHDDEEDEAMSITA**, **EEEEYFVFGRRK** y **RRREEEYEEEE**, así como los péptidos **ERERRDREER** y **QVYYFGPCGKY** usados para generar los anticuerpos antiCK1 δ y antiCK1 γ fueron sintetizados por el Centro de Síntesis y Análisis de Biomoléculas, OLIGOPEPTIDO, Universidad de Chile. Todos los péptidos usados en los estudios de especificidad de sustrato de la Sección B de los Resultados fueron sintetizados en el laboratorio del Dr. Lorenzo Pinna, Universidad de Padova, Italia.

Los polipéptidos ácido poliglutámico (43 kDa), ácido poliaspártico (42,5 kDa), poliglutámico-fenilalanina, poli(Glu⁸⁰:Phe²⁰), (16 kDa) y poliglutámico-tirosina, poli(Glu⁸⁰:Tyr²⁰), (46 kDa) fueron obtenidos de Sigma.

3. *Oligonucleótidos.*

Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

CK1N: 5' - AAAAAACATATGGCGAGTAGC -3'

CK1C: 5' - AAAAAAGAATTCTTAGAAACCTTTCAT -3'

K46A: 5' - CTGTGATTCCAGCGCTACGGCTACTTCC- 3'

K46Ai: 5' – GGAAGTAGCCGTAGCGCTGGAATCACAG -3'

S206A: 5' – GATGACATGGAGGCCCTAGGGTACG -3'

S206Ai: 5' – CGTACCCTAGGGCCTCCATGTCATC - 3'

CK1D5Bg: 5' – CATCATAGATCTATGGAGCTGAGAGTCGGG -3'

CK1D3E: 5' – TATTATGAATTCTCAYCGGAGCACGAC -3'

NdeI/BglIII-A 5' – TAGCGGCGGCAGATCTGCCGCCGC -3'

NdeI/BglIII-B 5' – TATCGAAGGTCGTAGATCTCCGGCACCGGCGGCCGC -3'

Los oligonucleótidos fueron sintetizados por OLIGOPEPTIDO, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. CK1N, CK1C, K46A, K46Ai, S206A y S206Ai fueron usados como partidores en la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) y en la reacción de secuenciación de DNA. Los partidores CK1D5Bg, CK1D3E, *NdeI/BglIII-A* y -B fueron usados en el clonamiento de CK1 α ^{WT}, CK1 α ^{K46A} y CK1 δ en los vectores de expresión eucarióticos pCEFL.

B. METODOS

Toda la metodología que involucraba purificación, análisis de restricción, clonamiento y secuenciación de DNA fue realizada básicamente según los protocolos descritos en Sambrook *y col.*, (1989).

1. Clonamiento de *XICK1* α en el vector pT7-7H6.

1.1. Obtención del fragmento de DNA que contiene el gen de *XICK1* α .

La secuencia codificante para CK1 α de *X.laevis* fue amplificada por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) desde el vector recombinante pGEX-2T-GSTCK1 α . Se usaron los partidores CK1N y CK1C en una concentración de 10 μ M cada uno. La reacción de PCR se realizó en 50 μ l en presencia de 10 mM Tris-HCl pH 9,0; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 200 μ M dATP, dCTP, dGTP y dTTP y 0,25 U de la enzima *Taq* DNA polimerasa. Las mezclas se cubrieron con una gota de aceite mineral y se sometieron al siguiente programa de amplificación: 95°C por 5 min, 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 52°C y 1 min a 72°C, finalmente se incubó por 10 min a 72°C.

1.2. Ligación del fragmento que contiene el gen de CK1 α al vector pT7-7H6.

El fragmento amplificado obtenido como se describe anteriormente fue digerido con las enzimas *Nde*I y *Eco*RI durante 2 horas a 37°C, usando el Tampón Universal de Stratagene a una concentración de 1x. El fragmento digerido fue purificado según el protocolo de las columnas Wizard PCR Preps y resuspendido en 50 μ l de agua.

El vector pT7-7H6 (5 μ g) fue digerido con 2 U de cada una de las enzimas *Nde*I y *Eco*RI en tampón de alta sal, a 37°C durante 3 horas. Se suplementó la mezcla anterior

con solución amortiguadora para la enzima fosfatasa alcalina que contiene Tris-HCl 50 mM pH 9,3; $MgCl_2$ 1 mM; $ZnCl_2$ 0,1 mM; espermidina 1 mM y se adicionó 1 U de enzima. Se incubó durante 15 min a 37°C, se agregó 1 U más de enzima y se continuó la incubación durante 45 minutos adicionales. Se detuvo la reacción con EGTA 50 mM a 65°C durante 30 minutos. El vector digerido y desfosforilado fue purificado desde geles de agarosa con el uso de columnas Wizard DNA Clean Up.

Se cuantificó la cantidad relativa de fragmento y vector en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y se realizó la reacción de ligación. Para esto se incubó 100 ng del fragmento purificado con 20 ng del vector en una mezcla de ligación que contenía Tris-HCl 50 mM pH 7,5; $MgCl_2$ 10 mM; ATP 1mM; DTT 1mM; polietilenglicol 5% y 1 U de la enzima T4 Ligasa durante 16 horas a 16°C.

1.3. Obtención de células competentes:

Las células competentes de la cepa bacteriana DH5 α se prepararon por el protocolo que utiliza $CaCl_2$ descrito en Sambrook *y col.*, (1989) y se almacenaron en alícuotas a -20°C. Se prepararon células de la cepa bacteriana BL21 (DE3) competentes para transformación por electroporación. Para esto se inoculó una colonia de bacterias en 50 ml de medio de cultivo SOB (Tryptona 20 g/l; extracto de levadura 5 g/l; NaCl 10 mM; KCl 2,5 mM) y se incubó a 37°C durante toda la noche con agitación constante. Al día siguiente con 5 ml de este cultivo se inoculó 100 ml de medio SOB fresco y se crecieron las bacterias hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,8. Las bacterias se colectaron por centrifugación a 5000 rpm durante 20 minutos a 4°C, se lavaron en agua

estéril y se resuspendieron 2 ml de glicerol 10% en agua. Estas células se utilizaron inmediatamente o se almacenaron en alícuotas de 200 μ l a -70°C .

1.4. Transformación

La mezcla de ligación descrita en la Sección 1.2 se puso en contacto con 200 μ l de células competentes preparadas por el método de CaCl_2 y se incubó durante 2 horas en hielo. Se sometió la mezcla a un tratamiento térmico a 42°C durante 90 segundos, se agregó 600 μ l de medio de cultivo Luria-Bertoni (triptona 10 g/l; extracto de levadura 5 g/l; NaCl 10 g/l; LB) fresco y se incubó a 37°C sin agitación durante 2 horas. Las células se colectaron por centrifugación, se resuspendieron en 100 μ l de medio LB y se distribuyeron en forma homogénea en placas de medio LB-Agar con ampicilina (LB_{Amp} -Agar).

Al transformar por electroporación se tomó la mezcla de ligación se precipitó con acetato de amonio 3 M pH 5,2 y 2 volúmenes de etanol a -20°C y se resuspendió en 20 μ l de agua. Se tomaron entre 1 y 5 μ l de la mezcla anterior y se puso en contacto con 20 μ l de células competentes para transformación por electroporación. Esta mezcla se puso entre los electrodos de una celda de electroporación y se aplicó un pulso de 2400 V (30 μ F) en un aparato Cell Porator, Gibco BRL. A la celda de electroporación se agregó 600 μ l de medio de cultivo SOC (medio SOB suplementado con 20 mM Mg^{+2} y 0,36 % glucosa) y se incubó a 37°C sin agitación. Se sembraron 100 μ l de células en placas con medio LB_{Amp} -Agar y se incubó durante toda la noche a 37°C .

1.5. Purificación de DNA de los plasmidios recombinantes

Las colonias que crecieron a las 24 horas de cultivo fueron analizadas directamente por PCR para la presencia de los plasmidios recombinantes, usando los partidores CK1N y CK1C descritos en la Sección A4 en las condiciones de amplificación descritas en la Sección B1.1.

Las colonias positivas se crecieron en 100 ml de medio líquido LB_{Amp} y se purificó el DNA plasmidial por medio del protocolo que utiliza columnas Wizard MidiPreps (Promega). En el caso del clonamiento de CK1 α ^{WT}, en el vector pT7-7H6, la secuencia correcta de la región codificante completa de XICK1 α y del sitio de clonamiento fue corroborada por secuenciación de DNA de los clones obtenidos.

El DNA plasmidial obtenido como se describe fue utilizado para transformar *E. coli* BL21 (DE3) según se describe anteriormente. Se seleccionaron 5 clones positivos de esta transformación, se crecieron en medio líquido LB_{Amp} y se almacenaron alícuotas en 25% glicerol pH 7,5. Estas células almacenadas en glicerol fueron usadas como inóculo para la purificación de la enzima His-CK1.

2. Generación de formas mutantes de XICK1 α

Las enzimas mutantes XICK1 α ^{K46A} y XICK1 α ^{S206A} se generaron por medio de la estrategia de partidores sobrepuestos (Ho y col., 1989). Para generar CK1 α ^{K46A} se usaron los pares de partidores K46A / CK1N y K46Ai / CK1C en la primera reacción y los partidores CK1N y CK1C en la reacción de fusión y amplificación del producto final. Para generar CK1 α ^{S206A} se usaron los pares de partidores S206A / CK1N y S206Ai / CK1C en la primera reacción y los partidores CK1N y CK1C en la reacción de

fusión y amplificación del producto final. La mutación K46A cambia un residuo lisina conservado en el dominio catalítico de todas las quinasas y que por estudios de cristalografía se ha relacionado con la orientación del anillo de adenina del sustrato ATP. La mutación S206A cambia el único residuo de Ser dentro de la secuencia primaria de *XICK1* α que posee una posible secuencia de consenso para CK1. Los genes mutados fueron secuenciados para confirmar la presencia de la mutación y clonados en los sitios *NdeI* y *EcoRI* del vector pT7-7H6 como se describe anteriormente para la enzima tipo silvestre. Estas proteínas fueron expresadas en *E.coli* y posteriormente purificadas con 6 residuos His adicionales.

3. Clonamiento de *CK1* α^{WT} , *CK1* α^{K46A} y *CK1* δ en los vectores pCEFL.

El vector recombinante pT7-7H6*XICK1* α posee el gen de *XICK1* α clonado en los sitios *NdeI* y *EcoRI*. Para poder clonar este gen en los vectores pCEFL se cambió el sitio *NdeI* por *BgIII*. Para esto se insertó el oligonucleótido *NdeI/BgIII*-A que contiene el sitio *BgIII*, descrito en la Sección A4, en el sitio *NdeI* según el siguiente protocolo. El oligonucleótido *NdeI/BgIII* A) (100 pmol) fue fosforilado en presencia de 1 mM ATP y 15 U de la enzima T4 polinucleótidoquinasa a 37°C durante 30 minutos, la reacción se detuvo por la adición de 2 μ l de EDTA 0,5 M y se almacenó a -20°C. Se permitió al oligonucleótido hibridizar consigo mismo calentando la reacción de fosforilación a 95°C durante 5 minutos y manteniéndola a temperatura ambiente durante 4 horas. Se digirió el vector recombinante pT7-7H6*XICK1* α (5 μ g) con 5 U de la enzima *NdeI* en tampón de digestión D (Promega) durante 4 horas a 37°C y posteriormente se desfosforiló con 20 U

de fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP) esencialmente según las condiciones descritas en la Sección 1.2. El oligonucleótido *NdeI/BgIII*-A fosforilado y el vector pT7-7H6XICK1 α digerido y desfosforilado fueron incubados en una mezcla de ligación esencialmente según las condiciones descritas en la Sección 1.2. Con esta mezcla de ligación se transformó células *E. coli* BL21 (DE3) según se describe en la sección 1.4. A partir de las colonias positivas se preparó DNA plasmidial como se describe en la sección 1.5 y se determinó la presencia del sitio *BgIII* por análisis de restricción.

A partir de los nuevos clones del vector recombinante pT7-7H6XICK1 α que poseían el gen XICK1 α clonado en los sitios *BgIII* y *EcoRI* se obtuvo el fragmento de DNA correspondiente (por digestión *BgIII* / *EcoRI*) y se clonó en los sitios *BgIII* y *EcoRI* de los vectores pCEFL siguiendo esencialmente las condiciones descritas en las Secciones 1.2, 1.3, 1.4 y 1.5.

Para el clonamiento de XICK1 α ^{K46A} se utilizó el oligonucleótido *NdeI/BgIII*-B y las condiciones descritas para el clonamiento de XICK1 α ^{WT}. Posterior al clonamiento del gen que codifica para XICK1 α ^{K46A} en el vector pCEFLHA, el análisis de la secuencia del fragmento clonado determinó que se habían insertado dos copias consecutivas del oligonucleótido *NdeI/BgIII*-B. Lo anterior le adiciona 16 residuos extra en el extremo N-terminal a este gen en relación a XICK1 α ^{WT} lo que explica la diferencia de tamaño observada entre ambos productos proteicos (ver Figura 16 de Resultados).

El fragmento que contiene el gen para CK1 δ fue aislado por PCR con los partidores CK1D5Bg y CK1D3E desde el plasmidio recombinante pCSNK3 (gentilmente cedido por el Dr. Jun Kusuda, Universidad de Tokio). Para el clonamiento

de CK1 δ en los vectores pCEFL se utilizó el oligonucleótido *NdeI/BglII*-A y las condiciones descritas en las secciones B1.1 a B1.5 para el clonamiento de *XICK1 α* ^{WT} en pT7-7H6.

Los plasmidios recombinantes pCEFL-HA-*XICK1 α* ^{WT}, pCEFL-HA-*XICK1 α* ^{K46A} y pCEFL-HA-CK1 δ fueron preparados siguiendo el protocolo de purificación de DNA por columnas Wizard Midi Preps, resuspendidos en agua y almacenados a -20°C hasta su uso. En los casos que el clonamiento involucraba la reacción de PCR, la secuencia del gen clonado se confirmó por secuenciación de DNA de los clones obtenidos.

4. *Secuenciación directa de DNA por la técnica de PCR.*

Mediante esta técnica basada en el método de Sanger (1977), se somete el DNA de doble hebra a varios ciclos de desnaturación, hibridación con un partidor marcado en forma radiactiva y reacciones de extensión de cadena en la presencia de dideoxinucleótidos de terminación. La reacción se realiza mediante el kit dsDNA Cycle Sequencing System (BRL) en las siguientes etapas:

4.1. *Marcación del partidor:*

1 pmol de un partidor específico para cada fragmento de DNA a secuenciar, se marca en forma radiactiva en su extremo 5' con 1 U de la enzima T4 polinucleótidoquinasa en presencia de 2 pmoles de [γ -³²P]ATP; Tris-HCl 60 mM pH 7,8; MgCl₂ 10 mM; KCl 200 mM, en un volumen final de 5 μ l. Se incuba durante 20 minutos a 37°C y luego se detiene la reacción incubando a 55°C por 15 minutos.

4.2. Reacción de secuenciación:

Se preparan cuatro tubos que contienen entre 3,5 y 12,5 fmoles de DNA; 0,25 pmoles del partidador marcado; 0,6 U de *Taq* DNA polimerasa en 10 μ l de una solución que contiene Tris-HCl 30 mM pH 9,0; MgCl₂ 50 mM; KCl 30 mM; W-1 0,05%; dATP, dCTP, dTTP, 7-deaza-dGTP 20 μ M y uno de cada dideoxinucleótido de terminación en la siguiente concentración: ddATP 0,4 mM; ddCTP 0,2 mM; ddGTP 0,04 mM; ddTTP 0,4 mM. Se cubre la solución con una gota de aceite mineral y se incuban las mezclas a 95°C por 3 minutos y luego se someten a 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, 52°C por 50 segundos y 70°C por 1 minuto. Una vez finalizado el programa de incubación, se ponen los tubos en hielo y se detiene la reacción agregando 5 μ l de una solución que contiene formamida 95%; EDTA 10 mM pH 8,0; azul de bromofenol 0,1%; xileno xianol 0,1%. Las muestras se guardan a -20°C y se analizan en geles de poliacrilamida.

4.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida para análisis de secuencia de DNA.

Las muestras que contienen las reacciones de secuenciación son sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida de 40 x 30 x 0,04 cm. La electroforesis se realiza en un gel separador preparado de la siguiente manera: se filtran y desgasifican al vacío 60 ml de una solución que contiene Tris-borato 90 mM; EDTA 2 mM; acrilamida 6% (19:1 de acrilamida:bisacrilamida) y urea 48% (p/v). La reacción de polimerización se inicia por la adición de 30 μ l de TEMED al 100% y 60 μ l de persulfato de amonio al 25%. El gel se deja polimerizar a temperatura ambiente. Previo a aplicar las muestras

estas se calientan a 90°C por 3 minutos. La electroforesis se realiza a un voltaje constante de 1699-1800V. Una vez terminada la electroforesis, los geles se secan y se someten a autoradiografía con una película X-OMAT durante 1 a 3 días.

5. *Expresión en E. coli y purificación de CK1 α de Xenopus laevis recombinante.*

5.1. *Expresión y purificación de GST-CK1:*

La isoforma α de la enzima CK1 recombinante de *X. laevis* (XICK1 α) fue purificada como proteína de fusión con glutatión S-transferasa (GST-CK1) desde *E. coli* BL21(DE3) transformadas con el vector recombinante pGEX-2T-GSTCK1. Las bacterias se crecieron durante toda la noche en 100 ml de medio de cultivo líquido Luria-Bertoni (LB) suplementado con 100 μ g/ml de ampicilina (LB_{Amp}), a 37°C con agitación constante. Al día siguiente se usaron 10 ml de este cultivo para inocular 1 litro de medio LB_{Amp} fresco y se incubó a 37°C con agitación constante hasta una densidad óptica medida a 600 nm de 0,5-0,7. La expresión de GST-CK1 fue inducida con 0,5 mM de IPTG durante 3 horas a 37°C. Las células fueron colectadas por centrifugación a 5000 rpm durante 20 min a 4°C, lavadas con tampón PBS y resuspendidas en tampón A (Tris-Cl 50 mM pH 7,5; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM; β -mercaptoetanol; PMSF 1 mM). Las bacterias fueron lisadas por sonicación 3 veces a la máxima potencia en hielo. Se separó la fracción soluble por centrifugación a 15.000 rpm a 4°C. La fracción sedimentada se resuspendió en un buffer que contenía tampón A suplementado con 1% Tritón X-100, y se centrifugó nuevamente. La fracción soluble recuperada por centrifugación se mezcló con la fracción soluble obtenida en la primera centrifugación. Las proteínas solubles así

obtenidas se cargaron en un columna de 2 ml de Glutación-Sefarosa según las indicaciones descritas (Smith y Johnson, 1988), previamente equilibrada con tampón A suplementado con 0,5% Tritón X-100. Después de lavar con 10 volúmenes de columna de tampón A, se eluyó la proteína con 25 mM de glutatión en 50 mM Tris-HCl pH 8,0. Se colectaron las fracciones que poseían mayor actividad de fosforilación de β -caseína. Una preparación típica de GST-CK1 poseía una actividad específica de $5 \text{ pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ con $0,5 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ de enzima.

5.2. *Expresión en E. coli y purificación de His-CK1.*

Las células almacenadas en glicerol descritas anteriormente (50 μl) se inocularon en 50 ml de medio LB_{Amp} y se crecieron durante toda la noche a 37°C con agitación constante. Al día siguiente se usaron 10 ml de este cultivo para inocular 1 litro de medio LB_{Amp} fresco que se incubó a 37°C con agitación constante hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,4-0,6. La expresión de His-CK1 fue inducida con 0,5 mM de IPTG a 22°C durante toda la noche. Las células fueron colectadas por centrifugación a 5.000 g durante 20 min a 4°C, lavadas con PBS y resuspendidas en tampón TBNa (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; β -mercaptoetanol 20 mM, NaCl 100 mM, PMSF 1 mM). Se agregó 1/10 de volumen de tampón TBNa suplementado con 5% de Tritón X-100 y 0,1 mg/ml de lisozima y se incubó durante 30 min a 4°C. Las bacterias fueron lisadas por sonicación 8 veces por 30 segundos a 50 Watt en hielo. Se separó la fracción soluble por ultracentrifugación a 38.000 rpm a 4°C durante 30 min. La fracción soluble recuperada por centrifugación se cargó en una columna de Ni²⁺-NTA-Agarosa previamente

equilibrada con 10 volúmenes de tampón TBNa suplementado con 1 mM PMSF. La columna se lavó con 5 volúmenes de columna de tampón TBNa y 10 volúmenes de tampón TBNaI (TBNa suplementado con 10 mM de imidazol). Las proteínas unidas se eluyeron con una gradiente desde 10 a 200 mM de imidazol en tampón TBNa suplementado con 10% de glicerol y 1 mM PMSF. Usualmente la proteína His-CK1 eluía a una concentración de imidazol de alrededor de 100 mM. Se colectaron las fracciones que poseían mayor actividad de fosforilación de β -caseína y se concentraron en un aparato Centricon-30 (Amicon) según las instrucciones del fabricante. La enzima proveniente de dos o tres preparaciones fue mezclada y almacenada a -20°C en tampón TBNa suplementado con 50% de glicerol. La actividad enzimática era estable por varios meses. La actividad específica calculada para una preparación típica de His-CK1 usando β -caseína como sustrato variaba entre 0,6 y 1,2 $\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$.

En los experimentos mostrados en la Sección B de Resultados se utilizó además de la enzima $\chi\text{CK1}\alpha$ (His-CK1), una preparación de enzima nativa de CK1 purificada desde hígado de rata (Meggio *y col.*, 1989). Esta preparación contenía una concentración de proteínas de 2,04 mg/ml y una actividad específica de 7,3 $\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$.

6. *Microsecuenciación de proteínas.*

Para determinar la identidad de las proteínas contaminantes de la preparación de GST-CK1, los productos de baja masa molecular presentes en algunas preparaciones fueron secuenciados. Las proteínas a secuenciar fueron separadas en un gel de poliacrilamida y transferidas a una membrana de PVDF (ProBlot). Se identificó la

ubicación de la proteína de interés por tinción con Azul de Coomassie y se retiró el trozo de membrana correspondiente. La proteína inmovilizada fue secuenciada por el método de Edmann de degradación secuencial del extremo N-terminal en un aparato Applied Biosystems 476A en el Centro de Síntesis y Análisis de Biomoléculas, OLIGOPEPTIDO, Universidad de Chile.

7. *Ensayos de la actividad enzimática de XICK1 α .*

7.1. *Ensayos para detectar serina fosforilada:*

La enzima XICK1 α fue ensayada en una mezcla de reacción que contenía en un volumen de 50 μ l: 50 mM Hepes pH 7,4; 150 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 0,5 mM DTT; 50 μ M [γ -³²P]ATP (500-1000 cpm/pmol); 5 mg/ml de β -caseína ó 1 mM del péptido **RRKDLHDDEEDEAMSITA** y normalmente 2 U de GST-CK1 ó His-CK1. Se definió la unidad (U) de actividad CK1 como la cantidad de enzima que cataliza la incorporación de 1 pmol de fosfato en β -caseína por min. Las incubaciones fueron realizadas durante 10 min a 30°C y la reacción se detuvo absorbiendo la solución en trozos de papel de fosfocelulosa Wathman p81 de 2 cm². Los papeles fueron lavados tres veces con ácido fosfórico 75 mM, secados y la radiactividad se determinó en un contador de centelleo líquido. Todos los ensayos se realizaron en duplicado y se restaron los valores obtenidos en ausencia de enzima. Algunas muestras fueron procesadas para cargarlas en geles de poliacrilamida con SDS. Los experimentos son representativos de dos o tres determinaciones independientes.

Para las determinaciones de constantes cinéticas de la enzima GST-CK1, se realizaron determinaciones en condiciones de velocidad inicial (10 minutos de incubación, determinada previamente) con las siguientes concentraciones de sustratos variables y demás condiciones estándares: 2 a 100 μM de ATP, 1 a 400 μM del péptido sustrato **RRKDLHDDEEDEAMSITA** y 0,1 a 20 mg/ml de β -caseína. Para las determinaciones de constantes cinéticas de diversos péptidos sustratos para las enzimas His-CK1 y ratCK1, se realizaron determinaciones en condiciones de velocidad inicial (10 minutos de incubación) variando la concentración de cada péptido sustrato entre 1 y 500 μM . En el análisis de la inhibición por poli(Glu⁸⁰:Tyr²⁰) se varió el sustrato β -caseína entre 0,5 y 2,0 mg/ml y las concentraciones del polipéptido inhibidor fueron 2,0, 5,0 y 7,5 μM , suponiendo una masa molecular de poli(Glu⁸⁰:Tyr²⁰) de 46 kDa. Los datos fueron linearizados por análisis de mínimos cuadrados, graficados en gráficos de dobles recíprocos y ajustados a la ecuación de Michaelis Menten usando el programa MicroCal Origin 2.8 (MicroCal Software Inc.). La constante de inhibición aparente de poli(Glu⁸⁰:Tyr²⁰) fue determinada desde gráficos secundarios $1/V$ v/s $[i]$ para cada concentración de sustrato, donde $[i]$ es la concentración del péptido inhibidor, y de la ecuación $K_i = K_s[i]/(K_{s-i}-K_s)$. Se realizó un análisis de la función de poli(Glu⁸⁰:Tyr²⁰) como inhibidor competitivo y como sustrato alternativo según lo presentado en Siegel, I.H. (1975). La actividad CK2 se determinó en las mismas condiciones que para CK1 usando 1,2 pmol de la subunidad CK2 α y 2 pmol de la subunidad CK2 β como se describe en Hinrichs y col., (1993).

En los ensayos de determinación de la incorporación de ^{32}P en péptidos que contenían residuos básicos, se usó el ensayo con papel de fosfocelulosa descrito anteriormente. En el caso de péptidos ácidos que no contenían residuos básicos la radiactividad incorporada se determinó por hidrólisis parcial a 110°C durante 4 horas en HCl 6 N seguida de electroforesis de alto voltaje en papel Whatman 3M en un tampón de pH 1,9 (ácido fórmico 5%, ácido acético glacial 15%) durante 2 horas a 1400 V y 50 mA. La radiactividad incorporada en el aminoácido serina se cuantificó en un aparato Instant Imager. En forma alternativa los péptidos fosforilados fueron resueltos en geles de poliacrilamida al 16,5% y las señales reveladas por autoradiografía. La fosforilación de sustratos proteicos se determinó separando las proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida seguida de autoradiografía ó análisis directo del gel en un aparato Instant Imager.

En los ensayos de actividad en inmunoprecipitados se usó un volumen de 10 μl de la suspensión final de la inmunoprecipitación como fuente de enzima. En los ensayos actividad CK1 de extractos celulares totales se usó 5 μg de proteína total. En ambos tipos de ensayos la fosforilación de péptidos se determinó por el ensayo con papeles de fosfocelulosa como se describe anteriormente.

7.2. *Ensayos para detectar fosfotirosina:*

En los ensayos para detectar actividad tirosinaquinasa se usaron entre 10 y 20 U de la enzima GST-CK1 y $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 50 μM (3000-5000 cpm/pmol). Como sustrato se usó el polipéptido poli($\text{Glu}^{80}:\text{Tyr}^{20}$) a una concentración de 0,1 mg/ml. Este polipéptido

posee una secuencia al azar compuesta sólo de residuos glutámico y tirosina en una relación 4:1 con una masa molecular promedio de 46 kDa. También se usaron los péptidos **E₄EEYFVFGRRK** y **RRREEEY₄EEEE** en una concentración de 1 mM. La reacción se detuvo en tampón de carga para geles de poliacrilamida y la fosforilación de poli(Glu⁸⁰:Tyr²⁰) dependiente del tiempo, fue detectada por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% y posterior autoradiografía. La fosforilación de los dos péptidos indicados anteriormente, fue detectada por electroforesis en geles de poliacrilamida al 16,5% y posterior autoradiografía.

7.3 Reacción de autofosforilación:

Para la reacción de autofosforilación se incubaron durante 1 hora 20 U de enzima (GST-CK1 ó His-CK1) en las condiciones descritas para los ensayos para detectar fosfotirosina pero en ausencia de sustrato. Las reacciones se detuvieron con tampón de carga para geles de poliacrilamida con SDS y se resolvieron en geles al 10%. La radiactividad incorporada fue cuantificada en un aparato Instant Imager.

8. Tratamiento de GST-CK1 con trombina.

La enzima GST-CK1 fue incubada con trombina para liberar la *X*CK1 α de la glutatión *S*-transferasa. Se incubaron 5 pmoles de la proteína de fusión con 0,5 μ l de una solución de trombina 62 U/ml en un tampón que contenía Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM y CaCl₂ 2,5 mM, durante 1 hora a 25°C. Los productos de la reacción fueron

separados en geles de poliacrilamida al 10% con SDS y la *XICK1* α fue detectada mediante un ensayo de Western Blot con un anticuerpo específico.

9. *Análisis de fosfoaminoácidos.*

Las proteínas y los péptidos fosforilados fueron secados en un aparato Speed-Vac, resuspendidos en agua y se les agregó un volumen igual de HCl 12 M. En forma alternativa, las proteínas fosforiladas fueron resueltas en geles de poliacrilamida al 10% y transferidas a membranas de PVDF (difluoruro de polivinilideno). Los trozos de membrana que contenían las proteínas fosforiladas fueron identificados por autoradiografía y retirados. Las proteínas en solución ó los trozos de membrana que las contenían se sometieron a hidrólisis en HCl 6 M durante 2 horas a 115°C. Posterior a la hidrólisis se evaporó el HCl y los productos se resuspendieron en 25 μ l de agua y se aplicó 10 μ l a una placa cromatográfica. Los productos de la hidrólisis se separaron por cromatografía ascendente de capa fina en placas de sílica con una mezcla de solventes que contenía etanol absoluto:amoníaco = 3,5:1,6 como se describe en Muñoz y Marshall (1990). Los fosfoaminoácidos estándares fueron visualizados por tinción con una solución de ninhidrina (ninhidrina 0,3%, ácido acético 3% en *n*-butanol) y los fosfoaminoácidos radiactivos fueron detectados por autoradiografía.

10. *Digestión química con CNBr.*

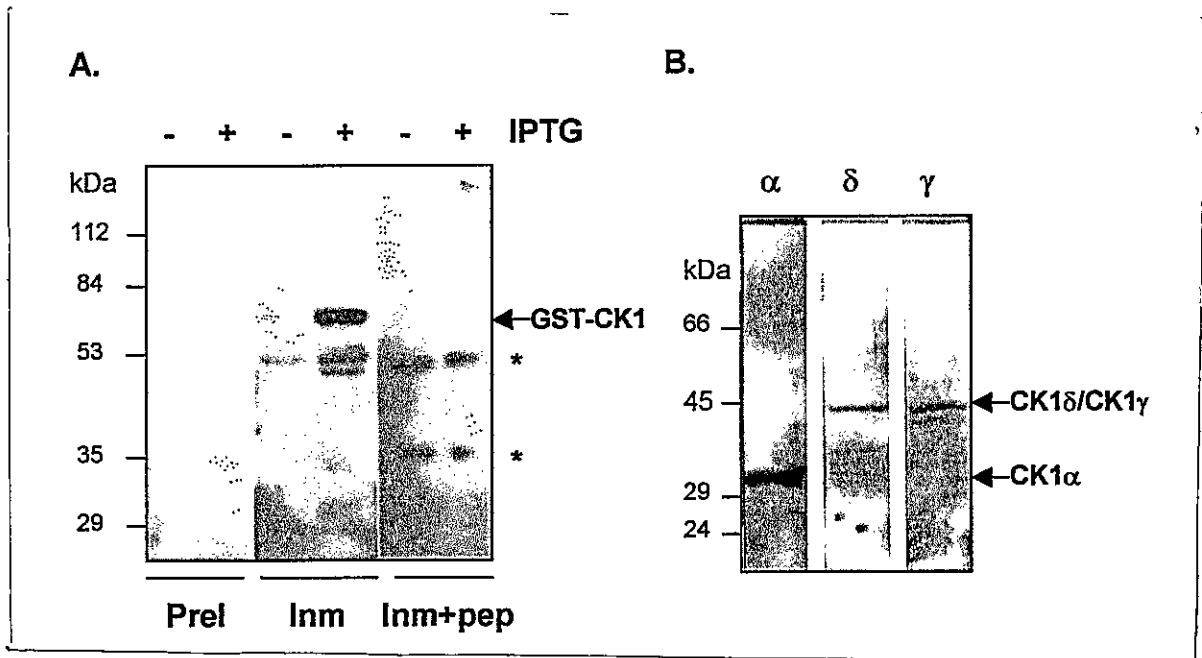
La enzima *XICK1* α como His-CK1 fue autofosforilada por diferentes tiempos (0 a 60 min) en las condiciones descritas en la Sección 4. Las reacciones de

autofosforilación fueron separadas en un gel de poliacrilamida al 10% con SDS y las proteínas transferidas a una membrana de PVDF como se describe en la Sección 9. Los trozos de membrana que contenían las proteínas marcadas en forma radiactiva fueron identificados en un aparato Instant Imager. Estas secciones de membrana fueron incubadas en la oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución de CNBr 1 mg/ml en tubos eppendorf previamente tratados con silicona. Transcurrida la incubación, los productos de digestión fueron separados en un gel de poliacrilamida al 20% con SDS e identificados por autoradiografía.

11. *Western Blot e inmunoprecipitación.*

Se analizaron las secuencias primarias de CK1 α , δ y γ , usando los programas computacionales ANTIGEN, PALIGN y CLUSTAL de PCGene y además por inspección visual y se seleccionaron regiones que resultaran específicas de cada una de ellas: **G¹⁴⁷RHCNKLFLLIDFGLAKKY¹⁶⁴** para CK1 α de *X. laevis* (Pulgar y col., 1996); **E³⁰⁵RERRDREER³¹⁴** para CK1 δ de rata (Graves y col., 1995); y **Q¹⁰³VYYFGPCGKY¹¹³** para CK1 γ de rata (Zhai y col., 1995). Estas secuencias peptídicas fueron sintetizadas como derivados "octopus" por OLIGOPEPTIDO, Universidad de Chile, y se usaron para generar antisueros en conejos. La secuencia usada para generar el anticuerpo antiCK1 α es común a CK1 α y β (Rowles y col., 1991); la secuencia usada para generar el anticuerpo antiCK1 δ es común a CK1 δ y CK1 ϵ (Graves y Roach, 1995; Fish y col., 1995), mientras que la secuencia usada para generar el anticuerpo antiCK1 γ es común a las tres subisoformas de CK1 γ descritas (γ_1 , γ_2 y γ_3 ;

Zhai y col., 1995). El Esquema 4A muestra el uso del anticuerpo antiCK1 α para detectar GST-CK1 en extractos de células de *E.coli* que expresan esta proteína. Las proteínas purificadas ó extractos celulares fueron separados en geles de poliacrilamida al 10% y transferidas a una membrana de nitrocelulosa a 350 mA durante 90 min en un tampón que contenía Tris 20 mM, glicina 190 mM y metanol 20%. La membrana de nitrocelulosa fue bloqueada con BSA 3% en tampón TBS (Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM) durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana fue incubada con los antisueros correspondientes en una dilución que variaba entre 1:1000 y 1:750, en tampón TBS suplementado con 1% BSA y 0,02% de NaN₃, durante toda la noche a 4°C con agitación suave. Los anticuerpos unidos fueron detectados por medio de una reacción colorimétrica usando un segundo anticuerpo conjugado a fosfatasa alcalina y posterior incubación en una solución compuesta de Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl₂ 5 mM. Como sustratos se usaron 5-bromo-4-cloro-indolil fosfato (BCIP) 165 μ g/ml y nitro azul de tetrazolium (NBT) 165 μ g/ml. En los casos en que se usó un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa la reacción se reveló con reactivos de quimioluminiscencia ECL (Amersham). El Esquema 4B muestra la identificación de CK1 α , CK1 δ y CK1 γ en una preparación de enzima CK1 nativa altamente purificada desde hígado de rata (Meggio y col., 1989). Se observa una señal única con los tres anticuerpos y los valores de tamaño molecular corresponden a los esperados para CK1 α , δ y γ . En particular, la señal reconocida por antiCK1 γ es consistente con la subisoforma γ_3 mientras que el grosor de la señal reconocida por antiCK1 α puede reflejar un duplete consistente con la presencia en rata de dos subisoformas CK1 α y CK1 α L que difieren en



ESQUEMA 4 *Análisis de la especificidad de los anticuerpos antiisoformas de CK1*

A. Extractos totales (20 μ g) de células *E. coli* que expresan la proteína de fusión GST-CK1 inducidas con IPTG 0,5 mM durante 3 h (+) o no inducidas (-), fueron resueltos en un gel de poliacrilamida al 10% con SDS y transferidos a una membrana de nitrocelulosa. Las proteínas se incubaron con antiCK1 α . Se muestra la incubación con un suero preinmune en una dilución 1:1000 (PreI), suero inmune en una dilución 1:1000 (Inm) y suero inmune preabsorbido con el péptido inmunogénico (Inm+pep). La flecha señala la banda correspondiente a la enzima GST-CK1. Se indica la posición de estándares de masa molecular. En la incubación del suero inmune con el péptido antigénico (Inm+pep) se observa la intensificación de algunas señales presentes en la incubación con el suero inmune (Inm) debido a un mayor tiempo de exposición de la membrana a los sustratos de la enzima peroxidasa usada en la reacción de revelado.

B. 100 μ g de proteína total de una preparación de CK1 nativa de hígado de rata fueron resueltos en un gel de poliacrilamida al 10% con SDS y transferidos a una membrana de nitrocelulosa. Las proteínas se incubaron con los anticuerpos antiCK1 α (α), antiCK1 β (β) y antiCK1 γ (γ) en una dilución 1:750. Las flechas señalan las bandas correspondientes a las enzimas CK1 α , CK1 δ y CK1 γ . Se indica la posición de estándares de masa molecular. Las bandas adicionales que se observan con el anticuerpo antiCK1 γ podrían representar algunas de las subisoformas CK1 γ descritas.

28 residuos (Zhang y col., 1996). La inmunoprecipitación de las isoformas de CK1 desde la preparación de enzima CK1 nativa de hígado de rata (ratCK1) fue realizada incubando 20 µg de proteína total de la preparación ratCK1 con 5 µl de antisuero en 500 µl de tampón IP (Tris HCl 10-mM pH 7,5, glicerol 25%, PMSF 25 µM, NaN₃ 0,02%) durante toda la noche a 4°C con agitación suave. Al día siguiente se agregó 50 µl de una suspensión al 50% de Proteína A-Sefarosa en tampón PBS y se continuó la incubación por 2 horas adicionales. Los inmunoprecipitados se lavaron dos veces en tampón IP, una vez en tampón quinasa y se resuspendieron en 100 µl de tampón quinasa. Para los ensayos de actividad enzimática, se usaron 10 µl de la suspensión como fuente de enzima. Los anticuerpos antiCK1α, antiCK1δ y antiCK1γ permiten la inmunoprecipitación, desde ratCK1, de una actividad que fosforila β-caseína y un péptido específico de la familia de proteínaquinasas CK1. Se observó que sólo el anticuerpo antiCK1α y no los anticuerpos antiCK1δ y antiCK1γ, inmunoprecipitaba las proteínas recombinantes GST-CK1 ó His-CK1.

12. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS.

Se analizaron entre 20 y 50 µg de proteínas totales de extractos de células en geles de poliacrilamida preparados según el método de Laemmli (1970). El gel separador contiene acrilamida 10%; bisacrilamida 0,25%; Tris HCl 0,375 mM pH 8,8; SDS 0,1%; TEMED 0,025% y persulfato de amonio 0,037%. El gel espaciador está compuesto por acrilamida 3%; bisacrilamida 0,08%; Tris HCl 0,125 mM pH 6,8; SDS 0,1%; TEMED 0,1% y persulfato de amonio 0,13%. Las proteínas se calentaron a

ebullición durante 5 minutos en una solución que contiene Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8; SDS 2%; glicerol 10%; azul de bromofenol 0,02% y β -mercaptoetanol 50 mM, y se analizaron en el gel. La electroferesis se realizó a un voltaje constante entre 100 a 200 V en una solución de electrolito que contiene Tris 25 mM pH 8,0; glicina 190 mM; SDS 0,1%. En algunos casos se varió el porcentaje de acrilamida según los requerimientos del experimento. Como patrón de tamaño molecular se usaron diversos estándares comerciales que cubrían un rango de valores entre 14 y 220 kDa. En el caso que las proteínas fueran posteriormente transferidas a membrana se usaron estándares preteñidos.

13. Cultivo de células.

13.1. Líneas celulares

Se usaron las líneas celulares *cos-7* gentilmente cedidas por el laboratorio de la Dra. María Rosa Bono, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile y fibroblastos de ratón Balb-c 3T3 (clon A31) gentilmente cedidas por la Dra. Mari Armelin, Instituto de Química, Universidad de Sao Paulo.

13.2. Condiciones generales.

Las líneas celulares usadas fueron cultivadas adheridas en frascos de cultivo de plástico en un incubador Shellab modelo IR2424 a 37°C en una atmósfera que contenía 5% CO₂ y una humedad relativa mayor que 80%. Para los estudios de

inmunofluorescencia las células se crecieron adheridas a láminas de vidrio de 5 mm² ubicadas en el fondo de placas de plástico de 60 mm de diámetro (p60).

Como medio de cultivo se usó medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 4,5 g/l de glucosa. Al momento de la preparación del medio se le adicionó 3,7 g/l de bicarbonato de sodio y los antibióticos penicilina y streptomina a una concentración de 100 U/ml y 100 µg/ml respectivamente. El medio fue esterilizado por filtración en un aparato de presión negativa usando filtros de 47 mm y con poros de 0,2 µm de diámetro. Usualmente el medio DMEM contenía 10% de suero fetal de bovino (FBS), excepto en los experimentos en que se indica el porcentaje de suero presente.

Todos los procedimientos de propios del cultivo, subcultivo y transfección de células fueron realizados en una campana de flujo laminar FACTOMET equipada con luz UV una sistema de recirculación y filtrado del aire.

13.3. Subcultivo de células.

Para mantener los cultivos las células fueron subcultivadas en forma periódica cada 2 a 3 días. Para realizar el subcultivo de las células éstas se incubaron, por 5 a 10 min en el incubador a 37°C, con una solución de 0,25% de tripsina y 10 mM EDTA en tampón PBS. Posterior a la incubación, la tripsina fue inactivada y las células colectadas con DMEM suplementado con 10% FBS. Las células colectadas se sembraban en frascos ó placas con medio fresco.

14. Transfección de células en cultivo

14.1. Procedimiento de transfección de células usando DEAE-dextrano.

Se cultivaron células en las condiciones descritas anteriormente hasta que el cultivo alcanzó entre un 50 a 80% de subconfluencia. Usualmente se plaqueó un total de 1×10^6 células *cos-7* en 4 placas p60 y al día siguiente se realizó el experimento de transfección. Las células se retiraron del incubador, se lavaron 2 veces con tampón PBS mantenido a 37°C y se incubaron con la mezcla de transfección. La mezcla de transfección contenía 2 a 5 µg del DNA plasmidial de interés y 300 µg/ml de DEAE-dextrano, en tampón PBS en un volumen de 600 µl. Las células se incubaron con la mezcla de transfección durante 30 min en el incubador con agitación suave en forma ocasional. Transcurrida esta incubación se agregó medio DME sin FBS suplementado con 100 µM de quinolina y se incubó durante 3 horas en el incubador. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se reemplazó con medio DME fresco suplementado con 10% FBS. Las células se incubaron durante 48 a 72 horas y se procesaron para análisis posteriores.

14.2. Procedimiento de transfección de células usando Lipofectamina.

Se preparó un tubo que contenía 2 a 5 µg del DNA plasmidial de interés en 250 µl de medio DME sin FBS y sin antibióticos. En otro tubo se mezcló 12 µl de Lipofectamina en 250 µl de medio DME sin FBS y sin antibióticos. Ambos tubos se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente y posteriormente se mezclaron. Las células (*cos-7* y fibroblastos Balb-c 3T3), al estado de subconfluencia, se lavaron 2

veces con PBS, se les agregó 3 ml de medio DME sin FBS y sin antibióticos y se incubaron con la mezcla descrita durante 2,5 horas en el incubador. Transcurrida la incubación se agregó 3,5 ml de medio DME sin antibióticos y suplementado con 20% de FBS de modo que las células tranfectadas se mantenían en 10% FBS. Al día siguiente se retiró el medio de cultivo y se cambió por medio DME con antibióticos y suplementado con 10% FBS. Las células se incubaron por 24 ó 48 horas adicionales y se procesaron para análisis posteriores.

14.3. Determinación de la eficiencia de transfección.

La eficiencia de transfección de las células cos-7 con los métodos descritos anteriormente se determinó por transfección con un vector que permite la expresión de la enzima β -galactosidasa. Al término del período de transfección las células se lavaron en PBS y se fijaron en formaldehído 3,7% durante 10 minutos. Las células se lavaron en PBS y se incubaron en la mezcla de tinción que contenía $MgCl_2$ 2 mM, $K_3Fe(CN)_6$ 5 mM, $K_4Fe(CN)_6$ 5 mM, X-gal 0,1%, NP-40 0,02% en PBS durante 4 horas. Transcurrida la incubación se medía la cantidad de colonias azules y se expresaba como porcentaje del total de células. Usando los métodos de transfección con DEAE-dextrano y Lipofectamina se obtenía entre un 10 y un 30% de eficiencia de transfección.

15. Preparación de extractos celulares totales.

Para la preparación de los lisados totales las células fueron lavadas en PBS frío y retiradas de las placas con la ayuda de un raspador para células. Las células fueron

colectadas por centrifugación a 3000 rpm durante 5 min a 4°C y resuspendidas en forma homogénea en tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; NaCl 100 mM; NP-40 1%; glicerol 10%; vanadato de sodio 1 mM; PMSF 1mM; leupeptina, aprotinina y pepstatina a una concentración de 2 µg/ml cada uno. Después de incubar 30 min en hielo se separó la fase soluble por centrifugación a 14.000 rpm durante 15 min a 4°C. Se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bradford, 1976). Los lisados se almacenaron en alícuotas a -70°C.

