Clonamiento, Expresión y Caracterización de las Subisoformas de la Proteínaquinasa CK1α de Pez cebra (*Danio rerio*)

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

Molecular, Celular y Neurociencias

Facultad de Ciencias

por

Verónica Andrea Burzio Menéndez

Marzo de 2003

Director de Tesis: Dr. Jorge E. Allende Rivera

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 presentada por la candidata

Verónica Andrea Burzio Menéndez

ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de Tesis como requisito de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 8 de Octubre del año 2002.

Director de Tesis:

Dr. Jorge Allende R. _____

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Octavio Monasterio (Presidente) _____

Dra. Rosalba Lagos _____

Dr. Ariel Orellana _____

Dr. Andrew Quest _____

Esta tesis fue realizada en el Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, bajo la dirección del Dr. Jorge E. Allende Rivera.

La realización de esta tesis fue financiada en parte por el Proyecto FONDECYT Nº 2970015.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero expresar mis agradecimientos al Dr. Jorge Allende y a la Dra. Catherine Connelly por su valiosa guía durante la realización de esta tesis y por la paciencia de tenerme tanto tiempo en su laboratorio.

Agradezco también a los miembros de la Comisión de Evaluación por sus sugerencias en la corrección de la tesis y por los consejos que han brindado desde el comienzo de la realización de esta tesis.

Quiero agradecer de todo corazón a mis compañeros de laboratorio, los que están y los que se han ido, no sólo por el apoyo técnico, sino especialmente por su amistad y cariño.

También agradezco a mis familiares y amistades que de una manera u otra estuvieron involucradas en este largo peregrinaje.

Muy especialmente deseo agradecer a mis padres por permitirme llegar hasta donde estoy y en particular a mi padre que ha contribuido enormemente en mi formación profesional y me ha inculcado el amor por la ciencia.

Dejo para el final el profundo agradecimiento que guardo para mi esposo Renato por la paciencia que ha tenido durante todo este tiempo, por su amor y su capacidad de ver siempre el lado bueno de las cosas.

A mi hijita Francisca le agradezco por su alegría y por el sólo hecho de existir.

ÍNDICE DE MATERIAS

página

ÍNDICE DE ESQUEMAS Y FIGURAS xxi

ÍNDICE DE TABLAS xiv

LISTA DE ABREVIATURAS xv

RESUMEN xix

SUMMARY xxiii

INTRODUCCIÓN 1

1. La Fosforilación de Proteinas 1
2. La Proteínaquinasa CK1 2
3. Isoformas de CK1 de Levadura 3
4. Isoformas de CK1 de Eucariontes Superiores 4
5. Especificidad de Sustrato de CK1 9
6. Antecedentes sobre Funciones de CK1 *in vivo* 11
   - 6.1. CK1 en Levaduras 11
   - 6.2. Funciones de CK1 en Eucariontes Superiores 14
7. Regulación de la Actividad de CK1 20
8. Localización Subcelular de CK1 24
9. Estructura Tridimensional de la Proteínaquinasa CK1 27
10. Procesamiento Alternativo de Mensajeros de CK1 31

11. El Pez Cebra como Modelo Animal..... 33

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS..... 35

MATERIALES Y MÉTODOS..... 37

A. REACTIVOS Y ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN..... 37

1. Enzimas y Reactivos de Biología Molecular..... 37

2. Oligonucleótidos..... 39

3. Péptidos..... 40

4. Reactivos y Materiales para el Cultivo de Células..... 40

5. Anticuerpos..... 41

6. Animales de Experimentación..... 41

B. MÉTODOS..... 42

1. Clonamiento de CK1α de Pez cebra..... 42

1.1. Síntesis de sonda de CK1α de *X. Laevis*..... 42

1.2. Rastreo de la genoteca de cDNA de Pez cebra en λZAP..... 43

1.3. Excisión *in vivo* de clones de λZAP..... 44

2. Secuenciación directa de DNA por la técnica de PCR..... 45

2.1. Marcación del partidor..... 46

2.2. Reacción de secuenciación..... 46

2.3. Análisis de reacciones de secuencia en geles de poliacrilamida..... 47

3. Construcción de cDNAs completos para CK1αL y CK1αLS y subclonamiento en vectores de expresión..... 47

3.1. Generación de cDNAs completos para CK1αL y CK1αLS: Digestión de clones con *Bgl*II y *Sal*I..... 47

3.2. Ligación del fragmento de 514 pb en clones de CK1α y CK1αS..... 48

3.3. Amplificación de la región codificante de clones de CK1α..... 48

3.4. Digestión de productos de amplificación y de vectores y subclonamiento..... 49

3.5. Obtención de células electrocompetentes..... 50

3.6. Electroporación de células de *E. coli*..... 50

3.7. Selección de clones bacterianos mediante PCR de colonias.... 51

3.8. Purificación de DNA de los plasmidios recombinantes..... 51

4. Expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* y su purificación.... 52

5. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS..... 53

6. Análisis de proteínas recombinantes por Western blot..... 53

7. Determinación de actividad enzimática..... 54

7.1. Detección de fosforilación de serina..... 54

7.2. Fosforilación de tirosina..... 55

7.3. Autofosforilación..... 56

8. Fosforilación de CK1α por PKA..... 56

9. Cultivo de células..... 57

9.1. Línea utilizada..... 57

9.2. Condiciones de cultivo..... 57

9.3. Subcultivo de células..... 58

9.4. Transfección de células..... 58

9.5. Preparación de extractos celulares totales..... 59

9.6. Inmunoprecipitación de lisados celulares..... 59

9.7. Experimentos de pulso y caza..... 60

10. Determinación de niveles de expresión de CK1α en embriones de pez cebra..... 61

10.1. Obtención de embriones de pez cebra de diferentes estadíos de desarrollo..... 61

10.2. Purificación de RNA total de embriones y adultos de pez cebra..... 61

10.3. Transcripción inversa acoplada a PCR (RT-PCR)..... 62

10.4. Síntesis de sondas de RNA..... 62

10.5. Hibridación *in situ* sobre embriones completos de pez cebra con sondas de CK1α..... 64

RESULTADOS..... 66

A. CLONAMIENTO DE SUBISOFORMAS DE CK1α DE PEZ CEBRA.. 66

1. Rastreo de la genoteca de cDNA de pez cebra..... 66

2. Construcción de cDNAs completos para CK1αL y CK1αLS y subclonamiento en vectores de expresión..... 74

B. ESTUDIOS *IN VITRO* DE LAS SUBISOFORMAS DE CK1α DE PEZ CEBRA EXPRESADAS EN *E. coli*..... 78

1. Expresión de las subisoformas de CK1α en *E. coli* y su purificación. 78

2. Determinación de Km aparente de las subisoformas para diferentes sustratos..... 80

3. Efecto de inhibidores sobre las subisoformas de CK1α..... 83

4. Autofosforilación de las Variantes de CK1α..... 88

5. Estabilidad térmica de las subisoformas de CK1α..... 90

6. Fosforilación de subisoformas de CK1α por otras proteinaquinasas. 92

7. Estudios con péptidos sintéticos derivados de la secuencia de NFAT4..... 94

7.1. Fosforilación de péptidos derivados de distintos dominios de NFAT4..... 94

7.2. Fosforilación por CK1 de péptidos con mutaciones individuales. 99

7.3. Importancia de residuos acídicos en la fosforilación de péptidos de NFAT4 por CK1..... 102

C. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE SUBISOFORMAS DE CK1α DE PEZ CEBRA *in vivo*..... 106

1. Expresión de subisoformas de CK1α recombinantes en células Cos-7 en cultivo 106
2. Actividad enzimática de subisoformas de CK1α expresadas en células Cos-7 107
3. Marcaje metabólico de células que expresan subisoformas exógenas de CK1α 110
4. Inmunolocalización de subisoformas de CK1α expresadas en células Cos-7 112
D. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE CK1α DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE PEZ CEBRA 117
1. Determinación de niveles relativos de expresión de mensajeros mediante RT-PCR 117
2. Hibridación *in situ* sobre embriones de pez cebra 119
DISCUSIÓN 121
1. Clonamiento de subisoformas de CK1α de pez cebra 122
2. Caracterización bioquímica de subisoformas de CK1α expresadas en *E. coli* 125
3. Caracterización de la fosforilación de NFAT4 por CK1 132
4. Expresión de subisoformas de CK1α en células en cultivo 136
5. Estudios de expresión de CK1α en desarrollo embrionario 144

CONCLUSIONES..... 148

REFERENCIAS..... 149

PUBLICACIONES GENERADAS DE LA TESIS..... 161

ÍNDICE DE ESQUEMAS Y FIGURAS

		Página
Esquema 1	Alineamiento de isoformas de CK1 de vertebrados.....	5
Esquema 2	Estructura de isoformas de CK1 de vertebrados.....	7
Esquema 3	Mecanismo de regulación de CK1 sobre la importación nuclear de NFAT4.....	21
Esquema 4	Estructura tridimensional de Cki1 de *S. pombe* a 2,0 Å de resolución.....	28
Figura 1	Rastreo de la genoteca de cDNA de embrión de pez cebra.....	67
Figura 2	Secuencia nucleotídica del clon 3.2 aislado de la genoteca de cDNA de pez cebra, que codifica para CK1αS.....	68
Figura 3	Rastreo de la genoteca de cDNA de pez cebra con la sonda específica para CK1αL.....	71
Figura 4	Secuencia nucleotídica del clon 6.3.....	72
Figura 5	Secuencia aminoacídica deducida de la secuencia del cDNA de los clones aislados de la genoteca de cDNA de pez cebra.....	73

Figura 6 Amplificación de transcritos de las variantes de procesamiento de CK1α de pez cebra..... 75
Figura 7 Construcción de CK1αL y CK1αLS y subclonamiento de las 4 subisoformas..... 77
Figura 8 Expresión de subisoformas de CK1α en *E. coli*..... 79
Figura 9 Determinación de Km de las variantes de CK1α para ATP..... 84
Figura 10 Inhibición de las subisoformas de CK1α de pez cebra por CKI-7..... 85
Figura 11 Interacción de las variantes de CK1α con poli[Glu80Tyr20]..... 87
Figura 12 Autofosforilación de subisoformas de CK1α..... 89
Figura 13 Estabilidad térmica de las subisoformas de CK1α a 40°C. 91
Figura 14 Fosforilación de subisoformas de CK1α por PKA..... 93
Figura 15 Péptidos sintéticos derivados de las regiones A, L y Z de NFAT4..... 96
Figura 16 Fosforilación de péptidos derivados de NFAT4 por diferentes isoformas de CK1..... 97
Figura 17 Fosforilación de péptidos derivados de NFAT4 con mutaciones individuales en residuos de serina..... 100

Figura 18 Efecto de la fuerza iónica sobre la fosforilación de péptidos ALZ1 y A1 por CK1 de hígado de rata..... 104
Figura 19 Fosforilación de péptidos de NFAT4 con mutaciones en bloque..... 105
Figura 20 Expresión de variantes de CK1α en células Cos-7 en cultivo..... 108
Figura 21 Actividad CK1 de lisados e inmunoprecipitados de células transfectadas con variantes de CK1α..... 109
Figura 22 Determinación de vida media de CK1α y CK1αL..... 111
Figura 23 Inmunolocalización de HA-CK1α en células Cos-7 en cultivo..... 113
Figura 24 Inmunolocalización de HA-CK1αL en células Cos-7 en cultivo..... 115
Figura 25 Amplificación de mRNA de variantes de CK1α mediante RT-PCR de embriones de pez cebra..... 118
Figura 26 Hibridación *in situ* sobre embriones de pez cebra..... 120

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1 Actividad específica de las subisoformas recombinantes de CK1α expresadas en *E. coli*..... 81

Tabla 2 Km aparente de las subisoformas de CK1α de pez cebra para diferentes sustratos..... 82

Tabla 3 Constantes cinéticas de CK1 de hígado de rata para péptidos derivados de NFAT4..... 98

Tabla 4 Constantes cinéticas de CK1αS y CK1αLS recombinantes de pez cebra para péptidos derivados de NFAT4..... 101

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	aminoácido
ATP	adenosina 5' trifosfato
cAMP	adenosina 3'-5' monofosfato cíclico
cDNA	DNA complementario
Ci	curie
CKI-7	N-(2-aminoetil)-5-cloro-isoquinolina-8-sulfonamida
cpm	cuentas por minuto
cRNA	RNA complementario
dATP	2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	2'-desoxicitidina 5'-trifosfato
dGTP	2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato
dTTP	2'-desoxitimidina 5'-trifosfato
dUTP	2'-desoxiuracilo 5'-trifosfato
ddATP	2', 3'-didesoxiadenosina 5'-trifosfato
ddCTP	2', 3'-didesoxicitidina 5'-trifosfato
ddGTP	2', 3'-didesoxiguanosina 5'-trifosfato
ddTTP	2', 3'-didesoxitimidina 5'-trifosfato
DEAE	dietilaminoetil
DEPC	dietilpirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucleico

DO	densidad óptica
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilendiaminotetraacetato
g	fuerza de gravedad
g	gramo
GST	glutatión-S-transferasa
h	hora
IC50	concentración de inhibidor para un 50% de inhibición
IgG	inmunogamaglobulina
kDa	kilodalton
Km	constante de Michaelis
LB	medio Luria-Bertani
mA	miliampère
min	minuto
mRNA	RNA mensajero
ORF	marco de lectura abierto
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
pfu	unidades formadoras de placas de lisis
pH	potencial hidrógeno
pI	punto isoeléctrico
PMSF	fenilmetilsulfonilfluoruro
rpm	revoluciones por minuto

RNA	ácido ribonucleico
RNasa	ribonucleasa
RT-PCR	transcripción inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa
s	segundo
SDS	dodecil sulfato de sodio
snRNPs	proteínas ribonucleicas nucleares pequeñas
Taq	*Thermus aquaticus*
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina
TNF	factor de necrosis tumoral
Tris	tris-(hidroximetil)-aminoetano
tRNA	RNA de transferencia
U	unidad
UTR	región no traducida
V	voltio
Vmax	velocidad inicial máxima
vol	volúmenes

Abreviación de Aminoácidos

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

A	Ala	alanina
C	Cys	cisteína

D	Asp	ácido aspártico
E	Glu	ácido glutámico
F	Phe	fenilalanina
G	Gly	glicina
H	His	histidina
I	Ile	isoleucina
K	Lys	lisina
L	Leu	leucina
M	Met	metionina
N	Asn	asparragina
P	Pro	prolina
Q	Gln	glutamina
R	Arg	arginina
S	Ser	serina
T	Thr	treonina
V	Val	valina
W	Trp	triptófano
Y	Tyr	tirosina
X	simboliza cualquier aminoácido	

RESUMEN

La proteínaquinasa CK1 es una enzima altamente ubícua y conservada en todos los eucariontes estudiados y, particularmente, dentro de los vertebrados. En estos organismos, la enzima existe como una familia de siete miembros genéticamente distintos, denominados CK1α, β, γ1, γ2, γ3, δ y ε. Hasta el momento se ha determinado que los mensajeros de tres de estas isoformas, α, γ1 y γ3, sufren procesamiento alternativo, dando lugar así a nuevas variantes. En particular, el mRNA de la isoforma α da origen a 4 subisoformas, definidas por la presencia o ausencia de 2 segmentos adicionales, llamados inserto L e inserto S. El primero se ubica en medio del dominio catalítico de la enzima, en la llamada region "bisagra" y el segundo se encuentra localizado en el extremo C-terminal. La coexistencia de algunas o todas estas variantes se ha descrito anteriormente en rata, pollo y humano y las secuencias de los insertos se encuentran altamente conservadas entre estas especies.

En esta Tesis, se clonaron las cuatro variantes de procesamiento de CK1α de pez cebra (*Danio rerio*) y se expresaron tanto en células de *E. coli* como en células eucarióticas en cultivo. La caracterización bioquímica de las variantes recombinantes expresadas en bacterias determinaron que las que contienen el inserto L tienen una menor afinidad por ATP, al igual que por el

inhibidor específico, CKI-7, que compite por el sitio de unión del nucleótido. Estas variantes, además, muestran una mayor actividad hacia β-caseína, aunque no existen diferencias en el valor de la Km aparente entre las cuatro isoformas con respecto a los sustratos proteicos y peptídicos ensayados, β-caseína, fosvitina y el péptido RRKDLHDDEEDEAMSITA, derivado del inhibidor-2 de la proteína fosfatasa 1 (PPI2). Las variantes L también exhiben una mayor termolabilidad a 40°C, comparadas con las que no contienen este inserto. Esta secuencia contiene además un sitio canónico para la fosforilación por PKA y, al ser incubadas con esta enzima, la fosforilación es estimulada en 2 veces para CK1α, 6 veces para αS, 16 veces para αL y aproximadamente 70 veces para αLS. Esto sugiere que la PKA fosforila a CK1α, en particular dentro de los insertos y especialmente el inserto L. Por otro lado, las cuatro variantes poseían actividad autofosforilativa y tirosinaquinasa.

Otro aspecto abordado en esta Tesis fue la fosforilación de NFAT4 por CK1. El trabajo de Zhu y col. (1998) demuestra que este factor de transcripción es fosforilado *in vivo* por CK1α y que esta fosforilación previene la entrada de NFAT4 al núcleo. En esta publicación se describe un putativo sitio de acoplamiento o "docking" dentro de la secuencia donde interactúa CK1. En nuestro estudio se utilizaron péptidos sintéticos que abarcaban las regiones conservadas A y Z y la región "linker" entre ellas (L). Tanto las variantes de CK1α de pez cebra como CK1 nativa purificada de hígado de rata fosforilaban residuos no canónicos contenidos en la región A2, pero no la Z, a diferencia de

lo encontrado por Zhu y col. (1998). Una extensión de residuos acídicos presentes en la región L demostró ser esencial para la fosforilación eficiente del dominio A2, como se pudo determinar por un aumento en la Km de un orden de magnitud provocada por la deleción de la región L o por la sustitución de los residuos acídicos por glicinas o alaninas. Este resultado también difiere de los de Zhu y col., que habían ubicado el sitio "docking" en la región A2. Por otro lado, al reemplazar una de las serinas del extremo N-terminal de la región A2, la Ser177, por fosfoserina, se desencadena un efecto jerárquico que provoca un aumento dramático en la eficiencia de fosforilación del péptido. Estos datos son consistentes con un mecanismo bifásico de fosforilación, en que la región L provee un sitio "docking" funcional que facilita la fosforilación no canónica de la Ser177, la que, consiguientemente, gatilla una cadena de fosforilaciones jerárquicas río debajo de este residuo.

Con objeto de realizar estudios sobre el comportamiento *in vivo* de las variantes de CK1α, se transfectaron células Cos-7 con construcciones de CK1α y CK1αL. Mediante inmunocitoquímica, se determinó que la CK1α se localizaba en forma generalizada dentro de la célula, predominantemente en el citoplasma. CK1αL, en contraste, se localizaba en forma predominante en el núcleo, lo que sugiere que la secuencia PVGKRKR, contenida dentro del inserto L, constituiría una señal de localización nuclear funcional. La variante más larga también exhibió una vida media 4 veces menor que CK1α, siendo de 97 y 400 minutos,

respectivamente, como fue determinado por experimentos de pulso y caza en células transfectadas y marcadas metabólicamente con ^{35}S.

Mediante experimentos de RT-PCR utilizando RNA total de embriones y adultos de pez cebra, se determinó que la proporción relativa de los transcritos de las cuatro subisoformas varía a lo largo del desarrollo y en adulto, observándose un aumento relativo de αS y una caída en el nivel de αL entre los estadíos de 1 célula y larva (4-5 días). Además, por hibridación in situ utilizando una sonda general para las cuatro variantes de CK1α, se observó una expresión generalizada de los mensajeros de esta isoforma de CK1 hasta las 24 h de desarrollo y, entre los 2 y 3 días, una localización más específica en la cabeza y el primordio de la aleta pectoral.

En síntesis, la presencia del inserto L confiere a la enzima algunas propiedades que la distinguen de las variantes que no contienen este inserto: Altera el sitio de unión a ATP, disminuyendo levemente la afinidad por el nucleótido, disminuye la estabilidad de la enzima, tanto *in vivo* como *in vitro* frente a una temperatura de 40°C, aumenta el nivel de fosforilación de la CK1α en presencia de PKA y concentra la enzima en el núcleo, probablemente debido a la secuencia PVGKRKR contenida en el inserto L.

SUMMARY

Protein kinase CK1 is highly ubiquitous and conserved in all eukaryotes studied, particularly among vertebrates. In these organisms, the enzyme exists as a family comprised of seven genetically distinct members, CK1α, β, γ1, γ2, γ3, δ and ε. Up to date, it is known that the mRNA of at least three of these isoforms, α, γ1 and γ3, undergo alternative splicing, generating in this way new variants. In particular, CK1α mRNA originates 4 subisoforms, defined by the presence or absence of 2 additional segments, the L and S inserts. The former is located in the middle of the catalytic domain, in the so-called "hinge" region, whereas the latter is found at the C-terminus. The coexistence of some or all of these splicing variants has been described previously in rat, chicken and human and the sequences of the inserts are highly conserved among these species.

In this thesis, we have cloned the 4 splicing variants of Zebrafish (*Danio rerio*) CK1α and expressed them in *E. coli* and in cultured mammalian cells. Biochemical characterization of the recombinant proteins expressed in bacteria determined that the variants containing the L insert display a lower affinity for ATP, as for the specific inhibitor CKI-7, which competes for the nucleotide binding site. Furthermore, these variants show a higher specific activity towards β-casein, although there is no difference in the apparent Km between the four isoforms towards the protein and peptide substrates studied, namely, β-casein,

phosvitin and the protein phosphatase1 inhibitor-2-derived peptide, RRKDLHDDEEDEAMSITA (PPI2). The L variants also were more thermolabile at 40°C, compared to the variants that lack this insert. In addition, the L insert contains a canonical phosphorylation site for PKA. In the presence of this enzyme, phosphorylation levels are stimulated 2-, 6-, 16- and approximately 70-fold for CK1α, αS, αL and αLS, respectively, Thus the four splicing variants of CK1α appear to be phosphorylated by PKA, particularly within the inserts and, especially within the L insert. The four splicing variants, moreover, displayed autophosphorylating and tyrosine kinase activities.

Another aspect of this thesis was the phosphorylation of NFAT4 by CK1. The work of Zhu *et al.* (1998) shows that this transcription factor in phosphorylated *in vivo* by CK1α and that this phosphorylation prevents entry of NFAT4 to the nucleus (Zhu et al., 1998). This article describes a putative docking site within the sequence of NFAT4 that interacts with CK1. In our study we used synthetic peptides spanning the conserved regions A and Z, with the linker region located between them (L). Zebrafish CK1α splicing variants, as well as native rat liver CK1, phosphorylated non-canonical residues of the A2 region, but not the Z region, in contrast to the results of Zhu et al. (1998). An acidic cluster of amino acids in the linker region is essential for high-efficiency phosphorylation of the A2 domain, as shown by the increase of an order of magnitude in the Km caused by a deletion of the linker region or a substitution of the acidic residues for glicines or alanines. This result is also at variance with

that of Zhu et al. (1998), because they had located the docking site in the A2 region. In addition, replacement of one of the serine residues of the N-terminus of the A2 region, Ser177, by phosphoserine, triggers a hierarchical effect with a dramatic improvement in phosphorylation efficiency. These results are consistent with a two-phase phosphorylation mechanism, in which the L region provides a functional docking site for CK1 and allows the unorthodox phosphorylation of Ser177. This residue, once phosphorylated, primes the phosphorylation of other downstream residues.

In order to carry out studies on the *in vivo* behavior of the CK1α splicing variants, Cos-7 cells were transfected with CK1α and CK1αL constructs. By immunocytochemistry, CK1α was found to localize in a general fashion throughout the cell, predominantly in the cytoplasm. CK1αL, in contrast, was located mainly in the nucleus, suggesting that the sequence KRKR, contained within the L insert, constitutes a functional nuclear localization signal. The longest of the 2 variants also displayed a half-life 4 times shorter than CK1α, being the former 97 minutes and the latter 400 minutes, as determined by pulse-chase experiments in transfected cells metabolically labelled with ^{35}S.

RT-PCR experiments performed on total RNA from embryos and adult zebrafish showed that the relative proportion of the transcripts derived from the four splice variants varies during embryonic development and in adult. Between the 1-cell and larval (4-5 days) stages, an increase in the relative amount of the αS transcript is observed, together with a concomitant decrease in αL. Finally, *in*

INTRODUCCION

1. LA FOSFORILACION DE PROTEINAS.

La fosforilación es la modificación posttraduccional más importante que sufren las proteínas dentro de la célula eucariótica. Esta ocurre fundamentalmente en residuos de tirosina, serina y treonina y produce cambios en la proteína blanco, específicamente en su actividad, conformación, localización subcelular o vida media. Esta modificación está involucrada en la regulación de una variedad de procesos celulares, como transducción de señales mitogénicas, importación nuclear y expresión génica, lo cual se relaciona con oncogénesis, desarrollo embrionario y diferenciación celular, entre otros.

Las encargadas de producir estas modificaciones son las proteínaquinasas, que conforman una gran familia que posee, en el genoma humano, más de 800 miembros (Venter y col., 2001). Entre ellas se distinguen dos tipos fundamentales, las serina/treonina quinasas y las tirosinaquinasas. También existen las que fosforilan a los tres residuos mencionados, caracterizándolas como quinasas de especificidad dual (Lindberg y col., 1992) En términos generales, las serina/treonina quinasas están involucradas en cascadas de transducción de señales y las tirosinaquinasas forman parte de algunos receptores de membrana.

Dentro de las serina/treonina quinasas, se destacan algunas grandes familias, clasificadas según el segundo mensajero del cual depende su actividad. Entre ellas se encuentran la PKC o proteínaquinasa dependiente de calcio y fosfolípidos, la PKA o proteínaquinasa dependiente de cAMP o la CaMK o proteínaquinasa dependiente de calcio y calmodulina.

Las proteínaquinasas CK1 y CK2, originalmente llamadas caseínaquinasa I y caseínaquinasa II, han sido caracterizadas como quinasas independientes de segundos mensajeros y con especificidad por sustratos acídicos. Su nombre original derivó del uso de la caseína como sustrato *in vitro* y del orden en el cual estas dos enzimas eluían de una columna de DEAE-celulosa (Tuazon y Traugh, 1991).

2. LA PROTEINAQUINASA CK1.

La CK1 es una enzima altamente ubícua, encontrándose desde las levaduras hasta el hombre, en todos los tipos y compartimientos celulares estudiados. Posee afinidad por sustratos acídicos, exhibiendo ella misma un punto isoeléctrico de más de 9,0. Esta enzima se ha encontrado siempre como monómero activo, independiente de segundos mensajeros y ha sido relacionada a una gran variedad de sustratos *in vitro* e *in vivo* (Tuazon y Traugh, 1991; Gross y Anderson,1998). Entre estas se encuentran p53 (Milne y col., 1992), CREM (deGroot y col., 1993), el inhibidor-2 de fosfatasa 1 (Agostinis y col., 1992), el antígeno T grande de virus SV40 (Cegielska y Virshup, 1993), el receptor de insulina (Rapuano y Rosen 1991), receptor de TNFα, los receptores

muscarínicos m1 y m3 (Tobin y col., 1997; Waugh y col., 1999), la fosfoproteína DARPP-32 (Desdouits y col., 1995) y la proteína 14-3-3ζ (Dubois y col., 1997).

La CK1 comprende una familia de varias isoformas, las que se encuentran conformadas por un dominio catalítico central conservado, flanqueado en los extremos C- y N-terminal por extensiones de longitud y composición variable, lo cual explica el amplio rango de tamaños moleculares publicados para esta enzima, que van desde los 26.000 hasta 62.000. Dentro del dominio catalítico, sin embargo, existe una identidad de secuencia de más del 50% entre todas las isoformas conocidas. Por este motivo y por exhibir una identidad de secuencia de menos del 25% con otras proteínaquinasas, la CK1 se encuentra en una rama única en un árbol filogenético basado en la estructura primaria de las proteínaquinasas conocidas. El dominio catalítico posee casi todos los subdominios comunes a todas las ser/tre quinasas, con la diferencia de que la secuencia Asp-Pro-Glu del subdominio VIII es reemplazada por Ser/Ile-Val-Asn y por la ausencia de un residuo de arginina que se encuentra casi invariablemente en el subdominio XI (Hanks y Hunter, 1991; Hanks y Quinn, 1995).

3. ISOFORMAS DE CK1 DE LEVADURA.

Hasta la fecha se han descrito 4 isoformas de CK1 en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, conocidas como HRR25, YCK1, YCK2 y YCK3, las que poseen tamaños moleculares entre 55.000 y 62.000 (DeMaggio y col.,

1992; Robinson y col., 1992; Wang y col., 1992; Wang y col, 1996). Otras cinco isoformas han sido encontradas en *Schizzosaccharomyces pombe*, las que se han llamado CKi1, CKi2, CKi3, Hhp1 y Hhp2. Estas tienen tamaños moleculares entre los 45.000 y 50.000 (Wang y col., 1994; Kitamura y Yamashita, 1998; Dhillon y Hoekstra, 1994).

