

UCH-FC
DOC-15
H668
C.1

**CLONAMIENTO, SECUENCIACION, EXPRESION Y ESTUDIO
FUNCIONAL DE LA SUBUNIDAD β DE LA CK2 DE *Xenopus laevis***

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

MARIA VICTORIA HINRICHS ROSELLO

Agosto de 1995

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



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

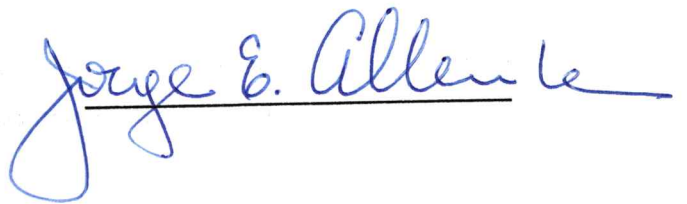
Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la
Tesis de Doctorado presentada por el candidato

MARIA VICTORIA HINRICHS ROSELLO

ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como
requisito de Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención
en Biología, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día
29 de Agosto de 1995.

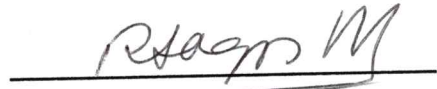
Director de Tesis:

Dr. Jorge E. Allende

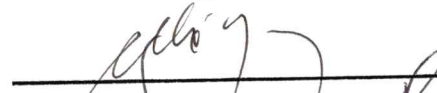


Comisión de Evaluación de la Tesis:

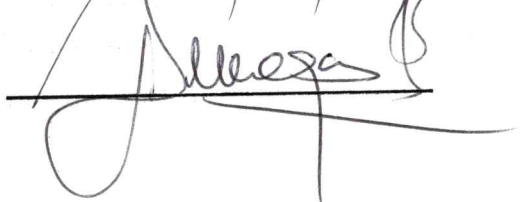
Dra. Rosalba Lagos



Dr. Claudio Vasquez



Dr. Alejandro Venegas



Esta tesis fue realizada en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, División Ciencias Médicas Norte, de la Universidad de Chile, bajo la dirección del Dr. Jorge E. Allende.

A mis padres y hermanos

A mi esposo Juan

A mis hijos Catalina y Juan Luis

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos :

Al Dr. Jorge Allende y a la Dra. Catherine Connelly por haberme dado la oportunidad de trabajar en su Laboratorio y por sus valiosos consejos y enseñanzas, tanto en lo científico como en lo humano.

A todos mis compañeros de trabajo del Laboratorio, en especial a Marta Gatica y Marcelo Antonelli, por su constante colaboración y apoyo.

A Moni Jedlicki por su valiosa amistad, solidaridad y apoyo, que fueron fundamentales para el desarrollo de esta Tesis.

A Juan Olate por su permanente apoyo y comprensión y por su valiosa guía y ayuda en el desarrollo de todas las técnicas de Biología Molecular.

A Erika Johannsen y Monique Forton por su siempre excelente disposición y buena voluntad.

A todos los integrantes del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina Norte, por su compañerismo y amistad.

A la Dra. Rosalba Lagos, al Dr. Claudio Vasquez y al Dr. Alejandro Venegas, por su trabajo y dedicación en la corrección de esta Tesis.

INDICE DE MATERIAS

	pág.
LISTA DE TABLAS.....	xi
LISTA DE ESQUEMAS Y FIGURAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
RESUMEN.....	xvii
SUMMARY.....	xxi
INTRODUCCION.....	1
A.- Características generales de la CK2.....	3
B.- Localización subcelular de la CK2.....	5
C.- Expresión de la CK2 en los distintos tejidos.....	7
D.- Estructura de la subunidad α	7
D.1.- Presencia de tirosina en el subdominio conservado I	8
D.2.- Serie de lisinas entre los subdominios II y III.....	11
D.3.- Presencia de valina en la posición 66 y de triptofano en la posición 176.....	11
D.4.- Agrupación de histidinas en el subdominio VI.....	12
E.- Estructura de la subunidad β	13
E.1.- Sitios de fosforilación.....	14
E.2.- Agrupación de residuos ácidos.....	16
E.3.- Probable presencia de un dedo de Zinc.....	16
E.4.- Región análoga a la caja de destrucción de las ciclinas.....	17
F.- Proteínas sustrato de la CK2.....	17
G.- Regulación de la CK2.....	20
G.1.- Aspectos generales.....	20

G.2.-	Compuestos que afectan la actividad.....	21
G.3.-	Regulación de la actividad bajo distintas condiciones de crecimiento.....	23
G.4.-	Posible existencia de la subunidad α monomérica.....	28
G.5.-	Papel de la subunidad β en la regulación de la CK2.....	30
	OBJETIVOS DE LA TESIS.....	32
	MATERIALES Y METODOS	
A.-	Reactivos y materiales.....	33
A.1.-	Reactivos generales.....	33
A.2.-	Soluciones generales.....	33
A.3.-	Cepas utilizadas.....	34
A.4.-	Genoteca.....	34
A.5.-	Medios de cultivo.....	35
A.6.-	Oligonucleótidos utilizados.....	35
B.-	Métodos	
B.1.-	Electroforesis en geles de agarosa.....	37
B.2.-	Digestión del DNA con enzimas de restricción.....	38
B.3.-	Purificación del DNA por extracción con fenol.....	38
B.4.-	Precipitación del DNA con etanol.....	38
B.5.-	Purificación de fragmentos de DNA por membrana de DEAE.....	39
B.6.-	Desfosforilación de vectores.....	39
B.7.-	Estimación de la concentración de DNA en geles de agarosa.....	40
B.8.-	Ligación de fragmentos de DNA a plásmidos.....	40
B.9.-	Preparación de células competentes para la transformación.....	40
B.10.-	Transformación de bacterias	41
B.11.-	Preparación de DNA plasmidial en pequeña escala.....	41
B.12.-	Preparación de DNA plasmidial en gran escala.....	42
B.13.-	Purificación de DNA monohebra a partir del fago M13.....	44

B.13.1.- Transformación de bacterias TG1 con el vector M13.....	44
B.13.2.- Preparación de DNA monohebra.....	44
B.14.- Purificación del DNA de fagos mediante la técnica del CTAB.....	45
B.14.1.- Infección de bacterias <i>E.coli</i> Y1090 con fagos λ gt10 recombinantes.....	45
B.14.2.- Extracción de fagos.....	45
B.14.3.- Purificación del DNA de los fagos.....	46
B.15.- Secuenciación de DNA de doble hebra.....	46
B.16.- Secuenciación de DNA de hebra simple.....	48
B.17.- Geles de poliacrilamida para analizar reacciones de secuencia.....	48
B.18.- Amplificación de DNA por PCR.....	49
B.19.- Subclonamiento de los fragmentos amplificados por PCR.....	50
B.20.- Marcación de fragmentos de DNA por el método de "random priming".....	50
B.21.- Análisis de la genoteca de cDNA.....	51
B.21.1.- Titulación de la genoteca.....	51
B.21.2.- Infección y transferencia de los fagos a filtros de nitrocelulosa.....	52
B.21.3.- Prehibridación e hibridación.....	53
B.21.4.- Identificación de las placas de lisis positivas.....	54
B.21.5.- Purificación de los fagos positivos.....	54
B.22.- Subclonamiento del gen que codifica para la subunidad β en el vector de expresión pGEX-2T.....	55
B.23.- Expresión de la subunidad β	57
B.24.- Purificación de la proteína de fusión.....	57
B.25.- Tratamiento de la proteína de fusión con trombina.....	58
B.26.- Microsecuenciación de la subunidad β recombinante.....	58
B.27.- Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.....	58
B.28.- Determinación de la concentración de proteínas.....	59

B.29.-	Determinación de la actividad enzimática de la CK2.....	59
B.30.-	Autofosforilación de las subunidades α y β de la CK2.....	59
B.31.-	Estudio de la interacción entre las subunidades α y β por centrifugación en gradiente de sacarosa.....	60
B.32.-	Síntesis de mutantes de la subunidad β	61
B.32.1.-	Lista de genes mutantes de la subunidad β sintetizados.....	61
B.32.2.-	Construcción de las mutantes $\beta S^{2,3} \rightarrow G$, $\beta S^{209} \rightarrow G$ y $\beta \Delta^{179-215}$	62
B.32.3.-	Construcción de las mutantes $\beta P^{58} \rightarrow A$, $\beta P^{58} \rightarrow Y$, $\beta C^{137,140} \rightarrow A$ y $\beta D^{26}, E^{27}, D^{28} \rightarrow A$	64
B.32.4.-	Construcción de las mutantes $\beta H^{151,152,153} \rightarrow A$, $\beta D^{59} E^{60} E^{61} \rightarrow A$, $\beta D^{55} E^{57} D^{59} E^{60} E^{61} \rightarrow A$	66

RESULTADOS

A.-	Clonamiento del gen que codifica para la subunidad β de la CK2 de oocitos de <i>Xenopus laevis</i>	68
A.1.-	Síntesis de un fragmento del gen de la subunidad β para ser utilizado como sonda en el análisis de la genoteca.....	68
A.2.-	Análisis de la genoteca.....	70
A.3.-	Purificación y análisis del DNA de los fagos recombinantes aislados.....	72
A.4.-	Secuenciación del fragmento de DNA del fago recombinante aislado.....	72
B.-	Expresión y purificación de la subunidad β	77
B.1.-	Subclonamiento del gen de la subunidad β en el vector de expresión pGEX-2T.....	77
B.2.-	Expresión de la proteína de fusión glutación-S-transferasa subunidad β	78

B.3.-	Purificación de la proteína de fusión y digestión con trombina.....	81
B.4.-	Microsecuenciación de la subunidad β	84
C.-	Estudio funcional de la subunidad β recombinante.....	84
C.1.-	Activación de la subunidad α por la subunidad β	84
C.2.-	Autofosforilación de las subunidades α y β y efecto de polilisina y heparina.....	86
D.-	Estudio de mutantes de la subunidad β	89
D.1.-	Síntesis y expresión de las subunidades β mutantes.....	92
D.2.-	Estimulación de la subunidad α por las distintas proteínas mutantes de la subunidad β	92
D.3.-	Estudio comparativo de la estimulación de la subunidad α silvestre y de la subunidad $\alpha K^{75,76} \rightarrow E$ por diferentes proteínas mutantes de la subunidad β	97
D.4.-	Estudio de la autofosforilación de la subunidad α y de las subunidades β mutantes.....	99
D.5.-	Estudio del efecto protector de las subunidades β silvestre y mutantes sobre la inactivación térmica de la subunidad α	103
D.6.-	Estudio de la interacción entre la subunidad α y las subunidades β mutantes por sedimentación en gradientes de sacarosa.....	105
D.7.-	Inhibición por heparina de la subunidad α monomérica y reconstituída con diferentes proteínas mutantes de la subunidad β	107
D.8.-	Inhibición por el copolímero glutámico-tirosina (4:1) de la subunidad α monomérica y de la holoenzima reconstituída con diversas proteínas mutantes de la subunidad β	109
D.9.-	Resumen de las propiedades de las proteínas mutantes de las subunidades β	111

DISCUSION

A.-	Aislamiento del gen que codifica para la subunidad β	115
B.-	Expresión y purificación de la subunidad β	115
C.-	Reconstitución de la holoenzima a partir de las subunidades recombinantes purificadas.....	117
D.-	Estudio de las diversas proteínas mutantes de la subunidad β	118
D.1.-	Efecto de las proteínas mutantes sobre la estimulación de la actividad de la subunidad α	118
D.2.-	Estudio comparativo de la estimulación producida por las diversas proteínas mutantes de la subunidad β sobre la subunidad α silvestre y la mutante α K ^{75,76} \rightarrow E.....	121
D.3.-	Importancia del extremo carboxilo terminal en la interacción de la subunidad β con la subunidad α	122
D.4.-	Estudio de la autofosforilación de las subunidades α y β mutantes.....	124
D.5.-	Efecto protector de las subunidades β mutantes sobre la inactivación térmica de la subunidad α	129
D.6.-	Efecto de heparina sobre la actividad de la subunidad α monomérica y reconstituída con diferentes subunidades β mutantes.....	130
D.7.-	Influencia de la subunidad β silvestre y mutantes en el reconocimiento del copolímero poli glu-tir.....	131
E.-	Perspectivas futuras.....	134
	CONCLUSIONES.....	137
	BIBLIOGRAFIA.....	139

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. Efecto de la subunidad β recombinante y de la proteína de fusión glutatión transferasa-subunidad β sobre la actividad de la subunidad α	85
TABLA 2. Rendimiento de la subunidad β silvestre y de las diferentes subunidades β mutantes.....	93
TABLA 3. Cuadro resumen de las propiedades de la subunidad α monomérica y de las holoenzimas reconstituídas con la subunidad β silvestre y con las subunidades β mutantes.....	114

LISTA DE ESQUEMAS Y FIGURAS

Esquema 1 : Subclonamiento del gen de la subunidad β en el vector PGEX.....	56
Esquema 2 : Síntesis de la mutante β S ^{2,3} \rightarrow G mediante amplificación por PCR.....	62
Esquema 3 : Síntesis de la mutante β S ²⁰⁹ \rightarrow G mediante amplificación por PCR.....	63
Esquema 4 : Síntesis de la mutante β Δ ¹⁷⁹⁻²¹⁵ mediante amplificación por PCR.....	63
Esquema 5 : Síntesis de las mutantes β P ⁵⁸ \rightarrow A, β P ⁵⁸ \rightarrow Y, β C ^{137,140} \rightarrow A y β D ²⁶ E ²⁷ D ²⁸ \rightarrow A de acuerdo al método del megapartidor.....	64
Esquema 6 : Síntesis de las mutantes β H ^{151,152,153} \rightarrow A, β D ⁵⁹ E ⁶⁰ E ⁶¹ \rightarrow A y β D ⁵⁵ E ⁵⁷ D ⁵⁹ E ⁶⁰ E ⁶¹ \rightarrow A, mediante el método de extensión de fragmentos sobrepuestos.....	66
Figura 1 : Comparación de las secuencias aminoacídicas de las subunidades α de la CK2 de distintas especies.....	9
Figura 2 : Secuencia aminoacídica de la subunidad α de la CK2 de <i>Xenopus laevis</i> , en la cual se indican los residuos o regiones que presentan ciertas características relevantes	10
Figura 3 : Secuencia aminoacídica de la subunidad β de la CK2 de <i>Xenopus laevis</i> , en la cual se indican los residuos o regiones que presentan ciertas características importantes.....	15
Figura 4 : Análisis en gel de Nusieve agarosa de los fragmentos del gen de la subunidad β de <i>Xenopus laevis</i> y <i>Drosophila</i> amplificados por PCR.....	69

Figura 5	: Análisis de la genoteca de cDNA de oocitos de <i>Xenopus laevis</i>	71
Figura 6	: Análisis en gel de agarosa del DNA de los fagos aislados de la genoteca y digeridos con EcoR I.....	73
Figura 7	: Secuencia nucleotídica y aminoacídica del gen de la subunidad β de la CK2 de <i>Xenopus laevis</i>	75
Figura 8	: Comparación de las secuencias aminoacídicas de las subunidades β de la CK2 de diversas especies.....	76
Figura 9	: Determinación de la orientación del gen de la subunidad β en el vector pGEX-2T por análisis en gel de agarosa del DNA digerido con BamH I y Pst I.....	79
Figura 10	: Análisis en gel de poliacrilamida de las proteínas expresadas en <i>Escherichia coli</i> a partir del vector pGEX-2T.....	80
Figura 11	: Cinética de inducción de la proteína de fusión glutatión transferasa-subunidad β en <i>Escherichia coli</i>	82
Figura 12	: Análisis en gel de poliacrilamida de la proteína de fusión glutatión transferasa-subunidad β expresada en <i>E. coli</i> y purificada por glutatión agarosa y de la subunidad β obtenida de la proteína de fusión digerida con trombina.....	83
Figura 13	: Curva de estimulación de la actividad de la subunidad α por cantidades crecientes de la subunidad β recombinante.....	87
Figura 14	: Autofosforilación de las subunidades α y β y efecto de heparina y polilisina en su fosforilación.....	88
Figura 15	: Esquema de las diferentes mutaciones introducidas en el gen de la subunidad β de la CK2.....	91

Figura 16	:Estimulación de la subunidad α por la subunidad β silvestre y diferentes proteínas mutantes de la subunidad β	94
Figura 17	:Curva de estimulación de la actividad de la subunidad α por la subunidad $\beta\Delta^{179-215}$	98
Figura 18	:Comparación de la estimulación de la subunidad α silvestre y de la mutante $\alpha K^{75,76} \rightarrow E$ por diversas proteínas mutantes de la subunidad β	100
Figura 19	:Estudio de la autofosforilación de las subunidades α y β silvestre y mutantes.....	102
Figura 20	:Efecto de la subunidad β silvestre y de las distintas proteínas mutantes en la protección de la actividad de la subunidad α frente a la inactivación térmica.....	104
Figura 21	:Análisis por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa de la interacción entre la subunidad α y la subunidad β silvestre y las distintas proteínas mutantes.....	106
Figura 22	:Inhibición por heparina de la subunidad α monomérica y reconstituída con la subunidad β silvestre y las diferentes mutantes.....	108
Figura 23	:Efecto del polímero poli glu-tyr en proporción 4:1 sobre la subunidad α monomérica y reconstituída con la subunidad β silvestre y las diferentes proteínas mutantes.....	110

LISTA DE ABREVIATURAS

- ATP : adenosina 5'-trifosfato
- BSA : seroalbúmina de bovino
- cAMP : adenosina 3'- 5'- monofosfato cíclico
- CIP : fosfatasa alcalina de intestino de ternero
- CK 2 : serina / treonina proteína quinasa
- cpm : cuentas por minuto
- CTAB : bromuro de cetyl-trimetilamonio
- dATP : desoxiadenosinatrifosfato
- dCTP : desoxicitosinatrifosfato
- dGTP : desoxiguanosinatrifosfato
- dTTP : desoxitimidinatrifosfato
- DEAE : dietilaminoetil
- DO : densidad óptica
- DTT : ditioneitol
- EDTA : ácido etilendiaminotetraacético
- EGF : factor de crecimiento epidérmico
- EGTA : ácido etilenglicol-bis-(β-amino etiléter) N'N'- tetraacético
- GTP : guanosina 5'-trifosfato
- Hepes : ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
- IPTG : isopropiltio-β-D-galactósido
- MAP : proteína asociada a microtúbulos
- MEK : proteína quinasa que fosforila en treonina y tirosina a la MAP
quinasa
- pb : pares de bases
- PCR : reacción de polimerización en cadena
- PEG : polietilenglicol

PKA : proteína quinasa dependiente de AMP cíclico
PNK : polinucleótido quinasa
SDS : dodecil sulfato de sodio
TCA : ácido tricloroacético
Tris : ácido tris-(hidroximetil)-aminometano

RESUMEN

La CK2 es una serina/treonina proteína quinasa que se encuentra ampliamente distribuída tanto en el núcleo como en el citoplasma de todas las células eucarióticas. Esta quinasa presenta una estructura tetramérica y está compuesta por dos subunidades catalíticas α y α' y dos subunidades β , cuya función es supuestamente reguladora. En los últimos diez años la CK2 ha despertado un gran interés, ya que se ha visto que los niveles de actividad de esta enzima se encuentran elevados en células en activa proliferación o en aquellas inducidas a diferenciarse. Además, ha podido observarse que la actividad de esta quinasa se incrementa en respuesta al tratamiento con hormonas o agentes mitogénicos.

Otro hecho que indica que la CK2 podría estar jugando un papel regulador muy importante en la célula es la gran cantidad de proteínas que han sido descritas que son fosforiladas por esta quinasa. En la actualidad, éstas suman más de cien y muchas de las cuales están involucradas en el control de la división celular o en los procesos de transducción de señales.

A pesar que esta enzima fue descubierta hace 40 años, aún no se conoce su mecanismo de regulación ni se ha podido encontrar ningún compuesto fisiológico que module su actividad. Se sabe que *in vitro*, esta enzima es inhibida por compuestos de naturaleza aniónica como son la heparina, el ácido 2,3 difosfoglicérico, los polipéptidos de ácido glutámico y ácido aspártico y los ácidos nucleicos. Los compuestos de naturaleza catiónica por el contrario, como espermina, espermidina o polilisina son activadores

de la enzima. Debido a la interacción principalmente iónica que esta quinasa presenta con sus sustratos proteicos e inhibidores, su actividad es muy dependiente de la fuerza iónica. La holoenzima requiere concentraciones de sal entre 100 y 150 mM para su actividad óptima y concentraciones más bajas o más altas la inhiben. La otra propiedad que caracteriza a esta quinasa, es que puede utilizar tanto GTP como ATP como sustrato dador de fosforilo.

Hasta hace muy poco tiempo no fue posible estudiar las subunidades de esta proteína quinasa en forma aislada, ya que la holoenzima no se puede disociar *in vitro* bajo condiciones que no impliquen una desnaturación de la proteína. Debido a ello, la única forma de poder obtener las subunidades aisladas en su conformación nativa, es expresando los genes de cada una de ellas en forma separada.

Por lo tanto, para llevar a cabo el objetivo central de esta tesis, que es el de estudiar la función que está desempeñando la subunidad β en la CK2, fue necesario aislar el gen que codifica para esta subunidad y luego expresarlo en bacterias. Debido a que la subunidad β se obtuvo fusionada a la glutatión transferasa, esta proteína fue muy fácil de purificar por cromatografía en glutatión-agarosa y luego, digiriendo la proteína de fusión con trombina, se obtuvo la subunidad β con un alto grado de pureza y libre de glutatión transferasa.

Al incubar la subunidad β recombinante en presencia de la subunidad α se reconstituyó la holoenzima tetramérica, lo cual se vio reflejado en un aumento de la actividad de alrededor de 5 veces. La máxima estimulación se obtuvo cuando se alcanzó una relación estequiométrica entre ambas subunidades de aproximadamente 1, lo que refleja una alta afinidad entre ellas.

Además de estimular la actividad de la subunidad α , la subunidad β modificó el comportamiento de la subunidad α monomérica en los siguientes aspectos : 1) aumentó la estabilidad de la actividad catalítica frente a la inactivación térmica; 2) aumentó la sensibilidad de la enzima frente al inhibidor poli glu-tyr (4:1); 3) aumentó el grado de autofosforilación de la subunidad α y 4) modificó el coeficiente de sedimentación de la enzima.

Para estudiar la relación entre la estructura y función de la subunidad β , se procedió a sintetizar una serie de genes mutantes de esta proteína, los cuales se detallan a continuación : β $S^{2,3} \rightarrow G$: subunidad β mutante, a la cual se le sustituyeron las serinas 2 y 3 por glicina, para identificar el sitio de autofosforilación y estudiar su función en la CK2; β $S^{209} \rightarrow G$: subunidad β mutante, a la cual se le sustituyó la serina 209 por glicina, para estudiar la función de la fosforilación catalizada por la cdc2 quinasa; β $\Delta^{179-215}$: subunidad β delecionada en 37 aminoácidos en su extremo carboxilo terminal, para estudiar función de esta región tanto en la interacción con la subunidad α como en la activación de ella; β $H^{151, 152, 153} \rightarrow A$: subunidad β , a la cual se le sustituyeron las histidinas 151, 152 y 153 por alanina, para estudiar si esta agrupación inusual de histidinas tiene alguna función en las propiedades de la subunidad β ; β $C^{137, 140} \rightarrow A$: subunidad β , a la cual se le sustituyeron las cisteínas 137 y 140 por alanina, para estudiar si estos residuos tienen una participación importante en la estructura terciaria de esta proteína, ya que estos dos residuos junto con las cisteínas 109 y 114 podrían estar constituyendo un dedo de unión a metales; β $D^{26}E^{27}D^{28} \rightarrow A$: subunidad β , a la cual se le sustituyeron los aspárticos 26 y 28 y el glutámico 27 por alanina, para estudiar si la agrupación de estos residuos ácidos afecta de alguna manera la capacidad de la subunidad β de asociarse con la subunidad α y

estimular su actividad; β D⁵⁹E⁶⁰E⁶¹ \rightarrow A : subunidad β , a la cual se le sustituyeron el aspártico 59 y los glutámicos 60 y 61 por alanina, para estudiar si estos residuos ubicados dentro de la región hiperacídica de la subunidad β tienen alguna función en esta proteína; β D⁵⁵E⁵⁷D⁵⁹E⁶⁰E⁶¹ \rightarrow A : subunidad β , a la cual se le sustituyeron los aspárticos 55 y 59 y los glutámicos 57, 60 y 61 por alanina, por la misma razón que la mutante anterior; β P⁵⁸ \rightarrow A : subunidad β , a la cual se le sustituyó la prolina 58 (que se encuentra ubicada en el centro de la región hiperacídica) por alanina, para estudiar si este residuo participa en la función atenuadora de la actividad que presenta la región hiperacídica de la subunidad β ; β P⁵⁸ \rightarrow Y : subunidad β , a la cual se le sustituyó la prolina 58 (que se encuentra ubicada en el centro de la región hiperacídica) por tirosina, para estudiar si la introducción de este residuo en la región hiperacídica produce algún efecto en la función atenuadora de la actividad que presenta esta proteína.

De los estudios realizados con estas proteínas mutantes se pudo obtener las siguientes conclusiones : 1) que las serinas 2 y 3 de la subunidad β constituyen el único sitio de autofosforilación de esta proteína; 2) que la autofosforilación de la subunidad β no influye en su interacción con la subunidad α , ni tampoco modifica el grado de estimulación de la actividad de ella; 3) que el extremo carboxilo terminal de la subunidad β tiene una participación importante en la interacción con la subunidad α ; 4) que la región hiperacídica de la subunidad β comprendida entre los residuos 55 y 64, tiene una función atenuadora de la actividad de la CK2; 5) que la prolina 58, ubicada dentro de la región hiperacídica de la subunidad β , tiene también una participación importante (probablemente otorgándole la conformación adecuada) en el efecto atenuador que este segmento produce sobre la actividad de la enzima.

SUMMARY

CK2 is a widely distributed protein serine/threonine kinase that is present in the nucleus and cytoplasm of all eukaryotic cells. The holoenzyme has a tetrameric structure, with two α and α' catalytic subunits and two presumably regulatory β subunits. In the last ten years the popularity of this protein kinase has been increasing, and numerous reports appeared in the literature that indicate that cells that have been induced to differentiate or are actively proliferating contain increased levels of CK2. It has also been shown significant enhancements in CK2 activity in response to hormones or mitogenic factors treatments.

The increasing number of protein substrates that have been described, many of which are involved in the control of cell division and signal transduction, are also an indicator that CK2 is playing an important role in the cell.

Despite the fact that this enzyme was discovered 40 years ago, the mechanisms that regulate its activity under physiological conditions continue to be a puzzle. It is well known, that *in vitro* polyanionic compounds like heparine, 2,3-biphosphoglycerate, peptides rich in glutamic or aspartic acid and nucleic acids are inhibitory to CK2. Polycationic compounds on the other hand, like spermine, spermidine and polylysine are activators of the enzyme.

The CK2 holoenzyme's activity is very sensitive to ionic strength, it requires salt concentrations between 100 and 150 mM for its optimal activity and higher or lower concentrations inhibit its activity. Another

unusual feature of this kinase, is that it can use both ATP and GTP as phosphoryl donors.

Since the holoenzyme can not be dissociated *in vitro* under non denaturing conditions, it was not possible until recently to study the isolated subunits. Now this problem has been overcome by expressing both subunits separately, as recombinant proteins.

In order to study the role of the β subunit in the CK2, we have cloned the gene that encodes this subunit in order to induce expression of the protein in bacteria. Since the β subunit was obtained as a fusion protein with the glutathione-S-transferase, the recombinant protein was very easily purified by glutathione agarose chromatography. Removal of the glutathione transferase moiety was achieved by thrombin digestion and glutathione agarose recromatography.

When the β subunit was incubated in the presence of the α subunit, the holoenzyme was reconstituted and the catalytic activity increased 5-fold. Maximal stimulation was achieved when stoichiometric amounts of both subunits were added, indicating high affinity between them.

In addition to the stimulatory effect on the enzymatic activity, the β subunit modified the monomeric α subunit in the following aspects: 1) it increased the thermal stability of the enzyme; 2) it enhanced the inhibitory capacity of the copolymer poly glu-tyr (4:1); 3) it enhanced the α subunit autophosphorylation several fold and 4) it modified the sedimentation coefficient of the enzyme.

In order to study the β subunit structure-function relationship, the following protein mutants were created : β S^{2,3} \rightarrow G : serines 2 and 3 were mutated to glycine. To identify the β subunit autophosphorylation site and to study its effect in the CK2 activity and subunit interaction; β S²⁰⁹ \rightarrow G : serine 209 was mutated to glycine, to study the effect of the β subunit cdc2

phosphorylation site; $\beta \Delta^{179-215}$: 37 amino acids were deleted in the carboxy terminal end, to study the role of this region in the α subunit activation or interaction; $\beta H^{151, 152, 153} \rightarrow A$: histidines 151, 152 and 153 were mutated to alanine, to study if this unusual histidine cluster has a role in the β subunit ; $\beta C^{137, 140} \rightarrow A$: cysteins 137 and 140 were mutated to alanine, to study if this residues are constituting a Zinc finger and if they have any effect in the β subunit properties or interactions; $\beta D^{26}E^{27}D^{28} \rightarrow A$: aspartics 26 and 28 and glutamic 27 were mutated to alanine, to study if this acidic cluster is important in the β subunit; $\beta D^{59}E^{60}E^{61} \rightarrow A$: aspartic 59 and glutamics 60 and 61 were mutated to alanine, to study if these residues located in the β subunit's hyperacidic region have an important role; $\beta D^{55}E^{57}D^{59}E^{60}E^{61} \rightarrow A$: aspartics 55 and 59 and glutamics 57, 60 and 61 were mutated to alanine for the same reason mentioned above; $\beta P^{58} \rightarrow A$: proline 58 (that is located in the center of the hyperacidic region) was mutated to alanine, to study if this residue participates in the effect produced by the hyperacidic region; $\beta P^{58} \rightarrow Y$: proline 58 was mutated to tyrosine, to study if the introduction of this residue in the hyperacidic region modifies the effect produced by this region.

From the studies that have been carried out with this mutants, one can conclude that :1) serines 2 and 3 constitute the only autophosphorylation sites of the β subunit; 2) the β subunit autophosphorylation does not modify its interaction with the α subunit and its stimulation level; 3) the β subunit carboxy terminal end is involved in the binding of β to the α subunit; 4) the β subunit hyperacidic region has an important role in dampening the CK2 α catalytic activity and 5) proline 58 also has an important role in dampening the CK2 activity.

INTRODUCCION

La fosforilación y desfosforilación de proteínas constituye un mecanismo de regulación muy importante en una gran variedad de procesos celulares, tales como la transducción de señales inducidas por hormonas y factores de crecimiento y la regulación de la proliferación y diferenciación celular. Durante el ciclo celular también se ha visto, que ocurre un cambio muy importante en el grado de fosforilación de muchas proteínas nucleares que es responsable de diversos fenómenos que ocurren durante la mitosis, como por ejemplo, la ruptura de la membrana nuclear, la condensación de la cromatina y la formación del huso mitótico.

Por este motivo es que en los últimos años, el número de proteína quinasas identificadas ha aumentado enormemente, llegando a constituir una familia de más de doscientos miembros. Hanks y cols. en 1988 y Hanks y Quinn en 1991, han realizado una recopilación de todas las secuencias de las proteína quinasas que han sido publicadas y las han clasificado en dos grandes subfamilias : las serina-treonina quinasas y las tirosina quinasas.

Al efectuar un estudio comparativo de todas las secuencias aminoacídicas de estas proteínas, estos autores encontraron doce regiones conservadas que constituyen el dominio catalítico de las proteína quinasas y que está constituido por 250 a 300 aminoácidos. Mediante alineamiento de secuencias, ellos además construyeron un árbol filogenético de los dominios catalíticos de todas las quinasas y las agruparon en distintas

subfamilias de acuerdo a la similitud que éstas presentaban (Hanks y Quinn, 1991).

Dentro de la gran familia de las serina-treonina quinasas se encuentran la caseínaquinasa I y II que tienen propiedades y secuencias diferentes, pero que presentan una característica común, que es la de tener especificidad para fosforilar serinas o treoninas circundadas por residuos ácidos. Debido a ello, es que para ambas quinasas, la caseína resulta ser un muy buen sustrato y es el origen de su nombre. Los números I y II que las diferencian se deben a la posición en que eluyen al cromatografiarlas en una columna de DEAE celulosa. Recientemente, se ha decidido cambiarles el nombre a estas quinasas por el de CK1 y CK2, debido a que lo anterior inducía a confusión, ya que ninguna de estas enzimas fosforila en forma fisiológica a la caseína. Cabe hacer notar, que a pesar de tener estas dos quinasas un nombre relacionado y sustratos de características parecidas, no pertenecen a la misma familia de acuerdo al estudio filogenético realizado por Hanks y Quinn. De acuerdo al mismo estudio, la CK2 estaría más relacionada con la glicógeno sintetasa quinasa 3 (GSK3), con las quinasas dependientes de ciclinas (cdk) y con las MAP quinasas, mientras que la CK1 conformaría una rama del árbol filogenético diferente al de las otras quinasas conocidas (Hanks y Quinn, 1991).

El hecho que la CK2 se encuentre relacionada con las cdk quinasas y con las MAP quinasas es muy interesante, ya que durante los últimos años han ido acumulándose cada vez más evidencias que relacionan a la CK2 con los procesos de proliferación y diferenciación celular. Recientemente incluso se ha descrito a la subunidad α de la CK2 como un protooncogen, ya que su expresión desregulada es capaz de inducir, en combinación con c-myc, transformación en linfocitos (Seldin y cols., 1995).

A.- Características generales de la CK2

La CK2 es una proteína quinasa que se encuentra ampliamente distribuída en todas las células eucarióticas, desde las levaduras hasta el hombre, y su secuencia es extraordinariamente conservada en todas las especies. En estudios realizados en levaduras también se ha visto que la actividad de esta quinasa es indispensable para la viabilidad de las células (Padmanabha y cols., 1990).

La especificidad que presenta esta enzima es la de fosforilar residuos de serina y treonina que se encuentran situados hacia el lado amino terminal de aminoácidos ácidos como ácido glutámico y ácido aspártico (los cuales también pueden ser reemplazados por fosfoserina, fosfotreonina o fosfotirosina). La secuencia mínima de fosforilación que se ha establecido es **S/T X X D/E**, en la cual la presencia de un residuo ácido en la tercera posición hacia el lado carboxilo terminal con respecto a la serina o treonina fosforilable es un requisito indispensable.

La CK2, que ha sido purificada desde una gran variedad de organismos, presenta una estructura tetramérica con un peso molecular de 130 a 140 kDa y está formada por dos subunidades α o α' y por dos subunidades β . La holoenzima tetramérica puede adoptar la estructura general de $\alpha_2\beta_2$ o $\alpha\alpha'\beta_2$. Las subunidades α y α' tienen un tamaño de 42 y 38 kDa, respectivamente y son las subunidades catalíticas. Ambas proteínas presentan similitud con las demás proteína quinasas y aunque son estructuralmente muy parecidas, se encuentran codificadas por genes diferentes (Padmanabha y Glover, 1987; Litchfield y cols., 1990; Lozeman y cols., 1990). Sólo en algunas especies ha podido identificarse α' y en los limitados estudios realizados con esta proteína recombinante (Bodenbach y cols., 1994; Antonelli, comunicación personal) no se han encontrado diferencias importantes entre las propiedades catalíticas de

ambas subunidades. En levaduras basta con la expresión de sólo uno de los genes de α o α' para poder rescatar las células doble mutantes no viables (Padmanabha y cols., 1990).

La subunidad β , que es más pequeña (alrededor de 25 kDa), no posee actividad catalítica, pero cuando se combina con la subunidad α estimula la actividad de ésta entre 5 y 10 veces. Además, se ha visto que β protege a α de la inactivación térmica, y en algunos casos β puede incluso cambiar la especificidad de interacción con algunos sustratos e inhibidores (Meggio y cols., 1992a).

La CK2 presenta además una característica poco usual dentro de las proteína quinasas, que es la de poder utilizar tanto GTP como ATP como nucleótido donante de fosforilo. Esta propiedad es usada como uno de los criterios para determinar su actividad en extractos celulares. La cdc2 quinasa y la tirosina quinasa soluble src también son capaces de utilizar ambos nucleótidos (Hunter y Cooper, 1985), pero hasta el momento no se ha podido determinar que aminoácidos o que región de estas proteínas serían las responsables de conferirle la propiedad de utilizar GTP.

Otra propiedad que caracteriza a la CK2 es su dependencia con respecto a la concentración de sal. A baja fuerza iónica, se produce una agregación e inactivación de la enzima, la cual es revertida si se aumenta la concentración de sal (Glover, 1986). La concentración óptima de sal para la holoenzima es de 0,1 a 0,2 M de NaCl o KCl, produciéndose una disminución de la actividad a concentraciones más altas. La subunidad α monomérica sin embargo, no requiere de sal para su actividad óptima y concentraciones mayores a 0,1 M de NaCl la inhiben.

La CK2, además de necesitar una alta concentración de sal para su actividad, requiere también de ión Mg^{2+} . La concentración óptima de Mg^{2+} es entre 5 a 15 mM. A mayores concentraciones la actividad también

disminuye. Se ha visto que los metales Mn^{2+} y Co^{2+} pueden sustituir al Mg^{2+} , aunque son mucho menos efectivos (con Mn^{2+} se obtiene un 30% de la actividad con respecto a con Mg^{2+} y con Co^{2+} un 10%) (Gatica y cols., 1993).

B.- Localización subcelular de la CK2

Respecto a la localización intracelular de la CK2 hay bastantes discrepancias. Basándose en estudios de fraccionamiento celular, hay investigadores que postulan que esta quinasa tendría una localización predominantemente citoplasmática (Singh y Huang, 1985; Goueli y cols., 1986a; Kandror y cols., 1989; Girault y cols., 1990). Otros en cambio, encuentran que ésta se ubicaría principalmente en el núcleo (Thornburg y cols., 1979; Hathaway y Traugh, 1982; Goueli y cols., 1986b; Caizergues-Ferrer y cols., 1987; Filhol y cols., 1990).

Mediante estudios inmunohistoquímicos, que tienen la ventaja de no tener los problemas de contaminación que se tienen con los de fraccionamiento celular, también los resultados han sido confusos. Pfaff y Anderer (1988) y Belenguer y cols. (1989) encontraron que la CK2 se encontraba asociada al nucleólo. En cambio, otros autores describieron que ésta se encontraba distribuída entre el núcleo y el citoplasma (Schneider y Issinger, 1989; Filhol y cols., 1990a). Por otro lado, Yu y cols. (1991) encontraron que esta enzima se localizaba casi exclusivamente en el citoplasma.

Recientemente, en un estudio inmunohistoquímico muy cuidadoso realizado por Krek y cols. (1992), se encontró que las tres subunidades α , α' y β se localizaban predominantemente en el núcleo. Por otro lado, si consideramos que la gran mayoría de los sustratos descritos para la CK2 son de origen nuclear, entonces es muy probable que ésta se localice en el núcleo (o por lo menos una fracción de ella).

Otra posibilidad que ha sido postulada por algunos autores es que la distribución de la CK2 sea regulada y su localización dependa del grado de proliferación celular en que se encuentren las células. Se ha visto por ejemplo que al agregar suero a células en reposo se produce una redistribución nuclear de la CK2 endógena (Gauthier-Rouviere y cols., 1991). Por otro lado Belenguer y cols. (1989) vieron que en células endoteliales de aorta, la localización de la CK2 en el núcleo se correlacionaba con el crecimiento celular y con la transcripción del DNA ribosomal. En células confluentes en cambio, la proteína quinasa no pudo ser detectada en el núcleo. También se ha visto que en cultivos de células de neuroblastoma de ratón (N115), la CK2 se localiza principalmente en el núcleo, mientras que en células diferenciadas de neuroblastoma ésta se encuentra en el citoplasma (Serrano y cols., 1989).

Estudios realizados en nuestro laboratorio, en que se ha medido la actividad enzimática en núcleos y en extractos totales de oocitos, indican que aproximadamente el 20% de la enzima activa estaría en los núcleos de los oocitos (Wilhelm, comunicación personal).

Respecto al problema de como las subunidades podrían entrar al núcleo no se sabe nada, pero es interesante el hecho que existan tanto en la subunidad α como en la subunidad β secuencias que podrían corresponder a señales de localización nuclear ($^{175}\text{RPKRP}^{179}$ en la subunidad β y $^{71}\text{KPVKKKKIKR}^{80}$ en la subunidad α) y que podrían estar participando en la importación de estas proteínas al núcleo (Rihs y cols., 1991).

Expresión de la CK2 en los distintos tejidos

La expresión de las subunidades α , α' y β de pollo fue estudiada en una gran cantidad de tejidos por Maridor y cols. (1991). En este estudio ellos encontraron que los mRNA de estas subunidades eran mucho más abundantes en ciertos tejidos que en otros, encontrando diferencias de hasta 10 veces entre ellos. También se vio que en la mayor parte de los tejidos predomina la expresión de una de las dos subunidades catalíticas, encontrándose en bazo y corazón altos niveles de α y bajos de α' y en hígado, cerebro y ovario lo contrario. La expresión de β con respecto a $\alpha + \alpha'$ no se encontró que estuviera balanceada y se observaron diferencias de hasta 10 veces en la razón de $\beta/\alpha+\alpha'$ en los distintos tejidos estudiados. Este hecho no es sorprendente, ya que se sabe que los genes que codifican para estas subunidades se encuentran en cromosomas diferentes y por lo tanto es probable que su expresión no sea regulada en forma común. Por otro lado también hay que tener en cuenta que las diferencias observadas a nivel de RNA mensajero no necesariamente reflejan las mismas diferencias en los niveles de proteína en la célula.