16. *Inmunofluorescencia indirecta en células en cultivo.*

Las células se cultivaron en láminas de vidrio de 5 mm² ubicadas en el fondo de placas de plástico de 60 mm de diámetro y se transfectaron como se describe en las secciones precedentes usando la técnica de Lipofectamina. Al término de la transfección las células fueron lavadas en tampón PBS e incubadas durante 5 min a temperatura ambiente en 3,7% de formaldehído para fijarlas. Posterior a la fijación las células podían ser almacenadas a 4°C en PBS con NaN₃ 0,1%. Para la permeabilización se utilizó un protocolo básico de incubación en acetona a -20°C durante 2 min. Una vez permeabilizadas las células se incubaron con los anticuerpos correspondientes.

Para la detección de las isoformas CK1 endógenas se utilizaron los anticuerpos antiCK1 α , antiCK1 δ y antiCK1 γ descritos en el ESQUEMA 4. Para la detección de las isoformas CK1 transfectadas se utilizó el anticuerpo monoclonal antiHA que reconoce el epitopo de hemaglutinina presente en las células transfectadas. Como controles se incubó solamente con el segundo anticuerpo y se utilizaron los sueros preinmunes

correspondientes. Como marcadores de localización subcelular se utilizaron: un anticuerpo que reconoce la proteína T grande del virus SV40 (antiT-SV40), un anticuerpo anti α -tubulina y el compuesto ER-TrackerTM Blue-White que marca específicamente membranas del retículo endoplásmico.

16.1. Incubación con el primer anticuerpo.

Se incubó con el anticuerpo monoclonal generado en ratón antiHA en una dilución 1:50. En el caso de los anticuerpos antiisoformas CK1 se usó una dilución 1:100. La incubación se realizó adicionando 25 μ l de la solución de anticuerpo diluido en tampón PBS, sobre la lámina que contenía las células e incubándolas en una "cámara húmeda" dentro del incubador de CO₂ durante 30 a 45 min. La "cámara húmeda" consistía de una placa petri de vidrio de 150 mm de diámetro que contenía un trozo de parafilm ubicado sobre 3 trozos de papeles filtro Wathman 3MM humedecidos con agua. Transcurrida esa incubación las láminas se lavaron en 3 vasos de precipitados que contenían tampón PBS pasándolas varias veces por la interface aire-líquido.

16.2. Incubación con el segundo anticuerpo

En los casos en que se usó un primer anticuerpo generado en ratón se utilizó como segundo anticuerpo un anti IgG de ratón conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) en una dilución 1:50. En los casos en que se usaba un primer anticuerpo generado en conejo se usó como segundo anticuerpo un anti IgG de conejo conjugado a isotiocianato de tetrametil rodamina (TRITC) en una dilución de 1:1000. Se incubaron

las láminas con el segundo anticuerpo durante 45 min en la cámara húmeda dentro del incubador y posteriormente se lavaron en forma similar a lo descrito anteriormente con un lavado adicional en agua. En los casos que se realizó la tinción de la cromatina se incubó las láminas en este estado con 25 μ l de una solución de yoduro de propidio 10 μ g/ml durante 2 min. La solución de tinción se dejó escurrir y se montaron las láminas en portaobjetos sobre una gota de líquido de montaje.

16.3. Marcación con ER-Tracker.

El uso del marcador de retículo endoplásmico ER-TrackerTM Blue-White se realizó según las instrucciones del fabricante (Molecular Probes). Las células vivas se lavaron y se incubaron durante 1 hora en medio de cultivo sin FBS suplementado con el compuesto marcador en una concentración de 1 μ M. Transcurrida la incubación las células se fijaron en formaldehído, se permeabilizaron en Tritón 0,2% durante 20 minutos a temperatura ambiente y se continuó con las incubaciones con los anticuerpos.

17. Detección de la fluorescencia de las proteínas transfectadas y adquisición de las imágenes.

La detección de la fluorescencia emitida por los fluoróforos indicados (FITC, TRITC, yoduro de propidio, ER-Tracker) y la adquisición de las imágenes se realizó en la Unidad de Análisis Celular Integral (UACI) de la facultad de Medicina Universidad de Chile en un Microscopio Confocal, marca Zeiss Modelo LSM-410 Axiovert 100, provisto de tres rayos laser (488, 543, 633 nm) y los filtros apropiados. En forma

alternativa se utilizó un Microscopio Fotométrico marca Zeiss Modelo MPM400 con sistema de observación de epifluorescencia y unidad microfotográfica para registro de imágenes modelo MC100 Spot.

18. *Análisis estadístico.*

En el caso de las determinaciones de actividad quinasa en extractos celulares totales se realizó un análisis estadístico de los resultados. Se utilizó un análisis de varianza de una vía (ANDEVA) para determinar la significancia de las diferencias observadas y una prueba a posteriori de Tuckey (HSD) para probar las diferencias observadas entre los grupos de determinaciones. El análisis se realizó según se describe en Sokal y Rohlf (1995), utilizando el programa STATISTICS v. 7.0.

RESULTADOS

SECCIÓN A. CARACTERIZACION DE LA ENZIMA CK1 α RECOMBINANTE DE *X. laevis*.

1. *CK1 α de X. laevis expresada en bacterias y purificada: como una proteína de fusión con glutatión S-transferasa (GST-CK1) y como una proteína con 6 residuos histidina adicionales (His-CK1).*

En un trabajo anterior de nuestro laboratorio, el gen que codifica para la isoforma α de la enzima CK1 de *X. laevis* (*XICK1 α*) fue aislado desde una genoteca de oocitos y clonado en el vector de expresión procariótico pGEX2T.

El punto de partida del trabajo de esta Tesis fue la expresión de CK1 α de *X. laevis* en *E. coli* DH5 α como una proteína de fusión con glutatión S-transferasa (GST-CK1). La enzima fue purificada por afinidad por medio de una resina de Glutatión-Sefarosa según se describe en Materiales y Métodos. La Figura 1A muestra la purificación de GST-CK1 desde 1 litro de cultivo de bacterias. Se observa la gran insolubilidad de esta proteína de fusión de 63 kDa, manteniéndose en la fracción sedimentada la gran mayoría de la proteína expresada. Diferentes sistemas de extracción de la fracción insoluble fueron probados con el objetivo de recuperar la enzima en forma activa, con el resultado que la enzima solubilizada no mantuvo su actividad catalítica. A pesar de lo anterior fue posible obtener una cantidad de enzima en la fracción soluble suficiente para realizar la caracterización bioquímica. En la fracción eluída de la columna de glutatión-sefarosa es posible distinguir otros polipéptidos de baja masa

molecular los que corresponderían a productos de degradación proteolítica de la enzima GST-CK1. Por medio de microsecuenciación, varios de éstos polipéptidos fueron identificados como glutatión *S*-transferasa, cuya masa molecular corresponde a 26 kDa, lo que corrobora la idea de que estos componentes son productos de proteólisis de GST-CK1.

Como una alternativa a la preparación de la proteína de fusión GST-CK1, la región codificante de *XICK1*α fue clonada en un derivado del vector pT7-7, el pT7-7H6, generado en nuestro laboratorio. Este vector permite la expresión de las proteínas en *E.coli* con una secuencia adicional de 6 residuos histidina (His-CK1α), y su posterior purificación en una columna de afinidad que contiene Ni⁺². La estrategia de clonamiento se describe en Materiales y Métodos. La proteína His-CK1 fue purificada desde *E.coli* BL21 (DE3) con el uso de una resina de Níquel-NTA-Agarosa y posteriormente eluída con un gradiente de imidazol desde 10 a 200 mM. En la Figura 1B se muestra la purificación de His-CK1. En ambos sistemas de expresión y purificación se observan productos de baja masa molecular. Este tipo de contaminación fue muy variable entre diferentes preparaciones y estos productos no interactúan con un anticuerpo antiCK1α (ver Figura 3C).

La proteína de fusión GST-CK1 posee un sitio de digestión para la proteasa trombina situado entre las secuencias codificantes para glutatión *S*-transferasa y *XICK1*α. Con el objetivo de separar la glutatión *S*-transferasa de la enzima *XICK1*α se realizó una digestión con trombina por diferentes tiempos. Según se muestra en la Figura 2A, esta incubación genera una banda única cuando es ensayada con el anticuerpo

antiCK1 α , de un tamaño de 38 kDa. Sin embargo, al analizar la actividad CK1 como función del tiempo de hidrólisis se observa una pérdida de la actividad enzimática (Figura 2B). Por esta inestabilidad de la enzima purificada, la mayoría de los estudios de caracterización de CK1 α de *X. laevis* fueron realizados con la proteína de fusión GST-CK1. Por otro lado, una preparación estable de His-CK1 fue obtenida por concentración en aparatos de filtración Centricon, combinando varias preparaciones.

Al comparar ambos métodos de purificación se observa que una característica común es la gran insolubilidad de las proteínas producidas, en el caso de GST-CK1 alrededor de un 90% de la cantidad de proteína inducida permanece en la fracción insoluble. En la purificación de His-CK1 se obtiene un mejor rendimiento de la proteína en forma soluble y la estabilidad de la proteína expresada mejora notablemente.

2. *GST-CK1 se comporta como una proteínaquinasa CK1.*

Para verificar que la enzima recombinante producida en bacterias como proteína de fusión poseía las características de la enzima CK1 nativa se estudió el comportamiento de GST-CK1 en varios aspectos. Se determinó que GST-CK1 era capaz de fosforilar β -caseína y un péptido sustrato sintético derivado de la proteína Inhibidor-2 de fosfatasa-1 (RRKDLHDDEEDEAMSITA) descrito por el laboratorio del Prof. Lorenzo Pinna (Marin y col., 1994). La Tabla 1 muestra los valores de K_m aparente determinados para ATP, β -caseína y el péptido sustrato ya indicado. Se observa que los valores determinados son muy similares a los reportados para la enzima purificada desde diversos tejidos animales.

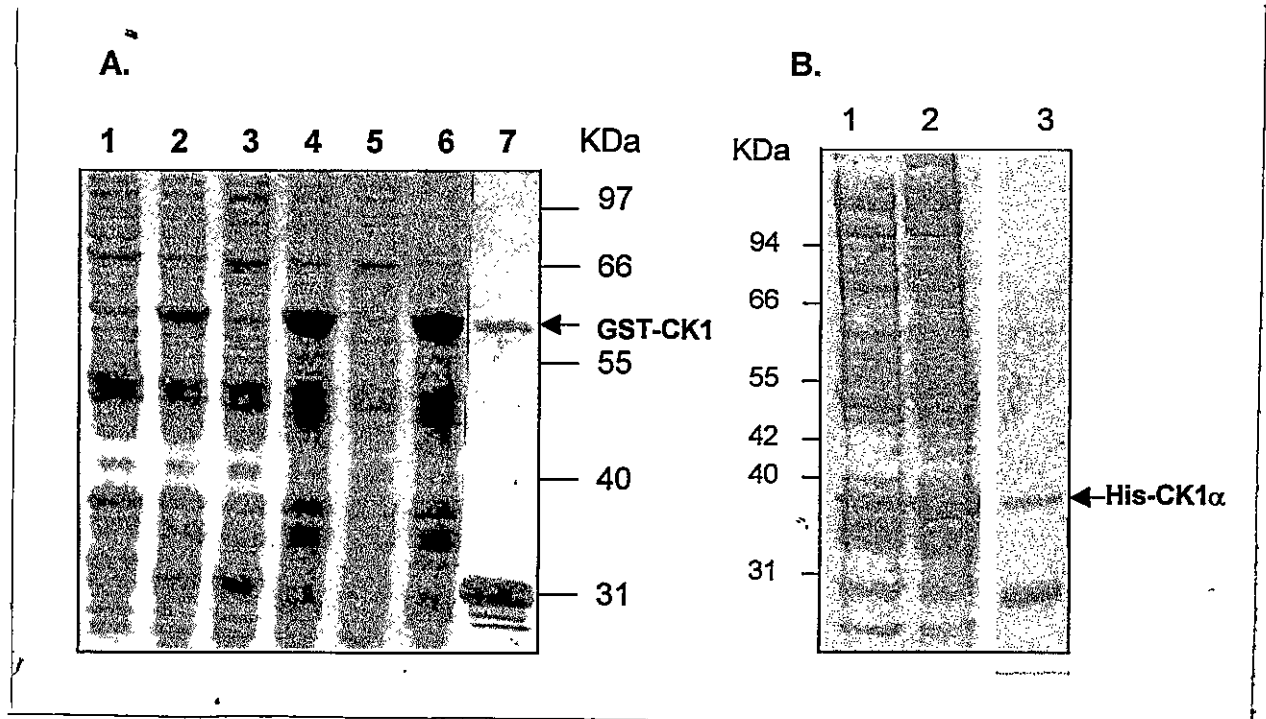


Figura 1. Purificación de CK1 α de *X. laevis* como proteína de fusión con glutatión transferasa y como una proteína con 6 residuos histidina adicionales.

A. Purificación de GST-CK1 desde *E. coli* DH5 α transformadas con el vector pGEX-2T-XICK1 α según se detalla en Materiales y Métodos. Carril 1; células *E. coli* no inducidas; Carril 2: células inducidas con IPTG; Carril 3: fracción soluble 1; Carril 4: fracción insoluble 1; Carril 5: fracción soluble 2; Carril 6: fracción insoluble 2; Carril 7: proteína eluida desde la columna de Glutatión-Sefarosa. La flecha señala la posición de la proteína GST-CK1.

B. Purificación de His-CK1 desde *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el vector pT7-7H6-XICK1 α según se detalla en Materiales y Métodos. Carril 1; células *E. coli* no inducidas; Carril 2: células inducidas con IPTG; Carril 3: proteína eluida desde la columna de Ni²⁺-NTA-Agarosa. La flecha señala la posición de la proteína His-CK1. Se indica la posición de estándares de masa molecular.

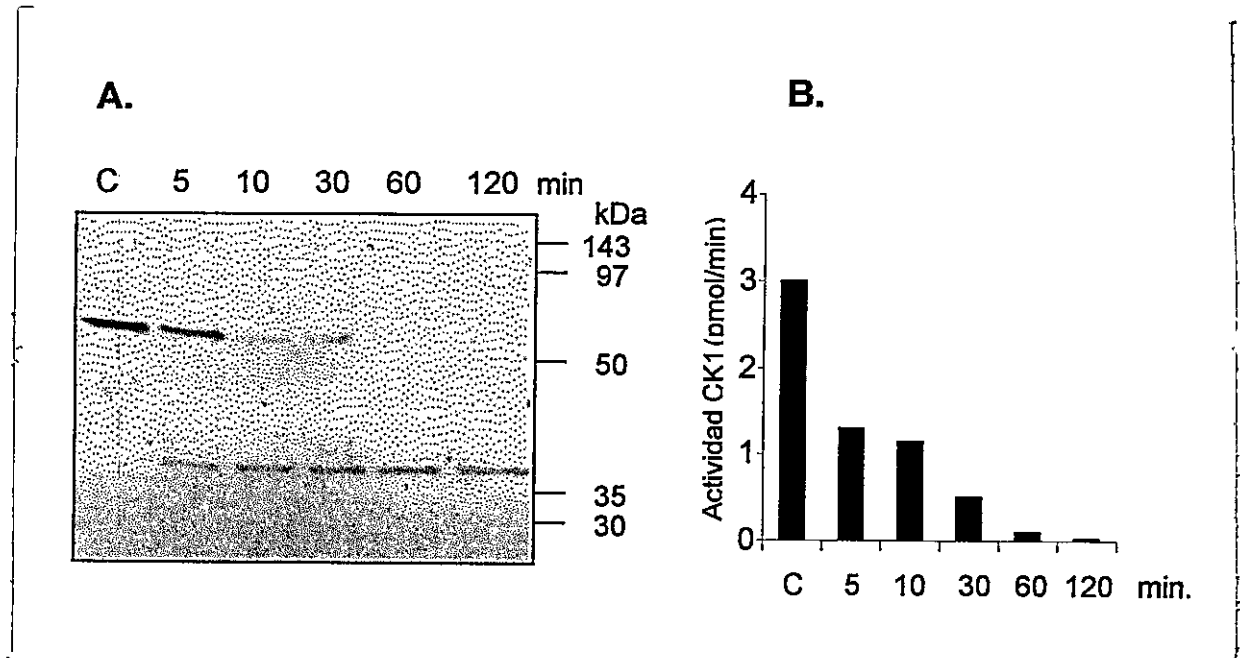


Figura 2. Efecto de la liberación de XICK1 α desde la proteína de fusión.

Se incubaron 2 U de GST-CK1 con 0,3 U de trombina según se describe en Materiales y Métodos.

A. Se detuvo la reacción a los tiempos indicados con tampón de carga para geles SDS-PAGE y las proteínas fueron analizadas en un gel de 10% poliacrilamida y posteriormente visualizadas por Western Blot utilizando el anticuerpo antiCK1 α como se indica en Materiales y Métodos.

B. Se midió simultáneamente la actividad enzimática de CK1 en alícuotas de la reacción con trombina utilizando como sustrato β -caseína.

Se ha descrito que para CK1 la K_m aparente para ATP, una de la más bajas reportada entre las proteínquinasas, varía entre 7 y 25 μM (Tuazon y Traugh, 1991), mientras que para el péptido sustrato se ha determinado una K_m aparente de 184,5 μM usando CK1 purificada desde hígado de rata (Marin *et al.*, 1994). En un análisis de la actividad CK1 presente en núcleos de oocitos de *X. laevis* se determinó un valor de 12 μM para la K_m aparente para ATP (Leiva *et al.*, 1987). Nuestros valores, obtenidos con la enzima recombinante GST-CK1, son muy concordantes con estos datos de la literatura.

Con frecuencia se ha usado heparina como un medio para discriminar entre las proteínquinasas que fosforilan sustratos ricos en aminoácidos ácidos como CK1 y CK2. La proteínquina CK2 posee valores de I_{50} de 0,3 $\mu\text{g/ml}$ o menores, las preparaciones de CK1 en cambio no se ven afectadas por este compuesto a concentraciones 50 veces mayores (Hathaway y Traugh, 1982). Como se muestra en la Figura 3A, usando β -caseína como sustrato, GST-CK1 es sólo levemente inhibida aún a las más altas concentraciones de heparina usadas, mientras que CK2 es muy inhibida.

Se ha descrito un compuesto derivado de sulfonamida, *N*-(2-aminoetil-5-cloroisoquinolina-8-sulfonamida, denominado CK1-7, que actúa como un inhibidor específico de la familia de proteínas quinasas CK1 (Chijiwa *et al.*, 1989). Como se muestra en la Figura 3B, CK1-7 se comporta como un inhibidor de GST-CK1 y de His-CK1 con un I_{50} de ~ 50 μM para ambas preparaciones. Esta inhibición se verifica al usar tanto β -caseína como un péptido específico como sustratos. Este nivel de efecto del inhibidor también coincide con los valores informados en la literatura para CK1 nativa aislada desde diferentes tejidos animales.

Sustratos usados	GST-CK1 ^(a)	(b)	(c)
ATP	14 ± 2 μM	7-25 μM ⁽¹⁾	12 μM
β-caseína	1,5 ± 0,3 μg/ml	1,3 μg/ml ⁽²⁾	n.d
RRKDLHDDEE <u>DE</u> AMSITA	190 ± 9 μM	184,5 μM ⁽³⁾	n.d.

Tabla 1: Valores de K_m aparente para diferentes sustratos de XICK1 α .

Los valores de K_m aparente para GST-CK1 fueron determinados en condiciones de velocidad inicial según se describe en Materiales y Métodos.

^(a): valores obtenidos con la enzima XICK1 α como proteína de fusión GST-CK1 (Pulgar y col., 1996).

^(b): valores reportados en la literatura para la enzima CK1 purificada desde tejidos animales. ⁽¹⁾ Hathaway y Traugh, (1982), ⁽²⁾ Meggio y col., (1991), ⁽³⁾ Marin y col., (1994).

^(c): valores reportados para la enzima CK1 aislada desde núcleos de oocitos de *X. laevis* (Leiva y col., 1987). n.d: no determinado.

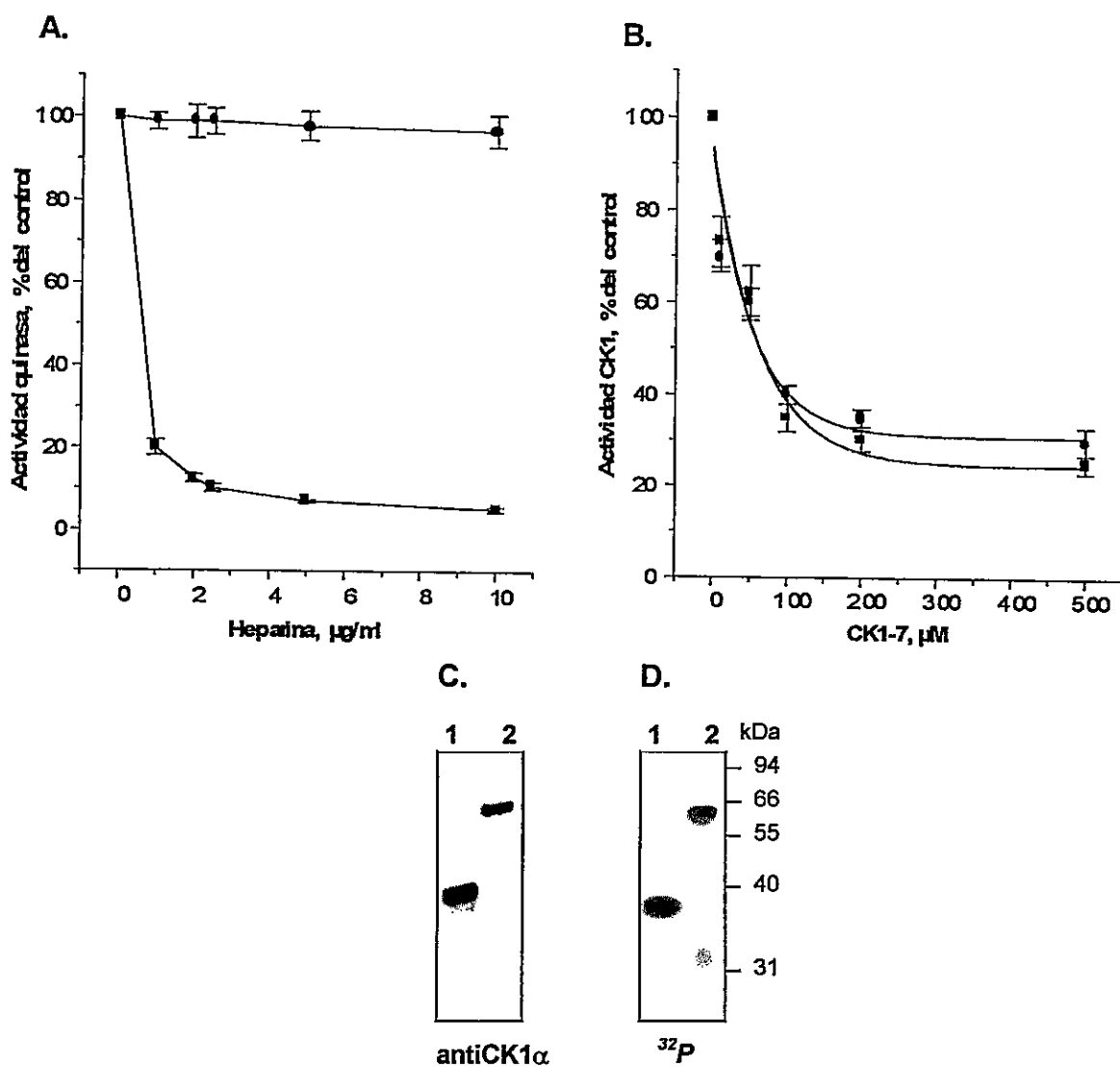


Figura 3. *Propiedades de GST-CK1 e His-CK1.*

- A. Se ensayó la actividad quinasa de GST-CK1 y CK2 recombinante usando β -caseína como sustrato, en presencia de cantidades crecientes de heparina. Se usaron 4 U de GST-CK1 (●) que incorporan 4 pmol/min de ^{32}P en el sustrato en ausencia de heparina (100%). Para CK2 (■) se usaron 1,2 pmol de la CK2 α y 2 pmol de CK2 β que incorporan 38 pmol/min de ^{32}P en el sustrato en ausencia de heparina (100%).
- B. La actividad quinasa de GST-CK1 (●) e His-CK1 (■) fue ensayada en presencia de cantidades crecientes de CK1-7 usando β -caseína como sustrato.
- C. Western Blot de las proteínas His-CK1 (carril 1) y GST-CK1 (carril 2) usando el anticuerpo antiCK1 α . Se cargaron 5 μg de proteína total de cada preparación. La señal fue revelada usando el sistema ECL (Amersham).
- D. Autofosforilación de His-CK1 (carril 1) y GST-CK1 (carril 2). Se autofosforilaron 5 U de His-CK1 y GST-CK1 en presencia de 50 μM [γ - ^{32}P]ATP, 5000 cpm/pmol, durante 30 minutos a 30°C. Se indica la posición de estándares de masa molecular.

Al ser incubadas con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ en ausencia de sustrato, ambas formas recombinantes de $X\text{ICK1}\alpha$ son capaces de autofosforilarse (Figura 3C), observándose una leve marcación radiactiva en algunos productos contaminantes de ambas preparaciones. Esta reacción de autofosforilación será analizada con mayor detalle más adelante. Estas proteínas son además reconocidas con eficiencia similar, por el anticuerpo antiCK1 α preparado en nuestro laboratorio (Figura 3D).

Como se mencionó anteriormente, los contaminantes observados en la preparación de GST-CK1 corresponden a productos de degradación de la enzima, principalmente GST liberada desde la proteína de fusión. Con el objetivo de analizar el efecto que GST podría tener sobre la actividad enzimática de GST-CK1, se analizó otra preparación de esta enzima midiendo la actividad contra un péptido sustrato en presencia de cantidades crecientes de GST. Como se observa en la Figura 4, un exceso molar de 100 veces (500 pmoles de GST versus 5 pmoles de GST-CK1, Figura 4A, barra 5), posee sólo alrededor de un 5% de efecto inhibitorio sobre la actividad.

Tomando en consideración los resultados anteriores obtenidos al analizar el efecto de GST sobre la actividad enzimática (Figura 4A), la similitud entre las propiedades de ambas preparaciones de enzima recombinante en relación a la inhibición por CK1-7 (Figura 3B) y a la K_m determinada para el péptido **RRKDLHDDEEDEAMSITA** (Tabla 1 y Tabla 3) y muy especialmente lo concordante que resultan los parámetros cinéticos obtenidos en este trabajo con los reportados con anterioridad en la literatura para otras formas de CK1 (Tabla 1), podríamos afirmar que ambas preparaciones de enzima (His-CK1 y GST-CK1) poseen

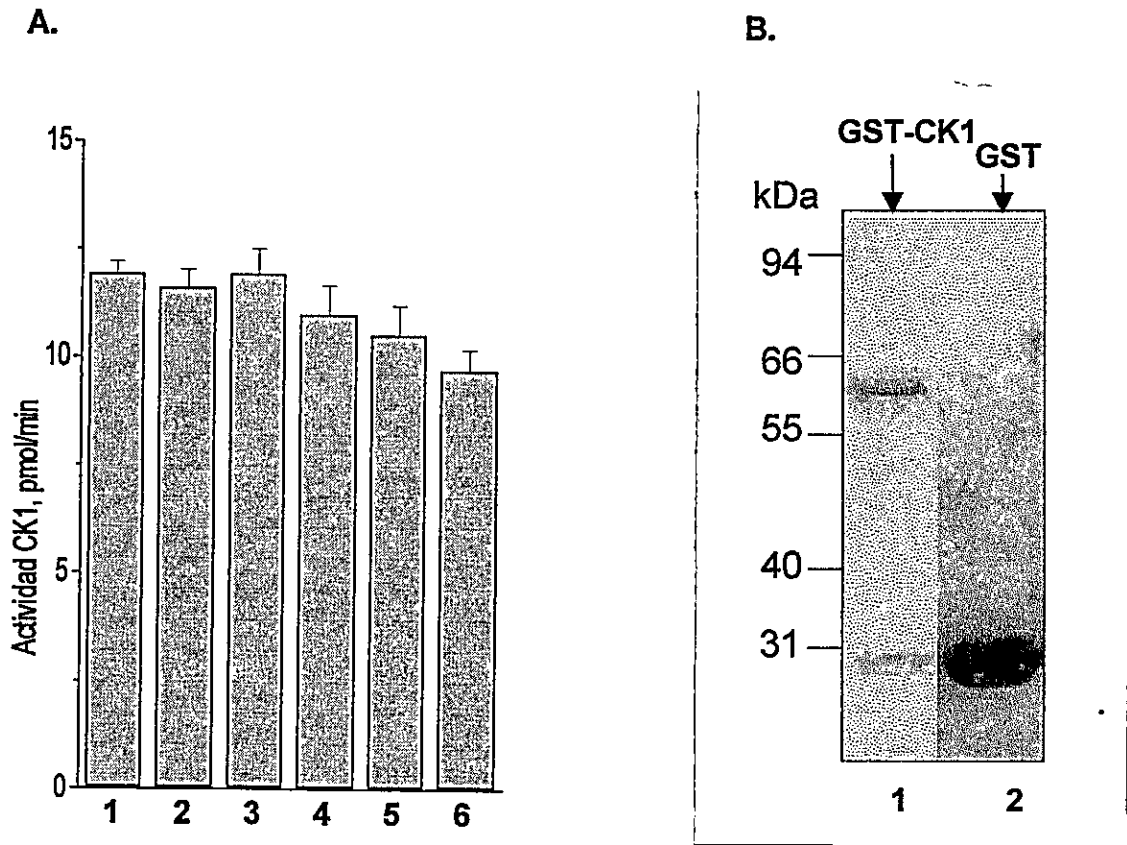


Figura 4. Efecto de GST sobre la actividad de GST-CK1.

A. Se incubaron 5 pmoles de una preparación de GST-CK1 con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 1000 cpm/pmol y se midió la fosforilación del péptido sustrato **RRKHAAIGDDDDAYSITA** a una concentración de 300 μM , en la presencia de:

- 1: GST-CK1 (5 pmoles)
- 2: GST-CK1 + 500 pmoles de BSA.
- 3: GST-CK1 + 25 pmoles de GST.
- 4: GST-CK1 + 250 pmoles de GST.
- 5: GST-CK1 + 500 pmoles de GST.
- 6: GST-CK1 + 1000 pmoles de GST.

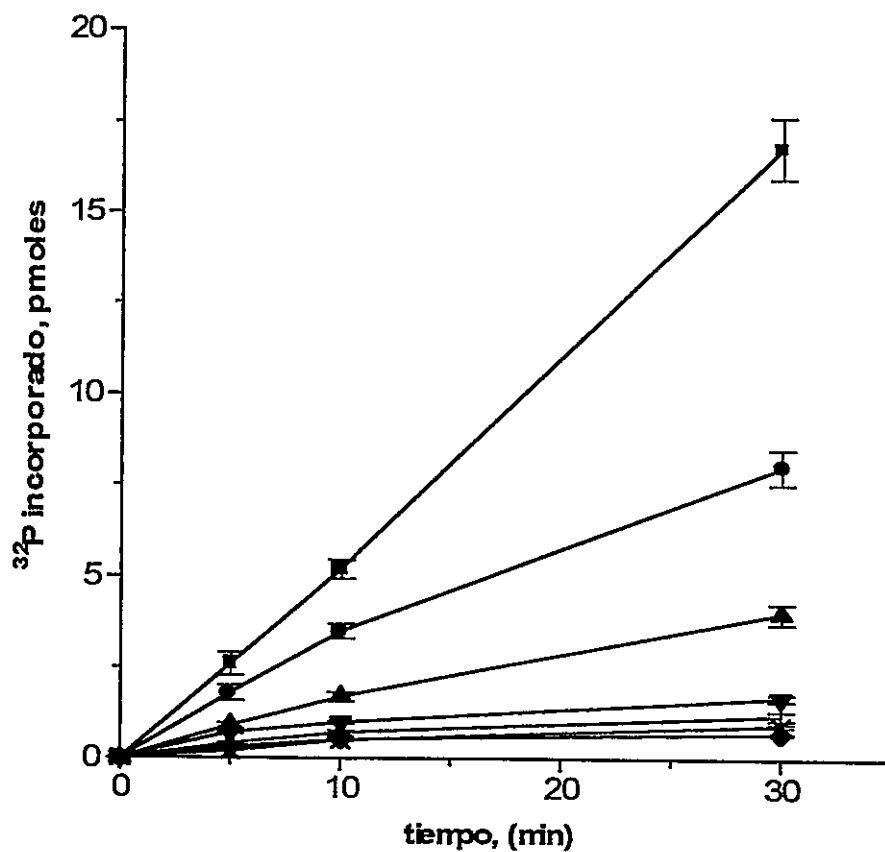
B. Gel de poliacrilamida al 10% tefido con azul de commasie.
 GST-CK1: 15 pmoles de la preparación de GST-CK1 ensayada en A.
 GST: 500 pmoles de GST (13 μg).
 Se indica la posición de estándares de masa molecular.

las características de una enzima CK1 validando su uso para el presente análisis y los resultados obtenidos con ellas.

Con la disponibilidad de formas recombinantes de *XICK1 α* , se realizó un análisis de algunas propiedades ya estudiadas para otras formas de esta enzima, como es la fosforilación de péptidos previamente fosforilados (fosfopéptidos). Se analizaron además, propiedades nuevas de esta familia de enzimas como son el efecto de diversos polipéptidos sintéticos sobre la actividad contra β -caseína y la fosforilación de residuos de tirosina presente en péptidos.

3. *Fosforilación de fosfopéptidos por XICK1 α*

La enzima nativa CK1 fue definida inicialmente como una quinasa con afinidad por residuos previamente fosforilados, dando origen al concepto de regulación por fosforilación jerárquica (Roach, 1990). Experimentos con fosfopéptidos sintéticos demostraron que la presencia de residuos de serina fosforilada (Ser-P, *Sp*) en posiciones *n-3*, *n-4* y *n-5* resultaban en determinantes positivos de la fosforilación. (Flotow y col., 1990; Meggio y col., 1991). Con el objetivo de extender estos estudios con la isoforma CK1 α recombinante, se analizó la fosforilación de diversos sustratos fosfopéptidos por *XICK1 α* . Las curvas de progreso de fosforilación de la Figura 5 muestran que *XICK1 α* no fosforila el péptido EEEEESIT mientras que el péptido SpSpSpEESIT es fosforilado con alta eficiencia, mostrando que la alta carga negativa del sustrato no es suficiente para lograr un nivel eficiente de fosforilación. La posición *n-3* (tres aminoácidos hacia el extremo amino terminal de la serina fosforilable) es la más



■	<i>SpSpSpEESIT</i>
●	<i>EE7pEESIT</i>
▲	<i>EESpEESIT</i>
▼	<i>SpEEEEESIT</i>
	<i>ESpeeEESIT</i>
X	<i>EEYpEESIT</i>
◆	<i>EEEEESIT</i>

Figura 5. Fosforilación de fosfopéptidos por *XICK1α*.

Los péptidos previamente fosforilados mostrados en la tabla bajo el gráfico, se pusieron en contacto con la enzima His-CK1 durante los tiempos indicados. Se usó una concentración de 1 mM de péptidos y 2 U. de enzima. Posterior a la hidrólisis y electroforesis de alto voltaje en papel, se determinó el contenido de ^{32}P -Ser en un aparato Instant Imager.

importante como determinante positivo de la fosforilación. Fosfoserinas ubicadas en las posiciones *n-4* y *n-5* no tienen efecto. La presencia de treonina fosforilada (*Tp*) en la posición *n-3* resulta en mayor incorporación de fosfato comparada con la presencia de Ser-P en esta posición. Es interesante que el péptido con Tyr-P en esta misma posición resulta ser un sustrato muy pobre y que por lo tanto el residuo que contiene el grupo fosfato sería determinante para la especificidad enzimática.

4. *GST-CK1 es capaz de fosforilar tirosina en péptidos sintéticos.*

Se ha reportado en la literatura que algunas isoformas CK1 de levaduras son capaces de fosforilar tirosina en el copolímero poli(Glu⁸⁰:Tyr²⁰) y de autofosforilarse en residuos de serina, treonina y tirosina (Hoekstra y col., 1994). Además, las isoformas de CK1 reportadas en *Arabidopsis thaliana* (Klimzak y col., 1995), fueron aisladas con el uso de un anticuerpo monoclonal antifosfotirosina. Debido a los muy conocidos e interesantes casos de regulación de la transducción de señales por medio de fosfotirosinas en la proliferación celular, se inició un análisis de la capacidad de *XICK1α* de fosforilar dichos residuos. Dentro de estos estudios se observó que esta enzima reconoce poli(Glu⁸⁰:Tyr²⁰) con alta afinidad. En la Figura 6 se muestra el efecto de diversos polipéptidos ácidos sobre la fosforilación de caseína por GST-CK1. Se observa que la enzima no es inhibida en forma significativa por ácido poliglutámico y sólo levemente inhibida por ácido poliaspártico y por poli(Glu⁸⁰:Phe²⁰). Este último polipéptido corresponde a una secuencia sintetizada al azar y compuesta sólo de residuos glutámico y fenilalanina en una relación de 4:1. Poli(Glu⁸⁰:Tyr²⁰) en la misma

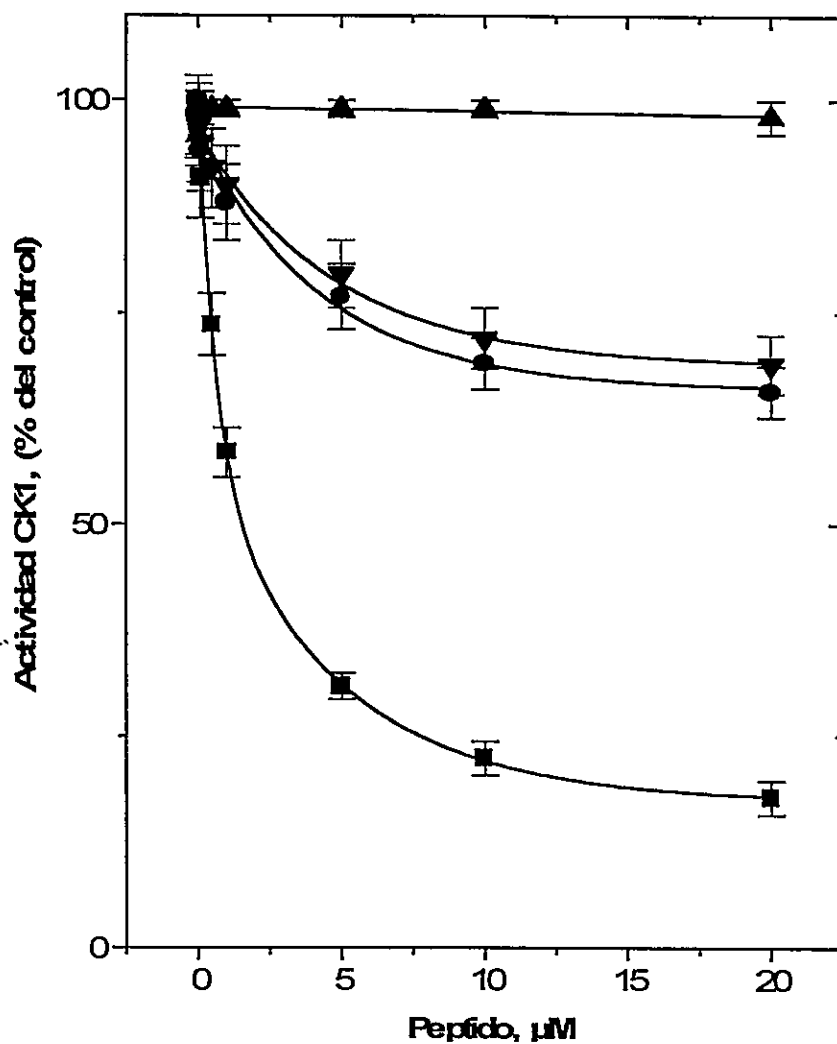


Figura 6. Efecto de diferentes polipéptidos ácidos sobre la actividad de XIICK1 α .

Se determinó la actividad de GST-CK1 en presencia de concentraciones crecientes de diferentes polipéptidos ácidos: ácido poliglutámico (43 kDa) (▲), ácido poliaspártico (42,5 kDa) (▼), poli(Glu⁸⁰:Phe²⁰) (16 kDa) (●) y poli(Glu⁸⁰:Tyr²⁰) (46 kDa) (■). Se usaron 2 U de GST-CK1 que incorporan 2 pmol/min de ³²P en el sustrato (100%) y 5 mg/ml de β -caseína como sustrato.

proporción en cambio, es un fuerte inhibidor de la CK1 con un I_{50} de 2 μM . En estos estudios se utilizó como sustrato β -caseína y se determinó que la inhibición de la actividad es de tipo competitivo según se muestra en la Figura 7. Los ensayos cinéticos realizados a diferentes concentraciones de poli(Glu⁸⁰:Tyr²⁰), y mediante gráficas secundarias $1/V$ versus concentración de inhibidor, permitieron determinar que la constante de inhibición K_i aparente para este polipéptido es de 5 μM . Este cálculo es solamente una aproximación ya que se usa el valor de 46 kDa para el tamaño del polipéptido determinado por medio de cromatografía de exclusión por el fabricante (Sigma). El polipéptido poli(Glu⁸⁰:Tyr²⁰), como veremos más adelante, es una mezcla de un amplio rango de tamaños que fluctúa entre 20.000 y 70.000 Da.

Poli(Glu⁸⁰:Tyr²⁰), usado en los estudios descritos en la Figura 6, ha sido usado frecuentemente para estudios *in vitro* como sustrato de proteínas tirosinaquinasas. Al usarlo como sustrato y analizar los productos de la reacción de fosforilación por electroforesis en geles de poliacrilamida y posterior autoradiografía, se observa la aparición de una región dispersa marcada en forma radiactiva (Braun y col., 1984; Schieven y col., 1986). Al incubar GST-CK1 y poli(Glu⁸⁰:Tyr²⁰) con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ en las condiciones descritas en Materiales y Métodos, se observa la fosforilación de este polipéptido que aparece entre los 10 a 20 min de incubación (Figura 8A, carril 5). Como se muestra en la Figura 8A, existe una aparición dependiente del tiempo de una marca radiactiva difusa que cubre un amplio rango de tamaños moleculares en el gel. Al omitir el polipéptido se observa la autofosforilación de la proteína de fusión y de algunos fragmentos proteolíticos (Figura 8A, carril 8).

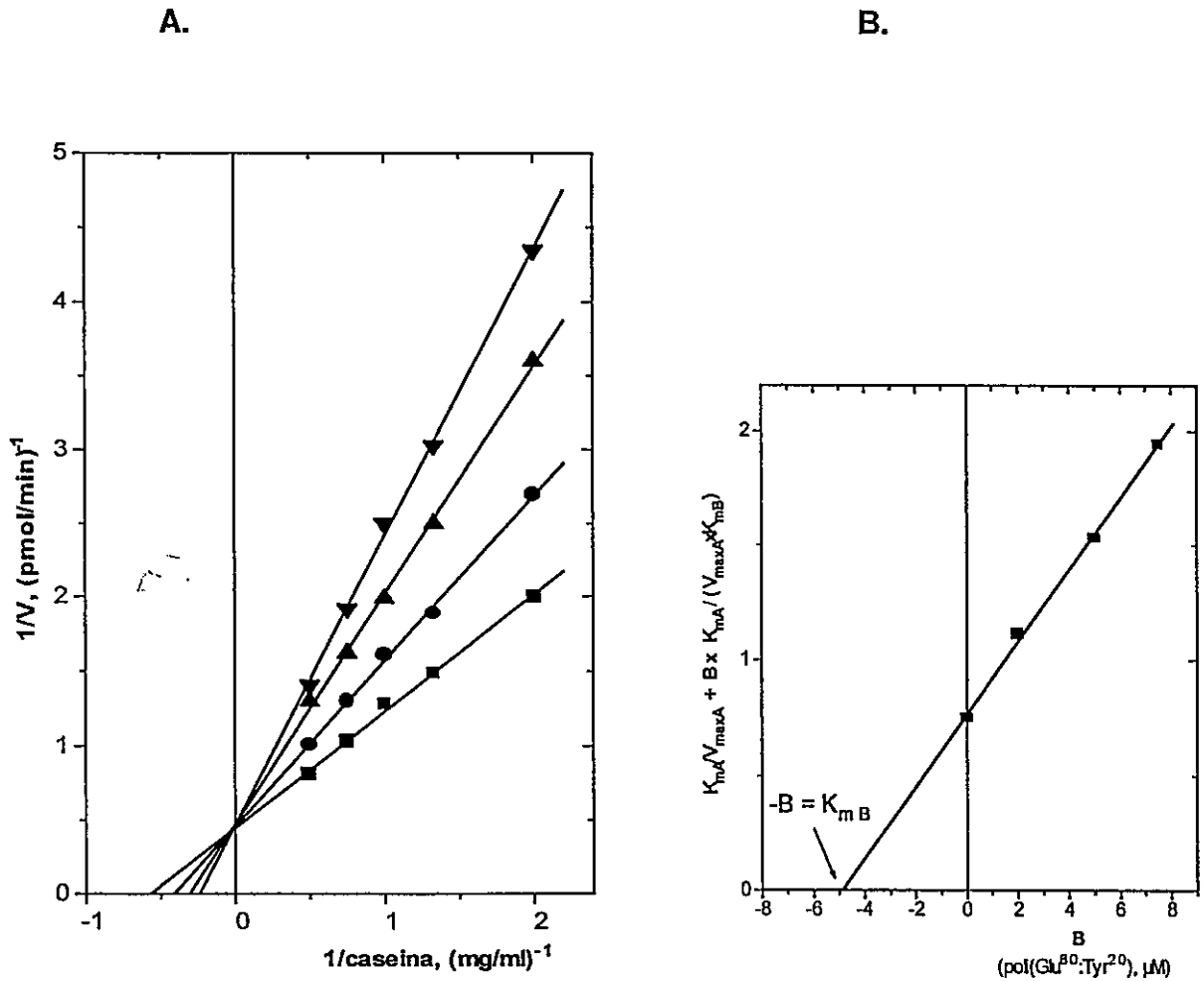


Figura 7. Inhibición competitiva de GST-CKI por poli(Glu⁸⁰:Tyr²⁰).