4. ISOFORMAS DE CK1 DE EUCARIONTES SUPERIORES

Los primeros cDNAs de CK1 fueron aislados en 1991 por Rowles y col., desde cerebro de bovino. Estos correspondían a CK1α, CK1β, CK1γ y una forma de CK1α con una inserción de 28 aminoácidos, llamada CK1αL. También en este estudio se purificó, desde bazo de bovino, otra isoforma de CK1, llamada CK1δ. Desde entonces, otros vertebrados han demostrado poseer estas y otras isoformas de la CK1. La isoforma más abundante y ubícua y más ampliamente estudiada es la CK1α, que posee un tamaño molecular de 37.500. Posee dominios C- y N- terminal cortos en relación a las demás isoformas (Esquemas 1 y 2A). Esta isoforma se ha descrito también en humano (Tapia y col., 1994; Fish y col., 1995), rata (Zhang y col., 1996), *Xenopus laevis* (Pulgar y col., 1996), ratón (McInnes y Leader, 1997), pollo (Green y Bennett, 1998) y *Drosophila melanogaster* (Santos y col., 1996). CK1β se ha identificado solamente en bovino y se ha calculado su tamaño molecular en 39.000 (Rowles y col., 1991). Esta isoforma posee una estructura general muy similar a α (Esquemas 1 y 2A). CK1γ existe como una subfamilia de tres miembros,

```
                                                                                I
ggCK1α      ----------------------------MASSSGSKAEFIVGGKYKLVRKIGSGSFGDI     31
ggCK1αS     ----------------------------MASSSGSKAEFIVGGKYKLVRKIGSGSFGDI     31
ggCK1αL     ----------------------------MASSSGSKAEFIVGGKYKLVRKIGSGSFGDI     31
ggCK1αLS    ----------------------------MASSSGSKAEFIVGGKYKLVRKIGSGSFGDI     31
bCK1β       ----------------------------MASSSRPKTDVLVGGRYKLVREIGFGSFGHV     31
hCK1γ1      --MDHPSREKDERQRTTKPMAQRSAHCSRPSGSSSSSGVLMVGPNFRVGKKIGCGNFGEL     58
hCK1γ1L     --MDHPSREKDERQRTTKPMAQRSAHCSRPSGSSSSSGVLMVGPNFRVGKKIGCGNFGEL     58
hCK1γ2      MDFDKKGGKGETEEGRRMSKAGGGRSSHGIRSSGTSSGVLMVGPNFRVGKKIGCGNFGEL     60
hCK1γ3      ---MENKKKDKDKSDDRMARPSGRSGHNTRGTGSSSSGVLMVGPNFRVGKKIGCGNFGEL     57
hCK1γ3L     ---MENKKKDKDKSDDRMARPSGRSGHNTRGTGSSSSGVLMVGPNFRVGKKIGCGNFGEL     57
hCK1δ       -------------------------------------MELRVGNRYRLGRKIGSGSFGDI     23
hCK1ε       -------------------------------------MELRVGNKYRLGRKIGSGSFGDI     23
                                                   . ** .::: ::** *.**.:

                    II                III                IV
ggCK1α      YLAINITNGEEVAVKLESQKARHPQLLYESKLYKILQGG-VGIPHIRWYGQEKDYNVLVM     90
ggCK1αS     YLAINITNGEEVAVKLESQKARHPQLLYESKLYKILQGG-VGIPHIRWYGQEKDYNVLVM     90
ggCK1αL     YLAINITNGEEVAVKLESQKARHPQLLYESKLYKILQGG-VGIPHIRWYGQEKDYNVLVM     90
ggCK1αLS    YLAINITNGEEVAVKLESQKARHPQLLYESKLYKILQGG-VGIPHIRWYGQEKDYNVLVM     90
bCK1β       YLAIDLTNHEQVAVKLESENTRQPRLLHEKELYNFLQGG-VGIPQIRWYGQETDYNVLVM     90
hCK1γ1      RLGKNLYTNEYVAIKLEPIKSRAPQLHLEYRFYKQLGSAGEGLPQVYYFGPCGKYNAMVL    118
hCK1γ1L     RLGKNLYTNEYVAIKLEPIKSRAPQLHLEYRFYKQLGSAGEGLPQVYYFGPCGKYNAMVL    118
hCK1γ2      RLGKNLYTNEYVAIKLEPIKSRAPQLHLEYRFYKQLSAT-EGVPQVYYFGPCGKYNAMVL    119
hCK1γ3      RLGKNLYTNEYVAIKLEPMKSRAPQLHLEYRFYKQLGSG-DGIPQVYYFGPCGKYNAMVL    116
hCK1γ3L     RLGKNLYTNEYVAIKLEPMKSRAPQLHLEYRFYKQLGSG-DGIPQVYYFGPCGKYNAMVL    116
hCK1δ       YLGTDIAAGEEVAIKLECVKTKHPQLHIESKIYKMMQGG-VGIPTIRWCGAEGDYNVMVM     82
hCK1ε       YLGANIASGEEVAIKLECVKTKHPQLHIESKFYKMMQGG-VGIPSIKWCGAEGDYNVMVM     82
             *. ::   * **:***  ::: *:*  * .:*: : .   *:* : : *   .**.:*:

                  V                VIa       VIb
ggCK1α      DLLGPSLEDLFNFCSRRFTMKTVLMLADQMISRIEYVHTKNFIHRDIKPDNFLMGIGRHC    150
ggCK1αS     DLLGPSLEDLFNFCSRRFTMKTVLMLADQMISRIEYVHTKNFIHRDIKPDNFLMGIGRHC    150
ggCK1αL     DLLGPSLEDLFNFCSRRFTMKTVLMLADQMISRIEYVHTKNFIHRDIKPDNFLMGIGRHC    150
ggCK1αLS    DLLGPSLEDLFNFCSRRFTMKTVLMLADQMISRIEYVHTKNFIHRDIKPDNFLMGIGRHC    150
bCK1β       DLLGPSLEDLFNFCSRRFSMKTVLMLADQMISRIEYVHSRNLIHRDIKPDNFLMGTGPQW    150
hCK1γ1      ELLGPSLEDLFDLCDRTFTLKTVLMIAIQLLSRMEYVHSKNLIYRDVKPENFLIGRQ---    175
hCK1γ1L     ELLGPSLEDLFDLCDRTFTLKTVLMIAIQLLSRMEYVHSKNLIYRDVKPENFLIGRQ---    175
hCK1γ2      ELLGPSLEDLFDLCDRTFTLKTVLMIAIQLITRMEYVHTKSLIYRDVKPENFLVGRP---    176
hCK1γ3      ELLGPSLEDLFDLCDRTFSLKTVLMIAIQLISRMEYVHSKNLIYRDVKPENFLIGRP---    173
hCK1γ3L     ELLGPSLEDLFDLCDRTFSLKTVLMIAIQLISRMEYVHSKNLIYRDVKPENFLIGRP---    173
hCK1δ       ELLGPSLEDLFNFCSRKFSLKTVLLLADQMISRIEYIHSKNFIHRDVKPDNFLMGLG---    139
hCK1ε       ELLGPSLEDLFNFCSRKFSLKTVLLLADQMISRIEYIHSKNFIHRDVKPDNFLMGLG---    139
            :**********::*.* *::****::* *:::*:**:*:::.:*:**:**:***:*

                                                      VII
ggCK1α      NK----------------------------LFLIDFGLAKKYRDNRTRQHIPYREDKNLT    182
ggCK1αS     NK----------------------------LFLIDFGLAKKYRDNRTRQHIPYREDKNLT    182
ggCK1αL     NKCLESPVGKRKRSMTVSTSQDPSFSGLNQLFLIDFGLAKKYRDNRTRQHIPYREDKNLT    210
ggCK1αLS    NKCLESPVGKRKRSMTVSTSQDPSFSGLNQLFLIDFGLAKKYRDNRTRQHIPYREDKNLT    210
bCK1β       KK----------------------------LFLVDFGLAKKYRDNRTGQHIPHRSGKSFI    182
hCK1γ1      -----------------------GNKKEHVIHIIDFGLAKEYIDPETKKHIPYREHKSLT    212
hCK1γ1L     -----------------------GNKKEHVIHIIDFGLAKEYIDPETKKHIPYREHKSLT    212
hCK1γ2      -----------------------GTKRQHAIHIIDFGLAKEYIDPETKKHIPYREHKSLT    213
hCK1γ3      -----------------------RNKTQQVIHIIDFGLAKEYIDPETKKHIPYREHKSLT    210
hCK1γ3L     -----------------------RNKTQQVIHIIDFGLAKEYIDPETKKHIPYREHKSLT    210
hCK1δ       -------------------------KKGNLVYIIDFGLAKKYRDARTHQHIPYRENKNLT    174
hCK1ε       -------------------------KKGNLVYIIDFGLAKKYRDARTHQHIPYRENKNLT    174
                                        :.::******:* * .* :***:*. * .:

            VIII              IX              X
ggCK1α      GTARYASINAHLGIEQSRRDDMESLGYVLMYFNRTSLPWQGLKAATKKQKYEKISEKKMS    242
ggCK1αS     GTARYASINAHLGIEQSRRDDMESLGYVLMYFNRTSLPWQGLKAATKKQKYEKISEKKMS    242
ggCK1αL     GTARYASINAHLGIEQSRRDDMESLGYVLMYFNRTSLPWQGLKAATKKQKYEKISEKKMS    270
ggCK1αLS    GTARYASINAHLGIEQSRRDDMESLGYVLMYFNRTSLPWQGLKAATKKQKYEKISEKKMS    270
bCK1β       GTPFCASISAHLGIEQSRRDDMESIGYVLMYFNRGSLPWQGLKAATLKQKCEKISEMKMT    242
hCK1γ1      GTARYMSINTHLGKEQSRRDDLEALGHMFMYFLRGSLPWQGLKADTLKERYQKIGDTKRN    272
hCK1γ1L     GTARYMSINTHLGKEQSRRDDLEALGHMFMYFLRGSLPWQGLKADTLKERYQKIGDTKRA    272
hCK1γ2      GTARYMSINTHLGKEQSRRDDLEALGHMFMYFLRGSLPWQGLKADTLKERYQKIGDTKRN    273
hCK1γ3      GTARYMSINTHLGKEQSRRDDLEALGHMFMYFLRGSLPWQGLKADTLKERYQKIGDTKRA    270
hCK1γ3L     GTARYMSINTHLGKEQSRRDDLEALGHMFMYFLRGSLPWQGLKADTLKERYQKIGDTKRA    270
hCK1δ       GTARYASINTHLGIEQSRRDDLESLGYVLMYFNLGSLPWQGLKAATKRQKYERISEKKMS    234
hCK1ε       GTARYASINTHLGIEQSRRDDLESLGYVLMYFNLGSLPWQGLKAATKRQKYERISEKKMS    234
            **.   **.:*** *******:*::*:::***   ********* * ::: ::*.: *
```

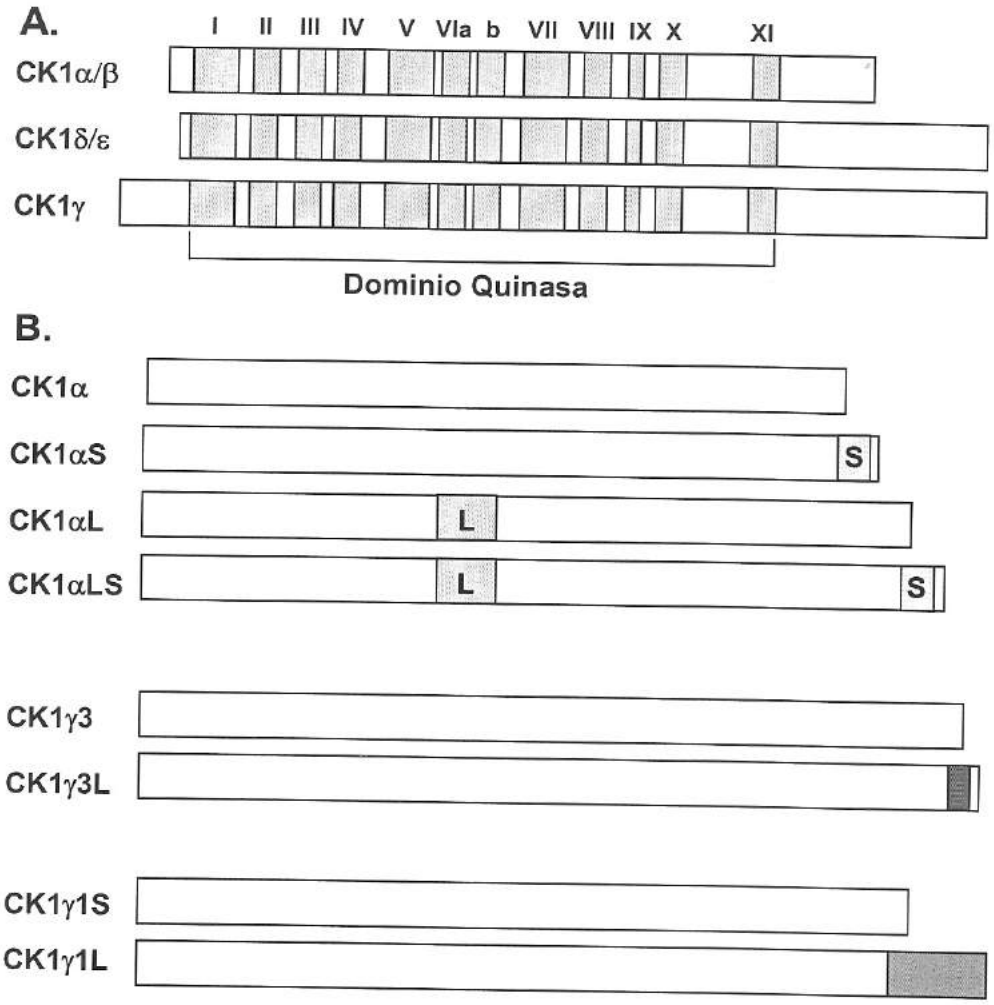
```
                                   XI
ggCK1α        TPVEVLCKGFPAEFAMYLNYCRGLRFEEAPDYMYLRQLFRILFRTLNHQYDYTFDWTMLK    302
ggCK1αS       TPVEVLCKGFPAEFAMYLNYCRGLRFEEAPDYMYLRQLFRILFRTLNHQYDYTFDWTMLK    302
ggCK1αL       TPVEVLCKGFPAEFAMYLNYCRGLRFEEAPDYMYLRQLFRILFRTLNHQYDYTFDWTMLK    330
ggCK1αLS      TPVEVLCKGFPAEFAMYLNYCRGLRFEEAPDYMYLRQLFRILFRTLNHQYDYTFDWTMLK    330
bCK1β         TPVDVLCKGFPIEFAMYLKYCLRLSFEEAPDYRYLRQLFRLLFRKLSYQHDYAFDWIVLK    302
hCK1γ1        TPIEALCENFPEEMATYLRYVRRLDFFEKPDYEYLRTLFTDLFEKKGYTFDYAYDWVGRP    332
hCK1γ2        TPIEVLCENFPEEMATYLRYVRRLDFFEKPDYDYLRKLFTDLFDRSGFVFDYEYDWAGRP    332
hCK1γ1L       TPIEALCENFPEEMATYLRYVRRLDFFEKPDYEYLRTLFTDLFEKKGYTFDYAYDWVGKP    333
hCK1γ3        TPIEVLCENFP-EMATYLRYVRRLDFFEKPDYEYLRKLFTDLFDRKGYMFDYEYDWIGKQ    329
hCK1γ3L       TPIEVLCENFP-EMATYLRYVRRLDFFEKPDYEYLRKLFTDLFDRKGYMFDYEYDWIGKQ    329
hCK1δ         TPIEVLCKGYPSEFATYLNFCRSLRFDDKPDYSYLRQLFRNLFHRQGFSYDYVFDWNMLK    294
hCK1ε         TPIEVLCKGYPSEFSTYLNFCRSLRFDDKPDYSYLRQLFRNLFHRQGFSYDYVFDWNMLK    294
              **:.:**:.:* *:: **.:   * * : *** *** **  **   .. .** :**

ggCK1α        QKAAQQAASSSGQGQQAQTPT------------GF--------------------------    325
ggCK1αS       QKAAQQAASSSGQGQQAQTPTGKQTDKSKSNMKGF--------------------------    337
ggCK1αL       QKAAQQAASSSGQGQQAQTPT------------GF--------------------------    353
ggCK1αLS      QKAAQQAASSSGQGQQAQTPTGKQTDKSKSNMKGF--------------------------    365
bCK1β         QKAEQQASSSSGEGQQAQTPTGK-SDNTKSEMKHS--------------------------    336
hCK1γ1        IPTPVGSVHVDSGASAITRESHTHRDRPSQQQPLRN-------------------------    338
hCK1γ1L       IPTPVGSVHVDSGASAITRESHTHRDRPSQQQPLRN-------------------------    338
hCK1γ2        LPTPIGTVHTDL-PSQPQLRDKTQPHSKNQALN----------------------------    364
hCK1γ3        LPTPVGAVQQDP-ALSSNREAHQHRDKMQQSKNQSADHRAAWDSQQANPHHLRAHLAADR    388
hCK1γ3L       LPTPVGAVQQDP-ALSSNREAHQHRDKMQQSKNQSADHRAAWDSQQANPHHLRAHLAADR    388
hCK1δ         FGASRAADDAERERR--DREERLRHSRNPATRGLPSTASG-----RLRGTQEVAPPTPLT    347
hCK1ε         FGAARNPEDVDRERREHEREERMGQLRGSATRALPPGPPTGATANRLRSAAEPVASTPAS    354
                   :   .   .

hCK1γ1        -----QSLRTVTAEHYDVNNSAIWHRGRGT-------------------------------    363
hCK1γ1L       -----QVVSSTNGELNVDDPTGAHSNAPITAHAEVEVVEEA--------KCCCFFKRKRK    385
hCK1γ2        ---------STNGELNADDPTAGHSNAPITAPAEVEVADET--------KCCCFFKRKRK    407
hCK1γ3        HGGSVQVVSSTNGELNTDDPTAGRSNAPITAPTEVEVMDET--------KCCCFFKRKRK    440
hCK1γ3L       HGGSVQVVSSTNGELNTDDPTAGRSNAPITAPTEVEVMDETNCQKVLNMWCCCFFKRKRK    448
hCK1δ         P-TSHTANTSPRPVSGMERERKVSMRLHRGAPVNISSSDLTGRQDTSRMSTSQIPGRVAS    406
hCK1ε         R-IQPAGNTSPRAISRVDRERKVSMRLHRGAPANVSSSDLTGRQEVSRIPASQTSVPFDH    413

hCK1γ1L       KTAQRHK------------------------------------------------------    392
hCK1γ2        KSLQRHK------------------------------------------------------    414
hCK1γ3        KTIQRHK------------------------------------------------------    447
hCK1γ3L       KTIQRHK------------------------------------------------------    455
hCK1δ         SGLQSVVHR----------------------------------------------------    415
hCK1ε         LGK----------------------------------------------------------    416
```

Esquema 1. Alineamiento de isoformas de CK1 de vertebrados. Se muestran las secuencias aminoacídicas de CK1α, CK1αS, CK1αL y CK1αLS de pollo, CK1β de bovino y las isoformas γ1, γ1L, γ2, γ3, γ3L, δ y ε de humano. Se indican en números romanos las regiones conservadas de los dominios quinasa (Hanks y Hunter, 1995). El asterisco "*" denota posiciones que contienen un único residuo absolutamente conservado. El símbolo ":" indica la conservación de uno de los grupos "fuertes" STA, NEQK, NHQK, NDEQ, QHRK, MILV, MILF, HY o FYW. El punto "." Representa la conservación de uno de los grupos "débiles" CSA, ATV, SAG, STNK, STPA, SGND, SNDEQK, NDEQHK, FVLIM, HFY o NEQHRK. Los alineamientos fueron realizados con el programa CLUSTALW Versión 1.8.



Esquema 2. *Estructura de isoformas de CK1 de vertebrados.* A, comparación de isoformas de CK1. Se muestran en gris las regiones conservadas I-XI del dominio quinasa, según la nomenclatura de Hanks y Hunter (1995). B, Esquema de subisoformas de CK1 generadas por procesamiento alternativo. La isoforma α da origen a 4 variantes según la presencia o ausencia de los segmentos codificados por 2 exones, L y S (Green y Bennet, 1998). CK1γ3 posee dos formas por la existencia de un exón alternativo que codifica para un segmento adicional de 7 aminoácidos en el extremo C-terminal (Zhai y col., 1995). CK1γ1 sufre un procesamiento alternativo que reemplaza los 24 residuos aminoacídicos C-terminales por una secuencia diferente de 53 aminoácidos (Kusuda y col., 2000)

llamados γ1, γ2 y γ3, provenientes de genes distintos. Sus tamaños moleculares son de 43.000, 45.000 y 49.700, respectivamente (Esquemas 1 y 2A). Los tres miembros fueron descritos en rata (Zhai y col., 1995) y en humano se ha identificado γ2 y γ3 (Kitabayashi y col., 1997). Los mensajeros de γ1 y γ2 parecen expresarse solamente en testículo, mientras que la expresión de γ3 se ha detectado en casi todos los tejidos (Zhai y col., 1995). La isoforma δ posee un tamaño molecular de 49.100 y ha sido encontrada, además de bovino (Rowles y col., 1991), en humano (Kusuda y col., 1996) y rata (Graves y col., 1993). Finalmente, existe otra isoforma, denominada CK1ε, que ha sido encontrada en humano (Fish y col., 1995), rata (Takano y col., 2000), Drosophila (Kloss y col., 1998), *Xenopus* (Peters y col., 1999) y ratón (Torres y Nelson, 2000) y exhibe un tamaño molecular de 47.300. Estas dos últimas isoformas poseen un dominio C-terminal extenso, que guarda una identidad de secuencia de un 40% entre ellas y sus dominios catalíticos son más del 98% idénticos (Esquemas 1 y 2A). Contribuyendo a ampliar aún más la variedad de isoformas de CK1 existentes en vertebrados, los mensajeros de al menos tres de ellas sufren procesamiento alternativo, dando lugar a nuevas formas de la enzima. Estas isoformas son α, γ1 y γ3 (Esquema 2B). Los detalles de este fenómeno son discutidos en mayor profundidad más adelante.

En invertebrados también se ha identificado una serie de isoformas de CK1. En *Drosophila* han sido descritas las isoformas α y ε. En *C. elegans* se han encontrado 87 genes putativos para CK1, además de 7 secuencias que

codificarían para dominios catalíticos parciales (Plowman y col., 1999). Dentro del reino vegetal, se han identificado cuatro isoformas en *Arabidopsis thaliana* (Klimczak y col., 1995) y en broccolli (*Brassica oleracea*) se aisló una isoforma de 34.200 (Klimczak y Cashmore, 1993). En mango (*Mangifera indica L.*) se identificó una CK1 cuya actividad era estimulada por Ca^{2+} (Frylinck y Dubery, 1998). También se ha logrado el aislamiento de CK1 de protozooarios, como *Plasmodium falciparium* (Barik y col., 1997), *Paramecium tetraurelia* (Walczak y col., 1993) y *Dictyostelium discoideum* (Moreno-Bueno y col., 2000).

5. ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO DE CK1.

La secuencia polipeptídica de consenso fosforilada por CK1 fue definida originalmente como una secuencia que contiene un residuo fosforilado ubicado 3 posiciones N-terminal al residuo de serina o treonina blanco (Flotow y col., 1990; Meggio y col., 1991). El determinante fosforilado podía corresponder a fosfoserina o fosfotreonina y, con bastante menor eficiencia, a fosfotirosina (Meggio y col., 1992). La función de los fosfoaminoácidos puede ser cumplida por grupos de 3 o 4 residuos aminoacídicos ácidos, siendo el aspartato más eficiente que el glutamato (Flotow y Roach, 1991). Mediante el uso de péptidos se ha definido la secuencia óptima de fosforilación dirigida por residuos acídicos, siendo los mejores sustratos los que se han derivado de los sitios fosforilables por CK1 en el inhibidor-2 de la proteína fosfatasa-1. Estas secuencias corresponden a RRKHAAIGDDDDAYSITA (péptido S86) y RRKDLHDDEEDEAMSITA (péptido S174) (Agostinis y col., 1992). Estos

péptidos poseen las características de un bloque de residuos acídicos entre las posiciones n-6 y n-3, relativo al residuo fosforilable y un grupo de residuos hidrofóbicos después de éste. Los residuos básicos del extremo N-terminal, adicionados por razones técnicas, tienen la función de inmovilizar el péptido al papel de fosfocelulosa durante el ensayo de fosforilación *in vitro*. Mediante el uso de librerías de péptidos sintéticos, seleccionados mediante el uso de columnas de afinidad con las enzimas recombinantes inmovilizadas en la resina, Songyang y col. (1996) determinaron como secuencias óptimas MAEFDTGSIIIFFAKKK para CK1δ y MAYYDAASIIIFFAKKK para CK1γ. Estos péptidos poseen como determinante un único residuo acídico en posición n-3 a la serina fosforilable y un bloque más fuertemente hidrofóbico en el lado C-terminal. En un estudio posterior, Pulgar y col. (1999), utilizando péptidos sintéticos derivados de la secuencia del inhibidor-2 de fosfatasa-1 y de los péptidos de las librerías, determinaron un requerimiento para la fosforilación por CK1 dirigida por residuos acídicos como un grupo de al menos 3 aminoácidos de esta naturaleza, a partir de la posición n-2. Todas las isoformas usadas en este estudio mostraron una preferencia similar, aunque no se puede descartar que *in vivo* las diferentes isoformas de CK1 muestren preferencias específicas por una u otra secuencia. Sin embargo, aunque las secuencias que poseen aminoácidos acídicos constituyen buenos sustratos para CK1, los fosfoaminoácidos siguen siendo los mejores determinantes para la fosforilación por esta enzima. Por ello, CK1 es una familia de proteínaquinasas dirigidas por

fosfato, que actúan sobre proteínas que han sido fosforiladas previamente por otras quinasas. Esta situación se enmarca dentro de la llamada fosforilación jerárquica, en que la acción previa de una quinasa crea un sitio fosforilable por CK1.

Algunas isoformas de CK1 son capaces también de fosforilar residuos de tirosina. La capacidad de fosforilar al polímero poliglutamato/tirosina se observó con las isoformas Hhp1 y Hhp2 de *S. pombe* (Hoekstra y col., 1994) y con la CK1α de *Xenopus* (Pulgar y col., 1996). Estas isoformas, además de HRR25 de *S. cerevisiae* y CKi1 de *S. pombe*, son capaces también de autofosforilarse en residuos de tirosina (Hoekstra y col., 1994; Pulgar y col., 1996). Aunque la actividad de tirosinaquinasa de estas enzimas es bastante menor que la fosforilación de serina y treonina, ellas se pueden incluir en el reducido grupo de las proteínaquinasas de especificidad dual.

6. ANTECEDENTES SOBRE FUNCIONES DE CK1 *IN VIVO.*

6.1. CK1 EN LEVADURAS.

Mediante estudios genéticos se ha logrado dilucidar la función de algunas de las isoformas de levadura de CK1. El gen *HRR25* fue aislado como una mutante de *Saccharomyces cerevisiae* con una sensibilidad aumentada a agentes que producen rupturas en las hebras del DNA, como tratamiento con agentes alquilantes, rayos X y la expresión contínua de la endonucleasa de doble hebra HO. Estas mutantes crecen más lentamente y son incapaces de

esporular. La ausencia completa del gen produce un efecto pleiotrópico, en que las mutantes exhiben un tiempo de duplicación aumentado, una morfología celular aberrante y un retraso en la fase G_2 del ciclo celular. El fenotipo genera defectos tanto en mitosis como en meiosis (Hoekstra y col., 1991). Más recientemente, se ha descrito la participación de HRR25 en la respuesta transcripcional al daño genético, mediante su interacción con el factor de transcripción Swi6 (Ho y col., 1997). Este factor se asocia con Swi4 para formar el complejo SBF, un factor de transcripción que gatilla la expresión de ciclinas G_1 y de genes requeridos para la fase S (Koch y Nasmyth, 1994). Swi6 no sólo se asocia con HRR25, sino que también es fosforilado por éste *in vitro*. Las mutantes *hrr25, swi4 y swi6* muestran defectos en la inducción transcripcional de genes inducibles por daño en el DNA (Ho y col., 1997). Se ha demostrado que HRR25 e YCK3, otra isoforma de CK1 de *S. cerevisiae*, constituyen un par esencial para la sobrevida y se localizan fundamentalmente en el núcleo (Wang y col., 1996). La función de HRR25 también se ha relacionado con la regulación negativa de la generación de vesículas desde el retículo endoplásmico (Murakami y col., 1999).

Ls genes *hhp1+* y *hhp2+* codifican para isoformas de CK1 altamente homólogas a HRR25 en *Schizosaccharomyces pombe* (Kearney y col., 1994). La mutación en uno o ambos genes produce defectos en la reparación de DNA, con la consiguiente sensibilidad al agente alquilante metilmetanosulfonato (MMS) y a radiación γ (Dhillon y Hoekstra, 1994).

En *S. cerevisiae*, los genes redundantes *yck1* e *yck2* constituyen, juntos, un par esencial para la viabilidad celular. Estos genes codifican para enzimas que proveen una actividad fundamental para el crecimiento vegetativo y confieren halotolerancia al ser sobreexpresadas (Robinson y col., 1992). Ambas isoformas, además, cumplen un papel concertado en la regulación de la H^+-ATPasa (Estrada y col., 1996) y en el tráfico vesicular en la membrana plasmática (Panek y col., 1997). Estas dos isoformas poseen secuencias de isoprenilación en su extremo C-terminal y se encuentran exclusivamente en la fracción de membranas, donde cumplirían sus funciones (Robinson y col., 1993; Wang y col., 1996). YCK2, además, participa en los fenómenos de yemación, morfogénesis y citoquinesis (Robinson y col., 1993; Robinson y col., 1999). Las isoformas YCK1 y YCK2, junto a otra, clonada posteriormente, la YCK3, son capaces de revertir un defecto en la entrada a la proliferación celular después del estado estacionario provocado por falta de nutrientes (Wang y col., 1996)

Los homólogos de las proteínas YCK1, 2 y 3 en *S. pombe* corresponden a la familia de las Cki1, 2 y 3. Cki1 y Cki2 son enzimas citoplasmáticas cuya localización subcelular no se sobrepone, lo que hace suponer que cumplen funciones diferentes dentro de la célula. Aunque ninguna de ellas es esencial para la viabilidad, la sobreexpresión de Cki1 desemboca en un defecto severo de crecimiento y una morfología aberrante (Wang y col., 1994). El otro miembro de esta familia, CKi3, está involucrado en la entrada de la célula a la vía de diferenciación luego de la privación de nutrientes. Esta isoforma tampoco es esencial para la sobrevida de la célula (Kitamura y Yamashita, 1998).

6.2. FUNCIONES DE CK1 EN EUCARIONTES SUPERIORES.

Como se mencionó en la sección 2, existe una larga lista de proteínas que son capaces de ser fosforiladas *in vitro* por CK1, pero la validez de estos datos no han sido comprobados *in vivo* en la mayoría de los casos. En algunos de ellos, sin embargo, se ha logrado atribuir una función a la fosforilación por CK1 de dichos sustratos.

Un caso de ello lo constituye la acción de CK1 sobre la función de la proteína supresora de tumores, p53. Esta proteína juega un papel central en la integración de señales de estrés celular y es regulada por una serie de fosforilaciones secuenciales practicadas por diferentes quinasas (Meek, 1998). La isoforma δ de CK1 fosforila *in vivo* a la serina 18 de p53, de manera dependiente de la fosforilación previa de la serina 15. Esta modificación es gatillada por agentes que producen daño genético y genera un aumento en la estabilidad de p53, dado por una disminución de la afinidad por MDM2, proteína que destina a p53 a la degradación al unírsele (Dumaz y col., 1999; Sakaguchi y col., 2000). Además, el tratamiento de células con drogas anti-tumorales que generan daño en el DNA provoca un aumento en los niveles de CK1δ, de una manera dependiente de p53 intacta. Esto sugiere la existencia de un ciclo de retroalimentación entre p53 y CK1δ (Knippschild y col., 1997). La CK1δ, además, se localiza en el huso mitótico en células que contienen p53 intacta (Behrend y col., 2000a; Behrend y col., 2000b).

Otro proceso en el cual participa la CK1 es el control del ritmo circadiano. El ritmo circadiano está determinado por períodos de 24 horas, regulados por ciclos de retroalimentación negativa basados en transcripción y traducción. Esta retroalimentación negativa genera oscilaciones periódicas de expresión génica de factores positivos que promocionan la transcripción de elementos negativos, el que, en cambio, reprime la expresión del factor positivo (Dunlap, 1999). En *Drosophila*, el elemento positivo corresponde al factor de transcripción heterodimérico formado por las proteínas CLOCK y BMAL1. Este factor de trancripción promueve la expresión de las proteínas PER y TIM, correspondientes a los elementos negativos del ciclo de retroalimentación. En el citoplasma, PER es fosforilada y degradada hasta que aumentan los niveles citoplasmáticos de TIM. Ambas proteínas entonces forman complejos que migran al núcleo e inhiben la transcripción de sus propios genes mediante la regulación negativa del complejo CLOCK/BMAL1 (Young, 1998). El producto del gen *dbt* (double-time) en *Drosophila* fue identificado como un ortólogo de la CK1ε de mamífero y su mutación provoca ya sea un acortamiento o un alargamiento en el ciclo circadiano, según la naturaleza de la mutación (Price y col., 1998). La ausencia completa del gen provoca una pérdida de ritmo circadiano, resultando en un fenotipo letal. A nivel molecular, la proteína PER se encuentra hipofosforilada, lo cual afecta su estabilidad. Además, las proteínas DBT y PER interactúan *in vivo,* lo que sugiere fuertemente que PER es un blanco de fosforilación para DBT. En mamíferos se ha observado similar

mecanismo de regulación (King y Takahashi, 2000; Lowrey y col., 2000; Ishida y col., 2001; Ishida y col., 2001; Kloss y col., 2001). En humanos, una mutación puntual en el gen de la proteína PER2 produce el síndrome de fase de sueño avanzado familiar (FASPS). La mutación puntual observada altera el sitio de fosforilación por CK1ε, lo cual se refleja en una proteína PER hipofosforilada, con el consiguiente acortamiento del período circadiano en los sujetos afectados (Toh y col., 2001).

Se han observado también la participación de isoformas de CK1 en la vía de señalización de Wnt. La transducción de la señal de esta molécula extracelular regula una serie de procesos, incluyendo proliferación celular y formación del eje dorso-ventral durante el desarrollo embrionario. Al interactuar Wnt con el receptor frizzled (frz), se produce la estabilización de β-catenina, con la consiguiente interacción de esta con factores de transcripción de la familia Lef/Tcf, generando una estimulación de la expresión de genes dependientes de estos. La regulación de la estabilidad de β-catenina está a cargo de un compejo multiproteico, donde participan la proteína dishevelled (Dsh), axina, glicógeno sintetasa quinasa 3β (GSK3β), la proteína APC (adenomatous polyposis coli) y la proteína de unión a GSK3 (GBP). En ausencia de Wnt, la GSK3β fosforila a la β-catenina, provocando su degradación (Morin, 1999). En dos trabajos independientes, mediante clonamiento de expresión, se identificó a la CK1ε como regulador positivo de la estabilización de β-catenina y su sobreexpresión inducía la formación de un segundo eje dorso-ventral en embriones de

Xenopus. CK1ε actuaría sinergísticamente con Dvl en la estabilización de β-catenina al formar un complejo ternario con axina y Dvl (Kishida y col., 2001). La estabilización de β-catenina también es lograda mediante su interacción con Tcf3, unión que es estimulada por la fosforilación del factor de transcripción por CK1ε. En contraste, una publicación reciente describe a la CK1α como una de las quinasas responsables de fosforilar directamente a β-catenina (Liu y col., 2002). La CK1α fosforila a la serina 45 de esta proteína, creando un sitio de consenso para GSK3β, lo que provoca una fosforilación secuencial por esta última quinasa. La consecuencia final de esta cooperación entre quinasas es la desestabilización de β-catenina, convirtiendo a la CK1α en antagonista a la vía de Wnt. Este es el primer ejemplo descrito en que dos isoformas diferentes de CK1 participan en una misma vía con roles antagónicos.