Con respecto a los niveles de proteína observados en los diferentes tejidos, se han visto ciertas discrepancias entre los distintos estudios realizados. En general, se ha visto que existen grandes diferencias en los niveles de actividad de la enzima en los distintos tejidos, encontrándose los niveles más altos en cerebro y testículo (Yutani y cols., 1982; Singh y Huang, 1985; Giraulty cols., 1990).

D.- Estructura de la subunidad α

La secuencia aminoacídica completa de la subunidad α ha sido deducida de los respectivos cDNA que han sido aislados de las genotecas de

Drosophila (Saxena y cols., 1987), levadura (Wu y cols., 1988), *Dictyostelium discoideum* (Kikkawa y cols., 1992) *Caenorhabditis elegans* (Hu y Rubin, 1990a), *Xenopus laevis* (Jedlicki y cols., 1992), pollo (Maridor y cols., 1991) y humana (Meisner y cols., 1989; Lozeman y cols., 1990). Al comparar las secuencias aminoacídicas entre las distintas especies, se puede observar que existe una gran similitud entre ellas (ver **Figura 1**). Entre *Drosophila* y humano hay una similitud de un 90% y entre *Xenopus laevis* y humano la similitud es mayor al 90%, encontrándose la mayoría de las diferencias concentradas en el extremo carboxilo terminal de la proteína (Jedlicki y cols., 1992).

Al comparar la secuencia de la subunidad α de la CK2 con respecto a las demás proteína quinasas podemos distinguir ciertos elementos que llaman la atención (ver **Figura 2**). A continuación se describen algunos de ellos.

D.1.- Presencia de tirosina en el subdominio conservado I

Esta región participa en la unión del sustrato nucleotídico en todas las quinasas y presenta la secuencia característica **G X G X X G/S X V**. En la gran mayoría de las quinasas el residuo situado en la quinta posición de esta secuencia es una fenilalanina, en cambio en la CK2 y en la familia de las cdk quinasas este residuo es una tirosina. Esta tirosina es muy importante en las quinasas dependientes de ciclinas, ya que es fosforilada por la proteína quinasa "wee" (junto con una treonina que la precede) lo que hace que permanezca inhibida la actividad de esta enzima (Gould y Nurse, 1989). La presencia de esta tirosina en la CK2 pone de manifiesto la cercanía evolutiva que existe entre estas dos subfamilias de quinasas, pero hasta el momento no se ha visto que la CK2 pueda ser fosforilada en esta tirosina.

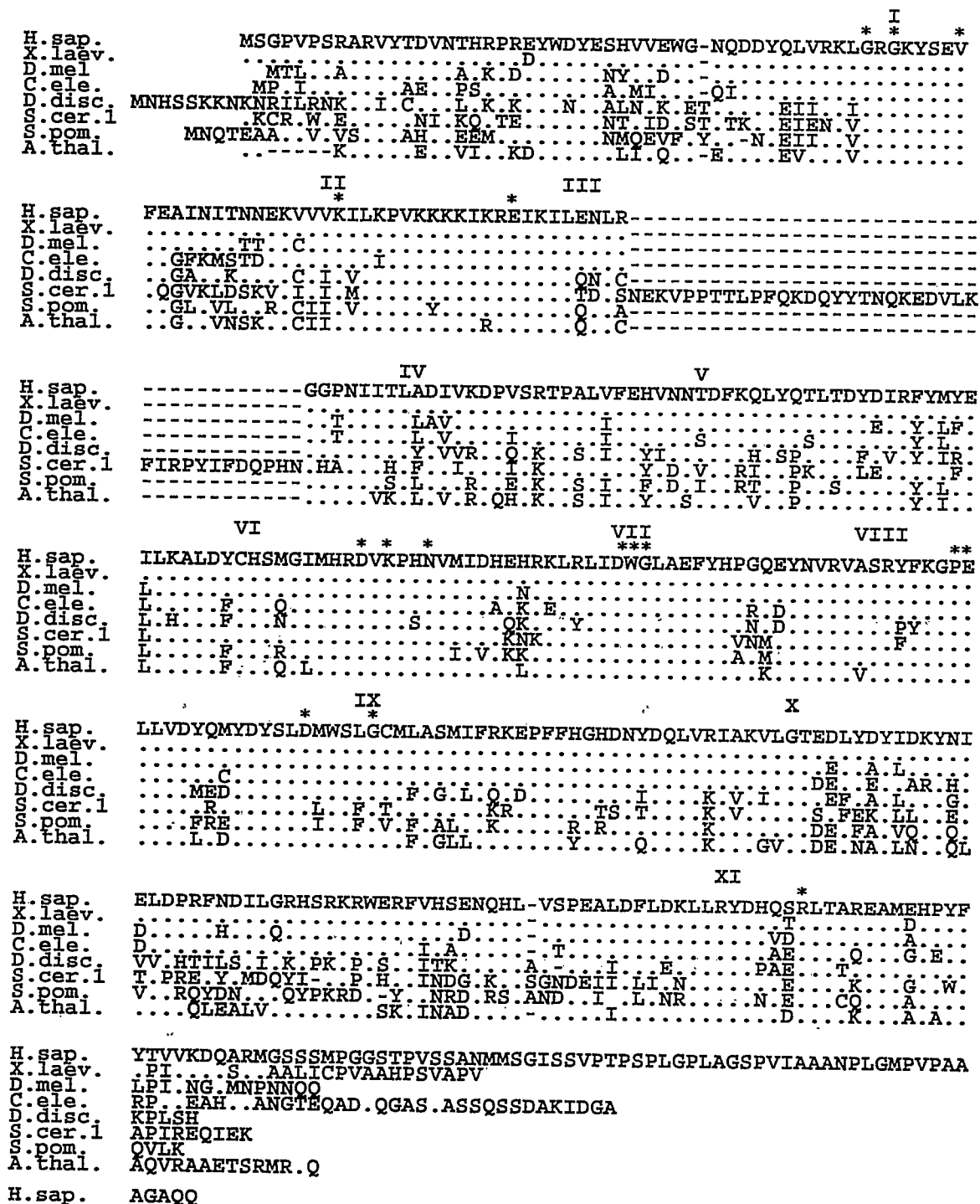


Figura 1 : Comparación de las secuencias aminoacídicas de las subunidades α de la CK2 de distintas especies.

Los números romanos indican los subdominios conservados en todas las proteína quinasa, y los asteriscos indican los aminoácidos que son conservados en más del 95% de las quinasa (Hanks y cols.,1988). El símbolo "-" indica ausencia de aminoácidos para maximizar el alineamiento de las secuencias.

M S G P V P S R A R V Y T D V N T H R P R D Y
 W D Y E S H V V E W G N Q D D ^F Y Q L V R K L G
 R G K Y S E V F E A I N I T N N E K V ^A V V K I
 región que participa en la unión del nucleótido 66
 L K P V K K K K I K R E I K I L E N L R G G P
 agrupación de lisinas
 N I I T L A D I V K D P V S R T P A L V F E H
 V N N T D F K Q L Y Q T L T D Y D I R F Y M Y
 E I L K A L D Y C H S M G I M H R D V K P H N
 agrupación de residuos básicos en el subdominio VI
 V M I D H E H R K L R L I D ^F W G L A E F Y H P
 176
 G Q E Y N V R V A S R Y F K G P E L L V D Y Q
 M Y D Y S L D M W S L G C M L A S M I F R K E
 P F F H G H D N Y D Q L V R I A K V L G T E D
 L Y D Y I D K Y N I E L D P R F N D I L G R H
 S R K R W E R F V H S E N Q H L V S P E A L D
 F L D K L L R Y D H Q T R L T A R E A M D H P
 Y F Y P I V K D Q S R M A A L I C P V A A H P
 S V A P V

Figura 2 : Secuencia aminoacídica de la subunidad α de la CK2 de *Xenopus laevis* en la cual se indican los residuos o regiones que presentan ciertas características relevantes.

D.2.- Serie de lisinas entre los subdominios II y III

Entre la lisina 68 (que es esencial para la actividad y participa directamente en la reacción de fosforilación) que se encuentra en el subdominio II y el glutámico 86 del subdominio III, la subunidad α contiene la secuencia $^{71}\text{K P V K K K K I K R E I K}^{83}$. Se ha postulado que esta secuencia de aminoácidos básicos podría estar formando una estructura de α -hélice (Meisner y cols., 1989), la cual podría estar interactuando con los residuos ácidos de las proteínas o péptidos sustratos, con los inhibidores polianiónicos o con la región acídica presente en la subunidad β .

Esta región también se ha descrito que posee las características de una señal de localización nuclear (NLS) y podría por lo tanto estar participando en el transporte de esta proteína al núcleo (Rihs y cols., 1991; Allende y Allende, 1995).

Se han construido proteínas mutantes en que se han sustituido dos de las lisinas presentes en esta región por ácido glutámico y se ha visto una disminución muy drástica en la potencia inhibidora causada por heparina y otros inhibidores polianiónicos como 2,3-difosfoglicerato, ácido poliuridílico y el copolímero glu-tyr (4:1) (Hu y cols., 1990b; Gatica y cols., 1994), pero no por inhibidores de otra naturaleza como el 5,6-dicloro-1- β -D-ribofuranosilbenzimidazol (DRB) (Zandomeni, 1989).

Estas mutaciones sin embargo, no afectan la interacción de la subunidad α con sus sustratos proteicos o con la subunidad β .

D.3.- Presencia de valina en la posición 66 y de triptófano en la posición 176

En el 95% de las quinasas estudiadas el residuo equivalente a la posición 66 de la subunidad α es una alanina y se encuentra en el subdominio II y

el residuo equivalente a la posición 176 es una fenilalanina y se encuentra en el subdominio VII. Sin embargo, en la CK2 estos residuos han sido sustituidos por valina y triptófano respectivamente. En base a estudios cristalográficos realizados con la proteína quinasa dependiente de cAMP se ha postulado que ambas regiones estarían participando en la interacción con el ATP (Taylor y cols., 1993).

Jakobi y Traugh (1992) mutaron ambos residuos cambiándolos a los aminoácidos de consenso alanina y fenilalanina respectivamente, con la idea de ver si éstos eran los responsables de que la CK2 fuera capaz de usar GTP o ATP como sustrato. El resultado obtenido fue que la subunidad α mutante sintetizada pudo utilizar igualmente ambos nucleótidos, aunque el K_m aparente para GTP aumentó al doble. La mutante obtenida sin embargo, resultó muy interesante, ya que aunque se pudo asociar a la subunidad β para reconstituir la holoenzima en forma normal, la actividad de ésta no pudo ser estimulada por la subunidad β .

D.4.- Agrupación de histidinas en el subdominio VI

En este subdominio se encuentra la secuencia **D X K X X N** que se ha visto que en la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA) tiene una participación importante en la unión del péptido sustrato (Taylor y cols., 1993). El quinto residuo de esta secuencia que corresponde al glutámico 170 de la PKA, interacciona con una arginina que se requiere cercana a la serina del sustrato que va a ser fosforilado. Resulta interesante que en la subunidad α este residuo sea una histidina en lugar de un residuo ácido como en todas las serina/treonina quinasas que reconocen residuos básicos, ya que su especificidad de fosforilación también es de carga opuesta. Por lo tanto, podríamos postular que en el

caso de la CK2, la histidina podría estar interactuando con el aminoácido ácido requerido cercano al sitio de fosforilación.

Llama la atención también, que esta histidina se encuentre rodeada por otras tres histidinas y una lisina y arginina y siempre espaciadas por cinco aminoácidos (KALDYCHSMGYMHRDVKPHNVMYDHEHRKLR). Se ha propuesto que esta secuencia podría estar formando una estructura helicoidal con todas las cargas positivas dispuestas hacia el mismo lado, la cual estaría interaccionando con las cargas negativas de las proteínas o péptidos sustratos (Pinna, 1990).

E.- Estructura de la subunidad β

En los últimos años han sido publicadas las secuencias aminoacídicas de las subunidades β de bovino (Takio y cols., 1987) y la secuencia deducida de los cDNA de *Drosophila* (Saxena y cols., 1987), humana (Heller-Harrison y cols., 1989; Voss y cols., 1991), pollo (Maridor y cols., 1991), *Caenorhabditis elegans* (Hu y Rubin, 1991), *Xenopus laevis* (Jedlicki y cols., 1992) y *Saccharomyces cerevisiae* (Bidwai y cols., 1994). Al comparar la secuencia de estas proteínas entre sí, se puede observar que existe una conservación evolutiva extraordinaria entre las distintas especies (ver **Figura 5** en Resultados). Sin embargo, la subunidad β no presenta similitud con ninguna otra proteína que tenga relación con alguna proteína quinasa. Este hecho, hace que se descarte alguna relación estructural entre la subunidad β y las subunidades regulatorias o catalíticas de otras proteínas quinasas, y confirma la idea de que la subunidad β constituye un componente regulatorio muy *sui generis* dentro de la familia de las proteínas quinasas.

Recientemente se encontró una proteína en *Drosophila*, producto del gen "stellate", que presenta una similitud de un 38% con la subunidad β y que

de acuerdo a resultados no publicados del laboratorio de Pinna podría interactuar con la subunidad α , aunque usando concentraciones de ésta mucho mayores.

Existe un sólo gen que codifica para la subunidad β en la mayoría de las especies estudiadas, con la excepción de levadura (Bidwai y cols., 1994) y *Arabidopsis thaliana* (Collinge y Walker, 1994), donde se han encontrado dos subunidades β diferentes y de características atípicas (41 y 32 kDa). Por otro lado, en *Dictyostelium discoideum* (Kikkawa y cols., 1992) y en *Zea mays* (Drobowska y cols., 1991) no se ha podido aislar ningún tipo de subunidad β , a pesar de que sí existe una subunidad α con iguales características que en otras especies.

La función que está cumpliendo la subunidad β en la CK2 no está muy clara, ya que se ha visto que la subunidad α es activa por sí sola y su actividad no es regulada por ningún modulador fisiológico conocido.

Al analizar la secuencia de la subunidad β hay una serie de elementos que llaman la atención, los cuales se detallan a continuación (ver **Figura 3**).

E.1.- Sitios de fosforilación

Se ha visto que la subunidad β es fosforilada tanto in vivo como in vitro, y al inspeccionar su secuencia, vemos que las serinas 2 y 3 de la CK2 cumplen con la secuencia de consenso de fosforilación (M S S S E E) y por lo tanto podrían constituir el sitio de autofosforilación de la proteína, pero esta proposición no ha sido demostrada experimentalmente. La cdc2 quinasa también se ha encontrado que fosforila a la subunidad β y existen dos posibles sitios fosforilables por esta quinasa. Uno es la treonina 145, cuya secuencia es T P K, y el otro es la serina 209 cuya secuencia es

M **S** **S** S E E V S W I S W F C G L R G N E F F C
 potencial sitio de autofosforilación
 E V D E D Y Y Q D K F N L T G L N E Q V P H Y
 R Q A L D M I L D L E P D E E L E D N P N Q S
 caja de destrucción agrupación de residuos ácidos
 D L I E Q A A E M L Y G L I H A R Y I L T N R
 G I A Q M L E K Y Q Q G D F G Y C P R V Y C E
 cisteínas que podrían
 N Q P M L P I G L S D I P G E A M V K L Y C P
 constituir un dedo de
 K C M D V Y T P K S S R H H H T D G A Y F G T
 unión a metales
 G F P H M L F M V H P E Y R P K R P A N Q F V
 P R L Y G F K I H P M A Y Q L Q L Q A A S N F
 K **S** P V K T M R *
 sitio fosforilado por la cdc2 quinasa

Figura 3 : Secuencia aminoacídica de la subunidad β de la CK2 de *Xenopus laevis*, en la cual se indican los residuos o regiones que presentan ciertas características importantes.

S P V K. Esta última serina se ha visto que es fosforilada in vivo (Litchfield y cols., 1991).

E.2.- Agrupación de residuos ácidos :

La secuencia comprendida entre los aminoácidos 55 y 64 presenta un alto contenido en ácidos glutámico y aspártico (siete de los diez aminoácidos presentan carga negativa) y se ha propuesto que esta zona podría estar interaccionando con los policationes que estimulan la actividad de la CK2 o con la región básica rica en lisinas presente en la subunidad α .

Esta región hiperacídica también es análoga al dominio de unión de calcio presente en la tubulina, cuya similitud nos fue sugerida por el Dr. Jesús Avila. A continuación se detallan las secuencias de dichas regiones :

región acídica de subunidad β : DMILDLEP DEELEDNPNQSD LIEQAAE

dominio de unión Ca^{2+} de tubulina : L-LEP DEE-DE-NQ-SD L-E-AAE

E.3.- Probable presencia de un dedo de Zinc

Existen cuatro cisteínas (C^{109} , C^{114} , C^{137} y C^{140}) que se encuentran ubicadas a una distancia adecuada como para poder constituir un dedo de unión a metales y además hay varios otros aminoácidos presentes que se ha visto que se encuentran siempre en este tipo de estructuras (Valleé y Auld, 1990).

La presencia de este tipo de estructura en la CK2 podría ser importante, ya que hay antecedentes en la literatura que indican que esta enzima interacciona con el DNA y con otros ácidos nucleicos (Filhol y cols., 1990b, Gatica y cols., 1989 y Gatica y cols., 1995).

E.4.- Región análoga a la caja de destrucción de las ciclinas

Las ciclinas, al igual que la subunidad β , son proteínas que se asocian a subunidades catalíticas de proteína quinasas y estimulan su actividad. Existe una secuencia en la familia de las ciclinas que es responsable de la degradación que sufren estas proteínas al final de la mitosis, la cual ha sido llamada "caja de destrucción" (Glotzer y cols., 1991). Esta secuencia se encuentra siempre ubicada hacia el lado aminoterminal de la proteína y posee una arginina que al ser mutada impide que las ciclinas sean degradadas por medio del sistema de proteólisis mediado por ubiquitinas. Como fue señalado por Allende y Allende (1995) la subunidad β también presenta una secuencia de este tipo que se encuentra ubicada en el extremo aminoterminal (entre los aminoácidos 47 y 55) de la proteína. A continuación se muestra la comparación entre la secuencia presente en la subunidad β y la secuencia de consenso de la caja de destrucción

	100	37	56	100	72	56	69	56	75
Secuencia de consenso de la caja de destrucción:	R	T	A	L	G	D	I	G	N
Secuencia de la subunidad β :	R	Q	A	L	D	M	I	L	D

(los números que se indican sobre cada letra, indican el porcentaje de la frecuencia en que se encuentra conservado cada aminoácido en las 18 secuencias analizadas)

F.- Proteínas sustrato de la CK2

En los últimos diez años, la lista de proteínas que han sido descritas como sustrato para la CK2 ha aumentado enormemente, llegando a sumar más de 100 proteínas diferentes (Meggio y cols. 1994a). A pesar que estas proteínas difieren mucho en su función y en su localización intracelular, llama la atención la gran cantidad de ellas que se encuentran

involucradas en los procesos de expresión génica y traducción de proteínas como por ejemplo: RNA polimerasas, DNA topoisomerasas, nucleolina, HMG, proteínas ribosomales, factores de iniciación y elongación, mRNPs etc. Podemos encontrar también un segundo grupo de proteínas sustrato de gran importancia que incluye diversos componentes del sistema de transducción de señales, como es el receptor de EGF, la subunidad reguladora de la proteína quinasa dependiente de cAMP y el de la proteína fosfatasa-1 (inhibidor-2), hsp90, las proteínas de la familia myc, etc. Además, como apoyando la gran función pleiotrópica que posee esta proteína quinasa, podemos encontrar en la lista de proteínas-sustrato, diversas enzimas claves de ciertas rutas metabólicas como son la glicógenosintetasa, la ornitina descarboxilasa y la acetilCoA carboxilasa y también otras proteínas que están cumpliendo funciones muy especializadas tales como troponina-T, espectrina, la cadena liviana de la clatrina β , etc.

Una característica frecuente de las fosforilaciones catalizadas por la CK2 es la de ser silenciosas, es decir, no provocan grandes cambios en la actividad de las enzimas que fosforilan. Sin embargo, estas fosforilaciones tienen a veces gran trascendencia, como lo es el caso de la glicogenosintetasa (De Paoli-Roach y cols., 1981) o el inhibidor-2 (De Paoli-Roach, 1984), ya que éstas son un prerequisite para poder ser fosforiladas posteriormente por la GSK-3, que es la que finalmente produce el efecto funcional importante. A esta fosforilación secuencial se le ha llamado fosforilación jerárquica (Meggio y cols., 1994a). Sólo para algunas de las proteínas sustrato de la CK2 ha podido demostrarse que la fosforilación conduce a un cambio funcional de ellas. Algunas de estas proteínas son :

DNA topoisomerasa II : Se ha visto que esta enzima presenta una actividad tres veces mayor cuando es fosforilada por la CK2 (Corbett y cols., 1992).

Antígeno T de SV40 : El antígeno T grande del virus SV40 es una proteína multifuncional, la cual es fosforilada por diversas proteína quinasas. Se ha visto que la fosforilación de las serinas 111 y 112 por la CK2 (que se encuentran muy cercanas a la señal de localización nuclear) causa un aumento muy significativo en la velocidad de transporte al núcleo (Rihis y cols., 1991). Es interesante el hecho que varias otras proteínas nucleares también presentan sitios fosforilables por la CK2 a una distancia de 10 a 30 aminoácidos de la señal de localización nuclear.

SRF: El factor de respuesta al suero es una proteína nuclear que se une a secuencias reguladoras del DNA (SRE) que se encuentran en la región promotora de los genes que se transcriben muy tempranamente cuando se tratan células en reposo con suero. Se ha visto, que cuando este factor es fosforilado, aumenta su cinética de unión a la secuencia SRE del DNA (Marais y cols., 1992).

c-jun: El producto de este proto-oncogen es uno de los componentes del factor de transcripción AP-1 que se une a las secuencias TRE, que son secuencias reguladoras del DNA, que se encuentran en la región promotora de los genes que se expresan en respuesta al tratamiento con ésteres de forbol (Angel y Karin, 1991). Se ha demostrado que la fosforilación de jun por la CK2 en el extremo carboxilo terminal, hace disminuir su capacidad de unión al DNA, lo cual también ha sido corroborado por el hecho de que péptidos inhibidores de la CK2 hacen que se induzca la expresión de genes que poseen secuencias TRE en sus regiones promotoras (Lin y cols., 1992).

c-myb: Se ha visto que el producto de este proto-oncogen, al ser fosforilado por la CK2 en su extremo amino terminal, se inhibe su capacidad de unirse al DNA (Lüscher y cols.,1990). Resulta también interesante el hecho que la mayoría de los productos oncogénicos de myb carecen del sitio fosforilable por CK2 (Meisner y Czech, 1991).

myc-max : Los productos de estos proto-oncogenes se unen a secuencias específicas del DNA formando homodímeros o heterodímeros. Ambas proteínas son fosforiladas por la CK2, pero sólo max es inhibido en su capacidad de unirse al DNA (Berberich y cols.,1992). Cabe hacer notar que la fosforilación sólo inhibe la unión del homodímero de max y no afecta al heterodímero myc-max.

De todos estos antecedentes podemos concluir que una de las funciones de la CK2 sería la de modular la actividad de una serie de factores de transcripción. Sin embargo, resulta contradictorio el porqué la fosforilación de SRF produce un aumento en su capacidad de unión al DNA (Marais y cols., 1992), en cambio en myb, max y jun se produce una disminución de ésta, siendo que aparentemente todos ellos son reguladores positivos de la proliferación celular.

Existen aún muchas interrogantes respecto a la función que está cumpliendo la CK2 en el control de la proliferación celular, sin embargo no hay dudas de que su actividad es fundamental para la célula.

G.- Regulacion de la CK2

G.1.- Aspectos generales

En general las proteína quinasas son enzimas que participan en los procesos de transducción de señales, provocando cambios en la actividad o función de sus proteínas sustrato. En la mayoría de los casos, ellas poseen subunidades reguladoras o dominios reguladores que mantienen

reprimida su actividad hasta que sean activadas por sus efectores fisiológicos. La CK2 sin embargo, constituye una excepción, ya que aunque presenta una estructura similar a la PKA (posee dos subunidades catalíticas y dos subunidades reguladoras), la holoenzima es activa por sí sola. A diferencia de otras proteína quinasas, la subunidad β no se disocia *in vitro* bajo condiciones fisiológicas aparentes. Debido a ello, es que no resulta fácil comprender que función está cumpliendo la subunidad β en la CK2 y es una de las interrogantes que se desea responder en esta tesis.

G.2.- Compuestos que afectan la actividad

La CK2 no es regulada por ninguno de los segundos mensajeros conocidos como cAMP, Ca^{+2} , calmodulina, fosfolípidos etc.. Sin embargo, su actividad es afectada por una serie de compuestos de naturaleza policatiónica o polianiónica (Hathaway y Traugh, 1982).

Los compuestos policatiónicos como espermina y espermidina y los polipéptidos básicos como polilisina son activadores de la CK2. Espermina estimula 2 a 3 veces la actividad de la enzima, sin embargo esta estimulación es dependiente de la concentración de Mg^{+2} y de la naturaleza del sustrato (Hathaway y Traugh, 1984a). La importancia fisiológica que podría tener este activador en la regulación de la CK2 *in vivo* es especulativa. Sin embargo, una estimulación fisiológica resulta consistente si tenemos en cuenta que las concentraciones intracelulares de espermina que se alcanzan en ciertas circunstancias (del orden de milimolar), concuerdan muy bien con las condiciones que se requieren *in vitro* para obtener una buena estimulación. También resulta interesante que tanto la actividad de la CK2 como la biosíntesis de poliaminas se incrementan en forma paralela cuando se estimula el crecimiento y división celular (Cochet y cols., 1980).

El efecto de los polipéptidos básicos sobre la CK2 es más dramático, encontrándose con ciertos sustratos un efecto del todo o nada, como es el caso del efecto de polilisina sobre la fosforilación de calmodulina, la cual presenta un requerimiento absoluto de esta polimerización para su fosforilación (Meggio y cols., 1994b). El significado fisiológico que podrían tener estos compuestos es cuestionable, debido a la naturaleza artificial de ellos (polilisina, poliarginina y otros péptidos relacionados). Sin embargo, recientemente se han descrito proteínas poseedoras de largas series de lisinas que estarían afectando la actividad de enzimas asociadas a la membrana (Gatica y cols., 1987), como es el caso de la proteína K-ras que posee un dominio muy básico (**KDEKDKKKKER**) que es capaz de producir el mismo efecto que polilisina sobre la quinasa del receptor de insulina (Fujita-Yamaguchi y cols., 1989), que al igual que la CK2 requiere de polipéptidos básicos para fosforilar alguna de sus proteína-sustratos. Por lo tanto, es posible que existan otras proteínas con características similares a K-ras que pudieran estar operando como efectores fisiológicos de la CK2.

Los compuestos polianiónicos, en contraste a los policationicos, son inhibidores muy potentes de la enzima. Heparina es el inhibidor más conocido y característico de esta enzima y ha sido ampliamente usado como uno de los criterios para identificar su actividad (Hathaway y cols., 1980), ya que la CK2 es la única quinasa que es inhibida a concentraciones nanomolares de este compuesto. Otro compuesto polianiónico que también inhibe a la CK2 es el 2,3 difosfoglicerato, el cual podría tener importancia como regulador fisiológico en los eritrocitos (Hathaway y Traugh, 1984b).

Moléculas polianiónicas, como DNA de doble hebra o monohebra, oligonucleótidos sintéticos (especialmente el de uracilo o poliU) (Gatica y

cols., 1989 y Gatica y cols., 1995) y polipéptidos de ácido glutámico y ácido aspártico (Meggio y cols., 1984a) inhiben también fuertemente la actividad de la enzima. Muy interesantes son los polipéptidos de ácido glutámico que contienen residuos de tirosina intercalados, los cuales presentan una capacidad inhibidora muy alta (su I_{50} es del orden de 10^{-8} M, que es dos órdenes de magnitud menor que el del ácido poliglutámico) (Téllez y cols., 1990; Meggio y cols., 1989). Este hecho nos indica que la CK2 presenta una gran afinidad por los residuos de tirosina que se encuentran ubicados en ambientes acídicos, a pesar de que éstos no puedan ser fosforilados por esta quinasa.

Otro tipo de compuestos que no son de naturaleza polianiónica y que inhiben la actividad de la CK2 son los derivados de los bencilimidazol (Zandomeni, 1989). Estos derivados son análogos de los sustratos nucleotídicos ATP y GTP y se comportan como inhibidores competitivos de éstos. Lo interesante de estos compuestos es que sólo inhiben a la CK1 y a la CK2, pero no a las demás quinasas (Meggio y cols., 1990).

G.3.- Regulación de la actividad bajo distintas condiciones de crecimiento

En estudios realizados en diversos laboratorios se ha visto que en distintos tipos de células se produce una rápida activación de la CK2 en respuesta al tratamiento con diversos agentes mitogénicos como insulina, el factor de crecimiento semejante a la insulina-I (IGF-I) y el factor de crecimiento epidermal (EGF) (Sommercorn y cols., 1987; Klarlund y Czech, 1989 y Ackerman y Osheroff, 1989). De acuerdo a los estudios realizados, la activación observada en todos estos casos no se debería a un aumento en la cantidad de enzima, sino que más bien a una modificación covalente de esta proteína.

Otra observación interesante respecto a la regulación de la CK2 frente a estos agentes, es la descrita por Carroll y Marshak (1989). Ellos encontraron que los niveles de actividad de la CK2 aumentaban 6 veces, después de tratar fibroblastos WI38 de pulmón humano con suero y por 30 minutos. Posteriormente, ellos también observaron ciclos de activación e inactivación cada 12 y 24 horas después de la estimulación. Estas oscilaciones de actividad observadas no dependían de la síntesis de proteínas *de novo*, por lo que probablemente reflejaban ciclos de activación e inhibición post-traduccionales del pool de quinasas celulares.

Estos hallazgos, llevaron posteriormente a Ackerman y cols. (1990) a estudiar si existía una relación entre la activación hormonal de la CK2 y su grado de fosforilación. Para realizar este estudio, ellos incubaron células A431 de carcinoma humano con [^{32}P]-ortofosfato en presencia y ausencia de EGF. Al estudiar el grado de fosforilación de la enzima inmunoprecipitada de los dos extractos celulares, ellos detectaron que la CK2 proveniente de las células tratadas con el factor de crecimiento contenía alrededor de 3 veces más [^{32}P]-fosfato que aquella proveniente de células no tratadas. Además, el aumento en el grado de fosforilación se correlacionaba muy bien con el grado de estimulación de la actividad, en un amplio rango de concentración de EGF. De acuerdo a este estudio, el 97% del fosfato incorporado se encontraba asociado a la subunidad β y la remoción de este fosfato por fosfatasa alcalina, disminuía la actividad a los niveles de la enzima control. Tanto la enzima activada como la en estado basal contenían fosfoserina y fosfotreonina, y los fosfopéptidos generados al digerir ambas proteínas con distintas enzimas proteolíticas también eran los mismos. Por lo tanto de acuerdo a estos resultados, la activación hormonal de la CK2 se debería a una hiperfosforilación, que

ocurriría en los mismos sitios fosforilados en condiciones basales, pero en mayor magnitud.

A pesar de lo convincente que parecen estos resultados, existen serias discrepancias en la literatura sobre el posible efecto de la fosforilación en la regulación de la actividad de la CK2. En los estudios realizados por Agostinis y cols. con proteína fosfatasas por ejemplo, los resultados se contraponen completamente a los anteriores, ya que ellos encontraron que al desfosforilar la CK2 se producía una estimulación de su actividad (Agostinis y cols.,1987).

Una posible explicación a estas discrepancias sería que *in vivo* estén actuando distintas quinasas en distintos sitios de la proteína, los cuales podrían estar afectando a la enzima de distinta forma.

Al estudiar los tipos de quinasas que podrían estar participando en la fosforilación de la CK2, Mulner-Lorillon y cols. encontraron que la cdc2 quinasa era capaz de fosforilar a la subunidad β *in vitro*, en un sitio distinto al de autofosforilación, encontrando fosfotreonina en lugar de fosfoserina. Además ellos pudieron observar, que la fosforilación producida *in vitro* por la cdc2 quinasa incrementaba la actividad de la enzima en 1,5 a 5 veces (Mulner-Lorillon y cols.,1990).

Posteriormente, Litchfield y cols. corroboraron los resultados anteriores, demostrando que la subunidad β de la CK2 podía ser fosforilada tanto *in vivo* como *in vitro* por la cdc2 quinasa, identificando a la serina 209 como el residuo fosforilado. En contraposición al estudio del grupo de Bellé, estos autores no pudieron ver activación de la enzima modificada (Litchfield y cols.,1991). En un estudio más reciente, Meggio y cols. tampoco pudieron observar ningún efecto en la actividad de la CK2 al fosforilar *in vitro* la subunidad β con la cdc2 quinasa (Meggio y cols.,1993).

Debido a que la cdc2 quinasa experimenta grandes cambios de actividad durante las distintas etapas del ciclo celular, Litchfield y cols. estudiaron el grado de fosforilación de la CK2 quinasa en células detenidas en mitosis, encontrando que la fosforilación de la serina 209 se encontraba muy aumentada con respecto a la fosforilación del sitio de autofosforilación (Litchfield y cols., 1992). Por otro lado, también se ha demostrado que la cdc2 quinasa es fosforilada por la CK2 tanto *in vivo* como *in vitro*, en la serina 39 durante la fase G1 del ciclo celular (Russo y cols., 1992). Por lo tanto, es probable que la fosforilación recíproca de ambas quinasas pueda provocar cambios en sus propiedades durante las distintas etapas del ciclo celular.

Los niveles de CK2 no sólo se han encontrado aumentados en respuesta al tratamiento con hormonas y factores de crecimiento, sino que también se ha visto que se encuentran elevados en células que se encuentran en activa proliferación, como tejido embrionario y tumores (Issinger, 1993). Resulta interesante que diversos órganos y tejidos embrionarios, presentan niveles de actividad de CK2 varias veces más alto que en el correspondiente tejido adulto. Este hecho, apoyaría la idea de que la CK2 tendría un papel importante en los procesos de proliferación y diferenciación celular.

Con respecto a este punto, existe un estudio realizado por Ole-MoiYoi y cols. con el parásito intracelular *Theileria parva*, que es un protozoo parásito, responsable de un síndrome linfoproliferativo mortal en el ganado vacuno, debido a que induce transformación de los linfocitos del animal (Ole-MoiYoi y cols. 1993). Lo interesante de este estudio, fue que se pudo determinar que en linfocitos de bovino infectados con este parásito había una marcada inducción de la CK2, encontrándose elevados niveles tanto de RNA mensajero como de proteína y de actividad

enzimática. Basándose en estos resultados, Seldin y Leder (1995) procedieron a estudiar el papel de la CK2 en esta patología linfoproliferativa, produciendo una sobreexpresión del gen de la subunidad α en linfocitos de ratones transgénicos. El resultado obtenido fue que la CK2 α puede actuar como un oncogen, y su desregulada expresión es capaz de transformar linfocitos en combinación con c-myc.

Estudios de Sommercorn y Krebs han demostrado que la CK2 se encuentra relacionada no sólo con procesos de proliferación, sino que también de diferenciación celular (Sommercorn y Krebs, 1987). Ellos encontraron que al tratar células 3T3-L1 con dexametasona, para inducir su diferenciación a adipocitos, los niveles de CK2 aumentaban 4 veces, lo que se correlacionaba con un aumento equivalente en la cantidad de proteína quinasa sintetizada. La inducción observada era transiente y no ocurría en células 3T3-C2 que no experimentan diferenciación.

Otro ejemplo muy interesante que relaciona a la CK2 con procesos de diferenciación, es un estudio publicado por el grupo de Jesús Avila. En él, ellos encontraron que la CK2 actuaba como un agente inductor del desarrollo de las neuritas en células de neuroblastoma que se inducen a diferenciación por remoción del suero (Díaz-Nido y cols., 1988). Recientemente estos autores demostraron que al tratar células de neuroblastoma con oligodesoxirribonucleótidos "antisense" del RNA mensajero de la subunidad α (lo cual resulta en la depleción de la subunidad catalítica α CK2), se bloquea la neurogénesis (Ulloa y cols., 1993).

Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de evidencias que indican que la actividad de la CK2 estaría aumentada en respuesta a la acción de diversos agentes mitogénicos, recientemente estos resultados han sido cuestionados por el grupo de Krebs (que fue uno de los primeros

laboratorios en describir este efecto), ya que éstos no han podido ser reproducidos en forma sistemática (Litchfield y cols., 1994).

Considerando estos resultados, Pinna ha propuesto la posibilidad de que la CK2 sea una enzima constitutiva encargada de mantener fosforiladas a todas sus proteínas sustrato y que luego la actividad de éstas sea regulada por desfosforilación (Pinna, 1990).

G.4.- Posible existencia de la subunidad α monomérica

Como ya ha sido mencionado anteriormente, la CK2 es una enzima heterotetramérica, la cual es indisociable bajo condiciones fisiológicas y está constituida por dos subunidades catalíticas α y α' y por dos subunidades β cuya función es supuestamente reguladora. Sin embargo, existen varios ejemplos en la literatura en que se describen subunidades α monoméricas, como por ejemplo en *Dyctyostelium* (Kikkawa y cols., 1992) y en *Zea mays* (Dobrowolska y cols., 1991), donde no se han encontrado subunidades β como en todas las demás especies. También Stigare y cols., realizando extracciones de núcleos a distintas concentraciones de sal, encontraron que la mayor parte de la subunidad α nuclear se encontraba muy firmemente unida a otros componentes nucleares y no asociada a la subunidad β (Stigare y cols., 1993).

Por otro lado Bidwai y cols. observaron que al introducir los genes de las subunidades α y β de *Drosophila* en células de *S. cerevisiae* mutantes doble en los genes α y α' y por lo tanto no viables, bastaba con que sólo se expresara α para que las levaduras pudieran crecer (Bidwai y cols., 1992). Sin embargo, en estas células, la actividad CK2 aparecía como una entidad monomérica, ya que la subunidad α de *Drosophila* no es capaz de interactuar con las subunidades β de la levadura. Resulta interesante que cuando se transformaron levaduras sólo con el gen de la

subunidad β de *Drosophila*, no fue posible detectar la proteína. Estos resultados indican que la subunidad α puede expresarse y ejercer su función en ausencia de β , en cambio cuando la subunidad β es expresada aisladamente, ésta se degrada muy rápidamente (Bidwai y cols., 1992).

En relación con estos resultados, Robitzky y cols. encontraron que la subunidad α humana era capaz de unirse a una secuencia ubicada en la región promotora del gen de la subunidad β , provocando una estimulación de la transcripción de este gen (Robitzky y cols., 1993). Aunque resulta muy atractiva la posibilidad de que exista un mecanismo que regule en forma coordinada la expresión de ambos genes, estos resultados no han podido ser reproducidos con la enzima de *Xenopus* (Gatica y cols., 1995).

Otra evidencia que indica que cierta fracción de la subunidad α podría no encontrarse asociada a β , proviene de estudios realizados por el grupo de Czech (Heller-Harrison y Czech; 1991). En este trabajo se transfectaron células COS-1 con los genes de la subunidad α y de la subunidad β en forma separada. En ambos casos se produjo un aumento similar en los niveles de actividad de CK2, lo cual no es sorprendente cuando se expresa α ya que ésta posee actividad catalítica, pero sí lo es cuando se expresa β que es inactiva. La explicación más factible de este resultado es pensar que en estas células existía un exceso de subunidad α monomérica que se asoció a la subunidad β sobreexpresada, estimulando de esta manera su actividad.

Hasta el momento, la posibilidad de que CK2 pueda ser regulada por asociación y disociación de sus subunidades, como en el caso de las cdk quinasas, es solamente especulativa. A pesar que en los estudios realizados *in vitro* se ha visto que la holoenzima prácticamente no se

disocia, es posible que *in vivo* las condiciones sean diferentes y existan factores que faciliten la disociación.

G.5.- Papel de la subunidad β en la regulación de la CK2

De los estudios realizados a partir de las subunidades α y β recombinantes se ha podido determinar, que aunque la subunidad α posee actividad catalítica intrínseca, la subunidad β es necesaria para que la enzima adquiriera una conformación más estable y una actividad catalítica cuatro a cinco veces mayor (Issinger y cols., 1992; Grankowski y cols., 1991).

Por analogía con la familia de las cdc2 quinasas (que son las quinasas más cercanas a la CK2), otra forma de regulación que podría tener la CK2, sería el que la síntesis o degradación de la subunidad β fuera regulada como en el caso de las ciclinas, que son las subunidades reguladoras de las cdk quinasas (Glutzer y cols., 1991).

Aunque hasta el momento no existen evidencias concretas que apoyen este tipo de mecanismo, es muy sugerente la presencia de la "caja de destrucción" en el extremo amino terminal de la subunidad β (Allende y Allende, 1995). También resulta interesante el hecho que la CK2 haya sido encontrada asociada con la subunidad 20S del proteosoma, el cual constituye el organelo encargado de la degradación de las proteínas ubiquitiniladas (Ludeman y cols., 1993).

Respecto a la degradación de la subunidad β , recientemente Lüscher y Lietchfield (1994), realizando estudios de pulso y caza en diversas líneas celulares, pudieron determinar que la subunidad β era sintetizada en gran exceso sobre la subunidad α . Bajo estas condiciones, una fracción muy pequeña de β formaba parte de la holoenzima tetramérica, sufriendo el resto de la proteína una rápida degradación por un mecanismo no

lisosomal. En concordancia con los resultados de Lüscher y Lietchfield, el grupo de Issinger también observó que en diversos tumores existe un gran exceso de subunidad β comparado con el tejido normal del mismo paciente (O.G. Issinger, 1993).