A. La actividad de GST-CKI se midió, usando β -caseína como sustrato (concentración variable entre 0,5 y 2,0 mg/ml) en la presencia del polipéptido inhibidor poli(Glu⁸⁰:Tyr²⁰) a las concentraciones de 2 (●), 5 (▲) y 7,5 (▼) μM o sin inhibidor (■). Se muestra la gráfica de Lineweaver-Burk usando los promedios de tres determinaciones independientes realizadas en duplicado.

B. Determinación de la K_i aparente para poli(Glu⁸⁰:Tyr²⁰). Se grafica la pendiente de las curvas mostradas en A versus la concentración de inhibidor.

La fosforilación de residuos de tirosina fue además analizada con el uso de dos péptidos sustrato de secuencia definida, **RRREEEYEEEE** y **EEEEYFVFGRRK**, que poseían tirosina como único residuo fosforilable. La fosforilación de estos péptidos fue detectada por electroforesis en geles de poliacrilamida al 16,5% y posterior autoradiografía. La Figura 8C muestra la fosforilación de los péptidos con tirosina comparada con la fosforilación de un péptido previamente usado que contiene serina. Un análisis densitométrico permitió estimar que la fosforilación en tirosina representaba un 5% de la fosforilación en serina. Se debe destacar que sólo el péptido **RRREEEYEEEE** es fosforilado por XICK1 α mientras que el péptido **EEEEYFVFGRRK** no es sustrato. Estos resultados indican claramente que la enzima XICK1 α recombinante es capaz de fosforilar tirosina en péptidos sintéticos que posean este residuo inmerso en un ambiente ácido y que los residuos presentes hacia el carboxilo terminal también influyen en la especificidad de fosforilación.

5. *Poli(Glu⁸⁰:Tyr²⁰) como inhibidor y como sustrato alternativo de XICK1 α .*

Inicialmente se determinó que el polipéptido poli(Glu⁸⁰:Tyr²⁰) se comportaba como un inhibidor competitivo de la fosforilación de caseína por XICK1 α (Figura 7A) y posteriormente resultó ser un sustrato de la enzima XICK1 α (Figura 8A). Dado lo anterior poli(Glu⁸⁰:Tyr²⁰) podría no comportarse necesariamente como un inhibidor verdadero o de punto muerto ya que participa en la catálisis y se hace necesario realizar el análisis de la inhibición considerando al poli(Glu⁸⁰:Tyr²⁰) como un sustrato alternativo.

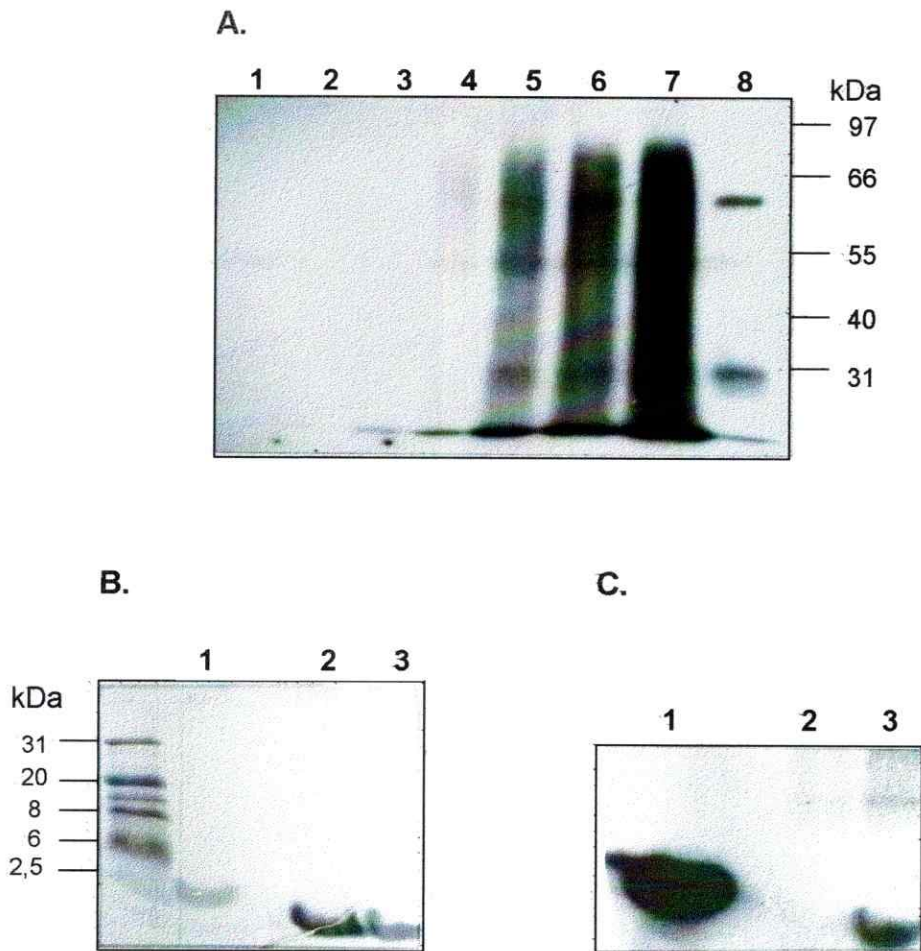


Figura 8. Fosforilación de péptidos sintéticos que contienen tirosina por XIICK1 α .

A. El polipéptido poli(Glu⁸⁰:Tyr²⁰) a una concentración de 0,1 mg/ml, fue incubado por diferentes tiempos con 20 U de enzima GST-CK1 en presencia de [γ -³²P]ATP. La fosforilación se detectó por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% con SDS y autoradiografía. Carriles 1-7: 0, 1, 5, 10, 20, 30 y 60 minutos de incubación; Carril 8: 60 min de incubación en ausencia de péptido.

B, C: Se realizó la incubación de 2 U de GST-CK1 con 1 mM de los péptidos RRKDLHDDEEDEAMSIAA, EEEEYFVFGRRK y RRREEEYEEEE (carriles 1, 2 y 3), durante 30 min a 30°C. Los péptidos fosforilados fueron separados por electroforesis en un gel de poliacrilamida de 16,5%. Se muestra en **B**, la tinción con Azul de Coomassie del gel y en **C**, la autoradiografía correspondiente. En **A** y en **B** se indica la posición de estándares de masa molecular.

Según se describe en Siegel I.H. (1975), la inhibición competitiva con sustratos alternativos es descrita, en condiciones de equilibrio, por la ecuación I:

$$v_t = \frac{V_{maxA} \frac{[A]}{K_{mA}} + V_{maxB} \frac{[B]}{K_{mB}}}{1 + \frac{[A]}{K_{mA}} + \frac{[B]}{K_{mB}}} \quad (\text{I})$$

en la cual V_{maxA} es la velocidad máxima de la reacción con el sustrato A y V_{maxB} es la velocidad máxima con el sustrato B.

Si consideramos $a = [A]/K_{mA}$ y $b = [B]/K_{mB}$ entonces al obtener los dobles recíprocos de la ecuación I se obtiene la ecuación II:

$$\frac{1}{v} = \frac{1 + a + b}{V_{maxA} a + V_{maxB} b} \quad (\text{II})$$

En el caso que se analiza definiremos los sustratos A y B como β -caseína y poli(Glu⁸⁰:Tyr²⁰) respectivamente. Considerando que los ensayos de inhibición de la fosforilación de caseína por poli(Glu⁸⁰:Tyr²⁰) se realizaron con incubaciones de 10 minutos y que a ese tiempo de incubación la fosforilación de poli(Glu⁸⁰:Tyr²⁰) es apenas detectable (ver Figura 8A) podemos considerar que $V_{maxA} \gg \gg V_{maxB}$ con lo que la ecuación II se transforma en la ecuación III:

$$\frac{1}{v} = \frac{1 + a + b}{V_{maxA} a} \quad (\text{III})$$

reemplazando el significado de a y b, y reordenando la ecuación III se obtiene la ecuación IV:

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{K_{mA}}{V_{maxA}} + \frac{B K_{mA}}{K_{mB} V_{maxA}} \right) \frac{1}{A} + \frac{1}{V_{maxA}} \quad (\text{IV})$$

A partir de una gráfica $1/v$ versus $1/A$, como la presentada en la Figura 6A, se obtiene la pendiente de las curvas correspondientes a las diferentes concentraciones de B (poli(Glu⁸⁰:Tyr²⁰):

$$\text{pendiente} = \frac{K_{mA}}{V_{maxA}} + \frac{K_{mA}}{K_{mB} V_{maxA}} B$$

Al graficar la pendiente antes mencionada versus $[B]$ se obtiene una recta que al ser extrapolada al punto de pendiente = 0 se obtiene:

$$-B = K_{mB}$$

El valor calculado para $K_{m\text{Poli(Glu}^{80}\text{:Tyr}^{20})}$ según la gráfica mostrada en la Figura 7B fue de 5 μM . Este valor es idéntico al obtenido anteriormente para la constante de inhibición aparente K_i lo que demuestra que en este caso la inhibición por poli(Glu⁸⁰:Tyr²⁰) resulta de su función como un inhibidor verdadero más que de su función como un sustrato alternativo.

6. Autofosforilación de XICK1 α

Al realizar un análisis de fosfoaminoácidos de la proteína CK1 α de fusión en la presencia y ausencia de sustratos fue posible determinar el tipo de aminoácidos modificado en estos casos. En la Figura 9A se observa la autofosforilación de GST-CK1, en ausencia de sustrato, en residuos de serina, treonina y tirosina. Estos resultados

indican que CK1 α de *X. laevis* sufre autofosforilación en serina, treonina, y con mucho menor eficiencia en tirosina (ver carril 5 de Figura 9A).

Con el objetivo de analizar con más detalle la autofosforilación de *X*CK1 α se autofosforiló His-CK1 por diferentes tiempos, las proteínas fosforiladas se separaron en un gel de poliacrilamida al 10% y la radiactividad incorporada se midió en un aparato Instant Imager. La incorporación de ^{32}P en His-CK1 por autofosforilación resultó ser lineal con respecto al tiempo hasta 1 hora de incubación. Se observó además que en un ensayo de 30 minutos, la autofosforilación no resulta ser dependiente de la concentración de enzima (Figura 9B) lo que indicaría que se trata de un reacción de tipo intramolecular.

La proteína His-CK1 autofosforilada fue separada en un gel de poliacrilamida y transferida a una membrana de Inmobilon. Se identificó por autoradiografía la posición de la proteína marcada y los trozos de membrana correspondientes fueron sometidos a digestión química con CNBr en las condiciones descritas en Materiales y Métodos. En la Figura 9C se muestra la aparición dependiente del tiempo de tres polipéptidos marcados en forma radiactiva con tamaños de 3000, 3500 y 7000 Da. Dado que CNBr hidroliza el enlace Met-X, fue posible relacionar éstos con péptidos de masas equivalentes presentes en *X*CK1 α :

péptido 1: G¹⁴⁵IGRHQNKLFLIDFGLAKKYRDNRT^{*}RQHIPPYREDKNLTGTARY

ASINAHLGIEQSRRDDM²⁰⁴

péptido 2: L³⁰¹KQKAAQQAASSSGQGQQAQTPTGKQTDKS^{*}KSNM³³⁴

péptido 3: Y²¹³FNRTSIPWQGIIKAATKKQKYEKIS^{*}EKKM²⁴¹

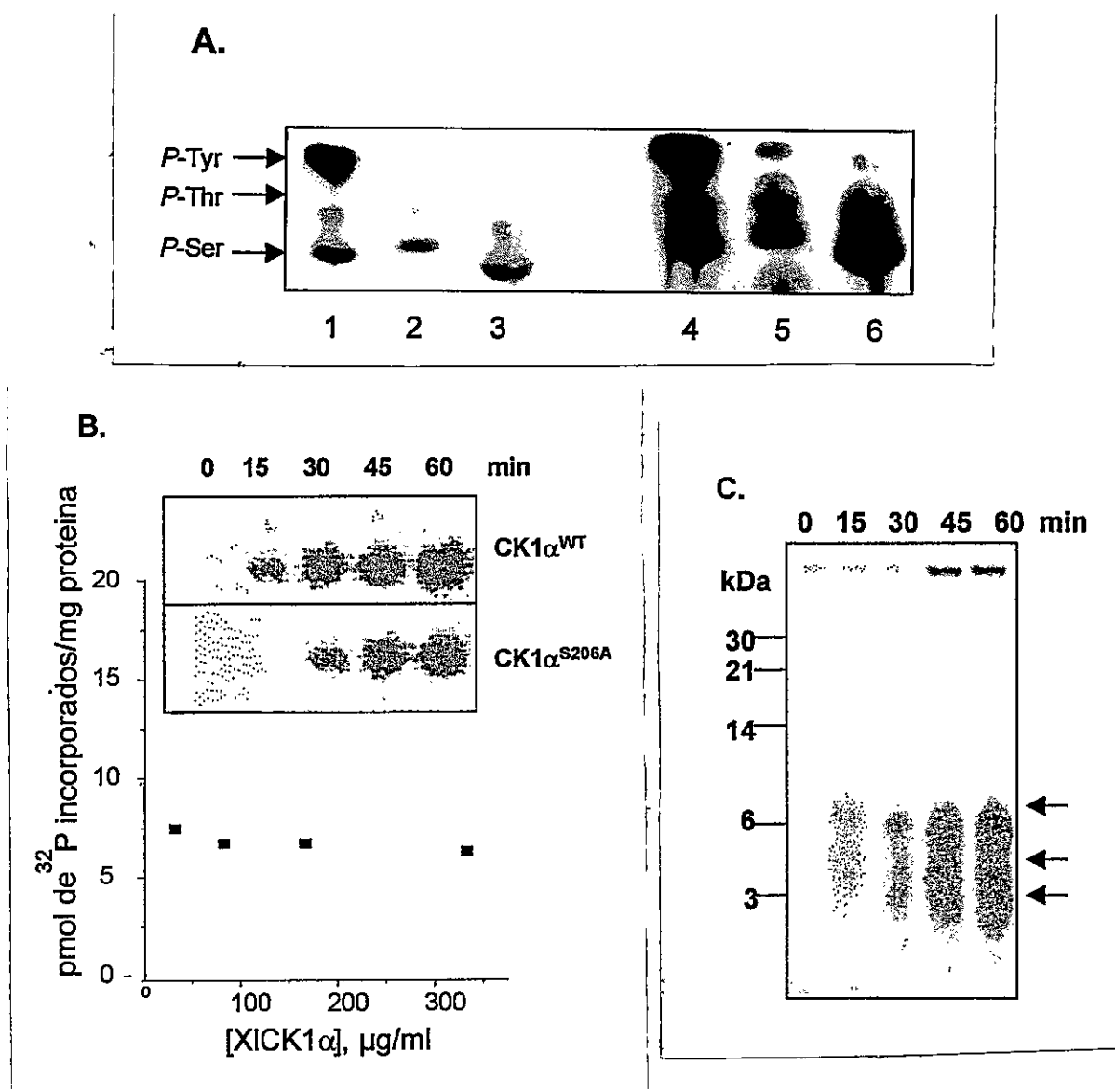


Figura 9. Autofosforilación de CK1 α de *X.laevis*.

A. Análisis de fosfoaminoácidos de reacciones de fosforilación de poli(Glu⁸⁰:Tyr²⁰) (carril 1), autofosforilación de GT-CK1 (carril 2) y fosforilación β -caseína (carril 3). Las proteínas se sometieron a hidrólisis ácida y los productos se resolvieron por cromatografía en capa fina y autoradiografía como se describe en Materiales y Métodos. Los carriles 1-3 representan 4 días de exposición y los carriles 4-6 10 días.

B. Se determinó la incorporación de ^{32}P en His-CK1 por autofosforilación durante 30 minutos, a diferentes concentraciones de enzima. El inserto muestra la autofosforilación de XICK1 α^{WT} y XICK1 α^{S206A} dependiente del tiempo.

C. His-CK1 autofosforilada por diferentes tiempos fue digerida con CNBr según se describe en Materiales y Métodos. Los productos de digestión se resolvieron en un gel SDS-PAGE 20%, seguido de autoradiografía.

En la secuencia de estos péptidos se observa un total de 14 residuos de Ser, Thr y Tyr capaces de ser fosforilados, sin embargo ninguno de ellos posee el consenso típico de fosforilación por CK1 y muchos de ellos están en un ambiente básico. Algunos sitios poseen un requerimiento mínimo para fosforilación por ejemplo en el péptido 1 el aminoácido Thr¹⁶⁹ posee un residuo aspártico en posición *n*-3, en el péptido 2 Ser³³⁰ posee un residuo aspártico en posición *n*-2 y en el péptido 3 el residuo Ser²³⁸ posee un aminoácido glutámico en la posición *n*-3 (estos tres residuos se indican con un asterisco sobre la secuencia). La posibilidad que la secuencia de autofosforilación difiera del consenso de fosforilación de sustratos exógenos ha sido sugerida para la isoforma CK1δ (Graves y Roach, 1995).

7. *Generación de formas mutantes de XIICK1α.*

Con el objetivo de obtener información de algunos residuos importantes para la función de XIICK1α se realizó mutagénesis dirigida cambiando estos residuos a Ala. Se generaron las enzimas mutantes XIICK1α^{K46A} y XIICK1α^{S206A} por medio de la estrategia que se describe en Materiales y Métodos. La mutación K46A (cambio de lisina por alanina en la posición 46 de la secuencia primaria) altera un residuo esencial para la catálisis y de consenso en todas las proteínaquinasas. Esta enzima mutante fue usada posteriormente en los estudios de localización subcelular de las diferentes isoformas de CK1 (ver Sección C). La mutación S206A cambia el único residuo de serina dentro de la secuencia primaria de XIICK1α que posee una posible secuencia de consenso para CK1,

y que podría corresponder a un sitio de autofosforilación. La secuencia que rodea a cada residuo mutado es la siguiente:

K46: EVAVK⁴⁶LESQ

S206: RDDMES²⁰⁶LGYVLM

Estas proteínas fueron purificadas en *E.coli* con 6 residuos His adicionales. La mutación K46A resultó en una enzima que perdía totalmente su actividad catalítica por lo que su presencia se siguió por medio de Western Blot con el anticuerpo antiCK1 α . La mutación S206A resultó en una enzima con una actividad catalítica comparable a la enzima de tipo silvestre. Se observó que XICK1 α ^{S206A} sufre autofosforilación (Figura 9B inserto), aunque en una forma más lenta que XICK1 α ^{WT}. Dada la estrategia usada para la digestión química de la proteína autofosforilada (digestión con CNBr) no se detecta un péptido fosforilado en el que estuviera presente el residuo Ser²⁰⁶ ya que éste se encuentra rodeada de residuos metionina y los péptidos resultantes serían muy pequeños. Estos estudios respaldan la idea de la existencia de varios sitios de autofosforilación en la enzima XICK1 α .

Los resultados reportados en esta Sección se refieren al Objetivo 1 de la Tesis y aportan la caracterización de una isoforma de CK1 en particular producida en forma recombinante y analizada *in vitro*.

Dada la disponibilidad de una isoforma CK1 (XICK1 α) y para cumplir con el Objetivo 2 se realizaron los análisis expuestos en la siguiente Sección en los que se comparan la isoforma α con otras isoformas CK1 en relación a los requerimientos de secuencia primaria en el sustrato peptídico que determinan su fosforilación.

SECCION B. ESTUDIOS DE LA ESPECIFICIDAD DEL SITIO FOSFORILABLE POR CK1.

1. *La secuencia de consenso "clásica" para CK1 versus la secuencia de consenso obtenida de una "librería" de péptidos.*

Como se indica previamente, la proteínaquinasa CK1 ha sido definida como una quinasa dirigida por residuos previamente fosforilados y como una quinasa acidotrópica, con secuencias de consenso $Sp/Tp^{-3}-X-X-S/T$ y $(E/D)_n^{-3}-X-X-S/T$, respectivamente. Los estudios de caracterización de la $X1CK1\alpha$ recombinante mostraron que esta isoforma es capaz de fosforilar además tirosinas inmersas en segmentos ácidos, aunque con menor eficiencia.

Cuando esta Tesis estaba en marcha, en 1996, el laboratorio del Dr. Lewis Cantley describió una secuencia de consenso que no poseía los residuos identificados previamente como determinantes de la especificidad del sitio para CK1 (Songyang y col., 1996). Para estos estudios se utilizó una "librería" orientada de péptidos y CK1 δ y CK1 γ recombinantes como enzimas. En este análisis, después de seleccionar los péptidos fosforilados por estas enzimas recombinantes, se reportaron las secuencias indicadas en la Figura 10 (Songyang y col., 1996). Una comparación entre las secuencias obtenidas de la "librería" (Lib δ y Lib γ) y las secuencias presentes en los péptidos S86 y S174 (Figura 10), que representan el consenso "clásico" para fosforilación de sustratos ácidos por CK1, muestra que las secuencias de la "librería" poseen sólo un residuo ácido en posición $n-3$. Además Lib δ y Lib γ poseen un grupo de residuos hidrofóbicos, tres isoleucinas y dos fenilalaninas, C-terminales a la serina fosforilable que no se

<p>A. Secuencias determinadas en forma directa (fosforilación de proteínas naturales):</p>	
<p>$(Sp)_n$ EES/T</p>	<p>DDDDAYS⁸⁶DT EEDEEMS¹⁷⁴ET</p>
<p>Caseína</p>	<p>Inhibidor- 2</p>
<p>B. Secuencias derivadas de una "librería" de péptidos:</p>	
<p>Libδ:</p>	<p>MAEFDTGSIIIFFAKKK</p>
<p>Libγ:</p>	<p>MAYYDAASIIIFFAKKK</p>
<p>Secuencia matriz usada para preparar la "librería":</p>	
<p>MA-X-X-X-X-X-S-I-X-X-X-X-AKKK</p>	

Figura 10. *Secuencias de consenso descritas para la familia de proteínas quinasas CKI.*

A. En la secuencia indicada para caseína n es 1 a 3. Los números indicados en el caso de las secuencias de la proteína inhibidor-2 indican la posición de la serina fosforilada en la proteína. (Flotow y Roach, 1991; Marin *et al.*, 1994)

B. La secuencia indicada como matriz indica la secuencia utilizada en la reacción de formación de péptidos específicos donde, durante la reacción de polimerización, se utilizó en las etapas de adición un aminoácido específico y único (M, A, S, I ó K) ó una mezcla de los veinte aminoácidos (X). La "librería" resultante entonces poseía una mezcla de productos que llevaba 5 aminoácidos específicos en sitios específicos y 9 aminoácidos incorporados al azar (Songyang *et al.*, 1996).

encuentra en las secuencias de consenso analizadas previamente para CK1 nativa obtenida desde tejidos animales (Flotow y Roach, 1991; Marin *y col.*, 1994).

2. *Análisis de la fosforilación de los péptidos derivados de la "librería" versus los péptidos derivados de Inhibidor-2 con XI α CK1 recombinante y CK1 purificada de hígado de rata como enzimas.*

Con el objetivo de extender los estudios de especificidad del sitio fosforilable por CK1 y analizar la discrepancia anteriormente expuesta, se sintetizaron los péptidos correspondientes a las secuencias reportadas por la "librería" y se comparó su eficiencia como sustratos en ensayos de fosforilación *in vitro*, con los péptidos que poseen un grupo de aminoácidos ácidos derivados de la proteína Inhibidor-2 de fosfatasa-1. Usando una preparación de enzima nativa CK1, se ha descrito que la proteína Inhibidor-2 de fosfatasa-1 y los péptidos derivados de los sitios fosforilados por CK1 en ella (S86 y S174), poseen una alta eficiencia de fosforilación, en términos de K_m y V_{max} , y han sido usados para definir la secuencia de consenso de esta enzima (Marin *y col.*, 1994).

Como se mencionó previamente, la gran mayoría de los estudios de especificidad del sitio de fosforilación para esta familia de enzimas se han realizado con CK1 purificada desde tejidos animales.

Los estudios de especificidad de fosforilación llevados a cabo en esta Tesis fueron realizados comparando la especificidad de sitio de una preparación de CK1 nativa y una isoforma CK1 determinada.

El objetivo de comparar ambas formas de la enzima fue el de determinar si existían diferencias en la especificidad del sitio fosforilable entre isoformas de CK1 y si estas diferencias eran las que daban cuenta de la discrepancia surgida con el uso de la "librería" de péptidos. Para lo anterior, se utilizó como fuente de enzima una preparación de CK1 nativa altamente purificada de hígado de rata (ratCK1) y la CK1 α recombinante de *X. laevis*, *XICK1 α* (100% idéntica a CK1 α de rata), producida en bacterias como His-CK1 que fue descrita y analizada en la Sección A de esta Tesis.

Se analizaron péptidos que poseían las secuencias derivadas de la "librería", péptidos que poseían las secuencias "clásicas" de fosforilación por CK1 y variantes de estos últimos útiles para estudiar los determinantes de la especificidad presentes en la secuencia primaria del sustrato.

Para investigar con más detalle el papel de los residuos ácidos N-terminales al residuo fosforilable en determinar la eficiencia de la fosforilación, se reemplazó cada residuo aspártico del péptido Ser⁸⁶ de Inhibidor-2 **RRKHAAIGDDDDAYSITA** (S86), por alanina. Al determinar la incorporación de ³²P en estos péptidos mutados, se observa que todos los péptidos modificados son fosforilados en forma mucho más lenta que el péptido tipo silvestre, (Tabla 2a), indicando que cada residuo ácido contribuye en determinar la eficiencia de fosforilación. Como se desprende de los valores obtenidos para la fosforilación de estos péptidos, la posición más importante en determinar esta función es la posición *n*-3, seguida de las posiciones *n*-4, *n*-5 y *n*-6. Tanto para ratCK1 como *XICK1 α* se observa el mismo orden anterior, aunque el efecto es más pronunciado para la enzima nativa de rata que para la enzima recombinante de *Xenopus*.

Péptidos sustratos usados		XICK1 α	ratCK1
a) Péptidos derivados de Inhibidor-2:			
RRKDLHDDEEDEAM <u>S</u> ITA (Ser ¹⁷⁴)		100	100
RRKHAAIG <u>DDDD</u> AY <u>S</u> ITA (Ser ⁸⁶)		100	100
IG <u>DDDD</u> AY <u>S</u> ITA		115	70
IG <u>DDAD</u> AY <u>S</u> ITA		36	38
RRKHAAIG <u>DDD</u> AAY <u>S</u> ITA		22	10
RRKHAAIG <u>DDAD</u> AY <u>S</u> ITA		38	15
RRKHAAIG <u>DADD</u> AY <u>S</u> ITA		64	34
RRKHAAIG <u>DDD</u> AY <u>S</u> ITA		77	42
b) Péptidos derivados de la “librería”:			
Lib δ	MAEFDTG <u>S</u> IIFFAKKK	27	5
Lib γ	MAYYDAAS <u>S</u> IIFFAKKK	10	2
c) Péptidos “híbridos” Inh-2/Lib:			
Inh-2/Lib δ	RRKHAAIG-AEFDTG <u>S</u> IIFFA	25	3
Inh-2/Lib γ	RRKHAAIG-AYYDAAS <u>S</u> IIFFA	5	1

Tabla 2. Fosforilación de péptidos por XICK1 α y ratCK1.

La velocidad de fosforilación se expresa relativa a la velocidad de fosforilación del péptido derivado del sitio Ser⁸⁶ de la proteína Inhibidor-2 **RRKHAAIGDDDDAYSITA**, y fue de 2,81 y 8,19 pmol/min para XICK1 α y ratCK1, respectivamente. La incorporación de ³²P en el péptido derivado del sitio Ser¹⁷⁴ **RRKDLHDDEEDEAMSITA** fue de magnitud similar. Se indica en verde el residuo fosforilable y en rojo el grupo de residuos ácidos N-terminal al residuo fosforilable.

Al determinar el comportamiento como sustratos de los péptidos derivados de la "librería", Lib δ y Lib γ (Tabla 2b) se observa que tanto la enzima nativa ratCK1 como la enzima recombinante *XICK1 α* usan estos péptidos como sustratos con una muy baja eficiencia. El efecto es mucho más pronunciado en el caso de ratCK1 cuya actividad contra Lib δ y Lib γ es apenas detectable.

Con el objetivo de analizar si la presencia de tres residuos básicos en el extremo carboxilo terminal de los péptidos Lib δ y Lib γ podrían influenciar su comportamiento como sustratos, se sintetizaron péptidos "híbridos" que contenían la secuencia amino terminal del péptido S86 y la secuencia de Lib δ y Lib γ excluyendo los residuos básicos. Como se observa en la Tabla 2c, estas modificaciones no alteran el pobre comportamiento de Lib δ y Lib γ como sustratos, indicando que, en este caso, la posición del grupo de residuos básicos no influye en la eficiencia de fosforilación.

La Figura 11 muestra el curso temporal de fosforilación de diversos péptidos sustrato por *XICK1 α* (Figura 11A) y por ratCK1 (Figura 11B). Se aprecia que los péptidos derivados de Inhibidor-2 son claramente preferidos como sustratos sobre los péptidos Lib δ y Lib γ , tanto por *XICK1 α* como por ratCK1. La fosforilación de Lib δ y Lib γ es apenas detectable en el caso de ratCK1, la enzima *XICK1 α* en cambio fosforila estos péptidos en forma baja pero significativa. Se muestra la pobre fosforilación de uno de los péptidos híbridos descritos en la Tabla 2c (indicado con \blacklozenge en la Figura 11).

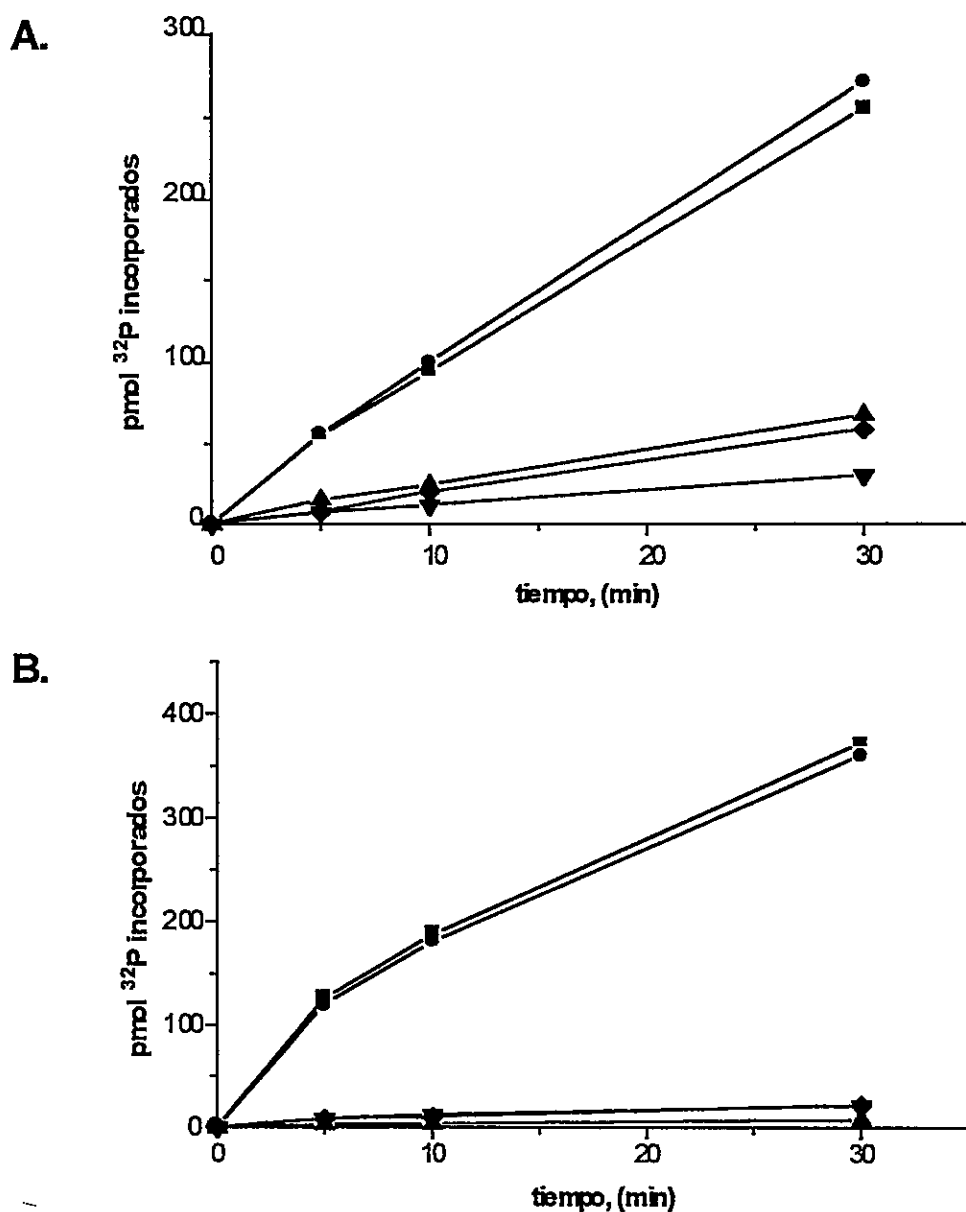


Figura 11. Fosforilación de diferentes péptidos por CK1.

Se muestra el curso temporal de fosforilación, por XIICK1 α (A) y ratCK1 (B), de los péptidos RRKDLHDDEEDEAMSITA (■) y RRKHAAIGDDDDAYSITA (●) derivados de la proteína Inhibidor-2, y de los péptidos RRKHAAIGAEEFDTGSIIFFA (◆), MAEFDTGSIIFFAKKK (▲) y MAYYDAASIIFFAKKK (▼), sintetizados en base a los resultados derivados de la "librería". Los péptidos fueron usados en una concentración de 300 μ M. Las condiciones de fosforilación se detallan en Materiales y Métodos.

3. *Análisis cinético de la fosforilación de los péptidos.*

Para analizar con más detalle la fosforilación observada de los diferentes péptidos descritos previamente, se realizaron estudios en velocidad inicial y se determinaron las constantes cinéticas K_m y V_{max} para cada péptido sustrato. Las Tablas 3 y 4 muestran los resultados obtenidos con $XICK1\alpha$ y ratCK1, y la eficiencia de fosforilación resultante, expresada como V_{max}/K_m . Para facilitar la comparación la V_{max} se expresa relativa al péptido S86 (=100), **RRKHAAIGDDDDAYSITA**.

En la Tabla 3a se observa que el mayor nivel de fosforilación se obtiene con el péptido que reproduce el sitio Ser⁸⁶ de Inhibidor-2 (**IGDDDDAYSDTETTEA**) y otro derivado de éste **IGDDDDAYSITA**. El valor de K_m de este último aumenta al adicionar, en el extremo N-terminal, cuatro residuos básicos que permiten el uso del ensayo con papel de fosfocelulosa para detectar los péptidos fosforilados (ver Materiales y Métodos). El péptido resultante **RRKHAAIGDDDDAYSITA** posee una K_m dos veces mayor mientras su V_{max} es afectada en alrededor de un 35% y es similar en términos de K_m y V_{max} al péptido que reproduce el sitio Ser¹⁷⁴ de Inhibidor-2.

En los resultados descritos en las Tablas 3 y 4 se observa la importancia crucial, para una alta eficiencia de fosforilación, del grupo de aminoácidos ácidos N-terminales al residuo fosforilable. La sustitución de sólo uno de estos residuos ácidos, no sólo en la posición $n-3$ sino también en las posiciones $n-4$, $n-5$ y $n-6$, posee un gran efecto negativo sobre la función de estos péptidos como sustratos. Cada una de las sustituciones en el péptido **RRKHAAIGDDDDAYSITA** causa una caída de un orden de magnitud en la eficiencia de fosforilación, principalmente debido a un drástico descenso en V_{max} que se

acompaña de un significativo aumento de K_m . Resultados similares se obtienen al reemplazar con alanina el residuo aspártico presente en la posición $n-3$ del péptido original **IGDDDDAYSITA**.

Al analizar los péptidos derivados de la "librería" Lib δ y Lib γ (Tabla 3b y 4b), se observa una muy baja eficiencia de fosforilación, comparable a aquellos péptidos derivados de Inhibidor-2 en que se ha sustituido un residuo aspártico por alanina. La baja eficiencia como sustratos en este caso se debe a bajos valores de V_{max} mientras que su K_m es comparable a los péptidos derivados de Inhibidor-2. Para analizar si el grupo de tres residuos lisina presente en el C-terminal de los péptidos Lib δ y Lib γ tenía alguna implicancia en los bajos valores de V_{max} observados, se cambió la posición de éstos hacia el N-terminal en forma similar a lo realizado con los péptidos de Inhibidor-2. Como se muestra en las Tablas 3b y 4b este cambio posee un efecto de menor magnitud para la enzima *XICK1 α* .

Como se muestra en la Tabla 3c para *XICK1 α* , el péptido "híbrido" **IGDDDDAYSIIFFA**, que contiene el grupo de residuos ácidos N-terminales al residuo fosforilable del péptido S86 y el grupo de residuos hidrofóbicos, tres isoleucinas y dos fenilalaninas, ubicados en el C-terminal de los péptidos Lib δ y Lib γ , resulta un sustrato incluso mejor que los péptidos derivados de Inhibidor-2 con una V_{max} similar y una K_m levemente menor. Los resultados obtenidos con ratCK1 (Tabla 4) muestran que, al igual que con *XICK1 α* , la eficiencia de fosforilación de los péptidos Lib δ y Lib γ es mínima con respecto a los péptidos derivados de Inhibidor-2, mientras que los péptidos S86 y S174 se comportan en forma similar.

Péptidos sustratos	V_{max} (%)	K_m (μM)	V_{max}/K_m
a) Derivados de Inhibidor-2			
IG DDDD AY <u>S</u> DTETTEA	23,1	32,0	0,720
IG DDDD AY <u>S</u> ITA	65,8	56,0	1,175
IG DDAD AY <u>S</u> ITA	37,5	138,0	0,271
RRKHAAIG DDDD AY <u>S</u> ITA (S86)	100	114,0	0,870
RRKHAAIG DDDA AY <u>S</u> ITA	13,5	153,0	0,088
RRKHAAIG DDAD AY <u>S</u> ITA	25,2	200,0	0,126
RRKHAAIG DADD AY <u>S</u> ITA	36,0	286,0	0,120
RRKHAAIG DDDA AY <u>S</u> ITA	98,0	187,0	0,524
RRKDLHDEEDEAM <u>S</u> ITA (S174)	102,0	133,0	0,760
b) Péptidos derivados de la "librería"			
Lib δ			
MAEFDTG <u>S</u> IIIFFAKKK	9,9	50,0	0,198
RRKHAAIGAEFDTG <u>S</u> IIIFFA	17,7	83,0	0,200
Lib γ			
MAYYDAA <u>S</u> IIIFFAKKK	3,42	26,0	0,131
RRKHAAIGAYYDAA <u>S</u> IIIFFA	3,25	35	0,092
c) Péptido "híbrido"			
IG DDDD AY- <u>S</u> -IIIFFA	72,6	20	3,630

Tabla 3. Constantes cinéticas de diversos sustratos peptídicos para XICK1 α .

Los valores de V_{max} se expresan como % de la radiactividad incorporada en el péptido S86 derivado del sitio Ser⁸⁶ de Inhibidor-2 por XICK1 α que corresponde a 11,6 pmol/min (en negro). Se indica en verde el residuo fosforilable y en rojo el grupo de residuos ácidos N-terminal al residuo fosforilable.

Péptidos sustratos	V_{max} (%)	K_m (μM)	V_{max}/K_m
a) Derivados de Inhibidor-2			
IG DDDD AY <u>S</u> DTETTEA	28,0	33,0	0,840
IG DDDD AY <u>S</u> ITA	79,0	58,0	1,360
IG DDA DAY <u>S</u> ITA	37,0	153,0	0,240
RRKHAAIG DDDD AY <u>S</u> ITA (S86)	100	250,0	0,400
RRKHAAIG DDD AAY <u>S</u> ITA	10,6	363,0	0,029
RRKHAAIG DDA DAY <u>S</u> ITA	15,3	444,0	0,034
RRKHAAIG DADD AY <u>S</u> ITA	25,6	438,0	0,058
RRKHAAIG DDD AY <u>S</u> ITA	86,9	346,0	0,251
RRKDLHDDEEDEAM <u>S</u> ITA (S174)	104,0	239,0	0,430
b) Péptidos derivados de la "librería"			
Lib δ			
MAEFDTG <u>S</u> IIFFAKKK	5,0	36,0	0,138
RRKHAAIGAEFDTG <u>S</u> IIFFA	7,0	333,0	0,021
Lib γ			
MAYYDAA <u>S</u> IIFFAKKK	1,3	33,0	0,039
RRKHAAIGAYYDAA <u>S</u> IIFFA	n.d.	n.d.	n.d.
c) Péptido "híbrido"			
IG DDDD AY- <u>S</u> -IIFFA	115,0	62	1,860

Tabla 4. Constantes cinéticas de diversos sustratos peptídicos para ratCK1.

Los valores de V_{max} se expresan como % de la radiactividad incorporada en el péptido derivado del sitio Ser⁸⁶ de Inhibidor-2 por ratCK1 que corresponde a 58,2 pmol/min (en negro). Se indica en verde el residuo fosforilable y en rojo el grupo de residuos ácidos N-terminal al residuo fosforilable. n.d = no determinado debido a una muy baja incorporación.

El efecto de las sustituciones Asp→Ala en el grupo de residuos ácidos N-terminales y del cambio del grupo de residuos básicos C-terminales es más pronunciado con la enzima ratCK1 que con *X1*CK1 α . Este último cambio provoca un aumento en la K_m con ratCK1 (Tabla 4) mucho más de lo observado con *X1*CK1 α (Tabla 3).

4. *Especificidad del sitio fosforilable de diferentes isoformas de CK1.*

Con el objetivo de realizar un estudio comparativo de especificidad del sitio fosforilable entre algunas isoformas CK1 se usó ratCK1, que contiene al menos tres isoformas CK1 diferentes, y los anticuerpos descritos en Materiales y Métodos para inmunoprecipitar diferentes isoformas de CK1 y analizar la fosforilación de péptidos y sustratos proteicos.

4.1. *Fosforilación de péptidos por CK1 α , CK1 δ y CK1 γ inmunoprecipitadas desde ratCK1.*

En la Tabla 5 se compara la incorporación de fosfato en los péptidos Lib δ y Lib γ , por ratCK1 y las diferentes isoformas de CK1 inmunoprecipitadas desde esa preparación. Se observa que la fracción inmunoprecipitada por el anticuerpo antiCK1 α fosforila en forma baja pero significativa los péptidos Lib δ y Lib γ , en forma similar a *X1*CK1 α . Por otro lado, la selectividad de ratCK1 es similar a la de la fracción inmunoprecipitada por el anticuerpo antiCK1 γ , en ambos casos se observa una mínima actividad contra los péptidos Lib δ y Lib γ , siendo Lib γ el peor sustrato.

Sustrato usado	ratCK1	α	δ	γ	X/CK1 α
RRKDLHDDEEDEAM <u>S</u> ITA	100	100	100	100	100
MAEFDTG <u>S</u> IIIIFFAKKK	5	19	21	5	25
MAYYDAA <u>S</u> IIIIFFAKKK	2	16	0,4	<0,1	12

Tabla 5. Fosforilación de los péptidos derivados de Ser¹⁷⁴ de Inhibidor-2 y los péptidos derivados de la "librería" por diferentes isoformas de CK1.

La actividad CK1 de las diferentes isoformas CK1 inmunoprecipitadas desde ratCK1 fue determinada como se describe en Materiales y Métodos en la presencia de 300 μ M de los péptidos indicados. Los péptidos fosforilados fueron sometidos a hidrólisis ácida y ³²P-serina fue determinada por electroforesis de alto voltaje en papel y cuantificada en un aparato Instant Imager. La velocidad de fosforilación se expresa relativa a la del péptido Ser¹⁷⁴ de Inhibidor-2 (=100). α : actividad inmunoprecipitada por el anticuerpo antiCK1 α ; δ : actividad inmunoprecipitada por el anticuerpo antiCK1 δ ; γ : actividad inmunoprecipitada por el anticuerpo antiCK1 γ .

En forma consistente la actividad inmunoprecipitada por el anticuerpo antiCK1 γ daba cuenta de alrededor del 50% de la actividad total CK1 encontrada en ratCK1.

La Figura 12 muestra la fosforilación de los péptidos, **RRKHAAIGDDDDAYSITA** y **RRKHAAIGDDDDAAYSITA**, que difieren en la presencia de un residuo aspártico en la posición $n-3$ relativo a la serina fosforilable. Se observa que para CK1 α , CK1 δ y CK1 γ , la posición $n-3$ es un determinante positivo de fosforilación, en el caso de las tres isoformas el péptido **RRKHAAIGDDDDAAYSITA** incorpora entre un 10 y un 20% de la radiactividad incorporada en el péptido tipo silvestre **RRKHAAIGDDDDAYSITA**. Este resultado destaca la importancia de la posición $n-3$ como determinante de especificidad y que éste es un fenómeno común a varias de las isoformas CK1.