Además del ejemplo anterior, CK1 participa en otras vías de transducción de señales, específicamente sobre la porción intracelular de algunos receptores de membrana, como es el caso del receptor de insulina (Tuazon y col., 1985; Rapuano y Rosen, 1991) y el receptor de 75 KDa del factor de necrosis tumoral (TNFR p75) (Beyaert y col.,1995). Este último se encuentra constitutivamente fosforilado por CK1 en células linfoides no estimuladas. El tratamiento con el inhibidor específico de CK1, CKI-7, indujo apoptosis mediada por dicho receptor (Beyaert y col.,1995). CK1 también participa en la vía de TNF fosforilando al dominio intracelular del ligando de membrana, cuando éste se encuentra involucrado en la señalización inversa, fenómeno en el cual el ligando actúa

como receptor (Watts y col.,1999). La CK1, específicamente la isoforma α, se ha visto implicada también en la fosforilación de receptores acoplados a proteínas G, como los receptores muscarínicos m1 y m3 y rodopsina (Tobin y col., 1997; Waugh y col., 1999; Budd y col., 2001). Esta fosforilación se produce de manera dependiente de agonista, lo cual sugiere que CK1α forma parte de la respuesta generada por las señales que estimulan a estos receptores. Un miembro de la familia de los receptores tirosinaquinasa, como es el receptor del factor de crecimiento β derivado de plaquetas (β-PDGFR), también es sustrato *in vivo* de la CK1. Esta fosforilación es responsable de inhibir la actividad autofosforilativa del receptor. La isoforma a cargo de esta modificación parece ser la γ2 (Bioukar y col., 1999). Esta isoforma se encuentra asociada constitutivamente, además, a la proteína adaptadora Nck, la cual media la transducción de señales iniciadas por receptores tirosinaquinasas (Lussier y Larose, 1997; Voisin y col., 1999).

En otro ámbito, la CK1 ha sido implicada en la hiperfosforilación de la proteína tau, lo que facilita su autoensamblaje en filamentos helicoidales pareados, una de las manifestaciones de la enfermedad de Alzheimer (Singh y col., 1994; Singh y col., 1995). Las isoformas α, δ y ε se encuentran elevadas en cerebros de pacientes con Alzheimer, especialmente CK1δ, la que se encuentra aumentada unas 30 veces en tejidos enfermos (Ghoshal y col.,1999; Yasojima y col., 2000). En otro aspecto de la enfermedad, la proteína precursora β-amiloide es fosforilada en la porción extracelular por una ectoquinasa que exhibe

características de CK1 (Walter y col., 2000). De esta manera, la CK1 parece estar involucrada en la génesis de la enfermedad de Alzheimer, tanto en la formación de lesiones neurofibrilares intracelulares como en la aparición de depósitos de la proteína β-amiloide en la superficie externa de las células.

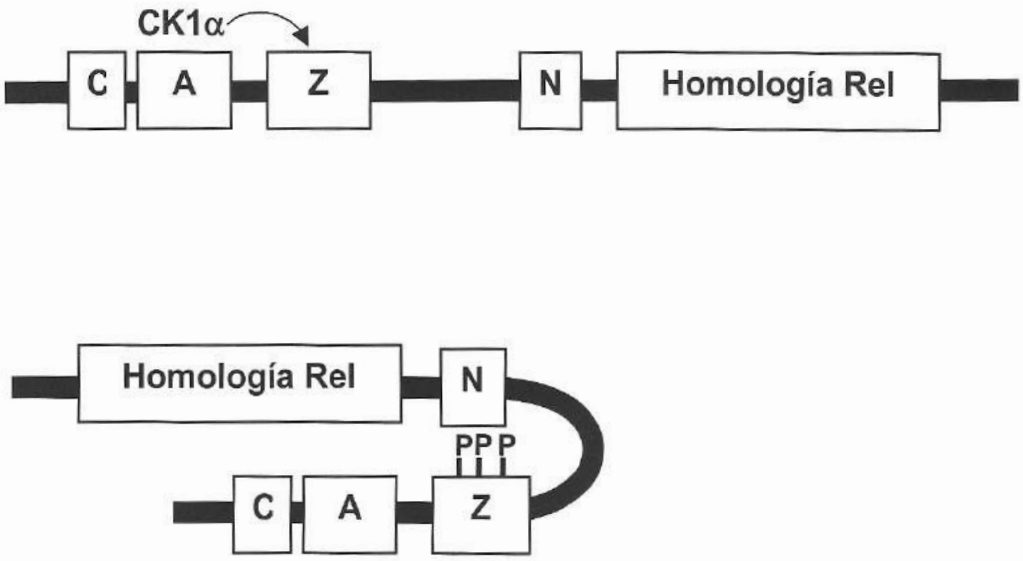
Uno de los más recientes descubrimientos sobre CK1 es la influencia que ejerce su acción sobre el factor de transcripción NF-AT4. NF-AT4 es un miembro de la familia de los factores de transcripción NF-AT y se encuentra fundamentalmente en linfocitos T. Esta proteína se encuentra en el citoplasma hasta que un aumento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} provoca su entrada al núcleo, donde es responsable de la estimulación de la transcripción de una serie de genes de citoquinas (Zhu y McKeon, 2000). El factor esta compuesto de una serie de dominios conservados; un dominio de unión de calcineurina, los dominios conservados A, Z y B, una señal de localización nuclear y un dominio de homología a proteínas Rel. El dominio Z se encuentra normalmente fosforilado, enmascarando la señal de localización nuclear e impidiendo la migración de NF-AT4 al núcleo. El aumento de Ca^{2+} intracelular generado por la estimulación de receptores induce la unión de calcineurina, el cual desfosforila al dominio Z, liberando la señal de localización nuclear, con la consiguiente entrada de NF-AT4 al núcleo (Shibasaki y col., 1996). Existe poca claridad con respecto a cual sería la quinasa responsable de fosforilar NFAT4 y, por lo tanto, de antagonizar la acción de Ca^{++} y calcineurina en este proceso. Crabtree (2001) ha postulado a la glicógeno sintetasa quinasa 3β (GSK3β) como la

enzima responsable. Otros autores, sin embargo, han señalado que esta enzima sería la CK1α (Zhu y col., 1998). La sobreexpresión de CK1α provocaba un retraso en la migración de NF-AT4 al aumentar el Ca^{2+} intracelular y formas dominantes negativas de CK1α permitían la importación nuclear de NFAT4 en ausencia de calcineurina. Las evidencias presentadas en este trabajo sugieren que la fosforilación de NF-AT4 por CK1α ocurre principalmente en el dominio Z y que el dominio A actuaría como secuencia de reconocimiento o anclaje ("docking site") más que como sustrato (Zhu y col., 1998) (Esquema 3).

7. REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE CK1

La CK1 se encuentra ampliamente distribuida en todos los tipos y compartimientos celulares estudiados. Si a este antecedente sumamos la simpleza de la secuencia de consenso fosforilada por la enzima y el hecho de que la CK1 parece ser, en muchos casos, una enzima constitutivamente activa e independiente de los segundos mensajeros clásicos, sus diferentes isoformas deben estar, por consiguiente, sujetas a estrictos mecanismos de regulación.

Una instancia de regulación viene precisamente de la naturaleza de su secuencia de consenso, la que dictamina el requerimiento de la fosforilación previa del sustrato por otra quinasa, la cual puede, a su vez, estar sometida a mecanismos regulatorios propios, como segundos mensajeros. Un ejemplo de ello es la glicógeno sintetasa, la que, al ser fosforilada por quinasa dependiente



Esquema 3. *Mecanismo de regulación de CK1 sobre la importación nuclear de NFAT4.* CK1 reconocería la secuencia del dominio A del factor y se anclaría a esta, en un evento de tipo "docking" y posteriormente la enzima fosforilaría al dominio Z. Este dominio, así modificado, enmascararía a la señal de localización nuclear, impidiendo de esta manera el ingreso del factor de transcripción al núcleo (Zhu y col., 1998).

de cAMP (PKA), se convierte en un excelente sustrato para la CK1, que la fosforila *in vivo* (Flotow y Roach, 1989). Otro caso es el de p53, que, en respuesta a daño genético, es fosforilado en la serina 18, de una manera dependiente de la fosforilación previa de la serina 15 (Flotow y Roach, 1989).

Al menos dos isoformas de CK1, δ y ε, son reguladas mediante autofosforilación. Estas isoformas son muy similares en secuencia entre sí y comparten la característica de poseer un dominio C-terminal de 124 residuos aminoacídicos, considerablemente más largo que CK1α (Rowles y col., 1991; Fish y col, 1995). Ambas isoformas se autofosforilan en una serie de residuos de estas extensiones C-terminales, inhibiendo, de esta manera, su propia actividad (Graves y Roach, 1995; Cegielska y col.,1998). La región fosforilada aparentemente interactúa con el sitio S2, que se encuentra en proximidad con el sitio activo de la enzima y, de esta manera, inhibe la capacidad de unir sustrato (Xu y col., 1995; Longenecker y col., 1996). Esta inhibición es revertida, *in vitro*, por tratamiento con fosfatasas, heparina y remoción del dominio C-terminal por proteólisis (Graves y Roach, 1995; Cegielska y col., 1998). En células vivas, estas isoformas de CK1 son mantenidas en estado activo por la acción de proteína fosfatasas celulares. El tratamiento de células con inhibidores de fosfatasas, como ácido okadaico y caliculina A, provocan un rápido aumento en la autofosforilación de CK1δ y ε y, por consiguiente, en su autoinhibición (Rivers y col., 1998). En *Drosophila*, una isoforma de CK1 que fue identificada como el homólogo a CK1α de vertebrados, también es regulada

negativamente por fosforilación (Santos y col., 1996). Esta enzima, denominada dmCK1α, se expresa solamente en embriones tempranos y hembras adultas, donde permanece en el citoplasma en un estado fosforilado inactivo. La irradiación γ de los embriones provoca la migración de la proteína al núcleo, junto con la desfosforilación y consiguiente activación.

CK1α también se encuentra bajo la regulación por el fosfolípido fosfatidilinositol-4,5-*bis*fosfato (PIP_2), el cual inhibe la actividad de CK1α al estar presente en membranas nativas (Brockman y Anderson, 1991). Este fosfolípido parece además modular la asociación de CK1 a la cara interna de la membrana celular (Brockman y Anderson, 1991; Gross y col., 1995), en una instancia de regulación por compartimentalización.

El procesamiento alternativo que sufren algunas isoformas de CK1 también podría constituir un mecansimo regulatorio, de manera que la expresión de cada subisoforma dependa del la vía que siga el procesamiento de cada mensajero original. Otro tipo de regulación que ocurre a nivel de mensajeros se ha observado en el caso de los mRNAs de CK1α, para la cual existen dos transcritos en humano y en bovino, al menos (Rowles y col., 1991; Yong y col., 2000), generados por la presencia de dos señales de poliadenilación. La estabilidad del transcrito más largo se encuentra sujeta a la regulación por la presencia de múltiples elementos desestabilizantes de mRNA, correspondientes a elementos ricos en AU (AREs) en la región 3' no traducida (Yong y col., 2000).

Por último, un estudio reciente demuestra que CK1 es regulada en neuronas neostriatales por receptores de glutamato metabotrópicos (Liu y col., 2001). Un agonista de estos receptores, la (S)-3,5-dihidroxifenilglicina (DHPG), provoca un aumento de actividad de CK1 y de la quinasa dependiente de ciclinas 5 (cdk5) en estas células y la activación de esta última depende de la actividad de CK1.

8. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE CK1

Diferentes isoformas de CK1 se han encontrado en una diversidad de compartimientos celulares. La localización de cada isoforma a lugares específicos dentro de la célula es una manera de regular el acceso de ellas a sus sustratos fisiológicamente definidos. Dos ejemplos de localización subcelular específica han sido aludidos en la sección anterior, la migración de dmCK1α al núcleo gatillada por daño genético (Santos y col., 1996) y la asociación de CK1α a la membrana plasmática, mediada por PIP2 (Brockman y Anderson, 1991; Gross y col., 1995). Además de estas, existe una gran gama de evidencias que describen la asociación de diferentes isoformas de CK1 a diversos componentes celulares.

En levaduras, las isoformas YCK1, YCK2, YCK3, CKi1 y CKi2 se encuentran unidas covalentemente a la membrana plasmática mediante isoprenilación (Wang y col., 1992; Vancura y col., 1994; Wang y col., 1996). La isoforma HRR25 de *S. cerevisiae* se localiza en el núcleo, donde cumple sus

funciones asociadas a reparación de DNA (Ho y col., 1997). Sin embargo, al adicionar un sitio de isoprenilación a esta isoforma, esta se localiza en la membrana celular y es capaz de compensar una mutación nula de YCK1 e YCK2. Por otro lado, la adición de la señal de localización nuclear de HRR25 a YCK2 y la remoción de su sitio de isoprenilación confiere a esta isoforma la capacidad de complementar una mutación nula de HRR25 (Wang y col., 1996). Estas evidencias, tomando en cuenta además la alta homología que guardan todas las isoformas de CK1 entre sus dominios catalíticos, reflejan la importancia de las secuencias que flanquean a dicho dominio en la función y localización de estas isoformas.

Utilizando anticuerpos específicos, se observó que la localización de CK1α varía a lo largo del ciclo celular, encontrándose asociada al centrosoma y estructuras vesiculares citosólicas en células CHO y fibroblastos de ratón en interfase. Durante la mitosis, sin embargo, la enzima se observa localizada en el huso mitótico (Brockman y col., 1992). Esta isoforma se asocia además, en células LLCPK de riñón de porcino, a un grupo de vesículas citosólicas específicas, que poseen marcadores de retículo endoplásmico y de Golgi. En células neuronales, CK1α se asocia con vesículas sinápticas pequeñas y puede fosforilar un grupo de proteínas asociadas a estas vesículas (Gross y col., 1995) En células normales de riñón de rata, CK1α exhibe una localización generalizada y más acentuada en el núcleo, donde se encuentra asociada a estructuras discretas ("nuclear speckles"). En estas regiones CK1α colocaliza

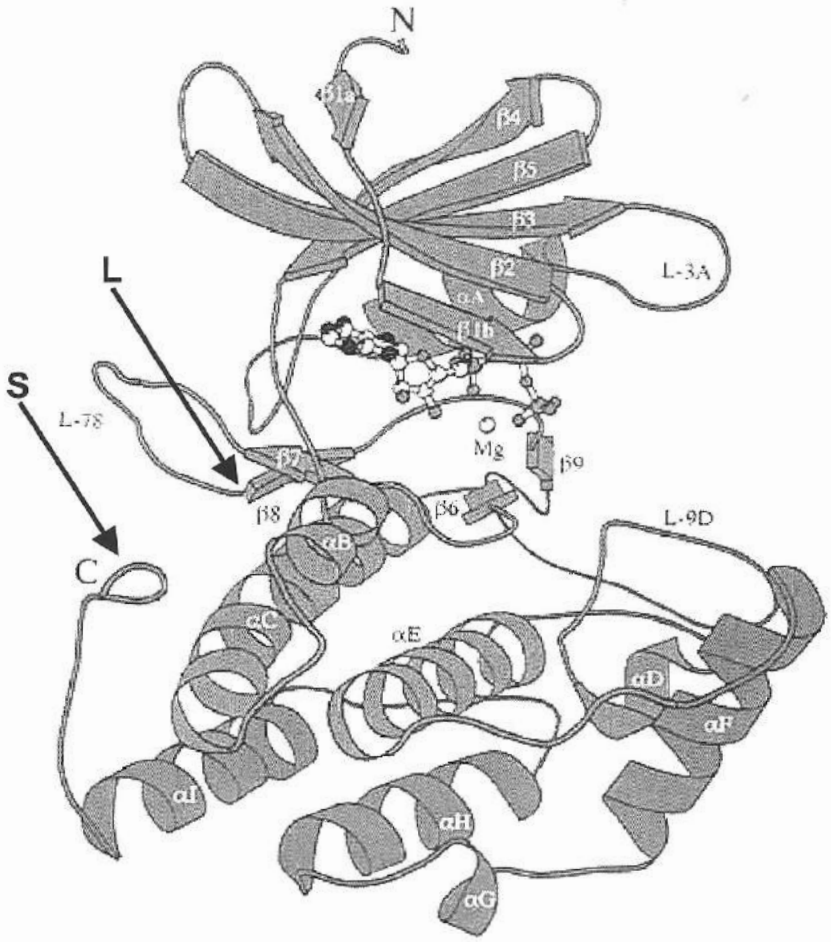
con factores de procesamiento de pre-mRNA. Específicamente, la enzima se asocia con algunas proteínas SR y es capaz de fosforilarlas *in vitro* (Gross y col., 1999).

Un trabajo reciente ha logrado localizar CK1δ en el trans-Golgi y en partículas granulares asociadas a microtúbulos en células en interfase. Durante la mitosis, esta isoforma es reclutada al huso mitótico y al centrosoma en células que han sido expuestas a agentes que producen daño genético. Se determinó que la afinidad de la enzima por diferentes isoformas de tubulina aumenta también bajo estas circunstancias (Behrend y col., 2000a). En células Cos-7 y en fibroblastos de ratón Balb-c 3T3, CK1δ muestra una localización total y parcialmente nuclear, respectivamente. Sin embargo, la privación de suero bovino fetal provoca una exclusión del núcleo en el último tipo celular (Pulgar, 1999). Un informe más reciente establece que la localización de CK1δ es predominantemente citosólica, enriquecida específicamente en el complejo de Golgi y en vesículas de transporte entre el retículo endoplásmico y el Golgi. La actividad enzimática, empero, es esencial para esta localización, puesto que dos mutantes inactivas de CK1δ exhiben localización casi exclusivamente nuclear (Pulgar, 1999, Milne y col., 2001).

La compartimentalización de las diferentes isoformas de CK1 sería un importante mecanismo que regula el acceso de ellas a los diferentes sustratos que, de otra manera, podrían ser fosforilados por cualquier isoforma indistintamente.

9. ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LA PROTEÍNAQUINASA CK1

Hasta la fecha se ha logrado la cristalización de dos isoformas de CK1. El primer trabajo publicado al respecto informó de la obtención de la estructura tridimensional de una variante trunca de CKi1 (CKi1Δ298), en un complejo con MgATP, mediante cristalografía de rayos X a una resolución de 2,0 Å (Esquema 4) (Xu y col., 1995). El modelo obtenido se asemeja a la conformación cerrada que adoptan la quinasa 2 dependiente de ciclina (cdk2) y la proteínaquinasa dependiente de cAMP (PKA), con las diferencias correspondientes en dominios superficiales que confieren las características propias de cada enzima. El dominio catalítico de CK1 posee 9 hélices α y 9 hebras plegadas β. Está organizado en dos lóbulos, uno N-terminal compuesto principalmente de hebras β plegadas antiparalelas, en formación de barril. El dominio C-terminal es de mayor tamaño y está conformado fundamentalmente por hélices α. Ambos lóbulos se encuentran conectados por una "bisagra", formada por el loop L-5B, que le confiere cierta flexibilidad a la enzima. Esta bisagra esta conformada por la secuencia LLGPSLEDL, que es una de las secuencias identificatorias de la familia de las CK1 y se encuentra absolutamente conservada entre todos sus miembros. Entre los dos lóbulos existe un bolsillo que contiene el sitio de unión de MgATP. El modelo también tiene asociado un ión sulfato dentro del lóbulo C-terminal, que determina el sitio de interacción de la enzima con el residuo aminoacídico fosforilado presente en un polipéptido sustrato (sitio S1). Un segundo sitio, denominado S2, representaría la localización de un sitio de



Esquema 4. *Estructura tridimensional de Cki1 de S. pombe a 2,0 □ de resolución.* Se observa la estructura bilobular típica de las proteínaquinasas, con un dominio N-terminal formado principalmente por hebras plegadas β y un dominio C-terminal conformado fundamentalmente por hélices α. Ambos dominios se encuentran conectados mediante una región bisagra y el complejo de MgATP se aloja en la hendidura existente entre ambos lóbulos. Se indica la posición de los elementos de estructura secundaria, las hojas β (β1-β9), las hélices a (αA-αI) y las vueltas o "loops" (L-3A, L-78 y L-9D). Las flechas negras muestran los sitios donde se ubican los insertos L y S, respectivamente. Reproducido de Xu y col., 1995.

autofosforilación de la enzima. Otro sitio susceptible de ser fosforilado es un resíduo de treonina que se encuentran en el loop L-9D, equivalente al loop de activación de otras proteínaquinasas. El loop de activación actúa regulando la accesibilidad al sitio de unión de sustrato, mientras que en CK1 este permanece en una conformación abierta, dejando al sitio activo libre para la entrada de sustrato (Xu y col., 1995). La otra isoforma de CK1 que fue cristalizada es CK1δ de rata, cuya estructura tridimensional fue resuelta a 2,3 Å, mediante reemplazo molecular usando la estructura publicada de CKi1. Esta isoforma también se encontraba trunca en su extremo C-terminal (CK1δΔ317), careciendo de la región autoinhibitoria y fue cristalizada en ausencia de MgATP y en presencia de tungstato (Longenecker y col., 1996). La estructura obtenida, al igual que CKi1, estaba compuesta de 9 hélices α y 9 hebras β plegadas y mostraba esencialmente la misma topología. La presencia de un ión tungstato en el sitio S1 confirmó la existencia de un sitio de unión de aniones que determinaría la especificidad de sustrato de la CK1. La comparación de ambas estructuras demuestra la ocurrencia de una rotación de 15º del dominio N-terminal con respecto al C-terminal, en concomitancia con la unión de MgATP. La flexibilidad de la bisagra también se vio reflejada por la reciente cocristalización de CKi1Δ298 y el inhibidor específico IC261. Esta estructura reveló una rotación a la mitad del camino entre las conformaciones de CK1 unidas y no unidas a ATP (Mashhoon y col., 2000). El loop L-9D, mencionado anteriormente, junto con el loop L-EF, participarían en el reconocimiento de sustrato. En ambas estructuras

el loop L-EF aparece sin una estructura definida y L-9D exhibe diferencias en su topología. Esto podría reflejar una flexibilidad inherente a estas regiones y, de ser así, podría ser esencial en el mecanismo de reconocimiento de sustrato. Por un lado, los residuos presentes en estos loops podrían ser capaces de adoptar una conformación complementaria al sustrato, o bien, los residuos básicos podrían cumplir un papel en el reconocimiento de sustratos no fosforilados, cuya fosforilación está dirigida por aminoácidos acídicos. El loop L-EF está conformado en parte por la secuencia LPWQGLKA, la cual constituye otra de las señales características de la familia CK1. Dentro de este loop se encuentra además una putativa secuencia de localización nuclear, TKKQKY, la que está bastante conservada entre todas la isoformas de CK1 conocidas (Graves y col., 1993; Hoekstra y col., 1991). En la estructura de CK1δΔ317 también se observó un sitio secundario de unión de un ión tungstato, el cual se encontraba en una posición análoga al sitio S2 de CKi1Δ298, pero los antecedentes que existen hacen pensar más bien que se trata de un sitio de unión de un fosfato autoinhibitorio del extremo C-terminal de CK1δ (Graves y Roach, 1995). Más recientemente se logró la cristalización de la CK1δ completa (Longenecker y col., 1998). En el modelo fue imposible resolver una estructura definida para la región C-terminal autoinhibitoria, pero se obtuvo evidencia que sugiere que este segmento podría participar en una posible dimerización, que podría constituir una instancia de regulación.

10. PROCESAMIENTO ALTERNATIVO DE MENSAJEROS DE CK1

Además de las siete isoformas en vertebrados de CK1 provenientes de genes distintos, se ha determinado la existencia de variantes de procesamiento de tres de estas isoformas. Un caso de estos es el de CK1γ3, cuyo mensajero es sometido a procesamiento alternativo dentro de su región C-terminal (Zhai y col., 1995). No existen estudios respecto de las consecuencias de este inserto.

Una publicación reciente, por otro lado, informa sobre la identificación de dos tipos de cDNA provenientes del gen de CK1γ1 (Kusuda y col., 2000). Uno de ellos codifica para una proteína de 393 aminoácidos (hCK1γ1S), altamente homóloga a la descrita anteriormente en rata (Zhai y col., 1995). El polipéptido codificado por el otro cDNA, hCK1γ1L, posee 422 aminoácidos y es idéntico a hCK1γ1S en el dominio quinasa, pero hCK1γ1L posee una secuencia de 50 residuos aminoacídicos adicionales en el extremo C-terminal, que es compartido por las isoformas γ2 y γ3. La forma más corta se encuentra predominantemente en el testículo, mientras que hCK1γ1L muestra una abundancia similar en diversos tejidos (Kusuda y col, 2000).

En 1991, Rowles y col. describieron en cerebro de bovino la existencia de un cDNA que codificaba para una isoforma de CK1α que poseía una fragmento adicional de 28 aminoácidos en el dominio catalítico. Esta subisoforma, generada por procesamiento alternativo, fue llamada CK1αL. La coexistencia de ambas subisoformas fue corroborada en rata, donde la secuencia L ("long") mostraba un 96% de identidad de secuencia con el de

bovino (Zhang y col., 1996). Mediante el clonamiento de las subisoformas de CK1α de pollo, se demostró la ocurrencia de procesamiento alternativo con otro exón, que codifica para una secuencia de 12 residuos aminoacídicos ubicados en el extremo C-terminal de la enzima, dos residuos antes del final. Este inserto se ha denominado S ("short"). De esta manera, la isoforma α de CK1 constituye una subfamilia de al menos cuatro miembros, denominados CK1α, CK1αS, CK1αL y CK1αLS, según la presencia o ausencia de uno o ambos insertos (Green y Bennet, 1998). El análisis de Southern sobre DNA genómico de pollo sugiere fuertemente la existencia de un alelo único de CK1α, del cual provendrían las cuatro subisoformas (Green y Bennet, 1998).

Las cuatro subisoformas de CK1α se han encontrado expresadas en forma simultánea en diferentes tejidos y tipos celulares (Zhang y col., 1996; Green y Bennet, 1998).

El inserto L constituye un caso especial dentro de las proteínaquinasas, puesto que este se ubicaría en medio del dominio catalítico de la enzima, específicamente en la región adyacente a la bisagra que une ambos lóbulos (ver Esquema 4). Aunque no se conoce la estructura espacial que adquiriría este segmento dentro de la proteína, lo cierto es que esta región se encuentra muy próxima al bolsillo que ocupa el ATP, situación que podría modificar el comportamiento catalítico de la enzima hacia uno o más sustratos. En concordancia con esto, la isoforma αL de rata exhibía algunas diferencias catalíticas con respecto a la enzima que carece del inserto (Zhang y col., 1996).

Por un lado, la isoforma más larga poseía una mayor actividad específica hacia la mayor parte de los sustratos ensayados, como caseína, antígeno T grande de SV40, fosvitina y espectrina. Sólo con glicógeno sintetasa esta isoforma mostraba una actividad específica levemente menor. Los estudios de la afinidad de las enzimas por diferentes sustratos dieron resultados disímiles, mostrando la CK1αL una Km 10 veces mayor para fosvitina y el doble para glicógeno sintetasa, pero el valor de esta constante era 8 veces menor que la de CK1α para espectrina (Zhang y col., 1996). El inserto S, por otro lado, tiene su sitio de ubicación por una región externa de la enzima (Esquema 4), que no se encuentra en proximidad alguna con los sitios de unión de ATP o de sustrato proteico, lo cual hace pensar en la poca probabilidad de que esta secuencia afecte a la catálisis. La presencia de este inserto podría más bien estar relacionado con localización, especificidad o asociación con otros componentes celulares.

Esta Tesis ha sido enfocada al estudio de las características de las cuatro variantes de procesamiento de CK1α identificadas en pez cebra (*Danio rerio*).

11. EL PEZ CEBRA COMO MODELO ANIMAL

El pez cebra, como modelo experimental, es un organismo muy adecuado para el estudio de la embriogénesis, puesto que este proceso es externo y se desarrolla normalmente en el laboratorio, a 28 °C. Además, el

embrión es muy transparente, lo que facilita la visualización de los tejidos en desarrollo y el proceso se completa en pocos días (Westerfield, 1995). Este organismo ha sido estudiado ampliamente en laboratorios de todo el mundo, por lo que existe una gran cantidad de información al respecto, lo cual incluye la secuenciación del genoma de este pez, cuyo progreso se encuentra en curso.

En la presente Tesis se caracterizaron las variantes de procesamiento de CK1α clonadas desde una biblioteca de embrión de pez cebra. Esto abre la posibilidad de utilizar estas secuencias en estudios posteriores de las variantes de procesamiento de CK1α en el desarrollo embrionario de esta especie animal.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Se ha visto hasta ahora que existen en eucariontes una serie de isoformas de la proteínaquinasa CK1, que parecen cumplir papeles determinados en una gran variedad de procesos celulares. En vertebrados, particularmente, se han identificado siete isoformas genéticamente distintas. Tres de estas han demostrado estar conformadas por una subfamilia de variantes generadas por procesamiento alternativo de mensajeros. En el caso específico de CK1α, se encuentran al menos 4 variantes de procesamiento que se diferencian por la presencia o ausencia de dos secuencias llamadas inserto L e inserto S. La ocurrencia de esta variabilidad dentro de una isoforma de la enzima ha de tener un significado fisiológico. De especial interés resulta el inserto L, que se encuentra ubicado en el medio del dominio catalítico de la quinasa, constituyendo así un caso único dentro de la gran familia de las proteínaquinasas que han sido descritas hasta ahora. Surge espontáneamente así la interrogante de si la presencia de uno o ambos de estos insertos influye sobre el comportamiento de la enzima, ya sea en términos de catálisis, especificidad, localización subcelular o estabilidad. También es posible que, si cada variante cumple un papel específico, su expresión se encontraría diferencialmente regulada, por ejemplo, en tejidos específicos a cada una o

durante el proceso de desarrollo embrionario. En base a estos antecedentes, se planteó la siguiente hipótesis de trabajo:

La presencia del inserto S o del inserto L o de ambos, influye en las características bioquímicas y/o celulares de CK1α.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para explorar la hipótesis planteada, se proponen los siguientes objetivos específicos:

1.- Clonar las 4 variantes de procesamiento alternativo de CK1α de pez cebra (*Danio rerio*).

2.- Caracterizar bioquímicamente las variantes de CK1α *in vitro*.

3.- Realizar una caracterización celular de las variantes en células en cultivo.

4.- Estudiar los niveles de expresión de CK1α en el desarrollo embrionario de pez cebra.

MATERIALES Y METODOS

A. REACTIVOS Y ANIMALES DE EXPERIMENTACION

1. Enzimas y Reactivos de Biología Molecular:

Las sales, acidos, bases, detergentes, solventes y otros reactivos comunes utilizados eran de grado analítico o para biología molecular y fueron adquiridos de Sigma Chemical Co., Merck Química Chilena, Fluka y Winkler. Las enzimas de restricción, *Taq* DNA polimerasa, *pfu* DNA polimerasa, T4 polinucleótido quinasa, fosfatasa de intestino de ternera (CIAP), además de los sistemas de purificación de DNA Wizard Plus minipreps, midipreps y maxipreps Purification System fueron obtenidos de Promega. La T4 DNA ligasa era de USB o de Roche. La agarosa, desoxirribonucleasa I (DNasa I), proteinasa K, *p*-formaldehído, formaldehído, azul de bromofenol, xilencianol, poli(Glu^{80}:Tyr^{20}), polioxietilensorbitan monolaurato (Tween-20), Tritón X-100, β-caseína no desfosforilada, α-caseína desfosforilada, membranas de PVDF (Immobilon), ampicilina, los inhibidores de proteasa leupeptina, aprotinina, pepstatina, antipaína y PMSF, la albúmina de suero de bovino (BSA) y la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA, subunidad catalítica) fueron adquiridos de Sigma. El azul de Coomasie R-250 provenía de Winkler. Los reactivos para medios de cultivo bacteriológico, triptona, extracto de levadura y agar eran de DIFCO o de

GIBCO BRL Life Technologies. Las placas Petri desechables para cultivo de bacterias y bacteriófagos eran de Falcon o Nunc. La NZ amina, la acrilamida y bis-acrilamida, el bromuro de etidio, los estándares de escalera de DNA de 100 y 500 pb, el sistema de secuenciación de DNA dsDNA Cycle Sequencing System, los estándares preteñidos de proteínas y los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), provenían de GIBCO BRL Life Technologies. El sistema BCA Protein Assay Kit era de Pierce. El tampón de reacción de fosfatasa alcalina para Western blot (25X) y los sustratos nitroblue tetrazolio (NBT) y bromo-cloro-indolilfosfato (BCIP) eran de Bio Rad. La lisozima era de Eurobio y el isopropiltiogalactósido (IPTG) provenía de Winkler. Las membranas de nitrocelulosa eran de Schleicher & Schuell. El papel Whatman 3, Whatman 1 y fosfocelulosa (P81) eran de Whatman. Las películas autorradiográficas XOMAT y BIOMAX se adquirieron de Kodak y los reactivos de revelado y fijado fotográfico se obtuvieron de Kodak o Agfa. El nitrógeno líquido se obtuvo de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Chile. Los nucleótidos marcados radioactivamente, [α-^{32}P]dATP (10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol), [α-^{32}P]dCTP (10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol) y [γ-^{32}P]ATP (150 mCi/ml, 6000 Ci/mmol) eran de New England Nuclear. La genoteca de cDNA utilizada era obtenida de embriones de pez cebra (*Danio rerio*) de 24-48 horas y producida en el bacteriófago Lambda ZAP (Stratagene). El sistema de excisión *in vivo* Rapid Excision Kit también era de Stratagene. La resina Ni^{++}-NTA-Agarosa era de Qiagen. El kit de síntesis *in*

vitro de sondas de cRNA marcadas con digoxigenina-11-UTP era de Roche (Ex-Boehringer-Mannheim).