Otra función importante que se ha postulado que podría estar desempeñando la subunidad β , sería la de modificar la especificidad enzimática de la CK2. Con respecto a este punto hay estudios realizados por el grupo de Pinna (Meggio y cols., 1994b) y Glover (Bidwai y cols., 1993), en que se ha visto que ciertas proteínas como calmodulina, ornitinedescarboxilasa, la cadena liviana de clatrina β y el factor de elongación 1 de reticulocitos sólo pueden ser fosforiladas por la subunidad α monomérica y no por la holoenzima. Resulta muy sugerente que al agregar polilisina (activador de la enzima que interacciona principalmente con la subunidad β), la holoenzima recupera la capacidad de fosforilar estos sustratos. Ello significa que la subunidad β impide que la subunidad α fosforile a la calmodulina, efecto que es revertido por polilisina.

Por otro lado, también se han descrito sustratos de la CK2 en que la subunidad β juega un papel vital, ya que éstos sólo pueden ser fosforilados por la holoenzima y no por la subunidad α monomérica. El ejemplo que más llama la atención de este tipo de sustratos, es el antioncogen p53 (Wagner y cols., 1994), el cual se ha visto que sólo es fosforilado por la holoenzima. En este caso, la subunidad β estaría desempeñando un papel muy importante en la regulación de la proliferación celular, ya que se ha demostrado que p53 no sólo es sustrato de la CK2, sino que también existe una asociación física entre ellos, la cual se ha visto que ocurre a través de la subunidad β .

OBJETIVOS DE LA TESIS

De las evidencias presentadas puede concluirse que la CK2 es una enzima indispensable para la viabilidad de la célula y que juega un papel muy importante tanto en el metabolismo como en los procesos de diferenciación y proliferación celular. Sin embargo, hay muchas incógnitas aún por resolver, fundamentalmente respecto a su función y regulación fisiológica. Una interrogante especialmente interesante resulta ser el papel de la subunidad β en la CK2, ya que se ha visto que en algunas especies ésta no existe, y en *S. cerevisiae* sólo se requiere de la subunidad α monomérica para que las células sean viables. Por este motivo es que nos ha interesado estudiar la función que está cumpliendo la subunidad β en la actividad y regulación de la CK2.

Para llevar a cabo este estudio, se plantearon los siguientes objetivos:

- 1.-Aislamiento y secuenciación del gen que codifica para la subunidad β de la proteína quinasa CK2 de *Xenopus laevis*
- 2.-Expresión y purificación de la subunidad β
- 3.-Estudios de reconstitución a partir de las subunidades α y β recombinantes purificadas
- 4.-Estudios de autofosforilación de ambas subunidades
- 5.-Síntesis de diversas proteínas mutantes de la subunidad β
- 6.-Estudios de reconstitución con las diferentes proteínas mutantes
- 7.-Estudio comparativo de las holoenzimas reconstituídas con las diferentes subunidades β mutantes para estudiar su relación entre la estructura y función .

MATERIALES Y METODOS

A.- REACTIVOS Y MATERIALES

A.1.- Reactivos generales

Los reactivos generales como Tris, EDTA, ácido bórico, cloruro y acetato de magnesio, Hepes, DTT, EGTA, NaCl, TCA, SDS, sacarosa, urea y tritón X-100 fueron obtenidos de Sigma Chemical Co.

La triptona, extracto de levadura y el agar fueron de Difco.

Todas las enzimas utilizadas en biología molecular como enzimas de restricción, polimerasas, quinasas, ligasa, fosfatasa alcalina, etc., fueron adquiridas en BRL y Promega. Los isótopos [γ - ^{32}P] ATP, [α - ^{32}P] dATP y [α - ^{35}S] dATP fueron obtenidos en Amersham International y en New England Nuclear.

La membrana de DEAE fue de Schleicher & Schuell y el papel Whatman P-81 y Whatman #1 y #3 fueron de Whatman International.

Los oligonucleótidos utilizados fueron sintetizados en el "Centro de síntesis y referencia" de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

La glutatión-agarosa y la trombina fueron obtenidas de Sigma y el vector pGEX-2T fue donado por el Dr. Silvio Gutkind.

A.2.- Soluciones generales

TBE 5X: un litro de solución contiene 54 g de Tris base; 27,5 g de ácido bórico y 20 ml de EDTA 0,5M pH 8,0.

TE: solución que contiene Tris-HCl 10 mM pH 7,5 y EDTA 1 mM.

PBS: solución que contiene NaCl 150 mM; NaH₂PO₄ 16 mM y Na₂HPO₄ 4mM, pH 7,4.

SSC 20X: solución que contiene NaCl 3M y citrato de Na 0,3M, pH 7,0.

Denhardt 50X: solución que contiene ficoll al 1%, BSA al 1% y polivinilpirrolidona al 1%.

SM: solución que contiene NaCl 100 mM; MgCl₂ 1 mM; Tris-HCl 50 mM pH 7,5 y gelatina al 0,01%.

A.3.- Cepas utilizadas

Y1090 : supF hsdR araD 139 Δlon Δlac U169 rpsL trpC22 :: Tn 10 (tet^r) pMC9. Bacterias receptoras para infección con fago lambda

TG1 : supE hsdΔ5 thiΔ (lac-proAB)

F' [tra D36 proAB⁺ lacI^o lacZΔM15]

JM-105 : supE endA sbcB15 hsdR4 rpsL thiΔ (lac-proAB)

F' [traD36 proAB⁺ lacI^o lacZ ΔM15]

Tanto las bacterias TG1 como JM-105 fueron usadas para ser transformadas con el fago M13

BL21(DE3): hsdS gal (λc Its 857 ind1 S am7 nin 5 lac UV5-T7 gene 1)

bacterias usadas para ser transformadas con el vector pGEX-2T y para expresar las proteínas fusionadas a la glutatión-transferasa

A.4.- Genoteca

La genoteca utilizada fue donada por el Dr. Douglas Melton, la cual fue construída a partir de RNA poliadenilado de oocitos desfoliculados en estado VI de *Xenopus laevis*. Los cDNA fueron subclonados en el sitio EcoRI del DNA del fago λ gt10 (Rebagliati y cols., 1985).

A.5.- Medios de cultivo

Medio LB: contiene 10 g de bacto triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl para 1 litro de medio, y se agrega NaOH 1N para llevar a pH = 7

Medio LB ampicilina: medio LB que contiene ampicilina 50 µg/ml.

Medio LB-TAM: medio LB que contiene tiamina 50 µg/ml, ampicilina 50 µg/ml, MgCl₂ 10 mM y MgSO₄ 10 mM.

Medio LB sólido: medio LB que contiene agar al 1%.

Medio LB-TAM sólido: medio LB-TAM que contiene agar al 1%

Medio agar-H: contiene 10 g de bacto triptona, 8 g de NaCl y 12 g de agar para un litro de medio, y el pH se ajusta a 7 con NaOH 1N.

Medio 2XYT: contiene 16 g de bacto triptona, 10 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl para un litro de medio, y el pH se lleva a 7 con NaOH 1N.

A.6.- Oligonucleótidos utilizados

partidor # 1 : 5' CGTGGCAATGAGTTCTTCTG 3'

partidor río arriba, usado para amplificar un fragmento del gen de la subunidad β, el cual se utilizó como sonda para analizar la genoteca.

partidor # 2 : 5' ACATCCATGCACTTGGGGCA 3'

partidor río abajo, usado para amplificar un fragmento del gen de la subunidad β, el cual se utilizó como sonda para analizar la genoteca

partidor # 3 : 5' TACGAATTCAAATGAGTAGCTCG 3'

utilizado para incorporar un sitio EcoRI (GAATTC) previo al ATG del gen, para poder subclonarlo en el vector pGEX-2T

partidor # 4 : 5' GGGGAATTCTCAACGCATGGTCT 3'

utilizado para incorporar un sitio de restricción para la enzima EcoRI (GAATTC) después del codón de término del gen

partidor # 5 : 5` GGCGACCATCCTCCAAAA 3`

complementario a una región del extremo 5` del sitio de subclonamiento del vector pGEX-2T, para poder secuenciar y amplificar fragmentos subclonados en este vector

partidor # 6 : 5` CAGATCGTCAGTCAGTC 3`

complementario a una región del extremo 3` del sitio de subclonamiento del vector pGEX-2T, para poder secuenciar y amplificar fragmentos de DNA subclonados en este vector

partidor # 7 : 5` CCCGAATTCAAATGGGTGGCTCGGA 3`

utilizado para mutar las serinas 2 y 3 de la subunidad β a glicina

partidor # 8 : 5` GGGAATTCTCAACGCATGGTCTTCACGGGACCTTTAA 3` utilizado para mutar la serina 209 de la subunidad β a glicina

partidor # 9 : 5` GGATCTAGAAGCTGATGAGGA 3`

utilizado para mutar la prolina 58 de la subunidad β a alanina

partidor # 10 : 5` GGATCTAGAATATGATGAGGAA 3`

utilizado para mutar la prolina 58 de la subunidad β a tirosina

partidor # 11 : 5` CTGTGAGGTGGCTGCAGCCTATATCCAGGA 3`

utilizado para mutar los aspárticos 26, glutámico 27 y aspártico 28 de la subunidad β a alanina

partidor # 12 : 5` GGGGAATTCACCTCTTGGGCCTATA 3`

oligonucleótido complementario utilizado para introducir un codón de término después de la arginina 178 de la subunidad β seguido de un sitio de restricción para la enzima EcoRI

partidor # 13 : 5` GTAAACATCCATAGCCTTGGGAGCATAACAGTTTAA CC 3` utilizado para mutar las cisteínas 137 y 140 de la subunidad β a alanina

partidor # 14 : 5' AATCCTCACGGGCTGCTGCCACCGATGGAG 3'

y # 14': 5' CTCCATCGGTGGCAGCAGCCCGTGAGGATT 3'

son oligonucleótidos complementarios utilizados para mutar las histidinas 151,152 y 153 de la subunidad β a alanina

partidor # 15 : 5'TCTAGAACCTGCTGCGGCATTGGAAGATAAT 3'

y # 15': 5'ATTATCTTCCAATGCCGCAGCAGGTTCTAGA 3'

son oligonucleótidos complementarios utilizados para mutar el aspártico 59 y los glutámicos 60 y 61 de la subunidad β a alanina

partidor # 16 : 5'ACATGATACTGGCTCTAGCACCTGCTGCG 3'

y # 16': 5'CGCAGCAGGTGCTAGAGCCAGTATCATGT 3'

son oligonucleótidos complementarios utilizados para mutar el aspártico 55 y el glutámico 57 de la subunidad β a alanina.

NOTA: los nucleótidos subrayados son los que han sido cambiados para mutar el aminoácido correspondiente.

B.- METODOS

B.1.- Electroforesis en geles de agarosa

Para realizar la electroforesis se siguió el procedimiento descrito en Sambrook y cols. (1989), el cual consiste en lo siguiente :

Los geles de agarosa se preparan a una concentración de 1 o 1,2 % en amortiguador TBE 1 \times y bromuro de etidio a una concentración de 0,5 μ g/ml. A las muestras que se desea analizar se les agrega azul de bromofenol al 0,25% y glicerol al 10% y los geles se corren a un voltaje constante de 100V. Como patrón para estimar el tamaño de los fragmentos de DNA, se usa DNA de fago lambda digerido con la enzima de restricción HindIII. El DNA de los geles se visualiza colocando éstos sobre un transiluminador U.V. (de longitud de onda de 254 nm), desde donde pueden ser fotografiados.

B.2.- Digestión del DNA con enzimas de restricción

Las digestiones con enzimas de restricción se realizaron de acuerdo a Sambrook y cols. (1989). En general, el DNA es digerido usando 0,1 volúmenes de la solución amortiguadora que adjunta el fabricante para cada enzima y se usan 1-2 U de enzima por cada μg de DNA. La digestión se realiza a la temperatura recomendada por 1 a 3 horas. Luego los productos de la digestión son analizados en geles de agarosa.

B.3.- Purificación del DNA por extracción con fenol

Este tratamiento se realiza cuando se quiere limpiar el DNA de proteínas contaminantes (durante una purificación o después de haber sido tratado con alguna enzima de restricción, polimerasa, ligasa, etc.). Para ello se realizan tres extracciones secuenciales, agregando siempre un volumen de cada uno de ellos y separando las fases por centrifugaciones de 30 seg. en microcentrífuga. Primero se extrae con fenol, luego con fenol/cloroformo (1:1) y finalmente con cloroformo.

NOTA:el fenol siempre debe estar saturado en Tris HCl 10 mM pH 7,5 y el cloroformo mezclado con alcohol isoamílico en proporción (24:1). Para mayor detalle ver Sambrook y cols. (1989).

B.4.- Precipitación del DNA con etanol

Para precipitar el DNA con etanol, se agregan 0,1 volúmenes de acetato de Na 3M pH 5,2 o 0,2 volúmenes de acetato de amonio 10M y 2 a 3 volúmenes de etanol enfriado a -20°C . Después de incubar en frío (generalmente 1 a 2 horas a -20°) el DNA se centrifuga por 15 minutos a 12.000 rpm y se remueve el sobrenadante. Posteriormente se lava el DNA con etanol al 75% y se seca al vacío o a temperatura ambiente.

B.5.- Purificación de fragmentos de DNA por membrana de DEAE

Este método consiste en separar los fragmentos de DNA de acuerdo a su tamaño en geles de agarosa y luego extraer el o los fragmentos deseados con un trozo de membrana de DEAE (Sambrook y cols. 1989). Para purificar un fragmento, se aplica la muestra en un gel de agarosa preparativo cuya concentración dependerá del tamaño de los fragmentos que se deseen separar. Después de correr el gel lo suficiente como para obtener una buena separación entre los distintos fragmentos de DNA, se hace una incisión justo frente a la banda que se desea purificar y se inserta un trocito de membrana (de $\sim 2 \times 0,5$ cm). Se continúa la electroforesis por 10 minutos y se saca la membrana, se lava con agua destilada, se corta en trocitos pequeños y se incuba en 0,2 ml de una solución que contiene Tris-HCl 20 mM pH 8,0 y NaCl 1M. La incubación se realiza a 65° por una hora y posteriormente se realiza una extracción con un volumen de n-butanol saturado en agua y el DNA se precipita con etanol.

B.6.- Desfosforilación de vectores

Para poder introducir un fragmento de DNA en un determinado vector, además de ser digerido con las enzimas de restricción adecuadas, éste debe ser desfosforilado para impedir su recircularización. Para ello se incuban 1-5 μ g de DNA plasmidial previamente digerido, con 0,1 volumen de la solución amortiguadora que trae la enzima (0,5M Tris-HCl, pH 9,3; 10mM MgCl₂; 1mM ZnCl₂; 10mM espermidina) y 1 unidad de fosfatasa alcalina de intestino de ternero (CIP) durante 60 minutos a 37°. La reacción se detiene agregando 0,1 volúmenes de EDTA 0,5M pH 8,0 y se incuba a 60° por 30 minutos. Posteriormente se realiza una extracción con fenol y el DNA se precipita con etanol.

B.7.- Estimación de la concentración de DNA en geles de agarosa

Cuando se tienen cantidades muy pequeñas de DNA, que no permiten determinar su concentración por absorbancia a 260 nm, se puede estimar su concentración en geles de agarosa. Esta técnica consiste en analizar uno a dos μl del DNA de concentración desconocida en un gel de agarosa junto con distintas cantidades de un DNA patrón. Luego se compara la intensidad de la banda de DNA teñida con bromuro de etidio con la intensidad de la banda del fragmento de DNA patrón de tamaño más cercano y de esta forma se determina su concentración.

B.8.- Ligación de fragmentos de DNA a plásmidos

Para la reacción de ligación se incuban 10 a 20 ng del vector digerido y desfosforilado con 50 a 100 ng del fragmento durante 16 a 20 horas a 16° . La mezcla de reacción se realiza en un volumen final de 10 μl al cual se le ha agregado 1 μl de la solución amortiguadora que viene incluida con la enzima (300mM Tris-HCl, pH 7,8; 100mM MgCl_2 ; 100mM DTT y 10mM ATP) y 1 unidad de DNA ligasa del fago T4.

B.9.-Preparación de células competentes para la transformación

El procedimiento que se describe a continuación fue el utilizado para transformar las cepas de *E.coli* AG-1 o BL-21(DE3) :

Se inoculan 10 ml de medio LB con la cepa de bacteria a transformar y se incuba a 37° durante toda la noche. Al otro día se transfieren 0,2 ml de este cultivo a 50 ml de medio fresco y se incuba a 37° por 2 a 3 horas hasta alcanzar una absorbancia a 600 nm de 0,3 – 0,4. Las células se centrifugan en un tubo estéril a $750 \times g$ por 10 minutos y luego se resuspenden en la mitad del volumen original de una solución de CaCl_2 50 mM enfriada a 0°C . Después de incubarlo en hielo por una hora, se vuelve a

centrifugar y las bacterias se suspenden entonces en 0,1 volumen de la misma solución de CaCl_2 .

B.10.- Transformación de bacterias con DNA

Para realizar la transformación se incuban 0,2 ml de células competentes y la mezcla de ligación o 10 ng de DNA plasmidial en tubos estériles de vidrio por 1 hora a 0° . Luego se les da a las células un pulso térmico, incubándolas por 2 minutos a 42° y devolviéndolas inmediatamente al hielo. Posteriormente se les agregan 50 μl de medio LB e incuban a 37° por 30 minutos. En seguida se pipetea el contenido del tubo sobre una placa de agar LB ampicilina y se distribuye en forma homogénea con una pipeta Pasteur doblada en forma de triángulo. Las placas se incuban a 37° durante toda la noche.

Es conveniente siempre hacer un control de la transformación, para lo cual se incuban las células competentes sin DNA y luego se siembran sobre una placa de agar con ampicilina y otra sin ampicilina para calcular la viabilidad bacteriana después del procedimiento de transformación.

B.11.- Preparación de DNA plasmidial en pequeña escala

Para preparar DNA plasmidial en pequeña cantidad, se siguió el procedimiento descrito por Birnboim y Doly (1979), el cual consiste en lo siguiente :

Se toman las colonias transformantes y se crecen en 3 ml de medio LB con ampicilina a 37° durante toda la noche. La mitad de cada cultivo (1,5ml) se traspa a tubos de microcentrífuga y el resto se guarda a 4°C . Las bacterias se colectan por centrifugación a $12.000 \times g$ por 5 minutos y luego se incuban 5 minutos a temperatura ambiente con 100 μl de una solución de lisis que contiene glucosa 50 mM; Tris-HCl 25 mM pH 8,0 y

EDTA 10 mM. Posteriormente se agregan 200 μ l de una solución que contiene NaOH 0,2 N y SDS al 1% y se incuba 5 minutos en hielo. A continuación se agregan 150 μ l de una solución de acetato de potasio 5M y ácido acético 3M y se incuba de nuevo 5 minutos en hielo. Los tubos se centrifugan nuevamente a $12.000 \times g$ por 5 minutos y el sobrenadante se traspasa a otro tubo de microcentrífuga. Se realiza una extracción con un volumen de fenol : cloroformo : alcohol isoamílico (24:24:1), y el DNA plasmidial contenido en la fase acuosa se precipita con etanol. El DNA obtenido se resuspende en 50 μ l de una solución que contiene Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1mM y ribonucleasa pancreática 20 μ g/ml. Finalmente el plásmido purificado se digiere con la enzima de restricción adecuada y se analiza en un gel de agarosa la presencia del inserto.

Las colonias bacterianas que contienen al plásmido recombinante son guardadas a -20° en medio de cultivo LB con ampicilina y glicerol al 50%.

B.12.- Preparación de DNA plasmidial en gran escala

Para preparar DNA plasmidial en mayor cantidad se siguió el método del polietilenglicol descrito por Sambrook y cols. (1989), el cual permite obtener entre 0,5 a 1 mg de DNA plasmidial puro a partir de 1 litro de cultivo. A continuación se describe el procedimiento experimental seguido:

Se crece durante toda la noche a 37° , un litro de medio LB con ampicilina inoculado con 1 ml de cultivo fresco de bacterias que contienen el plásmido. Al día siguiente, se colectan las bacterias por centrifugación a $2.500 \times g$ por 20 minutos y se resuspenden en 10 ml de una solución que contiene glucosa 50 mM; Tris-HCl 25mM pH 8,0 y EDTA 10mM. Después de incubar la suspensión por 5 minutos a temperatura ambiente, se agregan 20 ml de una solución que contiene NaOH 0,2N y SDS al 1% y se

incuba 5 minutos en hielo. En seguida se adicionan 15 ml de una solución que contiene acetato de potasio 5M y ácido acético 3M y se incuba de nuevo en hielo. Las bacterias lisadas se centrifugan a $20.000 \times g$ por 30 minutos y al sobrenadante obtenido se le agregan 0,6 volúmenes de alcohol isopropílico. Después de incubar 15 minutos a temperatura ambiente se centrifuga nuevamente a $20.000 \times g$ por 10 minutos, se descarta el sobrenadante y el precipitado se lava con etanol al 70% y se seca al vacío. El precipitado se resuspende en 3 ml de amortiguador TE y luego se le agregan 3 ml de LiCl 5M y se deja precipitar por 10 minutos a temperatura ambiente. En esta etapa precipita el RNA de alto peso molecular el cual es eliminado por centrifugación a $12.000 \times g$ por 10 minutos. Al sobrenadante obtenido se le agrega un volumen de isopropanol y después de una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente se centrifuga a $12.000 \times g$ por 10 minutos. El DNA se lava con etanol al 70%, se seca y se resuspende en 0,5 ml de amortiguador TE conteniendo ribonucleasa A, a una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$. Después de incubar el DNA a 37° por 30 minutos se le agregan 0,5 ml de una solución que contiene NaCl 1,6 M y polietilenglicol 8.000 al 13% (p/v) y se deja precipitando a 4°C por una hora. En esta etapa el DNA plasmidial es precipitado selectivamente y se colecta por centrifugación a $12.000 \times g$ por 10 minutos a 4° . Posteriormente al DNA resuspendido en 400 μl de amortiguador TE, se le efectúan tres extracciones : una con un volumen de fenol, otra con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (24:24:1) y una tercera con un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Finalmente se precipita el DNA, agregándole 100 μl de acetato de amonio 7,5M y 1 ml de etanol al 100%. La cantidad de DNA obtenida se determina por densidad óptica a 260 nm.

B.13.- Purificación de DNA monohebra a partir del fago M13

B.13.1.- Transformación de bacterias TG1 con el vector M13

Con la mezcla de ligación obtenida al incubar el DNA doble hebra de M13 (digerido con la enzima de restricción adecuada y desfosforilado) con el fragmento que se desea secuenciar, se transforman células TG1. Las bacterias transformadas se crecen en placas Petri conteniendo agar H en presencia de IPTG al 0,02% y X-gal al 0,033%. Estos compuestos permiten diferenciar las colonias que han adquirido el fago M13 recircularizado de las que poseen el fago recombinante, ya que el fragmento insertado interrumpe el gen de la β galactosidasa y se obtienen placas blancas en lugar de azules.

B.13.2.- Preparación de DNA monohebra

Se toma una placa blanca y se incuba en 3 ml de medio 2XYT que contiene 15 μ l de un cultivo de bacterias TG1 por 6 a 7 horas a 37°. Terminado este período, las bacterias son sedimentadas por centrifugación durante 20 minutos a 4.000 $\times g$. Al sobrenadante se le agregan 300 μ l de una solución compuesta por polietilenglicol al 20% y NaCl 2,5 M y los fagos se dejan precipitando por 15 minutos a temperatura ambiente. Se centrifuga nuevamente a 8.000 $\times g$ por 10 minutos y el sobrenadante se remueve en forma completa. Los fagos obtenidos se resuspenden en 500 μ l de TE y se le adiciona 10 μ l de SDS al 20% y 4 μ l de proteinasa K 10 mg/ml y se incuban a 37° por 30 minutos. Finalmente el DNA se purifica por sucesivas extracciones con fenol, fenol:cloroformo (1:1), cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se precipita con etanol.

B.14.- Purificación del DNA de fagos mediante la técnica del CTAB

B.14.1.- Infección de bacterias *E.coli* Y1090 con fagos λ gt10 recombinantes.

Se inoculan 50 ml de medio LB-TAM con una colonia (o 10 μ l de un cultivo concentrado guardado en glicerol al 50% a -20°C) de *E.coli* Y1090 y se crece a 37° durante toda la noche. Luego se centrifuga a 3.000 rpm por 10 minutos a 4° y las bacterias precipitadas se resuspenden en 25 ml (1/2 del volumen) de MgCl_2 10mM.

Para realizar la infección, se agregan los siguientes componentes en tubos de vidrio estériles : 50 μ l de medio LB-TAM, 50 μ l de una dilución apropiada de los fagos en medio SM y 200 μ l de bacterias Y1090 2 \times en MgCl_2 10 mM. Los tubos se incuban a 37° por 40 a 60 minutos para permitir que el fago se adsorba a la superficie de la bacteria y la infecte. Luego se agrega a cada tubo 3 ml de medio LB-TAM conteniendo agar al 0,5% a una temperatura de alrededor de 50° e inmediatamente la solución es vertida sobre placas Petri con medio LB-TAM-sólido. Las placas se dejan enfriar a temperatura ambiente por media hora para dejar solidificar la capa superior de agar y luego se incuban a 37° por 8 a 10 horas o durante toda la noche.

B.14.2.- Extracción de fagos.

Se agrega 1 ml de medio SM a cada placa y con una pipeta Pasteur estéril doblada en forma de triángulo se desprende la capa de agar de la superficie y se transfiere a un tubo cónico de 50 ml. El resto del agar y fagos se arrastran de la placa con 2 a 3 ml de medio SM, se agrega un par de gotas de cloroformo y se incuba a 37° por 10 minutos para extraer los fagos del agar. Finalmente se centrifuga a 4.000 rpm por 10 minutos para separar el sobrenadante que contiene los fagos.

B.14.3.- Purificación del DNA de los fagos.

El DNA de los fagos se purificó de acuerdo a la técnica descrita por Del Sal y cols. (1989) según el procedimiento que se describe a continuación: El lisado que contiene los fagos se trata con DNAsa I a una concentración final de 20 µg/ml (o 20 U/ml), a temperatura ambiente, por 20 minutos y luego se centrifuga a $8.000 \times g$ por 10 minutos. Luego el sobrenadante se transfiere a otro tubo y se le agrega gelatina a una concentración final de 50 µg/ml. En seguida se agrega un volumen de resina DEAE celulosa DE-52 (equilibrada previamente en Tris-HCl 10 mM pH 7,0; EDTA 1 mM y azida al 0,01% y lavada dos veces con un volumen de medio LB, antes de ser usada) y se incuba a temperatura ambiente por 10 minutos invirtiendo el tubo periódicamente. Al sobrenadante obtenido, después de remover la resina por centrifugación, se le agrega EDTA a una concentración final de 20 mM y proteinasa K a una concentración de 50 µg/ml. Luego se incuba a 45° por 15 minutos, se agrega 0,1 volumen de una solución de CTAB al 5% p/v en 0,5 M NaCl y se vuelve a incubar a 68° por 3 minutos. Después de enfriar en hielo por 5 minutos, se centrifuga a $12.000 \times g$ por 10 minutos y se descarta el sobrenadante. El precipitado se resuspende en 0,2 volúmenes (del lisado inicial) de NaCl 1,2 M y se agregan 2,5 volúmenes de etanol a -20°C y se mezcla. El DNA precipitado se centrifuga, se lava con etanol al 75% y luego se resuspende en TE o agua.

B.15.- Secuenciación del DNA de doble hebra

El DNA fue secuenciado de acuerdo al método descrito por Sanger y Coulson (1975) que consiste en utilizar didesoxinucleótidos y que permite secuenciar tanto DNA de hebra simple como doble. Para secuenciar el

DNA de doble hebra se siguió una modificación del método descrito por Zhang y cols. (1988) y que se detalla a continuación:

Se desnaturan 2 a 5 μg de DNA (purificado por el método del polietilenglicol o por centrifugación en gradiente de cloruro de cesio) en 30 μl de un medio que contiene NaOH 0,2 N, durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego el DNA se neutraliza por la adición de 3 μl de acetato de amonio 2M y se precipita agregando 70 μl de etanol al 100% e incuba a -20° por una hora. Después de centrifugar a $10.000 \times g$ por 15 minutos a 4° , el DNA se lava con etanol al 70% y resuspende en 10 μl de un medio que contiene Tris-HCl 40 mM pH 7,5; MgCl_2 20 mM; NaCl 25 mM y 3 pmoles del oligonucleótido que se usará como partidor en la reacción de secuenciación. Esta mezcla se incuba a 37° por 30 minutos para permitir la hibridación entre el DNA y el partidor. Posteriormente se realiza la etapa de extensión de las hebras de DNA, para lo cual se le agregan a los 10 μl de la etapa anterior 5,5 μl de un medio que contiene DTT, SequenaseTM, dCTP, dGTP, dTTP y $[\alpha^{35}\text{S}]$ dATP y se incuba 5 minutos a temperatura ambiente (la concentración final en el medio durante la extensión del DNA es: DTT=10mM; dCTP=dGTP= dTTP= 0,2 μM ; $[\alpha^{35}\text{S}]$ dATP= 0,3 μM [1000 Ci/mmol] y Sequenase 2 a 3 unidades). El siguiente paso consiste en agregar a la reacción uno de los didesoxinucleótidos (ddATP, ddCTP, ddGTP o ddTTP) lo cual provoca la terminación de la cadena. Para ello se preparan 4 tubos Eppendorf de 0,5 ml, marcados con la letra A, G, C o T y se les agregan 2,5 μl de una solución que contiene NaCl 50 mM, los cuatro desoxinucleótidos a una concentración de 80 μM y el respectivo didesoxinucleótido a una concentración de 8 μM . A cada uno de estos tubos se le agregan 3,5 μl de la mezcla de secuenciación y se incuban por 5 minutos a 37° . La reacción se detiene agregando 4 μl de una solución

que contiene formamida al 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol al 0,05% y xilencianol al 0,05%. Las reacciones de secuenciación se guardan a -20° y posteriormente se analizan en geles de poliacrilamida.

B.16.- Secuenciación del DNA de hebra simple

La secuenciación se realiza de igual forma que para el DNA de doble hebra, con la diferencia que en este caso no es necesario desnaturar el DNA. Para ello se toma 1 μ g de DNA y 0,5 a 1 pmol del partidor universal de M13 y se lleva a un volumen final de 10 μ l con el mismo medio usado para la secuenciación de DNA de doble hebra (Tris-HCl 40 mM pH 7,5; $MgCl_2$ 20 mM y NaCl 25 mM). Luego se incuba 5 minutos a 65° , se deja enfriar lentamente a temperatura ambiente y se continúa con la etapa de extensión igual que en el otro caso.

B.17.- Geles de poliacrilamida para analizar reacciones de secuencia

Para hacer el gel, se preparan 60 ml de una solución que contiene amortiguador TBE 1 \times (Tris-borato 89 mM; EDTA 2 mM), acrilamida al 6% (razón acrilamida/bisacrilamida de 19:1) y urea 8 M. Después de filtrar la solución se toman 2 ml a los cuales se le agregan 4 μ l de TEMED y 8 μ l de persulfato de amonio al 25% y se introducen rápidamente por un costado de los vidrios para que se forme un tapón en la parte inferior del gel. Una vez que ha polimerizado, se agregan al resto de la solución, 40 μ l de TEMED y 80 μ l de persulfato al 25 %, la solución se transfiere con una jeringa plástica de 60 ml, dentro de los vidrios y se colocan las peinetas dejando los dientes mirando hacia afuera. El gel se deja polimerizando en forma horizontal por por lo menos una hora. Posteriormente, para realizar la corrida, se sacan las peinetas y se colocan esta vez con los dientes hacia adentro del gel para formar los

pocillos, y luego el gel se monta en la cámara de electroforesis. El gel se precorre por 15 a 20 minutos a 1.800 V para que se entibie, y luego se cargan las muestras que han sido previamente calentadas a 80° por 3 minutos. La electroforesis se realiza en amortiguador TBE 1 × y se corre a un voltaje de entre 1.600 a 1.800 V. Una vez terminada la corrida, el gel se transfiere a papel filtro Whatman 3M, se seca y se somete a autorradiografía.

B.18.- Amplificación de DNA por PCR

La reacción de amplificación se realiza en un volumen final de 50 µl que contiene los siguientes componentes: Tris-HCl 10 mM pH 9,0; KCl 50 mM; MgCl₂ 1,5 mM; Tritón al 0,1%; dATP 0,2 mM; dCTP 0,2 mM; dGTP 0,2 mM; dTTP 0,2 mM; partidores 0,4 a 0,8 µM y Taq polimerasa 0,2 a 0,5 unidades. Como DNA molde se usan entre 50 a 100 pg de un plásmido puro, y entre 10 a 50 ng de DNA genómico o de DNA proveniente de una genoteca. La amplificación se lleva a cabo incubando primero 5 minutos a 95° para desnaturar completamente el DNA y luego se realizan 25 a 30 ciclos que consisten en incubar 1 minuto a 95°, luego 1 minuto a una temperatura variable (entre 37° y 60° dependiendo de la temperatura de fusión de los partidores usados) y 1 minuto a 72° para que se realice la elongación del DNA. Al final se hace una incubación de 5 a 10 minutos a 72° para que se terminen de polimerizar todas las cadenas.

Los productos amplificados se analizan en geles de agarosa corriente o en Nu-Sieve agarosa dependiendo del tamaño de los fragmentos sintetizados.

B.19.- Subclonamiento de los fragmentos amplificados por PCR

El producto obtenido por amplificación por PCR se purifica por membrana de DEAE y luego se trata con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I, para lo cual el medio de reacción es suplementado con los siguientes componentes: dNTPs 0,2 mM; Tris-HCl 50 mM pH 7,5; MgSO₄ 10 mM; DTT 0,1 mM; BSA 50 µg/ml y 2 U de DNA polimerasa Klenow. El DNA se incuba 15 minutos a temperatura ambiente y luego se inactiva la enzima incubando 10 minutos a 65°. Posteriormente se hace un segundo tratamiento con polinucleótido quinasa del fago T4 (PNK) para lo cual se lleva la mezcla de reacción a ATP 1 mM; DTT 15 mM y 20 U de PNK y se incuba 40 minutos a 37°. En seguida se realizan tres extracciones: una con fenol, otra con fenol/cloroformo(1:1) y otra con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y el DNA se precipita con etanol. Después de lavar el DNA con 70% de etanol y secarlo, se resuspende en 20 µl de agua y se hace una estimación de la concentración en un gel de agarosa. Finalmente, el fragmento se liga a un vector (que ha sido cortado con una enzima de restricción que deje extremos romos y desfosforilado), de acuerdo al protocolo de ligación ya mencionado.

B.20.- Marcación de fragmentos de DNA por el método de "random priming"

Para realizar la marcación del DNA, se toman 25 a 50 ng del fragmento y se incuba a 100° durante 5 minutos. El DNA desnaturado se enfría rápidamente en hielo y se incuba a 37° por 1 a 2 horas en un volumen final de 30 µl de un medio que contiene : Tris-HCl 20 mM pH 8,0; Hepes 200 mM pH 6,6; dGTP 20 µM; dCTP 20 µM; dTTP 20 µM; DTT 2mM; MgCl₂ 10 mM; 5 a 6 unidades de DO₂₆₀ de oligonucleótidos hexaméricos; 50 µCi de [α -³²P] dATP y 5 U de DNA polimerasa Klenow. La reacción se

detiene agregando 2 μ l de EDTA 500 mM y calentando a 100° por 2 minutos. Finalmente se toma 1 μ l de la mezcla de reacción y se diluye 200 veces en agua. De esta dilución se colocan 10 μ l sobre un filtro de fibra de vidrio y se lava 3 veces con 50 ml de TCA helado al 10%. Una vez seco el filtro, se cuenta la radiactividad incorporada y se calcula la actividad específica del fragmento marcado.

B.21.- Análisis de la genoteca de cDNA

B.21.1.- Titulación de la genoteca

Para efectuar el análisis primario de una genoteca es necesario conocer previamente el número de placas de lisis/ml (PFU/ml) de la suspensión patrón de fagos recombinantes, ya que se deben colocar aproximadamente 10.000 placas de lisis por placa Petri (Abramowitz y cols. 1988). Para determinar entonces el número de fagos/ml que contiene la genoteca, se hacen diluciones seriadas de esta suspensión patrón en medio SM con las cuales se infectan bacterias *E.coli* Y1090 de la siguiente manera:

Se inoculan 50 ml de medio LB/TAM con una colonia aislada de bacterias Y1090 y se crece a 37°C durante toda la noche. El cultivo se centrifuga a 3.000 rpm por 10 minutos a 4°C y el precipitado bacteriano se resuspende en la mitad del volumen original (25 ml) de una solución de MgCl₂ 10 mM, obteniéndose una solución dos veces más concentrada en bacterias (Y1090 2 x). Para realizar la infección, se preparan una serie de tubos de vidrio estériles a los cuales se les agrega los siguientes componentes: 50 μ l de medio LB/TAM, 50 μ l de las diluciones seriadas de los fagos y 200 μ l de la solución de bacterias Y1090 2x. Los tubos se incuban a 37°C por 40 a 60 minutos para permitir que los fagos se adsorban a la superficie de las bacterias y se produzca la infección. Terminada la incubación se

agrega a cada tubo 4 ml de medio LB/TAM con agar al 1% que se encuentra a una temperatura de entre 40°C a 50°C. Inmediatamente se vierte todo el contenido del tubo sobre una placa Petri de 100 mm que contiene agar al 1% en medio LB/TAM y se extiende en forma homogénea sobre la superficie de la placa. La capa superior de agar se deja solidificar a temperatura ambiente y luego se incuban las placas en posición invertida a 37°C por 4 a 5 horas hasta que aparezcan las placas de lisis. Para determinar el título de fagos, se eligen 2 o 3 placas que tengan un número adecuado de placas de lisis y conociendo la dilución que tenía cada una de ellas, se calcula el número de fagos/ml de la suspensión patrón.

B.21.2.- Infección y transferencia de los fagos a filtros de nitrocelulosa

Para el análisis de la genoteca se utilizó el método descrito por Abramowitz y cols. (1988), para lo cual se preparan 15 placas de Petri con un número aproximado de 10.000 placas de lisis en cada una. La infección se realiza como ya se describió anteriormente y las placas de lisis se transfieren a filtros de nitrocelulosa embebidos previamente en bacterias *E.coli* Y1090. La transferencia de los fagos a los filtros se hace por duplicado para poder distinguir las verdaderas señales de los falsos positivos, y para poder ubicar después las señales positivas en la placa se hacen 3 orificios en los filtros y en el agar de la placa. Posteriormente, los filtros son incubados a 37°C durante toda la noche sobre placas de agar LB con ampicilina, con el objeto de amplificar el número de fagos transferidos y obtener una mejor señal. A la mañana siguiente los filtros son removidos de las placas y colocados por 15 minutos sobre un papel filtro embebido en NaOH 0,5 N y NaCl 1,5 M para desnaturar el DNA de

los fagos. Luego los filtros son neutralizados colocándolos primero sobre un filtro embebido en Tris-HCl 1M pH 7,5 por 15 minutos y después en otro filtro embebido en Tris-HCl 0,5 M pH 7,5 y NaCl 1,5 M por otros 15 minutos. Finalmente, los filtros se incuban sobre una solución de SSC 2 × (NaCl 0,3M; citrato de Na 30 mM pH 7,0) por 15 minutos, se secan a temperatura ambiente y luego se incuban a 68° durante 2 horas en una estufa para fijar el DNA a la nitrocelulosa.

B.21.3.- Prehibridación e hibridación

Antes de realizar la prehibridación, los filtros se lavan por 30 minutos a 68°C en una solución que contiene Denhardt 5×, SDS al 0,5% y EDTA 10 mM pH 8,0 para remover el residuo bacteriano presente en la superficie de ellos. En seguida se realiza la prehibridación de los filtros que consiste en realizar una incubación durante 4 horas, a una temperatura que varía dependiendo de la estrictez que se quiera tener (mientras más alta la temperatura, mayor va a ser la estrictez y más exigentes las condiciones de hibridación), en una solución que contiene SSC 6×, Denhardt 5×, fosfato de sodio 300 mM pH 6,8, SDS al 0,1% y DNA de espermio de salmón 100 µg/ml. El volumen de solución usado, depende del número de filtros y debe ser suficiente como para que los cubra completamente. Este tratamiento se hace con el objeto de bloquear los sitios inespecíficos de unión de los filtros con el DNA.

Una vez prehibridados los filtros, se realiza la hibridación que consiste en hacer una incubación durante toda la noche con igual volumen de la misma solución y a la misma temperatura que se realizó la hibridación, pero agregando un volumen de la sonda radiactiva (calentada a 100°C durante 2' y enfriada rápidamente en hielo antes de ser agregada a la solución de hibridación) de manera de obtener una actividad específica de

entre 300.000 a 500.000 cpm/ml de solución de hibridación. Posteriormente se lavan los filtros a distintas temperaturas (se empieza a temperatura ambiente y luego se va aumentando hasta que el filtro blanco, que se prepara de una placa Petri que contiene las mismas bacterias, pero que no han sido infectadas con fagos, no tenga radiactividad) en una solución de SSC cuya concentración depende de la estrictez que se quiera tener. Finalmente se secan los filtros y se someten a autorradiografía.

Nota : La estrictez de la hibridación y el lavado de los filtros, depende de la temperatura y de la concentración de la solución SSC, y se elige de acuerdo al experimento, dependiendo si se quiere facilitar o hacer más exigente las condiciones de hibridación de la sonda con el DNA.