4.2. Fosforilación de fosfopéptidos por CK1 α , CK1 δ y CK1 γ aisladas por inmunoprecipitación desde ratCK1.

Como se mencionó anteriormente la actividad CK1 puede ser dirigida también por grupos RRK previamente fosforilados. En la sección 1.3 se determinó que X1CK1 α era capaz de fosforilar péptidos con residuos previamente fosforilados. Con el objetivo de extender estos estudios a otras isoformas CK1 se realizó la fosforilación de fosfopéptidos con las isoformas aisladas por inmunoprecipitación desde ratCK1. La Figura 13 muestra la fosforilación de diversos fosfopéptidos por estas isoformas CK1 aisladas. Se observa que el péptido **EEEEESIT** no es sustrato para ninguna de las isoformas CK1 analizadas y los mejores sustratos, tanto para CK1 α , CK1 δ como para

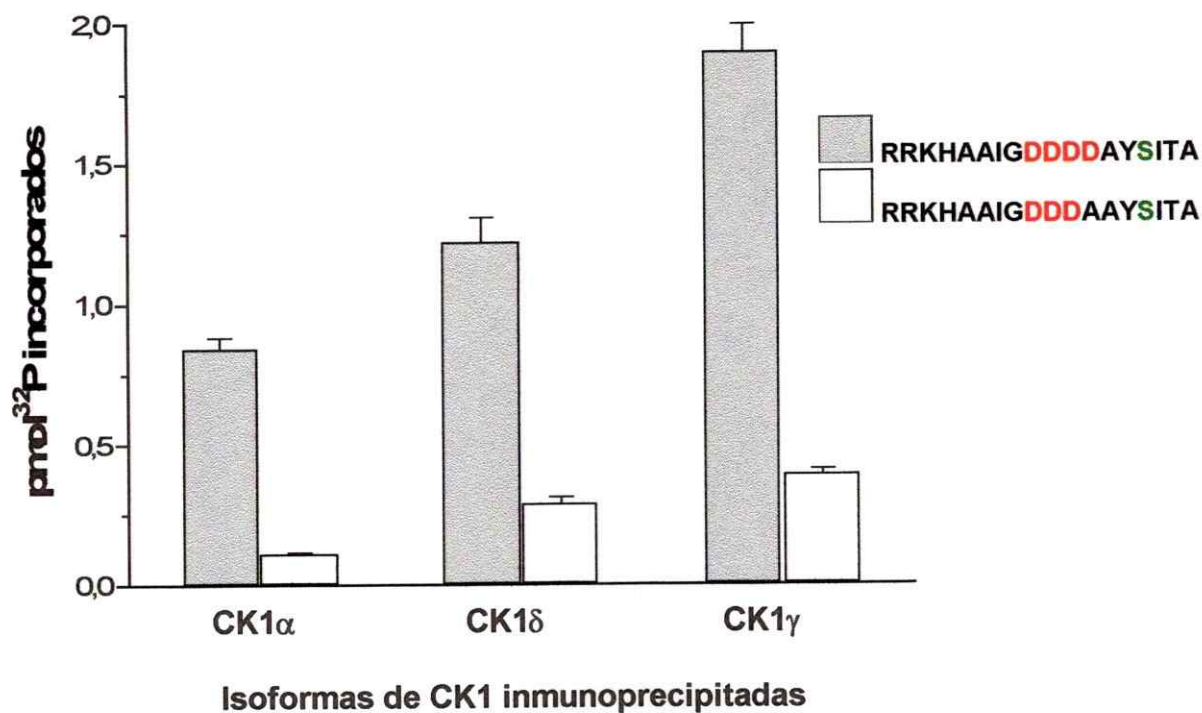


Figura 12. Efecto de la sustitución Asp \rightarrow Ala en la posición $n-3$ del péptido sustrato sobre la actividad de CK1 α , CK1 δ y CK1 γ .

La actividad de las diferentes isoformas CK1 inmunoprecipitadas desde ratCK1 fue determinada como se describe en Materiales y Métodos en la presencia de 300 μ M de los péptidos sustratos indicados.

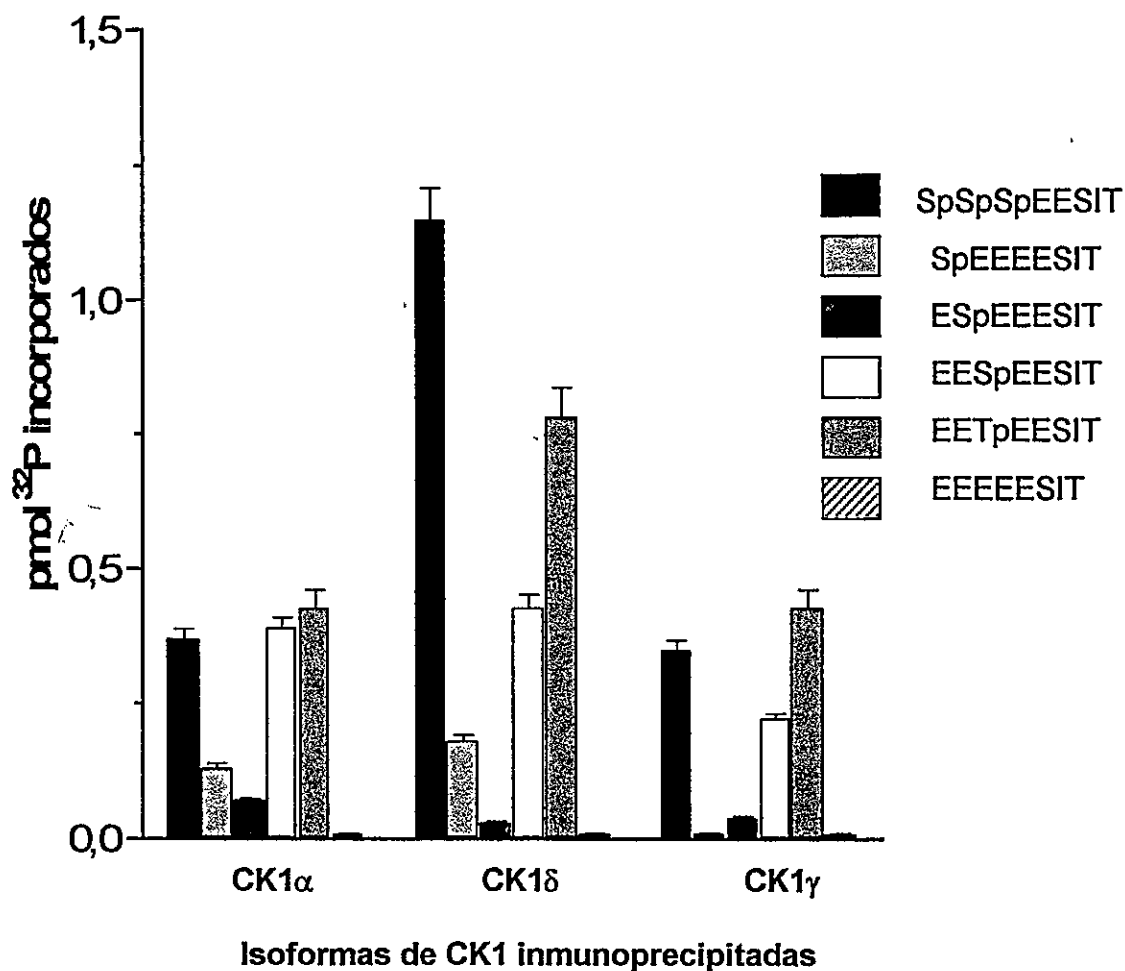


Figura 13. Fosforilación de fosfopéptidos por CK1 α , CK1 δ y CK1 γ inmunoprecipitadas desde rat CK1.

Se determinó la fosforilación de los fosfopéptidos indicados por las isoformas de CK1 aisladas mediante inmunoprecipitación desde ratCK1. Los fosfopéptidos fueron usados a una concentración de 400 μ M. El análisis de la radiactividad incorporada se realizó como se describe en la leyenda de la Tabla 5.

CK1 γ , resultan ser el péptido con tres residuos de Ser-P $S_P S_P S_P EESIT$, y los péptidos con Ser-P y Thr-P en la posición $n-3$.

Entre las diferencias observadas destacan la alta eficiencia como sustrato del péptido $S_P S_P S_P EESIT$ para CK1 δ y el hecho que el péptido $S_P EEEESIT$ no es fosforilado por CK1 γ mientras que sí es sustrato para CK1 α y CK1 δ . Se observa el siguiente orden de preferencia por la posición de residuos previamente fosforilados:

CK1 α : $S_P S_P S_P EESIT \cong EES_P EESIT \cong EET_P EESIT > S_P EEEESIT > ES_P EEEESIT$

CK1 δ : $S_P S_P S_P EESIT > EET_P EESIT > EES_P EESIT > S_P EEEESIT > ES_P EEEESIT$

CK1 γ : $EET^P EESIT \cong S_P S_P S_P EESIT > EES_P EESIT > ES_P EEEESIT; S_P EEEESIT$

Para la isoforma CK1 γ , la fosforilación del péptido $S_P EEEESIT$ no es detectable.

4.3. Fosforilación de sustratos proteicos por CK1 α , CK1 δ y CK1 γ inmunoprecipitadas desde ratCK1.

Con el objetivo de determinar si existían diferencias entre las isoformas de CK1 al fosforilar sustratos proteicos, se usaron las isoformas CK1 inmunoprecipitadas desde ratCK1 para analizar la fosforilación de diversas proteínas previamente descritas como sustratos de la actividad CK1.

En la Figura 14 se muestra la fosforilación de: Inhibidor-2, fosvitina, caseína, β -caseína y la proteína viral VpU por CK1 α , CK1 δ y CK1 γ aisladas desde ratCK1. Se observa que las tres isoformas analizadas presentan un patrón similar de preferencia por los sustratos proteicos analizados. En cada caso analizado β -caseína resulta ser el mejor

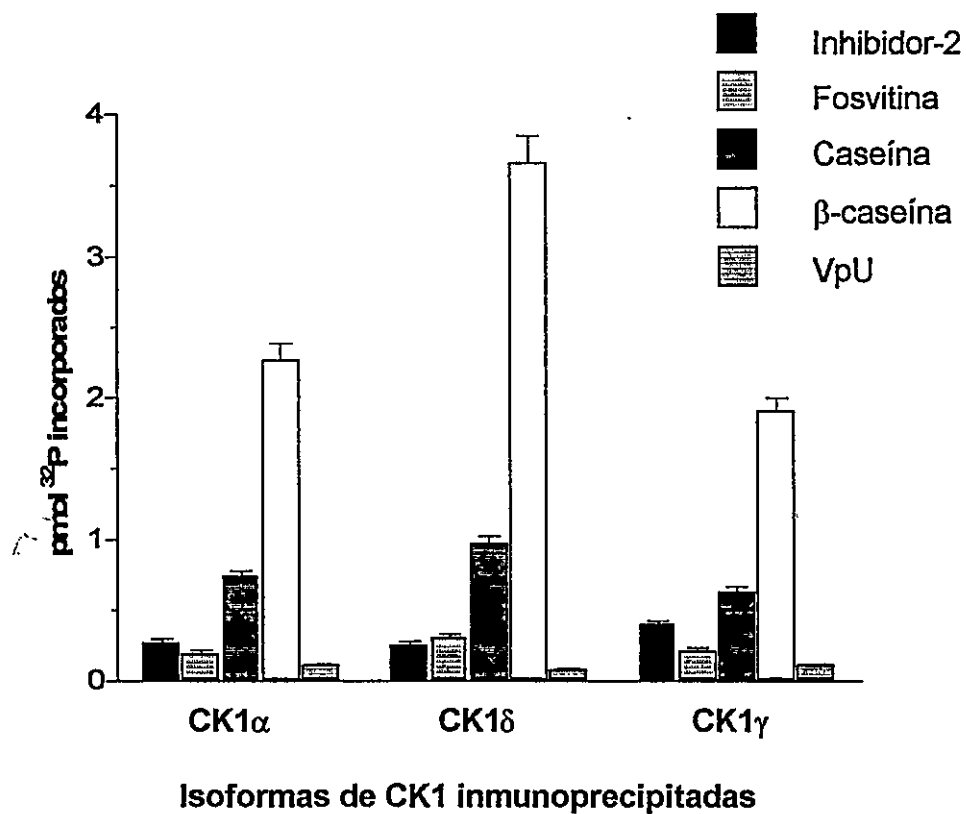


Figura 14. Fosforilación de sustratos proteicos por CK1 α , CK1 δ y CK1 γ inmunoprecipitadas desde ratCK1.

Se determinó la fosforilación de las proteínas indicadas a una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$, por las isoformas de CK1 aisladas desde ratCK1 por inmunoprecipitación. El análisis de la radiactividad incorporada se realizó como se describe en la leyenda de la Tabla 5.

sustrato, en especial para la isoforma CK1 δ , indudablemente debido al muy alto número de sitios fosforilables presentes en esta forma de caseína (desfosforilada en forma química).

Los resultados expuestos anteriormente, en los que se compara la fosforilación de péptidos por una preparación de CK1 que contiene varias isoformas (ratCK1) y una isoforma CK1 determinada (χ CK1 α), indican en primer lugar que no existen grandes diferencias en la especificidad del sitio fosforilable entre distintas isoformas CK1. Esto pareciera aplicarse tanto a la fosforilación de péptidos como de proteínas con algunas pequeñas diferencias observadas al usar fosfopéptidos como sustratos.

En cuanto a la secuencia primaria de un sustrato óptimo, destaca la gran importancia de un grupo de residuos ácidos N-terminales al residuo fosforilable como determinantes de la eficiencia de fosforilación por CK1. Los péptidos Lib δ y Lib γ no poseen los requerimientos para ser buenos sustratos, sin embargo poseen valores de K_m que indican que son capaces de interactuar en forma eficiente con la enzima, lo que explicaría el que sean seleccionados en el análisis de la librería.

Con estos estudios se cumple con el Objetivo 2 de esta Tesis y se presentan a continuación los resultados obtenidos al desarrollar el Objetivo 3, que dice relación con el análisis de la expresión *in vivo* de isoformas de CK1.

Sección C. ESTUDIOS DE LA EXPRESION *in vivo* DE CK1.

1. *Sobreexpresión de isoformas CK1 en células cos-7.*

A la fecha existen muy pocos antecedentes del papel de las diferentes isoformas CK1 en el contexto celular. Según los resultados mostrados en la Sección B de esta Tesis, las diferentes isoformas CK1 poseen en general una especificidad del sitio fosforilable similar, lo que hace ver como poco probable que sean diferencias a este nivel las que determinen la función de estas proteínas.

Una característica que puede ser determinante en la función de las diferentes isoformas CK1 es su localización subcelular. A la fecha existen muy pocos antecedentes de la localización de estas proteínas dentro de la célula. CK1 α se ha mostrado asociada a vesículas presentes en el citoplasma en células CHO (Brockman *y col.*, 1991), mientras que recientemente por un fraccionamiento muy crudo de extractos totales de células *cos-1* (separación de tres fracciones por centrifugación), CK1 ϵ se ha mostrado presente en cada etapa de separación: nuclear, citoplasmática y de membrana (Rivers *y col.*, 1998).

Con el objetivo de investigar la localización subcelular de isoformas CK1, se transfectaron los genes de *X1CK1 α* y CK1 δ humana en células en cultivo *cos-7*. Se eligieron estas isoformas debido a que las evidencias disponibles permiten incluirlas en ramas funcionales distintas dentro de la familia CK1: las isoformas que se relacionan con fenómenos de reparación de DNA por su capacidad de complementar mutantes de levadura (CK1 δ , CK1 ϵ y CK1 γ) y las que no lo hacen (CK1 α). Las isoformas CK1 α y CK1 δ son proteínas con diferencias estructurales importantes especialmente en la región carboxilo terminal, *X1CK1 α* posee 337 residuos con una masa molecular estimada de 38

kDa (Pulgar y *col.*, 1996) y CK1 δ 415 posee residuos y 49 kDa (Kusuda y *col.*, 1996). A pesar de lo anterior estas enzimas mantienen un alto grado de identidad que alcanza a un 68% en el dominio quinasa.

Para los experimentos de expresión *in vivo* se clonaron las regiones codificantes de XICK1 α y CK1 δ humana en los sitios *Bgl*III y *Eco*RI de los vectores de expresión para células eucarióticas pCEFL-HA y pCEFL-AU5. CK1 α ^{K46A}, una forma mutada de XICK1 α que da origen a una enzima inactiva fue clonada en el vector pCEFL-HA. La Figura 15 muestra un esquema del clonamiento de los genes indicados en los vectores pCEFL. Estos vectores, derivados del plasmidio pEBG que poseen el origen de replicación del virus SV40 y el promotor E2F, permiten la expresión constitutiva de las proteínas con una secuencia adicional que posibilita su posterior reconocimiento con un anticuerpo específico: pCEFL-HACK1 produce la enzima CK1 fusionada a un péptido de hemaglutinina (5 residuos) mientras que pCEFL-AU5CK1 produce la enzima CK1 fusionada a un péptido denominado AU5 (11 residuos).

Para la introducción del DNA plasmidial recombinante a las células se utilizaron las técnicas de transfección con DEAE-dextrano y transfección con Lipofectamina. A las 48 horas posterior a la transfección se analizó la expresión de las proteínas transfectadas por medio de Western Blot con el anticuerpo antiHA que reconoce el epitopo de hemaglutinina. La Figura 16 muestra la expresión de CK1 α ^{WT}, CK1 α ^{K46A} y CK1 δ transfectadas en células *cos-7*, observándose un nivel adecuado y similar de expresión de las tres proteínas transfectadas. Las proteínas detectadas poseen el tamaño esperado: 37 kDa para CK1 α ^{WT}, 40 kDa para CK1 α ^{K46A} y 50 kDa para CK1 δ . La diferencia de

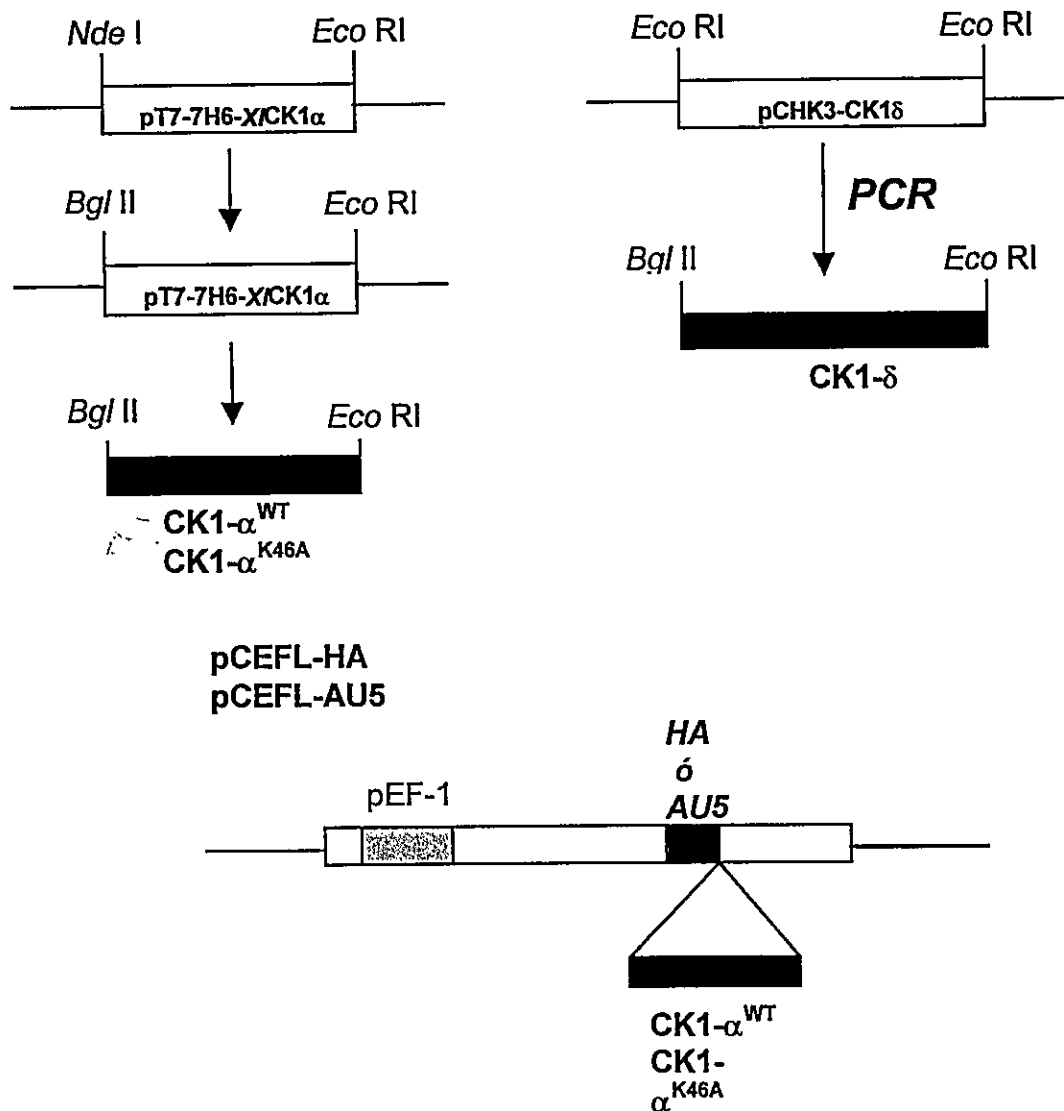


Figura 15. Clonamiento de *XICK1α* y *CK1δ* humana en los vectores *pCEFL*.

El sitio *Nde I* del gen de *CK1α* previamente clonado en el vector *pT7-7H6* se cambió por *Bgl II*. El fragmento resultante fue aislado y clonado en los vectores *pCEFL-HA* y *pCEFL-AU5*.

El gen que codifica para *CK1δ* humana fue amplificado por PCR desde el plasmidio *pCHK3* usando partidores que le adicionen el sitio *Bgl II*. El fragmento resultante *BglII-EcoRI* fue aislado y clonado en *pCEFL-HA* y *pCEFL-AU5*. *pEF-1*, *HA* y *AU5* indican la posición del promotor y de los epitopos *HA* ó *AU5* presente en los vectores.

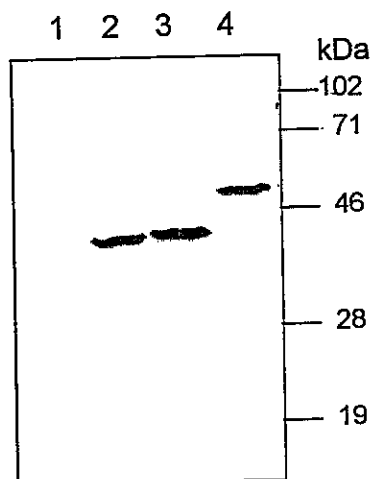


Figura 16. *Expresión de isoformas de CK1 transfectadas en células en cultivo.*

Células *cos-7* fueron transfectadas con el vector pCEFL-HA sin inserto (carril 1) o los vectores recombinantes que llevan los genes para CK1 α^{WT} (carril 2), CK1 α^{K46A} (carril 3) y CK1 δ (carril 4). A las 48 horas post-transfección se prepararon extractos totales de las células y se analizaron por medio de Western Blot con el anticuerpo antiHA. Se indica la posición de estándares de masa molecular.

tamaño observada entre CK1 α ^{WT} y CK1 α ^{K3&A} se debe a la inserción de una copia extra del oligonucleótido utilizado en la estrategia de clonamiento de este gen en el vector pCEFL-HA (ver Materiales y Métodos Sección B3), esta inserción le agrega a la proteína 16 residuos en el extremo N-terminal.

La eficiencia de transfección usando este sistema de vectores, en células *cos-7* y con los métodos de DEAE-dextrano y Lipofectamina variaba entre un 10 y un 30% según se describe en Materiales y Métodos.

En la Figura 17A se observa que la sobreexpresión de CK1 α ^{WT} y CK1 δ produce un aumento de la actividad CK1 sobre el nivel de fosforilación endógeno, medida en los extractos celulares totales con el sustrato peptídico específico **RRKHAAIGDDDDAYSITA**. La expresión de CK1 α ^{K46A} no afecta la actividad total CK1 determinada en las células transfectadas con esta mutante. El aumento de actividad detectado al transfectar las quinasas tipo silvestre y analizado *in vitro* es afectado por CK1-7, un compuesto derivado de isoquinolina y que se comporta como un inhibidor específico de la mayoría de las isoformas de CK1. Para determinar la significancia de las diferencias observadas entre los grupos de mediciones de actividad CK1 realizados, se aplicó un análisis estadístico de varianza de una vía (ANDEVA), mientras que para determinar cuáles grupos de datos presentaban diferencias significativas se realizó una Prueba a Posteriori de Tukey HSD, según se describe en Sokal y Rohlf (1995). De la primera parte de este análisis se desprende que existen diferencias significativas entre los grupos con valores de $F = 142,45$ y $p < 0,00001$. Al comparar el grupo 2 (extracto de células no transfectadas incubadas con el péptido sustrato) con los grupos 5, 8 y 11 (ver

números bajo las barras del gráfico en la Figura 17A) se observan valores de $p = 0,00012$, $p = 1,0$ y $p = 0,00012$ respectivamente. Estos valores respaldan la conclusión de que existe sobreexpresión de una actividad CK1 en células transfectadas con quinasas activas ($CK1\alpha^{WT}$ y $CK1\delta$) y no en células transfectadas con una quinasa inactiva ($CK1\alpha^{K46A}$).

Al analizar la actividad CK1 presente en inmunoprecipitados realizados desde los extractos totales con el anticuerpo antiHA, se observa en forma mucho más clara el aumento de actividad CK1 que se produce al expresar estas quinasas (Figura 17B). Lo anterior demuestra la expresión de las proteínaquinasas $CK1\alpha$ y $CK1\delta$ en una forma activa en células *cos-7*.

El ensayo en presencia del péptido específico permite obtener una medida aproximada de la cantidad de CK1 presente en los extractos crudos. En el caso de la transfección con el vector sin inserto, el aumento observado en la presencia del péptido muestra muy probablemente la actividad de las proteínaquinasas CK1 endógenas (Figura 17A, barra 2). Esto es reafirmado por la inhibición de la actividad por la presencia del inhibidor específico CK1-7 (Figura 17A, barra 3). En el caso de la transfección con el vector que lleva la enzima $CK1\alpha^{WT}$ se observa una fosforilación del sustrato peptídico mayor que en el caso de la transfección con el vector vacío (comparar barra 2 con barra 5 de la Figura 17A), este aumento de actividad es inhibido, aunque no totalmente, por CK1-7 (barra 6 Figura 17A). Algunas isoformas de CK1 ($CK1\gamma_3$) requieren concentraciones mayores para una inhibición total lo que explicaría la inhibición parcial observada con CK1-7.

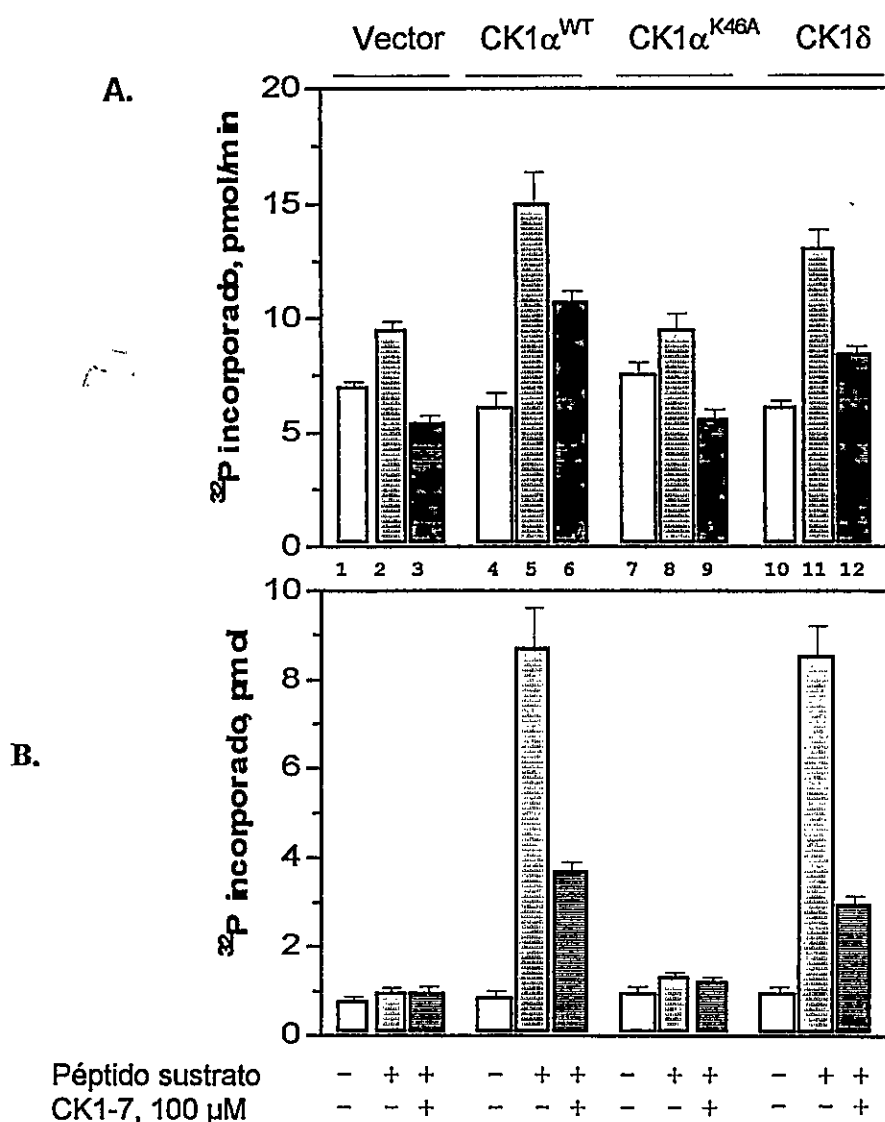


Figura 17. Actividad CK1 de células en cultivo *cos-7* que expresan *HACK1 α* y *CK1 δ* .

Se midió la actividad CK1 usando como sustrato el péptido específico para CK1 **RRKHAAGDDDDAYSITA** 300 μ M, CK1-7 100 μ M y [γ - 32 P]ATP 2000 cpm/pmol.

A. Se muestra la actividad CK1 en los diferentes extractos ensayados. Se usaron 5 μ g de proteína total de los extractos y ensayos de 5 minutos.

B. Actividad CK1 en inmunoprecipitados con antiHA de los extractos totales. Se usaron 10 μ l de los inmunoprecipitados y ensayos de 10 minutos.

Para ambos gráficos se indica el origen de los extractos analizados. Vector: células transfectadas con el vector pCEFL-HA vacío. CK1 α^{WT} : células transfectadas con el vector pCEFL-HA CK1 α^{WT} . CK1 α^{K46A} : células transfectadas con el vector pCEFL-HACK1 α^{K46A} . CK1 δ : células transfectadas con el vector pCEFL-HACK1 α . Los datos en A corresponden a 6 experimentos de transfección independientes, se grafica el promedio de las determinaciones con la desviación estándar correspondiente

La expresión de la quinasa CK1 α ^{K46A} produce un patrón muy similar al detectado en el extracto transfectado con el vector vacío (Figura 17A barras 7, 8, y 9) indicando que la enzima que se expresa no posee actividad catalítica. La transfección de la isoforma CK1 δ produce un aumento de actividad CK1 total que es inhibido, aunque al igual que CK1 α no totalmente, por el inhibidor específico de esta familia de proteínquinasas. Se debe destacar que siempre se detectó una actividad endógena menor que el control en los extractos de células transfectadas con quininas activas (Figura 17A barras 4 y 9 versus barra 1). Por otro lado, la actividad CK1 de los extractos totales (no así de los inmunoprecipitados con antiHA) de células transfectadas con la enzima CK1 δ fue siempre alrededor de un 25 a un 30% menor que la actividad de los extractos transfectados con CK1 α (Figura 17B), a pesar que los niveles de expresión son similares (ver Figura 16). Estos resultados son representativos de 6 experimentos de transfección independientes.

Dada la disponibilidad de dos isoformas de CK1 expresadas en forma activa en células en cultivo y con el objetivo de identificar proteínas que actuaran como sustratos *in vivo* de las isoformas CK1 α y CK1 δ se realizaron experimentos de marcación metabólica con ³²P-ortofosfato en células *cos-7* (Figura 18A) y fibroblastos de ratón Balb-c 3T3 (Figura 18B) transfectadas con estas quininas. Los resultados mostrados en la Figura 18 indican que al comparar el perfil de marcación de las células control con las células transfectadas con CK1 α o CK1 δ , no hay diferencias en la marcación de las proteínas (ver Figura 18A y B, carriles C, α y δ). Este resultado posiblemente indica que CK1 endógena es activa y no es limitante ya que la sobreexpresión de CK1 α y CK1 δ no

altera el perfil. Solamente al preincubar las células durante 30 min con el inhibidor CK1-7 (carriles 2 y 5), se observa una clara disminución en la marcación radiactiva de algunas proteínas tanto en células control como en células transfectadas con isoformas CK1. Entre las diferencias más claras observadas en el patrón de fosforilación total en células *cos-7* (Figura 18A), se observa la desaparición de la marca radiactiva de una proteína de 25 kDa y la disminución de la marcación de las proteínas de 35 y 37 kDa (indicadas con flechas). En fibroblastos (Figura 18B), se observa que el inhibidor CK1-7 afecta la fosforilación de proteínas de 25, 35, 37 y 40 kDa (indicadas con flechas). Estas proteínas, p25, p35, p37 y p40, representarían probables sustratos endógenos de CK1.

2. *Localización subcelular de isoformas de CK1 en células cos-7.*

Con el objetivo de analizar la localización subcelular de isoformas CK1 endógenas en células *cos-7* por medio de inmunofluorescencia indirecta se determinó inicialmente si los anticuerpos antiCK1 α , antiCK1 δ y antiCK1 γ , detectaban las proteínas correspondientes en este tipo de células. La Figura 19 muestra un Western Blot con las señales reconocidas por estos anticuerpos en extractos totales de células *cos-7*. Se observa que antiCK1 α reconoce dos bandas de 37 y 50 kDa siendo la banda de 37 kDa del tamaño esperado para CK1 α . La banda de 50 kDa no parece corresponder a una isoforma CK1 conocida y además no es detectada en la preparación de CK1 nativa que contiene una mezcla de isoformas (ver Materiales y Métodos Esquema 4). Esta banda de 50 kDa no es detectada con antiCK1 α en células en cultivo de ratón, pero si esta presente en extractos totales de células HeLa y en algunos tejidos de rata (no mostrado).

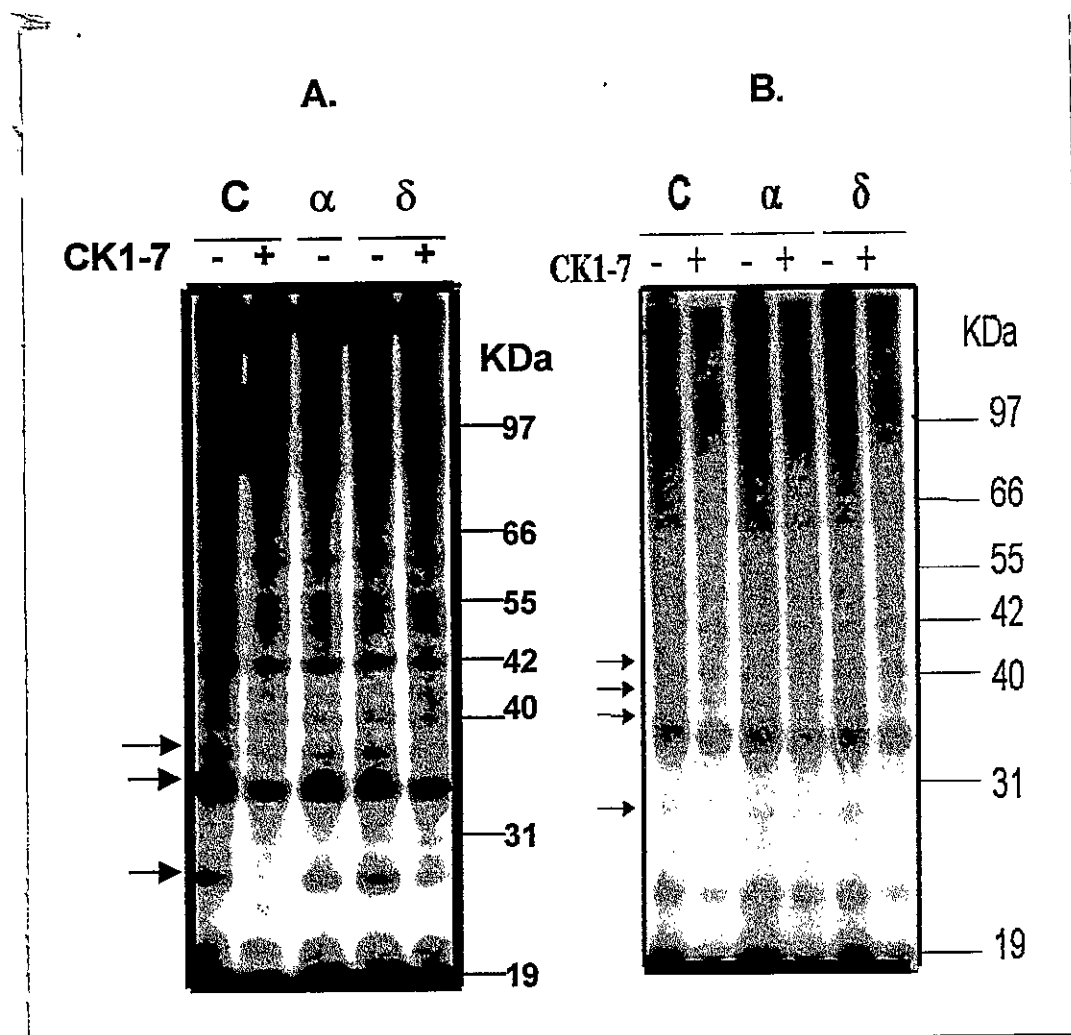


Figura 18. Marcación metabólica con ^{32}P de células en cultivo transfectadas con isoformas de CK1.

Células *cos-7* (A) y fibroblastos de ratón Balb-c 3T3 (B) fueron crecidas en placas p60 y se transfectaron con el vector pCEFL-HA vacío (C) ó con los vectores que expresan CK1 α^{WT} (α) y CK1 δ (δ). A las 48 horas posttransfección las células se lavaron con medio de cultivo DMEM deficiente en fosfato y suplementado con FCS dializado y se incubaron por 30 min en este medio de cultivo. Se agregó 1 mCi de ^{32}P -ortofosfato por placa y se incubó durante 5 horas adicionales. Transcurrida la incubación las células se colectaron y se prepararon extractos totales. Las proteínas radiactivas fueron resueltas en un gel de poliacrilamida al 10% con SDS y las señales reveladas por autoradiografía. Donde se indica se agregó 300 μM del inhibidor CK1-7 en la preincubación de 30 min. En B se agregó a las placas que no recibían inhibidor un volúmen igual de DMSO, el solvente del mismo. Las flechas señalan proteínas en las que se afecta la incorporación de fosfato en presencia del inhibidor. Se indica la posición de estándares de masa molecular.

Por otro lado el anticuerpo antiCK1 δ reconoce una señal única de ~50 kDa concordante con la masa molecular esperada para esta isoforma; el anticuerpo antiCK1 γ reconoce una banda única de ~70 kDa que es mayor que el tamaño esperado para CK1 γ . La detección de una isoforma CK1 γ con una masa molecular mayor de lo esperado se ha visto también en otros sistemas (Lussier y Larose, 1997) y esta diferencia en tamaño puede representar modificaciones postraduccionales no analizadas aún para esta familia de enzimas. Es posible también que esta forma sea el producto de un mRNA de 4,2 kb detectado por Zhai y colaboradores en varios tejidos de rata, y aún no analizado a nivel de proteína (Zhai *y col.*, 1995).

La localización de las isoformas α , δ y γ de CK1 endógenas en células *cos-7* se analizó por medio de inmunofluorescencia indirecta con el uso de los anticuerpos específicos para las isoformas de CK1. Estos anticuerpos fueron generados en conejo por lo que en la detección se utilizó como segundo anticuerpo un anti IgG de conejo conjugado a isotiocianato de tetrametil rodamina (TRITC). Las células *cos-7* fueron crecidas en láminas de vidrio y al nivel de subconfluencia fueron fijadas en formaldehído y procesadas para inmunofluorescencia como se describe en Materiales y Métodos.

La Figura 20A-C muestra los resultados obtenidos al estudiar la distribución de las isoformas CK1 α , δ y γ endógenas en células *cos-7*. Se muestran cortes ópticos obtenidos en un microscopio confocal Zeiss LSM-410 Axiovert 100. La isoforma CK1 α (Figura 20A) se observa como una enzima no nuclear con una distribución que pareciera indicar su asociación con algún tipo de estructura subcelular vesicular. En algunos casos

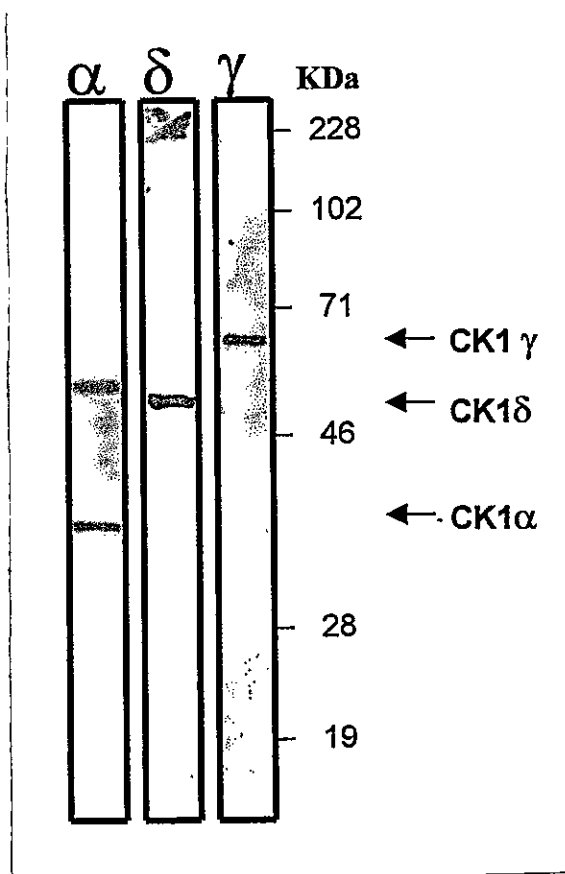


Figura 19. *Isoformas de CK1 presentes en células cos-7.*

Se detectó la presencia de isoformas de CK1 en células *cos-7* usando los anticuerpos antiCK1 α (carril 1), antiCK1 δ (carril 2) y antiCK1 γ (carril 3). 50 μ g de proteína total fueron separados en un gel de poliacrilamida al 10% con SDS y las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Se muestra un Western blot con los anticuerpos descritos en una dilución 1:750. Las señales fueron reveladas con un anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado a peroxidasa y el sistema de quimioluminiscencia ECL como se describe en Materiales y Métodos. Las flechas señalan las bandas correspondientes a las isoformas CK1 α , CK1 δ y CK1 γ en estas células analizadas. Se indica la posición de estándares de masa molecular.

fue posible observar una una pequeña cantidad de enzima presente en forma localizada dentro del núcleo.

La isoforma CK1 δ posee una localización mayoritariamente nuclear (Figura 20B). La isoforma CK1 γ no fue detectada en el núcleo (Figura 20C), se puede observar para CK1 γ una distribución vesicular similar a lo detectado para CK1 α . En cada experimento se analizaron 20 campos con alrededor de 200 células en total. Los resultados anteriores son representativos de tres experimentos independientes.

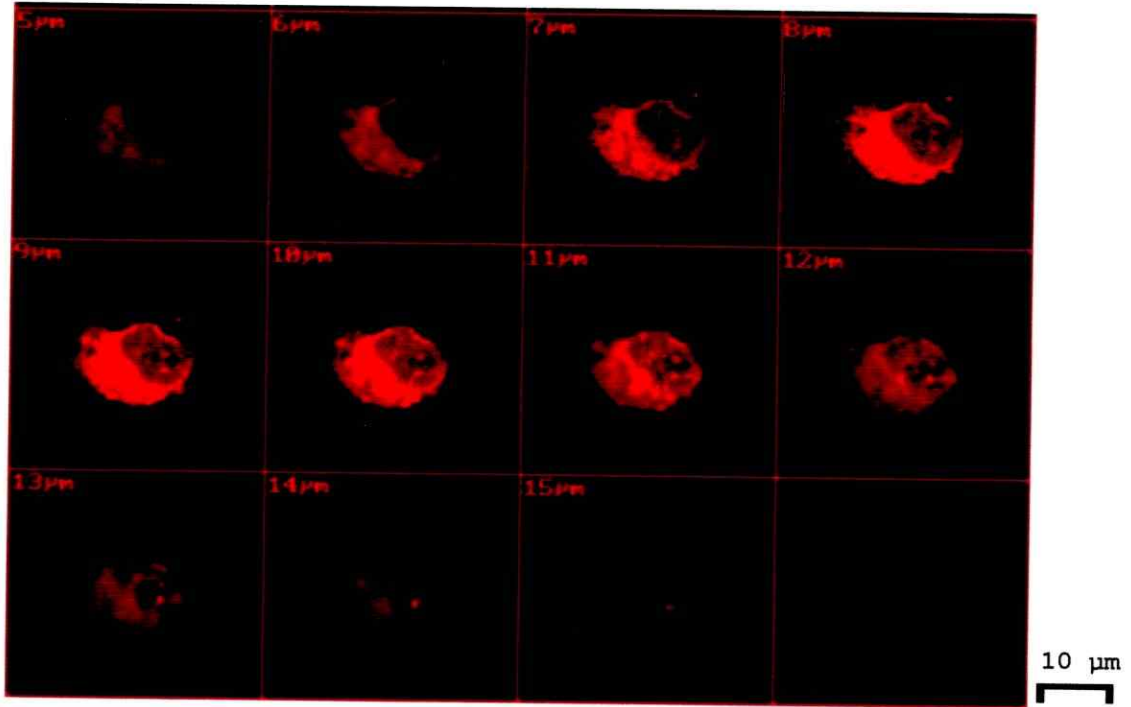
Se determinó además la distribución subcelular de las isoformas CK1 α y δ transfectadas en células *cos-7* como se describe en el punto 3.2. Para la detección de las proteínas expresadas ectópicamente se usó el anticuerpo monoclonal generado en ratón antiHA y un segundo anticuerpo anti IgG de ratón conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC).

Las isoformas de CK1 transfectadas fueron inicialmente detectadas por experimentos de inmunofluorescencia indirecta, detectada como fluorescencia transmitida en un microscopio Zeiss MPM400. En estos experimentos con células *cos-7* que expresaban las isoformas CK1, se realizó la tinción de la cromatina en las preparaciones, con yoduro de propidio. En este caso el color rojo define el perímetro nuclear, la fluorescencia de la fluoresceína, es decir de las proteínas transfectadas, corresponde al color verde y la sobreposición de ambas emisiones origina un color amarillo-anaranjado.

Figura 20. *Distribución subcelular de isoformas CK1 endógenas en células en cultivo.*

Células cos-7 fueron crecidas en láminas de vidrio en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% FBS. Al estado de subconfluencia las células fueron fijadas en 3,7% formaldehído y procesadas para inmunofluorescencia como se describe en Materiales y Métodos. Se usaron los anticuerpos antiCK1 α (Figura 20A), antiCK1 δ (Figura 20B) y antiCK1 γ (Figura 20C), en una dilución 1:100. Como anticuerpo secundario se usó un antiIgG de conejo conjugado a isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC) en una dilución 1:1000.

A.



B.