2. Oligonucleótidos:

Todos los oligonucleótidos utilizados fueron sintetizados en el Centro de Síntesis y Análisis de Biomoléculas OLIGOPEPTIDO, en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Las secuencias de estos oligonucleótidos se detallan a continuación:

CK1N	5' - AAAAAACATATGGCGAGTAGC - 3'
CK1K46A	5' - CTGTGATTCCAGCGCTACGGCTACTTCC - 3'
CKI13	5' - CGTCACTGTAATAAGTT - 3'
3.2-1	5' - GAAGAGAAAGCAGCGAC - 3'
zCK1(147-163)	5' - AGCCGAGTTTATAGTC - 3'
zCK1(336-351)	5' - TCGGGATCCCACACATC - 3'
zCK1(820-836)	5' - TATGAGAAGATTAGTGAG - 3'
zCK1α1086	5' - GCAACAGGCACAAACC - 3'
zCK1α1286	5' - ATAGATAAGATGCTCCG - 3'
zCK1α1561	5' - CCTTGTCATCGTCACAG - 3'
αL5'	5' - GCCGTCACTGTAATAAG - 3'
DPSFSG	5' - GACCCATCTTTCTCAGGA - 3'
αL3'	5' - GACCAAAATCGATAAGGA - 3'

zCK1αAS	5' - TCTTAATGCTTAGAAACCTGTGGGGG - 3'
zCK1α12AS	5' - CATGTTACTCTTGGGTTTGTCAGTTTG - 3'
zCK1αRT3'	5' - TGGTGAATTTGATCCTAG - 3'
5'Eco	5' - AAAAAAGAATTCATGGCCAGCAGCAGTG - 3'
3'Eco	5' - AAAAAAGAATTCGTCTTAATGCTTAGAAACC - 3'

Los oligonucleótidos que se utilizaron para secuenciar los clones de CK1α eran del 3.2-1 al zCK1α1561.

3. Péptidos:

Los péptidos RRKDLHDDEEDEAMSITA, RRREEEYEEEE y EEEEYFVFGRRK fueron sintetizadas en OLIGOPEPTIDO. Los péptidos derivados de NFAT4 se sintetizaron en el Dipartamento di Chimica Biologica en la Universidad de Padua, Padua, Italia.

4. Reactivos y Materiales para el Cultivo de Células:

El medio de cultivo de Eagle, modificado por Dulbecco (DMEM) y el medio DMEM sin L-metionina ni L-cisteína, fueron adquiridos de Sigma. El suero fetal de bovino y la mezcla de antibióticos estreptomicina/penicilina con L-glutamina provenía de GIBCO BRL Life Technologies. El reactivo de transfección FuGene® era de Roche. El medio de montaje para fluoresecencia era de DAKO. Los filtros de 47 mm y 0,2 μm Supor-200 fueron adquiridos de

Gelman Sciences y los aparatos de filtración desechables y autoclavables eran de Nalgene. El material de plástico utilizado para cultivo era de Falcon o Nunc. La mezcla de marcación de células Easytag^{TM} EXPRE^{35}S^{35}S Protein Labeling Mix [^{35}S]- era de New England Nuclear. La L-cisteína era de Merck y la L-metionina era de Calbiochem.

5. Anticuerpos.

El anticuerpo monoclonal de ratón específico contra el epítopo de 6 residuos de histidina (anti-His) era de Calbiochem o de Upstate Biotechnology. Los anticuerpos contra el epítopo de hemoaglutinina (anti-HA), tanto el monoclonal (de ratón) como el policlonal (de conejo) eran de Santa Cruz Biotechnology. El anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) era de DAKO. Los anticuerpos anti-IgG de ratón, producido en conejo y conjugado a fosfatasa alcalina y anti-IgG de ratón producido en conejo y conjugado a peroxidasa fueron obtenidos de Promega y Sigma, respectivamente. Los anticuerpos anti-IgG de conejo producido en cabra y conjugado ya sea a fosfatasa alcalina o a peroxidasa, eran de Promega.

6. Animales de experimentación:

Los ejemplares de pez cebra (*Danio rerio*) adulto fueron adquiridos en el comercio y los embriones de pez cebra fueron gentilmente cedidos por el Dr. Miguel Allende C. de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

B. METODOS

Toda la metodología que involucraba purificación, análisis de restricción y clonamiento de DNA y electroforesis en geles de agarosa y de poliacrilamida fue realizada según los procedimentos descritos por Sambrook y col., 1989.

1. Clonamiento de CK1α de Pez cebra:

1.1. Síntesis de sonda de CK1α de *X. laevis*:

Las sondas marcadas radioactivamente para el rastreo de la genoteca de pez cebra fueron sintetizadas mediante. La mezcla de reacción contenía, en un volumen total de 100 μl, 10 mM Tris-HCl pH 9,0, 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 200 μM dGTP y dTTP, 1 μM de cada uno de los partidores, CK1N y CK1K46A, 0,67 μM [α-^{32}P]dATP, 0,67 μM [α-^{32}P]dCTP (3000 Ci/mmol), 1 ng DNA pGEX-2T-GSTCK1α y 2 U *Taq* DNA polimerasa. El PCR se llevó a cabo según el siguiente programa: 5 min a 95 °C, 25 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 52 °C y 1 min a 72 °C, finalizando con 10 min a 72°C. Finalmente, la sonda fue purificada mediante precipitación etanólica: se agregó 1/10 volumen de acetato de sodio 3M, pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol, luego de lo cual la sonda fue precipitada a -70°C durante 30 minutos y posteriormente centrifugada en microfuga (eppendorf) a 12000 rpm durante 15 minutos. Luego de eliminar el sobrenadante, el sedimento fue lavado con etanol al 70% y recentrifugado de la misma forma. El sedimento resultante fue secado al aire y resuspendido en tampón TE (Tris-HCl 10 mM, pH 7,0, EDTA 1 mM).

1.2. Rastreo de la Genoteca de cDNA de Pez Cebra en λZAP:

En 5 placas petri de 150 mm con agar LB, se sembró aproximadamente 400.000 pfu de bacteriófagos λZAP de la genoteca de pez cebra. Para estos efectos, se mezcló, para cada placa, 80.000 pfu con 200 μl de una suspensión de *E. coli* NM538 (cultivadas en medio LB + 0,2% maltosa durante toda la noche a 37ºC y posteriormente centrifugadas y resuspendidas en 10 mM $MgSO_4$). Esta suspensión fue incubada a 37ºC por 20 min, luego de lo cual se combinó con 7 ml de top-agarosa (LB + 0,7% agarosa), fundida y equilibrada a 45 ºC. La mezcla se vertió sobre una placa de petri de 150 mm con agar LB. Después de dejar gelificar la top-agarosa, las placas fueron incubadas durante 16-20 horas a 37ºC en posición invertida.

Después de la incubación, las placas fueron enfriadas a 4ºC y luego se procedió a realizar réplicas de las placas de lisis en membranas de nylon. Para ello se hicieron discos de 140 mm de diámetro de nylon, las que fueron colocadas sobre la superficie de cultivo de cada placa. Luego de marcar los filtros y las placas para su posterior alineación, los filtros fueron retirados y el proceso se repitió con nuevos filtros. Las réplicas, así obtenidas, fueron tratadas por 5 min con solución de denaturación (0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl) y luego por 5 min, también, con solución de neutralización (0,5 M Tris-HCl pH 7,4, 1,5 M NaCl). Las membranas fueron finalmente lavadas en 2X SSC (1X SSC = X M citrato de sodio, pH 7,0, 150 mM NaCl), secadas al aire y el DNA fue fijado a 120 ºC durante 20 min. La prehibridación de los filtros fue llevada a cabo en

solución de hibridación [6X SSC + 0,05 X BLOTTO (1X BLOTTO = 5% leche descremada, 0,02% azida de sodio)] a 50ºC durante 4 - 16 horas. Luego se agregó al medio la sonda marcada con ^{32}P, descrita en la sección 1.1, en una concentración de 0,1 - 1 ng/ml y con una actividad final de 1 - 3 x 10^6 cpm/ml. La hibridación transcurrió a 50ºC durante 24 - 72 horas, luego de lo cual los filtros se lavaron 2 veces en 2X SSC + 0,1 % SDS, durante 30 minutos, a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron dos lavados en 1X SSC + 0,1% SDS por 30 min a 55ºC, luego de lo cual los filtros fueron envueltos en film plástico y expuestos a película autorradiográfica Kodak BIOMAX durante 1 - 5 días a -70ºC.

Luego de revelar, las señales positivas que se repetían en ambos duplicados fueron alineadas con sus respectivas placas y se retiró un tapón de medio de cultivo correspondiente a cada clon positivo. Estos tapones se dejaron cada uno en 500 μl tampón SM (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 8 mM $MgSO_4$, 0,01% gelatina) y se dejaron eluir las partículas virales en este medio a 4 ºC durante 16 - 20 h. Cada clon positivo obtenido de esta manera fue sometido a un rastreo secundario y terciario, con objeto de obtenerlos puros.

1.3. Excisión *in vivo* de clones de λZAP:

Cada clon de λZAP obtenido del rastreo de la genoteca fue sometido a una excisión *in vivo*, con objeto de obtener los cDNAs clonados directamente en

el vector pBluescript. Para estos efectos se utilizó el sistema Rapid Excision Kit de Stratagene, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. En primer lugar, se combinó 100 μl de suspensión de células *E. coli* XPORT (DO_{600nm} = 1,0) con 10 μl de una suspensión de fago "helper" 704 (10^8 pfu/ml), incluído en el kit, 1 μl de la suspensión de fago λZAP (10-1000 pfu) del clon de interés y 10 μl de una suspensión de células *E. coli* XLOLR (DO_{600nm} = 1,0). A esta mezcla se le agregó 3-5 ml de NZY top agar (0,7% agar en medio NZY, 10 g/l NZ amina, 5 g/l NaCl y 5 g/l extracto de levadura) y se vertió todo sobre una placa de agar NZY (1,5% agar en medio NZY) de 90 mm. Se incubó durante 16-20 horas a 37ºC. Al otro día, se tocó una placa de lisis con un mondadiente estéril, con el cual se inoculó 3 ml de medio LB con 25 μg/ml tetraciclina y 100 μg/ml ampicilina y se cultivó durante la noche a 37ºC con agitación. De este cultivo se purificó el DNA plasmidial con el Wizard Plus Minipreps DNA Purification System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2. Secuenciación directa de DNA por la técnica de PCR:

El DNA fue secuenciado con el uso del kit ds DNA Cycle Sequencing System (GIBCO BRL Life Technologies), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Esta técnica se basa en el método de Sanger (1977) y consiste en someter el DNA a una serie de ciclos de desnaturación, hibridación con un partidor marcado con [γ-^{32}P]ATP en el extremo 5' y extensión en presencia de dideoxinucleótidos.

2.1. Marcación del partidor:

En primer lugar, se marcó el partidor en el extremo 5' con ^{32}P, en un medio que contenía 1 pmol de partidor, 60 mM Tris-HCl, pH 7,8, 10 mM MgCl2, 0,2 M KCl, 2 pmoles de [γ-^{32}P]ATP (6000 Ci/mmol, 150 mCi/ml) y 1 U T4 polinucleótidoquinasa. La reacción transcurrió durante 10 min a 37ºC, después de lo cual se inactivó la enzima incubando a 55ºC por 5 min.

2.2. Reacción de secuenciación:

Para cada secuencia, se prepararon cuatro tubos que contenían, en un volumen total de 10 μl, entre 15 y 50 fmoles de DNA, 0,25 pmoles de partidor marcado, 0,6 U de *Taq* DNA polimerasa, 30 mM Tris-HCl, pH 9,0, 5 mM MgCl2, 30 mM KCl, 0,05% W-1, 20 μM dATP, dCTP, dTTP y 7-deaza-dGTP y uno de cada dideoxinucleótido de terminación en la siguiente concentración: 0,4 mM ddATP, 0,2 mM ddCTP, 0,04 mM ddGTP o 0,4 mM ddTTP. Las mezclas se incubaron a 95ºC por 5 min y luego se sometieron a 20 ciclos de 95ºC por 30 s, 55ºC por 30 s y 72ºC por 1 min, seguidos de 10 ciclos de 95ºC por 30 s y 72º por 1 min y finalizando con una extensión de 5 min a 72ºC. Una vez terminado el programa de secuenciación, la reacción se detuvo mediante la adición de 5 μl de una solución que contenía 95% formamida, 10 mM EDTA, pH 8,0, 0,1% azul de bromofenol y 0,1% xilencianol. Las muestras fueron posteriormente analizadas en geles de poliacrilamida al 6% para secuencia.

2.3. Análisis de reacciones de secuencia en geles de poliacrilamida:

Las reacciones de secuencia fueron analizadas en geles de poliacrilamida al 6%, de 40 x 30 x 0,04 cm. El gel contenía 15 ml acrilamida:bisacrilamida (19:1) al 40%, 48 g urea (0,8 M final), 10 ml TBE 10X (0,9 M Tris-borato, 0,02 M EDTA pH 8,0), 0,25 ml persulfato de amonio al 10% y 50 μl Temed, en un volumen total de 100 ml. Las muestras fueron denaturadas a 95ºC por 5 min y enfriadas en hielo. El gel fue precorrido a voltaje constante de 1600-1800 V hasta alcanzar una temperatura de aproximadamente 50ºC, luego de lo cual se cargó 2-5 μl de cada reacción. La electroforesis transcurrió al mismo voltaje hasta que la migración del xilencianol hubo llegado hasta el extremo inferior del gel, en cuyo punto se volvió a cargar las muestras. La electroforesis finalizó al llegar el azul de bromofenol al extremo inferior. El gel fue desmontado, secado y expuesto a película Kodak X-OMAT durante 12-48 horas a -70ºC y posteriormente revelado.

3. Construcción de cDNAs completos para CK1αL y C1αLS y subclonamiento en vectores de expresión.

3.1. Generación de cDNAs completos para CK1αL y CK1αLS: Digestión de clones con *Bgl*II y *Sal*I.

Se digirieron 10 μg de cada uno de los clones 5.2 (CK1α), 5.1 (CK1αS) y 6.3 (CK1αL parcial) con *Bgl*II y *Sal*I durante 2 h a 37ºC. Los fragmentos de digestión fueron separados en un gel de agarosa al 1% y las bandas

correspondientes a los fragmentos deseados fueron eluidas desde la agarosa por centrifugación a 12000 rpm por 5 min en microfuga.

3.2. Ligación del fragmento de 514 pb en clones de CK1α y CK1αS:

El fragmento de 514 pb proveniente del clon de CK1αL, que contenía el exón codificante de la secuencia L, fue ligado en el fragmento de mayor tamaño generado por la digestión de cada uno de los otros clones. Cada mezcla de ligación contenía 67 mM Tris-HCl pH 7,8, 6,7 mM $MgCl_2$, 10 mM ditiotreitol (DTT), 66 μM ATP, 5 ng del fragmento de 514 pb, 40 ng del fragmento grande proveniente de la digestión del DNA de CK1α o de CK1αS y 1 U de T4 DNA ligasa, en un volumen total de 10 μl. La ligación se llevó a cabo durante 16-20 h a 16°C.

3.3. Amplificación de la región codificante de clones de CK1α

La región codificante de cada una de las construcciones resultantes y de los clones de CK1α y CK1αS fue amplificada mediante PCR, con la DNA polimerasa *pfu* (Promega). Para ello, se utilizó el partidor reverso 3'Eco, el cual agrega un sitio para *Eco*RI en el extremo 3' de la secuencia. Como partidor directo se utilizó ya sea el 5'Eco, que confiere un sitio *Eco*RI en el extremo 5', o el CK1N, el cual incorpora un sitio *Nde*I en dicho lugar. Cada mezcla de amplificación contenía 20 mM Tris-HCl, pH 8,8, 10 mM KCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 2 mM $MgSO_4$, 0,1% Triton X-100, 0,1 mg/ml albúmina de suero de bovino

vectores desfosforilados fueron purificados mediante extracción fenólica y precipitación etanólica (Sambrook y col, 1989).

Para el subclonamiento se mezcló 200 ng de inserto digerido con 1 μg de vector digerido y desfosforilado y 3 U T4 DNA ligasa, en tampón ligasa. La ligación se realizó a 16ºC por 16-20 h, luego de lo cual las mezclas de ligación se utilizaron para transformar células de *E.coli* electrocompetentes.

3.5. Obtención de células electrocompetentes:

Se inoculó 50 ml de medio SOB (20 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl) con una colonia de *E. coli* BL21(DE3) o DH5α y se dejó creciendo toda la noche con agitación constante a 37ºC. 5 ml de este cultivo se utilizaron para inocular 100 ml de medio SOB fresco y se crecieron las bacterias hasta una DO a 600 nm de 0,8. Luego de centrifugar el cultivo a 3000 x g durante 20 min a 4ºC, las bacterias fueron resuspendidas en agua estéril y recentrifugadas. Después de repetir este procedimiento una vez más, las células fueron finalmente resuspendidas en 2 ml de 10% glicerol en agua, separadas en alícuotas de 200 μl y almacenadas a -70ºC.

3.6. Electroporación de células de *E. coli*

20 μl de células electrocompetentes fueron combinadas con 1-2 μl de DNA (1-10 ng). La suspensión fue depositada entre los electrodos de una celda de electroporación y fue sometida a un pulso de 2400 V en un aparato Cell

Porator (GIBCO BRL Life Technologies). Después se agregó a la celda 1 ml de medio SOC (SOB + 20 mM MgCl y 0,36% glucosa) y se incubó a 37ºC con agitación suave durante 1 hora. 20-200 μl de este cultivo fueron sembrados en placas de agar LBA, las que fueron cultivadas a 37ºC durante toda la noche.

3.7. Selección de clones bacterianos mediante PCR de colonias:

De las placas sembradas con bacterias transformadas, se seleccionaron colonias al azar, las que fueron analizadas directamente por PCR, utilizando partidores específicos para CK1α de pez cebra, típicamente zCK1(336-351) y αL3'. Luego de analizar los productos de amplificación en geles de agarosa al 1% los clones positivos fueron seleccionados y amplificados por cultivo en medio LBA líquido.

3.8. Purificación de DNA de los plasmidios recombinantes:

Se inoculó 10 ml de LBA con una colonia *de E. coli* DH5α transformada con una de las construcciones de CK1α y se creció durante toda la noche a 37ºC con agitación constante. La suspensión celular se centrifugó a 3000 x g por 20 min a 4ºC y el DNA plasmidial fue purificado desde el sedimento mediante el uso del kit Wizard Plus Midipreps DNA Purification System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA obtenido fue almacenado a -20ºC.

4. Expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* y purificación:

Células de *E. coli* de la cepa BL21(DE3), transformadas con las construcciones de CK1α clonadas en pT7.7H6, fueron cultivadas en 10 ml de medio LBA (LB líquido + 100 μg/ml ampicilina) durante toda la noche a 37ºC con agitación. 4 ml de este cultivo se utilizaron para inocular 2 lt de LBA, los que se crecieron a 37ºC con agitación hasta alcanzar una DO a 600 nm de 0,5-1,0. El cultivo fue enfriado a 15ºC y se le adicionó IPTG a una concentración final de 0,4 mM, luego de lo cual se agitó a 15ºC durante 16-20 horas. La suspensión bacteriana fue centrifugada a 4000 x g por 15 min a 4ºC y el sedimento fue congelado a -70ºC. Luego de descongelar, las células fueron resuspendidas en 40 ml (1/20 del volumen de cultivo) de Tampón A (50 mM Hepes, pH 7,5, 0,5 M NaCl, 1% Tritón X-100, 1 mM PMSF). A la suspensión se le agregó lisozima a una concentración final de 1 mg/ml y se incubó sobre hielo durante 1 hora. La mezcla fue sonicada durante 1 min y se agregó 10 U/ml DNasa I, luego de lo cual se incubó a 37ºC durante 1 hora. Esta suspensión fue posteriormente centrifugada a 30.000 x g durante 30 minutos a 4ºC. El sobrenadante fue combinado con 0,5 ml de resina Ni^{++}-NTA-agarosa (QIAGEN) al 50% y se incubó con agitación suave a 4ºC por 1 hora. La resina se montó en una columna y se colectó la fracción no retenida. Luego la columna fue lavada con 10 ml (40 vol) de Tampón B (50 mM Hepes, pH 7,5, 0,2 M NaCl) y, posteriormente, con 5 ml (20 vol) de Tampón B + 7 mM imidazol. La proteína recombinante fue eluída con 2,5 ml (10 vol) Tampón B + 250 mM imidazol. Las

fracciones con actividad quinasa fueron combinadas y utilizadas en los estudios posteriores.

5. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS:

Entre 20 y 50 μg de proteína total fueron analizados en geles de poliacrilamida-SDS, preparados según el método de Laemmli (1970). El gel separador contenía 10% acrilamida:bisacrilamida (30:1), 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 0,1% persulfato de amonio y 0,075% TEMED. El gel espaciador estaba compuesto de 5% acrilamida:bisacrilamida (30:1), 0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% persulfato de amonio y 0,1% TEMED. Las muestras de proteínas, que contenían tampón de carga 1X (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 100 mM DTT, 2% SDS, 0,1% azul de bromofenol y 10% glicerol), fueron calentadas a 100ºC durante 5 minutos. Luego de cargar las muestras en el gel, la electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de entre 100 y 200 V en tampón de corrida (25 mM Tris, 250 mM glicina pH 8,3 y 0,1% SDS). En algunos casos se varió la concentración de acrilamida:bisacrilamida en el gel separador, según los requerimientos específicos de cada experimento.

6. Análisis de proteínas recombinantes por Western blot:

Para el análisis de Western blot, las proteínas fueron transferidas desde el gel de poliacrilamida a una membrana de PVDF. Después de finalizada la electroforesis, el gel se equilibró en tampón de transferencia (39 mM glicina, 48

mM Tris, 0,037% SDS y 20% metanol) durante 15 min. La membrana fue tratada por 15 segundos con metanol, luego se lavó 2 minutos en agua y finalmente, se equilibró durante 15 min en tampón de transferencia. La transferencia se llevó a cabo a un amperaje constante de 350 mA durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente la membrana fue lavada durante 5 min en tampón TBS (Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl) que contenía 0,05% Tween-20 (TBST) y luego bloqueada en BLOTTO (5% leche descremada en TBST) durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana fue luego incubada con un primer anticuerpo diluído en BLOTTO, durante 1 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4ºC. Después de lavar 3 veces por 5 min en TBST, la membrana se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo diluído también en BLOTTO. Este correspondía a anticuerpo contra IgG de ratón o de conejo, según el primer anticuerpo utilizado, producido en conejo y conjugado ya sea a fosfatasa alcalina. Al final de esta incubación, la membrana se lavó 3 veces en TBST y se procedió al revelado. Para ello, la membrana fue equilibrada en tampón de fosfatasa alcalina durante 5 min a temperatura ambiente, luego de lo cual se agregaron los sustratos NBT y BCIP y se llevó a cabo el revelado a temperatura ambiente durante 30 min-2 h.

7. Determinación de actividad enzimática:

7.1. Detección de fosforilación de serina.

La enzimas fueron ensayadas en condiciones estándar, en una mezcla de reacción que contenía 50 μM [γ-^{32}P]ATP (1000-2000) cpm/pmol y 5 mg/ml β-

caseína en tampón quinasa (50 mM Hepes, pH 7,5, 150 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$) en un volumen total de 30 μl. Se definió la unidad (U) como la cantidad de enzima que es capaz de catalizar la incorporación de 1 pmol de fosfato a β-caseína en un minuto, en condiciones estándar. La reacción fue comenzada con la adición del ATP y transcurrió durante 10 min a 37ºC. La detención de la reacción se logró mediante la adsorción a trozos de 4 cm^2 de papel de fosfocelulosa (P81, Whatman). Los papeles de fosfocelulosa fueron lavados 3 veces en 75 mM H_3PO_4 durante 10-60 min, luego de lo cual se secaron y su radioactividad fue determinada en un contador de centelleo, en presencia de líquido de centelleo.

Para la determinación de constantes cinéticas, se realizaron ensayos en condiciones de velocidad inicial, con concentraciones variables del sustrato correspondiente y los demás componentes en concentración estándar. Las concentraciones fluctuaban entre 0-100 μM para ATP, 0-10 mg/ml para β-caseína no desfosforilada, 0-10 mg/ml para fosvitina y 0-10 mM para péptidos sustrato.

7.2. Fosforilación de tirosina.

Para la fosforilación de tirosina, se llevó a cabo la reacción en tampón quinasa y con 50 μM [γ-^{32}P]ATP (1000-2000 cpm/pmol), en presencia de 20 U de enzima y poli(Glu^{80}:Tyr^{20}) 0,1 mg/ml, en un volúmen total de 25 μl. La reacción fue iniciada con la adición del ATP y detenida, después de diferentes

tiempos de incubación a 37°C, agregando 5 μl tampón de carga de geles de poliacrilamida-SDS 5X. Las muestras fueron analizadas en geles de poliacrilamida-SDS al 10%, los que posteriormente secados y expuestos a película Kodak BIOMAX durante 16-48 horas a -70ºC.

7.3. Autofosforilación.

En un volumen total de 25 μl, se incubaron 20 U de enzima en condiciones estándar, exceptuando la presencia de proteína o péptido sustrato. La autofosforilación se llevó a cabo durante diferentes tiempos a 37ºC, luego de lo cual la reacción se detuvo por la adición de tampón de carga de geles de poliacrilamida-SDS 5X. Las muestras fueron analizados en geles de poliacrilamida al 10%, los que fueron teñidos con azul de Coomasie, desteñidos, secados y expuestos a película Kodak BIOMAX por 1-3 días a -70ºC.

8. Fosforilación de CK1α por PKA.

Para determinar la fosforilación de subisoformas de CK1α por PKA, se incubaron 20 U de cada isoforma con 10 U de PKA, en presencia de 50 mM Hepes, pH 7,5, 100 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$ y 50 μM ATP (5000-7000 cpm/pmol). La reacción fue llevada a cabo durante 1 h a 30ºC, luego de lo cual se adicionó tampón de carga para geles de poliacrilamida. Las muestras se analizaron en un gel de poliacrilamida-SDS en condiciones denaturantes, el

cual fue secado y expuesto a película Kodak BIOMAX durante 48 horas a -70ºC.

9. Cultivo de células.

9.1. Línea utilizada.

Las células de la línea Cos-7, de riñón de mono verde africano, fueron gentilmente cedidas por la Dra. María Rosa Bono, de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

9.2. Condiciones de cultivo.

Las células fueron cultivadas adheridas a la superficie de frascos de cultivo de plástico de 25 cm^2 en un incubador Shellab modelo IR2424 a 37ºC en una atmósfera que contenía un 5% de CO_2 y una humedad relativa mayor al 80%.

El medio de cultivo utilizado era el de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), esterilizado por filtración a través de membranas de 0,2 μm de poro. El medio fue suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF), 4,5 g/l glucosa, 100 U/ml penicilina y 100 μg/ml estreptomicina. Los procedimientos de cultivo fueron realizadas en una campana de bioseguridad Factomet equipada con luz UV y sistema de filtración y recirculación de aire.

9.3. Subcultivo de células.

Para la mantención de las células, éstas fueron subcultivadas cada 2 o 3 días. Para estos efectos, el medio de cultivo fue aspirado de las placas, las que fueron luego lavadas con PBS estéril. Después de remover el PBS, se agregó sobre las células una solución de 0,25% tripsina y 10 mM EDTA en PBS, en una relación de 0,5 ml por cada 25 cm^2 de superficie de cultivo. Las placas se incubaron de esta manera por 5 min a 37ºC, luego de lo cual la tripsina fue inactivada con la adición de 2,5 ml de DMEM/SBF por cada 0,5 ml de solución de tripsina. Las células fueron resuspendidas en forma homogénea mediante sucesivas aspiraciones y expulsiones de la suspensión. Una fracción de esta suspensión (generalmente 1/5) fue dejada en la placa, sobre lo cual se agregó el volumen restante de medio fresco y se prosiguió la incubación a 37ºC.

9.4. Transfección de células.

El día previo a la transfección, se plaquearon aproximadamente 5×10^5 células por cada placa de 60 mm de diámetro (P60). Al día siguiente, se cambió el medio por 4 ml de DMEM/10% SBF fresco. En un tubo de microcentrífuga estéril, se combinaron 200 μl de DMEM sin suero con 12 μl del reactivo de transfección FuGene® (Roche). Después de mezclar, se agregó 4 μg de DNA plasmidial, se mezcló y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. La mezcla fue finalmente vertida gota a gota sobre las células, se mezcló bien y se incubaron las placas a 37ºC durante 48 h.

9.5. Preparación de extractos celulares totales.

Las células fueron sacadas de incubación y, luego de ser lavadas con PBS, fueron removidas de la placa mediante el uso de un raspador de plástico. Se centrifugó a 1000 rpm durante 5 min a 4ºC en microfuga, luego de lo cual el sedimento celular fue resuspendido en tampón de lisis (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 1% NP-40, 10% glicerol, 1 mM vanadato de sodio, 1 mM PMSF, 2 μg/ml leupeptina, 2 μg/ml aprotinina, 2 μg/ml pepstatina y 2 μg/ml antipaína. Se incubó 30 min sobre hielo y el lisado se centrifugó a 14000 rpm por 15 min a 4ºC en microfuga. Se determinó la concentración de proteína total del sobrenadante mediante el uso del sistema BCA Protein Assay Kit (Pierce). Los lisados fueron almacenados en alícuotas a -70ºC.

9.6. Inmunoprecipitación de lisados celulares.

Se incubaron 100-200 μg de proteína total de lisado celular con 1-2 μl de anticuerpo monoclonal anti-HA a 4ºC durante 1-3 horas con agitación suave. Se agregó 20 μl de una suspensión al 50% de Proteína G conjugada a agarosa, previamente equilibrada en tampón de lisis. Se prosiguió la incubación a 4ºC durante toda la noche y la suspensión fue centrifugado a 12000 rpm por 1 min a 4ºC en microfuga. El inmunoprecipitado fue lavado con tampón de lisis y centrifugado. Este procedimiento se repitió 4 veces más y el inmunoprecipitado fue finalmente resuspendido en támpón quinasa 1X.

9.7. Experimentos de pulso y caza

Se realizaron transfecciones en P60 de la manera descrita en la sección 9.4. A las 36 horas post-transfección, las placas fueron lavadas 3 veces con PBS estéril y dejadas con 2 ml cada una de DMEM sin metionina ni cisteína, suplementada con 10% SBF y con 0,1 mCi/ml de mezcla para marcaje de células con ^{35}S. Las células fueron marcadas durante 15 horas a 37°C, en las condiciones normales de cultivo celular. Al final de este período las células fueron lavadas 3 veces con PBS estéril y, previo al reemplazo por medio frío, se raspó una sección de la placa con espátula de goma y las células desprendidas fueron recogidas y centrifugadas. El sedimento celular de esta muestra, correspondiente al T_0, fue guardado a -70°C para su posterior procesamiento. Sobre las células restantes se agregó medio DMEM/10% SBF frío, suplementado con un exceso de L-metionina y L-cisteína (300 μg/ml y 600 μg/ml, respectivamente) y las placas fueron incubadas a 37°C. A diferentes tiempos se tomó una muestra de células, raspando un sector de la placa y las células desprendidas fueron centrifugadas a 1000 rpm por 3 min a 4°C. El sedimento de células fue lavado con PBS y recentrifugado. Las células se resuspendieron en tampón de lisis y se guardaron a -70°C hasta su uso. Al final de este proceso, los lisados celulares fueron descongelados e incubados sobre hielo por 30 min. Después de centrifugar y determinar concentración de proteína total, se realizó la inmunoprecipitación con anticuerpo anti-HA monoclonal de la manera como se describe en las secciones 9.5 y 9.6. Los

inmunoprecipitados fueron analizados en geles de poliacrilamida-SDS en condiciones denaturantes, luego de lo cual los geles fueron secados y expuestos a película Kodak BIOMAX a -70ºC.

10. Determinación de niveles de expresión de CK1α en embriones de pez cebra.

10.1. Obtención de embriones de pez cebra de diferentes estadíos de desarrollo.

Los huevos fecundados de pez cebra fueron incubados a 28ºC y a diferentes lapsos de tiempo se recolectaron algunos, los que fueron fijados o congelados a -70ºC para su posterior uso.

10.2. Purificación de RNA total de embriones y adultos de pez cebra.

El RNA total de embriones y adultos de pez cebra, utilizado en experimentos de RT-PCR fue purificado mediante el uso del reactivo TRIZOL® (GIBCO BRL Life Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada 50-100 mg de tejido fueron homogenizados en 1 ml de reactivo TRIZOL, con un homogenizador de vidrio. Los homogenizados fueron incubados por 15 min a temperatura ambiente, luego de lo cual se adicionó 0,2 vol cloroformo. Después de mezclar e incubar a temperatura ambiente durante 2 min, se centrifugó a 12000 rpm por 15 min a 4ºC en microfuga. La fase acuosa fue precipitada agregando 0,5 vol (respecto al vol inicial de TRIZOL) de

isopropanol. Se incubó 10 min a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 12000 rpm por 10 min a 4ºC en microfuga. El sedimento fue lavado con etanol al 75% y recentrifugado. El RNA fue secado parcialmente al aire y resuspendido en H_2O-DEPC.