B.21.4.- Identificación de las placas de lisis positivas

De las placas autorradiográficas se identifican las señales positivas y se eligen las que se repiten en el duplicado. Luego se toman las placas Petri originales (que habían sido guardadas a 4°C), se las coloca sobre la placa autorradiográfica haciendo coincidir los 3 puntitos del filtro con los de la placa y se saca un bocado de agar con la parte posterior de una pipeta Pasteur. Estos bocados se guardan en 1 ml de medio SM con una gota de cloroformo a 4°C.

B.21.5.- Purificación de los fagos positivos

De los bocados aislados se purifican los fagos positivos, haciendo un segundo y tercer análisis si es necesario, hasta obtener un único tipo de fago λ recombinante (cada placa de lisis debe corresponder a una señal en la placa autorradiográfica).

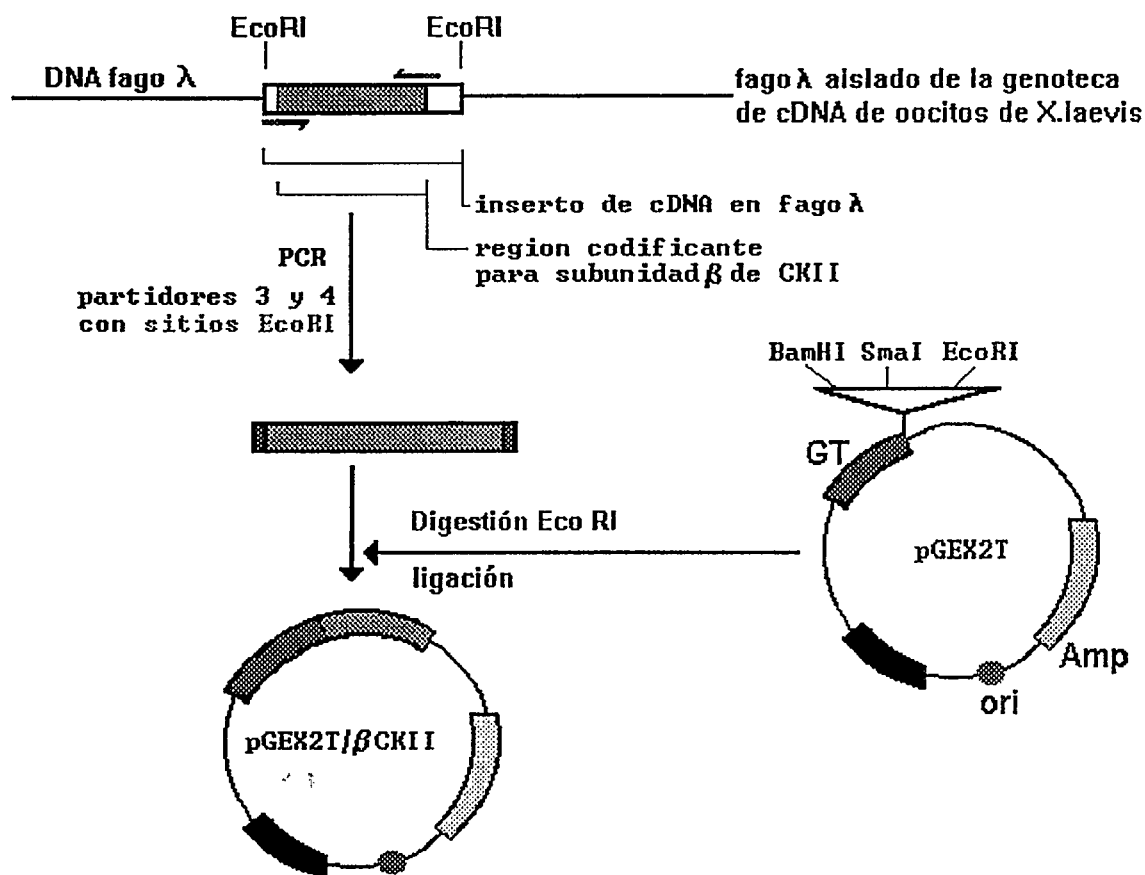
B.22.- Subclonamiento del gen que codifica para la subunidad β en el vector de expresión pGEX-2T

Para subclonar el gen de la subunidad β en el vector de expresión se necesita tener en ambos extremos de la región codificante sitios de restricción adecuados, los cuales fueron introducidos de acuerdo al siguiente procedimiento :

Se amplifica por PCR la región codificante de la subunidad β usando los partidores #3 y #4 (ver lista de partidores) y como molde se usa el DNA del fago λ aislado de la genoteca. El producto amplificado obtenido se digiere con la enzima EcoRI, se purifica por membrana DEAE y luego se liga al vector previamente digerido y desfosforilado (ver **Esquema 1**). Con la mezcla de ligación se transforman bacterias *E.coli* BL-21(DE3) y luego se seleccionan las colonias transformantes en placas LB con ampicilina.

Se toman 10 colonias transformantes y se crecen a 37° en 3ml de LB con ampicilina durante toda la noche. Luego se toma 1,5 ml de cada cultivo y se purifica el DNA plasmidial por el método del minilisado descrito anteriormente. (Los 1,5 ml de cultivo restantes se guardan para hacer un concentrado en glicerol al 50%). Los DNA purificados se digieren con EcoRI y luego se analizan en geles de agarosa al 1%. De las 10 colonias transformantes analizadas, cuatro contenían un inserto de alrededor de 600 pb correspondientes al fragmento subclonado.

Con el objeto de determinar la orientación del fragmento dentro del vector, se hacen digestiones dobles con las enzimas de restricción BamHI y PstI y luego se analizan los productos en geles de agarosa al 1%. De los 4 plásmidos que contenían el inserto de 600 pb, dos estaban en la orientación correcta y dos en la orientación inversa.



Esquema 1 : Subclonamiento del gen de la subunidad β en el vector PGEX-2T

expresión de la proteína por 2 horas, incubando a la misma temperatura. Finalmente, las bacterias se colectan por centrifugación en botellas plásticas de 250 ml y se continúa con su procesamiento inmediatamente o se guardan a -80° .

B.23.- Expresión de la subunidad β

Para la expresión y purificación de la subunidad β se siguió el protocolo descrito por Smith y Johnson (1988), el cual se detalla a continuación : Se crecen a 37°C durante toda la noche 50 ml de medio LB con ampicilina inoculados con una colonia de bacterias BL21(DE3) transformada con el plásmido recombinante pGEX-2T/gen de la subunidad β . A la mañana siguiente se transfieren 20 ml de este cultivo a 1 litro de medio LB con ampicilina y se crece a 37°C por 4 horas. En seguida se agregan al cultivo 5ml de IPTG 100 mM (0,5 mM concentración final) y se induce la expresión de la proteína por 2 horas, incubando a la misma temperatura. Finalmente, las bacterias se colectan por centrifugación en botellas plásticas de 250 ml y se continúa con su procesamiento inmediatamente o se guardan a -80°C.

B.24.- Purificación de la proteína de fusión

Las bacterias provenientes de 1 litro de cultivo se resuspenden en 20 ml de PBS y se sonicán 4 veces por 15 segundos a una potencia de 200 Watts. Al sonicado se le agregan 2ml de Tritón X-100 al 10% (1% concentración final) y se centrifuga a 10.000 rpm por 30 minutos en un rotor Sorvall SS-34. Luego se separa el sobrenadante y se carga en una columna de glutatión-agarosa de 1ml equilibrada en PBS con Tritón al 1%. La columna se lava posteriormente con 50 ml de PBS y 1% Tritón X-100, y la proteína de fusión se eluye con una solución de glutatión 20 mM recién preparada en amortiguador Tris-HCl 100mM pH 8.0. Se colectan 6 fracciones de 1ml, y se analizan en un gel de poliacrilamida al 10% con SDS al 0,1%. Las fracciones que contienen la proteína de fusión de 52 kDa se combinan y se dializan contra 2 litros de Tris-HCl 20 mM pH 7,4 y NaCl 150 mM.

B.25.- Tratamiento de la proteína de fusión con trombina

A la proteína de fusión dializada se le agrega una solución de trombina en una proporción de 0,2 a 1% p/p y se incuba a 30°C por 1 hora. Posteriormente se analiza en geles de poliacrilamida si la digestión fue completa.

B.26.- Microsecuenciación de la subunidad β recombinante

La subunidad β recombinante obtenida, fue enviada a microsecuenciar al Servicio de Péptidos y Proteínas LANAIS-PRO de Buenos Aires. Para ello la proteína se prepara de la siguiente manera :

La proteína de fusión se purifica y luego se digiere con trombina de acuerdo al protocolo ya descrito. Posteriormente se separa la glutatión transferasa de la subunidad β haciendo una recromatografía por glutatión agarosa. La subunidad β purificada, se somete a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12% y se transfiere a una membrana de PVDF desde donde es directamente microsecuenciada.

B.27.-Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

La electroforesis en geles de poliacrilamida se realizó de acuerdo al método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970), el cual se detalla a continuación :

Las muestras a analizar se resuspenden en amortiguador Tris-HCl 62,5mM pH 6,8; SDS al 1%; glicerol al 10%; β -mercaptoetanol al 5% y azul de bromofenol al 0,02% y se incuban a 100°C por 5 min. Luego las muestras se aplican en geles de poliacrilamida al 10% o 12% en presencia de SDS al 0,1% y la electroforesis se corre a un voltaje constante de 100-150 Volts. Una vez finalizada la electroforesis, los geles se tiñen en una solución que contiene ácido acético, metanol y agua en

una proporción de 1:5:5 y azul de Coomassie al 0,1% por una hora y se destiñen en ácido acético al 10 %.

B.28.- Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas se determina con el reactivo de Bradford de BIO-RAD usando como proteína estándar seroalbúmina de bovino de acuerdo al procedimiento descrito por el fabricante.

B.29.- Determinación de la actividad enzimática de la CK2

La actividad enzimática de la CK2 se determina en un volumen final de 50 μ l de una solución que contiene : Hepes 50mM pH 7,8; MgCl₂ 10 mM; DTT 1mM; caseína 5mg/ml; [γ ³²P] ATP 50 μ M (400-500 cpm/pmol) y NaCl 100-150mM. La reacción se hace partir con la adición de la enzima y se incuba por 10 minutos a 30°C. Para detener la reacción se toman 45 μ l del medio de incubación los cuales se adsorben en trocitos de papel Whatmann P81 de 1,5 \times 1,5 cm. Posteriormente, los papelitos se lavan 3 veces por 10 minutos en una solución de ácido fosfórico 75mM, se secan y luego se cuentan en un contador de centelleo.

B.30.- Autofosforilación de las subunidades α y β de la CK2

La reacción de autofosforilación se realiza incubando las subunidades α y β bajo las mismas condiciones descritas para la determinación de actividad, pero omitiendo la caseína. En este caso se realiza una incubación de 30 minutos y se detiene la reacción agregándole 0,2 volúmenes de la solución de muestra de Laemmli 5 \times . Posteriormente, las muestras se analizan en geles de poliacrilamida y se someten a autorradiografía.

En algunos casos la radiactividad incorporada se cuantifica, cortando la banda de proteína del gel correspondiente a la subunidad α y β y luego contándola en el contador de centelleo.

B.31.- Estudio de la interacción entre las subunidades α y β por centrifugación en gradiente de sacarosa

Para estudiar la interacción entre la subunidad α y las distintas mutantes de la subunidad β , se preincubaban 50 pmoles de subunidad α con 50 pmoles de subunidad β a 4°C por 10 horas (en algunos casos como con la mutante $\beta\Delta^{179-215}$ se usaron razones de β/α mucho mayores). Posteriormente, las muestras se aplican sobre una gradiente lineal de sacarosa de entre 5 y 25 % preparada en amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7,5 y NaCl 0,3 M y se centrifugan a 45.000 rpm por 15 horas en un rotor Sorvall AH-650. Una vez finalizada la centrifugación, se colectan fracciones de 200 μ l y se mide la actividad enzimática a una alícuota de 30 μ l. Paralelamente se corren también en la gradiente proteínas patrón, cuyas fracciones se precipitan con TCA y luego se analizan en geles de poliácridamida. Las proteínas patrón usadas fueron : BSA (PM=68 KDa), ovoalbúmina (PM=45 KDa) y citocromo C (PM=12,5 KDa).

B.32.- Síntesis de mutantes de la subunidad β

B.32.1.- Lista de genes mutantes de la subunidad β sintetizadas

β **S^{2,3} → G** : las serinas 2 y 3 fueron mutadas a glicina.

β **S²⁰⁹ → G** : la serina 209 fue mutada a glicina

β **$\Delta^{179-215}$** : se delecionaron 37 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la proteína

β **P⁵⁸ → A** : la prolina 58 fue mutada a alanina

β **P⁵⁸ → Y** : la prolina 58 fue mutada a tirosina

β **D²⁶E²⁷D²⁸ → A** : los aspárticos 26 y 28 y el glutámico 27 fueron mutados a alanina

β **D⁵⁹E⁶⁰E⁶¹ → A** : los glutámicos 60 y 61 y el aspártico 59 fueron mutados a alanina

β **D⁵⁵E⁵⁷D⁵⁹E⁶⁰E⁶¹ → A** : los glutámicos 57,60 y 61 y los aspárticos 55 y 59 fueron mutados a alanina

β **H^{151,152,153} → A** : las histidinas 151,152 y 153 fueron mutadas a alanina

β **C^{137,140} → A** : las cisteínas 137 y 140 fueron mutadas a alanina

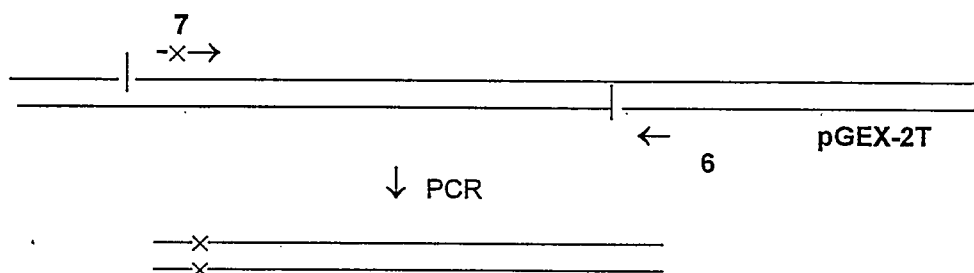
Todas las mutaciones fueron introducidas por amplificación por PCR usando como DNA molde el gen de la subunidad β silvestre subclonado en el vector pGEX-2T y los partidores descritos anteriormente. Para realizar las distintas mutaciones se siguieron tres estrategias diferentes, las cuales se detallan a continuación.

32.2.- Construcción de las mutantes $\beta S^{2,3} \rightarrow G$, $\beta S^{209} \rightarrow G$ y $\beta \Delta^{179-215}$

Estas mutantes se sintetizaron introduciendo las mutaciones en los partidores usados para amplificar el gen, aprovechando el hecho que éstas se encuentran en los extremos.

Mutante $\beta S^{2,3} \rightarrow G$:

Las serinas 2 y 3 de la subunidad β se mutaron a glicina utilizando para la amplificación los partidores 6 y 7, que contienen sitios de restricción para EcoRI, y una temperatura de hibridación de 45°C de acuerdo al siguiente esquema:



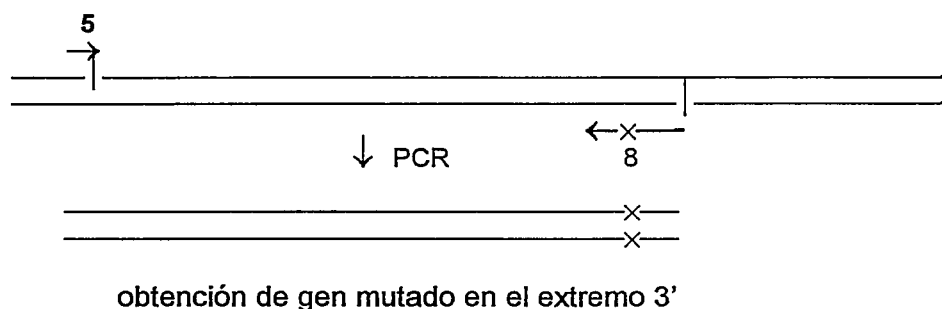
obtención de gen mutado en el extremo 5'

El fragmento amplificado fue digerido con EcoRI, purificado por membrana de DEAE y ligado al vector pGEX-2T previamente digerido con EcoRI y desfosforilado.

Esquema 2 : Síntesis de la mutante $\beta S^{2,3} \rightarrow G$ mediante amplificación por PCR

Mutante β S²⁰⁹ → G:

La serina 209 de la subunidad β fue mutada a glicina utilizando los partidores 5 y 8 y una temperatura de hibridación de 45°C de acuerdo al siguiente esquema.

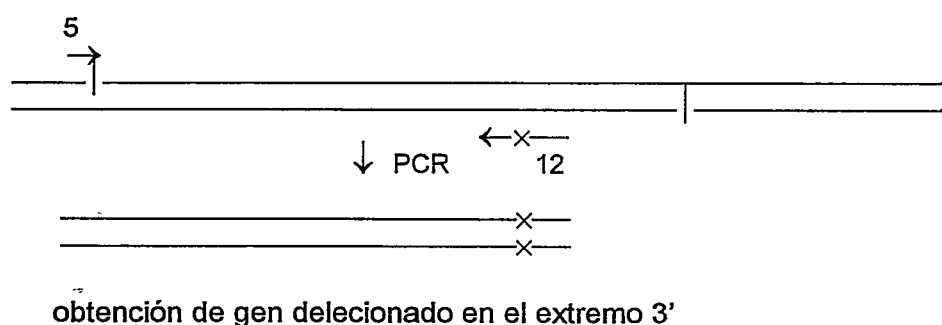


El fragmento amplificado fue tratado de igual forma y ligado al mismo vector.

Esquema 3 : Síntesis de la mutante β S²⁰⁹ → G mediante amplificación por PCR

Mutante β Δ ¹⁷⁹⁻²¹⁵:

Para producir esta deleción se amplificó un trozo del gen utilizando los partidores 5 y 12, que contiene un codón de término, y una temperatura de hibridación de 40°C.

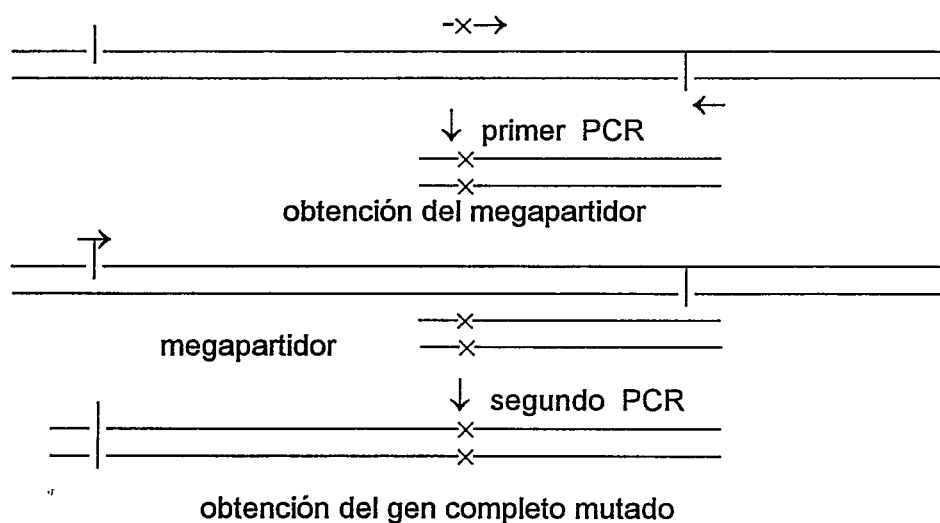


El fragmento obtenido fue digerido con EcoRI y subclonado en el mismo vector.

Esquema 4 : Síntesis de la mutante β Δ ¹⁷⁹⁻²¹⁵ mediante amplificación por PCR

B.32.3.- Construcción de las mutantes $\beta P^{58} \rightarrow A$, $\beta P^{58} \rightarrow Y$, $\beta C^{137,140} \rightarrow A$ y $\beta D^{26}E^{27}D^{28} \rightarrow A$

Estas mutantes se sintetizaron de acuerdo al método del megapartidor (Sarkar y Sommer, 1990) como se muestra en el siguiente esquema.



Esquema 5 : Síntesis de las mutantes $\beta P^{58} \rightarrow A$, $\beta P^{58} \rightarrow Y$, $\beta C^{137,140} \rightarrow A$ y $\beta D^{26}E^{27}D^{28} \rightarrow A$ de acuerdo al método del megapartidor

Para mutar un gen por el método del megapartidor, se realizan dos amplificaciones por PCR . Primero se realiza una amplificación usando un partidor interno que contiene la mutación y otro partidor de un extremo del gen, obteniéndose en esta etapa un fragmento llamado megapartidor que contiene en uno de sus extremos la mutación deseada. El fragmento obtenido se purifica por membrana de DEAE, y luego se utiliza como partidor en un segundo PCR junto con un partidor contra el otro extremo del gen. De esta segunda amplificación se obtiene el gen completo mutado, el cual es posteriormente subclonado en el vector correspondiente.

Mutante β P⁵⁸ → A:

La prolina 58 de la subunidad β fue mutada a alanina utilizando el método del megapartidor descrito anteriormente. Para ello se sintetiza primero un fragmento del gen realizando una amplificación con los partidores 9 y 6, y el fragmento obtenido llamado megapartidor se purifica por membrana de DEAE y luego se utiliza junto con el partidor 5 para amplificar el gen completo. El DNA obtenido se digiere con EcoRI, se purifica por membrana de DEAE y se subclona en el vector pGEX-2T.

Mutante β P⁵⁸ → Y:

La prolina 58 de la subunidad β fue mutada a tirosina por el método del megapartidor descrito anteriormente. Para sintetizar el megapartidor se realiza primero un PCR con los partidores 10 y 6 y luego se usa este fragmento purificado en un segundo PCR junto con el partidor 5. El gen amplificado se subclona de igual forma que el anterior.

Mutante β D²⁶E²⁷D²⁸ → A:

Los aspárticos 26 y 28 y el glutámico 27 fueron mutados a alanina también por el método del megapartidor. Para ello se sintetiza el megapartidor con los partidores 11 y 6 y luego para el segundo PCR se utiliza el partidor 5. El gen mutado obtenido se trata de igual forma y se subclona en el mismo vector.

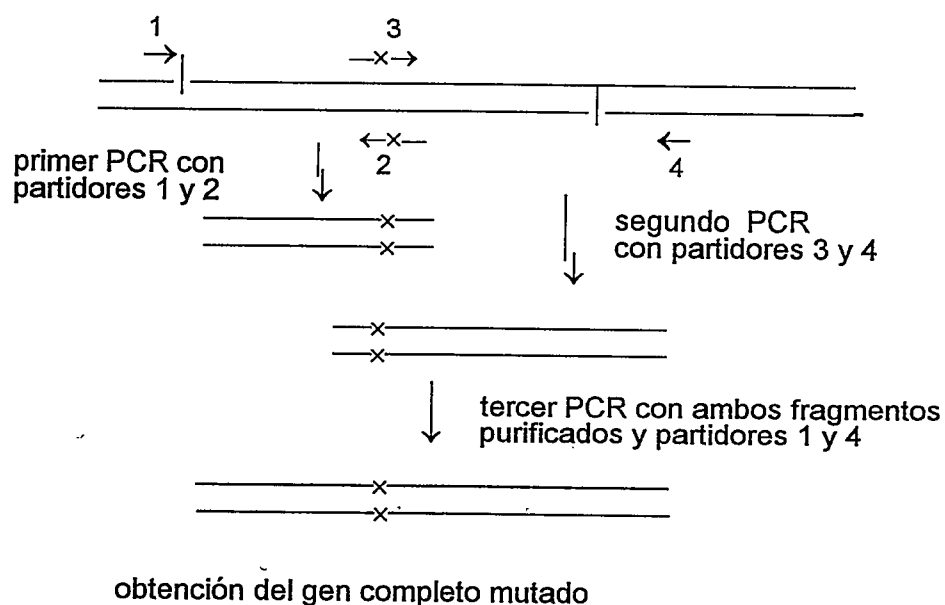
Mutante β C^{137,140} → A:

Las cisteínas 137 y 140 fueron mutadas a alanina también por el método del megapartidor. En este caso el megapartidor se sintetiza a partir de los partidores 5 y 13 y luego en la segunda amplificación se usa el partidor 6.

Igual que para las otras mutantes el gen se subclona en el sitio EcoRI del vector pGEX-2T.

**B.32.4.- Construcción de las mutantes $\beta H^{151,152,153} \rightarrow A$,
 $\beta D^{59}E^{60}E^{61} \rightarrow A$ y $\beta D^{55}E^{57}D^{59}E^{60}E^{61} \rightarrow A$**

Estas mutantes fueron sintetizadas de acuerdo al método de extensión de fragmentos sobrepuestos (Ho y cols., 1989) de acuerdo al siguiente esquema:



Esquema 6 : Síntesis de las mutantes $\beta H^{151,152,153} \rightarrow A$, $\beta D^{59}E^{60}E^{61} \rightarrow A$ y $\beta D^{55}E^{57}D^{59}E^{60}E^{61} \rightarrow A$, mediante el método de extensión de fragmentos sobrepuestos

Este método consiste en amplificar 2 fragmentos del gen a partir de un partidor interno que contiene la mutación y de un partidor de uno de los extremos. Los partidores internos deben ser complementarios, para permitir posteriormente que las hebras de los fragmentos sintetizados hibriden en esa región complementaria y puedan ser luego elongadas para poder producir el gen completo mutado.

Mutante β H^{151,152,153} \rightarrow A:

Las histidinas 151,152 y 153 fueron mutadas a alanina de acuerdo al método de extensión de fragmentos sobrepuestos ya descrito. Para ello se utilizan los partidores 14 y 14' que contienen la mutación y que son complementarios entre sí y los partidores 5 y 6 correspondientes a cada extremo del gen.

Mutante β D⁵⁹,E⁶⁰,E⁶¹ \rightarrow A:

El aspártico 59 y los glutámicos 60 y 61 fueron mutados a alanina siguiendo el método de extensión de fragmentos sobrepuestos descrito anteriormente. Con los partidores 5 y 15' se sintetiza uno de los fragmentos y con los partidores 6 y 15 el otro. Posteriormente a partir de los dos fragmentos purificados, se sintetiza el gen completo mutado el cual se subclona en el vector pGEX-2T.

Mutante β D⁵⁵,E⁵⁷,D⁵⁹,E⁶⁰,E⁶¹ \rightarrow A :

EL aspártico 55 y el glutámico 57 fueron mutados a alanina por el método de extensión de fragmentos sobrepuestos, usando en este caso para la amplificación, el DNA de la subunidad β ya mutada en los residuos D⁵⁹, E⁶⁰, E⁶¹ \rightarrow A y subclonada en el pGEX-2T. Para uno de los fragmentos se usaron los partidores 5 y 16', y para el otro fragmento el 6 y 16. El gen completo mutado se subclona en el mismo vector de igual forma que en los casos anteriores.

NOTA: Las secuencias de todos los DNA de las mutantes sintetizadas fueron corroboradas en forma completa por secuenciación por doble hebra. La secuenciación se realizó con los partidores 5 y 6 a partir de los genes subclonados en pGEX-2T.

RESULTADOS

A.- Clonamiento del gen que codifica para la subunidad β de la CK2 de oocitos de *Xenopus laevis*.

A.1.- Síntesis de un fragmento del gen de la subunidad β para utilizar como sonda en el análisis de la genoteca.

Mediante amplificación por PCR se sintetizó un fragmento de 380 pb del gen de la subunidad β de *Xenopus laevis*. Esta amplificación se realizó usando como molde el DNA preparado del conjunto de fagos de una genoteca de cDNA de oocitos de *Xenopus laevis* y los partidores #1 y #2 (ver lista de partidores en Materiales y Métodos) diseñados a partir de la secuencia del gen humano y de *Drosophila* que ya habían sido publicados. La amplificación se realizó de acuerdo a las condiciones que se indican en Materiales y Métodos usando una temperatura de 52° en la etapa de hibridación entre los partidores y el DNA.

En la **Figura 4** se muestra el fragmento amplificado a partir del DNA de *Xenopus laevis* y de *Drosophila*, que se usó como control positivo en la reacción de amplificación, digerido con varias enzimas de restricción. De las digestiones realizadas se puede concluir que los fragmentos amplificados de ambas especies son diferentes, ya que sólo el DNA de *Xenopus laevis* es cortado con HinfI y con PstI ambos fragmentos son digeridos pero en lugares diferentes.

Para corroborar la identidad del fragmento amplificado, éste se subclonó en el DNA del fago M13 como se describe en Materiales y Métodos y se

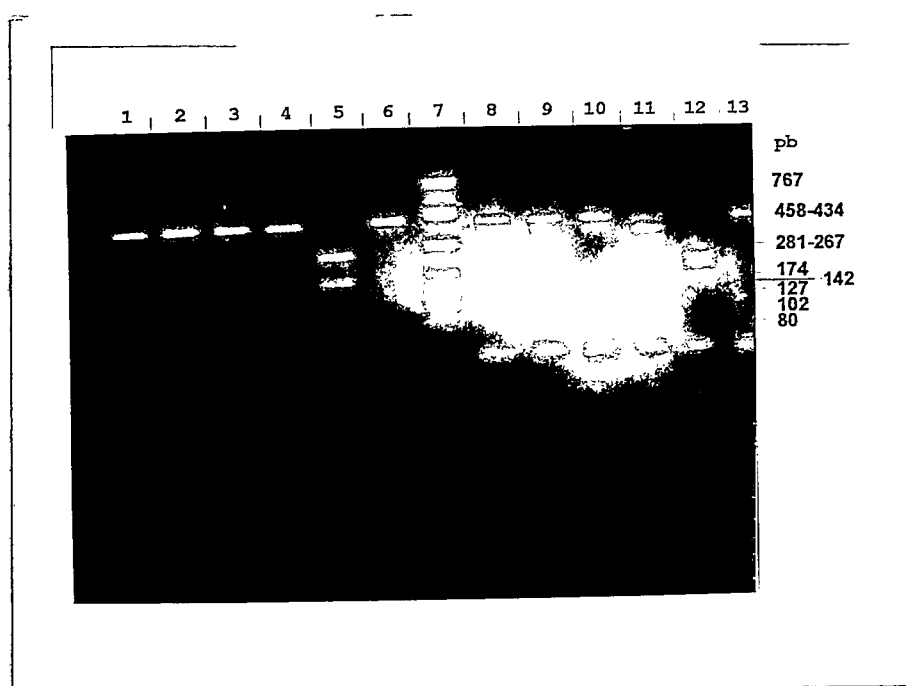


Figura 4 : Análisis en gel de Nusieve agarosa de los fragmentos del gen de la subunidad β de *Xenopus laevis* y *Drosophila melanogaster* amplificados por PCR.

Los fragmentos amplificados por PCR fueron digeridos con distintas enzimas de restricción y luego sometidos a electroforesis en un gel de Nusieve agarosa al 3% de acuerdo a como se indica en Materiales y Métodos. En los carriles 1 al 6 se muestra el fragmento amplificado del DNA de *Drosóphila* y en los carriles 8 al 13 el fragmento amplificado del DNA de *Xenopus laevis*. En los carriles 1 y 8 se presenta el fragmento sin digerir, en los 2 y 9 los DNA digeridos con EcoRI, en los 3 y 10 los digeridos con BamHI, en los 4 y 11 los digeridos con HinfI, en los 5 y 12 los digeridos con PstI y en los 6 y 13 los digeridos con HindIII. En el carril 7 se colocó un DNA estandar de los tamaños indicados en el costado de la figura.

secuenció. La secuencia obtenida correspondía a un trozo del gen de la subunidad β por lo que el fragmento se marcó por "random priming" y se utilizó como sonda para el análisis de la genoteca.

A.2.- Análisis de la genoteca.

Se analizaron alrededor de 150.000 placas de lisis distribuidas en 15 placas Petri siguiendo el procedimiento descrito en Materiales y Métodos usando para cada placa 50 μ l de una dilución de 1/10.000 de la genoteca. El lavado final de los filtros se realizó a 65° en solución SSC 2 \times .

Como resultado de este análisis primario se obtuvieron 20 señales positivas, de las cuales se eligieron seis para ser sometidas a análisis secundario.

Para realizar el análisis secundario se hicieron diluciones de 1/100.000 de la solución obtenida al incubar cada bocado de agar en 1 ml de medio SM. De las seis señales analizadas sólo una fue negativa y de los cinco clones restantes se pudo sacar bocados conteniendo una sola placa de lisis, los cuales fueron sometidos a un análisis terciario.

En la **Figura 5A** y **5B** se muestra la autoradiografía del filtro primario y su filtro réplica obtenidos del análisis primario y secundario respectivamente de la placa de la cual se aisló el fago cuyo inserto fue secuenciado y que contenía el gen de la subunidad β de *Xenopus laevis*. En el caso de esta placa sólo se obtuvo una señal positiva en el análisis secundario, lo cual se debió probablemente a que había un menor número de fagos positivos en el bocado sacado del análisis primario. En las demás placas del análisis secundario se obtuvo entre tres y doce señales positivas.

El análisis terciario se realizó de la misma forma que el análisis secundario, pero la dilución de los fagos usada fue de 1/ 5.000. En este

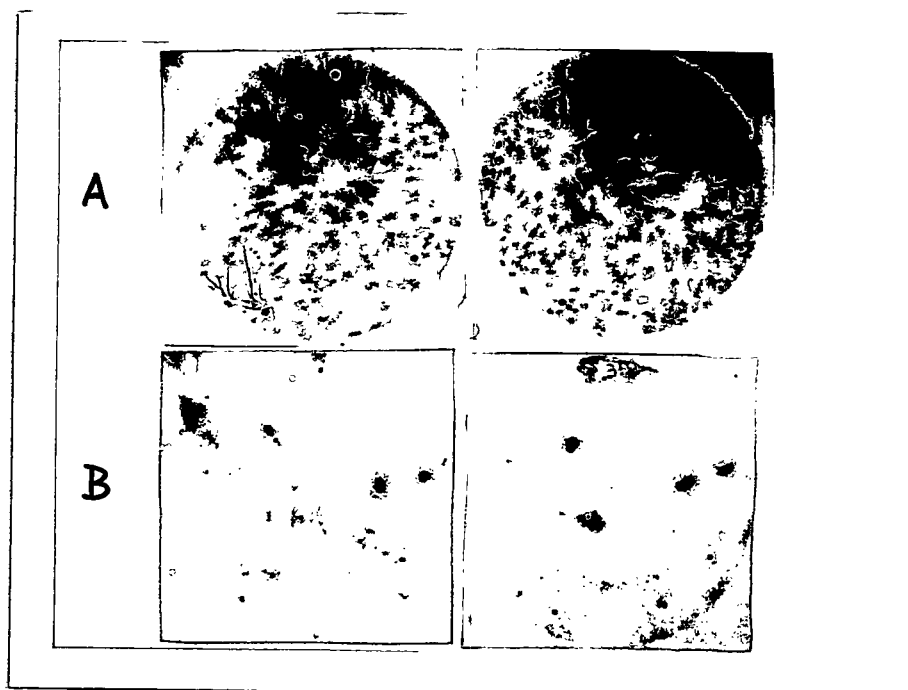


Figura 5 : Análisis de la genoteca de cDNA de oocitos de *Xenopus laevis*.

El análisis de la genoteca se realizó como se indica en Materiales y Métodos usando como sonda el fragmento de 380 pb amplificado por PCR. En A se muestra la autorradiografía obtenida del análisis primario y en B se muestra la del análisis secundario. La autorradiografía de la derecha corresponde al filtro primario y la de la izquierda al filtro réplica.

caso la intensidad de las señales obtenidas fue mucho mayor y cada placa de lisis correspondió a una señal en la placa autorradiográfica, lo cual nos indicó que los fagos recombinantes aislados se encontraban puros.

A.3.- Purificación y análisis del DNA de los fagos recombinantes aislados.

Los fagos aislados de la genoteca fueron amplificados y su DNA purificado de acuerdo al método del CTAB (Del Sal y cols.,1989). Posteriormente el DNA de los fagos fue digerido con EcoRI y sometido a electroforesis en gel de agarosa. En lá **Figura 6** se muestra una fotografía del gel obtenido, en la cual se pueden observar los insertos liberados al digerir con EcoRI cada DNA. Como puede apreciarse, todos los fagos analizados presentaron insertos de distinto tamaño, presentando el fago del clon 3 el inserto de menor tamaño (560 pb) y el fago del clon 4 el inserto de mayor tamaño (alrededor de 900 pb.).

El DNA que contenía el inserto de mayor tamaño (correspondiente al clon 4) fue digerido en mucho mayor cantidad y el fragmento liberado fue purificado por membrana de DEAE.

A.4.- Secuenciación del fragmento de DNA del fago recombinante aislado.

El fragmento de 900 pb que contenía el fago λ gt10 aislado de la genoteca, se subclonó en el vector M13 previamente digerido con EcoRI y desfosforilado, y con este DNA se transformaron bacterias JM-105. Se obtuvo gran cantidad de placas transformantes blancas de las cuales se tomaron seis y se purificó el DNA de hebra simple de los fagos M13.

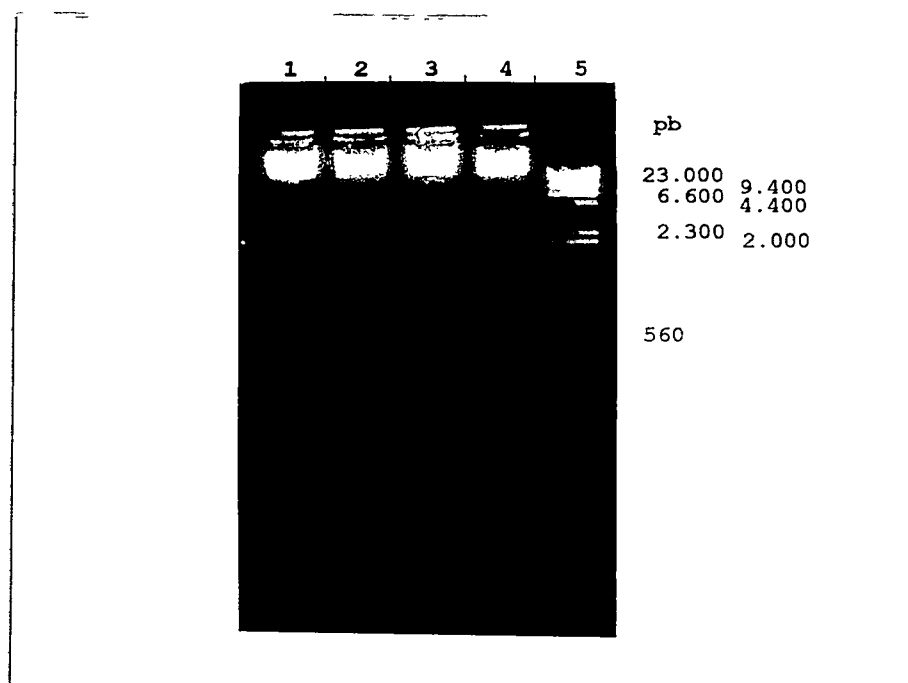


Figura 6 : Análisis en gel de agarosa del DNA de los fagos aislados de la genoteca y digeridos con EcoRI.

Los DNA de los fagos λ gt10 aislados de la genoteca fueron digeridos con EcoRI y luego sometidos a electroforesis en un gel de agarosa al 1% como se indica en Materiales y Métodos. En el carril 1 se muestra el DNA del clon 15, en el carril 2 el del clon 11, en el carril 3 el del clon 4 y en el carril 4 el del clon 3. En el carril 5 se colocó como estándar el DNA del fago λ cortado con HindIII.

Se secuenció el DNA de las seis muestras, usando el partidador universal de M13. En dos de los DNA secuenciados el fragmento estaba en la orientación correcta y en cuatro éste estaba en la orientación inversa, de manera que pudo obtenerse la secuencia completa del fragmento al poder secuenciarlo desde ambos extremos.

En la **Figura 7** se muestra la secuencia nucleotídica del gen de la subunidad β de la CK2 de *X. laevis* obtenida y la secuencia aminoacídica deducida del marco de lectura abierto encontrado. El fragmento de DNA que contenía el fago recombinante aislado estaba constituido por 55 nucleótidos de región 5' no codificante, por 196 de región 3' no codificante y por una región codificante de 648 nucleótidos, lo que da origen a una proteína de 215 aminoácidos con un peso molecular teórico de 24.960.

En la **Figura 8** se muestra el estudio comparativo realizado entre la secuencia aminoacídica de la subunidad β de *Xenopus laevis* y la de otras especies. Al comparar todas estas secuencias, podemos observar que el grado de conservación entre las distintas especies es extraordinario. Las secuencias de ratón y humano son idénticas y con *X. laevis* tienen sólo una diferencia en el penúltimo aminoácido. La secuencia de *Drosophila* presenta 26 diferencias de las cuales 9 son conservativas, lo que da una similitud de un 88%.