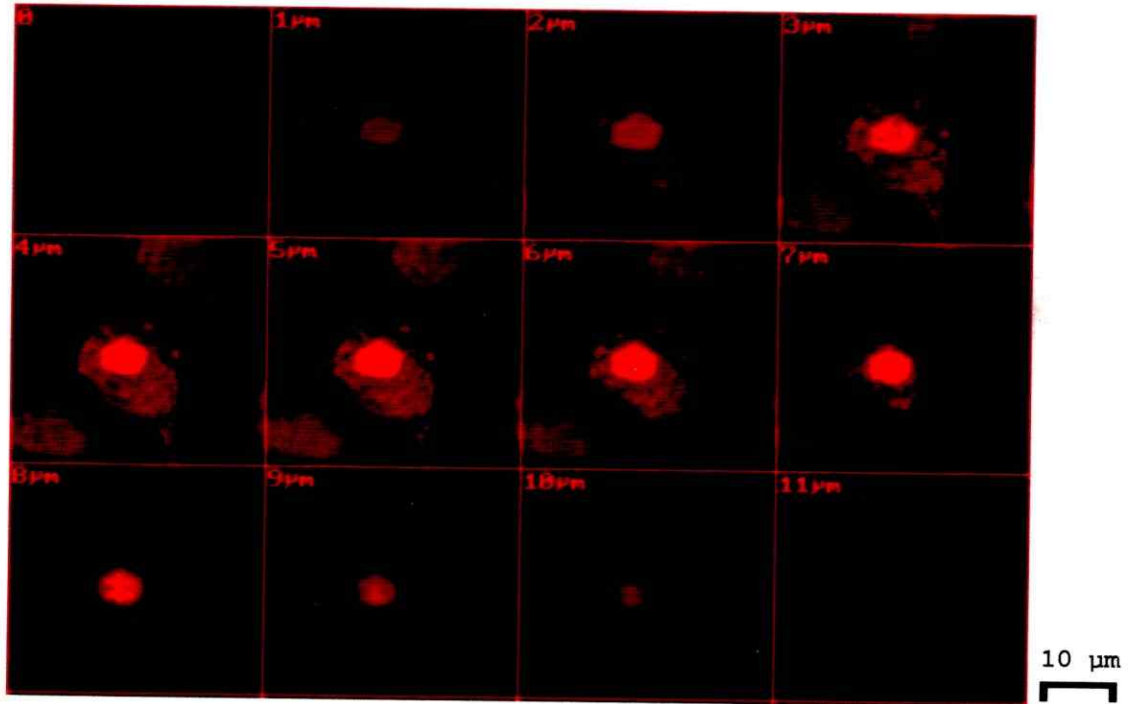
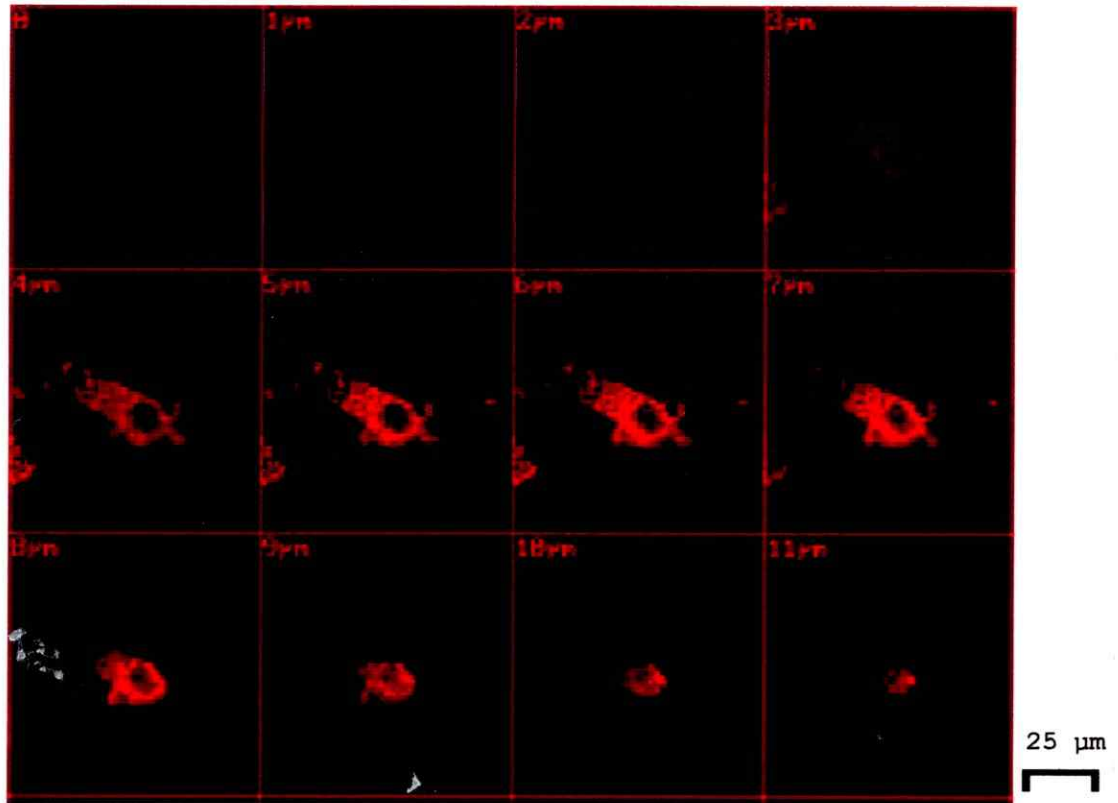


Figura 20.

C.**Figura 20 (cont.)**

La Figura 21A muestra que CK1 α ^{WT} se presenta mayoritariamente en el citoplasma de las células analizadas con una fracción en forma de vesículas. La proteína mutada CK1 α ^{K46A} posee una distribución similar a la enzima tipo silvestre indicando que la actividad no es necesaria para la localización de esta quinasa (Figura 21B). Por otro lado la isoforma CK1 δ se observa en citoplasma y núcleo, principalmente en el núcleo y en algunos casos en forma exclusiva en este organelo (Figura 21C).

Las imágenes presentadas en la Figura 22 corresponden a diferentes cortes ópticos de las células transfectadas con CK1 α y CK1 δ . En la Figura 22A se muestran imágenes de las células transfectadas con CK1 α . Estas permiten una aproximación a la distribución intracelular de la isoforma CK1 α transfectada en células *cos-7*. Se observa en general una distribución mayoritariamente citoplasmática. Existe una fracción de enzima localizada en el núcleo siendo posible distinguir la asociación a una estructura intranuclear similar al nucleólo .

Las imágenes obtenidas de células transfectadas con CK1 δ se muestran en la Figura 22B. Se observa en general una distribución más localizada que la observada para CK1 α , con presencia mayoritaria en el núcleo.

Se debe destacar que la distribución de las isoformas de CK1 transfectadas se correlaciona con la obtenida para las isoformas CK1 endógenas. En el caso de las células *cos-7* analizada en estos estudios la isoforma CK1 α es una proteína presente principalmente en el citoplasma, mientras que la isoforma CK1 δ se encuentra en núcleo y citoplasma, principalmente en el núcleo. A la fecha este corresponde al primer análisis de la distribución subcelular de distintas isoformas de CK1.

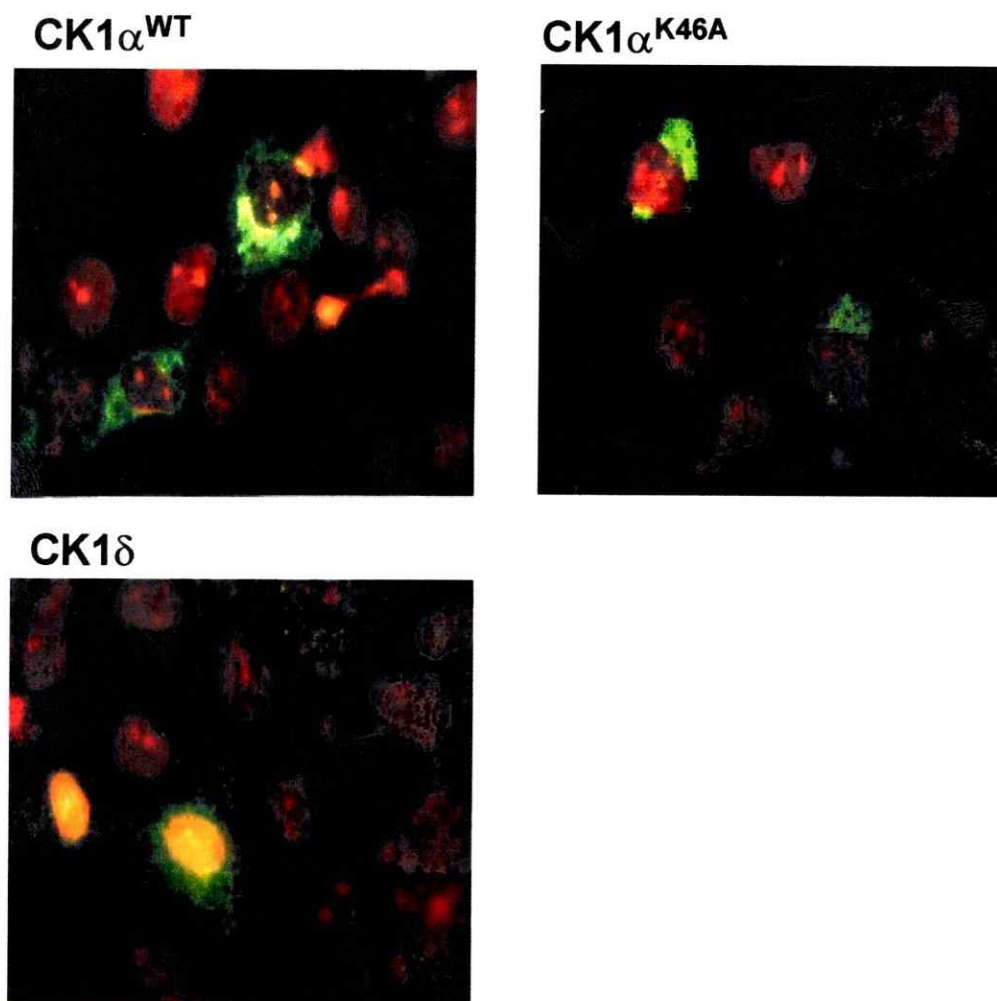


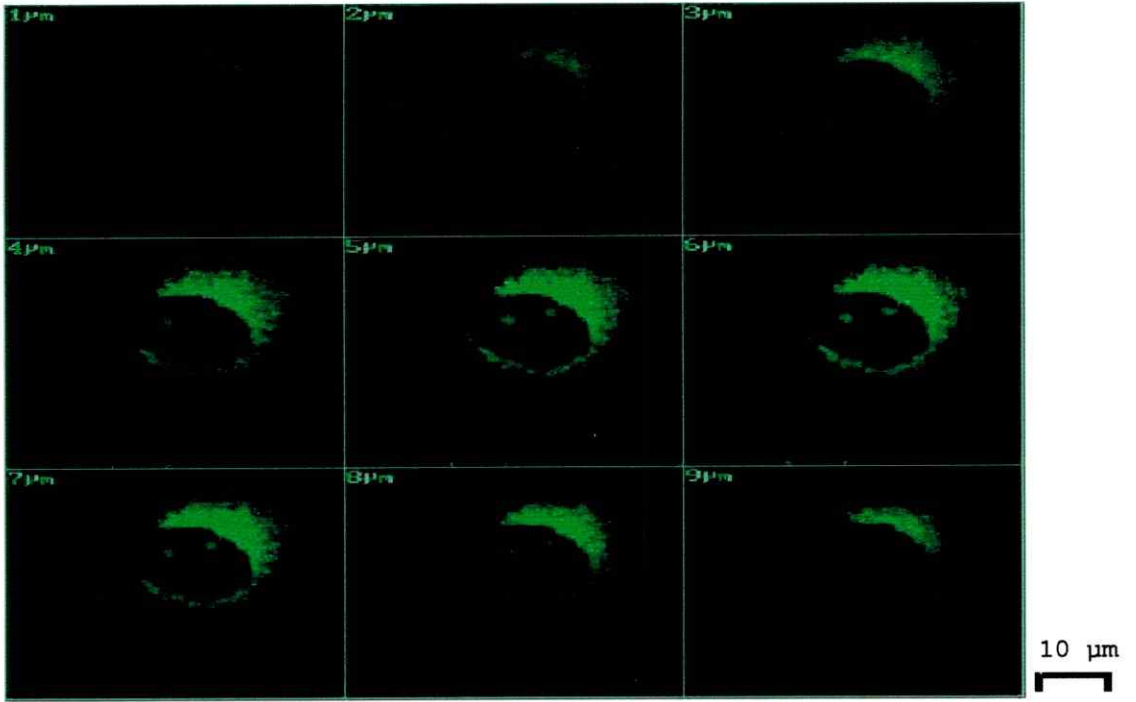
Figura 21. Localización subcelular de las isoformas $CK1\alpha^{WT}$, $CK1\alpha^{K46A}$ y $CK1\delta$ en células *cos-7*.

Se transfectaron células *cos-7* con los vectores pCEFL-HACK1 α^{WT} (A), pCEFL-HACK1 α^{K46A} (B) y pCEFL-HACK1 δ (C) en las condiciones descritas en Materiales y Métodos. En estos experimentos se incluyó una incubación con 20 $\mu\text{g/ml}$ de yoduro de propidio, al finalizar la incubación con el segundo anticuerpo.

Figura 22. *Localización subcelular de las isoformas CK1 α y CK1 δ transfectadas en células cos-7.*

Células *cos-7* fueron crecidas en láminas de vidrio y al estado de subconfluencia fueron transfectadas con 2 μ g de DNA de los vectores pCEFL-HACK1 α^{WT} (A) y pCEFL-HACK1 δ (B) mediante el uso de Lipofectamina según se describe en Materiales y Métodos. A las 48 horas postransfección las células fueron fijadas en 3,7% de formaldehído y procesadas para inmunofluorescencia usando el anticuerpo antiHA en una dilución 1:50 en tampón PBS. Como segundo anticuerpo se usó un antiIgG de ratón conjugado a fluoresceína (TRITC) en una dilución 1:50. Se realizaron seis experimentos independientes analizando cuatro láminas por experimento. Se muestran cortes ópticos representativos de los resultados obtenidos.

A.



B.

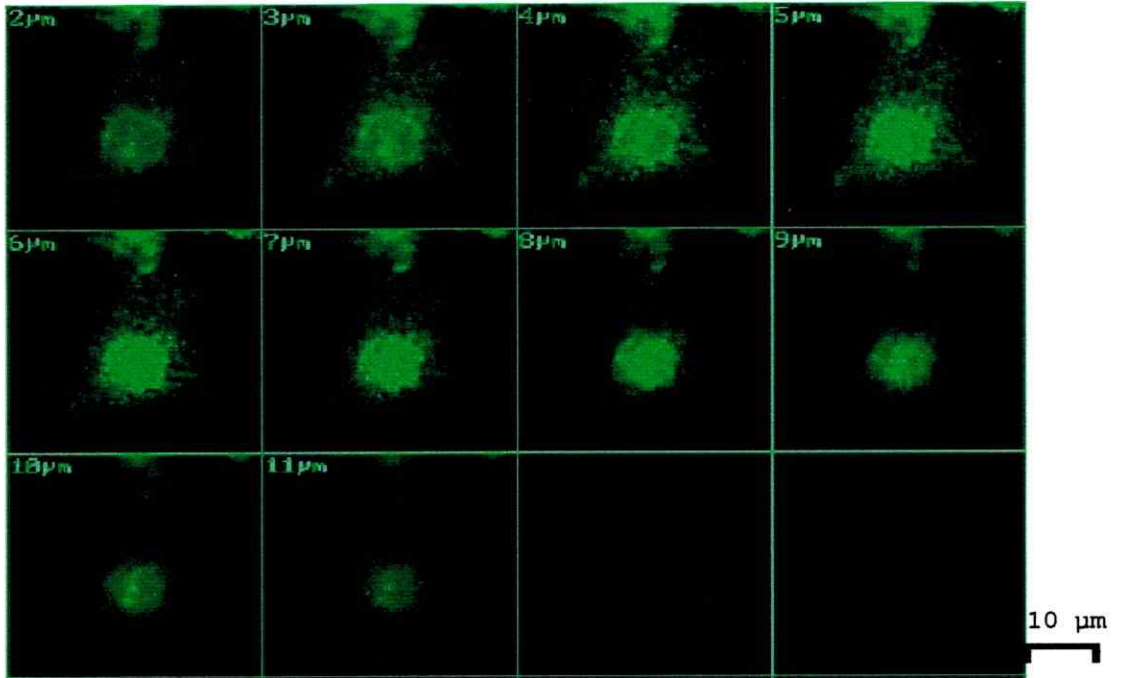


Figura 22.

2.1. *Controles y marcadores de localización subcelular.*

Para obtener mayor información sobre la localización subcelular antes descrita para las isoformas CK1 α y CK1 δ en células *cos-7*, se utilizaron compuestos y anticuerpos que permiten la identificación de diversos organelos subcelulares. Las señales obtenidas con estos marcadores son comparadas con las señales obtenidas en las Figuras 20, 21 y 22 .

La Figura 23 muestra la señal obtenida al usar los sueros preinmunes correspondientes a los anticuerpos antiCK1 α (Figura 23A) y antiCK1 δ (Figura 23B). La Figura 23C muestra la señal obtenida al incubar células transfectadas con el vector pCEFL vacío con el anticuerpo antiHA.

Las células *cos-7* derivan de células de riñón de mono verde africano transformadas con el virus SV40 y producen la proteína T-SV40 (Gluzman, 1991). Esta es una proteína exclusivamente nuclear. Con el objetivo de identificar el núcleo en estas células se utilizó un anticuerpo comercial antiT-SV40 y la señal obtenida se muestra en la Figura 24A.

Con el objetivo de analizar el citoesqueleto celular en células *cos-7* se utilizó un anticuerpo anti- α -tubulina para marcar esta estructura. La señal obtenida se muestra en la Figura 24B. Para obtener una señal representativa del retículo endoplásmico en estas células *cos-7* se utilizó ER-Tracker, un compuesto químico comercial fluorescente que marca en forma específica membranas de este organelo. En la Figura 24C se muestra una marcación simultánea con antiHA y ER-Tracker en células transfectadas con el plasmidio pCEFL-HACK1 δ , se observa una señal vesicular (rojo)

Figura 23 *Controles de los anticuerpos antiCK1 α , antiCK1 δ y antiHA.*

Se muestra el uso de los sueros preinmunes correspondientes a los anticuerpos antiCK1 α (A) y antiCK1 δ (B) incubados en las condiciones descritas en la Figura 20. Se muestra además la señal obtenida con el anticuerpo antiHA (C) en una dilución 1:50, al incubar células transfectadas con el vector pCEFL-HA vacío.

C.

0	1 μ m	2 μ m	3 μ m
4 μ m	5 μ m	6 μ m	7 μ m
8 μ m	9 μ m	10 μ m	11 μ m

Figura 23 (cont.)

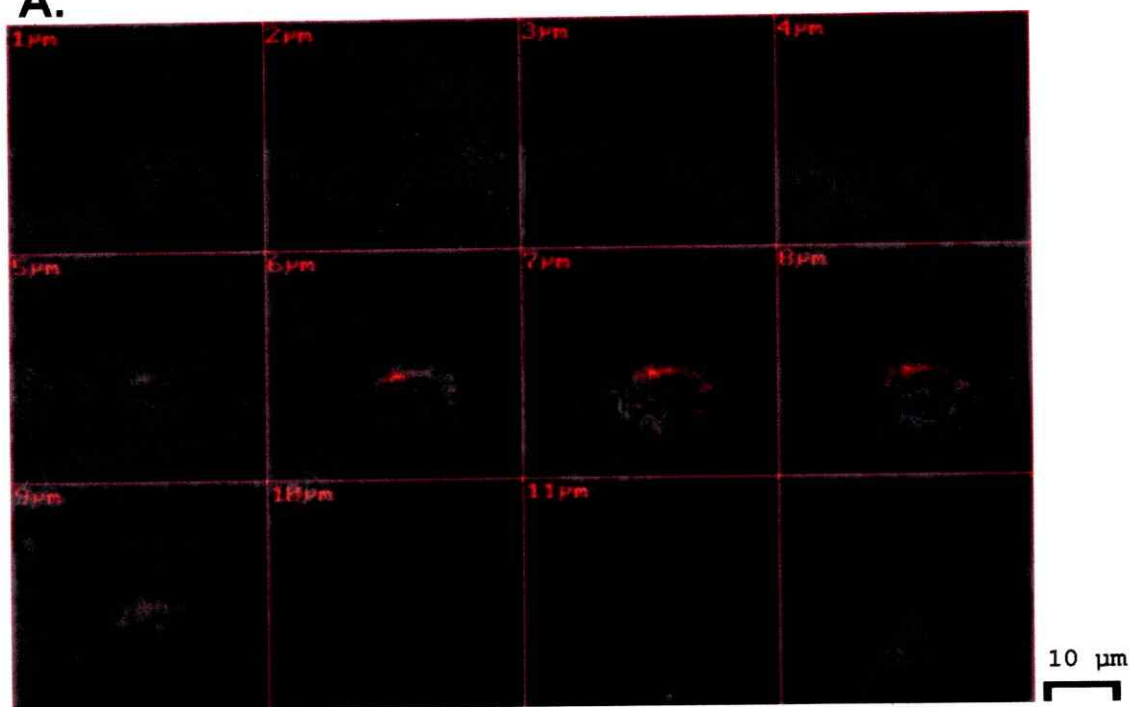
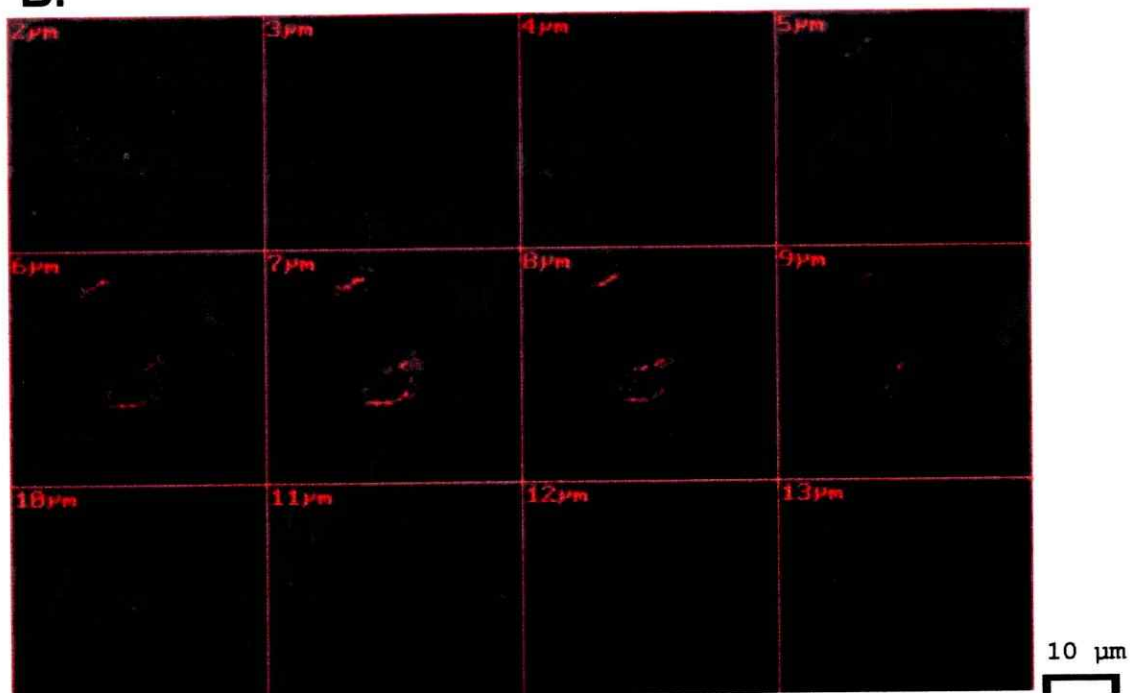
A.**B.**

Figura 23.

A.

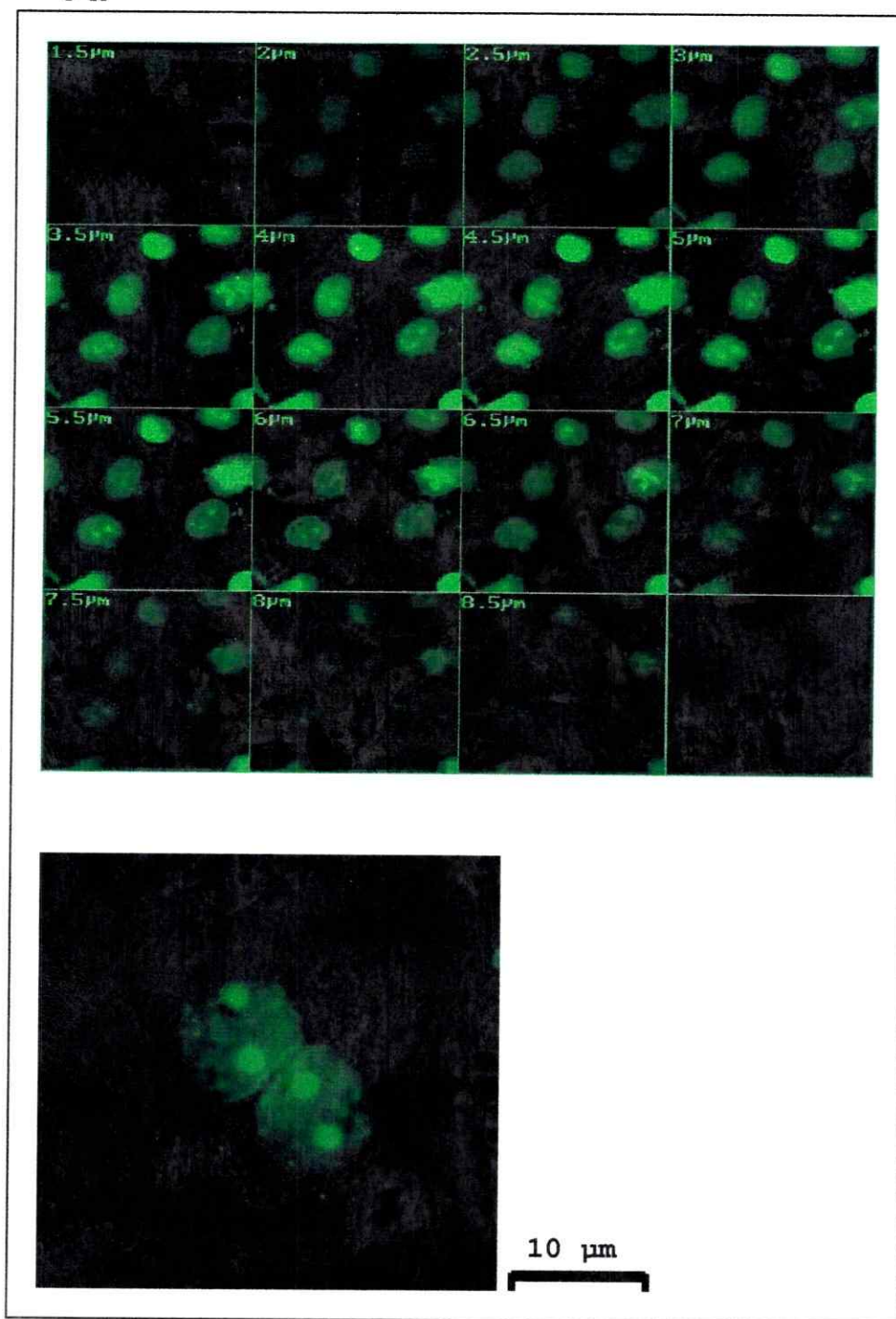
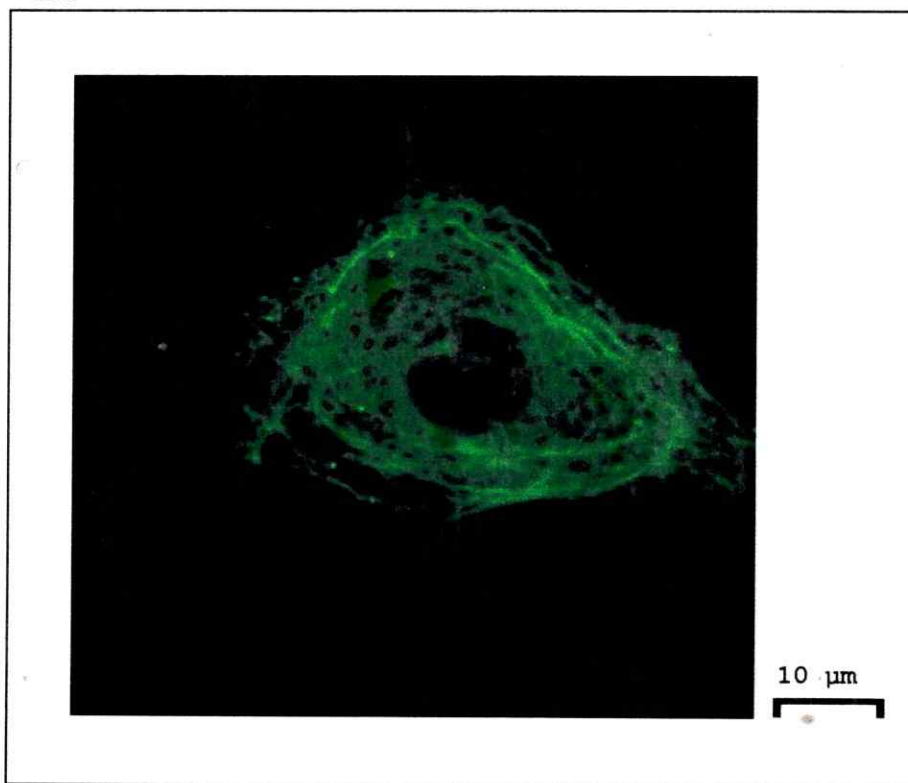
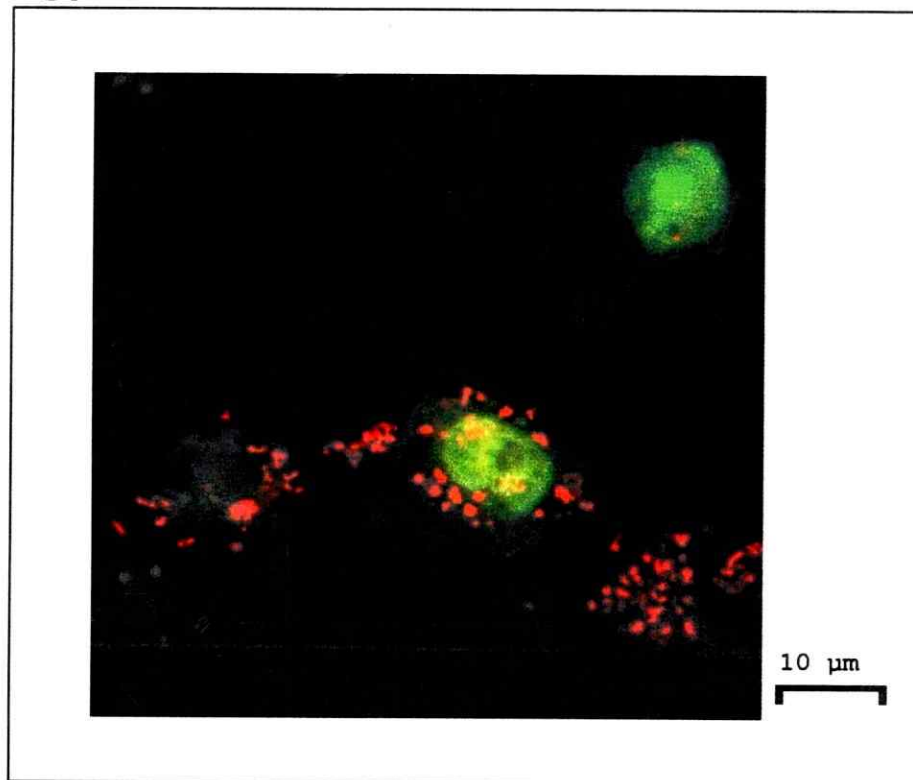
**Figura 24.**

Figura 24. *Marcadores de localización subcelular en células cos-7.*

Se muestra la señal obtenida con el anticuerpo monoclonal antiT-SV40 (A), anti α -tubulina (B) y la señal conjunta obtenida con antiHA en células transfectadas con CK1 δ y marcada con ER-Tracker (C) según se describe en Materiales y Métodos.

B.**C.****Figura 24. cont.**

que identifica al retículo endoplásmico y la señal verde identifica a la CK1 δ sobreexpresada.

El análisis de las señales obtenidas con los controles y marcadores de localización subcelular utilizados refuerza las conclusiones obtenidas que señalan que en células *cos-7* las isoformas CK1 α , CK1 δ y CK1 γ presentan una localización subcelular diferente. CK1 α y CK1 γ poseen una distribución mayoritariamente no nuclear con una probable asociación a estructuras subcelulares vesiculares. La isoforma CK1 δ se encuentra presente en el núcleo.

3. Relación entre el estado de proliferación celular, la actividad total CK1 y la localización subcelular de isoformas CK1.

Con el objetivo de extender el análisis de la expresión de CK1 en células en distintos estados de proliferación se analizó la posible relación entre la actividad CK1 y el estado proliferativo celular. Para lo anterior se realizó un experimento de privación y reestimulación con suero de modo de sincronizar los cultivos en distintos estados de proliferación. Se utilizaron fibroblastos de ratón Balb-c 3T3 crecidos en 10% FBS que fueron mantenidos en 0,5% FBS por 48 horas y reestimulados con 10% FBS por lapsos de tiempo de 1 a 6 horas. La Figura 25 muestra el nivel de actividad CK1 medido usando el péptido específico **RRKDLHDDEEAM**S**ITA** como sustrato. Se observa una actividad CK1 inicial baja que aumenta a las 4 horas post-estimulación y se mantiene por todo el período de tiempo analizado. Los datos presentados corresponden al promedio de tres experimentos independientes y señalan una relación entre el estado

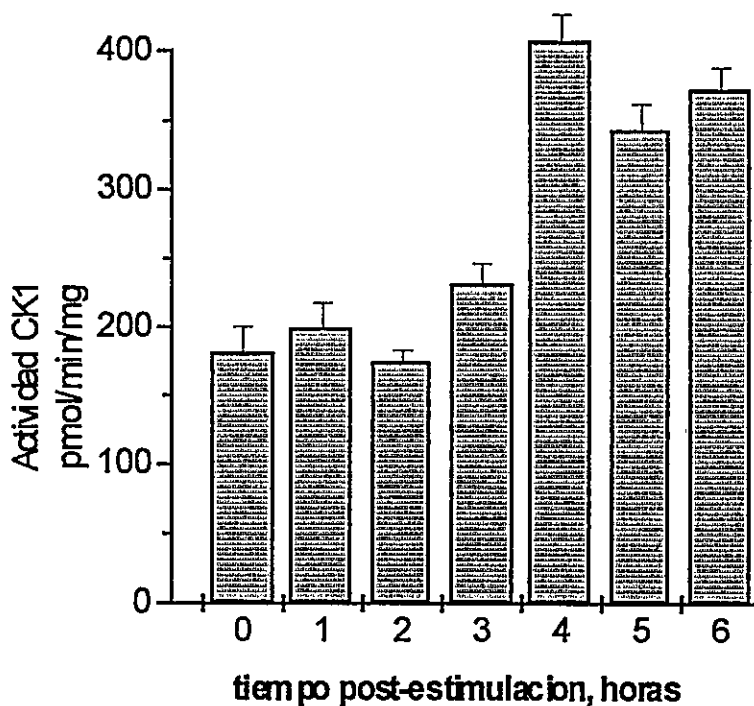


Figura 25. Efecto de la estimulación con suero sobre la actividad CK1 total en células en cultivo.

Fibroblastos de ratón Balb-c 3T3 fueron cultivados en DMEM suplementado con 10% de FBS, mantenidas en privación de suero en DMEM con 0,5% FBS durante 48 horas y finalmente reestimuladas con DMEM 10% FBS por los tiempos indicados. Se prepararon extractos celulares totales y se midió la actividad CK1 usando como sustrato el péptido **RRKHAAIGDDDDAYSITA**. Se usaron 5 μ g de extracto como fuente de enzima y 50 μ M de [γ - 32 P]ATP 1500 cpm/pmol en un ensayo de 5 minutos. Los valores representan un promedio de tres mediciones independientes realizadas en duplicado, en cada punto se restó el valor de la fosforilación endógena del extracto (ensayo sin péptido sustrato). Se grafican los promedios de tres determinaciones independientes y la desviación estándar correspondiente. En un análisis estadístico similar al señalado en la Figura 17 se obtuvo un valor de $p < 0,05$.

de proliferación celular y el nivel de actividad CK1 total en estas células.

Para analizar el efecto que podría tener la estimulación con FBS sobre la localización subcelular de CK1 α ^{WT}, CK1 α ^{K46A} y CK1 δ se transfectaron estas proteínas en fibroblastos de ratón Balb-c 3T3. Se realizó el experimento de privación y reestimulación con FBS ya descrito y se determinó la localización de las proteínas transfectadas por inmunofluorescencia según se describe en el punto 3.3. La Figura 26A muestra que al crecer las células en DMEM suplementado con 10% FBS, la localización de CK1 α (Figura 26A imagen A) es similar a lo detectado en células *cos-7* (ver Figura 20). Esta isoforma CK1 se excluye del núcleo y se asocia a una estructura vesicular.

La isoforma CK1 δ en cambio, está presente en núcleo y citoplasma (Figura 26E). Al crecer las células en 0,5% FBS se observa que la distribución de CK1 α no cambia en forma significativa manteniéndose en el citoplasma (Figura 26A imagen B). En el caso de CK1 δ se observa que la fracción nuclear es ahora excluida de este organelo detectándose esta proteína exclusivamente en el citoplasma (Figura 26A imagen F). Al reestimar con suero se observa que la distribución de CK1 δ retorna a la situación inicial con una fracción citoplasmática y una fracción presente en el núcleo (Figura 26A imágenes G y H). Estas observaciones se ven reforzadas al analizar cortes ópticos en las placas indicadas y que se muestran en la Figura 26B.

La isoforma CK1 α ^{K46A} posee la misma distribución que CK1 α ^{WT} y no se ve alterada por las condiciones de crecimiento celular (no mostrado). Estos resultados sugieren que CK1 δ posee una distribución dependiente del estado proliferativo celular con una mayor localización nuclear en células en activa proliferación.

Figura 26. *Localización subcelular de CK1 α y CK1 δ en células en distintos estados de proliferación.*

Las proteínas CK1 α y CK1 δ fueron transfectadas en fibroblastos de ratón Balb-c 3T3 y su expresión fue detectada por inmunofluorescencia indirecta usando el anticuerpo antiHA y un segundo anticuerpo conjugado a fluoresceína.

A) Planos únicos. Las imágenes A-D muestran células transfectadas con CK1 α y las imágenes E-H células transfectadas con CK1 δ . Las células transfectadas fueron mantenidas en DMEM suplementado con 10% FBS (imágenes A y E), transferidas a DMEM suplementado con 0,5% FBS durante 48 horas (imágenes B y F) y crecidas en DMEM suplementado con 10% FBS durante 45 min (imágenes C y G) ó dos horas (imágenes D y H), posterior a la incubación en 0,5% FBS.

B) Cortes ópticos de 1 μ m de espesor de células presentes en las placas mostradas en A.

1: células crecidas en 10% FBS.

2: células mantenidas en 0,5% FBS.

3: células estimuladas con 10% FBS durante 45 minutos.

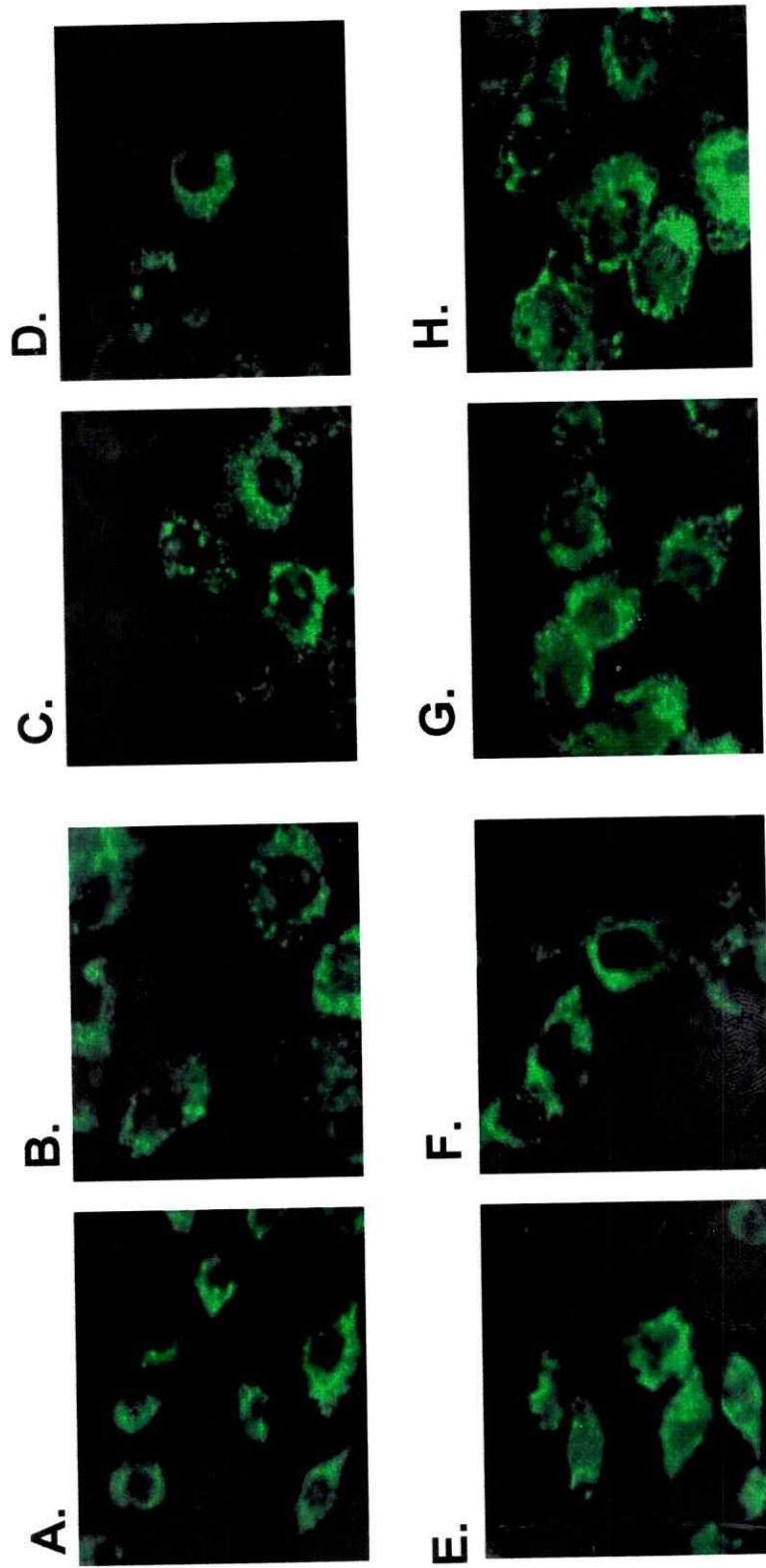
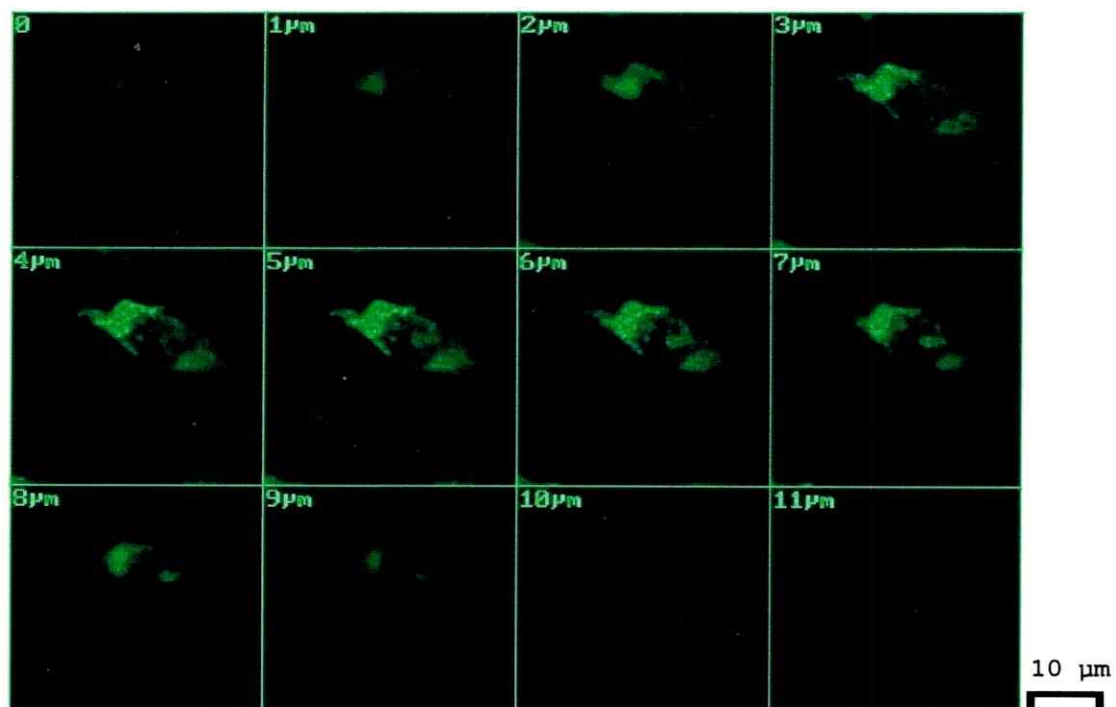
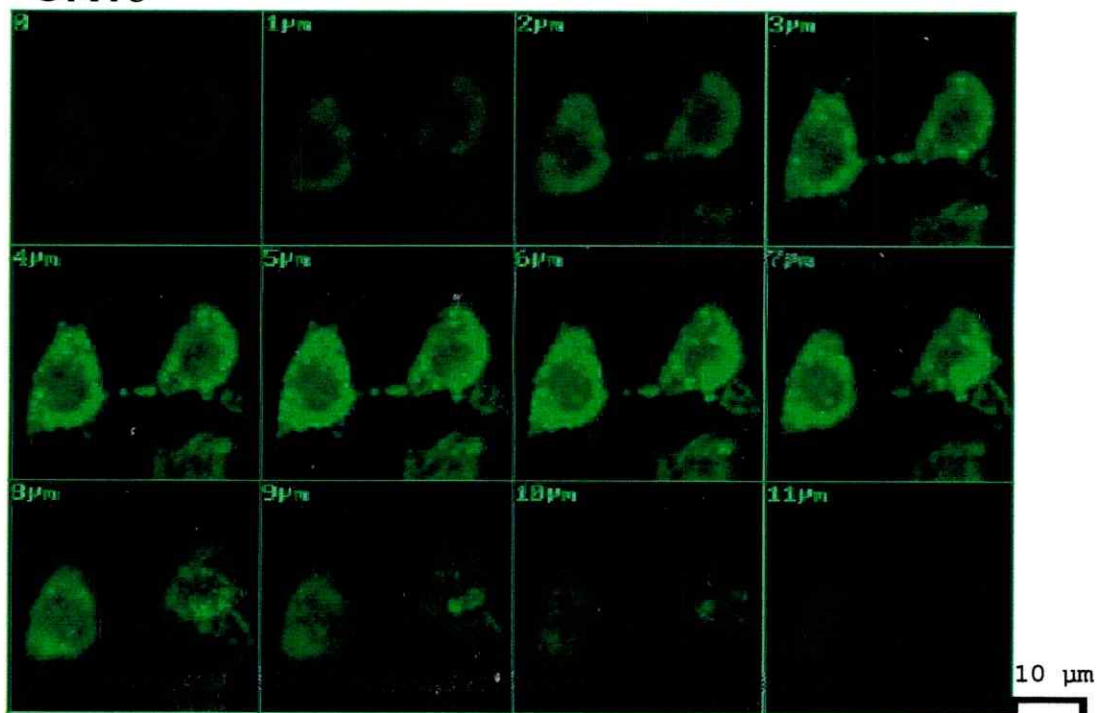


Figura 26A.