10.3. Transcripción Inversa acoplada a PCR (RT-PCR).

La síntesis de cDNA de CK1α se realizó a partir de RNA total de embriones o de adultos de pez cebra, mediante el uso de la transcriptasa inversa Superscript® (GIBCO BRL Life Technologies). La mezcla de reacción contenía 50 mM Tris-HCl pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 0,5 mM de cada dNTP, 25 μg/ml oligo(dT), 1 μg RNA total de embrión o de adulto de pez cebra y 10 U/ml transcriptasa inversa Superscript®. La transcripción de la primera hebra transcurrió durante 50 min a 42ºC, luego de lo cual se inactivó la enzima incubando a 70ºC durante 15 min. 1 μl de esta mezcla fue usada directamente como templado en una reacción de PCR, en un volumen total de 10 μl. La amplificación se realizó siguiendo un programa que consistía de una denaturación a 95ºC por 5 min y 30 ciclos de 95ºC or 1 min, 50ºC por 1 min y 72ºC por 1 min 15 s, finalizando con un ciclo de extensión a 72ºC por 10 min.

10.4. Síntesis de sondas de RNA.

Se digirió 1 μg del clon de CK1α en pBluescript en el extremo 5' del cDNA con *Eco*RI, para la obtención de la sonda antisentido, o en el extremo 3'

con *Xho*I, para la sonda sentido, durante 1 hora a 37ºC. Luego de la digestión, se agregó 1 vol de fenol:cloroformo, se mezcló y centrifugó. La fase acuosa fue precipitada con la adición de 1/10 vol de acetato de sodio 3M, pH 5,2 y 2,5 vol etanol. Luego de incubar por 30 min a -70ºC, se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min a 4ºC y el sedimento, luego de ser secado al aire, se resuspendió en H_2O-DEPC. La sonda de cRNA fue transcrita *in vitro* en presencia de digoxigenina-11-UTP, utilizando el sistema "Genius 4 RNA Labeling Kit" de Roche (ex-Boehringer Mannheim), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se agregó al DNA plasmidial digerido 5 μl NTP labeling mix 10X (10 mM ATP, 10 mM CTP, 10 mM GTP, 6,5 mM UTP y 3,5 mM digoxigenina-11-UTP), 5 μl tampón de transcripción 10X (400 mM Tris-HCl pH 7,2, 60 mM $MgCl_2$, 50 mM ditioeritrol y 40 mM espermidina), 1 μl inhibidor de RNasa y 90 U RNA polimerasa T7, para la síntesis de la sonda antisentido o T3, para sintetizar la sonda sentido. La polimerización se llevó a cabo durante 2 h a 37ºC, luego de lo cual se adicionó 5 μl DNasa I libre de RNasa y se incubó por 15 min más. Finalmente se detuvo la reacción agregando 5 μl EDTA 0,2 M. La cantidad de RNA sintetizado fue estimada por electroforesis en gel de agarosa al 1%, lográndose un rendimiento típico de 10 μg de RNA por cada 1 μg de DNA plasmidial inicial. El RNA sintetizado fue precipitado agregando 5 μl LiCl 4 M y 200 μl etanol. Después de incubar a -70ºC por 30 min, el RNA precipitado se centrifugó a 12000 rpm a 4ºC en microfuga. El sedimento fue lavado con

etanol al 80%, luego de lo cual se recentrifugó y el sedimento fue finalmente resuspendido en tampón de hibridación (descrito más abajo).

10.5. Hibridación *in situ* sobre embriones completos de pez cebra con sondas de CK1α.

Embriones de diferentes estadíos de desarrollo fueron fijados en *p*-formaldehído (PFA) al 4%, durante 3 horas a temperatura ambiente, luego de lo cual los embriones más tempranos fueron decorionados. Posteriormente fueron deshidratados en metanol por 10 min a temperatura ambiente y los embriones fueron almacenados en metanol a -20 ºC por hasta 6 meses. En el momento de su uso, los embriones fueron rehidratados secuencialmente en: 75% metanol/25% PBS, 50% metanol/50% PBS, 25% metanol/75% PBS y PBST (PBS + 0,1% Tween 20), durante 5 min cada uno. Luego fueron tratados con proteinasa K, a una concentración de 10 μg/ml para embriones de menos de 48 h de edad y 25 μg/ml para embriones de más de 48 h. Se lavaron 3 veces por 5 minutos con PBST, para luego ser refijados en PFA durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron posteriormente 5 lavados de 5 min cada uno con PBST, a temperatura ambiente y se procedió a la prehibridación. Para ello, los embriones fueron lavados una vez con solución de hibridación (50% formamida, 5X SSC, 50 μg/ml heparina, 500 μg/ml tRNA de levadura Thorula, 0,1% Tween-20 y 84 mM ácido cítrico pH 6,0), la que fue reemplazada por solución fresca. Se prehibridó a 65ºC durante 3-12 h, luego de lo cual la

solución fue reemplazada por una que contenía la sonda marcada con Dig, previamente denaturada a 70ºC por 5 min, en una concentración de 0,5-1,0 μg/ml. La hibridación se realizó durante la noche a 65ºC. Los embriones fueron posteriormente sometidos a una serie de lavados, a 65ºC, durante 10 min cada uno, en: 75% formamida/2X SSC, 50% formamida/2X SSC, 25% formamida/2X SSC y 2X SSC, para finalizar con 2 lavados en 0,2X SSC a 65ºC por 30 min cada uno. Se procedió enseguida al bloqueo incubando los embriones a temperatura ambiente durante 5 min en tampón MAB (100 mM ácido maleico, 150 mM NaCl y 0,1% Tween-20) y por 1 h en MAB/BMB (MAB + 2% Boehringer-Mannheim Blocking Reagent), para terminar con una incubación de 6-16 h en MAB/BMB/LS (MAB/BMB + suero de cordero inactivado al 20%). Durante esta última incubación, se preabsorbió el anticuerpo anti-Dig (fragmentos Fab de oveja, conjugados a fosfatasa alcalina), el que fue diluído en la misma solución, en una relación de 1:2000. El anticuerpo preabsorbido fue agregado a los embriones, los que fueron incubados a temperatura ambiente durante 8-20 h. Se practicaron luego 5 lavados, de 20 min cada uno, con MAB y, posteriormente, 3 lavados de 5 min con tampón AP (100 mM Tris-HCl pH 9,5, 50 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl, 0,2% Tween-20 y 0,2% Triton X-100). Para el revelado, se incubó los embriones en el sustrato comercial para fosfatasa alcalina, BM purple (Boehringer-Mannheim) durante 30 min - 2 h a temperatura ambiente, luego de lo cual los embriones fueron lavados 2 veces por 5 min en PBST y refijados.

RESULTADOS

A. CLONAMIENTO DE SUBISOFORMAS DE CK1α DE PEZ CEBRA.

1. Rastreo de la Genoteca de cDNA de Pez Cebra.

Mediante PCR y utilizando los partidores CK1N y CK1K46A, se amplificó un fragmento de DNA correspondiente a las primeras 159 pares de bases de la región codificante del cDNA de CK1α de *Xenopus laevis*, clonado previamente en nuestro laboratorio (Tapia y col., 1994). Este fragmento fue purificado y marcado radioactivamente mediante PCR como se describe en MÉTODOS. La sonda obtenida tenía una actividad específica de 2 - 8 x 10^9 cpm/μg. El rastreo de la genoteca con esta sonda resultó en la obtención de 11 clones, los que fueron sometidos a rastreo secundario y, en algunos casos, terciario. Al final de este proceso, quedaron 4 clones positivos, denominados 3.1, 3.2, 5.1 y 5.2 (Figura 1). Estos clones fueron sometidos a excisión *in vivo* y los clones así obtenidos finalmente en pBluescript fueron amplificados en células de *E. coli* XLOLR y los plasmidios fueron purificados. Los cDNAs de cada clon fueron secuenciados mediante PCR. El clon 3.1 estaba formado por 1992 pb y contenía un ORF de 978 pb, que codificaba para una proteína de 325 aminoácidos. Este ORF estaba flanqueado por 317 pb de 5' UTR y 657 pb de 3'UTR (Figura 2). Mediante la predicción de la secuencia aminoacídica a partir

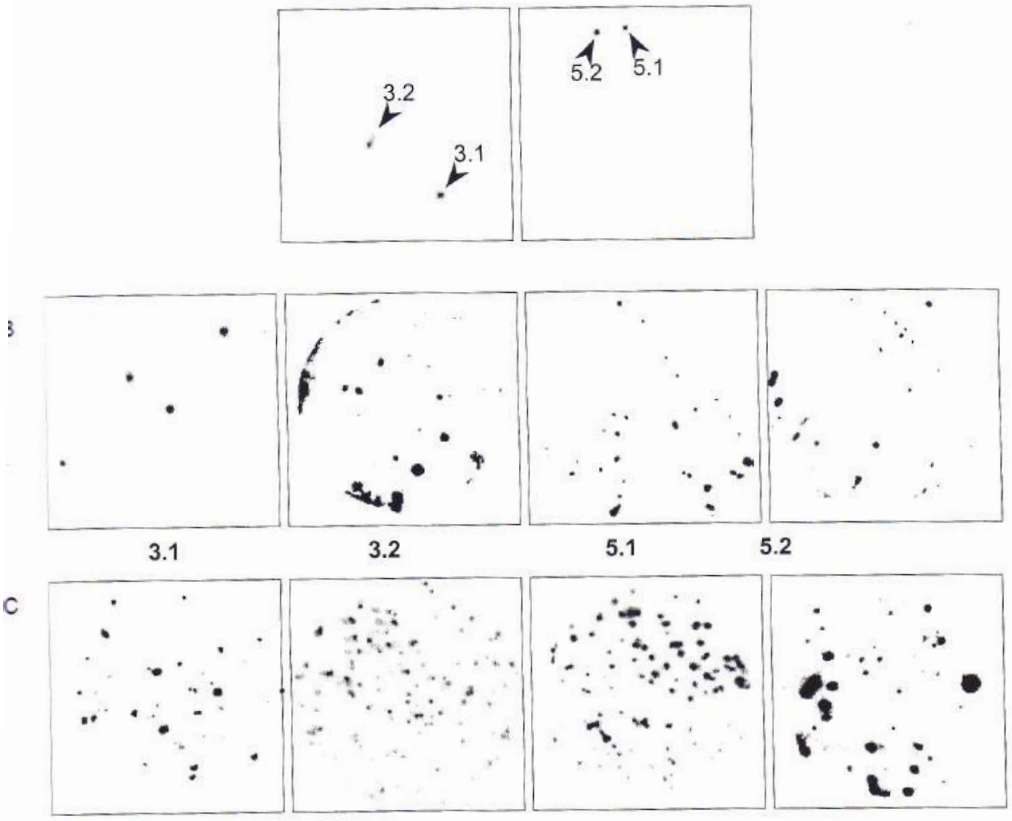


Figura 1. *Rastreo de la genoteca de cDNA de embrión de pez cebra*. A, rastreo primario. Se indican las posiciones de las señales correspondientes a los clones 3.1 y 3.2 en la primera placa y de 5.1 y 5.2 en la segunda placa. Los clones positivos fueron sometidos a un rastreo secundario (B) y terciario (C) para la obtención final de cada clon en forma pura.

```
5' TTCGGCACGAGAGACGGACAAGATGGGTTGCGCTTTGAAGAGAAAGCAGCGACTCACAAA    60
   AATTCTTCAACGTTAAAACGTCGGTTGCCTTGATGTTCGTTCAAATAAGCGGGAAAACGC   120
   ATCTTTTAAGAAGAAAAATCGCCCTCAGAGCGAGGTGAATCGAAGAGAGCGTCGAGGACA   180
   TCGACTCCTCCGTGTCCTTTCAGGCTAAGCTGCTAGTCAGCTATTCGGGGAATTGCTCAA   240
   GAGAAAAAACAGCCTCAACCTCAGGGGAAATAGTCTTGTTTTTTTTACTTAAATGTCGAG   300
   GCAGCAAAACTTATATTGAAACCGAGGTCCGTTATCATCTTCATTTCGTCGTTGTGAGTT   360
   AAGGACACAGCTAGTAAGGAAGAGCCGTTTTTAGGCTAGCTAGCATTGTTTCTACTGGAC   420
   TGAAGAAGAGAGCTGCCTGAAAACCTCGCCCGTTTACACAGTTTCAGTGTACTTCTCGGA   480
   TTTTAGGAC**ATG**GCCAGCAGCAGTGGCTCTAAAGCCGAGTTTATAGTCGGTGGGAAATAC   540
   AAGCTCGTTCGTAAAATCGGATCTGGATCCTTCGGTGACATTTATTTGGCAATCAACATC   600
   ACAAATGGAGAGGAGGTAGCTGTGAAATTGGAATCACAGAAAGCCAGACATCCTCAACTC   660
   CTATATGAAAGCAAATTGTACAAAATTCTCCAGGGAGGAGTCGGGATCCCACACATCAGG   720
   TGGTATGGCCAAGAAAAGGACTATAATGTCCTAGTCATGGACCTGCTCGGCCCAAGTCTG   780
   GAAGATCTCTTTAACTTCTGTTCCCGCAGATTCACAATGAAAACTGTCCTAATGCTTGCA   840
   GATCAGATGATCAGCAGAATCGAGTATGTGCACACAAAAAACTTCATCCACAGAGATATC   900
                                  αL5'                αL3'
   AAGCCAGACAACTTTTTAATGGGTATTGGCCGTCACTGTAATAAGTTGTTCCTCATCGAT   960
   TTTGGTCTGGCCAAGAAATACAGAGACAACAGGACACGACAGCACATACCCTACAGAGAA  1020
   GACAAAAACCTCACAGGCACAGCTCGCTATGCCAGCATCAACGCACACTTGGGCATCGAG  1080
   CAGAGTCGTCGAGATGACATGGAGTCGCTAGGATATGTCCTGATGTACTTCAACAGAACC  1140
   AGCCTGCCTTGGCAGGGACTGAAGGCTGCCACAAAGAAACAGAAATATGAGAAGATTAGT  1200
   GAGAAAAAGATGTCGACCCCTGTTGAGGTGTTGTGTAAGGGTTTCCCAGCAGAGTTTGCC  1260
   ATGTACCTGAACTACTGTCGTGGGTTGCGGTTTGAAGAGGCGCCTGACTACATGTACCTG  1320
   CGTCAGCTTTTCCGCATTCTTTTCAGGACTCTGAACCACCAGTATGACTACACATTTGAC  1380
   TGGACCATGCTGAAGCAGAAAGCAGCACAGCAAGCGGCCTCCTCAGGGGGACAGGGGCAA  1440
   CAGGCACAAACCCCCACAGGCAAGCAAACTGACAAACCCAAGAGTAACATGAAAGGTTTC  1500
   TAAGCATTAAGACAATGTAATGAAGCAGAGCAGAGTGGTCGTAGCAGGATTTGCCTTCCA  1560
   ATCACACCCCGGCATCTAGGATCAAATTCACCAGAACCTGCCAGGCACTGTGGGCAACCT  1620
   TTTTCCTGTTAAAGAACTTTGTTCCATATACTATATATGTAATCGGTATATATAGATAAG  1680
   ATGCTCCGCATATATCTATATATTGGTATGTATATACTATATCCACACACAGAAGCAGGC  1740
   TTGGTTTGGAGTTGGAAGCTGTAGCCTTTTCTATTGTCCTGTCCCTTAAGACTTTTCGCC  1800
   CCCTCCTTCTTTGAAACGGAAAACTGTAGAAAATGGGGATGTAATTGCGCACATGCCAAT  1860
   GTTTTTCCCGAGTTTTCTCCATCAGGAAATCTGTTTGGGGTCCTTCCTGAATTCTTGGTT  1920
   GCCCATCAGAGCAGTTTTGGCCCCCTTTTCCCTTTGTCATCGTCACAGAGTGTGGCACGA  1980
   ACCCAGACACTCTTCAGAATGGAGACATCCGAGACACATTTTCATCCTTTAATTTTTTTA  2040
   TTCTTCTTCCTTTCTTCAAACAAAGTGAAACATCTGAGATTAAACCTGATTTTGTTTTTC  2100
   GTTCTTCTTTTTCTTTTGGTTTTGTTCCAAGTGTATCCAAATAATTAAAAAGGCAAACAT  2160
   TGGGTTTTGTTCTTTTTTCTAAAAAGGTAATTACGATTCTGCCTGCTGATATGTGCTAGA  2220
   GAGCTTCTAATGTGAAGATTAAAAACATTCTAGTGACTACTAGGTTTCTCTTAGAGCGCT  2280
   GCATTAACTATATTGTACTTGGTATTCTGAAGTCTAAAAAAAAATAAAATAAATAAAAGAG  2340
   TAAACTCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTC 3'                      2377
```

Figura 2. *Secuencia nucleotídica del clon 3.2 aislado de la genoteca de cDNA de pez cebra, que codifica para CK1αS.* El ATG de iniciación de la traducción se destaca en negrita (bases 490-492). La secuencia codificante para el inserto S se encuentra enmarcada (posiciones 1459-1494). 3 señales de poliadenilación sobrepuestas, ubicadas entre las posiciones 2322 y 2336, se encuentran subrayadas. El clon 5.1, también codificante para CK1αS, comienza en la base 216 y termina en la posición 2161. Los clones 3.1 y 5.2 (CK1α) comienzan en las bases 173 y 376, y terminan en las bases 2161 y 2162, respectivamente. Se ilustran los partidores αL5' y αL3' (Materiales y Métodos), utilizados para amplificar la secuencia codificante para el inserto L desde RNA total de pez cebra.

de la secuencia nucleotídica, se determinó que este clon codificaba para CK1α (Figura 5) y esta exhibió un 99,7% de identidad de secuencia aminoacídica con respecto a la proteína de *Xenopus*, humano, bovino y rata, es decir, había una diferencia en un residuo aminoacídico. El clon 3.2 era el más largo y contenía 2377 pb, con un ORF de 1011 pb, flanqueado por 478 pb de 5' UTR y 845 pb de 3' UTR (Figura 2). Ambos clones exhibían una identidad de secuencia núcleotídica del 100% dentro de la región codificante y las regiones no codificantes compartidas, con la salvedad de que el clon 3.2 contenía una secuencia adicional de 36 pb, que se insertaba después de la base 969 de la región codificante de CK1α. Esta secuencia codificaba para un segmento que conservaba una alta identidad con el inserto S de la CK1αS de pollo, humano y *Xenopus* (75% identidad), por lo cual se determinó que este clon correspondía a CK1αS de pez cebra (Figura 5). Asimismo, los clones 5.2 y 5.1 correspondían también a CK1α y CK1αS, respectivamente. El clon 5.2 tenía 112 pb de 5'UTR y 655 pb de 3' UTR y el 5.1 tenía un 5' UTR de 213 pb y 657 pb de 3' UTR (Figura 2). Todos los clones contenían una secuencia de poli(dA), de entre 23-29 pb. La región 3' UTR de los clones 3.1, 5.1 y 5.2 era de 655-657 pb, con el comienzo de la cola de poli(dA) apoximadamente en el mismo punto. El clon 3.2 tenía una región 3' UTR de casi 200 pb más larga. y era el único clon que contenía 3 señales de poliadenilación verdaderas, traslapadas entre sí y ubicadas entre 13 y 27 bases río arriba del comienzo de la cola de poli(dA).

Con objeto de investigar la existencia de las formas de CK1α que

contuvieran el inserto L, descrito en bovino y rata, se diseñaron partidores que flanqueaban el sitio de inserción de dicha secuencia. Con estos partidores, el αL5' y el αL3' (Figura 2), se realizó RT-PCR sobre RNA total de pez cebra adulto, donde se amplificaron 2 fragmentos, uno de 39 pb y el otro de 123 pb. El fragmento más pequeño correspondía al obtenido por la amplificación de la secuencia de CK1α, mientras que el más largo mostró una secuencia que contenía una inserción de 84 pb con respecto a dicha isoforma, ubicada después de la base 456 de la región codificante. Este exón adicional codificaba para un segmento de 28 residuos aminoacídicos, el que guardaba una identidad del 89,3% con respecto a las secuencias descritas para el inserto L de CK1α de otras especies. Este fragmento fue marcado radioactivamente por PCR, utilizando los mismos partidores que fueron usados en la amplificación y se obtuvo una sonda que fue utilizada en un nuevo rastreo de la genoteca. En esta ocasión, se obtuvieron 8 clones del rastreo primario, pero sólo uno de ellos, el 6.3, resultó positivo hasta el rastreo terciario (Figura 3). Este se sometió a una excisión *in vivo* y se secuenció. Este clon contenía un inserto de 733 pb y comprendía una porción de la secuencia codificante de CK1α, desde la base 124 hasta la 756, interrumpida entre las bases 456 y 457 por una secuencia de 84 pb (Figura 4). Este segmento codificaba para el inserto L de 28 aminoácidos, encontrado previamente en el fragmento de DNA amplificado desde RNA total

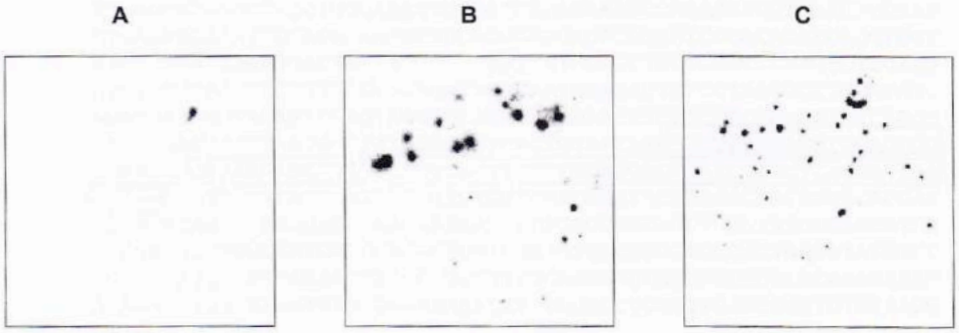


Figura 3. *Rastreo de la genoteca de cDNA de pez cebra con la sonda específica para CK1αL.* La genoteca fue sometida a un rastreo primario (A) y el clon positivo fue sometido a rastreo secundario (B) y terciario (C) para obtenerlo en forma pura.

```
5'  TTCGGCACGAGGTAGCTGTGAAATTGGAATCACAGAAAGCCAGACATCCTCAACTCCTAT   60
    ATGAAAGCAAATTGTACAAAATTCTCCAGGGAGGAGTCGGGATCCCACACATCAGGTGGT  120
    ATGGCCAAGAAAAGGACTATAATGTCCTAGTCATGGACCTGCTCGGCCCAAGTCTGGAAG  180
    ATCTCTTTAACTTCTGTTCCCGCAGATTCACAATGAAAACTGTCCTAATGCTTGCAGATC  240
    AGATGATCAGCAGAATCGAGTATGTGCACACAAAAAACTTCATCCACAGAGATATCAAGC  300
    CAGACAACTTTTTAATGGGTATTGGCCGTCACTGTAATAAGTGTTTAGAATCTCCAGTGG  360
    GGAAGAGGAAAAGAAGCTTGGCTGTTAGTTCTTCTCAGGACCCATCTTTCTCAGGATTAA  420
    ACCAGTTGTTCCTCATCGATTTTGGTCTGGCCAAGAAATACAGAGACAACAGGACACGAC  480
    AGCACATACCCTACAGAGAAGACAAAAACCTCACAGGCACAGCTCGCTATGCCAGCATCA  540
    ACGCACACTTGGGCATCGAGCAGAGTCGTCGAGATGACATGGAGTCGCTAGGATATGTCC  600
    TGATGTACTTCAACAGAACCAGCCTGCCTTGGCAGGGACTGAAGGCTGCCACAAAGAAAC  660
    AGAAATATGAGAAGATTAGTGAGAAAAAGATGTCGACCCCTGTTGAGGTGTTGTGTAAGG  720
    GTTTC    3'                                                   725
```

Figura 4. *Secuencia nucleotídica del clon 6.3.* El cDNA se encuentra trunco en ambos extremos. La secuencia que codifica para el inserto L, la cual se encuentra completa, se encuentra enmarcada.

```
drCK1α     MASSSGSKAEFIVGGKYKLVRKIGSGSFGDIYLAINITNGEEVAVKLESQ   50
drCK1αS    MASSSGSKAEFIVGGKYKLVRKIGSGSFGDIYLAINITNGEEVAVKLESQ   50
drCK1αL                                            EVAVKLESQ    9

drCK1α     KARHPQLLYESKLYKILQGGVGIPHIRWYGQEKDYNVLVMDLLGPSLEDL  100
drCK1αS    KARHPQLLYESKLYKILQGGVGIPHIRWYGQEKDYNVLVMDLLGPSLEDL  100
drCK1αL    KARHPQLLYESKLYKILQGGVGIPHIRWYGQEKDYNVLVMDLLGPSLEDL   59

drCK1α     FNFCSRRFTMKTVLMLADQMISRIEYVHTKNFIHRDIKPDNFLMGIGRHC  150
drCK1αS    FNFCSRRFTMKTVLMLADQMISRIEYVHTKNFIHRDIKPDNFLMGIGRHC  150
drCK1αL    FNFCSRRFTMKTVLMLADQMISRIEYVHTKNFIHRDIKPDNFLMGIGRHC  109

drCK1α     NK----------------------------LFLIDFGLAKKYRDNRTRQH  172
drCK1αS    NK----------------------------LFLIDFGLAKKYRDNRTRQH  172
drCK1αL    NKCLESPVGKRKRSLAVSSSQDPSFSGLNQLFLIDFGLAKKYRDNRTRQH  159

drCK1α     IPYREDKNLTGTARYASINAHLGIEQSRRDDMESLGYVLMYFNRTSLPWQ  222
drCK1αS    IPYREDKNLTGTARYASINAHLGIEQSRRDDMESLGYVLMYFNRTSLPWQ  222
drCK1αL    IPYREDKNLTGTARYASINAHLGIEQSRRDDMESLGYVLMYFNRTSLPWQ  209

drCK1α     GLKAATKKQKYEKISEKKMSTPVEVLCKGFPAEFAMYLNYCRGLRFEEAP  272
drCK1αS    GLKAATKKQKYEKISEKKMSTPVEVLCKGFPAEFAMYLNYCRGLRFEEAP  272
drCK1αL    GLKAATKKQKYEKISEKKMSTPVEVLCKGF--------------------  239

drCK1α     DYMYLRQLFRILFRTLNHQYDYTFDWTMLKQKAAQQAASSGGQGQQAQTP  322
drCK1αS    DYMYLRQLFRILFRTLNHQYDYTFDWTMLKQKAAQQAASSGGQGQQAQTP  322

drCK1α     T------------GF                                     325
drCK1αS    TGKQTDKPKSNMKGF                                     337
```

Figura 5. *Secuencia aminoacídica deducida de la secuencia del cDNA de los clones aislados de la genoteca de cDNA de pez cebra*. Se muestra la secuencia de CK1α, proveniente de los clones 3.1 y 5.2, de CK1αS, proveniente de los clones 3.2 y 5.1 y la secuencia de una CK1αL trunca en ambos extremos, correspondiente al clon 6.3, obtenido del segundo rastreo de la genoteca.

de pez cebra adulto. El clon 6.3 se encontraba trunco en las regiones que codifican para los extremos N- y C- terminal de la enzima (Figuras 4 y 5).

2. Construcción de cDNAs completos para CK1αL y C1αLS y subclonamiento en vectores de expresión.

El haber encontrado un clon en la genoteca que codificaba parcialmente para una variante de CK1α con el inserto L, junto con la existencia de clones para CK1α y CK1αS sugería la coexistencia de las cuatro formas de esta enzima dentro de un mismo organismo, en este caso, el pez cebra. Esta suposición fue corroborada en primer lugar mediante la amplificación específica por RT-PCR de fragmentos correspondientes a los cuatro transcritos en forma individual. Para ello se utilizaron partidores derivados de secuencias internas de los exones codificantes de S y L y partidores que cruzaban el sitio de inserción de estos exones (Figura 6A). Como se observa en la figura 6B, se obtuvieron fragmentos de amplificación de los cuatro tipos de transcrito de CK1α desde RNA total de pez cebra adulto. Por otro lado, con la utilización de los partidores αL5' y αL3', los que hibridan 5' de L y 3' de S, respectivamente (Figura 6A), se logró la amplificación simultánea de 4 fragmentos correspondientes en tamaño a los esperados para los transcritos de las cuatro variantes (Figura 6C). También se amplificaron desde RNA total fragmentos correspondientes en tamaño a las secuencias codificantes completas de las cuatro variantes utilizando los partidores 5'Eco y 3'Eco descritos en Materiales y Métodos (no

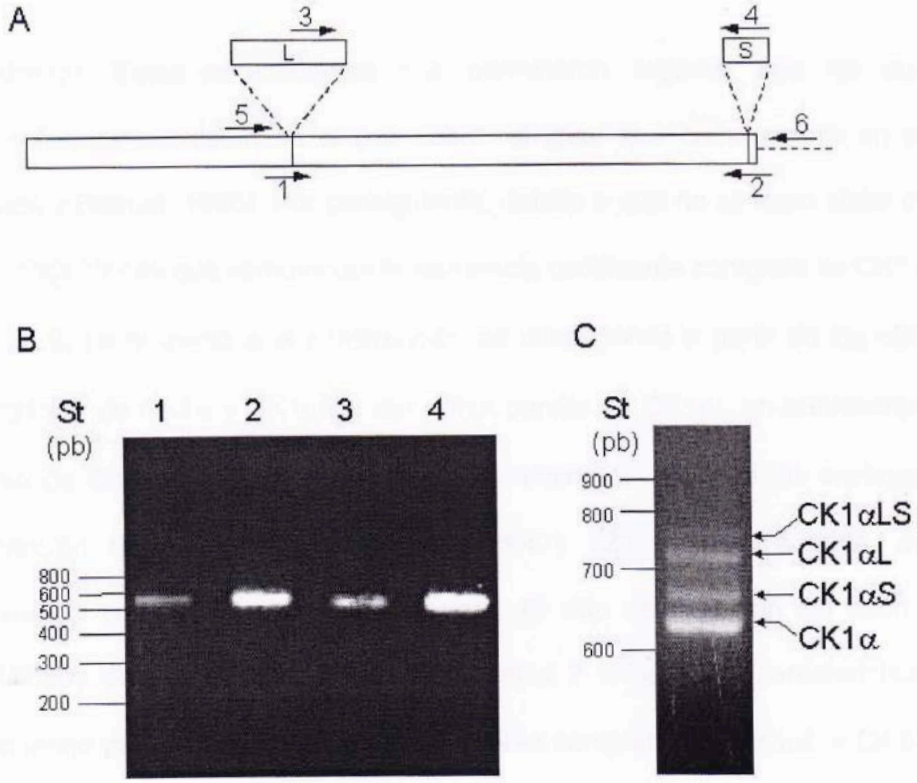


Figura 6. *Amplificación de transcritos de las variantes de procesamiento de CK1α de pez cebra.* A, esquema de los partidores utilizados: 1, CKI13; 2, zCK1αAS; 3, DPSFSG; 4, zCK1α12AS; 5, αL5'; 6, αL3' (ver secuencias en Métodos). B, Fragmentos amplificados específicos para cada variante. La transcripción inversa fue practicada utilizando el partidor 6 y los fragmentos de cada variante fueron amplificados específicamente con los pares de partidores correspondientes: carril 1, amplificación de CK1α con los partidores 1 y 2; carril 2, amplificación de CK1αS con los partidores 1 y 4; carril 3, amplificación de CK1αL con los partidores 3 y 2; carril 4, amplificación de CK1αLS con los partidores 3 y 4. C, Amplificación simultánea de fragmentos provenientes de las cuatro variantes utilizando los partidores 5 y 6.

mostrado). Estos antecedentes nos permitieron suponer que las cuatro subisoformas coexisten en el pez cebra, al igual que como ocurre en pollo (Green y Bennet, 1998). Por consiguiente, debido a que no se logró aislar de la genoteca clones que contuvieran la secuencia codificante completa de CK1αL y CK1αLS, se procedió a la construcción de tales clones a partir de los cDNAs completos de CK1α y CK1αS y del cDNA parcial de CK1αL en pBluescript. El cDNA de CK1α y CK1αS contenían sitios únicos de corte de las enzimas de restricción *Bgl*II y *Sal*I, en las bases 294 y 723, respectivamente, de la secuencia codificante de estas isoformas. El sitio de inserción del exón que codificaba para L se encontraba entre estos 2 sitios. Esta característica se aprovechó para la construcción de los cDNAs completos de CK1αL y CK1αLS, *de manera que el fragmento entre los 2 sitios de corte fue removido de los* clones de CK1α y CK1αS y fue reemplazado por el fragmento análogo obtenido de la digestíon del clon 6.3 (CK1αL parcial) (Figura 7). Estas construcciones, además de las secuencias de CK1α y CK1αS, fueron amplificadas con la DNA polimerasa *pfu* (Promega) donde se utilizaron partidores que incorporaban sitios de restricción en ambos extremos de las secuencias codificantes de estos clones. Después de la digestión con las enzimas de restricción correspondientes, los cDNA de las cuatro subisoformas de CK1α fueron subclonados en el vector para expresión en procariontes, pT7.7-H6 y en el vector para expresión en células eucarióticas, pCEFL-HA. En este último, solo

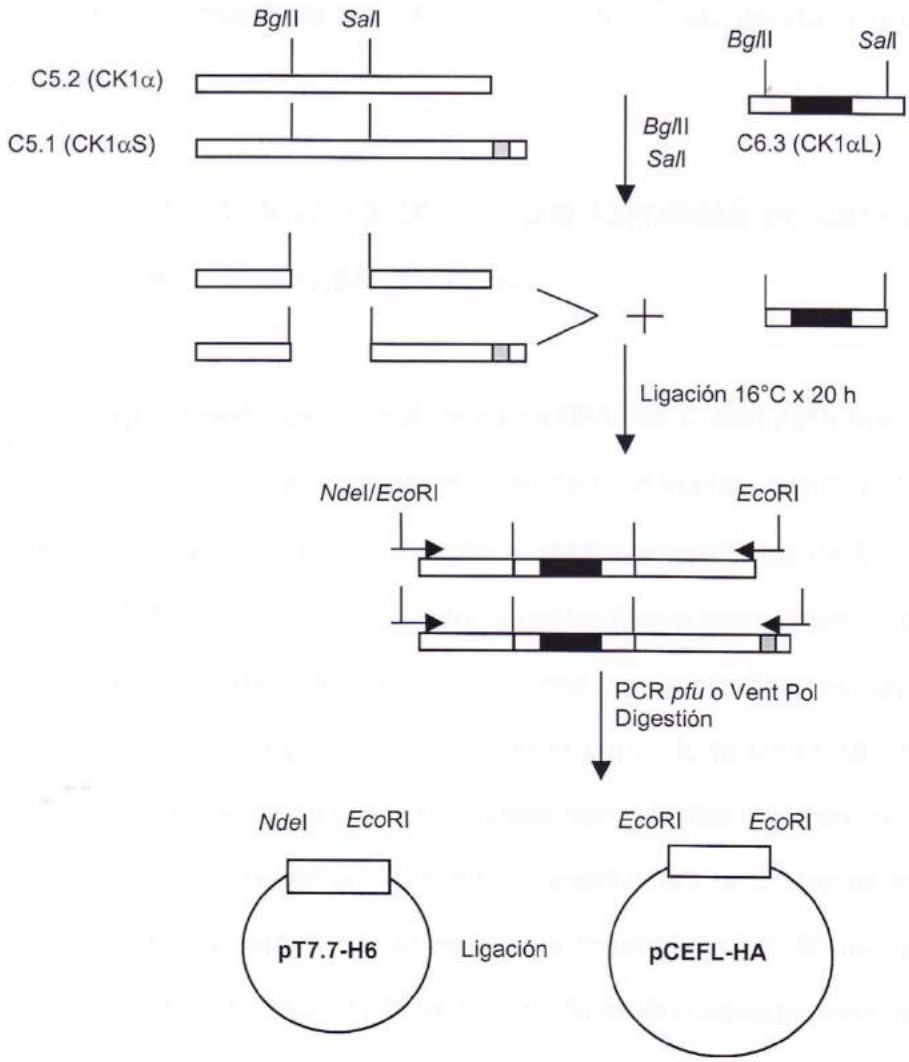


Figura 7. *Construcción de CK1αL y CK1αLS y subclonamiento de las 4 variantes.* Las subisoformas que contienen el inserto L fueron construidas como se describe en Métodos. Los clones 6.3, 5.2 y 5.1 fueron digeridos con *Bgl*II y *Sal*I. El fragmento de 514 pb liberado del clon 6.3 fue ligado en los fragmentos mayores generados de los clones 5.1 y 5.2. Las regiones codificantes de las cuatro variantes fueron amplificadas por PCR con la enzima *pfu* o Vent polimerasa, agregándoles sitios de restricción en ambos extremos. Después de digerir con las enzimas correspondientes, los insertos fueron ligados en los vectores de expresión pT7.7H6 y pCEFL-HA.

se logró el clonamiento de CK1α, CK1αS y CK1αL debido a dificultades técnicas.