La extraordinaria conservación evolutiva de este gen es sorprendente, ya que en *Saccharomyces cerevisiae* se ha visto que no es indispensable para la viabilidad de la célula y tampoco presenta similitud con otros genes conocidos.

cggcctggccactggcttcaccctaatactcttccggcctaaccatacgctagaaa
 ATGAGTAGCTCGGAGGAGGTGCCTGGATTAGCTGGTTTTGTGGTTTAAGAGGCAATGAGTTT
 M S S S E E V S W I S W F C G L R G N E F
 TTCTGTGAGGTGGATGAAGACTATATCCAGGATAAGTTTAACCTTGACAGGACTCAATGAGCAG
 F C E V D E D Y I Q D K F N L T G L N E Q
 GTCCACACTATAGACAGGCACTGGACATGATACTGGATCTAGAACCTGATGAGGAATTGGAA
 V P H Y R Q A L D M I L D L E P D E E L E
 GATAATCCCAATCAAAGTGACCTCATTGAACAAGCTGCAGAGATGCTGTATGGACTAATCCAT
 D N P N Q S D L I E Q A A E M L Y G L I H
 GCCCGTTACATATTGACTAACCGTGGCATTTGCTCAAATGCTGGAGAAATATCAACAGGGAGAT
 A R Y I L T N R G I A Q M L E K Y Q Q G D
 TTTGGCTACTGTCCCAGAGTATACTGTGAGAACCAGCCCATGCTACCTATTGGTCTCTCAGAT
 F G Y C P R V Y C E N Q P M L P I G L S D
 ATCCCTGGGGAAGCTATGGTAAAAGTGTATGTCCCAAGTGTATGGATGTTTACACACCCAAA
 I P G E A M V K L Y C P K C M D V Y T P K
 TCTTCACGGCATCATCACACCGATGGAGCATATTTTGGCACTGGATTTCTCACATGCTTTTT
 S S R H H H T D G A Y F G T G F P H M L F
 ATGGTTCACCCTGAGTATAGGCCCAAGAGGCCTGCCAATCAATTTGTTCCAAGGTTATATGGC
 M V H P E Y R P K R P A N Q F V P R L Y G
 TTCAAAATCCACCCTATGGCATAACCAGCTTCAACTACAAGCAGCCAGCAACTTTAAAAGTCCC
 F K I H P M A Y Q L Q L Q A A S N F K S P
 GTGAAGACCATGCGTTGAttcttgcccattaaacggttattcatggggtctatacaccctgta
 V K T M R *
 aaccttatttccttccttccatcggcaatgaaaaaaaaatgtctgtttcagtgattatttgccc
 caagttttgatttttagtcctgtttaaaatgtattactgcaatttctggttgtggttaaataaa
 gttataagaatcgtaaaaaaaaaaaaa

Figura 7 : Secuencia nucleotídica y aminoacídica del gen de la subunidad β de la CK2 de *Xenopus laevis*.

Los nucleótidos subrayados corresponden a las regiones utilizadas para diseñar los partidores que se utilizaron para la amplificación por PCR del fragmento del gen que se utilizó como sonda.

Humana	MSSSEEVSWISWFCGLRGNEFFCEVDEDEYIQDKFNLTGLNEQVPHYRQ
Ratón	MSSSEEVSWISWFCGLRGNEFFCEVDEDEYIQDKFNLTGLNEQVPHYRQ
X.laev.	MSSSEEVSWISWFCGLRGNEFFCEVDEDEYIQDKFNLTGLNEQVPHYRQ
Bovino	----SEVSWISWFCGLRGNEFFCEVDEDEYIQDKFNLTGLNEQVPHYRQ
D.mel.	MSSSEEVSWVTWFCGLRGNEFFCEVDEDEYIQDKFNLTGLNEQVPHYRQ
C.eleg.	MSSSEEVSWITWFCGLRGNEFFCEVDEEYIQDRFNLTGLNEQVPHYRQ

Humana	ALDMILDLEPDEELEDNPNQSDLIEQAAEMLYGLIHARYILTNRGIAQ
Ratón	ALDMILDLEPDEELEDNPNQSDLIEQAAEMLYGLIHARYILTNRGIAQ
X.laev.	ALDMILDLEPDEELEDNPNQSDLIEQAAEMLYGLIHARYILTNRGIAQ
Bovino	ALDMILDLEPDEELEDNPNQSDLIEQAAEMLYGLIHARYILTNRGIAQ
D.mel.	ALDMILDLEPEDELEDNPLQSDMTEQAAEMLYGLIHARYILTNRGIAQ
C.eleg.	ALDMILDLEP-DDIEDNATNTDLVEQAAEMLYGLIHARYILTNRGISQ

Humana	MLEKYQQGDFGYCPRVYCENQPMLPIGLSDIPGEAMVKLYCPKCMDVY
Ratón	MLEKYQQGDFGYCPRVYCENQPMLPIGLSDIPGEAMVKLYCPKCMDVY
X.laev.	MLEKYQQGDFGYCPRVYCENQPMLPIGLSDIPGEAMVKLYCPKCMDVY
Bovino	MLEKYQQGDFGYCPRVYCENQPMLPIGLSDIPGEAMVKLYCPKCMDVY
D.mel	MIEKYQTGDFGHCPRVYCESQPMLPLGLSDIPGEAMVKTYCPKCIDVY
C.eleg	MVEKWRDHDGFCPRVYCENQPMLPIGLSDVPGGEAMVKLYCPKCNMVY
	* ** *** ***** ***** ***** ***** ***** **
Humana	TPKSSRHHHTDGAYFGTGFPHMLFMVHPEYRPKRPNQFVPRLYGFKI
Ratón	TPKSSRHHHTDGAYFGTGFPHMLFMVHPEYRPKRPNQFVPRLYGFKI
X.laev.	TPKSSRHHHTDGAYFGTGFPHMLFMVHPEYRPKRPNQFVPRLYGFKI
Bovino	TPKSSRHHHTDGAYFGTGFPHMLFMVHPEYRPKRPNQFVPRLYGFKI
D.mel	TPKSSRHHHTDGAYFGTGFPHMLFMVHPEYRPKRPTNQFVPRLYGFKI
C.eleg	TPRSSRHQHTDGSYFGTGFPHMLFFVHPDLRPRRPVTQFVPKLYGFKI
	** **** * ** ***** ** * ** * ** *
Humana	HPMAYQLQLQAASNFKSPVKTIR
Ratón	HPMAYQLQLQAASNFKSPVKTIR
X.laev.	HPMAYQLQLQAASNFKSPVKTMR
Bovino	HPMAYQLQLQAASNFKSPVKT---
D.mel	HSLAYQIQQLQAANFKMPLRAKN
C.eleg	HPVAYGGQEGNSGGNTANNVAAAQNNTTPAGQQSGGQFNNYGL
	* ** *

Figura 8 : Comparación de las secuencias aminoacídicas de las subunidades β de la CK2 de diversas especies.

Los asteriscos indican los aminoácidos que son iguales en todas las especies.

B.- Expresión y purificación de la subunidad β

B.1.-Subclonamiento del gen de la subunidad β en el vector de expresión pGEX-2T

El plásmido pGEX-2T fue elegido como vector de expresión, ya que permite la obtención de proteínas que se sintetizan fusionadas a la glutatión-S-transferasa, lo cual facilita posteriormente muchísimo su purificación a través de cromatografía por glutatión agarosa. Además, la glutatión-S-transferasa presenta en su extremo carboxilo terminal un sitio de corte por trombina que permite obtener la proteína recombinante que se desea expresar con sólo un par de aminoácidos adicionales en su extremo amino terminal. Para poder expresar el gen de la subunidad β como proteína de fusión de la glutatión transferasa, es necesario introducir en el vector sólo la región codificante y en el marco de lectura apropiado. Para ello fue necesario adicionar dos sitios EcoRI en los extremos del gen (uno antes del ATG iniciador y otro después del codón de término), lo cual se llevó a cabo por amplificación por PCR usando los partidores #3 y #4. El fragmento sintetizado fue digerido, purificado y subclonado en el vector pGEX-2T de acuerdo a como se detalla en Materiales y Métodos.

Debido a que el fragmento presenta el mismo sitio de restricción en ambos extremos, éste puede introducirse en el vector en dos orientaciones diferentes. Para determinar cual era la posición del gen de la subunidad β en el vector pGEX-2T, se realizaron digestiones dobles con las enzimas de restricción BamHI y PstI que permiten discriminar entre las dos orientaciones posibles. Si la orientación es la correcta (es decir si el ATG del gen quedó a continuación de la glutatión transferasa) se deben obtener 3 fragmentos con los siguientes tamaños: uno de 230 pb, otro de 1380 pb y otro de 4000pb, en cambio si la orientación es

la inversa se obtiene un fragmento de 450 pb, otro de 1160 pb y otro de 4000 pb.

En la **Figura 9** puede observarse que los plásmidos que se colocaron en los carriles 4 y 5 contienen el inserto en la orientación correcta ya que presentan el fragmento de 230 pb, cambio los DNA del carril 1 y 2 contienen el inserto en la orientación inversa ya que presentan el fragmento de 450 pb. El plásmido del carril 3 no contenía inserto.

De acuerdo al plásmido construido, la subunidad β recombinante presentará seis aminoácidos adicionales en su extremo aminoterminal después que la proteína de fusión haya sido digerida con trombina, los cuales son G S P G Y Q.

B.2.- Expresión de la proteína de fusión glutatión-S-transferasa subunidad β

Para expresar la proteína de fusión, el plásmido recombinante se introdujo en bacterias BL-21(DE3) y las bacterias transformantes fueron crecidas y luego, la expresión de la proteína de fusión fue inducida con IPTG, de acuerdo a como se describe en Materiales y Métodos. En la **Figura 10** se muestra un gel de poliacrilamida en el que se analizaron los extractos de bacterias inducidas. En el carril 1 se puede apreciar la aparición de una proteína de 26.000 que corresponde a la glutatión-S-transferasa expresada a partir del vector pGEX-2T. En el carril 4 se observa la expresión de una proteína de 52.000, que corresponde al tamaño de la proteína de fusión esperada entre la glutatión-S-transferasa y la subunidad β y en los carriles 2 y 3 se puede ver que cuando se expresa el vector con el gen de la subunidad β insertado en el sentido inverso, se obtiene sólo la glutatión-S-transferasa debido a la presencia de codones de término en el fragmento de DNA insertado al revés.

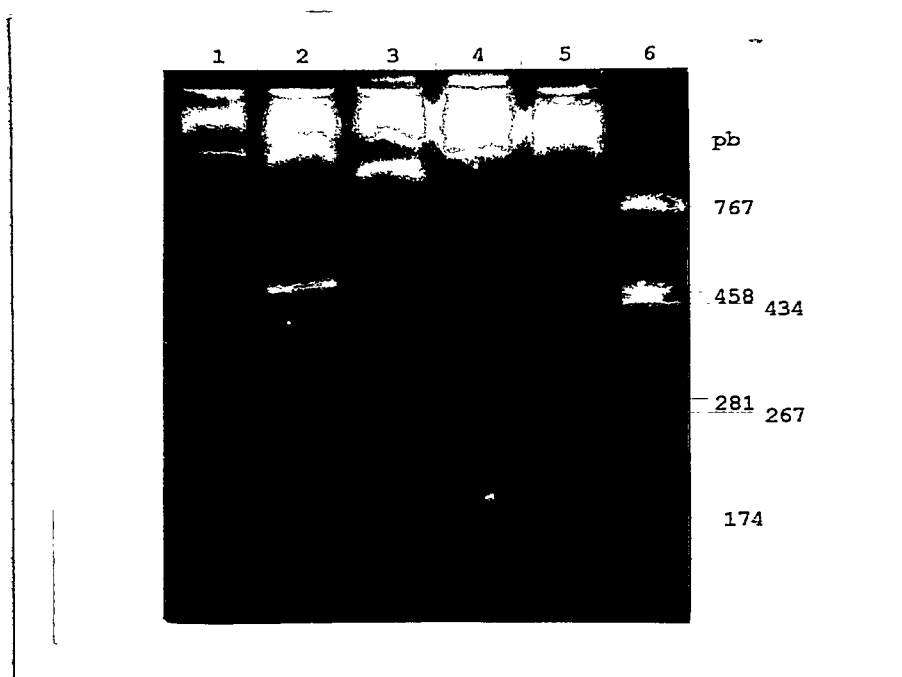


Figura 9 : Determinación de la orientación del gen de la subunidad β en el vector pGEX-2T por análisis en gel de agarosa del DNA digerido con BamHI y PstI.

Los DNA de los plásmidos recombinantes obtenidos fueron purificados y luego digeridos con las enzimas de restricción mencionadas y luego analizados en un gel de agarosa al 1% de acuerdo a como se indica en Materiales y Métodos. En los carriles del 1 al 5 se colocaron los DNA digeridos y en el carril 6 se colocó como estándar el plásmido PTZ18R digerido con HaeIII.

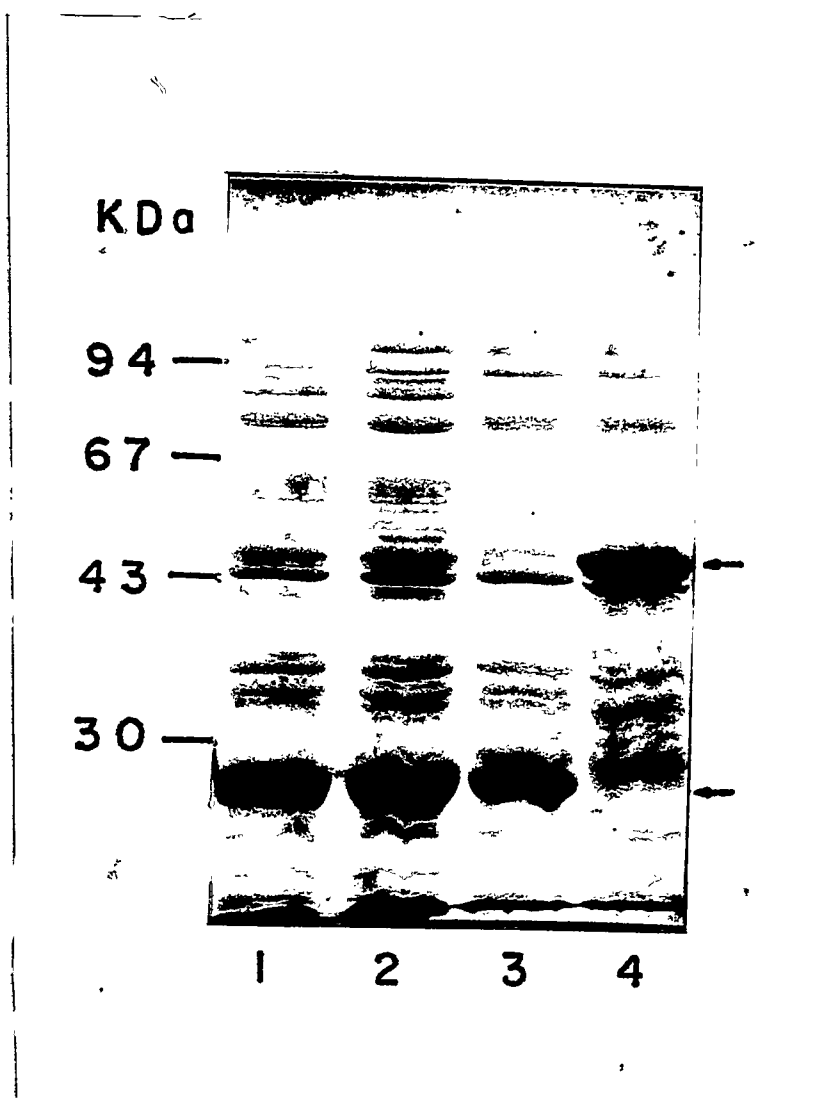


Figura 10 : Análisis en gel de poliacrilamida de las proteínas expresadas en *Escherichia coli* a partir del vector pGEX-2T.

Las bacterias transformadas con los respectivos vectores fueron crecidas y luego inducidas con IPTG por 4 horas. Posteriormente se analizaron 20 μ l de cada extracto en un gel de poliacrilamida al 10%. El carril 1 corresponde a extractos de bacterias BL-21(DE3) transformadas con el vector pGEX-2T, los carriles 2 y 3 a extractos de bacterias transformadas con el vector pGEX-2T fusionado al gen de la subunidad β en la orientación inversa y el carril 4, a extracto de bacterias transformadas con el vector pGEX-2T/gen de la subunidad β en la orientación correcta. Las flechas indican la migración de la glutatión-S-transferasa (26 KDa) y de la proteína de fusión glutatión-S-transferasa-subunidad β de la CK2 (52 KDa).

Con el objeto de determinar cual era el tiempo óptimo de inducción de la proteína de fusión en las bacterias, se hizo un experimento en que se estudió la cinética de expresión de la proteína. En la **Figura 11** se muestra un análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida de los extractos bacterianos inducidos con IPTG por distintos tiempos. Al analizar el gel se puede ver que después de 1 hora de inducción, hay bastante proteína de fusión sintetizada, sin embargo, a las 2 horas la cantidad de proteína aumenta y permanece constante después de 3 y 4 horas. Debido a que no es conveniente inducir la proteína por tiempos muy largos, ya que se favorece la formación de cuerpos de inclusión y la mayor parte de la proteína se obtiene en forma insoluble, se usó un tiempo de inducción de 2 horas.

B.3.- Purificación de la proteína de fusión y digestión con trombina

La proteína de fusión fue purificada por cromatografía en glutatión agarosa siguiendo el procedimiento descrito en Materiales y Métodos y posteriormente fue tratada con trombina para obtener a la subunidad β libre de la glutatión-S-transferasa. En la **Figura 12** se muestra un gel de poliacrilamida en el cual se analizan estas proteínas. En el carril 2 se muestra el extracto total de las bacterias inducidas con IPTG, en el carril 3 la proteína de fusión purificada por glutatión agarosa y en el carril 4 la proteína de fusión purificada y tratada con trombina. Puede observarse que en una sola etapa de purificación se obtiene la proteína de fusión de 52.000 prácticamente homogénea, y al digerir ésta con trombina se obtiene una sola banda de alrededor de 26.000. Esta banda de proteína corresponde a la mezcla de la glutatión-S-transferasa y de la subunidad β , ya que ambas proteínas presentan un peso molecular muy similar.

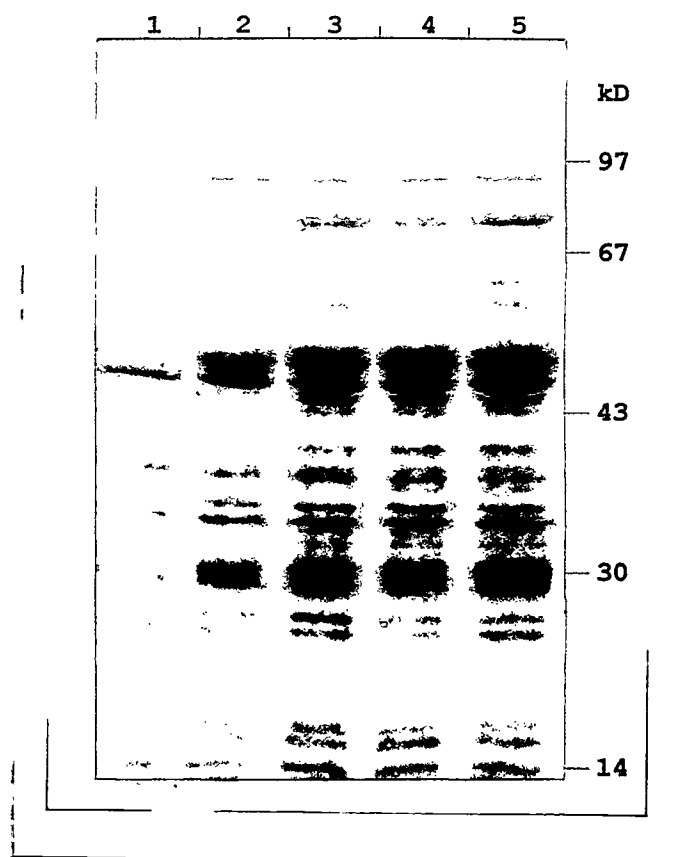


Figura 11 : Cinética de inducción de la proteína de fusión glutatión transferasa-subunidad β en *Escherichia coli*.

Bacterias BL-21(DE3) transformadas con el vector pGEX-2T/gen de la subunidad β fueron crecidas y luego inducidas con IPTG por distintos tiempos. Posteriormente se analizaron 20 μ l de cada extracto en un gel de poliacrilamida al 10 %. El carril 1 corresponde al extracto de bacterias sin inducir y los carriles 2, 3, 4 y 5 corresponden a los extractos inducidos por 1, 2, 3 y 4 horas respectivamente.

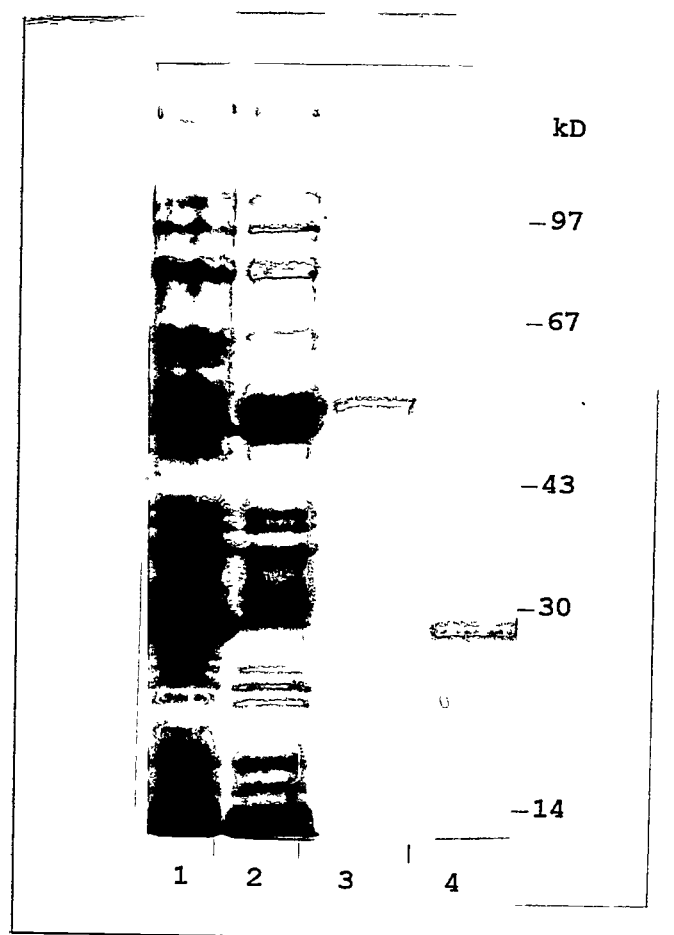


Figura 12 : Análisis en gel de poliacrilamida de la proteína de fusión glutatióntransferasa-subunidad β expresada en *E. coli* y purificada por glutatión agarosa y de la subunidad β obtenida de la proteína de fusión digerida con trombina.

Bacterias BL-21(DE3) transformadas con el vector pGEX-2T/gen de la subunidad β se crecieron y luego se indujeron con IPTG por 2 horas. Las bacterias obtenidas fueron centrifugadas y luego sonicadas de acuerdo a Métodos. El extracto bacteriano sonicado fue luego centrifugado y sometido a cromatografía por glutatión agarosa. En el carril 1 y 2 se muestran los extractos de bacterias transformadas con el vector pGEX-2T sin inserto y con el gen de la subunidad β respectivamente, los cuales fueron inducidos con IPTG. En el carril 3 se muestra la proteína de fusión purificada por cromatografía en glutatión agarosa y en el carril 4 la proteína de fusión purificada y luego tratada con trombina.

Para remover la glutatión-S-transferasa de la subunidad β , se recromatografió la proteína de fusión digerida y dializada, por glutatión agarosa. La proteína no retenida por la columna constituye la subunidad β y la proteína retenida la glutatión transferasa. Con el fin de determinar si la glutatión transferasa había sido removida completamente, ésta se eluyó de la columna y cuantificó. Se encontró que la cantidad de proteína eluída y retenida eran iguales, por lo que se concluyó que la separación había sido completa.

B.4.- Microsecuenciación de la subunidad β

Se microsecuenció el extremo aminoterminal de la subunidad β recombinante digerida con trombina y recromatografiada por glutatión agarosa. La secuencia obtenida fue la siguiente: **G S P G Y Q M ...**

Desgraciadamente, sólo se obtuvo la secuencia de la metionina inicial de la subunidad β ya que los seis primeros residuos corresponden a los aminoácidos adicionales del extremo amino. Sin embargo esto permitió comprobar que la proteína se comenzó a sintetizar correctamente y que la digestión con trombina también ocurrió en el lugar esperado.

C.- Estudio funcional de la subunidad β recombinante

C.1.- Activación de la subunidad α por la subunidad β

Para estudiar la funcionalidad de la subunidad β , se determinó su efecto sobre la actividad catalítica de la subunidad α . Para ello se incubaron cantidades equimolares de ambas subunidades y luego se midió la actividad enzimática como se describió en Materiales y Métodos.

En la **Tabla 1** se muestran los resultados obtenidos, en la cual podemos observar que la subunidad β es capaz de activar a la subunidad α en

TABLA 1: Efecto de la subunidad β recombinante y de la proteína de fusión glutatión transferasa/subunidad β sobre la actividad de la subunidad α .

	[pmoles de ^{32}P incorporados/min.] estimulación	
subunidad α	4,3	1,0
subunidad α + glutatión transferasa	4,9	1,1
subunidad α + proteína de fusión	15,8	3,7
subunidad α + subunidad β	19,9	4,6
subunidad β	0,0	0,0

Se incubaron cantidades equimolares de cada proteína y luego se determinó la actividad enzimática usando caseína como sustrato como se indica en Materiales y Métodos. La actividad obtenida en cada caso se dividió por el valor de la actividad que presentó la subunidad α monomérica y se expresó como grado de estimulación producida. La subunidad α utilizada es también recombinante, expresada en bacterias a partir del vector PT7-7 y luego purificada.

alrededor de 5 veces y que la proteína de fusión también lo hace, aunque en menor grado. Como control también se estudió a la glutatión-S-transferasa y se vio que no tenía ningún efecto sobre la actividad de la subunidad α . Estos resultados nos indican que la subunidad β expresada en bacterias es funcional y que puede interaccionar con la subunidad α y activarla, aún encontrándose fusionada a la glutatión-S-transferasa.

Con el objeto de determinar la relación estequiométrica que se requiere entre ambas subunidades para obtener la máxima estimulación, se realizó un estudio midiendo la actividad de la subunidad α a distintas concentraciones de subunidad β . En la **Figura 13** se muestra la curva de activación obtenida. En ella puede observarse que la estimulación máxima se obtiene cuando se alcanza una estequiometría entre ambas subunidades de aproximadamente 1. Ello significa que a medida que se va agregando β a la subunidad α , éstas se van asociando y se va estimulando su actividad hasta que se llega a cantidades equimolares en que toda la subunidad α se encuentra asociada a β . Si se sigue aumentando la cantidad de β por sobre la de α , ya no se observa un incremento de la actividad, ya que α se hace limitante y el exceso de β permanece libre y por lo tanto no produce ningún efecto.

C.2.- Autofosforilación de las subunidades α y β y efecto de polilisina y heparina.

Para estudiar la autofosforilación de las subunidades α y β , éstas se incubaron con [γ ^{32}P] ATP de acuerdo a las condiciones que se describen en Materiales y Métodos. En la **Figura 14** se muestra la autorradiografía del gel en que se analizaron las proteínas fosforiladas. En primer lugar puede observarse que la autofosforilación de la subunidad α monomérica es bajísima, pero cuando ésta se incuba junto con la subunidad β y se

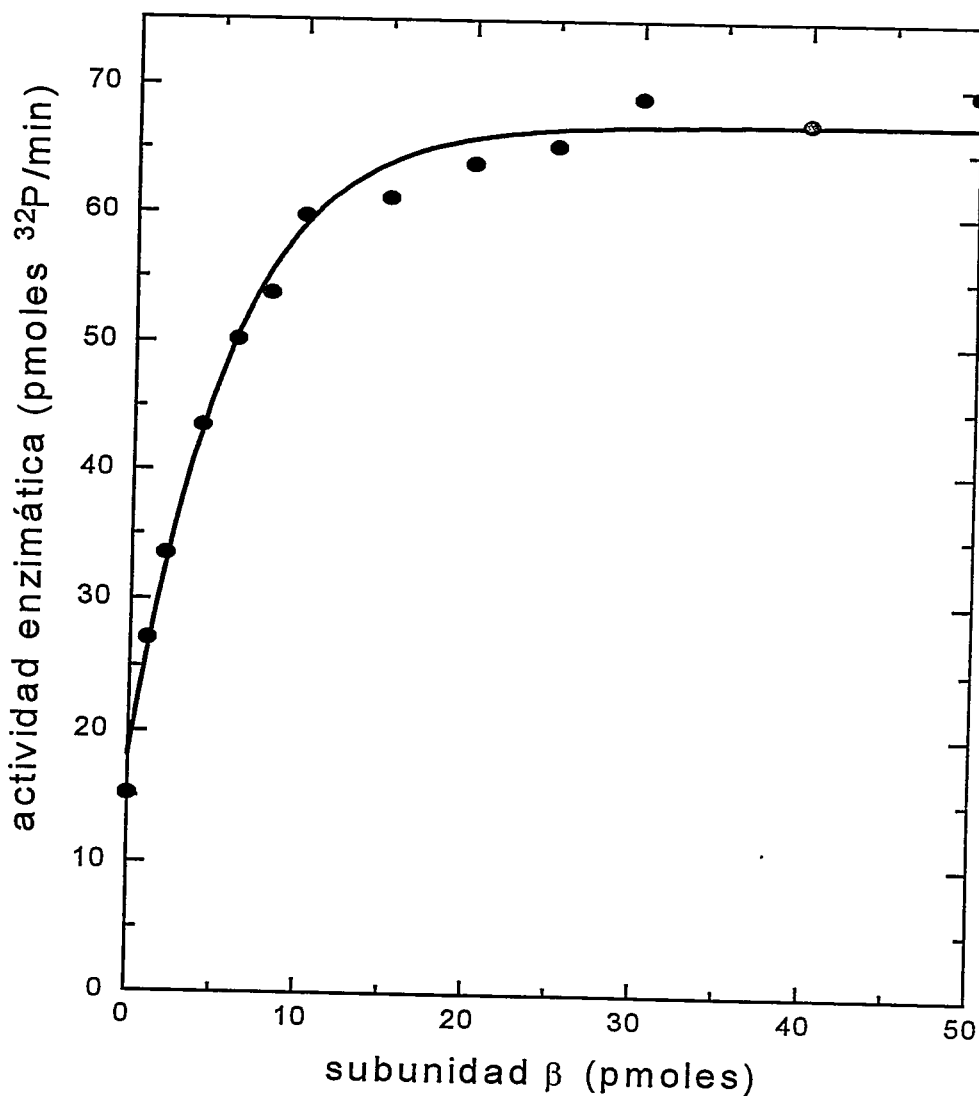


Figura 13 : Curva de estimulación de la actividad de la subunidad α por cantidades crecientes de la subunidad β recombinante.

Para estudiar la activación de la subunidad α se usaron 20 pmoles de subunidad α y cantidades crecientes de subunidad β . La actividad enzimática se midió usando caseína como sustrato y se incubó por 10 minutos a 30° de acuerdo a como se indica en Materiales y Métodos.

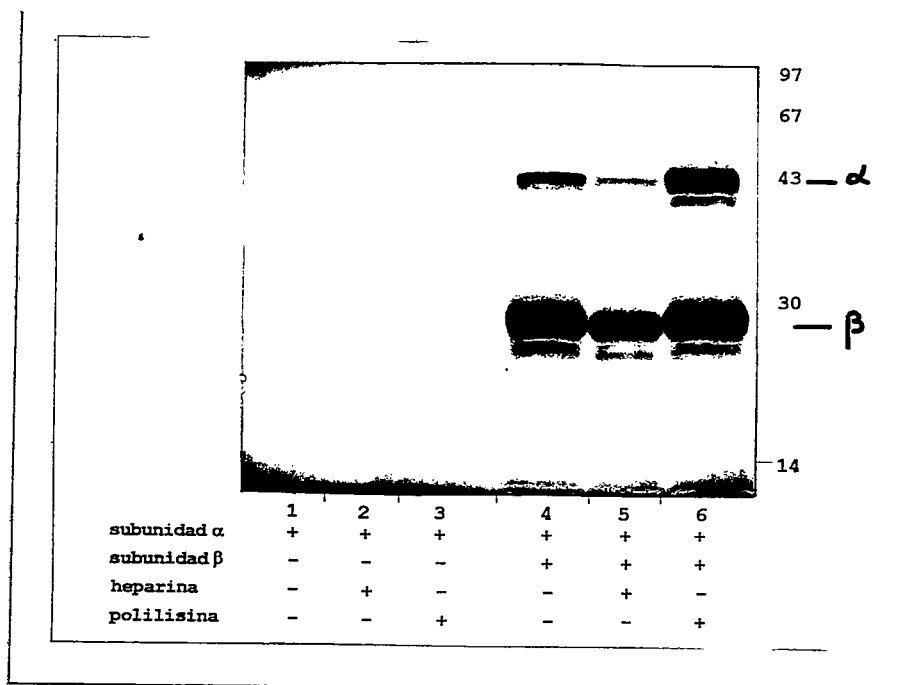


Figura 14 : Autofosforilación de las subunidades α y β y efecto de heparina y polilisina en su fosforilación.

La reacción de autofosforilación se realizó incubando las proteínas con [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP de acuerdo a las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Posteriormente, las proteínas fosforiladas se analizaron en un gel de poliacrilamida al 10 % y luego el gel sometido a autorradiografía. En el carril 1 se muestra la autofosforilación de la subunidad α monomérica, en el carril 2 la autofosforilación de la subunidad α incubada en presencia de heparina y en el carril 3 la autofosforilación de la subunidad α incubada en presencia de polilisina. En el carril 4 se muestra la autofosforilación de las subunidades α y β cuando se incuban juntas y en el carril 5 y 6 se muestra el efecto de heparina y polilisina respectivamente en la autofosforilación de ambas subunidades.

reconstituye la holoenzima, la autofosforilación de ésta se ve muy aumentada. Como se observa en el carril 4, la subunidad β es fosforilada muy eficientemente por la subunidad α , lo que concuerda con lo observado por otros autores.

Al estudiar el efecto de heparina sobre la autofosforilación de estas subunidades se vio que la fosforilación de α se inhibe, pero la de β prácticamente no se ve afectada. Polilisina por el contrario, no afecta la autofosforilación de la subunidad α monomérica pero sí estimula su fosforilación cuando se encuentra asociada a la subunidad β . La autofosforilación de β en cambio no se vio afectada por polilisina (comparar los carriles 4 y 6).

D.- Estudio de mutantes de la subunidad β

Con el objeto de estudiar la relación entre estructura y función de la subunidad β , se procedió a mutar diferentes residuos de esta proteína y luego se analizaron las propiedades de las proteínas mutantes obtenidas. A continuación se detallan las mutaciones introducidas en la subunidad β y la función que esta región podría tener dentro de la proteína.

β $S^{2,3} \rightarrow G$: Las serinas 2 y 3 se mutaron a glicina, ya que se postula que estos residuos serían los autofosforilados por la subunidad α .

β $D^{26}, E^{27}, D^{28} \rightarrow A$: Los aspárticos 26 y 28 y el glutámico 27 se mutaron a alanina, con el propósito de estudiar si estos tres residuos de carga negativa son importantes en la activación de la subunidad α o en la interacción con ella.

β D^{59}, E^{60} y $E^{61} \rightarrow A$: El aspártico 59 y los glutámicos 60 y 61 se mutaron a alanina, ya que estos residuos se encuentran en una región altamente ácida de la proteína y se quiere estudiar que efecto tiene esta región en la proteína.

β $D^{55}, E^{57}, D^{59}, E^{60}$ y $E^{61} \rightarrow A$: Los glutámicos 57,60 y 61 y los aspárticos 55 y 59 se mutaron a alanina para estudiar también la función de la región ácida en la proteína.

β $P^{58} \rightarrow A$: La prolina 58 se mutó a alanina para estudiar si este residuo que se encuentra en la región hiperácida de la proteína tiene algun efecto importante en la funcionalidad.

β $P^{58} \rightarrow Y$: La prolina 58 se mutó a tirosina para estudiar si la introducción de este residuo dentro de la región hiperácida afecta de alguna manera las propiedades funcionales de esta región de la subunidad β , ya que se ha visto que la CK2 presenta una muy alta afinidad por péptidos de ácido aspártico o glutámico que presentan tirosinas intercaladas.

β $C^{137,140} \rightarrow A$: Las cisteínas 137 y 140 se mutaron a alanina para estudiar si estos residuos están cumpliendo una función estructural importante, ya que se ha visto que existen 4 cisteínas en la subunidad β ($C^{109}, C^{114}, C^{137}$ y C^{140}) que se encuentran muy favorablemente ubicadas como para constituir un dedo de unión a metales.

β $H^{151,152,153} \rightarrow A$: Las histidinas 151,152 y 153 se mutaron a alanina para estudiar su posible función en la proteína.

β $\Delta^{179-215}$: Se delecionaron 37 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la proteína con el objeto de estudiar si esta región es necesaria para la interacción y estimulación de la subunidad α .

β $S^{209} \rightarrow G$: La serina 209 que se ha visto que es fosforilada por la cdc2 quinasa, se mutó a glicina para estudiar su posible efecto sobre la activación de la subunidad α .

En la **Figura 15** se muestra un resumen de las mutantes sintetizadas en que se señala la mutación y la localización aproximada de cada una de ellas dentro de la proteína.

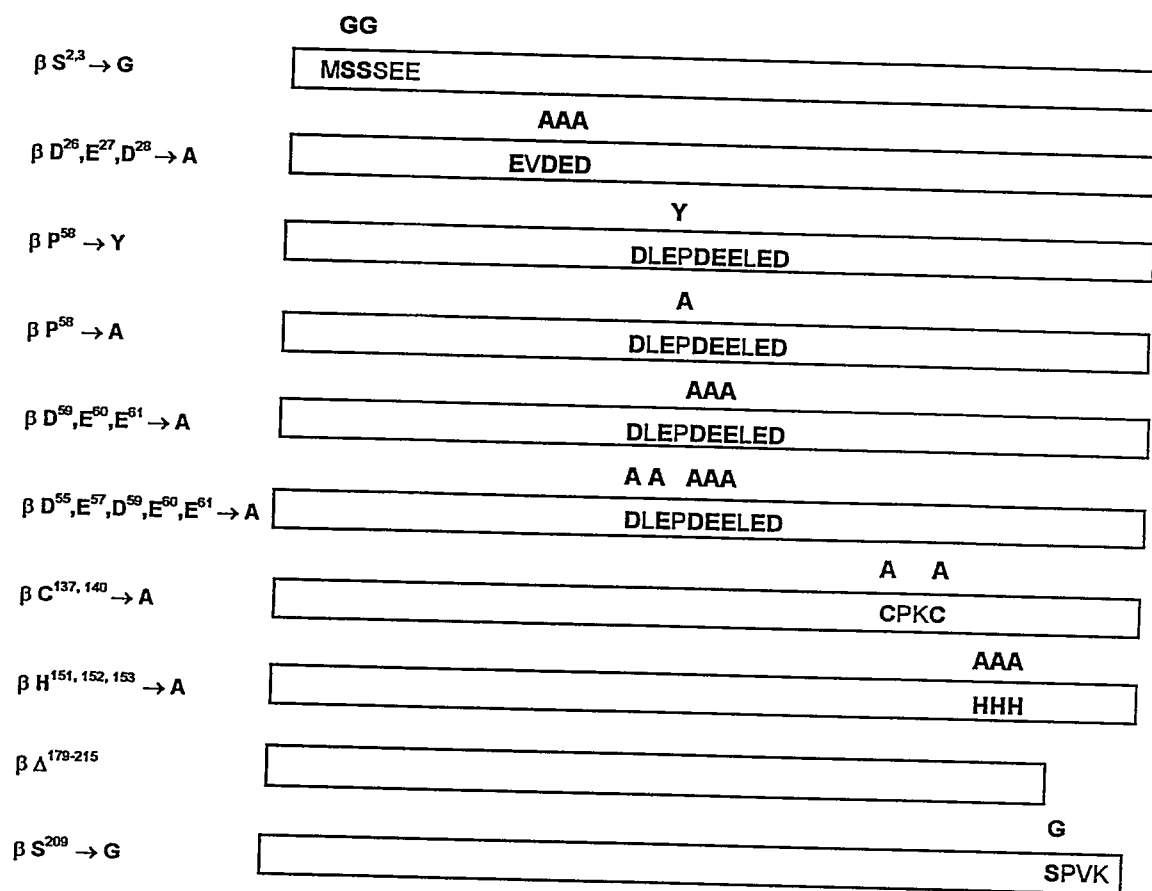


Figura 15 : Esquema de las diferentes mutaciones introducidas en el gen de la subunidad β de la CK2.

Las distintas proteínas mutantes de la subunidad β sintetizadas, se muestran esquematizadas en forma de barras en donde los aminoácidos que se encuentran dentro de cada rectángulo son los de la proteína silvestre, y los que se encuentran por sobre éstos, son los que han sido reemplazados en las proteínas mutantes.

D.1.- Síntesis y expresión de las subunidades β mutantes

Todas las mutaciones fueron introducidas en la subunidad β por amplificación por PCR de acuerdo a como se describe en Materiales y Métodos. Los genes mutados se subclonaron en el vector pGEX-2T y luego las proteínas mutantes obtenidas se purificaron de la misma forma que la descrita para la subunidad β silvestre. El rendimiento de las diferentes subunidades β mutantes fue sin embargo bastante variable, obteniéndose con algunas de ellas una cantidad de proteína mayor que con la subunidad β silvestre y con otras una cantidad menor. En la **Tabla 2**, se muestran los rendimientos aproximados obtenidos para cada subunidad β sintetizada.

Debido a que durante la amplificación por PCR se pueden introducir mutaciones no deseadas, cada gen amplificado fue secuenciado en forma completa para así corroborar la mutación introducida y verificar que en el resto del gen no se hubiera producido ningún otro cambio.

En ninguna de las 10 mutantes sintetizadas se detectaron cambios de bases fuera de las mutaciones introducidas en forma intencional.