CK1 α **CK1 δ** **Figura 26B.1.**

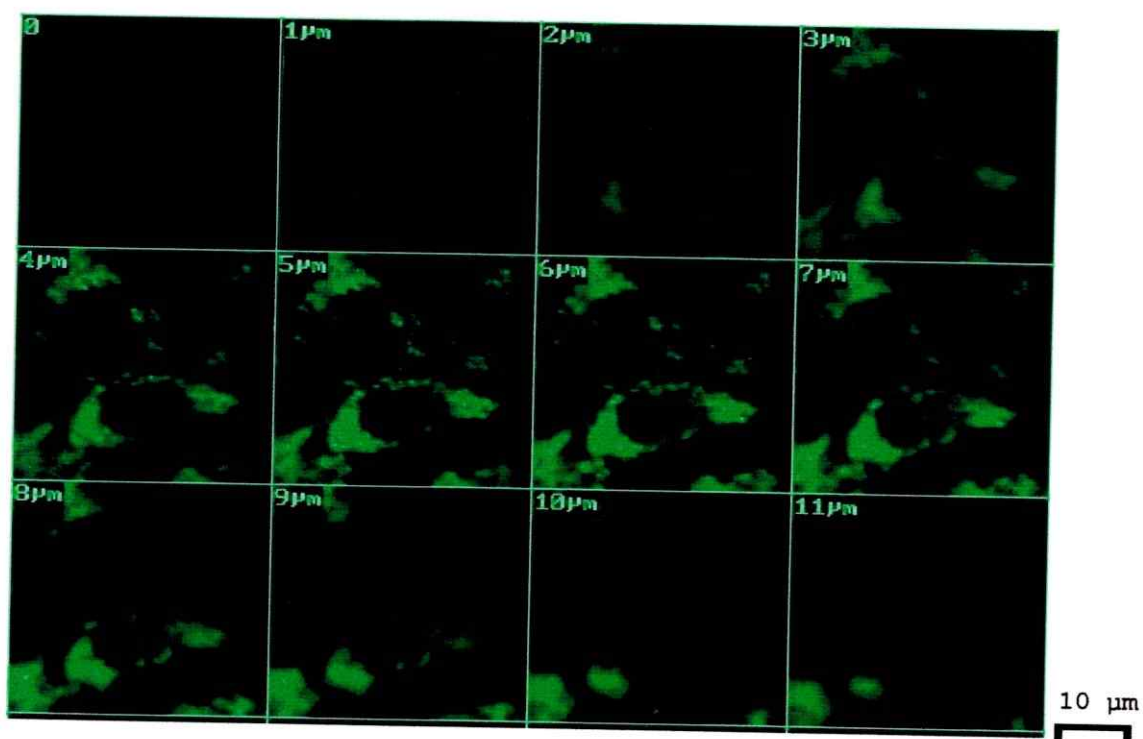
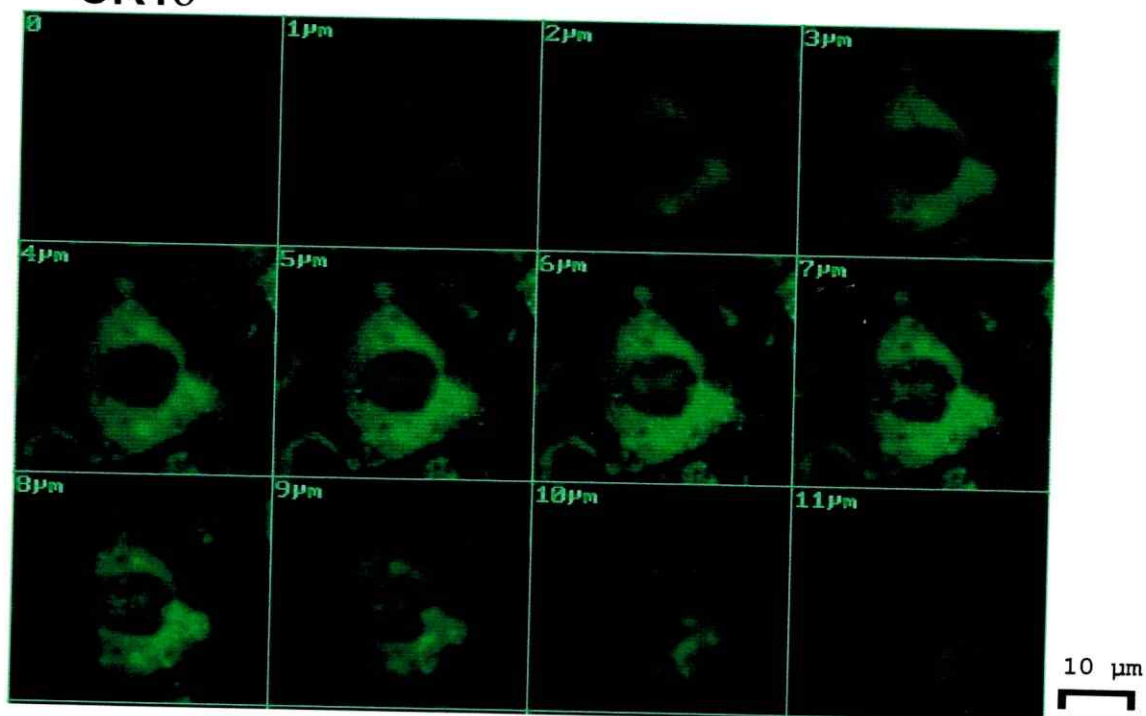
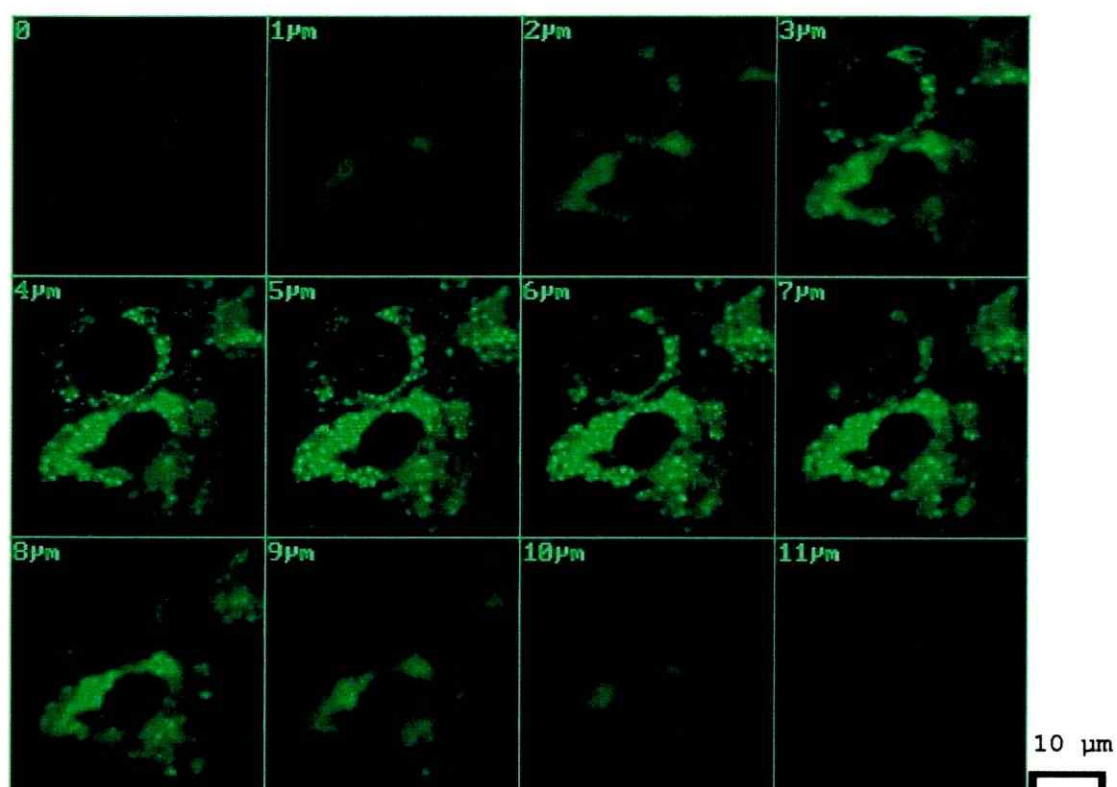
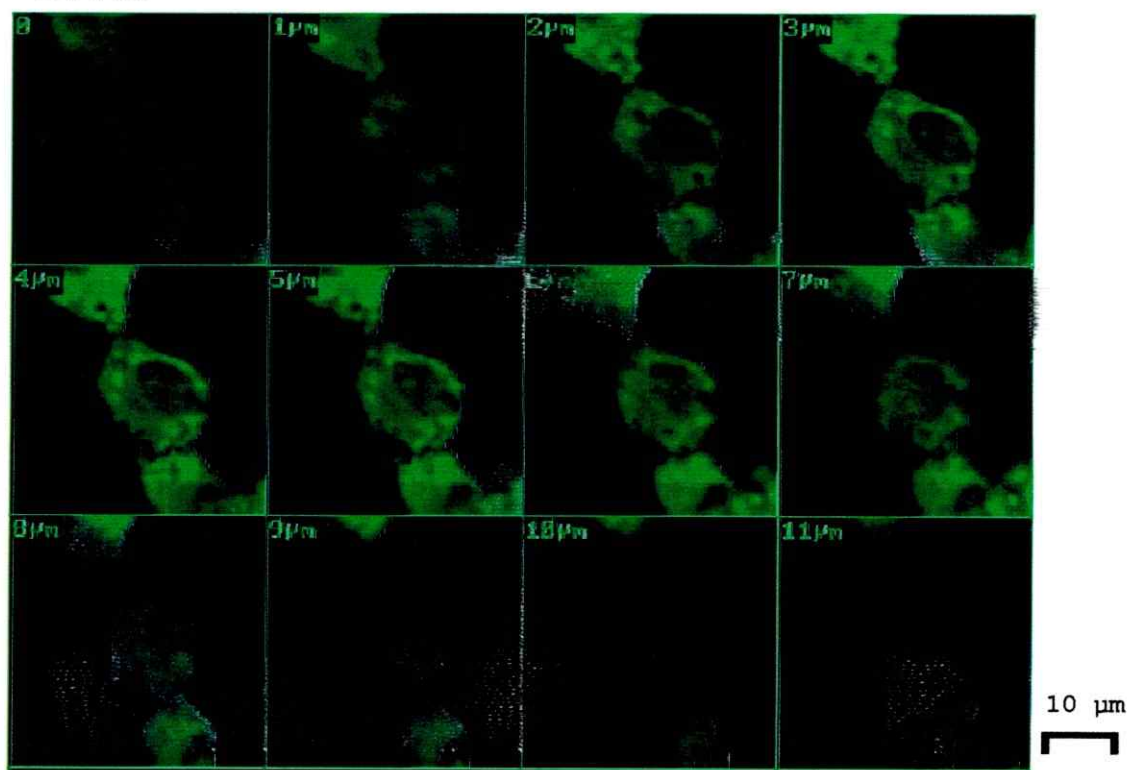
CK1 α CK1 δ 

Figura 26B.2.

CK1 α **CK1 δ** **Figura 26B.3.**

DISCUSION

Para la actividad enzimática descrita genéricamente como CK1, las más intrigantes características son la gran diversidad y distribución celular de sustratos y su expresión casi universal en tejidos de eucariontes. Una explicación para este fenómeno ha sido el esclarecimiento por estudios de clonamiento que CK1 es realmente una familia de isoformas genéticamente diferentes y que a la fecha consta de 7 miembros. Algunas de las inconsistencias en las características observadas, donde se utilizaron preparaciones de CK1 nativa, pueden deberse a que diferentes isoformas CK1 han sido analizadas en los distintos estudios reportados. No puede entonces establecerse una función y/o mecanismos(s) de regulación de CK1 hasta que cada una de las isoformas descritas hayan sido examinadas en detalle.

En el trabajo presentado en esta tesis se ha enfocado el estudio de la familia de proteínquinasas CK1 desde dos puntos de vista. Primero, la caracterización bioquímica de una isoforma CK1 en particular y estudio de las propiedades de especificidad del sitio de fosforilación *in vitro* de ésta y otras isoformas. Segundo, el análisis de la localización subcelular de dos isoformas específicas por medio de la transfección en células en cultivo y el estudio de la relación entre la proliferación celular y la actividad y localización subcelular.

1. *Caracterización bioquímica de CK1 α de X. laevis.*

En los estudios de caracterización bioquímica se analizó la isoforma CK1 α de *X. laevis*, la cual fue expresada en *E. coli* como una proteína de 63 kDa fusionada a

glutación *S*-transferasa. La cromatografía de afinidad en glutación-sefarosa permite un alto grado de purificación desde los extractos bacterianos aún con un rendimiento bajo. La fracción eluida de la columna contiene, sin embargo, otros polipéptidos de baja masa molecular que aparentemente corresponden a productos de degradación proteolítica de GST-CK1 ya que una de las bandas principales fue identificada, por medio de microsecuenciación, como glutación *S*-transferasa. Se realizaron varias preparaciones de la enzima donde se liberó la CK1 de la GST por tratamiento con con trombina resultando en una enzima muy inestable. Por esta razón, un número importante de los experimentos fue realizado con la enzima como proteína de fusión.

En forma alternativa se expresó *X1CK1 α* en un derivado del vector pT7-7 que permite su expresión con 6 residuos adicionales de histidina en el extremo amino. Esta forma de la enzima se purificó usando una columna de afinidad de níquel-NTA-agarosa. En este caso también es posible obtener un alto grado de purificación de la enzima y también se observan algunos péptidos de bajo peso molecular observados en el caso de la purificación de CK1 α como proteína de fusión. Estos polipéptidos no son reconocidos por un anticuerpo antiCK1 generado desde una secuencia peptídica de *X1CK1 α* , pero sí se marcan en forma radiactiva en la reacción de autofosforilación de la preparación enzimática. La forma His-CK1 tiene la ventaja de un mejor rendimiento en la fracción soluble y una estabilidad aumentada en comparación con la preparación como GST-CK1.

La gran mayoría de los estudios previos de caracterización de la actividad CK1 se han realizado con enzima preparada por métodos convencionales desde tejidos

animales. Estas preparaciones contienen, como se demostró en el transcurso de esta tesis, mezclas de diferentes isoformas de CK1, por lo que la determinación de características específicas de cada isoforma se hace difícil. Por lo tanto, la expresión en bacterias de una forma recombinante de CK1 α de *Xenopus laevis* permitió por primera vez estudiar algunas de las propiedades enzimáticas, en forma específica para esta isoforma.

Las propiedades cinéticas de X/CK1 α encontradas fueron muy similares a aquellas descritas para preparaciones de CK1 purificada desde tejidos, en especial, la fosforilación del péptido sustrato específico RRKDLHDDEEDEAMSITA con una K_m de 180 μ M y que es muy similar al valor de K_m de 184 μ M obtenido para la CK1 purificada desde hígado de rata (Marin y col., 1994).

La sensibilidad a la inhibición por heparina es una característica que permite discriminar entre las proteínasquinasa CK1 y CK2. Mientras CK2 es muy sensible a este inhibidor polianiónico, CK1 α es muy poco inhibida aún a las más altas concentraciones (10 μ g/ml) usadas en este análisis. Lo anterior concuerda con el comportamiento encontrado para CK1 nativa aislada desde tejidos animales (Tuazon y Traugh, 1991). En los últimos años y dada la disponibilidad de otras formas recombinantes de CK1, se ha demostrado que la sensibilidad de esta enzima a heparina es compleja y depende de la isoforma estudiada y del sustrato usado (Zhai y col., 1995; Graves y Roach, 1995). CK1 α puede ser inhibida por altas concentraciones de heparina (100 μ g/ml) mientras que CK1 δ y CK1 γ son activadas por concentraciones similares de este polianión. Estos

autores han demostrado además que el efecto de estimulación por heparina depende del estado de fosforilación de la enzima.

Se ha descrito el compuesto derivado de isoquinolina *N*-(2-aminoetil)-5-cloroisoquinolina-8-sulfonamida (CK1-7) como un inhibidor específico de la familia de proteínquinasas CK1. Las diferentes isoformas poseen diferente sensibilidad a este compuesto: CK1 δ es sensible, mientras algunos miembros de la familia CK1 γ , especialmente CK1 γ_3 (Zhai y col., 1995) son muy poco afectadas por este inhibidor. La sensibilidad de *X*CK1 α a CK1-7 resultó ser significativa con un I_{50} de 50 μ M determinado para esta enzima producida como GST-CK1 o His-CK1.

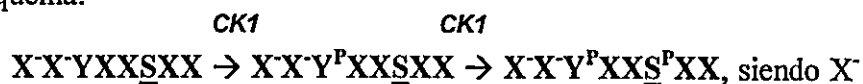
Antecedentes previos han indicado que CK1 es una quinasa con afinidad por residuos previamente fosforilados (Flotow y col., 1990; Meggio y col., 1991). Los resultados presentados en esta tesis indican que *X*CK1 α comparte esta propiedad al fosforilar el péptido SpSpSpEESIT con alta eficiencia, mientras el péptido EEEEEESIT no es fosforilado.

Se ha reportado que algunas isoformas de CK1 de levaduras, las cuales tienen solamente un 46% de homología con la CK1 α de *X. laevis*, poseen actividad tirosinaquinasa al usar el copolímero sintético poli(Glu⁸⁰:Tyr²⁰) como sustrato. Estas enzimas son capaces además de autofosforilarse en residuos de tirosina (Hoekstra y col., 1994). En *Arabidopsis thaliana* se ha mostrado que una isoforma CK1 con una extensión C-terminal larga fosforila poli(Glu⁸⁰:Tyr²⁰), pero una forma más corta de 36 kDa descrita en brocoli no es capaz de fosforilar residuos de tirosina en este péptido (Klimczak y col., 1995). La capacidad de fosforilar poli(Glu⁸⁰:Tyr²⁰) por la enzima

X γ CK1 α es baja comparada con la actividad de fosforilación de caseína en residuos de serina ó treonina, pero es claramente detectable en las condiciones ensayadas en este trabajo. Con el uso de péptidos sintéticos fue posible hacer una comparación de la eficiencia relativa de fosforilación de un sustrato conocido que posee serina como residuo fosforilable (RRKDLHDDEEDEAMSIAA) y un péptido que contiene un residuo de tirosina rodeado de residuos de ácido glutámico (RREEEEYEEE). El análisis densitométrico de las señales en la autoradiografía permitió estimar que el péptido con tirosina es fosforilado alrededor de un 5% de lo que es fosforilado el péptido con serina. En este mismo experimento se demostró que el péptido EEEEYFVGRRK no es fosforilado en forma detectable por CK1. Esta observación resulta de gran interés ya que indica que el reemplazo de grupos acídicos presentes hacia el lado carboxilo del residuo de tirosina fosforilado pueden tener drásticos efectos sobre la eficiencia del péptido como sustrato. En los estudios de los determinantes de especificidad de CK1 usando péptidos con serina como residuo fosforilable, no se han detectado efectos positivos o negativos de residuos acídicos en posiciones C-terminales al residuo fosforilable. Sin embargo un estudio más detallado podría indicar si la fosforilación de serina o treonina y tirosina por CK1 poseen diferentes requerimientos de especificidad. Songyang y colaboradores (Songyang y *col.*, 1995) han analizado la especificidad de varias tirosinaquinasas y han demostrado que, en la mayoría de los casos, los aminoácidos C-terminales a los residuos de tirosina son importantes determinantes de la especificidad.

El reconocimiento de residuos de tirosina en un ambiente ácido por CK1 se observó también en la fuerte inhibición de la fosforilación de caseína causada por poli(Glu⁸⁰:Tyr²⁰). La especificidad de esta interacción se observa en el hecho que polímeros de carga similar, como poli(Glu⁸⁰:Phe²⁰) y poli(Glu) producen una inhibición mucho menor. De acuerdo a su capacidad de actuar como un sustrato alternativo, poli(Glu⁸⁰:Tyr²⁰) se comporta como un inhibidor competitivo de la fosforilación de β -caseína con un valor aproximado de K_i aparente de 5 μ M.

Esta capacidad de algunas de las enzimas CK1 de fosforilar tirosinas cobra mayor interés si se considera que esta enzima es capaz de reconocer fosfoaminoácidos como determinantes de especificidad. En el proceso de fosforilación jerárquica podría ocurrir entonces que un sitio "pobre" se convierta en un sitio óptimo de fosforilación según el siguiente esquema:



cualquier aminoácido cargado negativamente y X cualquier aminoácido.

El análisis de la reacción de autofosforilación permitió determinar que en *XICK1* α se trataría de un fenómeno intramolecular y que ocurre fosforilación en por lo menos tres regiones de la proteína. En estos polipéptidos existen varios residuos serina, treonina y tirosina capaces de ser modificados, aunque ninguno de ellos concuerda con la secuencia de consenso clásica de fosforilación por CK1. El análisis de la autofosforilación de otras isoformas CK1, CK1 δ (Graves y Roach, 1995) y CK1 ϵ (Cegielska y *col.*, 1998) ha indicado que en estas proteínas, esta modificación ocurre en una región de alrededor de 100 aminoácidos en extremo C-terminal de la proteína. En

este segmento no se encuentran residuos que posean el consenso típico para esta quinasa, lo que indicaría que la especificidad de la reacción de autofosforilación es diferente de la especificidad de fosforilación de sustratos exógenos. La isoforma α contiene un extremo carboxilo terminal mucho más corto que el de estas proteínas. El análisis de los fosfoaminoácidos generados en la reacción de autofosforilación de la preparación de CK1 α ha indicado que se genera fosfotirosina. Este resultado sugiere que *XICK1* α , al igual que algunas isoformas de levadura, podría autofosforilarse en residuos de tirosina. Dada la estructura tridimensional determinada para las CK1 y otras quinasas se hace difícil explicar una reacción de autofosforilación en una región C-terminal alejada del sitio activo, para que esta reacción ocurra debería existir un grado importante de flexión de la estructura del C-terminal de modo que esta región se acerque al sitio catalítico. La isoforma CK1 δ ha sido cristalizada trunca en su extremo C-terminal (Longenecker *y col.*, 1996) y completa (Longenecker *y col.*, 1998). En este último caso si bien no se encontró una estructura asignable al extremo C-terminal, la unidad de celda cristalográfica contenía dos moléculas de proteína y esta interacción podría explicar la autofosforilación inhibitoria en el C-terminal que sufre esta isoforma de CK1. Para el caso de la isoforma CK1 α podría operar un mecanismo de regulación similar a pesar de que en nuestros estudios no hemos observado cambios significativos en la actividad de la *XICK1* α en la forma fosforilada (previa incubación con ATP).

La autofosforilación en tirosina de isoformas CK1 parece ser un fenómeno más general ya que la isoforma CK1-4 de *A. thaliana* fue aislada desde una genoteca de

expresión usando un anticuerpo antifosfotirosina y se demostró que es capaz de autofosforilarse en residuos de tirosina (Ali *y col.*, 1994; Klimczak *y col.*, 1995).

El poseer residuos de fosfotirosina permite que las proteínas presenten afinidad por otras proteínas que contienen dominios del tipo SH2 (Pawson y Schlessinger, 1995). Esta modificación puede, por lo tanto, ser altamente relevante para interacciones que dirijan la actividad CK1 a sitios celulares específicos. Recientemente se ha mostrado la asociación constitutiva de la isoforma CK1 γ_2 con la proteína Nck, una proteína que interactúa con receptores tirosinaquinasa a través de un dominio SH2. En este caso, sin embargo, la interacción con CK1 es a través de dos de los tres dominios SH3 presentes en Nck (Lussier y Larose, 1997). Es interesante notar que CK1 α es capaz de fosforilar en treonina a la proteína 14-3-3 (Dubois *y col.*, 1997), una proteína necesaria para la interacción de varias enzimas relacionadas con la transducción de señales por medio de regiones SH (Raf, PI3 quinasa, IGF-1), indicando que CK1 podría tener un papel importante en la formación de estos complejos. En levaduras existe evidencia que indica que la fosforilación de CK1 en tirosina puede aumentar la actividad enzimática debido a que el tratamiento con tirosinafosfatasa inhiben la enzima, mientras que serina/treoninafosfatasa no tienen efecto (Hoekstra *y col.*, 1994). En esta publicación se sugiere además que la autofosforilación en tirosina puede jugar un papel en la distribución subcelular de la isoforma de CK1 Hhp1.

2. *Estudios de la especificidad de sitio fosforilable de isoformas de CK1.*

La gran mayoría de los estudios de especificidad de sustrato de CK1 se han realizado con preparaciones de enzima nativa obtenida desde tejidos animales. Con el uso de péptidos sintéticos se ha definido la secuencia de fosforilación óptima de sustratos ácidos por CK1 como $(D/E)_nXXS/T$ con $n \geq 4$. Los péptidos que poseen las mejores propiedades como sustratos en términos de K_m y V_{max} han resultado ser aquellos derivados de los sitios fosforilados por CK1 en la proteína inhibidor-2 de fosfatasa-1: Ser⁸⁶ con la secuencia RRKHAAGDDDDAYSITA (péptido S86) y Ser¹⁷⁴ con la secuencia RRKDLHDDEEDEAMSITA (péptido S174) (Agostinis y *col.*, 1992; Marin y *col.*, 1994). Estos péptidos poseen como característica principal la presencia de un grupo de residuos ácidos (Asp o Glu) entre las posiciones $n-6$ a $n-3$ relativas al residuo de serina fosforilable.

Recientemente se ha descrito una aproximación experimental diferente al estudio clásico con péptidos sintéticos, para analizar la especificidad de sustrato de serina/treonina y tirosinaquinasas. Esta aproximación utiliza una "librería" de péptidos con secuencias sintetizadas al azar, los que se ponen en contacto con una quinasa dada. Los péptidos específicamente fosforilados por esa quinasa son aislados y posteriormente secuenciados. El análisis de la secuencia de los péptidos aislados permite identificar los aminoácidos preferidos por esa quinasa entre las posiciones $n-5$ hasta $n+5$ del sustrato. Esta es una secuencia teórica que representaría la secuencia óptima para la fosforilación de sustratos peptídicos por esa determinada enzima. Usando esta aproximación, Songyang y colaboradores observaron que existía una gran similitud entre las secuencias

seleccionadas de la "librería" y las secuencias fosforiladas por la enzima *in vivo* e *in vitro* en proteínas sustrato (Songyang *y col.*, 1996). Los casos más citados por estos autores son la quinasa CDC2 y la quinasa dependiente de cAMP (PKA). Para aplicar este método a la definición de el sustrato óptimo para CK1 Songyang y colaboradores diseñaron una "librería" que poseía como matriz la secuencia **MAXXXXSIXXXXAKKK** donde los aminoácidos Met, Ala, Ser, Ile, y Lys corresponden a los residuos ubicados en posiciones de secuencia fija, mientras que X indica las posiciones de secuencia variable en las que se introducen los aminoácidos al azar. Con esta "librería orientada" se describieron las secuencias óptimas de fosforilación de las isoformas CK1 δ y CK1 γ como **MAEFDTGSIIFFAKKK** (péptido Lib δ) y **MAYYDAASSIIFFAKKK** (péptido Lib γ) respectivamente.

Al comparar las secuencias derivadas de inhibidor-2 (S86 y S174) y las secuencias obtenidas de la "librería" (Lib δ y Lib γ), se observa que todos estos péptidos poseen un residuo ácido (generalmente Asp) en posición $n-3$. Sin embargo, los péptidos derivados de inhibidor-2 incluyen varios aminoácidos ácidos adicionales desde la posición $n-3$ (por ejemplo la secuencia **DDDD** entre $n-6$ y $n-3$ en el péptido S86) y además no poseen el grupo de residuos hidrofóbicos **IFF** que es fuertemente seleccionado en la "librería" en las posiciones $n+2$ a $n+5$.

Existía entonces una discrepancia muy grande entre los análisis realizados por varios grupos con enzima nativa y los obtenidos con dos isoformas de CK1 por medio del análisis de la "librería". Para dilucidar este punto y en activa colaboración con el laboratorio del Prof. Lorenzo Pinna decidimos hacer un estudio comparativo de estos

péptidos. Se realizó la comparación de la especificidad de sitio fosforilable de la isoforma CK1 α recombinante de *X. laevis* (*XICK1 α*) y una preparación de CK1 nativa obtenida desde hígado de rata (ratCK1). Los experimentos realizados con los anticuerpos anti-isoformas CK1, diseñados en base a la estructura de las isoformas α clonadas en el laboratorio y otras isoformas descritas en la literatura, permitieron determinar, por Western Blot e inmunoprecipitación, que ratCK1 contiene más de una isoforma CK1; al menos las isoformas CK1 α , CK1 δ y CK1 γ . La actividad inmunoprecipitada por el anticuerpo antiCK1 γ correspondía a alrededor del 50% de la actividad total CK1 inmunoprecipitada desde ratCK1, indicando la presencia de una actividad mayoritaria de CK1 γ en la preparación de hígado de rata. Para estos estudios se usaron como sustratos los péptidos derivados de inhibidor-2 y péptidos sintéticos con las secuencias obtenidas del análisis de la "librería", descritas anteriormente.

Al analizar la fosforilación de los distintos péptidos por *XICK1 α* y ratCK1, todos los datos obtenidos indican que *XICK1 α* y ratCK1 poseen una especificidad de sustratos peptídicos cualitativamente similar, aunque no idéntica. La similitud más destacable se observa en el fuerte requerimiento, para una óptima eficiencia de fosforilación de una agrupación de más de tres residuos acídicos, a partir de la posición $n-2$. El reemplazo de un residuo Asp por Ala en la secuencia **DDDD** en el péptido S86 provoca un descenso de un orden de magnitud en la eficiencia de fosforilación. Esta sustitución es más determinante en la posición $n-3$, aunque también posee un efecto negativo al estar presente en las posiciones $n-4$ y $n-5$.

El papel crucial del grupo de residuos Asp como determinante de especificidad en el péptido S86 no es consistente con las secuencias seleccionadas como óptimas para CK1 δ y CK1 γ en la librería. Los péptidos Lib δ y Lib γ son fosforilados por χ CK1 α en un nivel mucho menor que los péptidos S86 y S174, siendo aún peores sustratos para ratCK1 (donde las isoformas CK1 δ y CK1 γ están presentes). La baja eficiencia catalítica que se obtiene con los péptidos de la librería, se debe exclusivamente a bajos valores de V_{max} , mientras los valores de K_m son similares a aquellos de los péptidos S86 y S174.

Las isoformas CK1 α , CK1 δ y CK1 γ aisladas por inmunoprecipitación desde ratCK1 muestran una especificidad similar en relación a la importancia de la posición $n-3$, por otro lado, Lib δ y Lib γ son fosforilados en forma significativa por CK1 α inmunoprecipitada y en forma mucho menor por los inmunoprecipitados por antiCK1 δ y antiCK1 γ .

El péptido "híbrido" IGDDDDAY-SI-IIFFA, que posee la porción N-terminal del péptido S86 y la porción C-terminal de Lib δ ó Lib γ se comporta como un excelente sustrato con constantes cinéticas comparables a las del péptido original S86 IGDDDDAY-SI-TA. Este resultado indica por un lado que, la pobre función como sustratos de Lib δ y Lib γ puede ser mejorada notablemente insertándoles la secuencia acídica DDDD, mientras que por otro lado, la función como sustrato del péptido S86 mejora, sólo levemente en el caso de ratCK1 pero en forma más significativa para χ CK1 α , al insertarle la secuencia IIFF en posición C-terminal.

Los antecedentes anteriores demuestran claramente que las secuencias obtenidas del análisis de la "librería" y que, según este ensayo, definen la secuencia de consenso

óptima para la fosforilación de sustratos peptídicos acídicos por CK1, no representan en realidad buenos sustratos para ninguna de las isoformas CK1 analizadas.

Al analizar las posibles razones para esta afirmación se debe tener en cuenta la posibilidad que la selección de los péptidos de la "librería" sea influenciada por los residuos que ocupan las posiciones fijas dentro de la secuencia matriz **MAXXXXSIXXXXAKKK**. En particular, la región básica C-terminal **AKKK** insertada por razones técnicas, podría influenciar la selección. Entre los resultados presentados se muestra que el cambio de la secuencia **AKKK** C-terminal por la secuencia **RRKHAA** en posición N-terminal al residuo fosforilable, una posición en la que residuos básicos son compatibles con una eficiente fosforilación, no mejora la función de Lib δ ó Lib γ como sustratos de CK1. Es posible, sin embargo, que esta secuencia básica C-terminal pueda alterar el modo de unión de los péptidos Lib δ y Lib γ a la enzima y, por consiguiente, alterar la relevancia de los determinantes de especificidad "clásicos", reduciendo, por ejemplo, el efecto favorable de la secuencia **DDDD**.

Se debe destacar que los péptidos derivados de la "librería" poseen las características de inhibidores y/o sustratos alternativos de CK1 y podrían resultar muy útiles en estudios destinados a encontrar buenos inhibidores de estas enzimas.

Los resultados obtenidos en esta sección de esta tesis indican que se debe ser cauteloso al interpretar las conclusiones obtenidas del uso de "librerías" de péptidos para definir secuencias óptimas de fosforilación por proteínasas. Se debe hacer notar que aunque el resultado obtenido con la aproximación de la "librería" no muestra el

requerimiento crucial de un grupo de residuos ácidos N-terminales al residuo fosforilable, tampoco es totalmente inconsistente con éste. El péptido Lib δ posee un residuo Glu en la posición *n*-5, mientras que un residuo Glu es la segunda elección para Lib δ y Lib γ en la posición *n*-4 (Songyang *y col.*, 1996). Lo anterior, junto con el residuo Asp que Lib δ y Lib γ poseen en la posición *n*-3, daría origen a una secuencia similar al péptido "híbrido" el que se mostró como uno de los mejores péptidos sustratos probados. Es claro que la aproximación "clásica" y el uso de las "librerías" pueden complementarse y usarse en combinación, y con enzimas recombinantes, para definir las secuencias óptimas de fosforilación por diferentes proteínquinasas.

Como se desprende de los resultados presentados, además de la gran similitud existente entre *X*ICK1 y ratCK1 se observan algunas diferencias significativas en la especificidad de sitio fosforilable. En general, se observa que *X*ICK1 α es menos sensible a cambios en la estructura del sustrato que afectan profundamente a ratCK1. Por ejemplo, las sustituciones Asp \rightarrow Ala en el péptido sustrato son mejor toleradas por *X*ICK1 α que por ratCK1 y el grupo de residuos básicos aumenta los valores de K_m alrededor de 5 veces para ratCK1, mientras que el efecto sobre la fosforilación mediada por *X*ICK1 α es menos pronunciado. Por otro lado y como se mencionó anteriormente, la secuencia hidrofóbica C-terminal hace al péptido S86 un mejor sustrato para *X*ICK1 α y no tiene un efecto significativo sobre ratCK1.

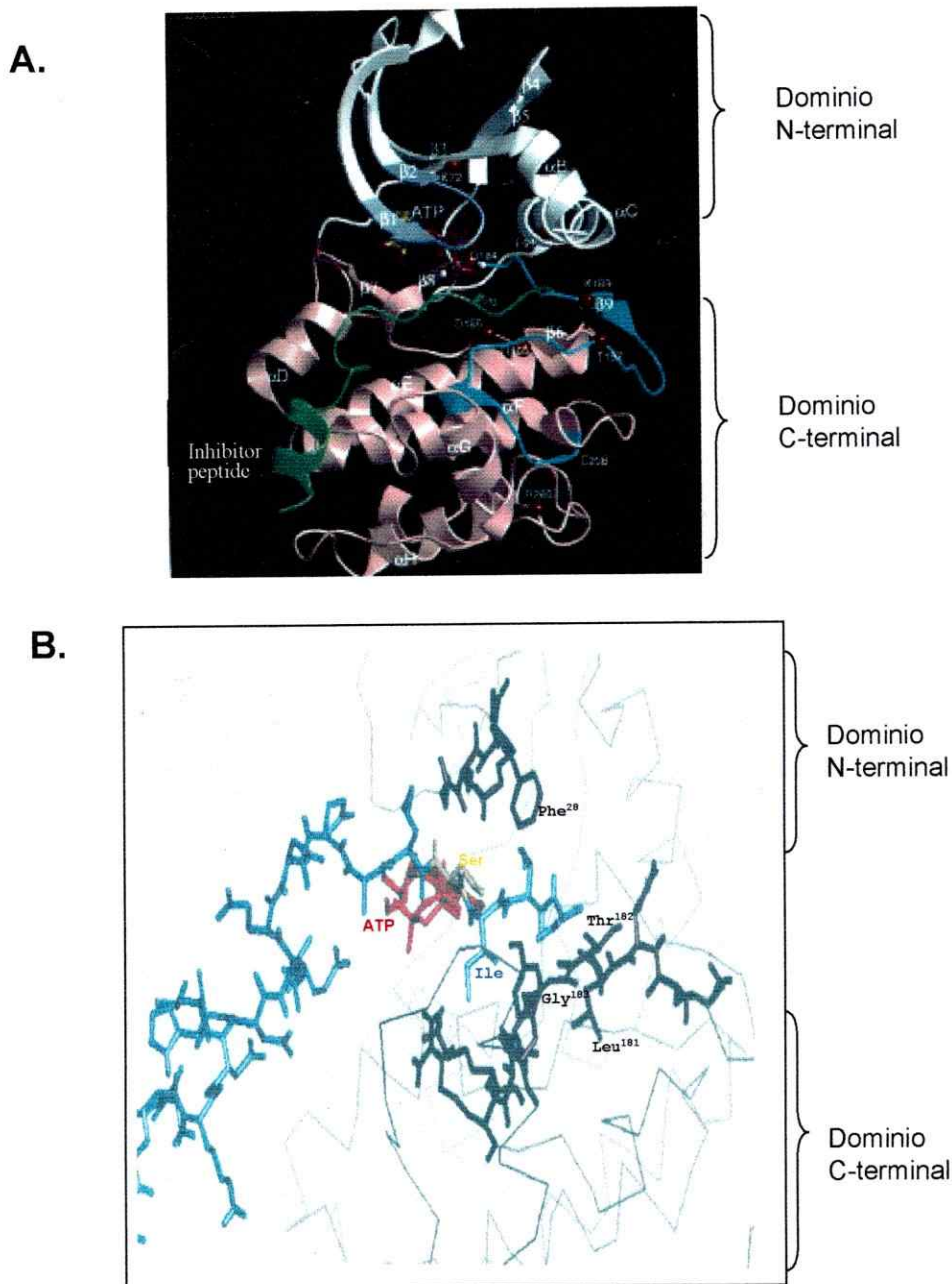
Con el uso de los anticuerpos antisoformas CK1 fue posible realizar un análisis de la especificidad de fosforilación, de fosfopéptidos y sustratos proteicos, de las isoformas CK1 α , CK1 δ y CK1 γ . Fue posible observar que las tres isoformas de CK1

analizadas poseen una clara preferencia del péptido **SpSpSpEESIT** sobre el péptido **EEEEESIT** indicando que la preferencia por sustratos previamente fosforilados es una característica común a toda la familia de proteínquinasas CK1. CK1 δ posee la mayor eficiencia de fosforilación para los péptidos **SpSpSpEESIT** y **EETpEESIT**. Se debe destacar que el péptido **SpEEEEESIT** es fosforilado en forma detectable por CK1 α y CK1 δ pero no es sustrato para CK1 γ . En relación al orden de preferencia por la posición que ocupan los residuos fosforilados en los péptidos sustratos analizados, tanto para CK1 α como para CK1 δ y CK1 γ la posición *n*-3 ocupada por un residuo Ser-*P* ó Thr-*P* representa un determinante positivo de fosforilación.

En el caso de la fosforilación de sustratos proteicos, fue posible observar una especificidad similar, siendo β -caseína preferida como sustrato por las tres isoformas CK1 analizadas.

El ejemplo mejor estudiado a nivel estructural de interacción entre una proteínquina y su sustrato es el caso de la proteínquina dependiente de cAMP (PKA). El Esquema 5A muestra la orientación del péptido inhibidor (PKI) cristalizado como un complejo con la quinasa (figura tomada de Johnson *y col.*, 1996). Con el objetivo de analizar la interacción con péptidos sustratos en el caso de la enzima *XICK1* α se realizó un modelaje de la estructura de esta isoforma de CK1 usando la secuencia primaria de *XICK1* α , las coordenadas cristalográficas de la isoforma CK1 δ (*pdb*: 1CSN) y el programa computacional *QUANTA*. Posteriormente se sobrepuso la estructura de PKA-PKI (*pdb*:1ATP) con la estructura determinada para *XICK1* α y se reemplazó la secuencia del péptido PKI por la secuencia del péptido sustrato para CK1

(**RRKDLHDDEE**DEAMSSITA). Al analizar la compatibilidad de la estructura por medio de sucesivos análisis de minimización de energía se obtuvo la estructura mostrada en el Esquema 5B. Se observa que la orientación que adopta el péptido sustrato al interactuar con la quinasa es similar a la que adopta el péptido inhibidor en el complejo PKA-PKI. Se destacan (en negro) los residuos en la proteína que se encuentran a una distancia que permitiría la interacción con algunos de los residuos del péptido sustrato (en azul). Este análisis resulta de gran utilidad al intentar dilucidar las características estructurales de la enzima que median la interacción con los residuos presentes en los péptidos sustrato analizados. Como se mencionó anteriormente el péptido "híbrido" **IGDDDDAY-SI-III**FFA se comporta como un muy buen sustrato para las enzimas analizadas, con valores de V_{max} similares a los péptidos originales derivados de inhibidor-2 y valores de K_m menores que éstos. Los bajos valores de K_m que posee este péptido indicarían que existen determinantes estructurales en la enzima que, al interactuar con los residuos hidrofóbicos **III**FFA, posibilitan una mejor interacción proteína-sustrato. En el modelo presentado en el Esquema 5B se destacan algunos aminoácidos que proveerían un ambiente hidrofóbico en la cercanía de los residuos **III**FFA del péptido sustrato "híbrido": Phe²⁸, Thr¹⁸², Gly¹⁸³, Leu¹⁸¹ entre otros. Si bien este modelo no sustenta la clara necesidad de un grupo de residuo ácidos N-terminales a la serina fosforilable, este ambiente hidrofóbico cercano a la porción C-terminal de los péptidos sustratos proveería las condiciones para una mejor interacción enzima-sustrato lo que explicaría el hecho que los péptidos que poseen este grupo de residuos hidrofóbicos sean fuertemente seleccionados por la "librería".



ESQUEMA 5. *Interacción de proteínquinasas con péptidos sustratos.*

A. Co-cristalización de la proteínquinaasa dependiente de cAMP (PKA) y un péptido que actúa como inhibidor. Se muestra la quinasa en colores blanco (dominio N-terminal) y rosado (dominio C-terminal). En azul se identifica la región responsable de la activación de la enzima y en magenta la región involucrada en la interacción con ATP. En verde se muestra la estructura que adopta el péptido sustrato al interactuar con la enzima. Figura tomada de Johnson *y col.*, (1996).

B. Modelo de la interacción entre el péptido sustrato **RRKDLHDDEEDEAMSITA** y la enzima *X7CK1α*. Se muestra la molécula de ATP en rojo, el péptido sustrato en azul con la serina fosforilable en amarillo. Los residuos de la enzima en negro se encuentran a una distancia que permite su interacción con residuos del péptido sustrato.

Los antecedentes reportados en esta tesis indican que, al menos para las isoformas CK1 analizadas, estas proteínas poseen un especificidad de sustrato *in vitro* similar. Esta sin embargo, no debiera ser una conclusión que se aplique necesariamente a toda la familia CK1. Algunos estudios sobre la fosforilación de diversos sustratos por las subisoformas α , CK1 α y CK1 α L de rata, recombinantes producidas en *E. coli*, demostraron diferencias en la afinidad por algunas proteínas sustrato. La proteína T grande del virus SV40 es 10 veces mejor sustrato para la isoforma CK1 α L que para CK1 α (Zhang y col., 1996).

3. *Estudios de la expresión in vivo de CK1.*

A la fecha existe muy pocos antecedentes sobre los factores que regulan la expresión de los 10 miembros descritos de la familia CK1 *in vivo*.

En el trabajo presentado en esta tesis hemos explorado algunos aspectos relacionados con la expresión de CK1 y sus isoformas en células en cultivo.