B. ESTUDIOS *IN VITRO* DE LAS SUBISOFORMAS DE CK1α DE PEZ CEBRA EXPRESADAS EN *E. coli*.

1. Expresión de las subisoformas de CK1α en *E. coli* y purificación.

Los cDNA de las subisoformas de CK1α clonadas en pT7.7-H6 fueron introducidos mediante electroporación a células competentes de *E. coli* de la cepa BL21(DE3) y las proteínas recombinantes fueron expresadas y purificadas parcialmente a través del epítope de 6 residuos de histidina por columna de afinidad a Ni^{++}. La figura 8 muestra, en el panel de la izquierda, un gel de poliacrilamida-SDS al 10% en condiciones denaturantes y teñido con azul de Coomasie, donde fueron analizadas las preparaciones obtenidas de las cuatro subisoformas, después de la elución de la columna de Ni^{++}-NTA-agarosa. El panel de la derecha muestra el análisis de Western correspondiente, donde se detectaron las proteínas recombinantes con un anticuerpo específico contra el epítope de 6 histidinas. El bajo grado de pureza obtenido en las preparaciones se debe a que las proteínas comenzaban a eluir de la columna a baja concentración de imidazol (20 mM). A pesar de esto, las preparaciones de enizima eran estables durante al menos 1 año a –20ºC en glicerol al 50%.

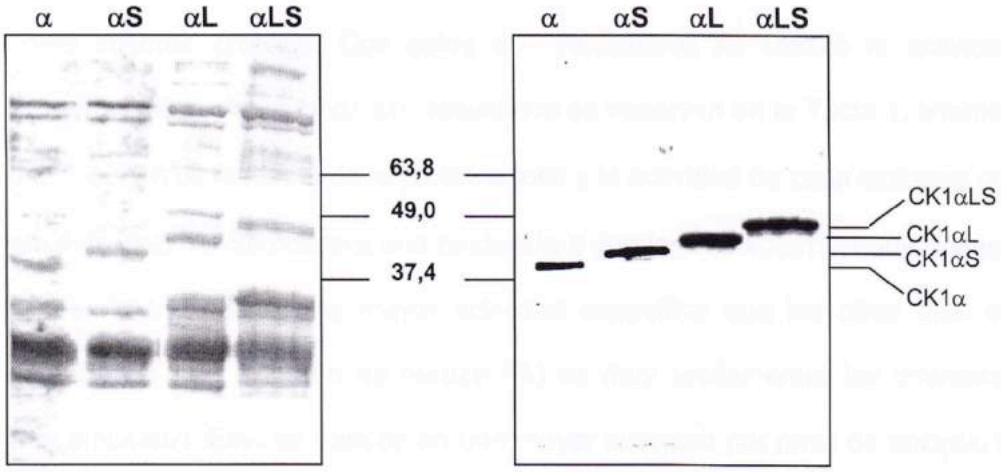


Figura 8. *Expresión de subisoformas de CK1α en E. coli.* Las subisoformas de CK1α de pez cebra clonadas en pT7.7-H6 fueron introducidas en células de *E. coli* de la cepa BL21(D3) y expresadas y purificadas parcialmente como se detalla en Métodos. A, Gel de poliacrilamida-SDS al 10% en condiciones denaturantes. Se ilustra para cada variante una muestra de la combinación de fracciones eluídas de la columna de Ni^{++}-NTA-Agarosa. B, Análisis de Western de los eluídos de la columna de Ni^{++}-NTA-Agarosa de cada subisoforma. El gel se corrió igual que en A y se transfirió a una membrana de PVDF, luego de lo cual la presencia de las enzimas fue detectada, como se describe en Métodos, mediante el uso de un anticuerpo monoclonal dirigido al epítope de 6 histidinas del N-terminal de las proteínas recombinantes. La columna del medio (M) describe la posición de marcadores de tamaño molecular.

La proporción de cada subisoforma de CK1α presente en las preparaciones se determinó mediante densitometría y se midió, además, la actividad enzimática en condiciones estándar utilizando 5 mg/ml β-caseína como sustrato proteico. Con estos dos parámetros se calculó la actividad específica de cada variante. Los resultados se observan en la Tabla 1, además del % de CK1α respecto de la proteína total y la actividad de cada isoforma por pmol de enzima. Se observa una tendencia a que las subisoformas que poseen el inserto L exhiban una mayor actividad específica que las otras dos, en condiciones que el grado de pureza (%) es muy similar entre las diferentes preparaciones. Esto se traduce en una mayor actividad por pmol de enzima, lo que es consistente con lo publicado por Zhang y col. (1996), que observaron una actividad mayor de CK1αL que CK1α hacia diferentes sustratos proteicos.

2. Determinación de Km aparente de las subisoformas para diferentes sustratos.

La Tabla 2 muestra los valores de Km aparente obtenidos con diferentes sustratos conocidos de CK1, para las cuatro subisoformas de CK1α. Los resultados obtenidos para sustratos proteicos (β-caseína y fosvitina) y el péptido derivado del inhibidor-2 de proteína fosfatasa 1 (PPI2) son muy similares entre las cuatro subisoformas, mientras que con ATP el comportamiento es diferente. La Km aparente (Km_{app}) obtenida para el sustrato nucleotídico aumenta en alrededor de 2 veces para las formas que poseen el inserto L, con respecto a

Tabla 1. *Resultados de la purificación parcial de las variantes recombinantes de CK1α expresadas en E. coli.* La actividad específica fue determinada en condiciones estándar de ensayo, utilizando 5 mg/ml β-caseína como sustrato.

	Actividad Específica[a] (pmoles/min x μg proteína)	**%CK1**[b]	**Actividad CK1** (pmoles/min x pmol Ez)
CK1α	72	6,5	42
CK1αS	225	6,2	141
CK1αL	602	7,5	326
CK1αLS	545	6,2	368

[a]La unidad se definió como la cantidad de enzima que cataliza la transferencia de 1 pmol de fosfato por minuto, desde ATP hacia β-caseína en condiciones estándares de ensayo, a 37°C.

[b]CK1/proteína total x 100. Determinado por densitometría utilizando el programa UN-SCAN-IT.

Tabla 2. *Km aparente de las subisoformas de CK1α de pez cebra para diferentes sustratos.* Los valores de Km aparente fueron determinados en condiciones de velocidad inicial, de la manera descrita en Métodos, en condiciones estándar.

	CK1α	**CK1αS**	**CK1αL**	**CK1αLS**
β-caseína (mg/ml)	1,23	1,03	1,58	1,23
péptido PPI2* (μM)	228	235	237	227
fosvitina (mg/ml)	3,21	2,75	2,48	2,42
ATP (μM)	33	30	69	55

*RRKDLHDDEEDEAMSITA

las que no lo tienen. Esta diferencia, aunque pequeña, es consistente, de manera que se repite la relación de 2 veces en cada experimento, habiéndose observado la misma tendencia en tres repeticiones independientes de esta determinación. Esta situación se ilustra más claramente en las curvas de saturación para ATP de las cuatro variantes de CK1α (Figura 9A). En estas curvas se observa la saturación a menores concentraciones de ATP para las dos subisoformas que no contienen el inserto L. Esta diferencia también se puede apreciar en el gráfico de dobles recíprocos en los puntos donde cortan el eje de las abcisas las rectas correspondientes a cada variante (Figura 9B). La Vmax obtenida en estos experimentos también fue de 2 veces para las variantes L, aunque para un análisis riguroso de eficiencia catalítica los experimentos tendrían que haberse realizado con cantidades equivalentes de enzima en lugar de número equivalente de unidades, como fueron realizadas estas determinaciones.

Cabe señalar también que ninguna de las 4 variantes de CK1α fue capaz de utilizar GTP como dador de fosforilo (resultados no mostrados).

3. Efecto de inhibidores sobre las subisoformas de CK1α.

La diferencia que se observa entre las cuatro subisoformas con respecto al sitio de unión de ATP también se refleja en el comportamiento exhibido por las enzimas frente al inhibidor específico para CK1, el CKI-7, el cual es competitivo con respecto al nucleótido. La figura 10 muestra las curvas de

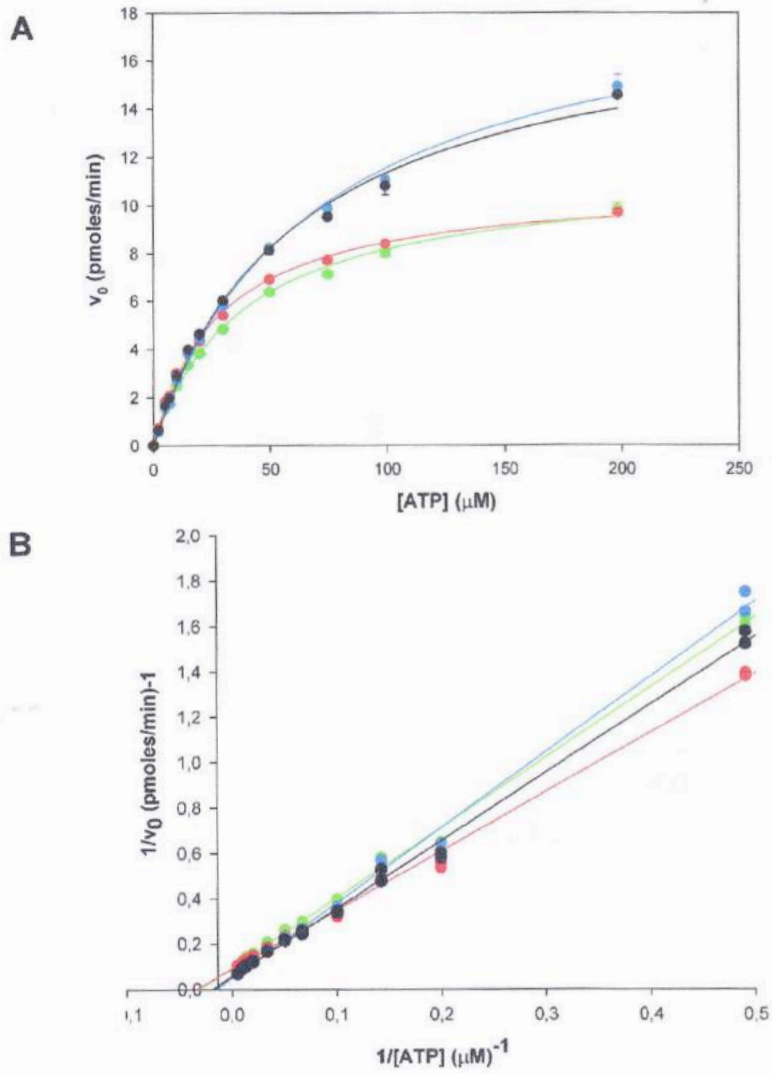


Figura 9. *Determinación de Km de las variantes de CK1α para ATP.* Las determinaciones fueron realizadas en condiciones estándar, utilizando 5 mg/ml β-caseína como sustrato proteico. Las muestras contenían cantidades equivalentes de [γ-^{32}P]ATP y las concentraciones indicadas de ATP frío, que variaban entre 2 y 200 μM. La radioactividad incorporada se midió por la técnica de la fosfocelulosa. A, curvas de saturación de Michaelis-Menten; B, Gráfico de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk. Los ajustes de curvas fueron realizados utilizando el programa Sigma Plot Enzyme Kinetics Module 1.1 (SPSS Inc.). Las líneas y símbolos representan a CK1α (—●—), CK1αS (—●—), CK1αL (—●—) y CK1αLS (—●—). n = 2

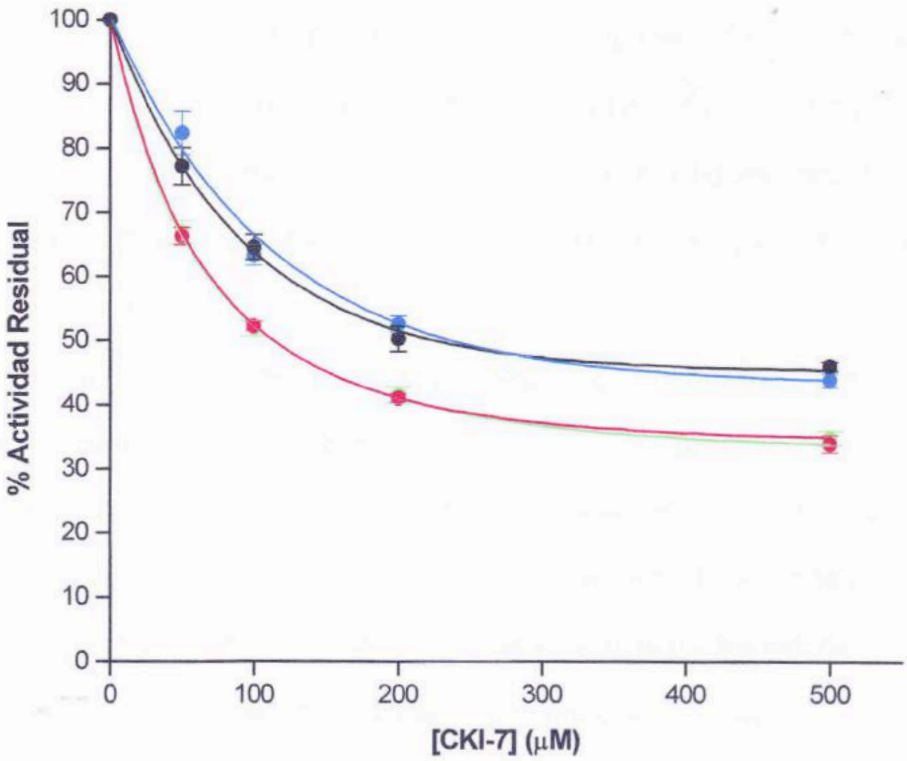


Figura 10. *Inhibición de las subisoformas de CK1α de pez cebra por CKI-7.* Los ensayos fueron realizados en condiciones estándar utilizando 5 mg/ml β-caseína como sustrato proteico, 50 μM ATP y en presencia de las concentraciones indicadas del inhibidor CKI-7. La radioactividad incorporada se midió mediante la técnica del papel de fosfocelulosa. Los símbolos y líneas representan a CK1α (—●—), CK1αS (—●—), CK1αL (—●—) y CK1αLS (—●—).

inhibición de CKI-7, donde se observa que, dentro de un amplio rango estudiado, se requiere de una concentración de aproximadamente dos veces mayor del compuesto para lograr que las isoformas CK1αL y CK1αLS sean inhibidas a niveles similares a CK1α y CK1αS. Las IC50 del inhibidor para CK1α, CK1αS, CK1αL y CK1αLS son de 113 μM, 113 μM, 236 μM y 224 μM, respectivamente.

Con el polímero de tirosina y ácido glutámico, poli[$Glu^{20}Tir^{80}$], que es un inhibidor competitivo con respecto al sustrato proteico o peptídico (Braun y col., 1984, Pulgar y col., 1996), ocurre un efecto variable. Se ve, en algunos casos, una tendencia de las variantes que contienen el inserto L de ser más sensibles a la inhibición por este compuesto. Al utilizar β-caseína no desfosforilada como sustrato (Figura 11A), se observa una mayor inhibición sobre αLS que sobre las demás variantes. La IC50 para cada subisoforma es de 3,0, 2,9, 2,7 y 1,3 μM para α, αS, αL y αLS, respectivamente. Cuando el sustrato utilizado es β-caseína desfosforilada, sin embargo (Figura 11B), no se observa una diferencia significativa entre las variantes. Los valores obtenidos de IC50, en este caso, son de 3,8 μM para α, 3,5 μM para αS, y 2,9 μM para αL y αLS.

Este polímero de glutamato y tirosina también es capaz de actuar como sustrato de CK1α de Xenopus, la cual la fosforila en los residuos de tirosina (Pulgar y col., 1996). En estos ensayos los resultados deben ser analizados en geles de poliacrilamida y posterior autorradiografía, puesto que el polímero

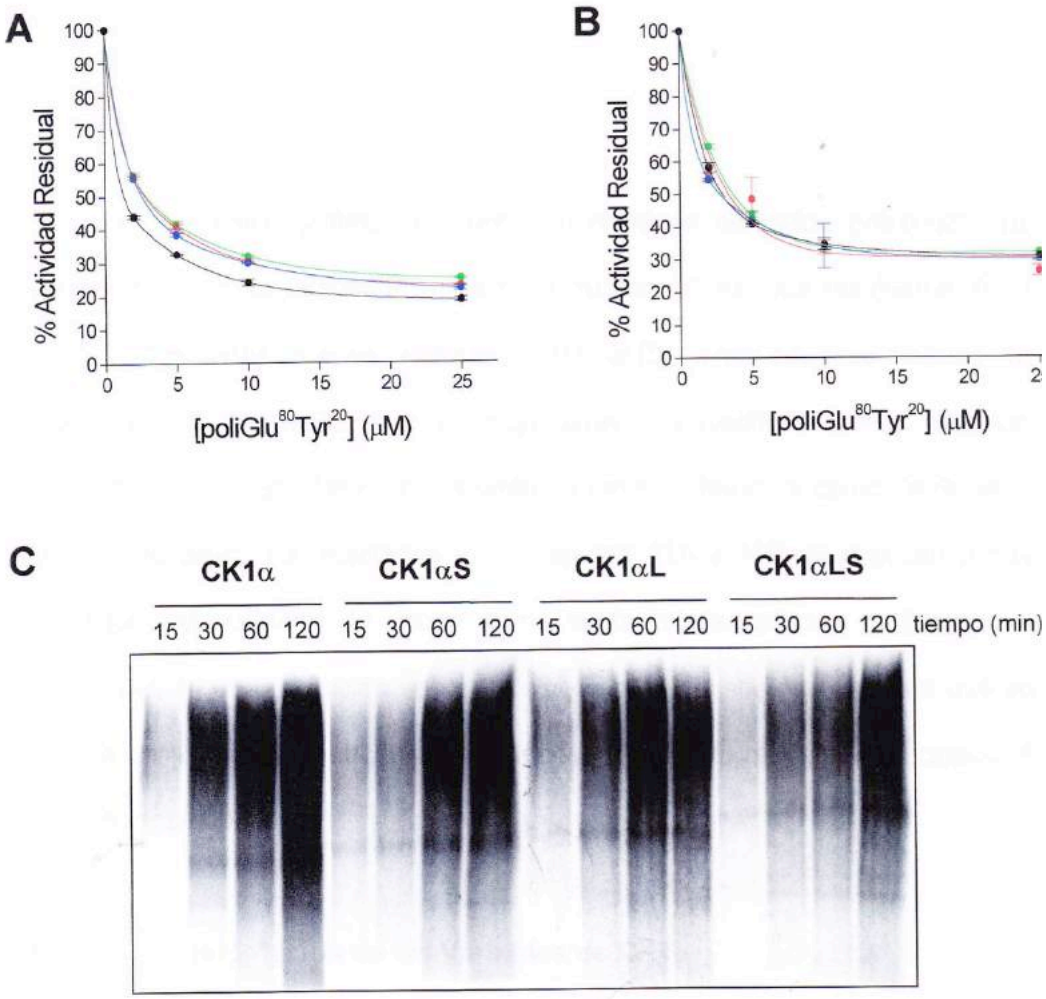


Figura 11. *Interacción de las variantes de CK1α con poli[Glu^{80}Tyr^{20}].* Ensayos de inhibición de las subisoformas de CK1α por el polímero, utilizando β-caseína desfosforilada (A) o fosforilada (B) como sustrato proteico. Los ensayos fueron realizados en condiciones estándar, en presencia de las concentraciones indicadas del polímero. Las líneas y símbolos representan a CK1α (-●-), CK1αS (-●-), CK1αL (-●-) y CK1αLS (-●-) (n=3). C, fosforilación del polímero sintético por las variantes de CK1α. 20 U de cada enzima fueron incubadas en presencia de 0,1 mg/ml poliGlu^{80}Tyr^{20} durante diferentes lapsos de tiempo, en las condiciones descritas en Métodos. La reacción fue detenida por la adición de tampón de carga para geles de poliacrilamida. Las muestras fueron analizadas en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones denaturantes, luego de lo cual los geles se secaron y expusieron a película Kodak BIOMAX.

de ácido glutámico y tirosina carece de residuos cargados positivamente, necesarios para su adsorción a papel de fosfocelulosa. Los resultados de la figura 11C muestran que las cuatro variantes de CK1α son capaces de fosforilar al polímero, lo cual las califica como quinasas de especificidad dual, es decir, son capaces de fosforilar residuos tanto de serina y treonina como de tirosina. Sobre esta base, los resultados de las figuras 11A y 11B se explican por la condición del polímero de actuar como sustrato alternativo a la β-caseína, observándose una inhibición sobre la fosforilación del sustrato proteico que se aprecia como una disminución en la cantidad de fosfato radioactivo asociado al papel de fosfocelulosa.

4. Autofosforilación de las Variantes de CK1α.

Dentro de la caracterización bioquímica de las subisoformas de CK1α, se estudió la posibilidad de que la presencia de una o ambas inserciones tuviera alguna incidencia sobre la capacidad de las enzimas de autofosforilarse. La figura 12 muestra un curso temporal de autofosforilación de las cuatro subisoformas de CK1α. Se observa que las cuatro enzimas son capaces de autofosforilarse en una manera dependiente del tiempo, alcanzando un máximo a la hora. La velocidad en la autofosforilación parece ser mayor en CK1αL y CK1αLS. Lo cual sugiere que el inserto L tendría sitios adicionales de

autofosforilación o bien que estas variantes se autofosforilan en los mismos residuos que CK1α y CK1αS con una velocidad mayor. Para diferenciar entre

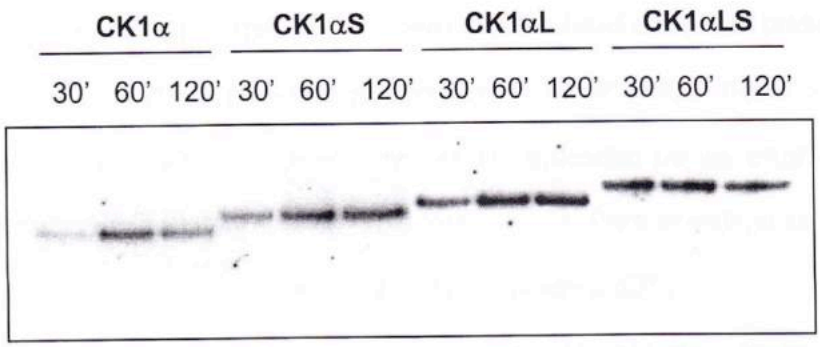


Figura 11. *Autofosforilación de subisoformas de CK1α.* 20 U de cada enzima fueron autofosforiladas de la manera descrita en Métodos, durante los tiempos indicados y luego la reacción fue detenida agregando tampón de carga para geles de poliacrilamida. Las muestras fueron analizadas en un gel de poliacrilamida al 10% en condiciones denaturantes, luego de lo cual el gel fue secado y expuesto a película Kodak BIOMAX.

estas dos posibilidades, se requerirán estudios más acabados, que incluyan el análisis de péptidos derivados de la digestión de las enzimas previamente autofosforiladas *in vitro*.

5. Estabilidad térmica de las subisoformas de CK1α.

Debido a que el inserto L se encontraría en la región bisagra de las enzimas que la poseen, se consideró la posibilidad de que la presencia de este segmento pudiera provocar diferencias en la estructura de la región, lo que podría reflejarse como diferencias en la capacidad de las enzimas de tolerar condiciones denaturantes como la temperatura. Para investigar esta posibilidad, se estudió la estabilidad térmica de las enzimas a 40°C.

Para estos efectos, se preincubaron las mezclas de reacción a 40°C durante diferentes lapsos de tiempo, al final de los cuales se adicionó la mezcla de ATP frío y ATP radioactivo y se prosiguió la reacción de fosforilación a 30°C durante 10 minutos. La reacción fue detenida mediante la adsorción a papel de fosfocelulosa, los que fueron procesados como se describe en Métodos. El gráfico de la figura 13 muestra la pérdida de actividad que sufren las 4 subisoformas de CK1α, a mayor tiempo de preincubación a 40°C. Se observa claramente que las formas que poseen el inserto L en la bisagra son bastante más termolábiles que las formas más cortas, de manera que α y αS requieren *de aproximadamente 4 veces el tiempo que demoran αL y αLS en decaer a un* 50% de actividad. Las preincubaciones a 40°C se realizaron en presencia de

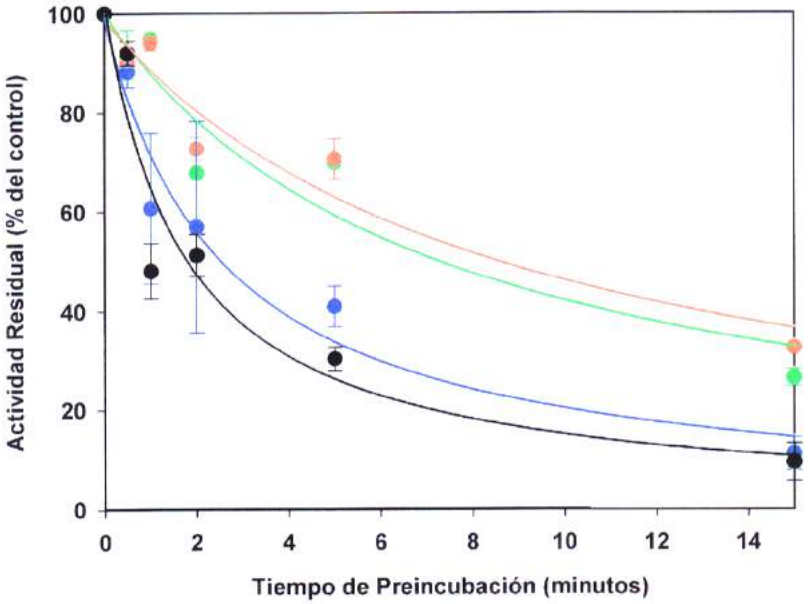


Figura 13. *Estabilidad térmica de las subisoformas de CK1α a 40°C.* Las mezclas de reacción, que contenían todos los elementos salvo el ATP, fueron incubadas durante los lapsos de tiempo indicados a 40°C, luego de lo cual se adicionó la mezcla de ATP frío y [γ-32P]ATP y se incubó a 30°C durante 10 minutos. La reacción fue detenida por adsorción a papel de fosfocelulosa, luego de lo cual los papeles fueron lavados de la manera descrita en Métodos y su radioactividad asociada fue determinada en un contador de centelleo. Los símbolos y líneas representan a CK1α (—●—), CK1αS (—●—), CK1αL (—●—) y CK1αLS (—●—). n=3

todos los componentes de la reacción, exceptuando el ATP. Esto incluye el sustrato β-caseína a una concentración de 5 mg/ml, lo que protegería a las enzimas del efecto denaturante de la dilución, con lo cual se puede concluir que el efecto observado se debería principalmente a la influencia de la temperatura y no a las posibles diferencias de composición entre las cuatro preparaciones de enzima.

6. Fosforilación de subisoformas de CK1α por otras proteínaquinasas

El inserto L contiene dos secuencias que podrían constituir sitios de fosforilación para otras proteínaquinasas celulares. La primera secuencia, SSQD, es un posible sito de CK2, sin embargo, esta enzima no mostró señas de ser capaz de fosforilar a ninguna de las cuatro variantes de CK1α (resultados no mostrados). La otra secuencia, RKRSM tiene las características de los sitios de consenso para PKA. Como se observa en la figura 14, la presencia de PKA estimula la fosforilación de las cuatro variantes de CK1α, siendo esta estimulación de de 2 veces para la variante α, de 6 veces para αS y de 16 veces para αL. En el caso de la subisoforma αLS, la banda correspondiente a esta enzima comigra con la de PKA, por lo que se dificulta la interpretación, pero se realizó una estimación, restando al total el aporte de la banda de PKA del carril 3, lo que arrojó una estimulación de la fosforilación de esta variante de unas 70 veces. Se observa un efecto sinérgico sobre la estimulación de la fosforilación en presencia de PKA, por la presencia de ambos

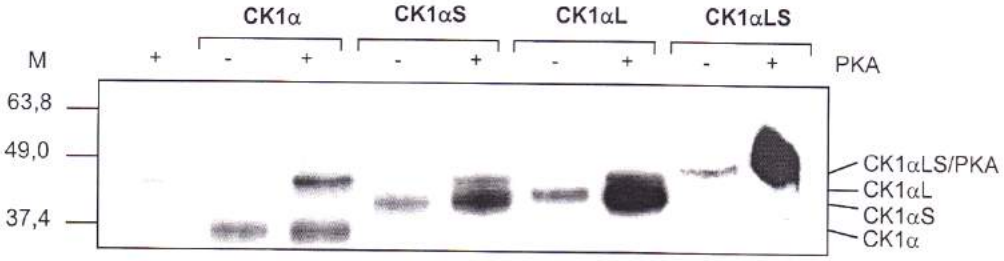


Figura 14. *Fosforilación de subisoformas de CK1α por la Proteínaquinasa dependiente de AMP cíclico (PKA).* Se incubaron 20 U de cada una de las variantes de CK1α con 10 U de PKA, o 10 U de PKA sin CK1, en las condiciones descritas en Métodos. Después de 1 h a 30ºC, la reacción fue detenida con la adición de tampón de carga para geles de poliacrilamida-SDS. Las muestras fueron analizadas en un gel de poliacrilamida-SDS al 10%, luego de lo cual el gel fue secado y expuesto a película Kodak BIOMAX. Se indican las posiciones de migración de las variantes de CK1α y de PKA. La columna M indica la posición de los marcadores de tamaño molecular.