D.2.- Estimulación de la subunidad α por las distintas proteínas mutantes de la subunidad β

En primer lugar, se estudió el efecto de las mutantes de la subunidad β sobre su capacidad de activar a la subunidad α . Para ello se incubaron cantidades equimolares de la subunidad α con las distintas mutantes de la subunidad β y se midió la actividad enzimática utilizando caseína como sustrato de acuerdo a como se indica en Materiales y Métodos.

En la **Figura 16** se muestra un gráfico de barras, en que se analiza la estimulación de la subunidad β silvestre y de las distintas mutantes con respecto a la actividad de la subunidad α monomérica. En primer

TABLA 2: Rendimiento de la subunidad β silvestre y de las diferentes subunidades β mutantes.

subunidad β silvestre	$0,5 \pm 0,09$ mg/ lt
subunidad β P ⁵⁸ \rightarrow A	$0,5 \pm 0,05$ mg/ lt
subunidad β P ⁵⁸ \rightarrow Y	$0,4 \pm 0,06$ mg/ lt
subunidad β D ⁵⁹ ,E ⁶⁰ ,E ⁶¹ \rightarrow A	$0,3 \pm 0,05$ mg/ lt
subunidad β S ^{2,3} \rightarrow G	$0,3 \pm 0,07$ mg/ lt
subunidad β C ^{137,140} \rightarrow A	$0,1 \pm 0,05$ mg/ lt
subunidad β H ^{151,152,153} \rightarrow A	$1,0 \pm 0,25$ mg/ lt
subunidad β Δ ¹⁷⁹⁻²¹⁵	$2,5 \pm 0,50$ mg/ lt

La subunidad β silvestre y todas las demás mutantes, fueron expresadas en *E. coli* como proteína de fusión de la glutatión transferasa a partir del vector pGEX-2T de acuerdo a como se indica en Materiales y Métodos. Luego la proteína de fusión soluble fue purificada por cromatografía en glutatión agarosa y digerida con trombina. Finalmente las distintas subunidades β fueron recromatografiadas por glutatión agarosa para remover la glutatión transferasa. Los valores indicados en la tabla, corresponden al promedio del rendimiento obtenido en 3 o 4 preparaciones de un litro de medio de cultivo.

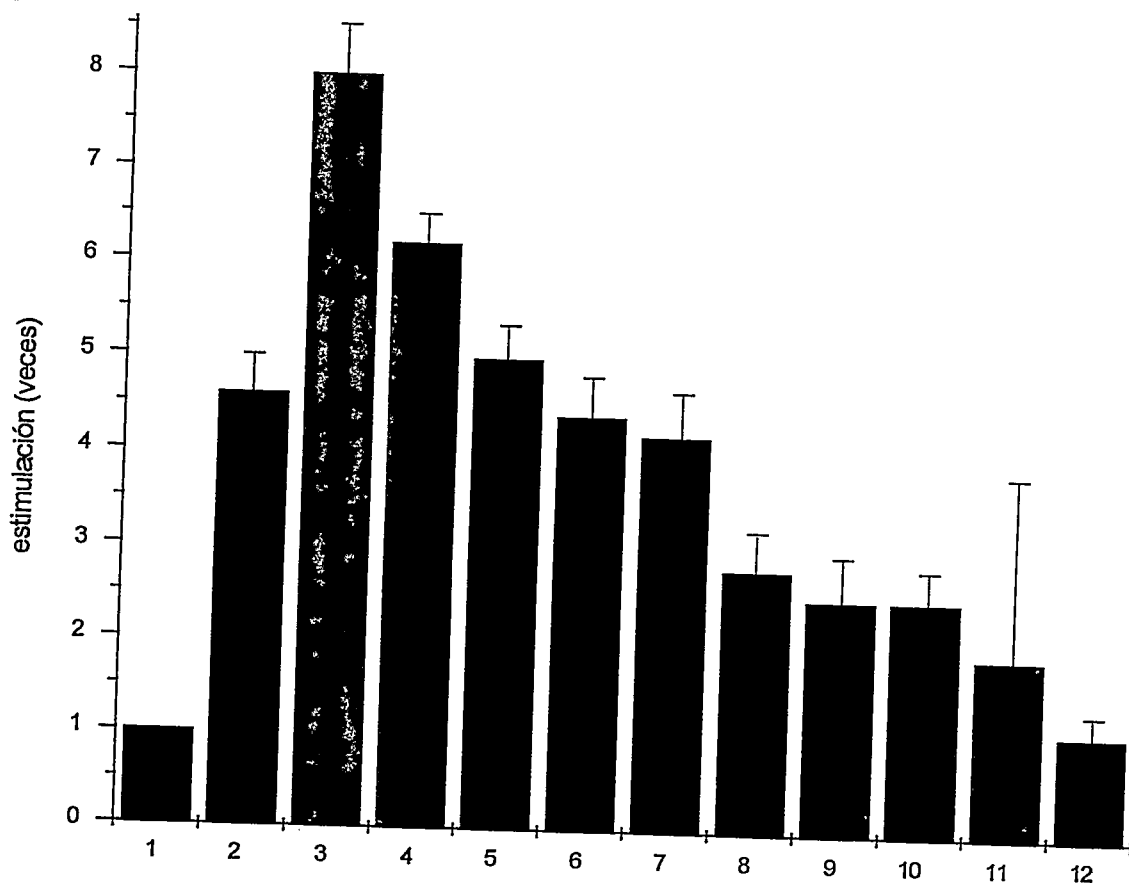


Figura 16 : Estimulación de la subunidad α por la subunidad β silvestre y diferentes proteínas mutantes de la subunidad β .

Se incubaron 2 pmoles de la subunidad α con 2 pmoles de cada proteína mutante de la subunidad β y se determinó la actividad enzimática como se indica en Materiales y Métodos. La actividad obtenida con cada mutante se dividió por la actividad de la subunidad α monomérica y el resultado se expresó como en las veces que se estimuló la actividad de esta quinasa. Se realizaron 2 a 3 preparaciones para cada proteína mutante de la subunidad β , a las cuales se les determinó en duplicado por lo menos 2 veces su efecto sobre la actividad de α .

1= α monomérica; 2= α + β silvestre; 3= α + β D⁵⁹E⁶⁰E⁶¹→A; 4= α + β P⁵⁸→A ;
 5= α + β D⁵⁵E⁵⁷D⁵⁹E⁶⁰E⁶¹→A; 6= α + β S^{2,3}→G; 7= α + β S²⁰⁹→G; 8= α + β P⁵⁸→Y;
 9= α + β H^{151,152,153}→A; 10= α + β D²⁶E²⁷D²⁸→A; 11= α + β C^{137,140}→A; 12= α + β Δ¹⁷⁹⁻²¹⁵.

lugar vemos que la subunidad β silvestre estimula la actividad de la subunidad α en 4,6 veces, lo que corresponde al rango de estimulación observado por otros autores (Bodenbach y cols., 1994) y a lo presentado en la **Tabla 1**.

Al comparar la activación producida por las diferentes proteínas mutantes con la de la subunidad β silvestre, podemos ver que existen dos mutantes que producen una estimulación mucho mayor.

La mutante que produce la mayor estimulación es la $\beta D^{59}E^{60}E^{61} \rightarrow A$ que aumenta la actividad de α en 8 veces, lo que concuerda plenamente con los resultados obtenidos por el grupo de Issinger (Boldyreff y cols., 1992). En esta mutante se han sustituido 3 residuos de la región hiperacídica por alanina, lo que hace disminuir considerablemente la densidad de cargas negativas en esa región. El hecho que esta mutante presente este efecto hiperactivador, ha hecho que se postule a la región acídica de la subunidad β como atenuadora de la actividad. Sin embargo, resulta contradictorio que la mutante $\beta D^{55}E^{57}D^{59}E^{60}E^{61} \rightarrow A$, en que se han cambiado 5 residuos ácidos de la región hiperacídica (el aspártico 55 y el glutámico 57 además de los otros 3 que se cambiaron en la mutante anterior) estimule sólo 5 veces la actividad de α . Este hecho podría deberse a que el cambio simultáneo de 5 residuos ácidos sea muy drástico y se produzca una alteración en la conformación de la subunidad β .

Extraordinariamente interesantes resultaron las mutantes $\beta P^{58} \rightarrow A$ y $\beta P^{58} \rightarrow Y$. En estas dos mutantes se cambió la prolina 58, que se encuentra en el centro de la región hiperacídica de la subunidad β , por alanina y por tirosina respectivamente.

El cambio a alanina, se realizó con el objeto de estudiar si la prolina era importante en el efecto atenuador de la actividad que presentaba esta

región, ya que se ha visto que muchas proteínas sustrato de la CK2 tienen ubicadas prolina hacia el extremo amino terminal del sitio de fosforilación (Carroll y cols., 1988 y Meggio y cols., 1994).

El cambio de prolina a tirosina, se hizo con la intención de estudiar que efecto tenía la introducción de una tirosina en la región hiperacídica de la proteína, ya que en resultados anteriores obtenidos en nuestro laboratorio se había visto que la CK2 presentaba una afinidad muy alta por copolímeros de glutámico y tirosina (Téllez y cols., 1990).

Como se observa en la **Figura 16**, la mutante $\beta P^{58} \rightarrow A$ resultó ser hiperestimuladora (estimuló la actividad de α en 6,2 veces), lo cual indica que la prolina 58 juega un papel importante en el efecto atenuador de la actividad que presenta la región acídica de la subunidad β .

La mutante $\beta P^{58} \rightarrow Y$ en cambio, presentó el efecto contrario a la mutante anterior, ya que estimuló la actividad de α en un grado menor que la subunidad β silvestre (en sólo 2,8 veces) lo cual estaría de acuerdo con nuestra hipótesis de que la tirosina haría aumentar la afinidad de la subunidad α por esta región hiperacídica.

Las mutantes $\beta S^{2,3} \rightarrow G$ y $\beta S^{209} \rightarrow G$ presentaron una estimulación semejante a la subunidad β silvestre de 4,4 y 4,2 veces respectivamente, lo que indicaría que por lo menos bajo las condiciones estudiadas, el sitio de autofosforilación de β no afecta la actividad de la enzima.

Con la mutante $\beta C^{137,140} \rightarrow A$ en cambio, se obtuvieron variaciones bastante grandes entre las distintas determinaciones realizadas. Con algunas preparaciones, se obtuvo estimulaciones semejantes a la obtenida con la subunidad β silvestre y con otras, prácticamente no se vio estimulación. Este hecho puede haberse debido a una inactivación de la proteína mutante. También pudo observarse a lo largo de todas las preparaciones, que la cantidad de proteína mutante obtenida en forma

soluble, era mucho menor que el de la otras proteínas mutantes (Tabla 2). Por lo tanto, es probable que la sustitución de las cisteínas 137 y 140 por alanina haya producido un cambio estructural importante en la proteína, que la hayan hecho menos soluble y menos estable que la proteína silvestre.

Las mutantes $\beta\text{H}^{151,152,153} \rightarrow \text{A}$ y $\beta\text{D}^{26}\text{E}^{27}\text{D}^{28} \rightarrow \text{A}$ estimularon a la subunidad α en un grado un poco menor que la subunidad β , en cambio la mutante delecionada $\beta\Delta^{179-215}$ no fue capaz de estimular a la subunidad α cuando se usó en cantidades equimolares al igual que las demás mutantes. Sin embargo, como se muestra en la **Figura 17**, cuando se usaron razones molares de $\beta\Delta^{179-215} / \alpha$ muchísimo mas altas, se logró obtener una estimulación de 2,7 veces con una razón molar de β 50 veces mayor. Estos resultados indican que el extremo carboxilo terminal de la subunidad β es importante en la interacción con la subunidad α , ya que la proteína truncada presenta una afinidad por la subunidad α muchísimo menor que la proteína silvestre.

D.3.- Estudio comparativo de la estimulación de la subunidad α silvestre y de la subunidad $\alpha\text{K}^{75,76} \rightarrow \text{E}$ por diferentes proteínas mutantes de la subunidad β

La mutante $\alpha\text{K}^{75,76} \rightarrow \text{E}$ es una mutante de la subunidad α en la que se han cambiado las lisinas 75 y 76 por ácido glutámico. Estas dos lisinas se encuentran ubicadas en la región rica en aminoácidos básicos que posee esta proteína (**K P V K K K K Y K R E I K**), la cual se ha demostrado que es responsable de la interacción con heparina (Gatica y cols., 1994). Con el propósito de estudiar si las proteínas mutantes de la subunidad β presentan alguna diferencia en el grado de estimulación de esta

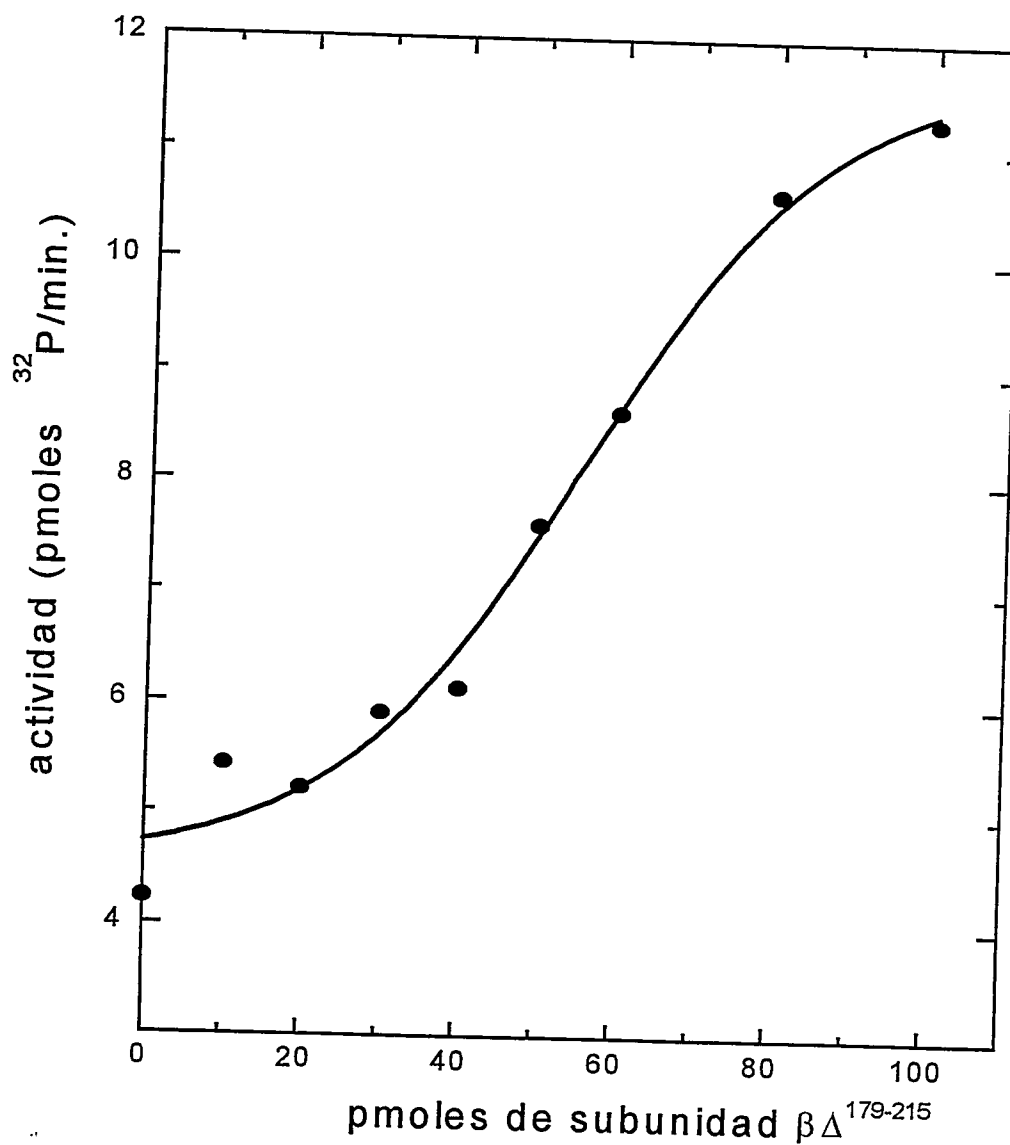


Figura 17 : Curva de estimulación de la actividad de la subunidad α por la subunidad $\beta\Delta^{179-215}$

Para estudiar la activación de la subunidad α por la subunidad $\beta\Delta^{179-215}$ se usaron 2 pmoles de la subunidad α y entre 10 y 100 pmoles de subunidad $\beta\Delta^{179-215}$. La actividad enzimática se midió usando caseína y $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ como sustratos y se incubó por 10 min. a 30° de acuerdo a como se indica en Materiales y Métodos.

subunidad α $K^{75,76} \rightarrow E$, se hizo un estudio comparativo midiendo la actividad de las holoenzimas reconstituídas con ambas subunidades α . En la **Figura 18** se muestran los resultados obtenidos de este experimento, los cuales se expresan como estimulación relativa de las distintas subunidades β con respecto a la actividad de la subunidad α monomérica correspondiente.

En primer lugar podemos observar que la subunidad β silvestre estimula a ambas subunidades α en un grado similar, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Gatica y cols. (1994). Igual comportamiento presentaron las mutantes $\beta H^{151,152,153} \rightarrow A$, $\beta C^{137-140} \rightarrow A$ y $\beta P^{58} \rightarrow Y$.

Las mutantes hiperactivadoras $\beta D^{59} E^{60} E^{61} \rightarrow A$ y $\beta P^{58} \rightarrow A$ en cambio, produjeron una estimulación sobre la subunidad $\alpha K^{75,76} \rightarrow E$ aún mayor que sobre la subunidad α silvestre.

Estos resultados apoyarían la idea de que la región rica en lisinas de la subunidad α pudiera tener algún grado de interacción con la región hiperacídica de la subunidad β , que como se vio anteriormente, tiene una acción atenuadora de la actividad de la holoenzima, ya que al cambiar dos residuos de carga positiva por dos de carga negativa en esa región, se produce un efecto estimulador de la actividad aún mayor.

D.4.- Estudio de la autofosforilación de la subunidad α y de las subunidades β mutantes

Para estudiar la autofosforilación de estas proteínas, se incubaron cantidades estequiométricas de la subunidad α y de las subunidades β mutantes en presencia de $[\gamma \text{ } ^{32}\text{P}] \text{ATP}$ de acuerdo a como se indica en Materiales y Métodos. Para comparar el grado de autofosforilación entre las distintas mutantes, se cuantificó la radiactividad incorporada en cada

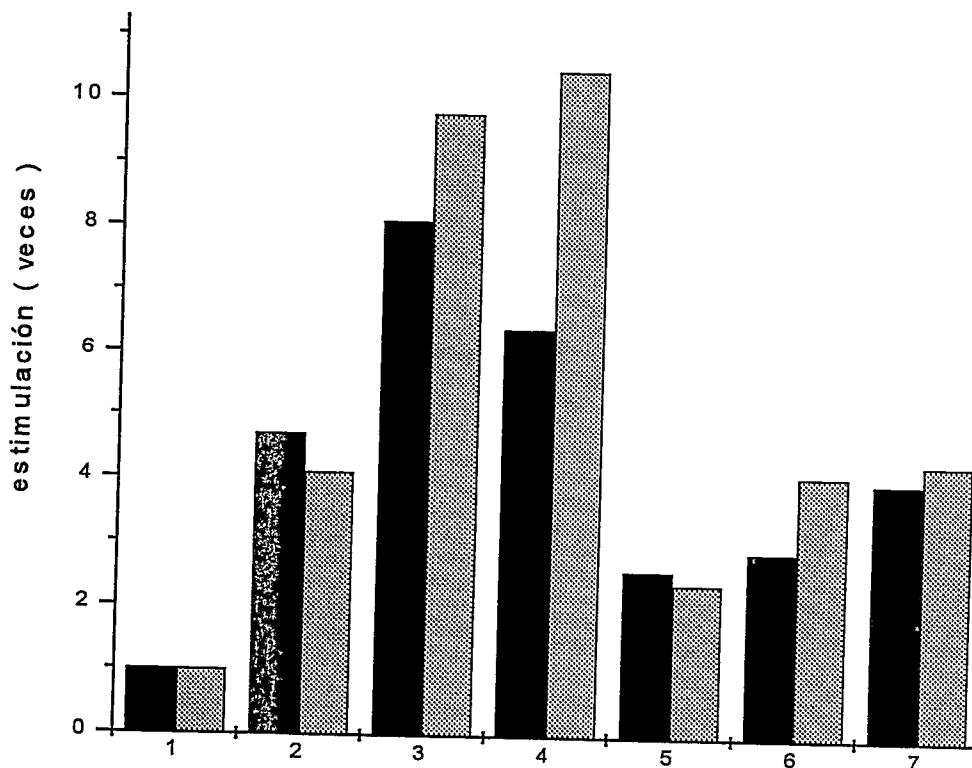


Figura 18 : Comparación de la estimulación de la subunidad α silvestre y de la mutante $\alpha K^{75,76} \rightarrow E$ por diversas proteínas mutantes de la subunidad β

Se incubaron 2 pmoles de la subunidad α silvestre o $\alpha K^{75,76} \rightarrow E$ con 2 pmoles de cada proteína mutante de la subunidad β y se determinó la actividad enzimática como se indica en Materiales y Métodos, usando caseína y $[Y^{32}P]$ ATP como sustratos. La actividad obtenida con las distintas holoenzimas se dividió por la actividad de la subunidad α monomérica correspondiente y los resultados fueron expresados como las veces en que se estimuló la actividad de esta quinasa. La actividad de la subunidad α silvestre fue de 5,2 pmoles/min. y la de la mutante $\alpha K^{75,76} \rightarrow E$ de 3,9 pmoles/min.

1 = α monomérica; 2 = $\alpha + \beta$ silvestre; 3 = $\alpha + \beta D^{59} E^{60} E^{61} \rightarrow A$; 4 = $\alpha + \beta P^{58} \rightarrow A$; 5 = $\alpha + \beta P^{58} \rightarrow Y$; 6 = $\alpha + \beta H^{151,152,153} \rightarrow A$; 7 = $\alpha + \beta C^{137,140} \rightarrow A$. Las barras negras corresponden a la subunidad α silvestre y las barras grises a la mutante $\alpha K^{75,76} \rightarrow E$.

subunidad y los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 19**. En primer lugar podemos observar que todas las proteínas mutantes de la subunidad β son autofosforiladas, con la excepción de la mutante $\beta S^{2,3} \rightarrow G$, en que se mutaron las serinas 2 y 3 a glicina, lo que nos confirma que estas serinas constituyen el único sitio de autofosforilación de la subunidad β .

Podemos apreciar también que la autofosforilación de la subunidad α , que es muy baja cuando ésta se encuentra al estado de monómero, aumenta varias veces cuando se incuba en presencia de las distintas subunidades β mutantes. La única subunidad β que no produce un aumento de la autofosforilación de α , es la mutante delecionada que (a las concentraciones usadas) tampoco estimula la actividad de ésta. Por lo tanto, para que se produzca un aumento en la autofosforilación de α , es necesario que la subunidad β interaccione con ella.

Es interesante observar que el grado de autofosforilación que α presenta cuando se incuba con las distintas mutantes de la subunidad β es proporcional a la estimulación que ésta experimenta con cada una de ellas. Vemos por ejemplo que las mutantes $\beta D^{59} E^{60} E^{61} \rightarrow A$ y $\beta P^{58} \rightarrow A$, que son las subunidades hiperestimuladoras, son las que mayor autofosforilación de la subunidad α producen, en cambio la mutante delecionada que no produce ninguna estimulación tampoco induce ningún aumento en la fosforilación de ésta.

Cabe destacar también, el efecto producido por la mutante $\beta S^{2,3} \rightarrow G$, que a pesar de no sufrir autofosforilación es capaz de estimular la autofosforilación de α debido a que sí puede interactuar con ella.

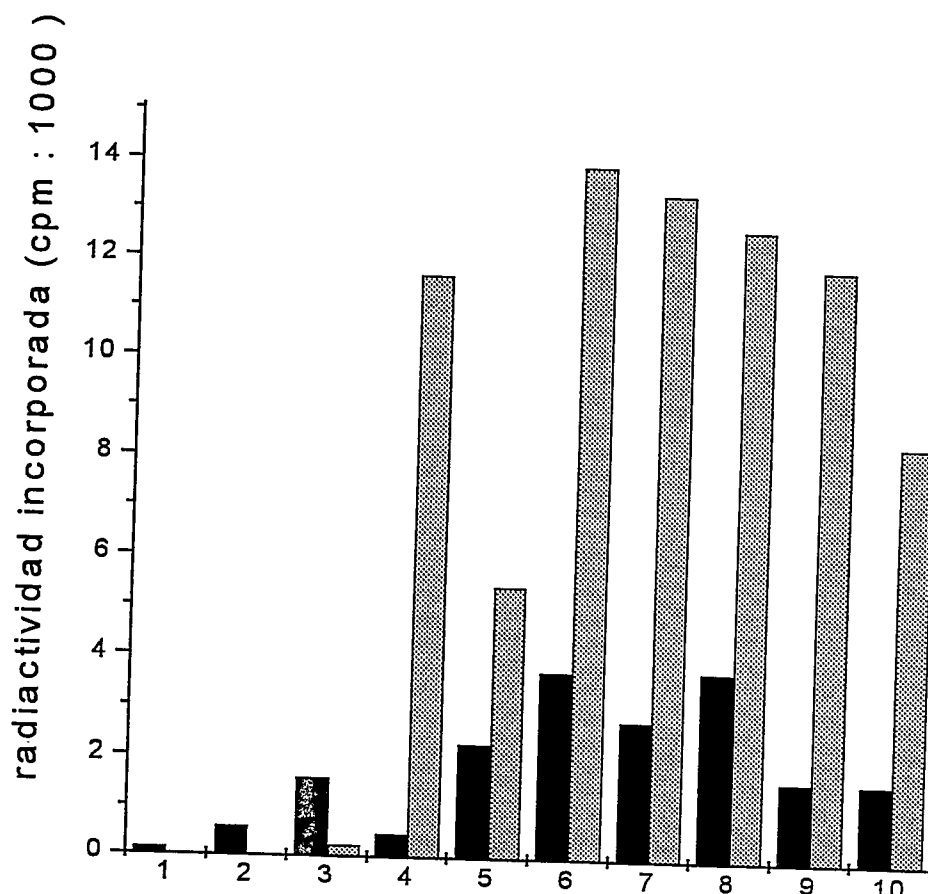


Figura 19 : Estudio de la autofosforilación de las subunidades α y β silvestre y β mutantes.

Se incubó la subunidad α monomérica tanto en ausencia como en presencia de las proteínas silvestre y mutantes de la subunidad β con $[\gamma^{32}\text{P}]$ ATP de acuerdo a como se indica en Materiales y Métodos. Posteriormente las proteínas fosforiladas fueron analizadas en un gel de poliacrilamida al 10% y sometidas a autorradiografía. La radiactividad incorporada en cada proteína se cuantificó cortando la banda del gel seco y contándola.

1 = α monomérica; 2 = α +BSA; 3 = α + $\beta\text{S}^{2,3} \rightarrow \text{G}$; 4 = α + $\beta\Delta^{179-215}$; 5 = α + $\beta\text{C}^{137,140} \rightarrow \text{A}$; 6 = α + $\beta\text{D}^{59}\text{E}^{60}\text{E}^{61} \rightarrow \text{A}$; 7 = α + $\beta\text{H}^{151,152,153} \rightarrow \text{A}$; 8 = α + $\beta\text{P}^{58} \rightarrow \text{A}$; 9 = α + $\beta\text{P}^{58} \rightarrow \text{Y}$; 10 = α + β silvestre. Las barras negras indican la radiactividad incorporada en la subunidad α y las barras grises la radiactividad incorporada en la subunidad β .

D.5.- Estudio del efecto protector de las subunidades β silvestre y mutantes sobre la inactivación térmica de la subunidad α .

Se ha visto que la subunidad β además de activar a la subunidad α , la protege de la inactivación térmica. Por esta razón es que se estudió el efecto protector de las distintas proteínas mutantes al incubarlas con la subunidad α a 40 ° por distintos tiempos. En la **Figura 20** se muestran los resultados obtenidos de este experimento, los cuales se expresan como porcentaje de la actividad remanente después de incubar los tiempos indicados. Es necesario hacer notar, que el nivel de actividad medido a tiempo 0 de incubación se consideró 100 % para todas las mutantes, correspondiendo este 100 % a valores de actividad muy diferentes para las distintas mutantes.

Al analizar los resultados obtenidos podemos ver que cuando se incuba la subunidad α monomérica a 40°, ésta se inactiva rápidamente quedando aproximadamente un 10% de actividad remanente después de 15 minutos de incubación. Cuando se agrega al medio de incubación alguna de las subunidades β mutantes, se ve que todas protegen a la subunidad α de la inactivación térmica (con excepción de la mutante delecionada), aunque en distinto grado.

El efecto protector más extraordinario, es el producido por las dos mutantes hiperactivadoras ($\beta D^{59}E^{60}E^{61} \rightarrow A$ y $\beta P^{58} \rightarrow A$), ya que no sólo protegen de la inactivación térmica a la subunidad α sino que la activan, obteniéndose una actividad 20% más alta después de 15 minutos de incubación a 40 °. Las mutantes $\beta C^{137,140} \rightarrow A$ y $\beta H^{151,152,153} \rightarrow A$ tienen también un efecto protector muy bueno, superior al producido por la subunidad β silvestre, en cambio La mutante $\beta P^{58} \rightarrow Y$ tiene un efecto protector muy pobre obteniéndose sólo un 30% de actividad remanente después de 15 minutos de incubación.

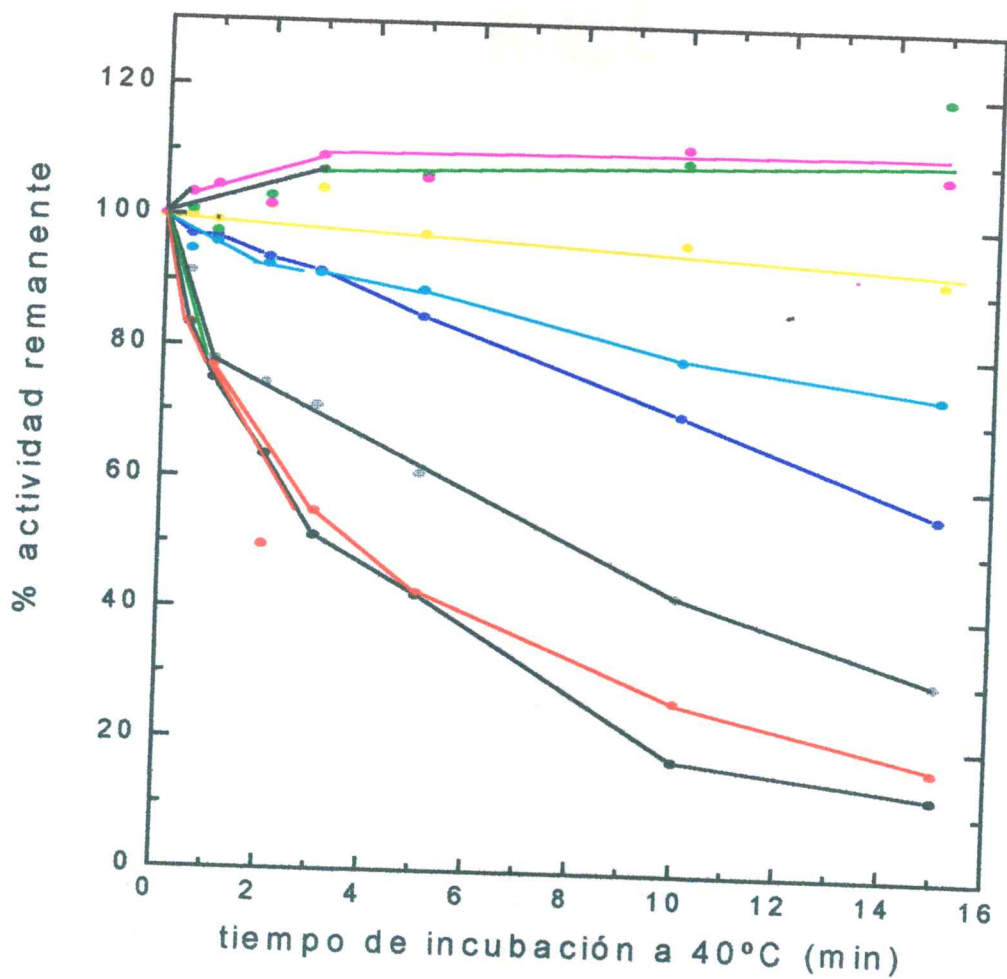


Figura 20 : Efecto de la subunidad β silvestre y de las distintas proteínas mutantes en la protección de la actividad de la subunidad α frente a la inactivación térmica.

Se incubaron 2 pmoles de la subunidad α con cantidades equimolares de la subunidad β silvestre y de las distintas proteínas mutantes a 40° por los tiempos señalados en la figura. Posteriormente se determinó la actividad enzimática remanente como se indica en Materiales y Métodos. El valor colocado entre paréntesis junto a cada mutante corresponde al 100% de la actividad.

- | | |
|--|---|
| — α monomérica (9,8pmol/min.), | — $\alpha + \beta \Delta^{179-215}$ (11,8 pmol/min.), |
| — $\alpha + \beta P^{58} \rightarrow Y$ (25,7pmol/min.), | — $\alpha + \beta$ silvestre (40,2 pmol/min.), |
| — $\alpha + \beta H^{151-153} \rightarrow A$ (43,9 pmol/min.), | — $\alpha + \beta C^{137,140} \rightarrow A$ (42,9 pmol/min.), |
| — $\alpha + \beta P^{58} \rightarrow A$ (57,2 pmol/min.), | — $\alpha + \beta D^{59}E^{60}E^{61} \rightarrow A$ (57,2 pmol/min.). |

Es importante destacar que en este caso, al igual que en la autofosforilación de α , el grado de protección térmica está directamente relacionado con la capacidad activadora de las mutantes.

D.6.- Estudio de la interacción entre la subunidad α y las subunidades β mutantes por sedimentación en gradientes de sacarosa

Para determinar si las subunidades β mutantes eran capaces de interactuar físicamente con la subunidad α y formar la holoenzima tetramérica, se incubaron ambas subunidades en cantidades equimolares y luego se sometieron a sedimentación en gradientes de sacarosa de acuerdo a como se indica en Materiales y Métodos. En la **Figura 21** se muestran los resultados que se obtuvieron al graficar la actividad enzimática en función del número de la fracción colectada.

Podemos observar que todas las subunidades β mutantes son capaces de interactuar con la subunidad α y formar la enzima tetramérica, ya que el pico de actividad aparece en la fracción 12 que corresponde al tamaño del tetrámero. En concordancia con los demás resultados obtenidos, vemos que la mutante delecionada en su extremo carboxilo terminal, no es capaz de asociarse a la subunidad α cuando se encuentra a una razón molar α/β de 1:2. Sin embargo, cuando esta razón aumenta a 1:20 se puede observar la formación de la especie tetramérica. Es interesante notar que en este caso, el pico de actividad que se obtuvo fue mucho más ancho que en las demás mutantes, lo cual podría deberse a la presencia de especies diméricas y monoméricas debido a la baja afinidad que presenta esta proteína delecionada por la subunidad α .

Llama la atención también, que a pesar que se usaron iguales cantidades de subunidad α en todos los tubos, los niveles de actividad observados

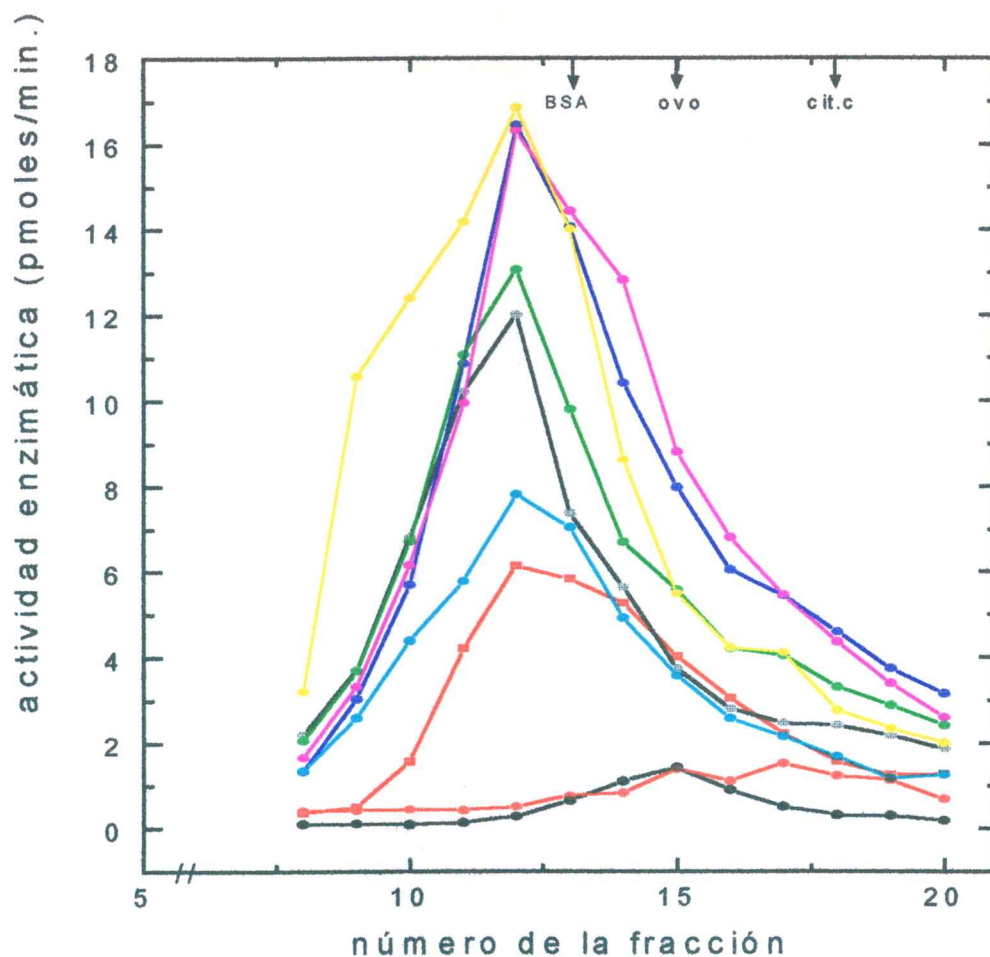


Figura 21 : Análisis por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa de la interacción entre la subunidad α y la subunidad β silvestre y las distintas proteínas mutantes.

Se incubaron 20 pmoles de la subunidad α y cantidades equimolares de la subunidad β silvestre y de las distintas proteínas mutantes (con la excepción de la mutante $\beta\Delta^{179-215}$ en que se usaron relaciones de α/β de 1:2 y de 1:20) por 10 horas a 4°C. Luego se aplicaron las muestras sobre tubos que contenían un gradiente entre un 5 y 20% de sacarosa y se sometieron a ultracentrifugación de acuerdo a las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Se colectaron fracciones de 200 μ l y luego se les determinó la actividad enzimática. Las flechas colocadas en la parte superior de la figura corresponden a la posición en que eluyen las proteínas estándar utilizadas, las cuales fueron BSA (65 KDa), ovoalbúmina (45 KDa) y citocromo C (12,5 KDa).

- α monomérica , -●- $\alpha + \beta \Delta^{179-215}$ (1:2), -●- $\alpha + \beta \Delta^{179-215}$ (1:20),
- $\alpha + \beta P^{58} \rightarrow A$, -●- $\alpha + \beta$ silvestre, -●- $\alpha + \beta H^{151-153} \rightarrow A$,
- $\alpha + \beta D^{59}E^{60}E^{61} \rightarrow A$, -●- $\alpha + \beta S^{2,3} \rightarrow G$, -●- $\alpha + \beta P^{58} \rightarrow Y$

sean tan diferentes. Esta gran diferencia se debe probablemente a la combinación de dos efectos producidos por la subunidad β , que son los de proteger y estabilizar a la subunidad α y también el de estimular su actividad. Vemos que en los dos casos en que la subunidad α se encuentra como monómero el nivel de actividad observado es alrededor de un 10 % del nivel observado para las demás especies.

D.7.- Inhibición por heparina de la subunidad α monomérica y reconstituída con diferentes proteínas mutantes de la subunidad β

En estudios realizados por Hu y Rubin se ha visto que la heparina, que es un muy potente inhibidor de la CK2, interactúa con una región rica en lisinas y argininas presente en la subunidad α (Hu y Rubin, 1990b). Debido a que en la subunidad β existe una región hiperacídica, que como se demostró anteriormente, posee propiedades atenuadoras de la actividad, existe la posibilidad de que esta zona pudiera estar interactuando con la región rica en lisinas de la subunidad α responsable de la interacción con heparina. Para analizar esta posibilidad, se realizó un estudio de la inhibición causada por concentraciones crecientes de heparina sobre la subunidad α monomérica y la holoenzima reconstituída con las diversas proteínas β mutantes.