El análisis de la expresión de CK1 α en células en diversas condiciones de crecimiento indica que existe una relación entre el estado proliferativo celular y la actividad CK1. Al estimular con 10% de suero fetal la proliferación de fibroblastos de ratón mantenidos previamente en hambruna de suero, se observa un aumento consistente de la actividad total CK1. Lo anterior indicaría que estas proteínas participan en mecanismos celulares necesarios para la proliferación. Además el hecho de encontrar estas alteraciones en la actividad podría relacionarse con la observación que en *D. melanogaster* la isoforma CK1 α es inactiva en inmunoprecipitados de embriones

tempranos pero puede ser activada por desfosforilación (tratamiento con fosfatasas) (Santos *y col.*, 1996). Sería de gran interés examinar el estado de modificación por fosforilación de las isoformas CK1 durante los períodos de hambruna/estímulo con suero en células transfectadas, para determinar si existen modificaciones que afecten en forma diferencial a estas isoformas.

Al transfectar CK1 α y CK1 δ en células en cultivo se observa un incremento en la actividad total CK1 medida con un sustrato específico en los extractos celulares. Sin embargo al analizar el patrón de fosforilación *in vivo* de estas células transfectadas, no se observa la fosforilación de nuevas proteínas. Se debe tener en cuenta que las células efectivamente transfectadas sólo representan entre un 10 y un 30% de la población total del cultivo, de modo que existe un alto nivel de fosforilación basal que no es afectado por las proteínas expresadas. En forma alternativa se podría considerar el hecho que las proteínas expresadas ectópicamente se encuentren en un estado inactivo del cual son liberadas durante la preparación del extracto total. Este estado inactivo podría deberse a una compartimentalización diferente de las proteínas sobreexpresadas, aún cuando la localización subcelular observada de éstas es muy similar a la de las proteínas endógenas.

Con el uso de los anticuerpos antiCK1 α , antiCK1 δ y antiCK1 fue posible obtener una aproximación de la localización subcelular de las correspondientes isoformas CK1 en células *cos-7* en cultivo. Dado que el anticuerpo antiCK1 α reconoce dos bandas en el ensayo de Western Blot, se debe dar una cautelosa interpretación a los resultados de inmunofluorescencia obtenidos con este anticuerpo. Sin embargo, la

congruencia entre dichos resultados y los observados con las células transfectadas con CK1 α etiquetada con el epitopo HA, refuerzan su validez.

La principal conclusión de este análisis es que las isoformas probadas no poseen una distribución equivalente. CK1 α se presenta mayormente en el citoplasma, mientras que CK1 δ es una enzima principalmente nuclear. CK1 γ por otro lado, es un enzima exclusivamente citoplasmática con una localización vesicular. Se debe tener presente que este patrón de localización subcelular fue obtenido en células *cos-7*, una línea celular transformada. Dada la relación de CK1 con fenómenos de proliferación celular, este patrón de localización puede ser específico del fenotipo de células transformadas.

Los estudios de expresión *in vivo* de las isoformas X1CK1 α y CK1 δ humana, transfectadas con un epitopo de hemaglutinina (HA) en células *cos-7*, tuvieron como objetivo el poder relacionar específicamente una determinada isoforma CK1 con una determinada localización subcelular. Los experimentos con un anticuerpo fluorescente que reconoce específicamente el epitopo HA permitieron establecer la distribución citoplásmica de CK1 α con apariencia vesicular. Dado que no existen en la secuencia primaria de estas proteínas señales que indiquen una de posible destinación a organelos (péptido señal, retención en retículo endoplásmico y/o aparato de golgi, etc...) es muy probable que estas proteínas no se encuentren dentro de algún organlo sino más bien asociadas a la cara externa de las vesículas. Esta localización mayormente no nuclear para la isoforma CK1 α es consistente con los antecedentes reportados en la literatura para la localización de esta isoforma en otras células en cultivo (Brockman y col., 1992;

Zhu y col., 1998). En algunos casos fue posible encontrar CK1 α en localizaciones discretas dentro del núcleo.

La disponibilidad del gen para la isoforma CK1 δ permitió investigar la localización subcelular de esta isoforma en células *cos-7*. La localización nuclear de esta isoforma es consistente con una función nuclear para esta quinasa. Los estudios de complementación de mutantes de *S cerevisiae* hrr25⁻ con defectos en segregación cromosómica, entre otros, indican que CK1 δ y CK1 ϵ pero no CK1 α , son capaces de complementar estos defectos (Fish y col., 1995).

Tanto CK1 α como CK1 δ poseen una posible secuencia de localización nuclear, K²²⁹KQK para CK1 α y K²²¹RQK para CK1 δ , ubicadas en posiciones equivalentes. Si estas secuencias son las que determinan la localización nuclear sería de mucho interés examinar qué otros factores determinan el destino final de estas proteínas.

Los experimentos de estimulación con suero fueron realizados para establecer si existe una relación entre la localización subcelular de isoformas CK1 y el estado proliferativo celular. Se utilizaron fibroblastos de ratón (cepa Balb-c 3T3) ya que estas células al no estar transformadas responden a la regulación por suero, no así las células *cos-7* transformadas. Las isoformas CK1 transfectadas en fibroblastos muestran una localización similar a lo detectado en células *cos-7*. CK1 α presente en citoplasma y CK1 δ en citoplasma y núcleo. En este caso la localización citoplásmica de la isoforma CK1 δ es mucho mayor que la localización nuclear.

En células sometidas a privación de suero durante 48 horas, la fracción de la enzima CK1 δ presente en el núcleo que se observa en células crecidas en 10% suero, es

excluída de este organelo. Al reestimar la proliferación celular, creciendo las células nuevamente en 10% suero, una pequeña fracción de esta isoforma de CK1 es detectada nuevamente en núcleo. Esta observación de una proteína que sale del núcleo como respuesta a un estímulo es un fenómeno de gran interés que necesita mayor estudio.

En el caso de CK1 α la distribución no cambia significativamente por los cambios efectuados en el estado de crecimiento celular, se observa una distribución más vesiculada en células privadas de suero.

En general estos resultados apoyan la idea que la localización subcelular es un importante determinante de la función de la familia de proteínquinasas CK1. La localización nuclear de CK1 δ permite relacionarla en forma más directa con fenómenos de regulación de la proliferación celular. Por otro lado, puede existir sobreposición de localizaciones entre isoformas CK1 y por consiguiente algunas funciones sobrepuestas aunque no idénticas. Con la disponibilidad de los genes clonados de las distintas isoformas CK1 será posible por medio de estudios de expresión *in vivo* establecer las funciones de estas quinasas en el contexto celular y las posibles relaciones entre ellas.

CONCLUSIONES

El trabajo de esta tesis utilizó técnicas de biología molecular, bioquímica y biología celular para profundizar nuestro conocimiento sobre las propiedades de la isoforma CK1 α y tratar de diferenciarla de otras isoformas de esta enzima que están presentes en eucariontes superiores.

Como conclusiones principales de este trabajo podríamos señalar:

1. La definición de propiedades bioquímicas de la isoforma CK1 α recombinante y su comparación con las propiedades de la mezcla de isoformas purificadas a partir de tejidos animales. La capacidad de CK1 α de fosforilar residuos de tirosina en péptidos ácidos y de autofosforilarse en tirosina además de serina y treonina.
2. Una definición fina de la especificidad de la CK1 α y de otras isoformas en cuanto a la secuencia aminoacídica que rodea a las serinas o treoninas que son blanco de fosforilación de esta enzima. Se pudo aclarar una controversia existente sobre este punto en la literatura científica que surgió debido al uso de "bibliotecas" de mezclas de péptidos.
3. Estudios de inmunocitoquímica y de transfección de proteínas etiquetadas con epitopos, han permitido establecer que las isoformas α , δ y γ estarían ocupando diferentes *loci* en la célula lo que señalaría una función diferencial para dichas proteínas.

A la fecha los trabajos realizados como parte de esta tesis han dado origen a las siguientes publicaciones (ver Apéndice):

- Pulgar, V., Tapia, C., Vignolo, P., Santos, J., Sunkel, C., Allende, C.C. y Allende, J.E. (1996) The recombinant α isoform of protein kinase CK1 from *Xenopus laevis* can phosphorylate tyrosine in synthetic peptides. *Eur. J. Biochem.* **242**:519-28.

- Pulgar, V., Marin, O., Meggio, F., Allende, C.C., Allende, J.E. y Pinna, L.A. (1999) Optimal sequences for non-phosphate directed phosphorylation by protein kinase CK1 (casein kinase-1): A re-evaluation. *Eur. J. Biochem.* **260**(3):520-6.

PROYECCIONES DEL TRABAJO REALIZADO EN ESTA TESIS

La familia de las proteínquinasas CK1 ha resultado ser un tema de creciente complejidad debido al gran número de isoformas que la componen. Es un área de estudio que se encuentra en una fase de expansión en la que, una vez caracterizados varios genes, se aprecia la determinación de propiedades específicas de algunas isoformas y su relación con importantes procesos celulares.

En este trabajo se caracterizó, bajo aspectos bioquímicos y celulares, la proteínquina $CK1\alpha$ para entender el comportamiento de la familia de las proteínquinasas CK1. De los resultados y las conclusiones obtenidas cabe preguntarse:

1. En relación al análisis de la fosforilación de residuos de tirosina por CK1: ¿existen proteínas fosforiladas en tirosina al sobreexpresar alguna de estas quinasas en células en cultivo?, ¿cuál es el significado fisiológico de esta modificación?
2. En relación al estudio de la especificidad de el(los) sitio(s) fosforilable(s) del sustrato peptídico ácido o previamente fosforilado (en forma química o enzimática) por CK1 ¿cuál es la real contribución de otros residuos de estos sustratos, tanto en las posiciones $n-1$ y $n-2$ como de la región C-terminal, a la especificidad de fosforilación por CK1?

Por otro lado para continuar estos estudios se deja abierto el camino a:

1. El análisis de secuencias proteicas que posean grupos de aminoácidos fosforilables rodeados de residuos ácidos permitirá analizar el posible papel fisiológico del fenómeno de fosforilación jerárquica, como una forma de ligar la actividad de estas

quinasas (tradicionalmente reconocidas como no dependientes de segundos mensajeros) a la de otras quinasas que podrían ser dependientes de estímulos.

2. El análisis de la localización subcelular de las isoformas CK1, abre interesantes interrogantes sobre la función de estas quinasas. Dado que la isoforma CK1 α parece estar asociada a una estructura subcelular de tipo vesicular, la colocalización con marcadores de organelos celulares (aparato de Golgi, retículo endoplásmico, etc.) permitiría precisar la ubicación de esta isoforma en la célula. La aparente relación existente entre la localización nuclear de la isoforma CK1 δ y el estado proliferativo celular es un aspecto que debería ser analizado en profundidad, dado que ambas isoformas CK1 estudiadas poseen posibles secuencias de localización nuclear similares, deben existir otros factores que regulan la localización diferencial de estas proteínas.

3. En relación a los estudios bioquímicos (determinación de actividad enzimática, etc.) realizados con los extractos celulares que expresan isoformas CK1, es de gran importancia mejorar la eficiencia de la transfección transitoria para obtener una mayor proporción de células que sobreexpresen las proteínas y, consecuentemente, un mayor nivel de actividad quinasa. La generación de transfectantes estables que sobreexpresen isoformas CK1 sería de gran utilidad. Entre los aspectos novedosos que pueden ser enfrentados se encuentra la interacción de diversas isoformas CK1 con otras proteínas, como una forma de regulación de la localización y/o la accesibilidad de estas quinasas a los diversos sustratos intracelulares y el análisis del efecto que podría tener la sobreexpresión de isoformas CK1 sobre parámetros de proliferación celular y sobre la actividad de diversas vías de transducción de señales.

BIBLIOGRAFIA

- Agostinis, P., Marin, O., James, P., Hendrix, P., Merlevede, W., Vandenneede, J.R. y Pinna, L.A. (1992) Phosphorylation of the phosphatase modulator subunit (inhibitor-2) by casein kinase-1. *FEBS Lett.* **305**(2):121-4.
- Ali, N., Hafker, U. y Chua, N-H. (1994) Cloning and biochemical characterization of a plant protein kinase that phosphorylate serine, threonine and tyrosine. *J. Biol. Chem.* **269**:31626-9.
- Barik, S., Taylor, R.E. y Chakrabarti, D. (1997) Identification, cloning, y mutational analysis of the casein kinase 1 cDNA of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* **272**(42):26132-8.
- Beyaert, R., Vanhaesebroeck, B., Declercq, W., Van Lint, J., Vandenneede, P., Agostinis, P., Vandenneede, J.R., y Fiers, W. (1995) Casein kinase-1 phosphorylates the p75 tumor necrosis factor receptor and negatively regulates tumor necrosis factor signaling for apoptosis. *J. Biol. Chem.* **270**:23293-23299.
- Braun S., Raymond, W.E. y Racker, E. (1984) Synthetic tyrosine polymers as substrates and inhibitors of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem.* **259**:2051-4
- Bradford, M.M. (1976) A rapid y sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-54.
- Brockman, J.L., Gross, S.D., Sussman, M.R., y Anderson, R.A. (1992) Cell cycle-dependent localization of casein kinase I to mitotic spindles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:9454-9458.
- Cegielska, A., y Virshup, D.M. (1993) Control of simian virus 40 DNA replication by the HeLa cell nuclear kinase casein kinase I. *Mol. Cell. Biol.* **13**:1202.1211.
- Cegielska, A., Fish, K., Rivers, A. y Virshup, D.M. (1998) Autoinhibition of casein kinase I ϵ (CKI ϵ) is relieved by protein phosphatases and limited proteolysis. *J. Biol. Chem.* **273**(3):1357-64.
- Chauchereau, A., Savouret, J.F. y Milgrom, E. (1992) Control of biosynthesis y post-transcriptional modification of the progesterone receptor. *Biol. Reprod.* **46**(2):174-7
- Chijiwa, T., Hagiwara, M. y Hidaka, H. (1989) A newly synthesized selective casein kinase I inhibitor, N-(2-aminoethyl)-5-chloroisoquinoline-8-sulfonamide and affinity purification of casein kinase I from bovine testis. *J. Biol. Chem.* **264**:4924-7.

- Clari, G., Toninello, A., Bordin, L., Cattapan, F., Piccinelli-Siliprandi, D. y Moret, V. (1994) Spermine effect on the binding of casein kinase I to the rat liver mitochondrial structures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**(1):389-95.
- De Bondt, H.L., Rosenblatt, J., Jancarik, J., Jones, H.D., Morgan, D.O. y Kim, S. (1993) Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature* **363**:595-602.
- de Groot, R.P., den Hertog, J., Vandenheede, J.R., Goris, J., y Sassone-Corsi, P. (1993) Multiple and cooperative phosphorylation events regulate the CREM activator function. *EMBO J.* **12**:3903-3911.
- Desdouits, F., Cohen, D., Nairn, A., Greengard, P. y Girault, J-A. (1995) Phosphorylation of DARP-32, a dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, by casein kinase *in vitro* y *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **270**(15):8772-8.
- Dhillon, N. y Hoekstra, M.F. (1994) Characterization of two protein kinases from *Schizosacharomyces pombe* involved in the regulation of DNA repair. *EMBO J.* **13**(12):2777-88.
- Dubois, T., Rommel C., Howell, S., Steinhussen, U., Soneji, Y., Morrice, N., Moelling, K. y Aitken, A. (1997) 14-3-3 is phosphorylated by casein kinase I on residue 233. Phosphorylation at this site *in vivo* regulates Raf/14-3-3 interaction. *J. Biol. Chem.* **272** (46):28882-8.
- Donella Deana, A., Grakowski, N., Kudlicki, W., Szyska, R., Gasior, E. y Pinna, L.A. (1985) A type-I casein kinase from yeast phosphorylates both serine and threonine residues of casein. Identification of the phosphorylation sites. *Biochim. Biophys. Acta* **829**:180-187.
- Estrada, E., Agostinis, P., Vandenheede, J.R., Goris, J., Merlevede, W., Francois, J., Goffeau, A. y Ghislain, M. (1996) Phosphorylation of yeast plasma membrane H⁺-ATPase by casein kinase I. *J. Biol. Chem.* **271**(50):32064-72.
- Flotow, H., Graves, P.R., Wang, A., Fiol, C.J., Roeske, R.W. y Roach, P.J. (1990) Phosphate groups as substrate determinants for casein kinase I action. *J. Biol. Chem.* **265**:14264-14269.
- Flotow, H. y Roach, P.J. (1991) Role of acidic residues as substrate determinants for casein kinase I. *J. Biol. Chem.* **266**:3724-3727.
- Fish, K.J., Cegielska, A., Getman, M.E., Landes, G.M. y Virshup, D.M. (1995) Isolation and characterization of a human casein kinase I ϵ (CKI), a novel member of the CKI gene family. *J. Biol. Chem.* **270**(5): 14875-83.

Gluzman, Y. (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23(1):175-82

Graves, P.R., Haas, D.W., Hagedorn, C.H., DePaoli-Roach, A.A. y Roach, P.J. (1993) Molecular cloning, expression, and characterization of a 49-kilodalton casein kinase I isoform from rat testis. *J. Biol. Chem.* 268(9):6394-401.

Graves, P.R. y Roach, P.J. (1995) Role of COOH-terminal phosphorylation in the regulation of casein kinase I δ . *J. Biol. Chem.* 270(37):21689-94.

Grankowski, N. y Issinger, O.G. (1990) Subcellular localization of casein kinase I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 167(2):471-6.

Green, C.L. y Bennett, G.S (1998) Identification of four alternatively spliced isoforms of chicken casein kinase I alpha that are all expressed in diverse cell types. *Gene* 216:189-195.

Gross, S.D. y Anderson, R.A. (1998) Casein kinase I: spatial organization y positioning of a multifunctional protein kinase family. *Cell Signal.* 10(10):699-711.

Gross, S.D., Hoffman, D.P., Fisette, Ph.L., Baas, P. y Anderson, R. (1995) A phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-sensitive casein kinase I α associates with synaptic vesicles and phosphorylates a subset of vesicle proteins. *J. Cell Biol.* 130(3):711-24

Gross, S.D., Simerly, C., Schatten, G. y Anderson, R.A. (1997) A casein kinase I isoform is required for proper cell cycle progression in the fertilized mouse oocyte. *J. Cell Sci.* 110(Pt 24):3083-90.

Hanks, S.K. y Quinn, A.M. (1991) Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods Enzymol.* 200:38-62.

Hanks, S.K. y Hunter, T. (1995) The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure y classification. *FASEB J.* 9:576-96.

Hathaway, G.M. y Traugh, J.A. (1982) Casein kinases - multipotential protein kinases. In *Current Topics in Cellular Regulation* (Stadman, E. & Horecker, B., eds.)vol. 21, pp101-127. Academic Press, New York.

Hicke, L., Zanolari, B. y Riezman, H. (1998) Cytoplasmic tail phosphorylation of the alpha-factor receptor is required for its ubiquitination and internalization. *J. Cell Biol.* 141(2):349-58.

- Hinrichs, M.V., Jedlicki, A., Tellez, R., Pongor, S., Gatica, M., Allende, C.C. y Allende, J.E. (1993) Activity of recombinant of α subunits and β subunits of casein kinase II from *Xenopus laevis*. *Biochemistry* 32:7310-6.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K y Pease, L.R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using polymerase chain reaction. *Gene* 77:51-9.
- Ho, U., Mason, S., Kobayashi, R., Hoekstra, M. y Andrews, B. (1997) Role of the casein kinase I isoform, Hrr25, and the cell cycle regulatory transcription factor, SBF, in the transcriptional response to DNA damage in *Sacharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94(2):581-6.
- Hoekstra, M.F., Liskay, M.R., Ou, A.C., DeMaggio, A.J., Burbee, D.G. y Heffron, F. (1991) HRR25, a putative protein kinase from budding yeast: association with repair of damaged DNA. *Science* 253:1031-4.
- Hoekstra, M.F., Dhillon, N., Carmel, G., DeMaggio, A.J., Lindberg, R.A., Hunter, T. y Kuret, J. (1994) Budding y fission yeast casein kinase I isoforms have dual-specificity protein kinase activity. *Mol. Biol. Cell* 5:877-86.
- Huflejt, M.E., Turck, C.W., Lindstedt, R., Barondes, S.H. y Leffler, H. (1990) L-29, a soluble lactose-binding lectin, is phosphorylated on serine 6 and serine 12 *in vivo* and *in vitro* by casein kinase I. *J. Biol. Chem.* 268(35):26712-8.
- Issinger, O.-G. (1993) Casein kinases; pleiotropic mediators of cellular regulation. *Pharmacol. Ther.* 591:1-30.
- Jedlicki, A., Hinrichs, M.V., Allende, C.C. y Allende, J.E. (1992) The cDNAs coding for the α and β subunits of *Xenopus laevis* casein kinase II. *FEBS Lett.* 297:280-4
- Johnson, L., Noble, M.E.M. y Owen, D. (1996) Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* 85:149-58.
- Kearney, P.H., Ebert, M. y Kuret, J. (1994) Molecular cloning and sequence analysis of two novel fission yeast casein kinase-1 isoforms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203(1):231-6.
- Kennelly, P.J. y Krebs E.G. (1991) Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* 266(24):15555-8
- Kitabayashi, A.N., Kusuda, J., Hirai, M. y Hashimoto, K. (1997) Cloning and chromosomal mapping of human casein kinase I gamma 2 (CSNK1G2) *Genomics* 46(1):133-7.

Klimczak, L.J., Farini, D., Lin, C., Ponti, D., Cashmore, A.R. y Giuliano, G. (1995) Multiple isoforms of Arabidopsis casein kinase I combine conserved catalytic domains with variable carboxyl-terminal extensions. *Plant Physiol.* 109(2):687-96.

Kloss, B., Price, J.L., Saez, L., Blau, J., Rothenfluh, A., Wesley, C.S. y Young, M.W. (1998) The Drosophila clock gene double-time encodes a protein closely related to human casein kinase I epsilon. *Cell* 94(1):87-107.

Klussmann, E., Maric, K., Wiesner, B., Beyermann, M. y Rosenthal, W. (1999) Protein kinase A anchoring proteins are required for vasopressin-mediated translocation of aquaporin-2 into cell membranes of renal principal cells. *J Biol Chem* 274(8):4934-8

Kosmopoulou, I., Koliakos, G., Haitoglou, C., Christodoulou, D., Dimitriadou, A. y Trakatellis, A. (1994) Rat liver endoplasmic reticulum protein kinases. *Int. J. Biochem.* 26(3):403-14.

Knighton, D.R., Zheng, J., Ten Euck, L.F., Ashford, V.A., Xuong, N., Taylor, S.S. and Sowadski, J.M. (1991) Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* 253:414-20.

Kusuda, J., Hidari, N., Hirai, M. y Hashimoto, K. (1996) Sequence analysis of the cDNA for the human casein kinase I δ (CSNK1D) gene and its chromosomal localization. *Genomics* 32:140-3.

Kusuda, J., Hirai, M., Toyoda, A., Tanuma, R. y Hashimoto, K. (1998) Cloning and chromosomal mapping of the human casein kinase I gamma3 (CSNK1G3) *Cytogenet. Cell Genet.* 83(1-2):101-3.

Laemmli, U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.

Leiva, L., Carrasco, D., Taylor, A., González, C., Allende, C.C. y Allende, J.E. (1987) Casein kinase II is a major protein phosphorylating activity in the nuclei of *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem. Int.* 14(4):707-17.

Longenecker, K.L., Roach, P.J. y Hurley, T.D. (1996) Three-dimensional structure of mammalian casein kinase I: molecular basis for substrate recognition. *J. Mol. Biol.* 257:618-31.

Longenecker, K.L., Roach, P.J. y Hurley, T.D. (1998) Crystallographic studies of casein kinase I delta toward a structural understanding of auto-inhibition. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 54(Pt 3):473-5.

Lussier, G. y Larose, L. (1997) A casein kinase I activity is constitutively associated with Nck. *J. Biol. Chem.* 272(5):2688-94.

- Marin, O., Meggio, F., Sarno, S., Andretta, M. y Pinna, L.A. (1994) Phosphorylation of synthetic fragments of inhibitor-2 of protein phosphatase-1 by casein kinase-1 and -2. *Eur. J. Biochem.* **223**:647-653.
- McInnes, C. y Leader, D.P. (1997) Tissue-specific distribution of mouse casein kinase I alpha mRNA. *DNA Seq.* **8**(1-2):55-7.
- Meggio, F., Donella Deana, A. y Pinna, L.A. (1979) Studies on the structural requirements of a microsomal cAMP-independent protein kinase. *FEBS Lett.* **106**:76-80.
- Meggio, F., Perich, J.W., Marin, O. y Pinna, L.A. (1992) The comparative efficiencies of the Ser(P)- and Tyr(P)-residues as specificity determinants for casein kinase-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **182**(3):1460-1465.
- Meggio, F., Perich, J.W., Reynolds, E.C. y Pinna, L.A. (1991) A synthetic β -casein phosphopeptide and analogues as model substrates for casein kinase-1, a ubiquitous, phosphate directed protein kinase. *FEBS Lett.* **283**:303-306.
- Milne, D.M., Palmer, R.H., Campbell, D.G. y Meek, D.W. (1992) Phosphorylation of the p53 tumor suppressor protein at three N-terminal sites by novel casein kinase-I like enzyme. *Oncogene* **7**:1361-1369.
- Muñoz, G. y Marshall, S.H. (1990) An alternative method for a fast separation of phosphotyrosine. *Anal. Biochem.* **190**:233-7.
- Murakami, A., Kimura, K. y Nakano, A. (1999) The inactive form of a yeast casein kinase I suppresses the secretory defect of the *sec12* mutant. *J. Biol. Chem.* **274**(6):3804-10.
- Panek, H.R., Stepp, J.D., Engle, H.M., Marks, K.M., Tan, P.K., Lemmon, S.K. y Robinson, L.C. (1997) Suppressors of YCK-encoded yeast casein kinase 1 deficiency define the four subunits of a novel clathrin AP-like complex. *EMBO J.* **16**(14):4194-204.
- Pawson, T. y Schlessinger, J. (1995) Protein modules and signalling networks. *Nature* **373**:573-580.
- Pinna, L.A. y Ruzzene, M. (1996) How do protein kinases recognize their substrates? *Biochim. Biophys. Acta* **1314**:191-225.
- Pulgar, V., Marin, O., Meggio, F., Allende, C.C., Allende, J.E. y Pinna, L.A. (1999) Optimal sequences for non-phosphate directed phosphorylation by protein kinase CK1 (casein kinase-1): a re-evaluation. *Eur. J. Biochem.* **260**(3):520-6.

- Pulgar, V., Tapia, C., Vignolo, P., Santos, J., Sunkel, C., Allende, C.C. y Allende, J.E. (1996) The recombinant α isoform of protein kinase CK1 from *Xenopus laevis* can phosphorylate tyrosine in synthetic peptides. *Eur. J. Biochem.* **242**:519-28.
- Rapuano, M. y Rosen, O.M. (1991) Phosphorylation of the insulin receptor by a casein kinase I-like enzyme. *J. Biol. Chem.* **266**(20):12902-7.
- Rivers, A., Gietzen, K.F., Vielhaber, E. y Virshup, D.M. (1998) Regulation of casein kinase delta by an *in vivo* futile phosphorylation cycle. *J. Biol. Chem.* **273**(26):15980-4.
- Roach, P.J. (1990) Control of glycogen synthase by hierarchal protein phosphorylation. *FASEB J.* **4**:2961-8.
- Robinson, L.C., Hubbard, E.J., Graves, P.R., DePaoli-Roach, A.A., Roach, P.J., Kung, C., Haas, D.W., Hagedorn, C.H., Goebel, M., Culbertson, M.R (1992) Yeast casein kinase I homologues: an essential gene pair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:28-32.
- Robinson, L.C., Menold, M.M., Garret, S. y Culbertson, M.R. (1993) Casein kinase I-like protein kinases encoded by YCK1 and YCK2 are required for yeast morphogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **13**(5):2870-81.
- Rowles, J., Slaughter, C., Moomaw, C., Hsu, J. y Cobb, M.H. (1991) Purification of casein kinase I and isolation of cDNAs encoding multiple casein kinase I-like enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:9548-52.
- Sambrook, J., Frisch, E., y Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2^a Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463-7.
- Santos, J.A., Logarinho, E., Tapia, C., Allende, C., Allende, J.E. y Sunkel, C. (1996) The casein kinase 1 α gene of *Drosophila melanogaster* is developmentally regulated and the kinase activity of the protein induced by DNA damage. *J. Cell Sci.* **109**:1847-56.
- Siegel, I.H. (1975) *Enzyme Kinetics*. Wiley Interscience Publications, John Wiley & Sons Inc. USA. p 113.
- Singh, T.J. y Huang, K.P. (1985) Glycogen synthase (casein) kinase-1: tissue distribution and subcellular localization. *FEBS Lett.* **190**(1):84-8.
- Schieven, G., Thorner, J. Y Martin, G.S. (1986) Protein tyrosine kinase activity in *Sacharomyces cerevisiae*. *Science* **231**:390-3.

Smith, D.B. y Johnson, K.S. (1988) Single step purification protocol of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutation s-transferase. *Gene (Amst.)* 67:31-8.

Sokal, R.R. y Rohlf, F.J. (1995) *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research*. Third Edition, W.H. Freeman & Co., New York.

Songyang, Z., Blechner, S., Hoagland, N., Hoekstra, M.F., Piwnica, W.H. y Cantley, L.C. (1994) Use of an oriented peptide library to determine the optimal substrates of protein kinases. *Curr. Biol.* 4:973-82.

Songyang, Z., Carraway, K.L., Eck, M.J., Harrison, S.C., Feldman, R.A., Mohammadi, M., Sclessinger, J., Hubbard, S.R., Smith, D.P., Eng, Ch., Lorenzo, M.J., Ponder, B.A.J., Mayer, B.J. y Cantley, L.C. (1995) Catalytic site specificity of protein-tyrosine kinases are critical for selective signalling. *Nature* 373:536-9.

Songyang, Z., Lu, K.P., Kwon, Y.T., Tsai, L-H., Filhol, O., Cochet, C., Brickey, D.A., Soderling, Th.R., Bartleson, Ch., Graves, D., DeMaggio, A.J., Hoekstra, M.F., Blenis, J., Hunter, T. y Cantley, L. (1996) A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: primary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, cdk5, and Erk1. *Mol. Cell. Biol.* 16(11):6486-93.

Tapia, C., Featherstone, T., Gomez, C., Taillon-Miller, P., Allende, C.C. y Allende, J.E. (1994) Cloning and chromosomal localization of the gene coding for human protein kinase CK1. *FEBS Lett.* 349:307-12.

Tobin, A.B., Totty, N.F., Sterlin, A.E. y Nahorski, S.R. (1997) Stimulus-dependent phosphorylation of G-protein-coupled receptors by casein kinase 1 α . *J. Biol. Chem.* 272(33):20844-9.

Tuazon, P.T y Traugh, J.A. (1991) Casein kinase I and II - multipotential serine protein kinases: structure, function and regulation. *Adv. Second Messenger Phosphoprot. Res* 23:123-164.

Vancura, A., Sessler, A., Leichus, B. y Kuret, J. (1994) A prenylation motif is required for plasma membrane localization and biochemical function of casein kinase I in budding yeast. *J. Biol. Chem.* 269(30):19271-8.

Vila, J., Walker, J.M., Itarte, E., Weber, M.J. y Sando, J.J. (1989) Phosphorylation of protein kinase C by casein kinase-1. *FEBS Lett.* 255(1):205-8.

Walczak, C.E., Anderson, R.A. y Nelson, D.L. (1993) Identification of a family of casein kinases in Paramecium: biochemical characterization and cellular localization. *Biochem. J.* 296(Pt 3):729-35.

Wang, X., Hoekstra, M.F., DeMaggio, A.J., Dhillon, N., Vancura, A., Kuret, J., Johnston, G.C. y Singer, R.A. (1996) Prenylated isoforms of yeast casein kinase I, including the novel Yck3p, suppress the *gcs1* blockage of cell proliferation from stationary phase. *Mol. Cell. Biol.* 16(10):5375-85.

Wang, P-Ch., Vancura, A., Desai, A., Carmel, G. y Kuret, J. (1994) Cytoplasmic forms of fission yeast casein kinase-1 associate primarily with the particulate fraction of the cell. *J. Biol. Chem.* 269(16):12014-23.

Wang, P-Ch., Vancura, A., Mitcheson, Th.G.M. y Kuret, J. (1992) Two genes in *Sacharomyces cerevisiae* encode a membrane-bound form of casein kinase-1. *Mol. Biol. Cell* 3:275-86.

Xu, R-M., Carmel, G., Sweet, R.M., Kuret, J. y Cheng, X. (1995) Crystal structure of casein kinase-1, a phosphate-directed protein kinase. *EMBO J.* 14(5):1015-23.

Zhai, L., Graves, P. R., Robinson, L.C., Italiano, M., Culbertson, M.R., Rowles, J., Cobb, M.H., DePaoli-Roach, A.A. y Roach, P.J. (1995) Casein kinase I γ subfamily. *J. Biol. Chem.* 270(21):12717-24.

Zhang, J., Gross, S.D., Schroeder, M.D. y Anderson, R.A. (1996) Casein kinase I α and α L: alternative splicing-generated kinases exhibit different catalytic properties. *Biochemistry* 35(50):16319-27.

Zhu, J., Shibasaki, F., Price, R., Guillemot, J.C., Yano, T., Dotsch, V., Wagner, G., Ferrara, P. y McKeon, F. (1998) Intramolecular masking of nuclear import signal on NF-AT4 by casein kinase I and MEKK1. *Cell* 93(5):851-61.

APENDICE

The recombinant α isoform of protein kinase CK1 from *Xenopus laevis* can phosphorylate tyrosine in synthetic substrates

Victor PULGAR¹, Claudio TAPIA¹, Pamela VIGNOLO¹, João SANTOS³, Claudio E. SUNKEL¹, Catherine C. ALLENDE² and Jorge E. ALLENDE¹

¹ Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Chile

² Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Chile

³ Centro de Citología Experimental, Laboratório de Genética Molecular, Universidade do Porto, Portugal

(Received 4 September 1996) – EJB 96 1313/4

The cDNA coding for protein kinase CK1 α has been cloned from a *Xenopus laevis* cDNA library. The derived amino acid sequence of the protein contains 337 amino acids and has a calculated molecular mass of 38 874 Da. The sequence is identical to that of the human CK1 α and to the bovine CK1 α , except that it is 12 amino acids longer than the latter protein. Southern blotting with a 264-bp probe demonstrates that four or more fragments are obtained upon digestion of genomic DNA with *Eco*R1 and *Hind*3, suggesting that *X. laevis* possesses a family of related CK1 genes. CK1 α was expressed in *Escherichia coli* as a glutathione transferase fusion protein (GT-CK1 α) and certain of its characteristics were determined. The recombinant GT-CK1 α fusion protein was found to have apparent K_m values for ATP (12 μ M), casein (1.5 mg/ml) and the specific peptide substrate RRRKDLIHDEEEDLEAMSITA (180 μ M) which are similar to those of the rat liver CK1 enzyme. The recombinant CK1 α activity is weakly inhibited by heparin, but strongly inhibited by poly(Glu³⁰⁰:Tyr³⁰⁰). This inhibition is competitive and shows an approximate K_i of 5 μ M. CK1 α can phosphorylate the tyrosine residues of poly(Glu³⁰⁰:Tyr³⁰⁰) and the tyrosine residue in the synthetic peptide RRREEEYEEEE. This kinase preparation also autophosphorylates in serine, threonine and weakly in tyrosine.

Keywords: casein kinase I; tyrosine phosphorylation; poly(glutamic acid, tyrosine).

Protein kinase CK1, also known as casein kinase I (CK1), is ubiquitous in eukaryotes and is known to be present in the nucleus, cytoplasm and membrane fractions of cells (for reviews, see Tuazon and Traugh, 1991; Issinger, 1993).

CK1 has been shown to phosphorylate important proteins such as p53 (Milne et al., 1992), aminoacyl-tRNA synthetases (Traugh and Pendergast, 1986), the large-T antigen of simian virus 40 (Grässer et al., 1988), the insulin receptor (Rapuano and Rosen, 1991) and glycogen synthase (De Paoli-Roach et al., 1981). In some cases, CK1 phosphorylation changes the biological properties of the protein substrates (Grässer et al., 1988; Bayaert et al., 1995).

An important contribution to the understanding of the structure of CK1 has been attained with the report on the crystal structure of a truncated form of the fission yeast CK1 (Xu et al., 1995) and of the mammalian enzyme (Longenecker et al., 1996).

CK1 has been generally isolated as a monomer, but wide variations in molecular mass have been reported (26–60 kDa; Tuazon and Traugh, 1991; Issinger, 1993). The reason for this variability may be explained by the finding that there are many isoforms of the CK1 family coded by different genes of a related

family, and that these isoforms differ in size. A bovine brain cDNA library yielded four CK1 isoforms named α , β , γ and δ (Rowles et al., 1991). The α and β genes code for 35–37-kDa proteins, while the γ and δ genes are considerably larger. The human CK1 α (Tapia et al., 1994), CK1 δ and CK1 ϵ (Fish et al., 1995) have also been cloned, as have the rat γ (three different genes) and δ isoforms (Graves et al., 1993; Zhai et al., 1995). In *Saccharomyces cerevisiae*, and in *S. pombe*, four different genes have been described and studied (Hockstra et al., 1994).

CK1 preparations purified from animal tissues, which possibly contain a mixture of isoforms of the enzyme, have been used to determine the specificity of CK1 toward proteins and model peptides. These studies demonstrated that CK1 preferentially phosphorylates serine or threonine residues that are preceded by acidic residues. Of particular importance is the residue three positions removed towards the amino end from the target hydroxyl amino acid (position –3). In some substrate sequences, this position is preferentially occupied by phosphoserine or phosphothreonine [sequences S(P)XX S* where X is any amino acid and * denotes the amino acid that is phosphorylated by CK1]. In this case, CK1 is involved in a hierarchical phosphorylation, in which the action of the first kinase would indirectly determine the capacity of CK1 to phosphorylate a second site of the same substrate (Flotow and Roach, 1991). However, the presence of a phosphoamino acid is not always required and proteins and peptides that have aspartic acid or glutamic acid residues in the –3 position (D/E XX S*) can be readily phosphorylated by CK1 (Meggio et al., 1991).

More recently, a surprising finding has been reported (Hockstra et al., 1994), indicating that some, but not all, yeast CK1 isoforms can phosphorylate tyrosine residues in poly (Glu³⁰⁰:

Correspondence to J. E. Allende, Casilla 70086, Santiago 7, Chile.
Fax: +56 2 737 6320.

Abbreviations. IPTG, isopropyl-thio- β -D-galactoside; CK1 α , protein kinase CK1, α isoform; GT-CK1 α , fusion protein glutathione-transferase–protein-kinase-CK1, α isoform.

Note. Both V. Pulgar and C. Tapia have contributed equally to this work.

Note. The novel nucleotide sequence data published here have been submitted to the EMBL sequence databank and are available under accession number Y08817.

sional thin-layer ascending chromatography with a solvent mixture containing absolute ethanol/25% ammonia in a ratio 3.5:1.6, as described by Muñoz and Marshall (1990). Standards were visualized by ninhydrin staining, and radioactive phosphoamino acids were detected by autoradiography.

Southern-blot analysis. 10 µg genomic DNA obtained from *X. laevis* liver was digested with the restriction enzymes indicated, using the amount and conditions for each enzyme suggested by the manufacturer. Digestions were for 5 hours at 37°C. Samples were fractionated by electrophoresis in 1% agarose and the blots were hybridized with a ³²P probe labeled by random priming. The probe used was the same 264-bp PCR product prepared to screen the cDNA library. This probe is not interrupted by introns in genomic DNA and does not contain restriction sites for *EcoRI*, *BamHI* and *HindIII*.

Antibody preparation. A polyclonal antibody that recognizes CK1α was prepared by microinjecting rabbits with the peptide GRHCNKLFIDFGLAKKY which corresponds to residues 147–164 of the protein. This peptide was synthesized as an 'octopus derivative' by Dr Sandor Pongor (ICGEB, Trieste, Italy).

Other methods. Western blots were carried out using 1:1000 dilution of the serum in buffers containing 25 mM Hepes, pH 7.5, 50 mM NaCl and 0.05% Tween 20. The second antibody used was goat anti-rabbit IgG conjugated to peroxidase and was diluted 1:400 in the same buffer. The reaction was developed with 4-chloro-1-naphthol and hydrogen peroxide. Standard recombinant DNA methods, bacterial culture and transformations were as described by Sambrook et al. (1989). Scanning densitometry was performed with a Logitech Scanman 256 and the program Gel Perfect by Bozzo (University of Chile). Protein determinations were carried out by the Bradford method (Bradford, 1976).

Materials. GSH-agarose, glutathione (reduced form) dithiothreitol, thrombin, phosphorylated amino acids (*O*-phospho-L-serine, *O*-phospho-L-threonine, *O*-phospho-DL-tyrosine), chromatographic plates (coated glass, silica gel, 0.2-mm layer thickness), and β casein were purchased from Sigma. Also from Sigma were polypeptides of molecular-size averages as follows: polyglutamic acid, 43 kDa; polyaspartic acid, 42.5 kDa; poly(Glu⁸⁰:Phe²⁰), 16 kDa; poly(Glu⁸⁰:Iyr²⁰), 46 kDa.

Recombinant protein kinase CK2 was prepared as described (Hinrichs et al., 1993). The thrombin used was Sigma product T-3010. Restriction enzymes were from Promega. Stained low-molecular-mass and middle-molecular-mass standards were supplied by BioRad. [γ-³²P]ATP (4500 Ci/mmol) was purchased from ICN. Synthetic peptides and oligonucleotides were synthesized by the Oligopeptido Core Facility of the University of Chile using an Applied Biosystems automatic synthesizer. Nitrocellulose filters were from Amersham. Autoradiography was performed using Kodak X-Omat film. All other chemicals were from Merck.

RESULTS

The PCR amplification of a λgt10 cDNA library of *X. laevis* oocytes using primers derived from a conserved region of bovine CK1 yielded a fragment of 264 bp. Sequence analysis of the PCR product confirmed that it corresponded to a cDNA coding for *X. laevis* CK1.

The PCR product was radiolabeled by random priming and used as a probe to screen the same cDNA library. One of the positive clones isolated and purified was analyzed and found to

contain an insert of 1400 bp that included the whole coding sequence of an α isoform of *X. laevis* CK1 (Fig. 1A). The sequence of CK1α of *X. laevis* was compared with the corrected human CK1α sequence (EMBL Data Library Accession number X80693 HSCCK1MR) and other reported CK1 isoforms (Fig. 1B). The α subunits of human, *X. laevis* and bovine CK1α are identical in their amino acid sequence, except that the bovine enzyme is 12 amino acids shorter than the others. The protein coded by the *X. laevis* CK1α isoform has a calculated molecular mass of 38874 Da. The newly isolated enzyme contains most of the 12 conserved regions present in other protein kinases (Hanks and Quinn, 1991) and all of the sequences that are characteristic of the CK1 family (Graves et al., 1993) (Fig. 1B).

The presence of related genes in the *X. laevis* genomic DNA was studied through Southern-blot analysis. The 264-bp PCR amplification product obtained initially to screen the cDNA library was used as a probe since amplification of genomic DNA with the same primers yielded a product of the same size, indicating that it did not contain introns. *X. laevis* liver genomic DNA was digested by *HindIII*, *BamHI* and *EcoRI* (Fig. 2); these enzymes have no cutting sites in the probe. It is evident that both *HindIII* and *EcoRI* yield four or five different-size fragments that hybridize with the probe. *BamHI* yields only one detectable large fragment. The use of other longer probes, which probably contain intron sequences with sites for these enzymes, results in much more complex patterns (not shown).

The cloned CK1α was expressed by introducing the whole coding sequence, amplified by PCR, as described in Materials and Methods, into the *BamHI* and *EcoRI* sites of the pGEX-2T vector. The nucleotide sequence of the insertion segment was determined. *E. coli* (DH5α) was transformed with the recombinant vector and the expression of the GT-CK1α fusion protein was induced by IPTG.

The bulk of the fusion protein sediments with the insoluble fraction of the extracts (Fig. 3), probably forming inclusion bodies, as occurs with many other recombinant proteins. However, sufficient protein is present in the soluble fraction to allow purification through the affinity column of glutathione-Sepharose.

A Western blot of the preparation of an SDS/PAGE of recombinant GT-CK1α fusion protein developed with a rabbit polyclonal antibody raised against synthetic peptide GRHCNK-LFLIDFGLAKKY was carried out (Fig. 4A); the antibody recognizes a single protein band with the expected mobility of the GT-CK1α fusion protein. The autophosphorylation conditions cause a slight delay in the mobility of the protein. The GT-CK1α fusion protein that was incubated with [γ-³²P]ATP (Fig. 4B, lane 2) is strongly autophosphorylated. Some faster moving peptides are radiolabelled but with less intensity. Native CK1 has also been shown to autophosphorylate (Dahmus, 1981).

Incubation with thrombin for different times (Fig. 4C) causes, as expected, a gradual disappearance of the positive Western band at 62 kDa, and the appearance of a new signal at approximately 39 kDa, the estimated size of the free recombinant CK1α. By 30-min incubation, nearly total loss of the fusion protein is seen. Thrombin digestion of the fusion protein is accompanied by rapid and complete loss of the CK1 phosphorylating activity (Fig. 4D). For this reason, the characterization of the enzymic activity described below was carried out with the preparation eluted from the affinity column without thrombin treatment.

