

## PURIFICACIO DE CK-2 A PARTIR DE NUCLIS DE HEPATOCITS DE RATA

Ramon Bosser, \*Elena Molina, \*Emili Itarte i Oriol Bachs

Dept. Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica, Facultat de Medicina, UB; \*Dept de Bioquímica i Biologia Molecular, Unitat de Bioquímica de la Facultat de Ciències, UAB.

Recentment hem descrit que la Calmodulina (CaM) pot regular el nivell de fosforilació d'algunes proteïnes nuclears a través de la inhibició de la caseïna quinasa 2 (CK-2) (Bossier et al, 1993). Per tal d'esbrinar si l'efecte de la CaM és directe sobre l'enzim o a través d'algun altre mecanisme, s'ha purificat CK-2 a partir de dues fraccions de nuclis d'hepatòcits de rata, una obtinguda després de incubar nuclis aïllats de hepatòcits amb DNasa I i RNasa A (fracció S1), l'altra tot solubilitzant les proteïnes no extraïbles per nucleases amb 1.6 M NaCl (fracció S2). S'han seguit protocols convencionals en la purificació de CK-2 a partir de citosol: fosfocel·lulosa, gel filtració amb Bio-gel 0.5m i Heparina-Agarosa. El comportament de l'enzim nuclear en aquestes columnes ha estat molt similar al de citosol. En fer l'assaig d'autofosforilació dels enzims purificats s'ha vist que, mentre que el citosòlic presenta una sola banda majoritària de 28 kDa (la subunitat  $\beta$  de la CK-2), els nuclears copurifiquen amb alguns dels seus substrats. En la S1 co-purifiquen quatre substrats majoritaris de 40,37,24 i 19 kDa, i en la S2 apareixen sis bandes fosforilades de 86,64,37,28,24 i 19 kDa. Assaigs d'autofosforilació amb GTP i en presència d' Heparina i Espermina (inhibidor i activador de la CK-2, respectivament) han permès comprovar que no hi havia cap altra quinasa contaminant i que per tant totes les proteïnes fosforilades són substrats de la CK-2. L'anàlisi per immunoblot en dues dimensions ha mostrat que tant la CK-2 de S1 com la de S2 contenen les dues subunitats  $\alpha$  i  $\beta$  (amb pI similars als descrits per la forma citosòlica) i que aquesta última és fosforilada. Així mateix es veu que els substrats són tant àcids (pI entre 5 i 6 pels de 40 i 24 kDa) com bàsics (pI entre 7.5 i 8.5 per als de 37 i 19 kDa). Un d'ells ha estat identificat com a p37, una proteïna bàsica força abundant en la fracció S1 (contra la qual ja havíem obtingut anticossos en conill), que ja havíem vist que era substrat de CK-2 i que la seva fosforilació disminueix en presència de CaM.

S'ha analitzat també la presència de *Calmodulin-Binding Proteins* per overlay amb  $^{125}$ I-CaM. En la CK-2 de S1 s'hi han trobat dues proteïnes de 150 i 60 kDa i en la de S2 dues de 60 i 42 kDa. Tot i que aquestes proteïnes no han estat encara identificades, és molt possible que la de 60 kDa sigui la subunitat A de la calcineurina, ja que ja l'havíem detectat en el nucli (Bossier et al, 1993).

Ja s'havia descrit que la CK-2 citosòlica podia co-purificar amb algun substrat com la pp49 (Molina et al, 1992) però no s'havia mostrat encara amb CK-2 nuclear. El fet de que amb la forma nuclear hi copurifiquin alguns dels seus substrats i altres proteïnes fa pensar que possiblement l'enzim formi complexos i que això pugui permetre una regulació més fina de la seva activitat, ja que probablement no tots els substrats formaran part d'un mateix complexe.

### BIBLIOGRAFIA:

Bossier, R., Aligué, R., Agell, N., Guerini, D., Carafoli, E., Bachs, O. (1993) "Calmodulin can modulate protein phosphorylation in rat liver cells nuclei" *J. Biol. Chem.*, en premsa

Molina, E., Plana, M., Itarte, E. (1991) "Heterogeneity of rat liver cytosol casein kinase 2" *Biochem. J.*, 277, 811-818