En la **Figura 22** puede observarse, que tanto la subunidad α como la holoenzima reconstituída con la subunidad β silvestre son inhibidas de igual forma por heparina. Todas las demás mutantes, con la excepción de la mutante deletionada que a la concentración usada no es capaz de reconstituír la holoenzima, presentan un comportamiento parecido requiriendo concentraciones levemente más altas para ser inhibidas por heparina. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por el grupo de Traugh (Lin y cols., 1991), pero se contraponen a los del grupo de

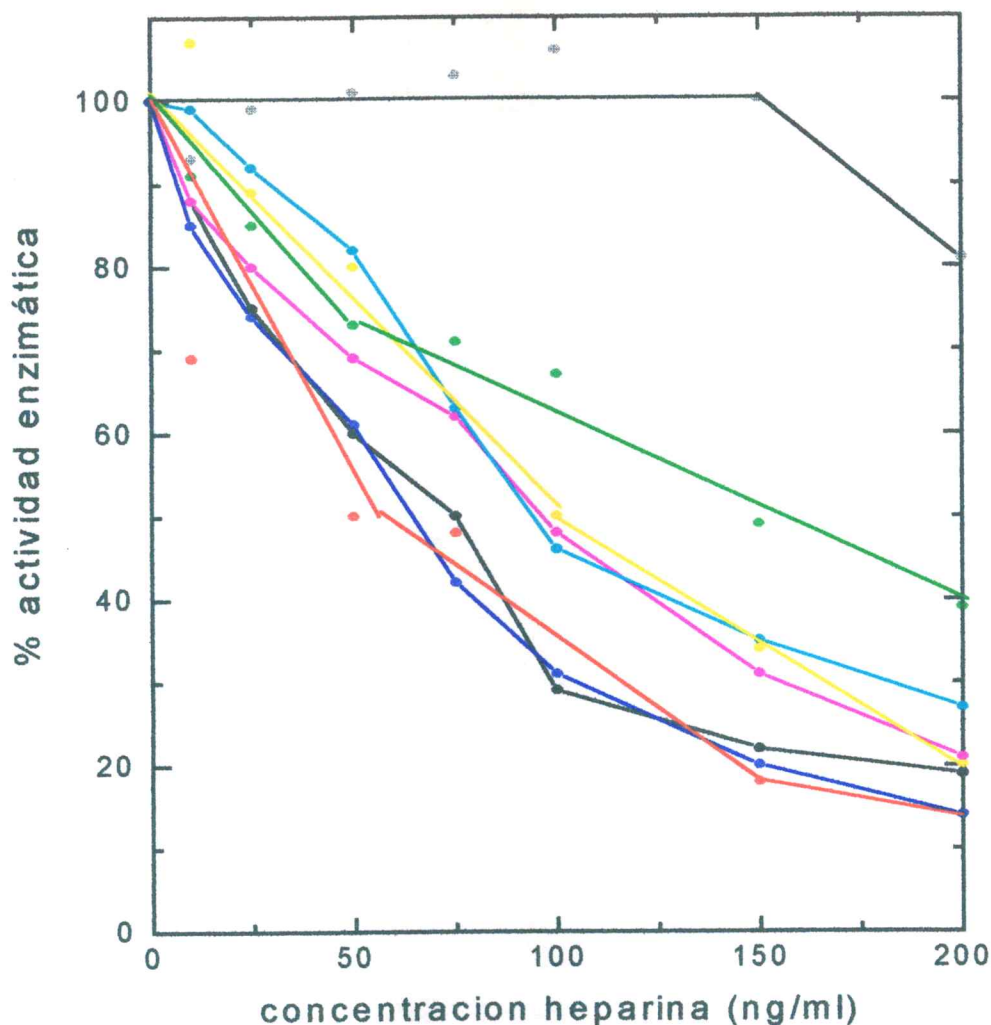


Figura 22 : Inhibición por heparina de la subunidad α monomérica y reconstituída con la subunidad β silvestre y las diferentes mutantes.

Se determinó la actividad enzimática a distintas concentraciones de heparina de acuerdo a las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Los valores de actividad para las distintas mutantes fueron normalizados asignándosele 100% a la actividad medida en ausencia de heparina. Como comparación se analizó también la mutante $\alpha K^{74,75} \rightarrow E$, la cual es resistente a la inhibición causada por heparina.

- | | |
|--|---|
| — α monomérica (10,4 pmol/min.), | — $\alpha + \beta \Delta^{179-215}$ (11,1 pmol/min.), |
| — $\alpha + \beta$ silvestre (42,3 pmol/min.), | — $\alpha + \beta H^{151-153} \rightarrow A$ (38,9 pmol/min.), |
| — $\alpha + \beta C^{137,140} \rightarrow A$ (37,1 pmol/min.), | — $\alpha + \beta D^{59}E^{60}E^{61} \rightarrow A$ (94,3 pmol/min.), |
| — $\alpha + \beta P^{58} \rightarrow A$ (82,5 pmol/min.), | — $\alpha K^{74,75} \rightarrow E$ (9,6 pmol/min.). |

Issinger (Boldyreff y cols. 1993), el cual observa diferencias entre la inhibición sufrida por la subunidad α monomérica y la holoenzima. Como se aprecia en la **Figura 22**, la enzima que realmente muestra una alta resistencia a la inhibición por heparina, es la mutante de la subunidad α (α K^{75,76} \rightarrow E) en la que se han cambiado las lisinas 75 y 76 por ácido glutámico, lo que confirma los resultados obtenidos por el grupo de Rubin (1990b) y de Gatica y cols. (1994).

D.8.- Inhibición por el copolímero glutámico-tirosina (4:1) de la subunidad α monomérica y de la holoenzima reconstituída con diversas proteínas mutantes de la subunidad β

En estudios realizados anteriormente en nuestro laboratorio, se había visto que la CK2 podía ser inhibida en forma muy potente por copolímeros de ácido glutámico y tirosina en proporción 4:1 (Téllez y col., 1990), presentando este copolímero un I_{50} dos órdenes de magnitud menor que el del homopolímero de ácido glutámico o el del copolímero de ácido glutámico y fenilalanina en proporción 4:1. Posteriormente, al estudiar la inhibición producida por estos polipéptidos sobre las subunidades recombinantes aisladas, se vio que la subunidad α monomérica era mucho menos sensible que la holoenzima frente a la inhibición causada por el copolímero de ácido glutámico y tirosina (Hinrichs y cols., 1993). Por esta razón es que nos interesó estudiar el comportamiento de las holoenzimas reconstituídas con las distintas subunidades β mutantes frente a este inhibidor y compararlo con el de la subunidad α monomérica. En la **Figura 23** se muestran los resultados obtenidos expresados como porcentaje de la actividad enzimática en función de la concentración del inhibidor poli glu-tyr (4:1).

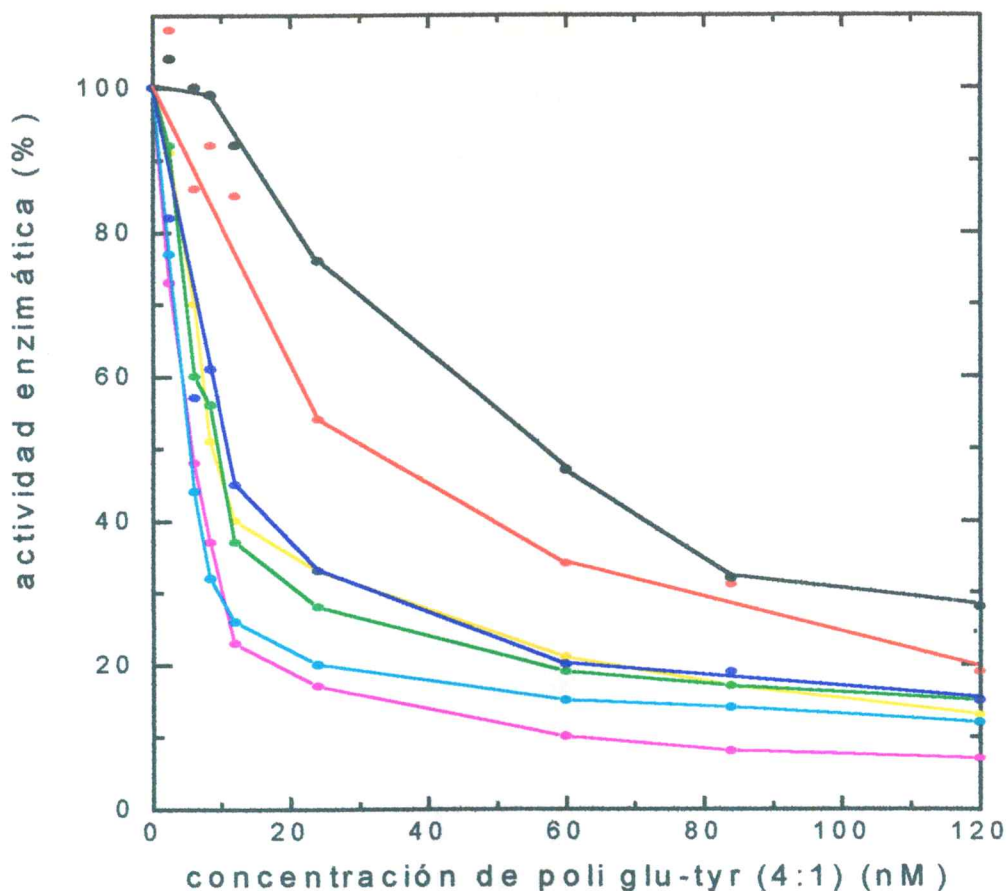


Figura 23 : Efecto del polímero poli glu-tyr en proporción 4:1 sobre la subunidad α monomérica y reconstituida con la subunidad β silvestre y las diferentes proteínas mutantes. Se determinó la actividad enzimática a distintas concentraciones de poli glu-tyr de acuerdo a como se indica en Materiales y Métodos. El valor que se indica entre paréntesis junto a cada mutante corresponde a la actividad medida en ausencia del inhibidor al cual se le asignó el 100%.

— α (7,8 pmol/min.), — $\alpha+\beta\Delta^{179-215}$ (8,5 pmol/min.), — $\alpha+\beta P^{58}\rightarrow A$ (52,4 pmol/min.),
 — $\alpha + \beta$ silvestre (31,2 pmol/min.), — $\alpha+\beta H^{151-153}\rightarrow A$ (19,5 pmol/min.),
 — $\alpha+\beta C^{137,140}\rightarrow A$ (21,8 pmol/min.), — $\alpha+\beta D^{59}E^{60}E^{61}\rightarrow A$ (60,5 pmol/min.).

En primer lugar puede observarse que la subunidad α monomérica es la enzima más resistente frente a la inhibición por poli glu-tyr, presentando un I_{50} de alrededor de 60nM. Las holoenzimas reconstituídas con las demás subunidades β en cambio, presentan una sensibilidad mucho mayor frente al inhibidor, con valores de I_{50} menores de 10 nM. El comportamiento intermedio que presentó la mutante delecionada $\beta\Delta^{179-215}$, se debe probablemente a la baja proporción de holoenzima presente debido a la baja afinidad que presenta esta mutante por la subunidad α . Por lo tanto, podemos concluir que con excepción de la mutante delecionada, todas las demás subunidades β producen un aumento de la afinidad por poli glu-tir, haciendo disminuir el valor de su I_{50} a valores iguales o incluso menor que el de la holoenzima silvestre.

D.9.- Resumen de las propiedades de las proteínas mutantes de la subunidad β

Con el propósito de analizar en forma conjunta los resultados de cada una de las proteínas mutantes, se elaboró una tabla en la que se resume toda la información obtenida, la que se muestra en la **Tabla 3**.

En primer lugar, se detallan los efectos que la subunidad β silvestre produjo sobre la subunidad α y luego se analizan las diferencias observadas para cada una de las proteínas mutantes.

subunidad β silvestre :

- se asocia a la subunidad α para formar la enzima tetramérica
- estimula la actividad de la subunidad α en 4,6 veces
- protege la actividad de la enzima frente a la inactivación térmica, obteniendo un 70% de actividad remanente en lugar de un 17% después de incubar la enzima por 10 minutos a 40°C

-incrementa la autofosforilación de la subunidad α en 12 veces y también es autofosforilada muy fuertemente

-disminuye el I_{50} para el copolímero poli glu-tir (4:1) en alrededor de 6 veces

subunidad β S^{2,3} \rightarrow G :

No es autofosforilada por la subunidad α , confirmando de esta manera que las serinas 2 y 3 constituyen los únicos sitios de autofosforilación de esta subunidad, sin embargo estimula en igual forma que la subunidad β silvestre la actividad y la autofosforilación de la subunidad α .

subunidad β S²⁰⁹ \rightarrow G :

Esta mutante no es capaz de ser fosforilada por la cdc2 quinasa, sin embargo activa a la subunidad α de igual forma.

subunidad β P⁵⁸ \rightarrow A :

Esta mutante es hiperactivadora, ya que estimula la actividad de α en 6,2 veces y además tiene un efecto protector frente a la inactivación térmica de α mucho mayor que el de la subunidad β silvestre.

subunidad β P⁵⁸ \rightarrow Y :

Esta mutante estimula la actividad de la subunidad α en sólo 2,8 veces y protege en menor grado que la subunidad silvestre de la inactivación térmica.

subunidad β D²⁶,E²⁷,D²⁸ \rightarrow A : Sólo se estudió la capacidad de activación de la subunidad α por esta mutante y se vio que era un poco menor que la de la subunidad silvestre.

subunidad β H^{151,152,153} \rightarrow A :

Esta mutante produjo una estimulación de la actividad de α un poco menor que la subunidad β silvestre, sin embargo incrementó muy fuertemente la autofosforilación de la subunidad α y la protegió muy efectivamente de la inactivación térmica.

subunidad β D⁵⁹,E⁶⁰,E⁶¹ \rightarrow A:

Esta mutante resultó ser la que más activó a la subunidad α , produciendo una estimulación de su actividad en 8 veces. También, al igual que la otra mutante hiperactivadora (β P⁵⁸ \rightarrow A) produjo una protección total frente a la inactivación térmica de α .

subunidad β D⁵⁵,E⁵⁷,D⁵⁹,E⁶⁰,E⁶¹ \rightarrow A :

Esta mutante resultó ser menos activadora que la mutante β D⁵⁹,E⁶⁰,E⁶¹ \rightarrow A, aunque también produjo una estimulación mayor que la subunidad β silvestre.

subunidad β C¹³⁷,C¹⁴⁰ \rightarrow A :

Esta mutante presentó propiedades muy semejantes a la subunidad β silvestre, pero la cantidad de proteína soluble que se obtuvo en cada preparación fue mucho menor. También esta proteína mutante se inactivó mucho más rápidamente que las demás.

subunidad β Δ ¹⁷⁹⁻²¹⁵ :

Esta proteína mutante fue la única que no fue capaz de interactuar con la subunidad α , por lo que no reconstituyó la enzima tetramérica, no estimuló la actividad, no produjo protección frente a la inactivación térmica, no incrementó la autofosforilación de α ni se estimuló su actividad con la fuerza iónica. Sólo usando concentraciones 20 veces más altas de esta proteína delecionada, se logró una parcial reconstitución de la holoenzima.

TABLA 3 : Cuadro resumen de las propiedades de la subunidad α monomérica y de las holoenzimas reconstituídas con la subunidad β silvestre y con las subunidades β mutantes

	estimulación (veces)	autofosforilación sub. β (cpm)	autofosforilación sub. α (cpm)	% actividad remanente al incubar 10 min. a 45°C	I_{50} para heparina [ng/ml]	I_{50} para poli glu-tir [nM]	especie molecular
α monomérica	1,0	—	138	17	65	56	monómero
$\alpha+\beta$ silvestre	4,6	8.367	1.617	70	65	10	tetrámero
$\alpha+\beta S^{2,3} \rightarrow G$	4,4	218	1.609	N.D.	N.D.	N.D.	tetrámero
$\alpha+\beta S^{209} \rightarrow G$	4,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	tetrámero
$\alpha+\beta P^{58} \rightarrow A$	6,2	12.681	3.786	110	150	9	tetrámero
$\alpha+\beta P^{58} \rightarrow Y$	2,8	11.893	1.643	43	95	N.D.	tetrámero
$\alpha+\beta D^{26} E^{27} D^{28} \rightarrow A$	2,5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	tetrámero
$\alpha+\beta H^{151,152,153} \rightarrow A$	2,8	13.408	2.803	80	95	6	tetrámero
$\alpha+\beta D^{59} E^{60} E^{61} \rightarrow A$	8,0	13.962	3.749	112	95	7	tetrámero
$\alpha+\beta D^{55} E^{57} D^{59} E^{60} E^{61} \rightarrow A$	5,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	tetrámero
$\alpha+\beta C^{137,140} \rightarrow A$	4,0	5.451	2.308	97	100	10	tetrámero
$\alpha+\beta \Delta^{179-215} (1:2)$	1,1	11.673	474	26	60	31	tetrámero
$\alpha+\beta \Delta^{179-215} (1:20)$	2,6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	ambas especies

N.D. = no determinado

DISCUSION

A.- Aislamiento del gen que codifica para la subunidad β

Al realizar el análisis de la genoteca de oocitos de *Xenopus laevis* se encontraron 20 señales positivas, de las cuales se analizaron finalmente 4 clones. Los clones estudiados presentaron insertos de distinto tamaño, secuenciándose finalmente sólo el fragmento de cDNA más grande, que fue de 900 pares de bases.

El inserto secuenciado contenía el gen de la subunidad β completo (Jedlicki y cols., 1992), el cual presentaba una similitud extraordinaria con las subunidades β de todas las demás especies conocidas. Los fragmentos más pequeños que contenían los demás fagos aislados no fueron secuenciados, pero es probable que éstos hayan representado cDNAs provenientes del mismo gen conteniendo deleciones de distinto grado en su extremo 5'. Apoya esta idea el hecho, que sólo se ha encontrado un gen para la subunidad β en la gran mayoría de las especies estudiadas. Sólo en *Saccharomyces cerevisiae* y *Arabidopsis thaliana* se han encontrado dos genes distintos que codifican para la subunidad β .

B.- Expresión y purificación de la subunidad β

La subunidad β fue expresada en bacterias utilizando el vector pGEX-2T, del cual se obtienen proteínas fusionadas a la glutatión transferasa que tiene la ventaja de producir proteínas más solubles y de facilitar muchísimo la purificación de las proteínas expresadas.

La utilización de este sistema de expresión fue en este caso una ventaja muy grande, ya que para realizar este trabajo de tesis se necesitaron sintetizar, expresar y purificar una gran cantidad de proteínas mutantes de la subunidad β .

La desventaja que presenta este sistema, es que se obtiene la proteína con algunos aminoácidos adicionales en el extremo amino terminal, que en el caso de la subunidad β fueron seis. Un problema adicional que se presentó con nuestra proteína, es que la glutatión transferasa y la subunidad β tienen el mismo tamaño, lo que impidió visualizar en geles de poliacrilamida, si la subunidad β purificada se encontraba totalmente libre de glutatión transferasa después de haber sido la proteína de fusión digerida con trombina y recromatografiada por glutatión agarosa. En todo caso, al realizar la microsecuenciación de la subunidad β purificada, no se observó contaminación con glutatión transferasa.

La subunidad β silvestre así como las proteínas mutantes fueron todas funcionales, aunque hubo variaciones bastante grandes en el rendimiento de cada una de ellas. Con algunas mutantes la cantidad de proteína obtenida fue mayor que para la proteína silvestre y con otras menor, obteniéndose el mayor rendimiento con la mutante delecionada $\beta\Delta^{179-215}$ (2,5 mg/ml) y el menor con la mutante $\beta C^{137,140} \rightarrow A$ (0,1 mg/ml).

La diferencia en el rendimiento obtenido, se debió a la distinta solubilidad que presentaron las proteínas mutantes, ya que al analizar en geles desnaturantes los extractos totales de las bacterias inducidas, la cantidad total de proteína expresada era aproximadamente igual en todos los casos.

C.- Reconstitución de la holoenzima a partir de las subunidades recombinantes purificadas.

Cuando se realizaron los estudios de reconstitución a partir de las subunidades α y β purificadas, se vio que la subunidad β era capaz de asociarse espontáneamente con la subunidad α para reconstituir la holoenzima tetramérica, produciéndose una estimulación de la actividad de alrededor de 5 veces. La estimulación máxima se obtuvo cuando se usaron cantidades equimolares de ambas subunidades, lo cual indica que existe una alta afinidad entre ellas.

Estos resultados, concuerdan plenamente con los obtenidos por Grankowski y cols. (1991) y Birnbaum y cols. (1992), los cuales expresaron las subunidades α y β humana en bacterias a partir del vector pT7-7 y de *Drosophila* en el sistema de expresión de baculovirus respectivamente. Sin embargo, el grupo de Chambaz utilizando el mismo sistema de expresión en baculovirus, fue incapaz de ver asociación *in vitro* de las subunidades expresadas separadamente (Filhol y cols., 1991). Este hecho hizo concluir a estos investigadores, que para que pudiera haber una reconstitución efectiva de la holoenzima, era indispensable que ambas subunidades fueran coexpresadas en la misma célula.

Actualmente ya no existe duda a este respecto, ya que ha sido ampliamente demostrado tanto por nosotros como por diversos otros grupos, que la asociación entre ambas subunidades ocurre *in vitro* espontáneamente.

La otra alternativa que existe de expresar la CK2 recombinante es mediante la expresión bicistrónica, la cual constituye genéticamente el procedimiento más elegante, ya que permite que ambas subunidades sean sintetizadas en la misma proporción y que la reconstitución de la holoenzima ocurra *in vivo*. Sin embargo, este sistema tiene la desventaja

de obtener la subunidad β fosforilada, lo cual para ciertos estudios no es deseable, y este sistema tampoco permite la obtención de las subunidades en forma separada.

En todo caso, se ha visto que la enzima sintetizada por este sistema presenta iguales características que la enzima nativa y que la reconstituída a partir de las subunidades recombinantes expresadas y purificadas en forma separada (Bodenbach y cols., 1994).

D- Estudio de las diversas proteínas mutantes de la subunidad β

D.1.- Efecto de las proteínas mutantes sobre la estimulación de la actividad de la subunidad α

Al estudiar el efecto de las diferentes subunidades β mutantes sobre la actividad de la subunidad α , se pudo observar que tres de ellas presentaban una mayor estimulación que la producida por la subunidad β silvestre. Estas mutantes fueron la $\beta D^{59}E^{60}E^{61} \rightarrow A$, $\beta D^{55}E^{57}D^{59}E^{60}E^{61} \rightarrow A$ y $\beta P^{58} \rightarrow A$.

Este efecto nos pareció extraordinariamente interesante, ya que la sustitución de algunos de los residuos de carga negativa presentes en la región hiperacídica de la subunidad β por aminoácidos neutros, hace que se obtenga una proteína mutante que es capaz de producir una hiperestimulación de la actividad de la subunidad α . La hiperactivación observada en estas mutantes, además pone de manifiesto una función que estaría cumpliendo esta región polianiónica en la subunidad β , que sería la de atenuar la actividad de la holoenzima, ya que al remover ciertos residuos acídicos de esta región, se estimula la actividad de la CK2 en un mayor grado.

Durante el desarrollo de esta tesis, Boldyreff y cols. publicaron resultados obtenidos con diversas proteínas mutantes de la subunidad β en las

cuales fueron cambiando los residuos ácidos ubicados dentro de esta región hiperácida de la proteína, y también encontraron que estas mutantes producían una hiperestimulación de la actividad de la CK2. De acuerdo a sus resultados, serían el aspártico 55 y el glutámico 57 los residuos más efectivos en producir la atenuación de la actividad, ya que las mutantes $\beta D^{55}E^{57} \rightarrow A$ y $\beta D^{55}L^{56}E^{57} \rightarrow A$ resultaron ser las que causaban una mayor estimulación de la actividad (Boldyreff y cols. 1993).

La otra proteína mutante nuestra que también presentó una hiperestimulación de la actividad fue la mutante $\beta P^{58} \rightarrow A$, en la cual se cambió la prolina 58 que se encuentra en el centro de la región hiperácida, por alanina. Esta mutación elimina la torción que provoca este aminoácido dentro de la región ácida de la subunidad β , lo cual es muy interesante ya que indica que no sólo es importante la naturaleza ácida de este segmento atenuador de la actividad, sino que también son necesarias ciertas características estructurales. Respecto a este punto, cabe hacer notar que de 105 secuencias presentes en diversas proteínas sustrato de la CK2, 25 presentan residuos de prolina ubicados muy próximos de la serina o treonina fosforilable, ubicándose siempre ésta hacia el extremo amino terminal del residuo hidroxilado (Meggio y col., 1994).

El efecto observado con la mutante $\beta P^{58} \rightarrow A$ complementa el resultado obtenido con las mutantes de la región hiperácida, ya que nos proporciona mayor información acerca de las características que son importantes de la región atenuadora de la actividad. El hecho que la región hiperácida presente tanta semejanza con las secuencias de las proteínas sustrato y además tenga una función atenuadora de la actividad, nos hace pensar en la posibilidad de que este segmento de la proteína

podiera estar actuando como un seudosustrato, manteniendo un cierto grado de inhibición sobre la holoenzima.

La otra mutante, que también apoya la idea de que este segmento ácido pudiera estar actuando como un seudosustrato, es la mutante $\beta P^{58} \rightarrow Y$. En esta mutante se sustituyó a la prolina 58 por una tirosina, para ver si la introducción de la tirosina en el centro del segmento ácido de la subunidad β causaba el mismo efecto al observado con los polipéptidos inhibidores poli glu-tir (Téllez y cols., 1990). En estos casos, la presencia de tirosina aumenta notoriamente la afinidad del péptido por la enzima.

Como se vio en la **Figura 13**, la mutante $\beta P^{58} \rightarrow Y$ produjo una estimulación menor que la subunidad β silvestre, estimulando sólo 2,8 veces la actividad de α . Este resultado concuerda plenamente con lo esperado, ya que indicaría que en esta mutante, la región ácida estaría teniendo un mayor efecto atenuador de la actividad debido probablemente a una mayor afinidad de la subunidad α por este segmento.

A pesar de lo bien que calzan todos estos resultados, el efecto observado con la mutante $\beta P^{58} \rightarrow Y$ no ha podido ser reproducido en forma sistemática en nuestro laboratorio, obteniéndose posteriormente con esta proteína mutante estimulaciones muy semejantes a las observadas con la subunidad β silvestre. Sin embargo, si consideramos que en la mutante $\beta P^{58} \rightarrow Y$ estamos viendo la combinación de dos efectos, los cuales son la remoción de la prolina (que como ya vimos producía una hiperestimulación de la actividad) y la introducción de la tirosina dentro del segmento ácido, entonces podemos pensar que aunque la mutante $\beta P^{58} \rightarrow Y$ estimule a la subunidad α en el mismo grado que la subunidad β silvestre, de igual forma el efecto neto de la tirosina es el de aumentar el efecto atenuador de la actividad. Por ello si comparamos la activación producida por la mutante $\beta P^{58} \rightarrow Y$ con la mutante $\beta P^{58} \rightarrow A$ vemos que hay

una diferencia muy grande, y aunque la mutante $\beta P^{58} \rightarrow Y$ produzca una estimulación semejante a la subunidad β silvestre igual el efecto neto va a ser de menor estimulación.

Una forma de determinar si la tirosina realmente está participando en aumentar el efecto atenuador de este segmento ácido, sería el de estudiar la mutante $\beta P^{58} \rightarrow F$, ya que este residuo presenta características parecidas a la tirosina y sin embargo no tiene ningún efecto en el aumento de la potencia inhibidora de los polipéptidos ácidos.

D.2.- Estudio comparativo de la estimulación producida por las diversas proteínas mutantes de la subunidad β sobre la subunidad α silvestre y la mutante $\alpha K^{75,76} \rightarrow E$

En el estudio comparativo realizado sobre la estimulación que las distintas subunidades β mutantes producen sobre la subunidad α silvestre y la subunidad mutante $\alpha K^{75,76} \rightarrow E$, se vio que las dos mutantes hiperactivadoras ($\beta D^{59} E^{60} E^{61} \rightarrow A$ y $\beta P^{58} \rightarrow A$), estimulaban aún más la actividad de la subunidad α alterada. Este resultado apoyaría la idea de que la región rica en lisinas de la subunidad α pudiera de alguna manera estar interactuando con la región ácida de la subunidad β atenuadora de la actividad, ya que al ser reemplazadas dos de las lisinas por glutámicos, se están cambiando dos residuos de carga positiva por dos de carga negativa en esta región de la subunidad α , lo cual se estaría viendo reflejado como un menor efecto atenuador de la subunidad β o una mayor activación de la holoenzima. Sería interesante sintetizar la mutante $\alpha K^{74,75,76,77} \rightarrow E$, en la cual se hayan sustituido las cuatro lisinas de esta región por glutámicos, y ver si la diferencia en el efecto de activación es más marcada.

Respecto a la participación de esta región policatiónica de la subunidad α en la interacción con los residuos ácidos del sustrato, se ha visto que la mutante α K^{75,76}→E presenta una afinidad muy disminuída por heparina, que es un inhibidor competitivo del sustrato proteico, pero la afinidad por el sustrato permanece prácticamente inalterada (Hu y Rubin, 1990b y Gatica y cols., 1994). Recientemente sin embargo, el grupo de Pinna realizó un estudio con la mutante α K^{74,75,76,77}→A mucho más detallado, usando una serie de péptidos sustratos diferentes, en el cual se pudo determinar que esta región policatiónica participaba interactuando con los residuos ácidos del sustrato, localizados en la posición +2 y +3 con respecto al residuo fosforilado (Sarno y cols., 1995).

Por lo tanto, de acuerdo a estos resultados es posible que la región hiperácida de la subunidad β se esté comportando como un seudosustrato y esté interactuando con la región policatiónica rica en lisinas de la subunidad α y de este modo esté atenuando la actividad de la CK2.

D.3.- Importancia del extremo carboxilo terminal en la interacción de la subunidad β con la subunidad α

Boldyreff y cols. realizaron un estudio muy completo analizando una gran cantidad de mutantes de la subunidad β que contenían distintos grados de deleción en su extremo carboxilo terminal. Las mutantes delecionadas estudiadas fueron $\beta\Delta^{209-215}$, $\beta\Delta^{194-215}$, $\beta\Delta^{181-215}$, $\beta\Delta^{171-215}$ y $\beta\Delta^{150-215}$.

De estas proteínas, las mutantes $\beta\Delta^{209-215}$ y $\beta\Delta^{194-215}$ pudieron asociarse y activar a la subunidad α normalmente, en cambio las mutantes $\beta\Delta^{150-215}$ y $\beta\Delta^{171-215}$ no pudieron reconstituír la enzima tetramérica y en consecuencia tampoco fueron capaces de producir estimulación de la actividad. La mutante $\beta\Delta^{181-215}$ presentó un efecto intermedio, ya que aunque fue menos

activa que la subunidad β silvestre, al usar una razón molar de β/α de 2:1 fue capaz de estimular a la subunidad α normalmente (Boldyreff y cols., 1993).

La proteína mutante $\beta\Delta^{179-215}$ estudiada por nosotros, que sólo tiene dos aminoácidos menos que la mutante $\beta\Delta^{181-215}$ mencionada anteriormente, fue también capaz de interactuar con la subunidad α pero con una afinidad muchísimo más baja, ya que se necesitaron razones molares de β/α sobre 20, para lograr observar algún efecto activador. Es interesante notar que aunque la afinidad de la subunidad β delecionada fue tan baja, ésta igualmente fue capaz de estimular a la subunidad α .

De acuerdo a estos resultados podemos concluir, que el segmento carboxilo terminal comprendido entre los residuos 171 y 180 de la proteína tiene una participación importante en la interacción con la subunidad α , especialmente los residuos 179 y 180 que provocan una disminución de la afinidad de más de 10 veces.

Dentro de esta región carboxilo terminal de la subunidad β , hay cuatro residuos que presentan carga positiva y uno que presenta carga negativa ($^{171}\underline{\text{H}}\underline{\text{P}}\underline{\text{E}}\underline{\text{Y}}\underline{\text{R}}\underline{\text{P}}\underline{\text{K}}\underline{\text{R}}\underline{\text{P}}\underline{\text{A}}^{180}$), los cuales fueron mutados uno por uno a alanina por Boldyreff y cols. con el objeto de estudiar su posible participación en la interacción con la subunidad α (Boldyreff y cols., 1993). Ninguno de los residuos mutados, resultó ser en forma individual indispensable para la interacción entre ambas subunidades, por lo que se postula que es la conformación general de este segmento y no la cadena lateral de algún aminoácido específico la que es requerida para que se produzca una interacción efectiva entre ambas subunidades.

Al inspeccionar la secuencia de este segmento carboxilo terminal, llama también mucho la atención la presencia de tres residuos de prolina ($^{171}\underline{\text{H}}\underline{\text{P}}\underline{\text{E}}\underline{\text{Y}}\underline{\text{R}}\underline{\text{P}}\underline{\text{K}}\underline{\text{R}}\underline{\text{P}}\underline{\text{A}}^{180}$), una de las cuales corresponde al residuo 179 que

se encuentra presente en la mutante $\beta\Delta^{181-215}$ pero ausente en la $\beta\Delta^{179-215}$. Por lo tanto, de acuerdo a los resultados obtenidos con las mutantes delecionadas antes mencionadas, es muy probable que estas prolinas estén jugando un papel importante en la estructuración de la conformación requerida para la interacción de la subunidad β con la subunidad α . Una forma de comprobar esta hipótesis, sería la de mutar estas prolinas una por una o en conjunto y luego determinar su efecto en la interacción con α .

Respecto al extremo amino terminal, sólo se han realizado deleciones de 4 aminoácidos para estudiar el efecto que tiene la remoción del sitio de autofosforilación de la subunidad β (Boldyreff y cols., 1994) y se ha visto que esta proteína mutante es capaz de reconstituir la holoenzima normalmente. Sería muy informativo estudiar que sucede al realizar deleciones mayores del extremo amino de la subunidad β , para ver si esta región tiene participación en la activación de la subunidad α , ya que hasta el momento no se ha logrado encontrar una mutante de la subunidad β que sea capaz de reconstituir la holoenzima, pero no de estimular la actividad de la subunidad α .

D.4.- Estudio de la autofosforilación de la subunidad α y de las subunidades β silvestre y β mutantes

La autofosforilación de la subunidad β es un hecho ya conocido hace bastante tiempo (Hathaway y Traugh, 1979 y Meggio y Pinna 1984b). Sin embargo, debido a las pequeñas cantidades de enzima de que se disponía y debido a que la subunidad β posee el extremo amino bloqueado (lo cual impide su microsecuenciación), tardó mucho tiempo en poder determinarse con certeza cuáles eran los residuos autofosforilados.

En un estudio realizado por Litchfield y cols. en 1991, ellos vieron que el sitio de autofosforilación de la subunidad β se encontraba ubicado en un nonapéptido del extremo amino terminal de la proteína. Tomando en cuenta este resultado y el hecho de que las serina 2 y 3 de la subunidad β son las únicas que cumplen con la secuencia de consenso de fosforilación de la CK2, ellos identificaron a estos dos residuos como los sitios de autofosforilación más probables de la subunidad β .

Como ya se mostró en Resultados, en el estudio realizado en este trabajo de tesis con la mutante $\beta S^{2,3} \rightarrow G$ se logró determinar con absoluta certeza que las serinas 2 y 3 constituían el único sitio de autofosforilación de la subunidad β (Hinrichs y cols., 1993). Posteriormente en estudios realizados por Boldyreff y cols. (1994) se confirmó este hecho, al determinar que la mutante $\beta \Delta^{1-4}$ (la cual carece de los cuatro primeros residuos MSSS) tampoco podía ser autofosforilada.

Por analogía con una serie de otras quinasas cuya actividad es regulada por autofosforilación (p.ej.: la proteína quinasa II dependiente de calmodulina y la proteína quinasa del receptor de insulina), se pensó en la posibilidad de que la autofosforilación de la subunidad β pudiera estar jugando algún papel regulatorio en la CK2.

La complicación que presentaba este estudio, era que la reacción de autofosforilación ocurre mucho más rápidamente que la fosforilación de los sustratos utilizados para medir la actividad de la CK2, lo cual impide determinar la actividad de la enzima no autofosforilada.

Con la mutante $\beta S^{2,3} \rightarrow G$ sin embargo, nos fue posible realizar este estudio, ya que como se demostró anteriormente esta subunidad no sufre de autofosforilación. Como se describió antes, esta proteína mutante fue igualmente efectiva en reconstituir la enzima tetramérica y en estimular la actividad de α , lo que indicaría que la autofosforilación no tiene ningún

efecto sobre la actividad de la enzima. Es posible sin embargo, que la fosforilación en las serinas 2 y 3 pudiera tener importancia en la regulación fisiológica de esta proteína quinasa, que bajo las condiciones estudiadas no fue posible detectar. Por ejemplo, es posible que la autofosforilación de la subunidad β influya en una serie de otros procesos que no han sido evaluados, tales como la unión de algunas proteínas sustrato que sean más fisiológicos que la caseína (Palen y Traugh, 1991) o que ésta afecte la translocación de la CK2 al núcleo (Lorenz y cols., 1993) o que se vea afectada la estabilidad de la proteína, como se ha visto que ocurre con el oncogen *mos* (Nishizawa y cols., 1992). De manera que es muy prematuro aseverar que la autofosforilación de la subunidad β no tiene ningún efecto importante en la regulación de la CK2 y sería muy interesante estudiar con la mutante $\beta S^{2,3} \rightarrow G$ otros aspectos, como su velocidad de transporte al núcleo, su vida media o su efecto en la fosforilación de diversas proteínas sustrato que se haya comprobado que *in vivo* son fosforiladas por la CK2.

Si tenemos en consideración los resultados anteriores, que indican que la autofosforilación de la subunidad β no modifica la actividad de la CK2, entonces debemos pensar en la posibilidad de que existan otros sitios de fosforilación en la subunidad β , mediados por otras proteína quinasas que den cuenta del aumento de actividad observado en respuesta a los agentes mitogénicos observados por Sommercorn y Krebs (1988), Carrol y Marshak (1989), Ackerman y cols. (1990), etc.

Como se mencionó anteriormente, el otro sitio de fosforilación que presenta la subunidad β es la serina 209, la cual es fosforilada por la cdc2 quinasa (Litchfield y cols., 1991). De acuerdo a estudios realizados por Mulner-Lorillon y cols. (1990), la fosforilación de una treonina de la subunidad β por esta quinasa produciría un aumento de la actividad de la

CK2. Sin embargo, no se ha encontrado ninguna treonina fosforilada *in vivo* en la CK2 β , y estudios realizados por el grupo de Pinna con la mutante $\beta\Delta^{209-215}$, demostraron que este sitio no era esencial para la reconstitución de la holoenzima activa (Meggio y cols., 1993), ni tampoco su fosforilación modificaba la actividad de la enzima. De manera que hasta el momento no existe ninguna evidencia que relacione el nivel de actividad de la CK2 con el grado de fosforilación de ésta.

Al comparar nuestros resultados de autofosforilación con los del grupo de Issinger y Pinna, vimos que teníamos ciertas diferencias con respecto al efecto de polilisina sobre la autofosforilación de la subunidad β . En nuestro caso, polilisina no afecta la autofosforilación de esta subunidad, en cambio ellos ven que este polipéptido catiónico inhibe fuertemente la autofosforilación de esta proteína (Meggio y cols., 1992b).

La diferencia observada es muy poco probable que se deba a que ellos trabajan con la subunidad β humana y nosotros con la de *Xenopus*, ya que ambas proteínas sólo se diferencian en el penúltimo aminoácido del extremo carboxilo terminal, y como se demostró anteriormente, el sitio de autofosforilación se encuentra en el segundo y tercer aminoácido del extremo amino terminal de la subunidad β . La otra diferencia existente entre ambas proteínas son los 6 aminoácidos adicionales en el extremo amino terminal que posee nuestra subunidad β , los cuales se encuentran bastante cercanos al sitio de autofosforilación y podrían de alguna manera interferir con el efecto de polilisina en la reacción de autofosforilación. Una forma de dilucidar este problema, sería el de expresar la subunidad β en otro vector que permita obtener la proteína libre de otros aminoácidos en el extremo amino y luego ver si bajo nuestras condiciones ésta se comporta diferente.

Un efecto bastante sorprendente en la reacción de autofosforilación de la subunidad β , fue el obtenido por Boldyreff y cols. (1994) con la proteína mutante $\beta E^{5,6} \rightarrow A$, ya que a pesar de que en esta mutante se removieron los dos residuos ácidos (los glutámicos 5 y 6) que son indispensables para constituir el único sitio de autofosforilación de la CK2, esta mutante fue capaz de ser autofosforilada en un 24%.

Una probable explicación frente a este hecho, sería el efecto observado por este mismo grupo, que ha visto que la región hiperacídica de la subunidad β tiene gran influencia en la autofosforilación de la misma. En estudios realizados con proteínas mutantes, en las cuales se han cambiado algunos de los aminoácidos de carga negativa ubicados en la región comprendida entre los aminoácidos 55-61 (mutantes hiperactivadoras), se ha visto que éstas presentan un grado de autofosforilación mucho menor (Boldyreff y cols. 1994). Especialmente importantes parecen ser los residuos 55 y 57, que son también los más importantes en atenuar la actividad de la subunidad α . De acuerdo a estos resultados, es posible que en la estructura tridimensional de la subunidad β exista alguna interacción entre ambas regiones y que la región hiperacídica participe de alguna manera en la reacción de autofosforilación de esta proteína.

Un hecho que apoya la hipótesis anterior, que indica que no sólo es importante la secuencia inmediata al sitio de fosforilación, sino que también influye mucho la estructura tridimensional de la proteína sustrato, son las grandes diferencias observadas entre la fosforilación de la proteína nativa y los correspondientes péptidos que sólo abarcan el sitio de fosforilación. Especialmente impresionante resulta el caso del antioncogen p53 que como sustrato de la CK2 presenta una K_m menor a

1 μ M, mientras que el péptido de esa proteína que se fosforila, presenta una K_m de 1,42 mM (Meggio y cols., 1994).

Con respecto al efecto de la región hiperacídica de la subunidad β en la reacción de autofosforilación, nuestros resultados tampoco concuerdan con los del grupo de Issinger, ya que en nuestro caso las mutantes hiperestimuladoras $\beta D^{59}E^{60}E^{61} \rightarrow A$, $\beta D^{55}E^{57}D^{59}E^{60}E^{61} \rightarrow A$ y $\beta P^{58} \rightarrow A$ presentaron un efecto absolutamente opuesto, es decir éstas sufrieron una autofosforilación mayor. Es importante hacer notar sin embargo, que el efecto más pronunciado que ellos observaron en la inhibición de la autofosforilación fue con la mutante $\beta D^{55}E^{57} \rightarrow A$, que nosotros no estudiamos.