The purified recombinant fusion protein was active in phosphorylating casein and a CK1-specific synthetic peptide substrate which was designed from the phosphorylated sequence of inhibitor 2 of protein phosphatase-1 that was described by Pinna's laboratory (Marin et al., 1994). The apparent *K_m* values calculated for three substrates (Table 1) are very similar to those

B

	I				
<i>x1CK1a</i>	MASSSSGSAE	IVGGKYKLV	VRKIGSGS	-FGDIYLAINIT	40
<i>hCK1a</i>	MASSSSGSAE	IVGGKYKLV	VRKIGSGS	-FGDIYLAINIT	40
<i>bCK1a</i>	MASSSSGSAE	IVGGKYKLV	VRKIGSGS	-FGDIYLAINIT	40
<i>bCK1β</i>	MASRRPKT	DVIVGGRYK	LVREIGFGS	-FGHVYLAIDL	40
<i>dcCK1a</i>	MRILKESR	PEIIVGGKYR	VIRKIGSGS	-FGDIYLGMSIQ	40
<i>rCK1δ</i>	MELRVGNR	YRLGRKIG	SGS	-FGDIYLGTDIA	32
<i>hCK1ε</i>	MELRVGNR	YRLGRKIG	SGS	-FGDIYLGANI	32
<i>hbp1</i>	MALDLRIG	NKYRIRGK	IGSGS	-FGDIYLGTVV	35
<i>hrr25</i>	MDLRVGRY	FRIGPKIG	SGS	-FGDIYHGTN	32
<i>hbp2</i>	MTVDIKIG	KNYTRGRK	IGSGS	-FGDIYLGNTV	34
<i>rCK1γ1</i>	MDHSNREK	DDRRQRT	TKTMAQRN	THCSRPSGT	67
<i>YCK1</i>	MSMPIAST	TTLAVNN	LTNINGNAN	FNVQANKQL	92
<i>YCK2</i>	MSQVQSPL	TATNSGL	AVNNNTMIS	QMPNRSN	99
	II				
<i>x1CK1a</i>	EEVAVKLES	QKARHPQL	LYESKYL	IQGGV-GIPH	139
<i>hCK1a</i>	EEVAVKLES	QKARHPQL	LYESKYL	IQGGV-GIPH	139
<i>bCK1a</i>	EEVAVKLES	QKARHPQL	LYESKYL	IQGGV-GIPH	139
<i>bCK1β</i>	EQVAVKLES	ENTRQPR	LLHEKEL	YNFLQGGV-G	139
<i>dcCK1a</i>	EEVAIKMES	AHARIPQL	LYEAKLYR	ILSGV-GFP	131
<i>rCK1δ</i>	EEVAIKLE	CVTKKHPQ	LHIESK	YKMMQGGV-G	131
<i>hCK1ε</i>	EEVAIKLE	CVTKKHPQ	LHIESK	YKMMQGGV-G	131
<i>hbp1</i>	EEVAIKLE	STRAKHPQ	LEYYRVR	YRILSGV-G	134
<i>hrr25</i>	EEVAIKLES	IRSRHPQ	LDYESRV	RYRILSGV-G	131
<i>hbp2</i>	EQVAVKLE	PLKARHPQ	LHIEYFR	VYVILKGN	167
<i>rCK1γ1</i>	EYVAIKLE	PIKSRAPQ	LHIEYFR	YKQSGEG	191
<i>YCK1</i>	VPVAIKFE	PRKTEAPQ	LRDEYK	TYKILNGT	191
<i>YCK2</i>	LPVAIKFE	PRKTEAPQ	LKDEYR	TYKILAGT	198
	III				
<i>x1CK1a</i>	DNFLMGI	--GRICN	KLFLIDF	GLAKKYR	237
<i>hCK1a</i>	DNFLMGI	--GRICN	KLFLIDF	GLAKKYR	237
<i>bCK1a</i>	DNFLMGI	--GRICN	KLFLIDF	GLAKKYR	237
<i>bCK1β</i>	DNFLMGT	--GPQWK	KLFLVD	FGLAKKYR	237
<i>dcCK1</i>	DNFLMGI	--GRICN	KLFLIDF	GLAKKYR	237
<i>rCK1δ</i>	DNFLMGL	--GKGNL	VYIIDF	GLAKKYR	229
<i>hCK1ε</i>	DNFLMGL	--GKGNL	VYIIDF	GLAKKYR	229
<i>hbp1</i>	DNFLMGI	--GKRGN	VNIIDF	GLAKKYR	232
<i>hrr25</i>	DNFLMGI	--GRRGS	TVHVID	FGLSKKYR	229
<i>hbp2</i>	DNFLM---	KKISNV	VTMIDF	GLAKKYR	229
<i>rCK1γ1</i>	ENFLIGR	QNKKEH	VIIHID	FGLAKKYR	267
<i>YCK1</i>	DNFLIGR	PQDPANN	IHIDF	GMAKQYR	291
<i>YCK2</i>	DNFLIGR	PQDPANN	IHIDF	GMAKQYR	298
	VII				
<i>x1CK1a</i>	EKKMSTP	VEVLCKG	FPAEFAM	YLNCRGLR	337
<i>hCK1a</i>	EKKMSTP	VEVLCKG	FPAEFAM	YLNCRGLR	337
<i>bCK1a</i>	EKKMSTP	VEVLCKG	FPAEFAM	YLNCRGLR	336
<i>bCK1β</i>	EMKMTT	PPVDVLC	KGFPFA	EAMYLKYL	330
<i>dcCK1a</i>	EKKMSTP	IEVLCKG	FPAEFAM	YLNCRSLR	330
<i>rCK1δ</i>	EKKMSTP	IEVLCKG	FPAEFAT	YLNFCASL	329
<i>hCK1ε</i>	EKKMSTP	IEVLCKG	FPAEFAT	YLNFCASL	329
<i>hbp1</i>	EKKISTP	TEVLCKG	FPQEF	SYLYNTR	322
<i>hrr25</i>	EKKLNV	SVETL	CSGLP	EFQYMA	327
<i>hbp2</i>	DTKIGT	PVLEVL	CKGLPEE	FIYMCY	279
<i>rCK1γ1</i>	DTKRSTP	IEALCEN	FPEEM	TYLRYR	317
<i>YCK1</i>	EKKRSTN	VYDLA	QGLPV	QFGRYLE	341
<i>YCK2</i>	EKKRLT	NVYDLA	QGLPI	QFGRYLE	398
	VIII				
<i>rCK1δ</i>	ASGRLR	GTQEVAP	PTPT	SHTANTS	428
<i>hCK1a</i>	LRGSAT	RALPPG	PPTGAT	ANRLSAA	416
<i>bCK1a</i>	DINTTV	VPVIND	PSATGA	QYINRPN	366
<i>hbp1</i>	SETFNK	IKLLAM	KKFT	THFYK	429
<i>hrr25</i>	NYSSI	PLPAER	NPKT	QPSF	379
<i>hbp2</i>	NQPRSL	TAEW	FVLAPL	SHPPAET	390
<i>rCK1γ1</i>	LQMQQ	LQMQQ	LQMQQ	LQMQQ	431
<i>YCK1</i>	HOYSSP	DIHHHH	YNOQQQ	QAQAQA	494
<i>YCK2</i>	HOYSSP	DIHHHH	YNOQQQ	QAQAQA	494
	IX				
<i>hrr25</i>	LLQQQ	QRDSQ	EQQQV	PMAATR	494
<i>hbp2</i>	SSLQ	PYSACL	RRV	DEEPAP	399
<i>YCK1</i>	QSQQ	FARY	QPOQ	PSAALR	538
<i>YCK2</i>	NTGANG	QTNK	YPYNA	QPTANDE	546

Fig. 1. Continued

that CK1a is very slightly inhibited (approximately 10%) even at the highest concentration of heparin used, while CK2 has the expected high sensitivity towards this inhibitor.

It has been reported (Hoekstra et al., 1994) that several isoforms of yeast CKI have tyrosine kinase activities, as demonstrated by the fact that they can phosphorylate the random

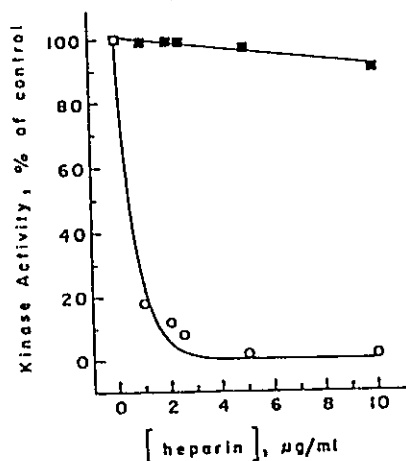


Fig. 5. The effect of heparin on CK1 α and on CK2. The kinase activities of the fusion protein GT-CK1 α and of recombinant protein kinase CK2 were assayed using casein as a substrate as detailed in Materials and Methods except that the indicated amounts of heparin were added. In the case of CK2 (O), 1.2 pmol recombinant α subunit and 2 pmol β subunit were used; the 100% control activity was 38 pmol 32 P incorporated/min. In the case of GT-CK1 (■), 4 units CK1 α were added to give 4 mol 32 P incorporated/min as the 100% control activity in the absence of heparin.

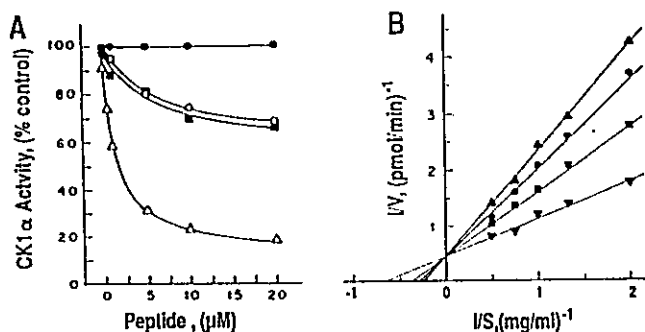


Fig. 6. Effect of acidic polypeptides on the activity of GT-CK1 α . (A) The activity of recombinant fusion protein GT-CK1 α (2 units) was measured using β casein as substrate as described in Materials and Methods in the presence of different concentrations of the acidic polypeptides polyglutamate (●), poly(aspartate) (O), poly(Glu 20 :Phe 20) (■), and poly(Glu 20 :Tyr 20) (Δ). (B) GT-CK1 α activity was measured as described in (A) with β casein substrate (0.5–2.0 mg/ml) in the presence of poly(Glu 20 :Tyr 20) at concentrations of 2 (■), 5 (●) and 7.5 (Δ) μ M or with no inhibitor (∇).

pearance of a wide polydisperse region in the autoradiograph of a polyacrylamide gel of the products, first appearing at 10–20 min incubation time (Fig. 7, lanes 4 and 5); the time-dependent appearance of diffuse radioactivity covers the whole range of sizes in the gel. Very similar patterns are obtained when the phosphorylation of poly(Glu 20 :Tyr 20) is assayed with tyrosine kinases (Braun et al., 1984; Schieven et al., 1986). When the polypeptide substrate was omitted (Fig. 7, lane 8), the autophosphorylation of the fusion protein and the previously described proteolytic product are observed.

The phosphorylation of tyrosine residues was also tested using two short synthetic polypeptides that contain an acidic cluster at the amino end of the tyrosine residue but that differ otherwise. Their phosphorylation is detected by autoradiography of high-resolution SDS/16.5% polyacrylamide gels and is compared to the serine phosphorylation of a known peptide derived from protein phosphatase inhibitor-2 (Marin et al., 1994;

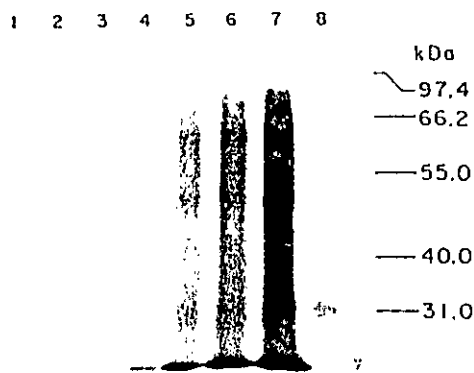


Fig. 7. Phosphorylation of poly(Glu 20 :Tyr 20) by GT-xICK1 α . The random polypeptide poly(Glu 20 :Tyr 20) (4:1) was incubated at different times with 20 units GT-xICK1 α as described in Materials and Methods. Phosphorylation of poly(Glu 20 :Tyr 20) was detected by SDS/PAGE and autoradiography. Lane 1, 0 min incubation; lane 2, 1 min incubation; lane 3, 5 min incubation; lane 4, 10 min incubation; lane 5, 20 min incubation; lane 6, 30 min incubation; lane 7, 60 min incubation; lane 8, 60 min incubation of enzyme without poly(Glu:Tyr). Number at right indicate molecular-mass standards.

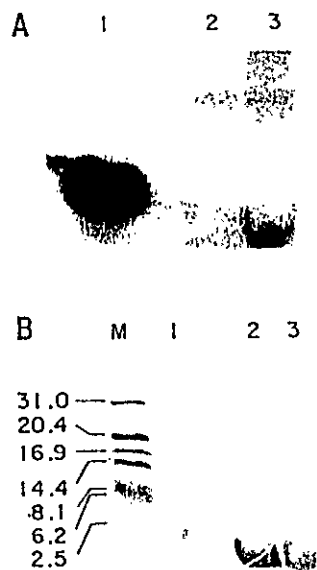


Fig. 8. Phosphorylation of synthetic peptides by CK1 α . Phosphorylation assays were carried out as given in Materials and Methods using 2 units CK1 α , 1 mM peptide as substrate and 30 min incubation. Products were analyzed on 16.5% SDS/polyacrylamide gels. (A) Autoradiograph of gel. Lane 1, peptide RRKDLHDDDEEAMSIAA, 2101 Da; lane 2, peptide EEEEEYFVFGRRK, 1589 Da; lane 3, peptide RRREEEYEEEE, 1554 Da (each indicated by the single-letter code). Scanning analysis of autoradiographic images was used for relative quantification of spots. (B) Coomassie-blue detection of peptide bands of the same gel used for autoradiograph shown above. Lane M indicates migration of polypeptide markers and numbers to the left indicate the molecular size in kDa.

Fig. 8A). The results obtained demonstrate that the recombinant CK1 can phosphorylate RRREEEYEEEE (Fig. 8A, lane 3) at about 5% of the level achieved with the known serine substrate RRKDLHDDDEEAMSIAA (densitometric comparison). It is interesting that the other tyrosine-containing peptide, EEEEEYFVFGRRK (Fig. 8A, lane 2) is not significantly phosphorylated by CK1, indicating that the presence of the acidic residues on the carboxyl side of the tyrosine residue are positive determinants for its phosphorylation.

³²P]ATP is fivefold higher than in the standard assay. With synthetic peptides, it has been possible to make an approximate comparison of the relative efficiency of a known serine substrate (RRKDLHDDDEEAMS*IAA) and a peptide that contains a tyrosine residue surrounded by glutamic acid residues (RRRE-EEY*EEEE). The densitometric comparison of the autoradiography spots indicates that the tyrosine peptide is phosphorylated about 5% that of the serine peptide. In the same experiment, it is shown that the peptide EEEEEYFVFGRRK is not appreciably phosphorylated by CK1. This observation is interesting since it indicates that replacement of acidic groups on the carboxyl side of the tyrosine residue can have a drastic effect on the efficiency of peptide substrates. Studies on the specificity determinants of CK1 using serine peptides (Flotow and Roach, 1991; Meggio et al., 1991) have not detected positive or negative effects of amino acid residues on the carboxyl side of the phosphorylated residue. However, a much more detailed study would be required to arrive at the conclusion that serine/threonine and tyrosine phosphorylation by CK1 have different specificity requirements. Songyang and collaborators (Songyang et al., 1995) have used a peptide library to test the specificity of several tyrosine kinases and have demonstrated that, in some instances, the amino acids downstream of the tyrosine residue are important specificity determinants.

The recognition of tyrosine residues in an acidic environment by CK1 is also demonstrated by the strong inhibition of casein phosphorylation caused by poly(Glu³⁰⁰:Tyr³⁰⁰). The specificity of this interaction is observed by the fact that polymers of similar charge, poly(Glu³⁰⁰:Phe³⁰⁰) and poly(glutamic acid), yield much lower inhibitions. In accordance with its capacity to act as a substrate, poly(Glu³⁰⁰:Tyr³⁰⁰) behaves as a competitive inhibitor of casein phosphorylation, with an approximate K_i of 5 μ M.

CK2 has also been shown to be strongly and specifically inhibited by tyrosine-containing acidic polypeptides (Meggio and Pinna, 1989; Téllez et al., 1990). It seems possible, therefore, that, as CK1, CK2 may also be capable of phosphorylating tyrosine residues under similar conditions.

Phosphoamino acid analysis demonstrated that the CK1 α preparation incubated with [γ -³²P]ATP yields some phosphotyrosine. This result suggests that *X. laevis* CK1 α , as the yeast isoforms, autophosphorylates tyrosine residues. Since autophosphorylation of the purified enzyme yields some smaller size radioactive bands, the phosphotyrosine detected might be present in these contaminating products. However, the possibility that autophosphorylation does indeed occur is supported by the fact that, in addition to all the yeast CK1 isoforms that autophosphorylate on tyrosine, the CK1-4 isoform from *A. thaliana* was isolated from an expression library that was screened with anti-phosphotyrosine serum. This enzyme also autophosphorylates tyrosine residues (Ali et al., 1994; Klimeczak et al., 1995).

The possession of phosphotyrosine makes proteins acquire affinity for other proteins containing SH2 domains (Pawson and Schlessinger, 1995) and may, therefore, signal interactions that may be relevant in the targeting of CK1 to special cellular loci. In yeast, there has been some evidence presented that indicates that CK1 tyrosine phosphorylation might increase the enzyme activity since treatment with tyrosine phosphatases inhibit the enzyme while serine/threonine phosphatases have no effect (Hoekstra et al., 1994). In this same publication, it is suggested that autophosphorylation of tyrosine might play a role in the subcellular distribution of the Hhp1 isoform of CK1.

Supported by grants from the Council for Tobacco Research, the International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology and the Fondo de Desarrollo Científico y Tecnológico-Chile to J. E. A. and from

Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica of Portugal to C. E. S.

REFERENCES

- Ali, N., Hakfker, U. & Clua, N. H. (1994) Cloning and biochemical characterization of a plant protein kinase that phosphorylates serine, threonine and tyrosine. *J. Biol. Chem.* **269**, 31626–31629.
- Beyaert, R., Vanhaesebroeck, B., Declercq, W., Van Lint, J., Vandenaebroeck, P., Agostinis, P., Vandenneede, J. R. & Fiers, W. (1995) Casein kinase-I phosphorylates the p75 tumor necrosis factor receptor and negatively regulates tumor necrosis factor signaling for apoptosis. *J. Biol. Chem.* **270**, 23293–23299.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
- Braun, S., Raymond, W. E. & Racker, E. (1984) Synthetic tyrosine polymers as substrates and inhibitors of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem.* **259**, 1051–1054.
- Brockman, J. L., Gross, S. D., Sussman, M. R. & Anderson, R. A. (1992) Cell cycle-dependent localization of casein kinase I to mitotic spindles. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **89**, 9454–9458.
- Dahmus, M. E. (1981) Purification and properties of calf thymus casein kinases I and II. *J. Biol. Chem.* **256**, 3319–3325.
- De Maggio, A. J., Lindberg, R. A., Hunter, T. & Hoekstra, M. F. (1992) The budding yeast HRR25 gene product is a casein kinase I isoform. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **89**, 7008–7012.
- De Paoli-Roach, A. A., Ahmad, Z. & Roach, P. J. (1981) Characterization of a rabbit skeletal muscle protein kinase (PC₆₃) able to phosphorylate glycogen synthase and phosphatase. *J. Biol. Chem.* **256**, 8955–8962.
- Fish, K. J., Gegielska, A., Getman, M. E., Landes, G. M. & Virshup, D. M. (1995) Isolation and characterization of human casein kinase I ϵ (CK1), a novel member of the CK1 gene family. *J. Biol. Chem.* **270**, 14875–14883.
- Flotow, H. & Roach, P. J. (1991) Role of acidic residues as substrate determinants for casein kinase I. *J. Biol. Chem.* **266**, 3724–3727.
- Grässer, F. A., Scheidtmann, K. H., Tuazon, P. T., Traugh, J. A. & Walter, G. (1988) *In vitro* phosphorylation of SV40 large T antigen. *Virology* **165**, 13–22.
- Graves, P. R., Haas, D. W., Hagedorn, C. H., De Paoli-Roach, A. A. & Roach, P. J. (1993) Molecular cloning, expression, and characterization of a 49-kilodalton casein kinase I isoform from rat testis. *J. Biol. Chem.* **268**, 6394–6401.
- Graves, P. R. & Roach, P. J. (1995) Role of COOH-terminal phosphorylation in the regulation of casein kinase I δ . *J. Biol. Chem.* **270**, 21689–21694.
- Hanks, S. K. & Quinn, A. M. (1991) Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods Enzymol.* **200**, 38–62.
- Hathaway, G. M. & Traugh, J. A. (1982) Casein kinases—multipotential protein kinases, in *Current topics in cellular regulation* (Stadman, E. & Horecker, B., eds) vol. 21, pp. 101–127, Academic Press, New York.
- Hoekstra, M. F., Dhillon, N., Carmel, G., De Maggio, A. J., Lindberg, R. A., Hunter, T. & Kuret, J. (1994) Budding and fission yeast casein kinase I isoforms have dual-specificity protein kinase activity. *Mol. Biol. Cell* **5**, 877–886.
- Hirnrichs, M. V., Jedlicki, A., Téllez, R., Pongor, S., Gatica, M., Allende, C. C. & Allende, J. E. (1993) Activity of recombinant α subunits and β subunits of casein kinase II from *Xenopus laevis*. *Biochemistry* **32**, 7310–7316.
- Issinger, O.-G. (1993) Casein kinases: pleiotropic mediators of cellular regulation. *Pharmacol. Ther.* **59**, 1–30.
- Klimeczak, L. J., Farini, D., Lin, C., Ponti, D., Cashmore, A. R. & Giuliano, G. (1995) Multiple isoforms of Arabidopsis casein kinase I combine conserved catalytic domains with variable carboxyl-terminal extensions. *Plant Physiol.* **109**, 687–696.
- Kobel, H. R. & Du Pasquier, L. (1986) Genetics of Polyploid *Xenopus*. *Trends Genet.* **2**, 310–315.

Optimal sequences for non-phosphate-directed phosphorylation by protein kinase CK1 (casein kinase-1) – a re-evaluation

Victor Pulgar¹, Oriano Marin², Flavio Meggio², Catherine C. Allende¹, Jorge E. Allende¹ and Lorenzo A. Pinna²

¹Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Chile; ²Dipartimento di Chimica Biologica and CNR, Centro di Studio delle Biomembrane, Università di Padova, Italy

A variety of synthetic peptides derived from either the inhibitor-2 (I-2) phosphoacceptor sites or the optimal sequences selected in an oriented peptide library have been compared for their susceptibility to phosphorylation by protein kinase CK1 (also termed casein kinase-1). The I-2-derived peptides are by far preferred over the library peptides by both rat liver CK1 (and by the α/β , γ and δ/ϵ isoforms immunoprecipitated from it) and recombinant *Xenopus laevis* CK1 α . The superiority of the I-2-derived peptides over the library ones is reflected by V_{max} values one to two orders of magnitude higher while the K_m values are comparable. Individual substitutions of any of the aspartic acids with alanine in the I-2-derived peptide RRKHAAGIDDDDDAYSITA is detrimental, producing both a fall in V_{max} and an increase in K_m which are more pronounced at position $n - 3$, but also quite significant at positions $n - 4$, $n - 5$ and, to a lesser extent, $n - 6$. The unfavourable effect of these substitutions is more evident with rat liver CK1 than with recombinant *Xenopus laevis* CK1 α . The chimeric peptide IGDDDDAYS-IIIFFA, resulting from the combination of the N-terminal acidic sequence of the I-2 (Ser86) site and the C-terminal hydrophobic cluster selected in the library peptides (MAEFDTG-S-IIIFFAKKK and MAYYDAA-S-IIIFFAKKK) is phosphorylated as efficiently as the I-2-derived peptide in terms of both K_m and V_{max} . These combined data strongly support the conclusion that, at variance with the optimal sequences selected in the library, optimal non-phosphate-directed phosphorylation of peptide substrates by CK1 critically relies on the presence of a cluster of acidic residues (preferably aspartic acid) upstream from position $n - 2$, while the highly hydrophobic region downstream from serine selected in the library appears to be dispensable. The reason for these discrepancies remains unclear. The possibility that the library data are biased by the invariant elements forming its scaffold (MA-x-x-x-x-SI-x-x-x-x-AKKK) would be consistent with the observation that the library-selected peptides, despite their low K_m values, fail to compete against the phosphorylation of protein and peptide substrates by CK1, suggesting that they bind to elements partially distinct from those responsible for substrate recognition.

Keywords: casein kinase; protein kinase CK1; site specificity CK1.

Protein kinases CK1 (also known as casein kinase-1) are a family of monomeric enzymes ranging in size from 35 to 55 kDa [1]. These enzymes have been found in all eukaryotes, from yeast to man, and are known to be present in the nucleus, cytoplasm and membrane fractions of cells. Although CK1 is known as a Ser/Thr protein kinase, some species of yeast [2] and *Xenopus laevis* [3] have been shown to phosphorylate Tyr residues in synthetic peptides albeit with lower efficiency. A number of proteins have been reported to be phosphorylated by CK1 including: simian virus 40 large T antigen [4,5], the insulin receptor [6], a tumour necrosis factor receptor [7], the m-3 muscarinic acid receptor [8], inhibitor-2 of protein phosphatase-1 (I-2) [9], glycogen synthase [10], p53 [11] and DARPP-32 [12].

Truncated forms of CK1 of yeast [13] and mammals [14] have been crystallized and their three-dimensional structures determined by X-ray diffraction yielding valuable information on the basic folding of its catalytic domain, which conforms to the

bi-lobal overall architecture found in protein kinase A and in all the catalytic domains of protein kinases solved to date [15].

According to the structure of sites affected in casein fractions [16,17] and consistent with subsequent studies with peptide substrates [18–20], CK1 was first classified as a phosphate-directed protein kinase, the consensus sequence of which is specified by a phosphorylated Ser or Thr residue at position $n - 3$ upstream from the target amino acid (Sp/Tr-X-X-S). An individual Asp or Glu definitely proved unable to effectively replace the crucial phosphoserine acting as specificity determinant [20]. Such a stringent requirement for a phosphorylated residue, however, was hardly consistent with a number of phosphoacceptor sites lacking this feature and nevertheless affected by CK1. Additional studies revealed that high phosphorylation efficiencies by CK1, comparable in terms of both V_{max} and K_m with those of phosphopeptides with SerP at $n - 3$, can be achieved with peptide substrates, mostly derived from I-2 in which many acidic residues are located on the N-terminal side of Ser at position $n - 3$ and further upstream [21]. Hence it was generally held that multiple N-terminal carboxylic (especially aspartyl) side chains can in some way substitute for a single phosphoserine (or phosphothreonine) at position $n - 3$. Later, a novel approach to the definition of the optimal sequences phosphorylated by protein kinases, based on the use of peptide libraries, was set up and developed [22]. The

Correspondence to L. A. Pinna, Dipartimento di Chimica Biologica, Viale G. Colombo 3, 35121 Padova, Italy. Fax: 39-49-8073310; E-mail: pinna@civ.bio.unipd.it

Abbreviations: CK1, protein kinase CK1 (EC2.7.1.37); RLCK1, CK1 purified from rat liver; rXCK1, recombinant *Xenopus laevis* CK1 α ; I-2, inhibitor-2 of protein phosphatase-1.

(Received 4 November 1998; accepted 15 December 1998)

most widely applied and successful of these methods provides the sequence of a virtual peptide representing the optimal substrate of a kinase having at each position on the two sides of Ser (or Tyr), generally between $n-4$ and $n+4$, those residues that are most frequently found by sequencing a mixture of peptides phosphorylated by that kinase within the library [23].

Despite the caveat that this method does not provide the sequence of a real peptide preferred over all other possibilities but rather the virtual sequence of a theoretically optimal peptide constructed from a mosaic of different ones, the reliability of this straightforward procedure was corroborated by generally good correlation between the sequences retrieved from the library and those provided by traditional methods. It came as a surprise therefore that the optimal sequences selected by two isoforms of CK1, δ and γ , in a peptide library, displayed an individual acidic residue at $n-3$ (in accordance with previous knowledge) not flanked, however, by an additional Asp or Glu residue, which were conversely expected to be strongly selected based on previous studies [24]. The very hydrophobic downstream sequence that was strongly selected (IIIF), moreover, is not generally found in CK1 substrates, with the exception of the hydrophobic residue at $n+1$.

It should be mentioned that most studies on CK1 specificity were performed using native preparations presumably composed of different isoforms, whereas two well-defined recombinant isoforms were analysed with the peptide library. This prompted us to synthesize the two peptides corresponding to the optimal sequence selected in the library by CK1 δ and γ and to compare their phosphorylation efficiencies with those of previously developed peptide substrates including clusters of acidic residues upstream, using as phosphorylating agents either rat liver CK1 (RLCK1), and the different isoforms (α/β , δ/ϵ and γ) immunoprecipitated from the preparation, or recombinant *Xenopus laevis* CK1 α (rXICK1 α).

The data presented here support the view that, although CK1 isoforms display significantly different peptide substrate specificity, all of them phosphorylate much more readily peptides with large acidic clusters on their N-terminal moiety than those conforming to the optimal sequences provided by the peptide library analysis.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials

RLCK1 was purified as previously described [25]. rXICK1 α , initially cloned in pGEX-2T vector [3], was excised and cloned in a pT7-7 vector derivative. The enzyme was produced as a His-tagged protein and purified using a nickel/agarose column as recommended by the manufacturer (Invitrogen).

Synthesis of peptides

The I-2-derived peptides, RRKHAAGDDDDAYSITA, RRKHAAGDDDDAAYSITA, RRKHAAGDDADAYSITA, RRKHAAGDADDAYSITA, RRKHAAGADDAYSITA, IGDDDDAYSITA, IGDDADAYSITA, RRKDLHDDEEDEAMSITA and IGDDDDAYSDTETTEA, were synthesized as previously described [21]. The library-derived peptides, MAEFDTGSIIFFA-KKK, MAYYDAASIIFFAKKK, RRKHAAGAEFDTGSIIFFA, RRKHAAGAYYDAASIIFFA and IGDDDDAYSIIIFFA, were obtained by the solid-phase method/Fmoc strategy [26] on 4-hydroxymethylphenoxymethyl/copolystyrene/1% divinylbenzene resin (0.96 mmol·g⁻¹) using an automated peptide synthesizer (Applied Biosystems, model 431A). Synthesis was

performed on a 0.05-mmol scale by adapting the manufacturer's protocol. The chain elongation was performed using a 10-fold excess (0.5 mmol) of each Fmoc-amino acid, 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate and 1-hydroxybenzotriazole (1 : 1 : 1) in the presence of a 20-fold excess of di-isopropylethylamine. Capping with acetic anhydride was carried out during synthesis of hydrophobic clusters.

The crude peptides were purified by either ion-exchange chromatography on CM Fast Flow resin (Pharmacia) or preparative reverse-phase HPLC on a C₁₈ column (Nova-Pak Cartridge, 25 × 100 mm; Waters). Non-specific interactions during purification, due to the hydrophobicity of the peptides, were responsible in some cases for very low yields.

The correct sequence of peptides was checked by mass analysis on a matrix-assisted laser-desorption ionization time-of-flight spectrometer (Maldi 1; Kratos-Shimadzu, Manchester, UK) and the purity was $\geq 95\%$ by analytical HPLC.

Kinase assays

Enzymatic reactions were performed at 30 °C in kinase buffer containing 50 mM Hepes or Tris/HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM dithiothreitol, [γ -³²P]ATP (50 μ M, specific activity 500–1500 c.p.m.·pmol⁻¹). The substrate peptides were used in a variable concentration from 0.02 to 1 mM. To determine the ³²P incorporated the phosphocellulose paper assay was used for peptides containing basic residues [27]. In the case of other acidic peptides devoid of basic residues the radioactivity incorporated was determined by partial acid hydrolysis (6 M HCl, 4 h at 110 °C) followed by high-voltage paper electrophoresis at pH 1.9 (3000 V, 50 mA for 2 h) [28] and quantification of P-Ser in an Instant Imager apparatus. Alternatively phosphorylation of these latter peptides was assayed by converting [γ -³²P]ATP into ³²P_i after boiling the samples for 10 min at 100 °C in the presence of 1 M HCl and by removal of free inorganic phosphate as a phosphomolybdic complex with isobutanol/toluene extraction as previously described [29]. The phosphorylation of protein substrates was determined by subjecting samples to SDS/PAGE followed by autoradiography or directly scanned on an Instant Imager apparatus.

Kinetic constants were determined by regression analysis of double-reciprocal plots constructed from initial-rate measurements.

Western-blot and immunoprecipitation analysis

Peptide sequences specific for the isoforms CK1 δ/ϵ and CK1 γ_{1-3} were selected and the corresponding peptides synthesized as octopus derivatives in the Oligopeptido Facility, Universidad de Chile. Sequences selected were: E(305)RERRDREER(314) for CK1 δ/ϵ [30,31] and Q(103)VYYFGPCGKY(112) for CK1 γ_{1-3} [32]. The octopus derivatives were used to raise polyclonal antibodies in rabbits by Immunovet, Universidad de Chile. For CK1 α , a previously described antibody was used [3]. RLCK1 or rXICK1 α was subjected to SDS/PAGE (10% gel) and transferred to nitrocellulose at 350 mA for 90 min in 20 mM Tris/190 mM glycine/20% methanol. The nitrocellulose filter was blocked with 3% BSA in Tris-buffered saline for 45 min, and then incubated overnight with the corresponding antisera, diluted 1 : 750 in Tris-buffered saline containing 1% BSA and 0.02% Na₂S₂O₃. Bound antibody was detected using an alkaline phosphatase-conjugated goat anti-(rabbit IgG) serum (Pharmacia) followed by incubation with bromochloroindolyl phosphate and Nitro Blue tetrazolium [33].

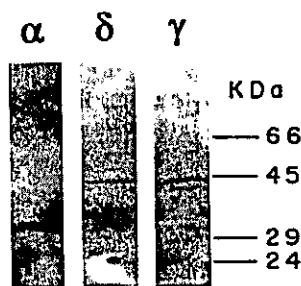


Fig. 2. Detection of CK1 isoforms in RLCK1 preparation. A Western-blot analysis was performed using 100 μ g of total protein from RLCK1 preparation per lane. After transfer to the nitrocellulose membrane the proteins were incubated with the isoform-specific antibodies as described in Experimental procedures. α , anti-CK1 α ; δ , anti-CK1 δ ; γ , anti-CK1 γ . Molecular masses of marker proteins are indicated.

with the subisoform γ_3 and the thickness of the signal recognized by anti- α may reflect a doublet, consistent with the presence in rat of both the two subisoforms, α and α L [34] differing by just 28 amino acids.

In an attempt to quantify the proportions of the different isoforms in the RLCK1 preparation, immunoprecipitation with the three antibodies was performed separately and the activity of each immunoprecipitate was assayed. Assuming that the efficiency of the affinity resin (Ipp) was the same for the three antibodies, it could be calculated that about 50% of RLCK1 activity is accounted for by the γ isoforms, while the δ/ϵ and the α/β isoforms contribute about 35% and 15%, respectively. An even more predominant contribution of the γ isoforms to the overall CK1 activity of the rat liver preparation is supported by the data of Table 2 where the rates of phosphorylation of the library peptides by RLCK1 and its immunoprecipitated fractions are compared. While the fraction immunoprecipitated by anti- α IgG resembles rXICK1 α as it appreciably phosphorylates both the library peptides, the selectivity of whole RLCK1 is closely reminiscent of that of the anti- γ immunoprecipitate: both display negligible activity toward the library peptides, the Lib- γ peptide actually being the poorest substrate with either RLCK1 or its anti- γ immunoprecipitate.

Kinetic analysis

To gain information about the features that could account for the poor performance of peptide substrates which, based on their selection in the peptide library, were expected to represent optimal substrates for CK1, a kinetic analysis was performed with a set of peptides derived from either the library or I-2 sites.

Table 3 shows the kinetic constants and the resulting phosphorylation efficiencies (V_{max}/K_m) determined with RLCK1, the overall activity of which, as shown above, is mainly ascribable to the γ isoform. The highest phosphorylation efficiency is observed with the peptide reproducing the I-2 Ser86 site

Table 2. Phosphorylation of the I-2 (site 174)-derived peptide and the library peptides by different isoforms of CK1. The CK1 activity of immunoprecipitated CK1 isoforms was determined as described in the Experimental procedures in the presence of 300 μ M phosphoacceptor peptides. Phosphorylation rate is expressed relative to that of I-2 (site 174) peptide (≈ 100).

Peptide substrates	RLCK1	α	δ	γ	rXICK1 α
RRKDLHDEEEDAMSTIA	100	100	100	100	100
MAEFDTGSI I IFFAKKK	5	19	21	6	25
MAYYDAAS I I IFFAKKK	2	16	0.4	< 0.1	12

Table 3. Kinetic constants for the phosphorylation of peptide substrates by rat liver CK1. V_{max} is expressed as percentage of radioactivity incorporated in I-2 (site 86)-derived peptide (in bold) by RLCK1 corresponding to 58.2 $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}$. The phosphorylatable Ser is italicized and the position changing from Asp to Ala in I-2 (site 86)-derived peptides is indicated in boldface. Values are the mean of at least three separate experiments with a standard error of less than 14%. ND, not determined because of very low phosphate incorporation.

Peptide substrates	V_{max} (%)	K_m (μ M)	$V_{max}K_m$
I-2 (site 86) derived			
IGDDDDAYS DTETTEA	28	33	0.84
IGDDDDAYS ITA	79	58	1.36
IGDDADAYS ITA	37	153	0.24
RRKHAAIGDDDDAYS ITA	100	250	0.40
RRKHAAIGDDDAAYS ITA	10.6	363	0.029
RRKHAAIGDDADAYS ITA	15.3	444	0.034
RRKHAAIGDADDAYS ITA	25.6	438	0.058
RRKHAAIGADDDAYS ITA	86.9	346	0.251
I-2 (site 174) derived			
RRKDLHDEEEDAM SITA	104	239	0.43
Library derived			
Lib- δ			
MAEFDTGSI I IFFAKKK	5	36	0.138
RRKHAAIGAEFDTGSI I IFFA	7	333	0.021
Lib- γ			
MAYYDAAS I I IFFAKKK	1.3	33	0.039
RRKHAAIGAYYDAAS I I IFFA	ND	ND	ND
'Chimeric' peptide			
IGDDDDAYS-S-I I IFFA	115	62	1.86

(IGDDDDAYS**DTETTEA**) and its derivative shortened and modified in its C-terminal moiety to prevent phosphorylation by CK2: IGDDDDAYS**ITA**. The latter displays a slightly higher K_m (58 vs. 33 μ M) which is compensated for, however, by an increase in V_{max} (46.7 vs. 28 $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}$). The K_m value is markedly increased by the N-terminal addition of four basic residues (at positions from $n-11$ to $n-14$) which make applicable the phosphocellulose paper assay [27]. The resulting peptide, RRKHAA-IGDDDDAYS**ITA**, displays an approximately fourfold higher K_m while the V_{max} is unaffected or even slightly improved. The overall performance of this peptide, in terms of either V_{max} or K_m , is nearly identical with that of the site-174-derived peptide, supporting the view that, whenever a very large cluster of acidic residues is present upstream, Glu can replace Asp even at the crucial $n-3$ position. On the other hand, the relevance of the Asp quartet in ensuring high phosphorylation efficiency of the site-86-derived peptides is highlighted by the detrimental effect of replacing just one of the Asp residues with Ala, not only at the canonical $n-3$ position but also at positions $n-4$ and, to a lesser extent $n-5$ and $n-6$. Each of these individual substitutions in the RRKHAA-IGDDDDAYS**ITA** peptide causes a decrease in phosphorylation efficiency of about one to two orders of magnitude, mainly accounted for by a drastic decrease in V_{max} , but also accompanied by a significant increase in K_m . Similar results have been obtained by replacing with Ala the Asp at position $n-4$ in the I-2 (site 86) parent peptide IGDDDDAYS**ITA**, lacking the N-terminal basic cluster. In this case the detrimental effect on K_m is more pronounced than that on V_{max} (Table 3).

The phosphorylation efficiencies of both the library peptides are comparable with those of the I-2-derived peptides in which one Asp was replaced by Ala (see Table 3). Such a poor performance, however, is entirely due, in the case of the library

phosphorylated by RLCK1 [5], or mimicking the optimal sequences selected by recombinant CK1 δ and γ isoforms in an oriented peptide library [24]. All these peptides share an acidic residue (generally Asp) at position $n-3$ and are potential indicators of the non-phosphate-directed activity of CK1 as they lack phosphoserine and phosphothreonine residues, which, at position $n-3$, have been shown to act as powerful, albeit not indispensable, specificity determinants [18,19]. They differ, however, in that the I-2-derived peptides include several additional acidic amino acids upstream from position $n-3$ (typically a DDDD quartet between $n-6$ and $n-3$ in the peptides derived from the Ser86 site), whereas they lack the very hydrophobic motif, IIFF, which is strongly selected by the library downstream from position $n+1$.

As judged from immunoprecipitation experiments, the RLCK1 preparation is mainly composed of the γ isoform(s) but it also contains appreciable amounts of the α (and/or β) and δ (and/or ϵ) isoforms. All available data indicate that RLCK1 and rX/CK1 α display similar, yet not identical, peptide substrate specificity. The most remarkable similarity they share is a stringent requirement for a cluster of more than three acidic residues upstream from position $n-2$ in order to exhibit optimal phosphorylation efficiency. In particular, the replacement of a single Asp with Ala in the D₄ cluster present in site-86-derived peptides causes a decrease in phosphorylation efficiency of one to two orders of magnitude. Although substitution is most effective at position $n-3$, it is also detrimental at positions farther upstream. Such behaviour is different from that observed when CK1 targeting is phosphate directed, as, in that case, by far the most crucial position at which phosphoserine is effective as the specificity determinant is $n-3$ and replacement of phosphoserines at $n-4$ and $n-5$ proved almost ineffective [18,19].

Such a crucial role for the whole D₄ cluster in CK1-mediated phosphorylation can hardly be reconciled with the optimal sequence selected by CK1 δ and γ in an oriented peptide library (MA-x-x-x-x-SI-x-x-x-AKKK), where only one Asp at position $n-3$ was strongly selected, together with a very hydrophobic quartet (IIFF) downstream from the invariant doublet SI [24], which is not found in any of the known CK1 phosphorylation sites. Indeed the two synthetic peptides reproducing the optimal sequences selected in the library by CK1 δ and γ , MA-EFDTG-SI-IIFF-AKKK and MA-YYDAA-SI-IIFF-AKKK, respectively, are very poorly phosphorylated by RLCK1 (the activity of which is mainly due to the γ isoforms but which also contains the δ isoform) as compared with the I-2-derived peptides. This poor performance is entirely due to very low V_{\max} values (the K_m values are similar to those of the best I-2-derived peptides).

On the other hand, the chimeric peptide IGDDDDAY-SI-IIFFA, the N- and C-terminal moieties of which conform to the I-2 (site 86) peptide and library-selected peptide, respectively, is an excellent substrate with kinetic constants comparable with those of the best of its two parents, IGDDDDAY-SI-TA. The possibility that the selection of the library peptides could have been biased by the invariant constraints imposed by the library's scaffold sequence (MAxxxxxSIxxxxAKKK) should be carefully considered. In particular, the C-terminal basic motif AKKK inserted for technical reasons could influence selection. We show here that the removal of this motif, or its transposition to the N-terminus where basic residues are compatible with a high phosphorylation rate, does not improve phosphorylatability of the library peptides. It is still conceivable, however, that such a C-terminal Lys triplet might alter the mode of binding of the peptides and consequently the relevance of canonical specificity determinants, reducing the favourable effect of the N-terminal

D₄ motif for example. Pertinent to this could be the intriguing finding that the library-selected peptides, which were expected to be efficient competitive inhibitors by virtue of their low K_m and negligible V_{\max} , actually fail to inhibit the phosphorylation of a protein substrate by CK1 under conditions in which the I-2-derived peptides and the chimeric peptide do compete against protein phosphorylation in the expected dose-dependent manner (see Fig. 3). The latter peptides, moreover, also suppress the slow phosphorylation of the library peptides, while the reverse does not apply. Behaviour such as this suggests that the library peptides bind to CK1 through elements that are not necessary for the binding of 'regular' substrates. This interpretation would also be consistent with the intriguing finding that the library peptides actually stimulate catalytic activity, suggesting that their binding to CK1 has a positive allosteric effect on the catalytic site.

Another possibility that should be taken into account is that the outcome of the library study is biased by the use of glutathione S-transferase-CK1 constructs [24], which could behave differently from the native and His6-tagged recombinant CK1 preparations used here and in previous studies [18,19,21]. In any case the discrepancies observed warn that some caution should be exerted when drawing general conclusions from the use of peptide libraries for defining the optimal sequences phosphorylated by protein kinases. It may be noted on the other hand that, although the peptide library result does not stress the crucial role of the N-terminal acidic cluster, it is not fully inconsistent with it either. Besides the Asp at position $n-3$, which is selected by both CK1 δ and γ , in fact, an additional Glu is selected by CK1 δ at $n-5$ while at position $n-4$ Glu was selected as second choice by CK1 δ and γ [24]. This would give a sequence resembling the chimeric peptide shown here to be one of the best substrates for both RLCK1 and rX/CK1 α (Tables 3 and 4). Clearly the 'classical' approach and the use of libraries can complement each other and should be used in combination for defining the optimal sequences for different protein kinases.

While immunoprecipitated CK1 isoforms were just sufficient for phosphorylation-rate determinations, a comparative kinetic study could be carried out using the whole RLCK1 preparation (in which the γ isoforms predominate, while the α isoform is almost negligible) and rX/CK1 α . Apart from the similarities, dealt with above, some significant differences in peptide substrate specificity were also observed. In general, it looks as if rX/CK1 α is somewhat more promiscuous than liver CK1 in that it is somewhat less responsive to structural changes that greatly affect the liver enzyme. This applies, for example, to the N-terminal D₄ cluster where individual substitutions with Ala are less detrimental with the α isoform than with the liver preparation. Another structural feature that variably affects phosphorylation by either RLCK1 or rX/CK1 α is the basic cluster RRR, which is present in the upstream sequence of the I-2 Ser174 site and which is often added to the peptides derived from the Ser86 site as well to make possible their assay with phosphocellulose paper [35]. This basic cluster, albeit quite remote from the phosphorylatable Ser (upstream from $n-11$) increases the K_m values for peptide substrate phosphorylation by RLCK1 about fivefold while its effect on rX/CK1 α -mediated phosphorylation is less pronounced.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants (to L.A.P.) from the Consiglio Nazionale delle Ricerche (97.03614.PS14 and T.P. on Biotechnology), from Ministero dell'Università e della Ricerca Scientifica e Tecnologica (MURST, PRIN