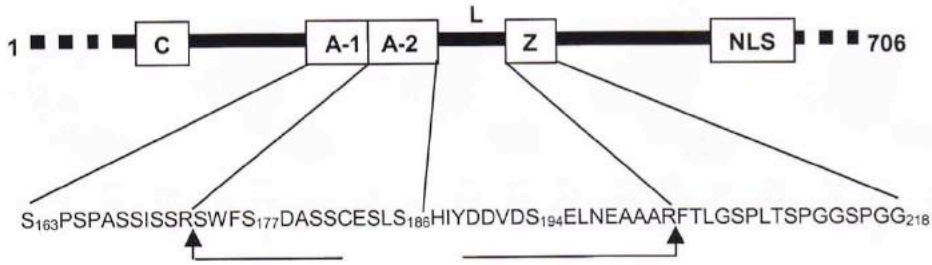
insertos. Estos resultados sugieren que los dos insertos podrían ser fosforilados por PKA, pero especialmente el inserto L, que posee el consenso para esta enzima. La fosforilación de PKA también aumenta en presencia de cualquiera de las cuatro subisoformas de CK1α, lo que sugiere que ocurriría una fosforilación mutua. Una explicación alternativa sería que ambas enzimas estimularan mutuamente su autofosforilación, sin mediar fosforilación entre las diferentes enzimas. La aclaración de estas alternativas requerirá de experimentos adicionales.

7. Estudios con péptidos sintéticos derivados de la secuencia de NFAT4.

7.1 Fosforilación de péptidos derivados de distintos dominios de NFAT4.

La publicación de un putativo sitio de "docking" para CK1 (Zhu y col., 1998), rico en residuos de serina, suscitó nuestro interés en este concepto y abrió la posibilidad de probar la capacidad de esta secuencia de actuar como sitio "docking" en péptidos sintéticos. Además, quisimos explorar la posibilidad de que el inserto L incidiera sobre el fenómeno de "docking" en la interacción con estos sustratos peptídicos. En asociación con los laboratorios del Dr. Lorenzo Pinna y del Dr. Flavio Meggio, en la Universidad de Padua, Italia, se llevó a cabo este proyecto, el cual generó una publicación en la revista Biochemistry (Marin, Burzio y col., 2002).

Como se describió en la introducción, la región de reconocimiento de NFAT4 como sustrato de CK1α reside entre los dominios conservados A2 y Z y la región "linker" entre ellas (Zhu y col., 1998). En nuestra aproximación experimental, se partió de péptidos derivados de estas regiones. La figura 15 muestra la secuencia del segmento que contiene los dominios A, L y Z y los péptidos sintéticos derivados de él. Los primeros péptidos sintetizados partían de la región A2, puesto que esta era la secuencia descrita como sitio "docking" en NFAT4 (Zhu y col., 1998). En nuestro estudio se utilizaron tanto las 4 subisoformas recombinantes de CK1α de pez cebra, como CK1 nativa purificada desde hígado de rata (rnCK1), la cual constituye una mezcla de isoformas. En la figura 16 se observa la imagen obtenida en un phosphorimager de una electroforesis en geles de poliacrilamida al 18% de los resultados de la fosforilación de los péptidos ALZ1, LZ1 y A1 con cada una de estas preparaciones de enzima. En todos los casos, se observa que tanto A1 como LZ1 son fosforilados por CK1, pero el péptido ALZ1, formado por la secuencia completa de la región, es fosforilado a una nivel que supera por mucho la suma de las fosforilaciones de A1 y LZ1. Cuando era mutado el residuo de serina 194, el cual constituye un sitio de fosforilación de consenso de CK1, el péptido resultante, LZ2, no era fosforilado en absoluto por la enzima (Figura 16 y Tabla 3), lo cual sugiere que en el péptido LZ1, este sería el único residuo que se estaría fosforilando. Estos resultados parecían consistentes con los encontrados por Zhu y col. (1998), que concluyeron que el dominio Z era



Residuos aminoacídicos en NFAT4	Péptidos Sintéticos
ALZ1 (173-218)	RRRSWFS$_{177}$DASSAESLS$_{186}$HIYDDVDS$_{194}$ELNEAAARFTLGSPLTSPGGSPGG$_{218}$
A1 (173-188)	RRRSWFS$_{177}$DASSAESLS$_{186}$HI
LZ1 (189-218)	YDDVDS$_{194}$ELNEAAARFTLGSPLTSPGGSPGG$_{218}$
AL1 (173-202)	RRRSWFS$_{177}$DASSAESLS$_{186}$HIYDDVDA$_{194}$ELNEAAAR
A5 (163-188)	RRS$_{163}$PSPASSISSRSWFS$_{177}$DASSAESLS$_{186}$HI

	Péptidos Trípticos
173-202 (AL12)	SSRSWFS$_{177}$DASSAESLS$_{186}$HIYDDVDS$_{194}$ELNEAAAR
203-218	FTLGSPLTSPGGSPGG$_{218}$

Figura 15. *Péptidos sintéticos derivados de las regiones A, L y Z de NFAT4.* Se muestran los péptidos primarios, secuencias que luego fueron mutadas en diferentes residuos. Se indican también los sitios de corte de tripsina y los péptidos trípticos derivados de ALZ1. Los residuos que fueron mutados o agregados por razones técnicas se encuentran subrayados.

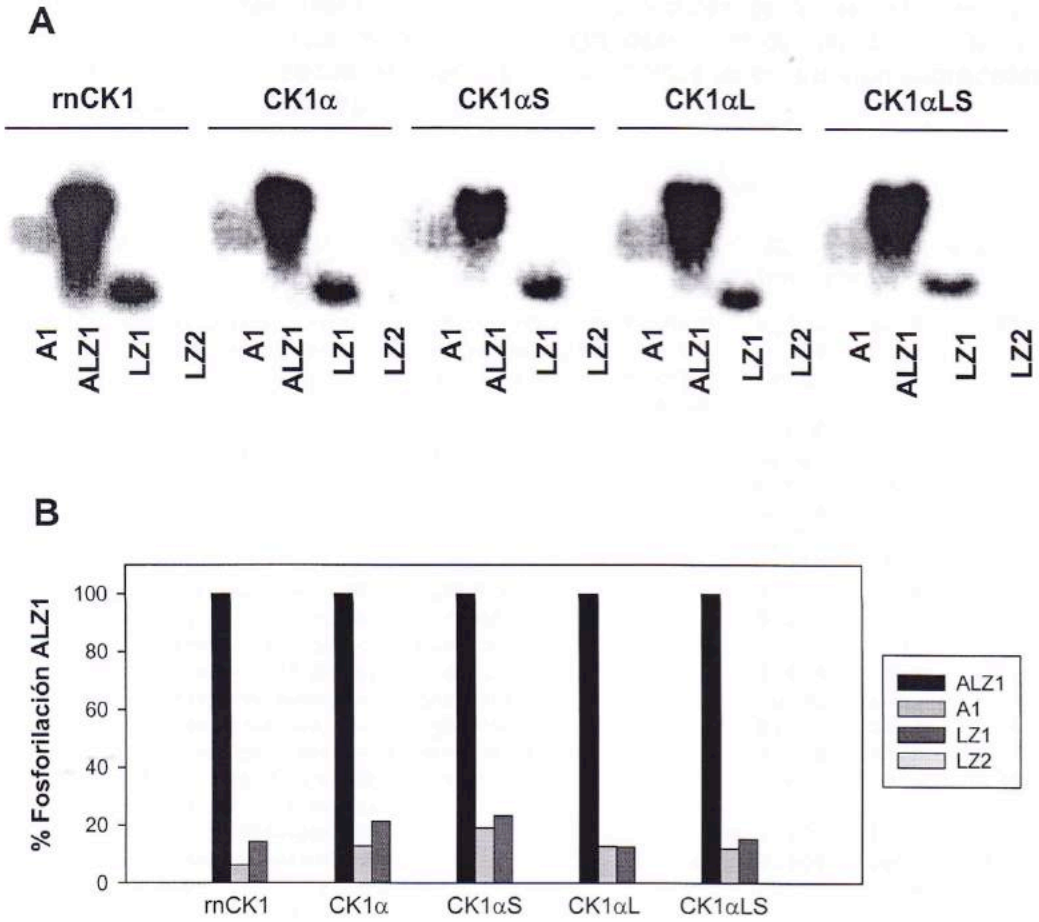


Figura 16. *Fosforilación de péptidos derivados de NFAT4 por diferentes isoformas de CK1.* Los péptidos fueron fosforilados en condiciones estándar, en una concentración de 200 μM, durante 10 minutos a 37ºC, por CK1 de hígado de rata (rnCK1) o las variantes de CK1α de pez cebra. Al finalizar la reacción, se agregó tampón de carga y las muestras se analizaron en un gel de poliacrilamida-SDS al 18%. La posición de los péptidos marcados y los niveles de radioactividad asociada a cada uno de ellos fue detectada en un Phosphorimager. A, imagen del gel obtenida de Phosphorimager. B, gráfico representando los niveles de fosforilación de los péptidos en relación a ALZ1, para cada isoforma de CK1.

Tabla 3. *Constantes cinéticas de CK1 de hígado de rata para péptidos derivados de NFAT4.* Las sustituciones individuales o múltiples son destacadas en negrita. Las mutaciones realizadas por razones metodológicas se encuentran subrayadas. pS representa a fosfoserina.

PÉPTIDO	SECUENCIA	K_m (mM)	V_{max} (pmol/min)	V_{max}/K_m
ALZ1	RRRSWFSDASSAESLSHIYDDVDSELNEAAARFTLGSPLTSPGGSPGG	0,553	31,6	57
ALZ2	RRRSWFSDASSAESLSHIYDDVDAELNEAAARFTLGSPLTSPGGSPGG	0,320	27,4	85
LZ1	YDDVDSELNEAAARFTLGSPLTSPGGSPGG	n.d.	n.d.	-
LZ2	YDDVDSELNEAAARFTLGSPLTSPGGSPGG	n.d.	n.d.	-
AL1	RRRSWFSDASSAESLSHIYDDVDAELNEAAAR	0,606	33,3	54
AL2	RRRSWF**A**DASSAESLSHIYDDVDAELNEAAAR	0,285	3,3	11
AL3	RRRSWFSD**AA**SAESLSHIYDDVDAELNEAAAR	0,680	13,6	20
AL4	RRRSWFSDAS**AA**ESLSHIYDDVDAELNEAAAR	0,722	17,1	23
AL5	RRRSWFSDASSA**E**A**L**SHIYDDVDAELNEAAAR	1,052	16,0	15
AL6	RRRSWFSDASSAES**LA**HIYDDVDAELNEAAAR	0,419	9,5	22
AL7	RRRSWFSDAS**G**AES**L**GHIYDDVDAELNEAAAR	0,312	10,0	32
AL8	RRR**G**WF**G**DAGSAE**G**LSHIYDDVDAELNEAAAR	0,215	6,1	28
AL9	RRRSWFS**G**ASSA**G**SLSHIYDDVDAELNEAAAR	n.d.	n.d.	-
AL10	RRRSWFSDASSAESLSHIY**GG**VGAGLNGAAAR	1,428	6,3	4
AL11	RRRSWFS**A**ASS**AA**SLSHIYDDVDAELNEAAAR	n.d.	n.d.	-
AL12	**SS**RSWFSDASSAESLSHIYDDVDAELNEAAAR	0,156	34,1	218
AL13	RRRSWF**pS**DASSAESLSHIYDDVDAELNEAAAR	0,033	201,5	6106
AL14	RRRSWF**pSG**ASSAGSLSHIYDDVDAELNEAAAR	0,027	210,2	7785
A1	RRRSWFSDASSAESLSHI	3,225	35,0	10
A2	SSRSWFSDASSAESLSHI	1,170	27,6	23
A3	RRRSWF**pS**DASSAESLSHI	0,106	258,7	2440
A4	RRRSWF**pS**GASSAGSLSHI	0,105	223,4	2127
A5	RRSPSPASSISSRSWFSDASSAESLSHI	1,923	43,0	22
A6	RRSP**pS**PASSISSRSWFSDASSAESLSHI	0,058	25,7	443
A7	RRSP**pS**PAGGISSRSWFSDASSAESLSHI	1,538	16,5	10
A8	RRSP**pS**PASSISSRSWF**A**DASSAESLSHI	0,047	21,5	457
A9	RRSPSPASSISSRSWF**pS**DASSAESLSHI	0,090	213,8	2375

fosforilado por CK1 en una manera dependiente de la interacción de la enzima con el dominio A. Sin embargo, al realizar un análisis que consistía en la fosforilación del péptido ALZ1, seguido de su tripsinización, análisis de HPLC e identificación de los péptidos trípticos por espectrometría de masas, se determinó que el péptido tríptico 203-218, que contenía la secuencia del dominio Z (Figura 15) no se encontraba fosforilado por CK1, mientras que el péptido 173-202, que contenía los dominios A y L, se encontraba fosforilado en más de un residuo aminoacídico (Marin, Burzio y col., 2002).

7.2 Fosforilación por CK1 de péptidos con mutaciones individuales.

En vista las observaciones mencionadas en la sección anterior, se sintetizó en primer lugar un péptido igual a ALZ1, pero con la serina 194 reemplazada por alanina para eliminar la interferencia de la fosforilación de este residuo (ALZ2, Figura 15). Este péptido resultó ser un buen sustrato para las enzimas, aunque con una eficiencia algo menor que ALZ1 (Figura 17B, Tablas 3 y 4). Luego se sintetizó el péptido AL1 que, como su nombre lo indica, estaba formado solamente por los dominios A2 y L, excluyendo el dominio Z (Figura 15). Este péptido resultó ser un sustrato tan eficiente como ALZ2, confirmando la noción de que el dominio Z no es fosforilado por CK1, contrario a lo postulado por Zhu y col. (1998) (Figura 17 y Tablas 3 y 4). Dos péptidos que fueron sintetizados posteriormente, el AL4 y AL6, contenían una mutación de serina a alanina en las posiciones 181 y 186, respectivamente, las dos serinas que se

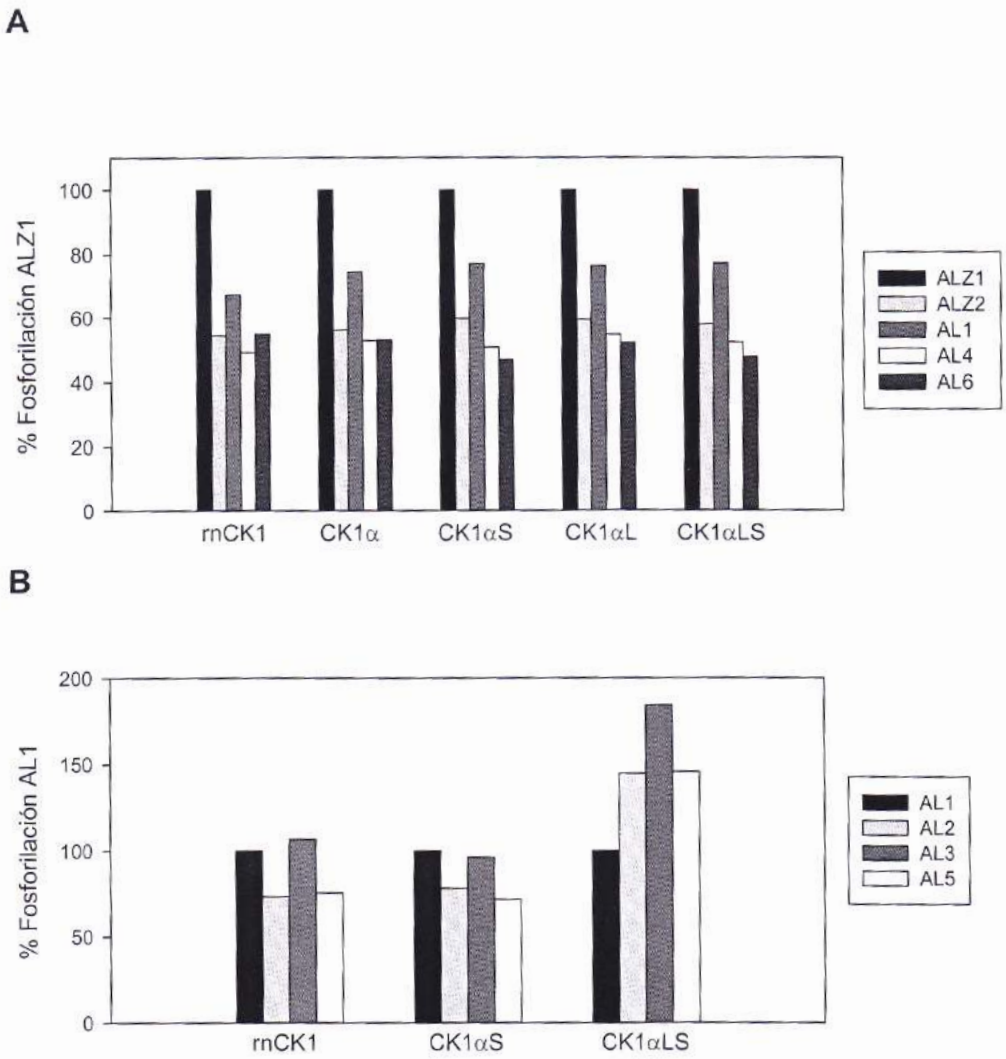


Figura 17. *Fosforilación de péptidos derivados de NFAT4 con mutaciones individuales en residuos de serina*. Los péptidos fueron fosforilados en las condiciones estándar descritas en Métodos, en una concentración de 200 μM. La determinación de radioactividad asociada fue realizada por la técnica del papel de fosfocelulosa. A, fosforilación de péptidos que contienen mutaciones individuales de cada una de las serinas de consenso. Se ensayaron la CK1 de hígado de rata y las cuatro subisoformas de CK1α de pez cebra. B, fosforilación de péptidos con mutaciones individuales en cada una de las serinas de la región A2 que no constituyen consenso de CK1. Se ensayaron la CK1 de hígado de rata y CK1αS y CK1αLS de pez cebra.

Tabla 4. *Constantes cinéticas de CK1αS y CK1αLS recombinantes de pez cebra para péptidos derivados de NFAT4.* La nomenclatura de los péptidos es la misma que en la Tabla 3.

	CK1αS			CK1αLS		
	Km (mM)	**Vmax** (pmol/min)	**Vmax/Km**	**Km** (mM)	**Vmax** (pmol/min)	**Vmax/Km**
A1	2,73	5,90	2,16	2,77	7,28	2,63
AL1	0,28	3,31	11,66	0,59	6,87	11,67
AL2	0,27	1,55	5,72	0,39	2,25	5,73
AL3	1,25	7,35	5,86	0,64	5,16	8,09
AL4	0,35	2,91	8,34	0,42	3,23	7,79
AL5	1,42	7,98	5,61	2,85	14,07	4,93
AL6	0,30	1,60	5,27	0,58	3,31	5,73
AL10	2,37	3,59	1,52	3,12	4,43	1,42
ALZ1	0,26	2,74	10,58	0,38	7,43	19,51
ALZ2	0,28	6,01	21,55	0,42	3,41	8,06

encontraban formando un consenso para CK1. Como se observa en la figura 17A y las tablas 3 y 4, aunque la eficiencia de fosforilación disminuyó parcialmente, ninguna de estas dos mutaciones abolió la fosforilación por CK1, lo que sugería que más de un residuo estaba siendo fosforilado en la región. Se prosiguió con la mutación individual de cada una de las serinas restantes, es decir, las serinas 177 (AL2), 180 (AL3) y 184 (AL5). Ninguna de estas mutaciones, sin embargo, fue capaz de eliminar la capacidad de ser fosforilado por CK1 (Figura 17B y Tablas 3 y 4), aunque la mutación de la serina 177 provoca un descenso importante en la velocidad máxima para CK1 de hígado de rata (Tabla 3). Estos resultados indican claramente la ocurrencia de múltiples fosforilaciones en la región A2 de NFAT4.

Se determinaron las constantes cinéticas para los péptidos utilizados en este estudio, de la CK1 de hígado de rata (Tabla 3) y de CK1αS y CK1αLS de pez cebra (Tabla 4). Estos resultados confirman las observaciones anteriores, en que ninguna de las mutaciones individuales produce un efecto drástico sobre la eficiencia catalítica de estos péptidos, pero la ausencia de la región "linker" provoca un aumento de 1 orden de magnitud en la Km aparente.

7.3 Importancia de residuos acídicos en la fosforilación de péptidos de NFAT4 por CK1.

El hecho de que el péptido A1 sea un sustrato mucho menos eficiente que ALZ1 e incluso que ALZ2, el cual posee los mismos residuos fosforilables

que A1, sugiere que la región "linker" que se encuentra entre los dominios A y Z estaría jugando un papel en la eficiencia catalítica de los péptidos, posiblemente aumentando la interacción de la enzima con el sustrato. Una evidencia consistente con esta teoría es que, al aumentar la fuerza iónica en el ensayo, se ve afectada la fosforilación del péptido ALZ1 en mucho mayor medida que el péptido A1 (Figura 18). Esto podría reflejar que la región "linker" le conferiría a CK1 la capacidad de establecer una interacción más permanente que la del tipo enzima/sustrato con este péptido. La región "linker" contiene una agrupación de 5 residuos acídicos, los que, siendo la CK1 una enzima acidotrópica, podrían ser responsables de la asociación de la enzima con el péptido. Para explorar esta posibilidad, se sintetizó un péptido en el que se reemplazaron todos los residuos acídicos de la región "linker" por glicina (no a alanina, por razones técnicas). Este péptido, denominado AL10, exhibió una capacidad de ser fosforilada por CK1 de rata similar al péptido A1, que carece de la región "linker" (Figura 19 y Tablas 3 y 4). Otro péptido, el AL9, tiene mutados los dos residuos acídicos presentes en la región A2, los que están dentro de secuencias de consenso, constituyendo potenciales determinantes de fosforilación por CK1. Este péptido es prácticamente incapaz de ser fosforilado por CK1 (Figura 19 y Tabla 3), pero se transforma en un inhibidor competitivo eficiente para la fosforilación de otros péptidos de NFAT4, como ALZ1 (Marin, Burzio y col., 2002). Esto significa que el péptido AL9, a pesar de no ser fosforilable por CK1, mantiene su capacidad de interactuar con la enzima, probablemente a través de la región "linker", la cual se encuentra intacta en este péptido. Por otro lado, la

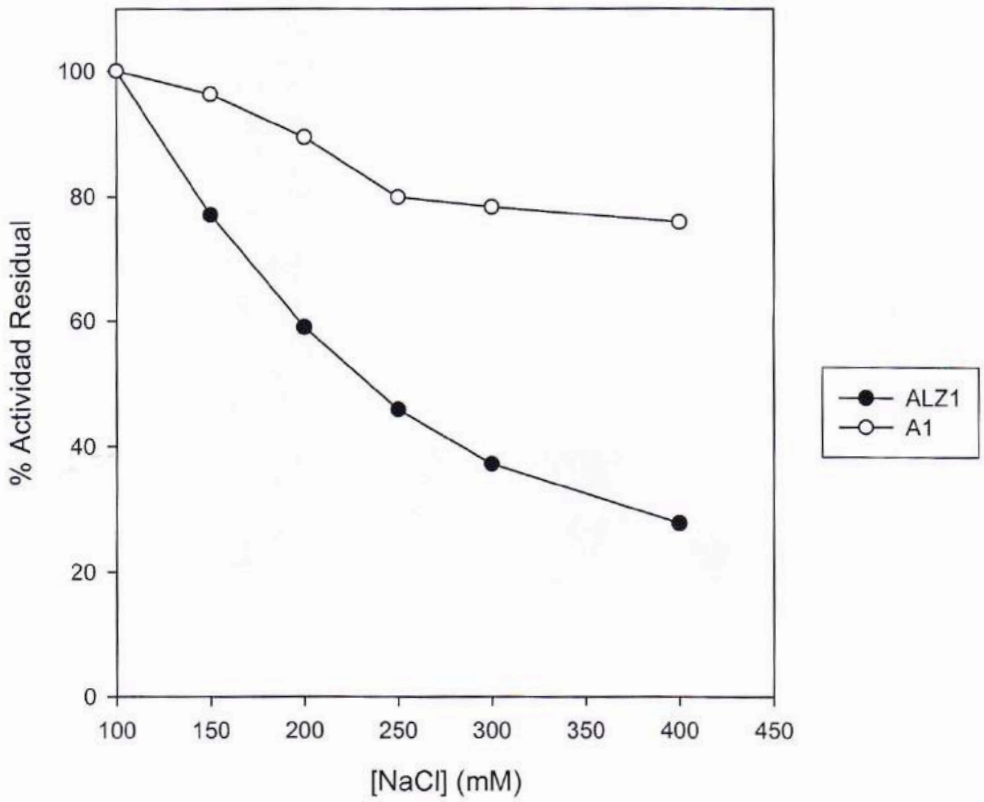


Figura 18. *Efecto de la fuerza iónica sobre la fosforilación de péptidos ALZ1 y A1 por CK1 de hígado de rata*. Los ensayos fueron realizados en condiciones estándar, de la manera descrita en la leyenda de la figura 17, y a las concentraciones indicadas de NaCl.

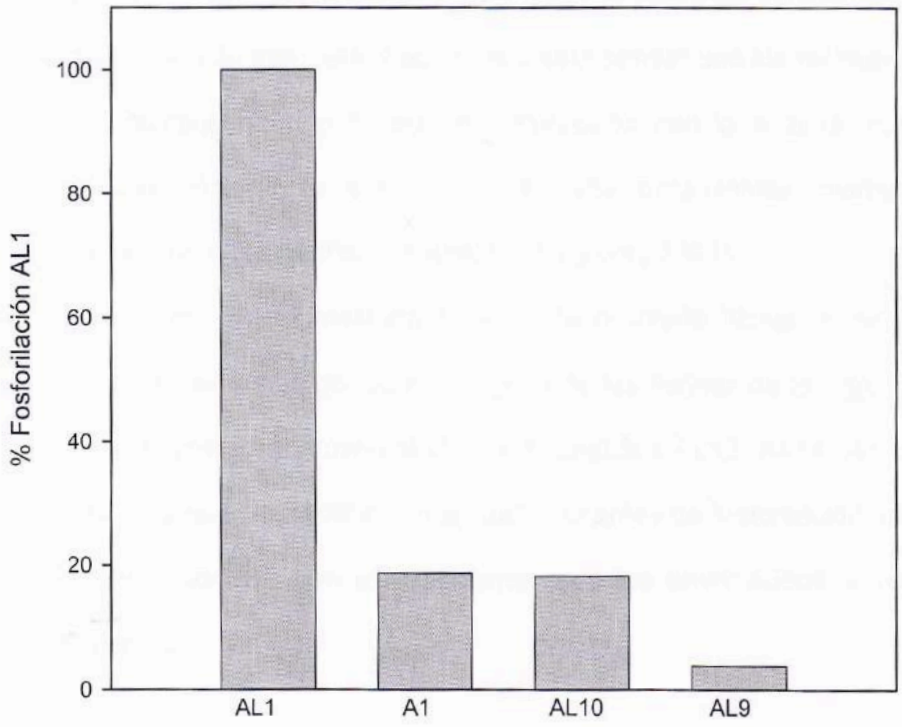


Figura 19. *Fosforilación de péptidos de NFAT4 con mutaciones en bloque*. Los péptidos fueron fosforilados en las condiciones descritas en la leyenda de la figura 16. Se utilizó CK1 de hígado de rata.

nula capacidad de sustrato del péptido AL9 sugiere que las serinas 181 y 186 serían los principales blancos de fosforilación. Sin embargo, al mutar estos dos residuos en bloque, no se observó efecto alguno sobre las constantes cinéticas (Tabla 3). Considerando este hecho, se podría pensar que los residuos acídicos estarían cumpliendo una función de interacción con la enzima, puesto que posee una afinidad lo suficientemente alta para inhibir fuertemente la fosforilación de otros péptidos (Marin, Burzio y col., 2002).

El efecto de los residuos acídicos de la región "linker" o de A2 se ve sobrepasado, sin embargo, cuando alguna de las serinas de la región A2 o A1 es reemplazada por fosfoserina (Tabla 3, péptidos AL13, AL14, A3, A4, A6 y A9), residuos que se transforman en determinantes de fosforilación, que, como ha sido mencionado, son más eficientes que los aminoácidos acídicos para estos efectos.

C. CARACTERIZACIÓN DE SUBISOFORMAS DE CK1α DE PEZ CEBRA EN CÉLULAS COS-7 EN CULTIVO.

1. Expresión de subisoformas de CK1α recombinantes en células Cos-7 en cultivo.

Se subclonaron las subisoformas CK1α, CK1αS y CK1αL en el vector de expresión de eucariontes, pCEFL-HA. Este vector posee un promotor constitutivo de citomegalovirus (CMV) y le confiere a la proteína exógena un

epítope de hemaglutinina (HA) en el extremo N-terminal, el cual le permite ser detectada y aislada mediante un anticuerpo específico.

2. Actividad enzimática de subisoformas de CK1α expresadas en células Cos-7.

Se realizaron transfecciones de células Cos-7 en cultivo del vector vacío o conteniendo el inserto de cada una de las subisoformas de CK1α de pez cebra. La figura 20 ilustra un análisis de Western donde se detectaron las proteínas recombinantes con un anticuerpo monoclonal específico contra el epítope de HA. En la figura 21 se grafican los niveles de actividad quinasa de lisados totales y de inmunoprecipitados sobre un péptido sustrato específico de CK1, el péptido RRKAAIGDDDDAYSITA. En todos los lisados de células transfectadas con subisoformas de CK1α, se observa una actividad basal en ausencia de sustrato agregado que aumenta levemente con el péptido y disminuye en gran medida con la presencia del inhibidor específico de CK1, CKI-7 (Figura 21A). Los lisados provenientes de células transfectadas con el vector vacío, sin embargo, muestran una actividad basal mayor a los lisados de las células que expresan CK1α exógena. Esto se podría deber a que la sobreexpresión de las variantes de CK1α ectópicas inhiban a algunas quinasas endógenas en forma directa o compitiendo por sustratos intracelulares. Pero al inmunoprecipitar los lisados con anticuerpo anti-HA, sólo se observa un nivel de

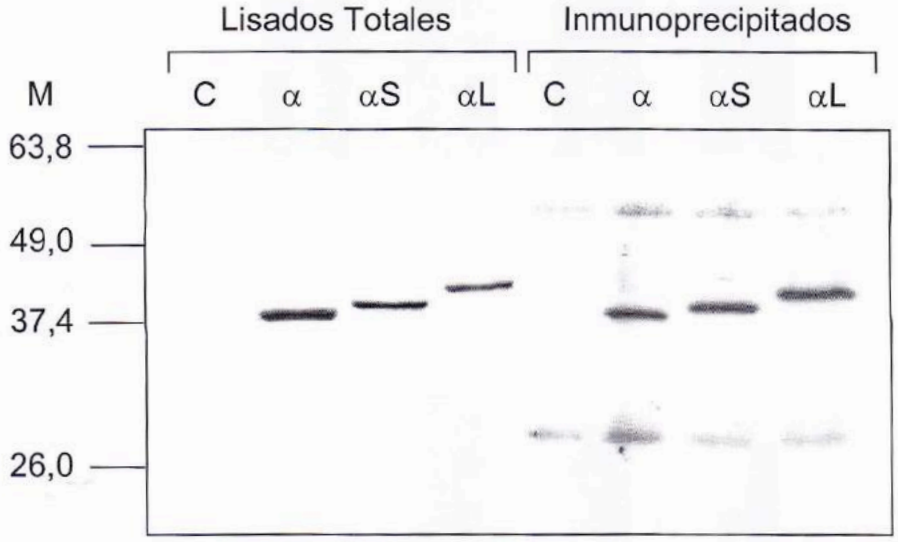


Figura 20. *Expresión de variantes de CK1α en células Cos-7 en cultivo.* Las células fueron transfectadas con vector pCEFL-HA vacío (C) o con construcciones de CK1α, CK1αS o CK1αL subclonadas en dicho vector. A las 48 horas post-transfección, las células fueron cosechadas y lisadas y posteriormente los lisados fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-HA monoclonal de la manera descrita en Métodos. Se muestra un análisis de Western de los lisados e inmunoprecipitados, donde las proteínas recombinantes fueron detectadas mediante la incubación con el anticuerpo monoclonal anti-HA y un segundo anticuerpo específico contra IgG de ratón y conjugado a fosfatasa alcalina. En la columna M se ilustran las posiciones de los marcadores de tamaño molecular.

