

CARACTERITZACIO MOLECULAR DE Ser/Thr FOSFATASES DEL TIPUS 2A D'*Arabidopsis thaliana*.

E. Pérez-Callejón¹, A. Casamayor², G. Pujol¹, M. Camps², F. Posas², J. Ariño² i A. Ferrer¹.

¹ Unitat de Bioquímica. Facultat de Farmàcia. Universitat de Barcelona.

² Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de Barcelona.

La fosforilació reversible de proteïnes és un dels principals mecanismes de control dels processos biològics en els organismes eucariòtics. Actualment hi ha evidències de que a les plantes superiors aquest mecanisme participa en el control de processos tan importants com la transducció de senyals, la modulació d'activitats enzimàtiques i la pol.linització. Les subunitats catalítiques de les Ser/Thr proteïna fosfatases (PP) de mamífers s'han classificat en quatre grups en funció de criteris bioquímics: tipus 1, 2A, 2B i 2C. A les plantes s'han detectat activitats enzimàtiques quasi idèntiques a les de PP1, PP2A i PP2C de mamífers. Amb l'objectiu d'aprofundir en l'estudi de l'estructura i la funció de les proteïna fosfatases a les plantes superiors hem iniciat una línia de recerca orientada a clonar i caracteritzar gens que codifiquen proteïna fosfatases d'*Arabidopsis thaliana*.

A partir de DNA genòmic d'*Arabidopsis* s'han amplificat per PCR dos fragments de DNA, AP-1 i AP-2, que codifiquen seqüències molt relacionades amb les subunitats catalítiques de Ser/Thr fosfatases. Emprant AP-1 com a sonda s'han aïllat diferents clons de cDNA a partir de dos bancs de cDNA, de fulles i de planta sencera. Els clons EP8a i EP14a codifiquen dues proteïnes de 306 Aa quasi idèntiques entre sí (97% identitat) i molt semblants a les isoformes alfa i beta de la PP2A humana (79-80% identitat, respectivament). Aquestes fosfatases s'han anomenat PP2A-1 i PP2A-2. Un tercer cló, EP7, codifica un polipèptid de 308 Aa, sense la metionina inicial, que té una identitat del 80% amb les PP2A humanes i del 79-80% amb PP2A-1 i PP2A-2, respectivament. Aquesta proteïna fosfatasa s'ha anomenat PP2A-3. Un darrer cló de cDNA està siguent caracteritzat i, encara que els resultats son molt preliminars, tot sembla indicar que codifica una quarta isoforma de proteïna fosfatasa (PP2A-4) altament relacionada amb PP2A-3. Cap dels clons obtinguts conté la seqüència AP-1, tot i que codifica una seqüència de 58 aminoàcids relacionada amb les PP2A d'*Arabidopsis* ja clonades (79% a 96% identitat).

Més recentment, emprant el fragment genòmic AP-2 com a sonda, hem aïllat clons de cDNA (EP124 i EP 129 que són ampliament solapants i EP 128 que és diferent) corresponents a dues isoformes d'un nou tipus de subunitat catalítica de PP, identificada només a conill i a humà i estructuralment relacionada amb la família de les PP2A. Aquestes seqüències codifiquen dues proteïnes de 305 Aa amb una identitat del 93% entre sí i del 83% amb la subunitat catalítica de la proteïna fosfatasa X de conill. S'han anomenat PPX-1 (EP124 i EP 129) i PPX-2 (EP128).

L'anàlisi de clons genòmics i de nous clons de cDNA, juntament amb experiments de Southern blot genòmic emprant sondes específiques de cadascun dels cDNAs en condicions de baixa i alta astringència, suggereix l'existència de no menys de cinc gens que codifiquen proteïna fosfatases de tipus 2A en el genoma d'*Arabidopsis*. Per altra banda, únicament s'ha detectat l'existència de dos gens que codifiquen subunitats catalítiques de PPX, que són els corresponents als cDNAs ja clonats.

Pel que fa referència a l'expressió d'aquest gens, els nivells dels mRNA de les PP2A (PP2A-1, PP2A-2, PP2A-3 i AP1) són més alts que els de les PPX a tots els teixits analitzats. Cal destacar que el mRNA corresponent a PP2A-1 és el més abundant en tots els casos. Per altra banda, els patrons d'expressió de les PP2A i les PPX en els diferents teixits son força semblants, encara que PP2A-1 i AP-1 s'expressen més intensament a flors i arrels, respectivament.

Actualment s'ha iniciat l'estudi dels gens que codifiquen PP2A-3 i PP2A-4. També estem procedint a l'obtenció de nous clons de cDNA que continguin el fragment AP-1 i de nous clons genòmics corresponents a la resta de cDNAs de PP2A i PPX.