Es posible que los efectos de inhibición de la autofosforilación de la subunidad β por polilisina y la disminución de la autofosforilación de las mutantes hiperactivadoras se deban a una misma causa, que como se mencionó anteriormente pudieran ser los aminoácidos adicionales que posee nuestra subunidad β en el extremo amino que son GSPGYQ. Aunque estos residuos no presentan ninguna carga, la prolina presente en este segmento podría estar produciendo una torsión que esté dificultando la posible interacción de la región hiperacídica con el sitio de autofosforilación.

D.5.- Efecto protector de las subunidades β mutantes sobre la inactivación térmica de la subunidad α

Estudios de dicroísmo circular realizados por Issinger y cols. (1992), demostraron que la subunidad β al interactuar con la subunidad α induce en ella un cambio conformacional que aumenta su contenido en α hélice y que le confiere una estructura más compacta y resistente frente a la acción proteolítica y a los agentes desnaturantes (Meggio y cols., 1992a).

Con el objeto de determinar si las diferentes proteínas mutantes de la subunidad β producían este efecto sobre la subunidad α , se procedió a estudiar el efecto de estas mutantes sobre la estabilidad de la actividad de la subunidad α frente a la inactivación térmica.

Como se mostró anteriormente, todas las subunidades β mutantes estudiadas aumentaron la termoestabilidad de la subunidad α , con excepción de la mutante $\beta \Delta^{179-215}$. Sin embargo, a diferencia de los resultados obtenidos por el grupo de Issinger (Boldyreff y cols. 1993), que vieron que todas las subunidades β que eran capaces de reconstituir la holoenzima protegían casi completamente y en forma similar a la subunidad α de la inactivación térmica, el grado de protección que se obtuvo con las diferentes mutantes fue muy variable.

De acuerdo a nuestros resultados se podría concluir que :

- todas las subunidades β mutantes que fueron capaces de interactuar con la subunidad α para reconstituir la holoenzima, fueron también capaces de aumentar su estabilidad térmica.
- en general, la protección frente a la inactivación térmica de cada proteína mutante fue directamente proporcional a su capacidad estimuladora de la actividad de la subunidad α , lo que indica que la subunidad β ejercería un cierto grado de interacción sobre el sitio catalítico de la subunidad α .

D.6.- Efecto de heparina sobre la actividad de la subunidad α monomérica y reconstituída con diferentes subunidades β mutantes

Al estudiar el efecto de heparina sobre la subunidad α monomérica y sobre las holoenzimas reconstituídas con las diferentes subunidades β se vio que todas ellas eran inhibidas en una forma muy similar. Este resultado concuerda con el obtenido por el grupo de Traugh (Lin y cols.,

1991), que vieron que tanto la holoenzima como la subunidad α se comportaban de la misma manera frente a este inhibidor.

Como ya fue demostrado anteriormente por Hu y Rubin (1990b) y Gatica y cols.(1994) (también se confirma en este trabajo al mostrar lo resistente a la inhibición por heparina que es la mutante α K^{75,76}→E), la subunidad α es la que interactúa con la heparina a través del segmento rico en lisinas que posee esta proteína, lo que concuerda con el hecho observado que la subunidad β no tenga influencia en esta inhibición.

En los estudios de inhibición con heparina realizados por el grupo de Issinger sin embargo, ellos vieron que las holoenzimas, reconstituídas tanto con la subunidad β silvestre como las subunidades β mutantes, eran mucho más resistentes frente a la inhibición que la subunidad α monomérica (Boldyreff y cols., 1993).

Es difícil encontrar una explicación ante estos resultados tan diferentes, pero una posibilidad es que haya influido el tipo de sustrato utilizado, ya que el grupo de Issinger utilizó un péptido sintético pequeño (RRRDDDSDDD) y el grupo de Traugh y nosotros usamos caseína.

D.7.- Influencia de la subunidad β silvestre y mutantes en el reconocimiento del copolímero poli glu-tir

En estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio se demostró que la CK2 presentaba una afinidad muchísimo más alta por copolímeros que contenían residuos de tirosina intercalados dentro de polipéptidos constituidos por residuos acídicos en proporción 4:1, que por los homopolímeros que contenían sólo residuos ácidos (Téllez y cols., 1990). Para determinar si era el carácter hidrofóbico de la tirosina la causante de esta mayor afinidad, se hizo un estudio con un copolímero que contenía fenilalanina y ácido glutámico en la misma proporción que el polipéptido

anterior. Sin embargo, este copolímero presentó la misma afinidad que el homopolímero de ácido glutámico, lo que descarta que el efecto observado se deba a la naturaleza hidrofóbica de la tirosina. Por lo tanto de acuerdo a estos resultados sería el grupo hidroxilo de la tirosina el responsable de esta interacción tan específica con la enzima.

Otra evidencia que apoya esta idea, es el estudio realizado por Meggio y Pinna (1989), que estudiaron el comportamiento del polipéptido de ácido glutámico y O-acetiltirosina, y vieron que éste compuesto ejercía un efecto inhibitorio incluso inferior al del homopolímero de ácido glutámico. Posteriormente, con el objeto de determinar si la enzima presentaba alguna preferencia con respecto a la posición de la tirosina en la secuencia de residuos ácidos, se hizo un estudio utilizando dos tipos de péptidos, el Y_2E_9 y el E_9Y_2 . El resultado fue que el péptido que tenía las tirosinas a la izquierda (Y_2E_9) fue mejor inhibidor que el que las tenía a la derecha (E_9Y_2) (Hinrichs y cols., 1993).

La preferencia observada por la enzima por el péptido que contenía el residuo de tirosina precediendo a los residuos ácidos concuerda también con la secuencia de consenso de fosforilación de la CK2 que es S/T X X D/E, lo que indicaría que la enzima tiene la capacidad de reconocer a estas tirosinas en su sitio activo, pero no de fosforilarlas, ya que estos péptidos o copolímeros no son sustrato de ella.

Posteriormente, cuando se pudo disponer de las subunidades de la CK2 en forma aislada, se vio que la subunidad β tenía una gran influencia en la alta afinidad que presentaba la CK2 por los copolímeros de tirosina y ácido glutámico, ya que la holoenzima era por lo menos 10 veces más sensible frente a la inhibición de este compuesto que la subunidad α monomérica. Al estudiar el efecto de los péptidos Y_2E_9 y E_9Y_2 sobre la enzima monomérica, se vio que la subunidad α era inhibida en igual forma

por ambos péptidos, en oposición a lo visto anteriormente con la holoenzima que presentaba mayor afinidad por el péptido Y₂E₉ (Hinrichs y cols., 1993).

Por lo tanto de acuerdo a estos resultados, la subunidad β tendría un papel muy importante en la holoenzima, ya que estaría participando en el reconocimiento de los residuos de tirosina y además sería la responsable de discriminar entre la posición de ellas dentro del polipéptido ácido.

En el estudio de inhibición realizado con poli glu-tir en esta tesis se trató de determinar si las proteínas mutantes de la subunidad β se comportaban de igual forma que la subunidad β silvestre en su capacidad de aumentar la afinidad de la holoenzima por poli glu-tir. Como se mostró en Resultados, con la excepción de la mutante $\beta\Delta^{179-215}$, todas las demás mutantes analizadas aumentaron la afinidad de la subunidad α por el polipéptido con tirosina, lo que indica que probablemente ninguno de los residuos mutados participa en el reconocimiento de la tirosina. El menor efecto observado con la mutante delecionada, se debe a que sólo se formó una pequeña fracción de holoenzima, ya que esta subunidad β presenta una afinidad muy disminuída por la subunidad α .

Las propiedades presentadas por la CK2, con respecto a su afinidad por los residuos de tirosina, la asemejan mucho a las proteína quinasas con especificidad dual que han sido descritas recientemente (Lindberg y cols., 1992). Este tipo de quinasas constituyen un nuevo grupo de enzimas que son capaces de fosforilar tanto serinas y treoninas como tirosinas, dentro de las cuales las mejor caracterizadas son wee1 (Parker y cols., 1992) y la proteína quinasa MEK. Aunque la CK2 no es capaz de fosforilar tirosinas, ésta reconoce en forma muy específica a estos residuos, lo que la sitúa en una posición intermedia con respecto a ambos grupos de quinasas.

Aunque el copolímero glu-tyr es un compuesto sintético que no tiene ninguna relevancia en la regulación fisiológica de la CK2, es posible que existan secuencias similares en algunas proteínas celulares y que jueguen un papel importante en la regulación de la actividad de la enzima. Respecto a este punto es interesante considerar que muchas de las proteínas sustrato de las tirosina quinasas, poseen la tirosina fosforilable inmersa en secuencias de aminoácidos. Si tomamos en cuenta los resultados descritos anteriormente podemos fácilmente deducir, que los sustratos de las tirosina quinasas serían excelentes inhibidores de la CK2. La subunidad β tendría en ese caso una función muy importante al modular la afinidad de la enzima por estas secuencias inhibitoras.

E.- Perspectivas futuras

Del trabajo presentado puede apreciarse, la gran utilidad que proporciona la técnica de mutagénesis dirigida y la valiosa información que puede obtenerse de las proteínas mutantes. Sin embargo, lo ideal es poder conocer la estructura tridimensional de la proteína, para así poder diseñar las mutaciones en forma más precisa y luego poder correlacionar los resultados obtenidos con las proteínas mutantes, con la estructura de la proteína. Lamentablemente no se conoce la estructura terciaria de la subunidad β , ni de ninguna otra proteína que presente algún grado de similitud con ella, por lo que no es posible hacer ningún tipo de aproximación con respecto a su estructura tridimensional. Por este motivo, es que para conocer el mecanismo de regulación y la función de esta subunidad en la CK2, es muy importante que en el futuro se realice un estudio estructural de la subunidad β , para así poder complementarlo con los estudios de mutagénesis.

Otra pregunta que está pendiente y que sería muy importante de estudiar, es ver si la "caja de destrucción" presente en la subunidad β tiene alguna función. Sería muy interesante sintetizar proteínas mutantes de la subunidad β en las que se hayan mutado la arginina 47 (que se sabe que es fundamental para la ubiquitinación y degradación de las ciclinas) o la lisina 33 (ya que ésta es la única lisina situada hacia el extremo amino de la caja de destrucción y debería ser la que se modifica con ubiquitina) y estudiar su velocidad de degradación, comparándola con la subunidad β silvestre en las distintas etapas del ciclo celular. La función de la autofosforilación en la degradación de esta subunidad también es algo que valdría la pena analizar.

El problema de no poder determinar el mecanismo de regulación de la CK2 quizás se deba, a que como la subunidad catalítica α es activa aún en ausencia de la subunidad reguladora β , la diferencia de actividad observada a lo largo del ciclo celular no sea tan significativa como en el caso de la cdc2 quinasa. Por lo tanto, para poder realmente determinar si la actividad de la CK2 está siendo regulada por un aumento en la síntesis o degradación de la subunidad β , habría que hacer un estudio muy riguroso en células sincronizadas, midiendo los niveles de esta proteína en las distintas etapas del ciclo celular. También sería importante analizar si existe alguna correlación entre los niveles de la subunidad β y los niveles de actividad en células tratadas con hormonas o factores de crecimiento, que se ha visto que incrementan la actividad de la CK2.

Una estrategia diferente a la utilizada en esta tesis, para estudiar la función de la subunidad β , sería la de microinyectar oligonucleótidos "antisense" contra el RNA mensajero de la subunidad β y estudiar luego su efecto en las diferentes etapas del ciclo celular, o sobre los distintos

componentes del sistema de transducción de señales. En estudios de este tipo realizados por el grupo de Pyerin en fibroblastos de pulmón humano (IMR-90), ellos vieron que al disminuir los niveles de la subunidad β se producía una inhibición de la proliferación celular y la proporción de células que habían sido microinyectadas con oligos "antisense" que pasaban a la fase S después de ser tratadas con suero era mucho menor (Lorenz y cols., 1994). Sin embargo, estos estudios sólo demuestran que la CK2 es importante para la proliferación celular, pero no indican cuál sería la función de esta quinasa, ni a que nivel ésta participaría. Por lo tanto, sería interesante estudiar como se ven afectadas etapas más precisas del sistema transductor de señales que conduce a la división celular, como por ejemplo, como se ve afectada la actividad de las MAP quinasas, la cdc2 quinasa, el nivel de fosforilación de diversas proteínas sustrato de la CK2, la inducción de los genes tempranos como jun y fos, etc.

CONCLUSIONES

Las conclusiones más importantes obtenidas en este trabajo de tesis son las siguientes :

1) Se aisló el gen de la subunidad β de la CK2 de *Xenopus laevis* y luego se expresó y purificó la proteína recombinante, la cual fue capaz de interactuar *in vitro* con la subunidad α para reconstituir la holoenzima tetramérica.

2) Al interactuar la subunidad β con la subunidad α para reconstituir la holoenzima se observaron los siguientes efectos :

-la actividad de la subunidad catalítica aumentó alrededor de 5 veces.

-se autofosforiló la subunidad β y la autofosforilación de la subunidad α se incrementó en gran medida.

-la estabilidad térmica de la subunidad α se vio muy aumentada.

-la sensibilidad frente a heparina no se vio modificada. En cambio, la inhibición frente al copolímero poli glu-tir (4:1) fue mucho mayor.

3) A través del estudio con la proteína mutante $\beta S^{2,3} \rightarrow G$, se pudo establecer con absoluta certeza, que las serinas 2 y 3 constituyen el único sitio de autofosforilación de la subunidad β y que la autofosforilación no interfiere con la reconstitución de la holoenzima, ni tampoco modifica la actividad de ella.

4) El extremo carboxilo terminal de la subunidad β participa en la interacción con la subunidad α , donde los residuos 179 y 180 juegan un papel especialmente importante.

5) La región hiperacídica de la subunidad β , comprendida entre los residuos 55 y 64, tiene una función atenuadora de la actividad, dentro de la cual la prolina 58 tiene también gran importancia.

BIBLIOGRAFIA

- Abramowitz, J., Mattera, R. , Liao, C.F., Olate, J., Perez-Ripoll, E., Birnbaumer, L. and Codina, J. (1988) Screening of cDNA libraries with oligonucleotides as applied to signal transducing G proteins, Receptors and Effectors. *J. Rec. Res.* 8 : 561-588.
- Ackerman, P. and Osheroff, N. (1989) Regulation of casein kinase II activity by epidermal growth factor in human A-431 carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 264: 11958-11965.
- Ackerman, P., Glover, C.V.C., and Osheroff, N. (1990) Stimulation of casein kinase II by epidermal growth factor: Relationship between the physiological activity of the kinase and the phosphorylation state of its β subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 821-825.
- Agostinis, P., Vandenheede, J.R., Goris, J., Meggio, F., Pinna, L.A. and Merevede, W. (1987) The ATP, Mg dependent protein phosphatase: regulation by casein kinase. *FEBS Lett.* 224 : 385-390.
- Allende, J.E. and Allende, C.C. (1995) Protein kinase CK2 : An enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation. *FASEB J.* 9 : 313-323.
- Angel, P. and Karin, M. (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta* 1072 : 129-157.
- Belenguer, P., Baldin, V., Mathieu, C., Prats, H., Bensaid, M., Bouche, G. and Amalrich, F. (1989) Protein kinase NII and the regulation of rDNA transcription in mammalian cells. *Nucl. Acids Res.* 17 : 6625-6636.
- Berberich, S.J., and Cole, M.D. (1992) Casein kinase II inhibits the DNA binding activity of Max homodimers, but not Myc/Max heterodimers. *Genes Dev.* 6 : 166-176.
- Bidwai, A.P., Hanna, D.E., and Glover, C.V.C. (1992) Purification and characterization of casein kinase II (CKII) from Dck α 1 Dck α 2 *Saccharomyces cerevisiae* rescued by *Drosophila* CKII subunits. The free catalytic subunit of casein kinase II is not toxic *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 267 : 18790-18796.

- Bidwai, A.P., Reed, J.C., and Glover, C.V.C. (1994)** Casein kinase II of *Saccharomyces cerevisiae* contains two distinct regulatory subunits, β and β' . Arch. Biochem. Biophys. 309 : 348-355.
- Bidwai, A.P., Reed, J.C. and Glover, C.V.C. (1993)** Phosphorylation of calmodulin by the catalytic subunit of casein kinase II is inhibited by the regulatory subunit. Arch. Biochem. Biophys. 300 : 265-270.
- Birnbaum, M.J., Wu, J., O'Reilly, D.R., Rivera-Marrero, C.A., Hanna, D.E., Miller, L.K. and Glover, C.V.C. (1992)** Expression and purification of the α and the β subunits of *Drosophila* casein kinase II using a Baculo vector. Protein exp. Purif. 3 : 142-150.
- Birnboim, H. and Doly, J. (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. 7 : 1513-1516.
- Bodenbach, L., Fauss, J., Robitzki, A., Krehan, A., Lorenz, P., Lozeman, F.J. and Pyerin, W. (1994)** Recombinant human casein kinase II. A study with the complete set of subunits (α , α' and β), site-directed autophosphorylation mutants and bicistronically expressed holoenzyme. Eur. J. Biochem. 200 : 263-273.
- Boldyreff, B., Meggio, F., Pinna, L.A. and Issinger, O-G. (1994)** Efficient autophosphorylation and phosphorylation of the β subunit by casein kinase 2 require the integrity of an acidic cluster 50 residues downstream from the phosphoacceptor site. J. Biol. Chem. 269 : 4827-4831.
- Boldyreff, B., Meggio, F., Pinna, L.A. and Issinger, O-G. (1992)** Casein kinase II structure function relationship: creation of a set of mutants of the β subunit that variably surrogate the wild type β subunit function. Arch. Biochem. Biophys. Commun. 188 : 228-234.
- Boldyreff, B., Meggio, F., Pinna, L.A., and Issinger, O-G. (1993)** Reconstitution of normal and hyperactivated forms of casein kinase 2 by variably mutated β subunits. Biochemistry 32 : 12672-12677.
- Caizergues-Ferrer, M., Belenguer, P., Lapeyre, B., Amalric, F., Wallace, M. O. and Olson, M. O. (1987)** Phosphorylation of nucleolin by a nucleolar type N II protein kinase. Biochemistry 26 : 7876-7883.
- Carrol, D., and Marshak, D. (1989)** Serum stimulated cell growth causes oscillations in casein kinase II activity. J. Biol. Chem. 264 : 7345-7348.

Carroll, D., Santoro, N. and Marshack, D.R. (1988) Regulating cell growth: Casein kinase II dependent phosphorylation of nuclear oncoproteins. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. Vol LII pp. 91-95.

Cochet, C., Job, D., Pirollet, F., and Chambaz, E.M. (1980) Adenosine 3',5'-monophosphate independent protein kinase activities in the bovine adrenal cortex cytosol. *Endocrinology* **106** : 750-757.

Collinge, M.A., and Walker, J.C. (1994) Isolation of an *Arabidopsis thaliana* casein kinase II β subunit by complementation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Mol. Biol.* **25** : 649-658.

Corbett, A.H., Devore, R.F., and Osheroff, N. (1992) Effect of casein kinase II mediated phosphorylation on the catalytic cycle of topoisomerase II. *J. Biol. Chem.* **267** : 20513-20518.

Del Sal, G., Manfioletti, G. and Schneider, C. (1989) The CTAB-DNA precipitation method : A common mini-scale preparation to template DNA from phagemides, phages or plasmids suitable for sequencing. *Biotechniques* **7** : 514-519.

De Paoli-Roach, A.A., Ahmad, Z. and Roach, P.J. (1981) Characterization of a rabbit skeletal muscle protein kinase (PC 0.7) able to phosphorylate glycogen synthase and phosphovitin. *J. Biol. Chem.* **256** : 8955-8962.

De Paoli-Roach, A.A. (1984) Synergistic phosphorylation and activation of ATP-Mg-dependent phosphoprotein phosphatase by F_A /GSK-3 and casein kinase II (PC). *J. Biol. Chem.* **259** : 12144-12152.

Diaz-Nido, J., Serrano, L., Mendez, E. and Avila, J. (1988) A casein kinase II-related activity is involved in phosphorylation of microtubule-associated protein MAP-1B during neuroblastoma cell differentiation. *J. Cell Biol.* **106** : 2057-2065.

Dobrowolska, G., Boldyreff, B., and Issinger, O.-G. (1991) Cloning and sequencing of CK-2 α subunit from *Z. mays*. *Biochim. Biophys. Acta* **1129** : 139-140.

Filhol, O., Cochet, C. and Chambaz, E.M. (1990a) Cytoplasmic and nuclear distribution of casein kinase II: characterization of the enzyme uptake by bovine adenocortical nuclear preparation. *Biochemistry* **29** : 9928-9936.

Filhol, O., Cochet, C. and Chambaz, E.M. (1990b) DNA binding activity of casein kinase II Biochem. Biophys. Res. Commun. 173 : 862-871.

Filhol, O., Cochet, C., Wedegaertner, P., Gill, G.N and Chambaz, E.M. (1991) Coexpression of both α and β subunits is required for assembly of regulated casein kinase II. Biochemistry 30 : 11133-11140.

Fujita-Yamaguchi, Y., Kathuria, S., Xu, Q.U., McDonald, J.M., Nakano, H. and Kamata, T. (1989) In vitro tyrosine phosphorylation studies on Ras proteins and calmodulin suggest that polylysine-like basic peptides or domains may be involved in interactions between insulin receptor kinase and its substrate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 7306-7310.

Gatica, M., Allende, C.C. and Allende, J.E. (1989) Nucleic acids can regulate the activity of casein kinase II. FEBS Lett. 255 : 414-418.

Gatica, M., Allende, C.C., Antonelli, M., and Allende, J.E. (1987) Polylysine-containing peptides, including the carboxyl-terminal segment of the human cKi-ras² protein, affect the activity of some key membrane enzymes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 : 324-328.

Gatica, M., Hinrichs, M.V., Jedlicki, A., Allende, C.C., and Allende, J.E. (1993) Effect of metal ions on the activity of casein kinase II from *Xenopus laevis*. FEBS Lett. 315 : 173-177.

Gatica, M., Jacob, G., Allende, C.C. and Allende, J.E. (1995) DNA inhibits the catalytic activity of the α subunit of protein kinase CK2. Biochemistry 34 : 122-127.

Gatica, M., Jedlicki, A., Allende, C.C., and Allende J.E. (1994) Activity of the E⁷⁵E⁷⁶ mutant of the α subunit of casein kinase II from *Xenopus laevis*. FEBS Lett. 339 : 93-96.

Gauthier-Rouviere, C., Basset, M., Blanchard, J.M., Cavadore, J.C., Fernandez, A. and Lamb, N.J.C. (1991) Casein kinase II induces c-fos expression via the serum response element pathway and p67 SRF phosphorylation in living fibroblasts. EMBO J. 10 : 2921-2930.

Girault, A.J., Hemmings, H.C., Jr, Zorn, St H., Gustafson, E.L. and Greengard, P. (1990) Characterization in mammalian brain of a DARPP-32 serine kinase identical to casein kinase II. J. Neurochem. 55 : 1772-1783.

- Glotzer, M., Murray, A.W., and Kirschner, M.W. (1991) Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349 : 132-138.
- Glover, C.V.C. (1986) A filamentous form of *Drosophila* casein kinase II. *J. Biol. Chem.* 261 : 14349-14354.
- Goueli, S.A., Ferkul, K.M. and Ahmed, K. (1986 a) Purification of cytosolic cAMP-independent protein kinases from rat ventral prostate. *Int. J. Biochem.* 18: 875-884.
- Goueli, S.A., Davis, A.T. and Ahmed, K. (1986 b) Purification of nuclear kinases from rat ventral prostate. *Int. J. Biochem.* 18 : 861-873.
- Gould, K.L. and Nurse, P. (1989) Tyrosine phosphorylation of the fission yeast *cdc2⁺* protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature* 342 : 39-45.
- Grankowski, N., Boldyreff, B. and Issinger, O.G. (1991) Isolation and characterization of recombinant human CKII subunits α and β from bacteria. *Eur. J. Biochem.* 198 : 25-30.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M. and Hunter, T. (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241 : 42-52.
- Hanks, S.K. and 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. and Traugh, J. A. (1979) Cyclic nucleotide independent protein kinases from rabbit reticulocytes. Purification of casein kinases. *J. Biol. Chem.* 254 : 762-768.
- Hathaway, G.M., Lubben, T.H. and Traugh, J. A. (1980) Inhibition of casein kinase II by heparin. *J. Biol. Chem.* 255 : 8038-8041.
- Hathaway, G.M. and Traugh, J.A. (1982) Casein kinases - Multipotential protein kinases. En "Current Topics in Cellular Regulation" (Stadtman, E. y Horecker, B. eds.) Academic Press, New York , vol. 21 : 101-127.
- Hathaway, G.M. and Traugh, J.A. (1984 a) Interaction of polyamines and magnesium with casein kinase II. *Arch. Biochem. Biophys.* 133 : 133-138.

- Hathaway, G.M. and Traugh, J.A. (1984 b) Regulation of casein kinase II by 2,3-bisphosphoglycerate in erythroid cells. *J. Biol. Chem.* **259** : 2850-2855.
- Heller-Harrison, R.A., and Czech, M.P. (1991) Enhanced casein kinase II activity in COS-1 cells upon overexpression of either its catalytic or noncatalytic subunit. *J. Biol. Chem.* **266** : 14435-14439.
- Heller/Harrison, R.A., Mersner, H. and Czech, M.P. ((1989) Cloning and characterization of a cDNA encoding the β subunit of human casein kinase II. *Biochemistry* **28** : 9053-9058.
- Hinrichs, M.V., Jedlicki, A., Tellez, R., Pongor, S., Gatica, M., Allende, C.C., and Allende, J.E. (1993) Activity of recombinant α subunits and β subunits of casein kinase II from *Xenopus laevis*. *Biochemistry* **32** : 7310-7316.
- Ho, S., Hunt, H., Horton, R., Pullen, J. and Pease L. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**: 51-59.
- Hu, E. and Rubin, C.S. (1990 a) Casein kinase II from *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* **265** : 5072-5079.
- Hu, E., and Rubin C.S. (1990 b) Expression of wild-type and mutated forms of the catalytic α subunit of *Caenorhabditis elegans* casein kinase II in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **265** : 20609-20615.
- Hu, E. and Rubin, C.S. (1991) Casein kinase II from *Caenorhabditis elegans*. Cloning, characterization and developmental regulation of the gene encoding the β subunit. *J. Biol. Chem.* **266** : 19796-19802.
- Hunter, T. and Cooper, J.A. (1985) Protein tyrosine kinases. *Ann. Rev. Biochem.* **54** : 897-930.
- Issinger, O.-G., Brockel, C., Boldyreff, B. and Pelton, J.T. (1992) Characterization of the α and β subunits of casein kinase II by far-UV CD spectroscopy. *Biochemistry* **31** : 6098-6103.
- Issinger, O.-G. (1993) Casein kinases: pleiotropic mediators of cellular regulation. *Pharmacol. Ther.* **59** : 1-30.

- Jakobi, R., and Traugh, J.A. (1992) Characterization of the phosphotransferase domain of casein kinase II by site-directed mutagenesis and expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **267** : 23894-23902.
- Jedlicki, A., Hinrichs, M.V., Allende, C.C., and Allende, J.E. (1992) The cDNAs coding for the α and β subunits of *Xenopus laevis* casein kinase II. *FEBS Lett.* **297** : 280-284.
- Kandror, K.V., Benumov, A.O., and Stepanov, A.S. (1989) Casein kinase II from *Rana temporaria* oocytes. Intracellular localization and activity during progesterone-induced maturation. *Eur. J. Biochem.* **180** : 441-448.
- Kikkawa, U., Mann, S.K.O., Firtel, R.A. and Hunter, T. (1992) Molecular cloning of casein kinase II α subunit from *Dictyostelium discoideum* and its expression in the life cycle. *Molec. Cell Biol.* **12** : 5711-5723.
- Klarlund, J.K. and Czech, M.P. (1989) Insulin-like growth factor I and insulin rapidly increase casein kinase II activity in BALB/c 3T3 fibroblast. *J. Biol. Chem.* **263** : 15872-15875.
- Krek, W., Maridor, G., and Nigg, E.A. (1992) Casein kinase II is a predominantly nuclear enzyme. *J. Cell. Biol.* **116** : 43-55.
- Laemmli, U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** : 680-685.
- Lin, A., Frost, J., Deng, T., Smeal, T., Al-Alawi, N., and Karin, M. (1992) Casein kinase II is a negative regulator of c-Jun DNA binding and AP-1 Activity. *Cell* **70** : 777-789.
- Lin, W.-J., Tuazon, P.T. and Traugh, G.T. (1991) Characterization of the catalytic subunit of casein kinase II expressed in *Escherichia coli* and regulation of activity. *J. Biol. Chem.* **266** : 5664-5669.
- Lindberg, R.A., Quinn, A.M. and Hunter, T. (1992) Dual specificity protein kinases: will any hydroxyl do? *TIBS* **17** : 114-118.
- Litchfield, D.W., Dobrowolska, G. and Krebs, E.G. (1994) Regulation of casein kinase II by growth factors : a reevaluation. *Cell. Mol. Biol. Res.* **40** : 373-381.

- Litchfield, D.W., Lozeman, F.J., Cicirelli, M.F., Harrylock, M., Ericsson, L.H., Pianning, C.J. and Krebs, E.G. (1991) Phosphorylation of the β subunit of casein kinase II in human A431 cells. *J. Biol. Chem.* **266** : 20380-20389.
- Litchfield, D.W., Lozemann, F.J., Pianning, C., Sommercorn, J., Takio, K., Walsch, K.A., and Krebs, E.G. (1990) Subunit structure of casein kinase II from bovine testis. *J. Biol. Chem.* **265** : 7638-7644.
- Litchfield, D.W., Lüscher, B., Lozeman, F.J., Eisenman, R.N., and Krebs, E.G. (1992) Phosphorylation of casein kinase II by p34^{cdc2} *in vitro* and at mitosis. *J. Biol. Chem.* **267** : 13943-13951.
- Livak, K. (1990) Detailed structure of the *Drosophila melanogaster* stellate genes and their transcripts. *Genetics* **124** : 303-316.
- Lorenz, P., Pepperkok, R., Ansorge, W. and Pyerin, W. (1993) Cell biological studies with monoclonal and polyclonal antibodies against human casein kinase II subunit β demonstrate participation of the kinase in mitogenic signaling. *J. Biol. Chem.* **268** : 2733-2739.
- Lorenz, P., Pepperkok, R. and Pyerin, W. (1994) Requirement of casein kinase 2 for entry into and progression through early phases of the cell cycle. *Cel. and Mol. Biol. Res.* **40** : 519-527.
- Lozeman, F.J., Litchfield, D.W., Pianning, C., Takio, K., Walsh, K.A. and Krebs, E.G. (1990) Isolation and characterization of human cDNA clone encoding the α and the α' subunits of casein kinase II. *Biochemistry* **29** : 8436-8447.
- Ludeman, R., Lerea, K.M. and Etlinger, J.D. (1993) Copurification of casein kinase II with 20S proteasome and phosphorylation of a 30 kDa proteasome subunit. *J. Biol. Chem.* **268** : 17413-17417.
- Lüscher, B. and Litchfield, D.W. (1994) Biosynthesis and degradation of casein kinase II in lymphoid cell lines. *Eur. J. Biochem.* **220** : 521-526.
- Lüscher, B., Christenson, E., Litchfield, D.W., Krebs, E.G., and Eisenman, R.N. (1990) Myb DNA binding inhibited by phosphorylation at a site deleted during oncogenic activation. *Nature* **344** : 517-521.

- Meggio, F., Perich, J.W., Reynolds, E.C. and Pinna, L.A. (1991) Phosphorysine as a specificity determinant for casein kinase II, a growth-related ser/thre-specific protein kinase. *FEBS Lett.* 279 : 307-309.
- Meggio, F., Shugar, D. and Pinna, L.A. (1990) Ribofuranosyl-benzimidazole derivatives as inhibitors of casein kinase-2 and casein kinase-1. *Eur. J. Biochem.* 187 : 89-94.
- Meisner, H. and Czech, M.P. (1991) Phosphorylation of transcriptional factors and cell-cycle-dependent proteins by casein kinase II. *Current Opinion in Cell Biology* 3 : 474-483
- Meisner, H., Heller-Harrison, R., Buxton, J. y Czech, M.P. (1989) Molecular cloning of the human casein kinase II α subunit. *Biochemistry* 28 : 4072-4076.
- Mulner-Lorillon, O., Cormier, P., Labbé, J.-C., Dorée, M., Poulhe, R., Osborne, H., and Bellé, R. (1990) M-phase-specific cdc2 protein kinase phosphorylates the β subunit of casein kinase II and increases casein kinase II activity. *Eur. J. Biochem.* 193 : 529-534.
- Nishizawa, M., Okazaki, K., Furuno, N., Watanabe, N. and Sagata, N. (1992) The "second-codon rule" and autophosphorylation govern the stability and activity of Mos during the meiotic cell cycle in *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* 11 : 2433-2446.
- Norbury, C., and Nurse, P. (1992) Animal cell cycles and their control. *Annu. Rev. Biochem.* 61 : 441-470.
- Ole-Moyoi, O.D., Brown, W.C., Iams, K.P., Nayar, A., Tsukamoto, T., and Mackin, M.D. (1993) Evidence for the induction of casein kinase II in bovine lymphocytes transformed by the intracellular protozoan parasite *Theileria parva*. *EMBO J.* 12 : 1621-1631.
- Padmanabha, A., Wu, J. L-P., Hanna, D.E. and Glover, C.V.C. (1990) Isolation, sequencing and disruption of the yeast CKA2 gene: casein kinase II is essential for viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 10 : 4089-4099.
- Padmanabha, R. and Glover, C.V.C. (1987) Casein kinase II of yeast contains two distinct a polypeptides and a usually large b subunit. *J. Biol. Chem.* 262 : 1829-1835.

Palen, E. and Traugh, J.A. (1991) Phosphorylation of casein kinase II. *Biochemistry* 30 : 5586-5590.

Parker, L.L., Atherton-Fessler, S. and Piwnicka-Worms, H. (1992) p107^{wee1} is a dual specificity kinase but phosphorylates p34^{cdc2} on tyrosine 15. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 : 2917-2921.

Pepperkok, R., Lorenz, P., Ansorge, W., and Pyerin, W. (1994) Casein kinase II is required for transition of G₀/G₁, early G₁, and G₁/S phases of the cell cycle. *J. Biol. Chem.* 269 : 6986-6991.

Pinna, L.A. (1990) Casein kinase II: an *éminence grise* in cellular regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1054 : 267-284.

Rebagliatti, M.R., Weeks, D.L., Harvey, R.P. and Melton, D.A. (1985) Identification and cloning of localized maternal RNAs from *Xenopus* Eggs. *Cell* 42 : 769-777.

Rihs, H.P., Jans, D.A., Fan, H., and Peters, R. (1991) The rate of nuclear cytoplasmic protein transport is determined by casein kinase II site flanking the nuclear localization sequence of the SV40 T-antigen. *EMBO J.* 10 : 633-639.

Robitzky, A., Bodenbach, L., Voss, H., and Pyerin, W. (1993) Human casein kinase II. The subunit a protein activates transcription of the subunit b gene. *J. Biol. Chem.* 268 : 5694-5702.

Rossomando, A., Wu, J., Weber, M. J. y Sturgell, T. W. (1992) The phorbol ester-dependent activator of the mitogen-activated protein kinase p42^{mapk} is a kinase with specificity for the threonine and tyrosine regulatory sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5221-5225.

Roussou, I., and Draetta, G. (1994) The *Schizosaccharomyces pombe* casein kinase II a and b subunits: Evolutionary conservation and positive role of the b subunit. *Mol. Cell. Biol.* 14 : 576-586.

Russo, G., Vandenberg, M., Yu, I.Y., Bae, Y.-S., Franza, B.R., and Marshak, D.R. (1992) Casein kinase II phosphorylates p34^{cdc2} kinase in G1 phase of the HeLa cell division cycle. *J. Biol. Chem.* 267 : 20317-20325.

Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second edition (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory).

Sanger, F. and Coulson, A.. (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **94** : 441- 445

Sarkar, G. and Sommer, S.S. (1990) The "megaprimer" method of site-directed mutagenesis. *BioTechniques* **8** : 404-407

Sarno, S., Boldyreff, B., Marin, O., Guerra, B., Meggio, F., Issinger, O.G. and Pinna, L. (1995) Mapping the residues of protein kinase CK2 implicated in substrate recognition: mutagenesis of conserved basic residues in the α subunit. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (in press).

Saxena, A., Padmanabha, R. and Glover, C.V.C. (1987) Isolation and sequencing of cDNA clones encoding alpha and beta subunits of *Drosophila melanogaster* casein kinase II. *Mol. Cell. Biol.* **7** : 3409-3417.

Schneider, H.R. and Issinger, O.G. (1989) CK II, a multifunctional protein kinase and its role during proliferation. *Biotec. Europe* **6** : 82-88.

Seldin, D.C. and Leder, P. (1995) Casein kinase II α transgene-induced murine lymphoma : relation to theileriosis in cattle. *Science* **267** : 894-897

Serrano, L., Hernandez, M.A., Diaz-Nido, J. and Avila, J. (1989) Association of casein kinase II with microtubules. *Exp. Cell Res.* **181** : 263-272.

Singh, T.J. and Huang, K. (1985) Glycogen synthase (casein) kinase-I: tissue distribution and subcellular localization. *FEBS Lett.* **190** : 84-88

Smith, D.B. and Johnson, K.S. (1988) Single step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**: 31-40.

Sommercorn, J. and Krebs, E.G. (1987a) Induction of casein kinase II during differentiation of 3T3/L1 cells. *J. Biol. Chem.* **262** : 3835-3843.

Sommercorn, J., Mulligan, A., Lozeman, F.J., and Krebs, E. (1987b) Activation of casein kinase II in response to insulin and to epidermal growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84** : 8834-8838.

Stigare, J., Buddelmeijer, N., Pigon, A., and Egyhazi, E. (1993) A majority of casein kinase II α subunit is tightly bound to intranuclear components but not to the β subunit. *Mol. Cell. Biochem.* **129** : 77-85.

- Takio, K., Kuenzel, E.A. Walsh, K.A. and Krebs, E.G. (1987) Amino acid sequence of the b subunit of bovine lung casein kinase II. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84 : 4851-4855.
- Taylor, S.S., Knighton, D.R., Zheng, J., Sowadski, J.M., Gibbs, C.S., and Zoller, M.J. (1993) A template for the protein kinase family. TIBS 18 : 84-89.
- Teitz, T., Eli, D., Penner, M., Bakhanashvili, M., Naiman, T., Timme, T.L., Wood, C.M., Moses, R.E., and Canaani, D. (1990) Expression of the cDNA for the b subunit of human casein kinase II confers partial UV resistance on *Xeroderma pigmentosum* cells. Mutat. Res. 236 : 85-97.
- Téliez, R., Gatica, M., Allende, C.C., and Allende, J.E. (1990) Copolymers of glutamic acid and tyrosine are potent inhibitors of oocyte casein kinase II. FEBS Lett. 265 : 113-116.
- Thornburg, W., Gamo, S., O'Malley, A.F. and Lindell, T.J. (1979) Properties of rat liver nuclear protein kinases. Biochim. Biophys. Acta 571 : 35-44.
- Traugh, J.A., Lin, W.-J., Takada-Axelrod, F. and Tuazon, P.T. (1990) Importance of subunit interactions in regulation of casein kinase II. En "Biology and Medicine of Signal Transduction" (Nishizuka Y. et al., eds.). Raven Press, New York, págs. 224-228.
- Tuazon, P.T. and Traugh, J.A. (1991) Casein kinase I and II Multipotential serine protein kinases: structure, function and regulation. En "Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research" (Greengard, P. y Robinson, G.A., eds.) Raven Press, New York, Vol. 20 : 123-164.
- Ulloa, L., Díaz-Nido, J., and Avila, J. (1993) Depletion of casein kinase II by antisense oligonucleotide prevents neuritogenesis in neuroblastoma cells. EMBO J. 12 : 1633-1640.
- Vallée, B.L. and Auld, D.S. (1990). Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. Biochemistry 29 : 5647-5659.
- Voss, H., Wirkner, U., Jakobi, R., Hewitt, N.A., Schwager, C., Zimmerman, J., Ansorge, W. and Pyerin, W. (1991) Structure of the gene encoding human casein kinase II subunit β . J. Biol. Chem. 266 : 13706-13711.

- Wagner, P., Appel, K., Issinger, O.G. and Montenarch. M. (1994) On the interaction of p53 with casein kinase II. *Int. J. Oncol.* 4 : 491-498.
- Wu, J. L-P., Padmanabha, R. and Glover, C.V.C. (1988) Isolation, sequencing and disruption of CKA 1 gene encoding the a subunit of yeast casein kinase II. *Mol. Cell. Biol.* 8 : 4981-4990.
- Yu, I.J., Spector, D.L., Bae, Y.S. and Marshak, D.R. (1991) Immunocytochemical localization of casein kinase II during interphase and mitosis. *J. Cell Biol.* 114 : 1217-1232.
- Yutani, Y. Tei, Y., Yukioka, M. and Inque, A. (1982) Occurrence of NI and NII type protein kinases in the nuclei from various tissues of the rat. *Arch. Biochem. Biophys.* 218 : 409-420.
- Zandomeni, R.O. (1989) Kinetics of inhibition by 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole on calf thymus casein kinase II. *Biochem. J.* 262 : 469-473.
- Zhang, H., Scholl, R., Browse, J. and Somerville, C. (1988) Double stranded DNA sequencing as a choice for DNA sequencing. *Nucl. Acids Res.* 16 : 1220-1225.