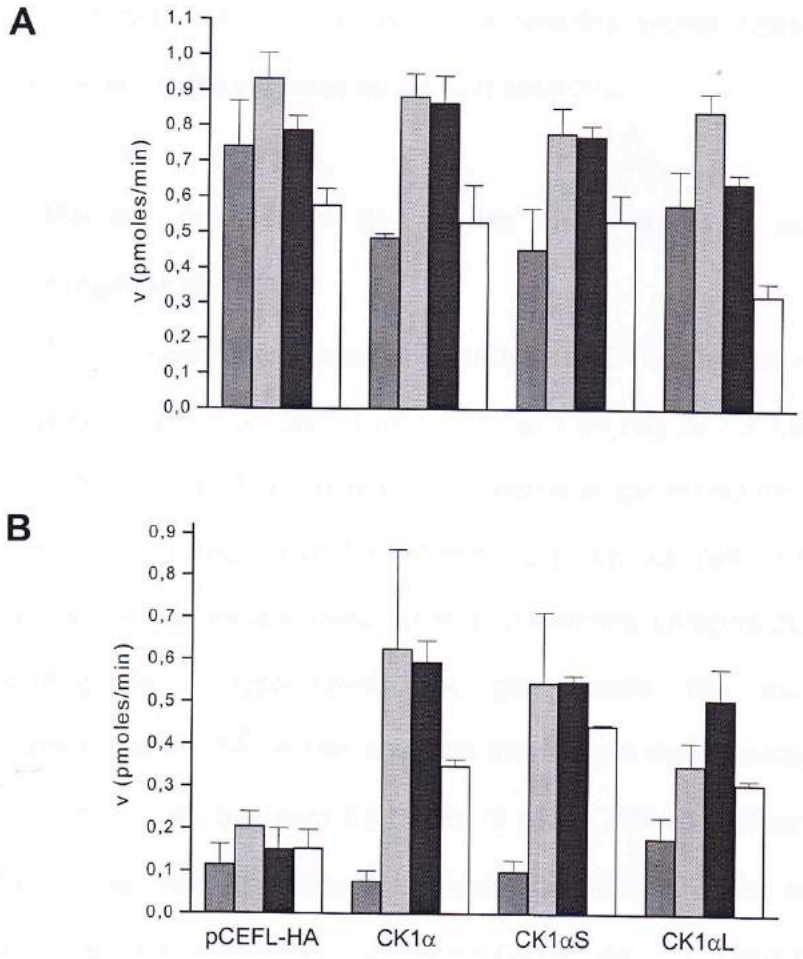


Figura 21. *Actividad CK1 de lisados e inmunoprecipitados de células transfectadas con variantes de CK1α.* Las células fueron transfectadas con pCEFL-HA o con las construcciones de las variantes de CK1α en dicho vector (CK1α, CK1αS y CK1αL). 48 horas posttransfección, las células fueron lisadas y los lisados fueron inmunoprecipitados de la manera descrita en Métodos. A, actividad de lisados totales sin sustrato agregado (■) o en presencia de 200 μM péptido RRKDLHDDEEDEAMSITA (▒), 5 mg/ml β-caseína (■) o 5 mg/ml β-caseína + 200 μM CKI-7 (□). Se utilizaron 5 μg de lisado por ensayo. B, actividad de inmunoprecipitados de los lisados totales. Los colores representan las mismas condiciones que en A. En cada ensayo se utilizó una cantidad de inmunoprecipitado obtenido de 25 μg de lisado total inicial.

actividad significativa en los inmunoprecipitados provenientes de células transfectadas con las variantes de CK1α (Figura 21B).

3. Marcaje metabólico de células que expresan subisoformas exógenas de CK1α.

Células Cos-7 transfectadas con CK1α o CK1αL fueron marcadas 30 horas post-transfección con 0,1 mCi/ml de una mezcla de ^{35}S-Met y ^{35}S-Cys, durante 16 horas a 37ºC. Después de reemplazar por medio frío, se tomaron muestras a T_0, 30 min, 1 h, 1 h 50 min y 5 h. Las células fueron lisadas e inmunoprecipitadas de la manera descrita en Métodos. La figura 22A muestra la autorradiografía correspondiente al gel donde se analizaron los inmunoprecipitados. Se percibe aquí una disminución de la marca que es más rápida para CK1αL que para CK1α. En la figura 22B se grafican los niveles relativos de la marca asociada a las bandas de las CK1, donde se obtiene un valor de vida media de 400 minutos para CK1α y de 97 minutos para CK1αL. En los inmunoprecipitados de células marcadas no se observaron proteínas que hayan coinmunoprecipitado en forma específica con CK1α, CK1αS o CK1αL, diferentes a las contaminantes que se observan en los inmunoprecipitados de los lisados de células transfectadas con el vector vacío (resultados no mostrados).

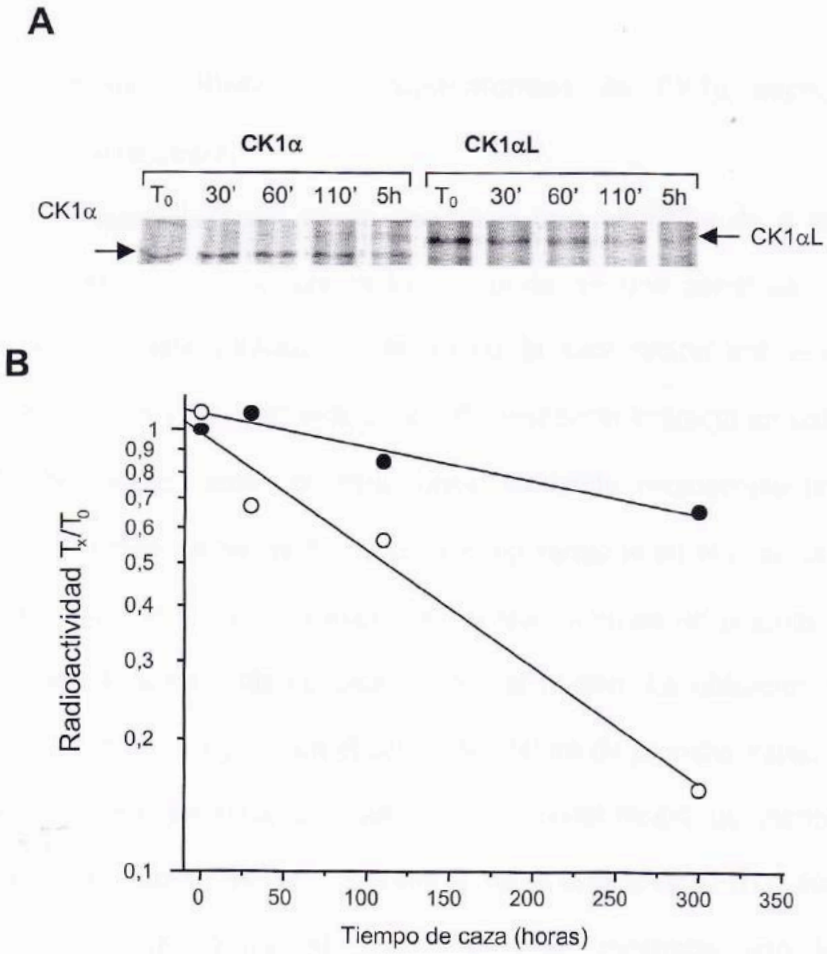


Figura 22. *Determinación de vida media de CK1α y CK1αL.* Se transfectaron células Cos-7 con pCEFL-HA/CK1α o con pCEFL-HA/CK1αL. 30 horas post-transfección, las células fueron marcadas durante 16 horas con 0,1 mCi/ml de una mezcla de [^{35}S]-Met y [^{35}S]-Cys, luego de lo cual las células fueron lavadas e incubadas en medio frío. A los tiempos indicados, las células fueron lavadas, cosechadas y lisadas de la manera descrita en Métodos. A, los inmunoprecipitados se analizaron en un gel de poliacrilamida-SDS al 10% en condiciones denaturantes, luego de lo cual el gel fue secado y expuesto a película Kodak BIOMAX durante 5 días a -70ºC. B, la radioactividad asociada a las proteínas marcadas con [^{35}S]-Met fue cuantificada mediante densitometría, utilizando el programa UN-SCAN-IT y la marca remanente respecto de la marca inicial fue graficada en función del tiempo de caza. Los símbolos representan CK1α (●) y CK1αL (○).

4. Inmunolocalización de subisoformas de CK1α expresadas en células Cos-7.

El inserto L posee en su secuencia una extensión de 4 aminoácidos básicos, KRKR, lo cual podría formar parte de una señal de localización nuclear. Por este motivo, se determinó la localización subcelular de las subisoformas α y αL mediante inmunofluorescencia indirecta en células Cos-7 transfectadas con estas construcciones. Mediante microscopía confocal, se visualizó la localización de CK1α predominantemente en el citoplasma (Figura 23), en muchos casos con exclusión nuclear, aunque en algunas células se observaba la señal más concentrada en el núcleo. La ubicación nuclear se confirmó por la cotinción con el colorante yoduro de propidio, observado como una coloración amarilla, producto de la colocalización de dicho colorante (fluorescencia roja) con el isotiocianato de fluoresceína (FITC, fluorescencia verde). La subisoforma αL, por otro lado, mostraba una localización invariablemente predominante en el núcleo, en algunos casos con un nivel más bajo de expresión en el citoplasma y en otros, con exclusión citoplasmática (Figura 24). En todos los casos se observó una total ausencia de señal perceptible en el nucleolo (Figuras 23 y 24), por lo que se puede concluir que ninguna de las variantes de CK1α participa en los procesos propios de este organelo, tales como la síntesis y ensamblaje de componentes ribosomales.

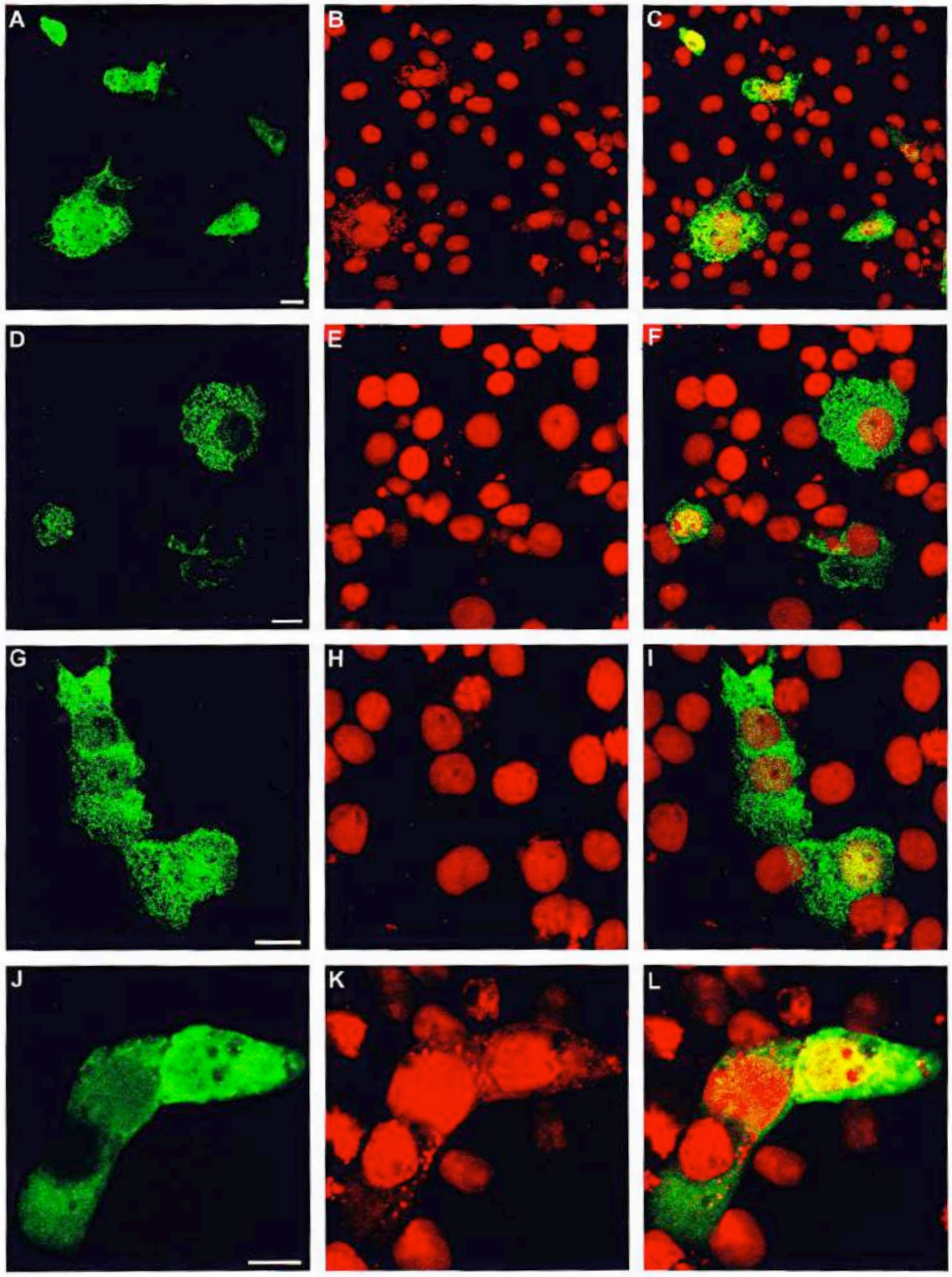

A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L

Figura 23. *Inmunolocalización de HA-CK1α en células Cos-7 en cultivo.* Las células fueron transfectadas con CK1α/pCEFL-HA de la manera descrita en Métodos. 48 h posttransfección, las células fueron fijadas y la proteína exógena fue detectada mediante un anticuerpo monoclonal anti-HA y un segundo anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC). Posteriormente las células fueron incubadas en yoduro de propidio y analizadas en un microscopio confocal Zeiss Axiophot en la Unidad de Análisis Celular Integral de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Se muestran 4 campos distintos y a diferente aumento. Se presenta la imagen obtenida de fluorescencia verde correspondiente a fluoresceína (FITC) (A, D, G y J), fluorescencia roja proveniente del yoduro de propidio (B, E, H y K) y la sobreposición de ambas, que da origen a una fluorescencia amarilla por colocalización de ambos fluoróforos (C, F, I y L). Las barras representan 10 μM.

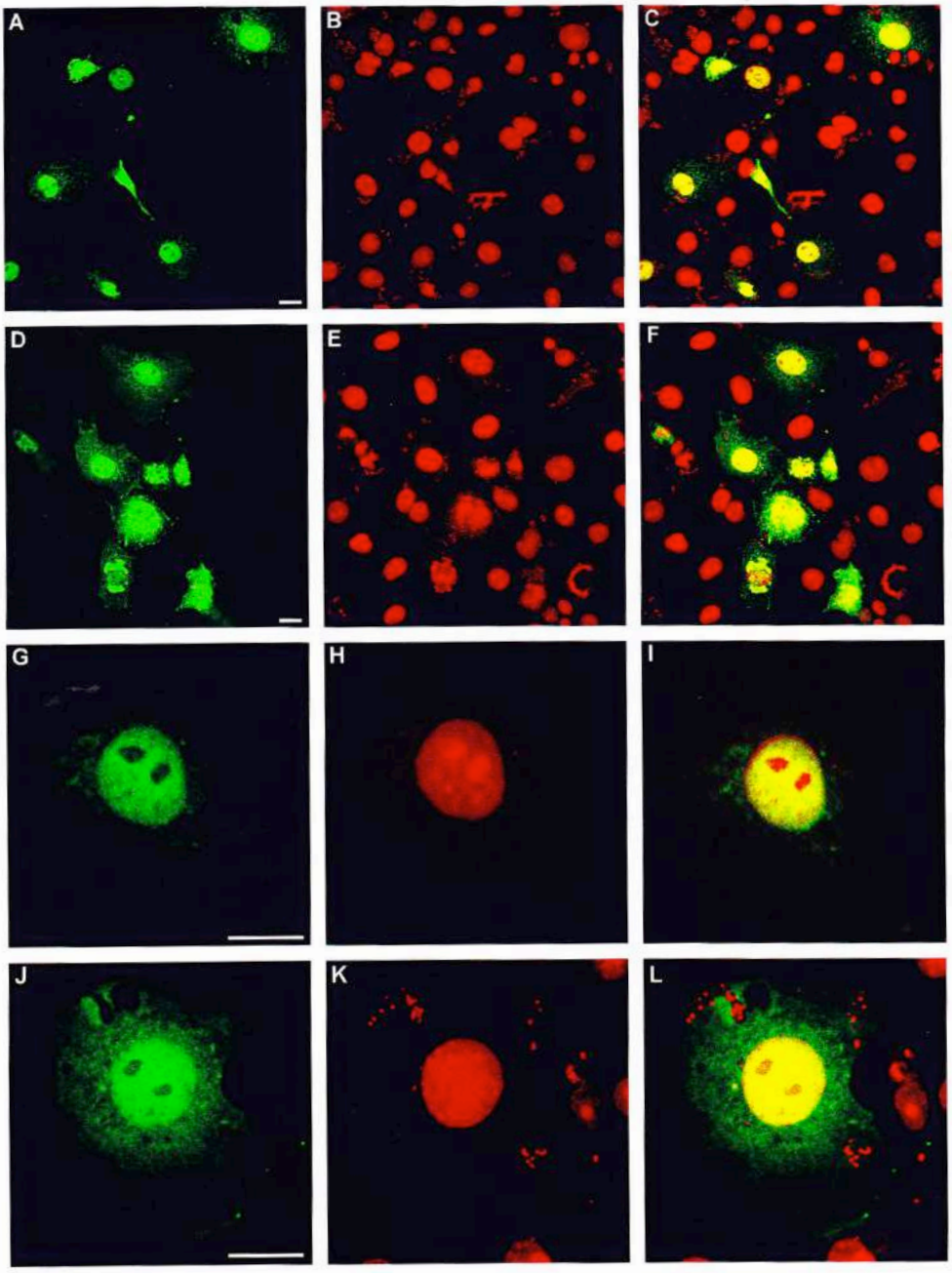

A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L

Figura 24. *Inmunolocalización de HA-CK1αL en células Cos-7 en cultivo.* Las células fueron transfectadas con CK1αL/pCEFL-HA y 48 h posttransfección, las células fueron fijadas y procesadas de la misma manera descrita en la leyenda de la Figura 23. Se presenta la imagen de FITC (A, D, G y J), yoduro de propidio (B, E, H y K) y la sobreposición de ambas, (C, F, I y L). Las barras representan 10 μM.

D. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE CK1α DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE PEZ CEBRA.

1. Determinación de niveles relativos de expresión de mensajeros mediante RT-PCR.

Para determinar los patrones de expresión de los mensajeros de las cuatro subisoformas de CK1α durante el desarrollo de pez cebra, se aisló RNA total de embriones en diferentes estadíos de desarrollo y se practicó sobre él experimentos de RT-PCR utilizando un partidor río abajo del sitio de ubicación del inserto S (zCK1αRT3') para la transcripción inversa y el mismo partidor, junto con otro que hibrida río arriba del sitio donde se inserta la secuencia L (αL5'), para el PCR. Como se observa en la figura 25, la variante α se observa como la más abundante entre los estadíos de 1-2 células y 50% epibolía. Le sigue en abundancia la αL, la αS y finalmente la αLS cuya expresión es muy baja. A partir del estadío de 80% epibolía, la proporción relativa de αS parece ser equivalente a la de α. Entre las 22 y las 31 h, la abundancia relativa de la variante αL sufre una caída, observándose en muy baja proporción a los 4-5 días. En todos los estadíos, la variante αLS es la menos abundante, aunque parece ocurrir un leve aumento en su abundancia relativa entre las 8 y las 35 h. El patrón de expresión observado en pez cebra adulto es similar a la de los embriones de 1-2 células hasta las 5 horas (50% epibolía), lo que nos permite especular que los mensajeros de las variantes de CK1α en estos estadíos sean

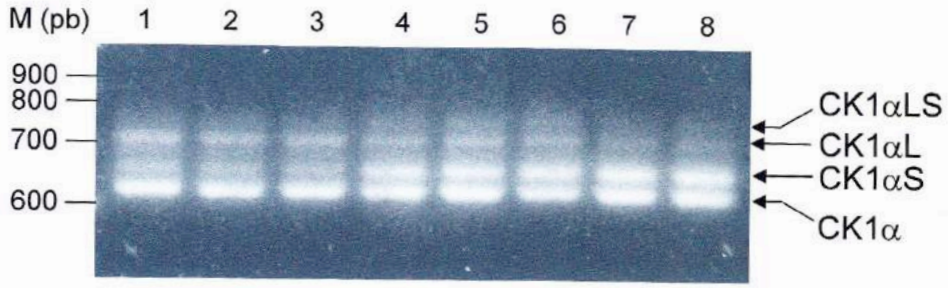


Figura 25. *Amplificación de mRNA de variantes de CK1α mediante RT-PCR de embriones de pez cebra*. Se realizó la transcripción reversa con 1 μg de RNA total y se utilizó 1 μl de cada reacción para la amplificación por PCR. Se muestra el resultado de un experimento donde se analizó RNA de embriones de 1-2 células (1), 3 h (2), 50% epibolía (3), 80% epibolía (4), 11-12 h (5), 22-24 h (6), 31-35 h (7) y 4-5 d (8). Se indica la posición de migración de los fragmentos de amplificación obtenidos de los clones de CK1α, CK1αS, CK1αL y CK1αLS en pT7.7-H6. M indica la posición de los estándares de tamaño molecular.

principalmente de origen materno, aunque para concluir esto debería realizarse el mismo experimento sobre óvulos no fecundados.

2. Hibridación *in situ* sobre embriones de pez cebra.

Para determinar el patrón de expresión de CK1α durante la embriogénesis de pez cebra, se realizó hibridación *in situ* sobre embriones completos fijados a diferentes tiempos de desarrollo, utilizando para ello una sonda de cRNA transcrita *in vitro* y marcada con digoxigenina-11-UTP, siendo detectada posteriormente con un anticuerpo específico contra dicho compuesto. La sonda derivó de la secuencia completa del cDNA de CK1α (clon 5.2), por lo cual probablemente se detectan los transcritos de las cuatro variantes de procesamiento. En la figura 26 se muestra el resultado de este experimento, donde se observa una expresión generalizada hasta las 24 horas de desarrollo. A los 2 días se comienza a localizar más específicamente el mensajero hacia la zona anterior del embrión, donde se ve una concentración localizada en la cabeza y en el primordio de la aleta pectoral. A los 3 días, se observa aún esta mayor concentración en la cabeza, pero de manera más difusa. Estos datos sugieren que la expresión de CK1α se encontraría sometida a un grado de regulación temporal y espacial durante el desarrollo embrionario de pez cebra, aunque cn este experimento no se puede predecir la expresión espacial de cada variante de procesamiento en forma específica.

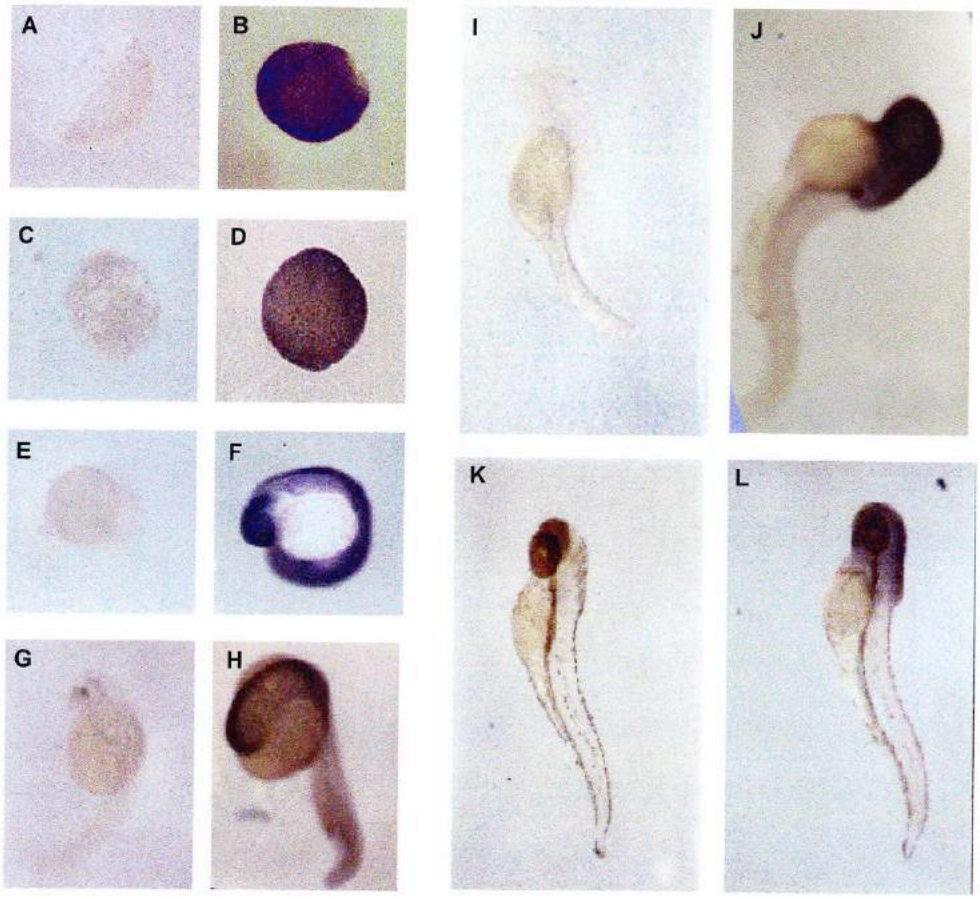


Figura 25. *Hibridación in situ sobre embriones de pez cebra.* Los embriones fijados y prehibridados fueron incubados con sondas de cRNA transcritas *in vitro* desde un clon de cDNA de CK1α de pez cebra, en presencia de digoxigenina-11-UTP. A, C, E, G, I y K: sonda sentido; B, D, F, H, J y L: sonda antisentido. A y B: 6 horas de desarrollo; C y D: 10 h; E y F: 18 h; G y H: 24 h; I y J: 52 h; K y L: 72 h. La expresión es generalizada, hasta los 2 días, donde se localiza en mayor grado en la cabeza y en la aleta pectoral. La coloración café observada en los embriones en K y L corresponde a la pigmentación que comienza a aparecer en este estadío del desarrollo.

DISCUSIÓN

El gran espectro de acción de la proteínaquinasa CK1, el que abarca un amplio rango de sustratos, compartimentos y fases del ciclo celular, torna evidente la noción de que esta enzima debiera estar estrictamente regulada dentro de la célula, para limitar el acceso a los sustratos fisiológicos. Algunas instancias posibles de regulación incluyen compartimentalización, modificación post-traduccional, procesamiento alternativo, fosforilación jerárquica y estabilidad de mensajeros.

El mencionado fenómeno de procesamiento alternativo que sufren al menos 3 isoformas de CK1 amplía aun más la gama de formas disponibles de esta enzima en la célula y plantea la interrogante sobre las posibles funciones específicas de cada una de ellas. En el caso de CK1γ1, la forma más corta generada por procesamiento alternativo se encuentra predominantemente en testículo, mientras que la forma larga tiene una distribución más general. Este es un caso en el que la expresión de una de las variantes se encuentra regulada de una forma tejido-específica. Sin embargo, en los otros casos conocidos de procesamiento alternativo de isoformas de CK1, como ocurre con CK1α y CK1γ3, no se conocen las consecuencias funcionales de este fenómeno.

El trabajo de esta tesis se ha centrado en el estudio de las características bioquímicas y celulares de las variantes generadas por procesamiento alternativo del mensajero de CK1α de pez cebra. Este fenómeno da origen a cuatro subisoformas definidas por la presencia o ausencia de dos segmentos, llamados los insertos L y S. Mientras el inserto S se ubica en el extremo C-terminal de la proteína, el inserto L se encuentra ubicado en medio del dominio catalítico de la quinasa, específicamente en la bisagra, en vecindad próxima a la hendidura donde se aloja el ATP y se produce la transferencia del grupo fosforilo. La ocurrencia de esta inserción se ha descrito en varias especies, desde pollo hasta humano y, en esta tesis, se ha encontrado en un organismo evolutivamente inferior a las aves, el pez cebra. Este grado de conservación en la escala evolutiva además de la similitud de las secuencias de los insertos entre especies, sugiere que la presión selectiva ha mantenido estas subisoformas por tener cada una de ellas una importancia fisiológica específica. En particular resulta intrigante la situación del inserto L, que interrumpe la secuencia aminoacídica del dominio catalítico. El objetivo de esta tesis fue la de caracterizar las variantes de procesamiento de CK1α de pez cebra para intentar dilucidar la función fisiológica de estos insertos.

1. Clonamiento de subisoformas de CK1α de pez cebra.

La orientación original de esta tesis apuntaba al clonamiento de diferentes isoformas de CK1 y el estudio de su expresión durante el desarrollo

embrionario. Sin embargo, durante la etapa de clonamiento, en la búsqueda de la isoforma α, se encontraron dos clones de cada una de las subisoformas de CK1α más cortas, CK1α y CK1αS (Figuras 1 y 2. Al analizar la secuencia aminoacídica deducida de los clones (Figura 5), se encuentra que la secuencia que constituye la subisoforma más corta (α) presenta sólo una diferencia con respecto a las de otras especies que se encuentran más arriba en la escala evolutiva, como *Xenopus laevis*, bovino y humano. Esto habla del altísimo grado de conservación de esta isoforma de CK1 a través de la evolución.

Cuando se identificaron estos 4 clones, estaba publicada la existencia de dos formas de CK1α en humano, las que fueron denominadas CK1α y CK1α2 (Tapia y col., 1994). Esta última corresponde a lo que más tarde se llamó CK1αS. Por otro lado, la existencia del inserto L se había descrito en bovino (Rowles y col., 1991) y en rata se publicó la coexistencia de CK1α y CK1αL (Zhang y col., 1996). Esto abrió la posibilidad de que ambos insertos coexistieran en la misma especie, dando origen, por combinatoria, a 4 potenciales subisoformas a partir del mismo gen de CK1α. Por este motivo, después del aislamiento de los clones de CK1α y CK1αS de la genoteca de pez cebra, se procedió a la búsqueda de clones que contuvieran el exón codificante para el inserto L en este organismo. Mediante el uso de partidores específicos diseñados sobre la secuencia de los clones aislados, se realizó RT-PCR con RNA total de pez cebra adulto, de lo cual se obtuvieron 2 fragmentos. El más largo codificaba para una secuencia que guardaba un alto grado de identidad

con las secuencias del inserto L descritas hasta el momento, de bovino y de rata. Utilizando este fragmento como sonda, se rastreó nuevamente la genoteca, pero sólo se logró aislar un clon que se encontraba trunco en ambos extremos (Figuras 3 y 4). Este resultado, sumado al hecho de que en el primer rastreo no se haya encontrado clon alguno que codificara para una subisoforma L sugiere que los mensajeros de estas subisoformas son escasos o posiblemente inestables. La inestabilidad de mensajeros de CK1α ha sido descrita en humano (Yong y col., 2000). Las subisoformas αS y αL son codificadas ambas por dos tipos de mensajeros, de 2,4 kpb y de 4,2 kpb. La existencia de dos tamaños de mensajeros de CK1α también fue descrita en bovino (Rowles y col., 1991). En humano, el mensajero más largo de los dos posee una serie de elementos desestabilizadores de RNA, que son secuencias ricas en AU (Yong y col., 2000). Esto puede constituir una instancia de regulación de la expresión de CK1α en humano, que posiblemente se aplique a otras especies.

Durante el desarrollo de estos rastreos, se publicó el hallazgo de las cuatro subisoformas de CK1α en pollo (Green y Bennet, 1998). En este trabajo se describió la coexpresión simultánea de los mensajeros de las 4 variantes en diferentes tejidos y tipos celulares, al igual que como se demostró en la presente tesis, en embriones y adulto de pez cebra (Figuras 6 y 25), lo que sugiere que, en varias especies, las cuatro subisoformas coexistirían como proteínas dentro del mismo organismo. Por este motivo, nos interesamos en el

estudio de las características individuales de cada una de estas subisoformas de CK1α y las consecuencias bioquímicas y celulares específicas de la presencia de cada uno de los insertos. Consiguientemente, se procedió a construir CK1αL y αLS y a subclonar las 4 subisoformas en vectores de expresión para procariontes y para células eucarióticas (Figura 7).

2. Caracterización bioquímica de subisoformas de CK1α expresadas en *E. coli*.

Las enzimas expresadas en *E. coli* BL21(DE3) fueron purificadas de manera parcial (Figura 7), puesto que estas proteínas se expresaban en forma predominante formando cuerpos de inclusión, y la fracción soluble constituía un porcentaje mínimo de la proteína recombinante total. Por otro lado, estas enzimas comenzaban a eluir de la columna de Ni^{++}-NTA-agarosa a una concentración de imidazol de aproximadamente 20 mM, y a 40 mM, concentración a la que usualmente se lavan las columnas de Ni^{++}, se perdía el 70-80% de la actividad. Por ello, la columna se lavó con 10 mM imidazol y, consecuentemente, los eluídos resultaban con un bajo grado de pureza (Tabla 1). La caracterización bioquímica, sin embargo, se realizó con estas preparaciones de enzima parcialmente purificada, puesto que el perfil electroforético de las proteínas contaminantes era muy similar entre todas ellas (Figura 7), lo que hace posible la comparación entre las variantes de CK1α en términos de determinaciones que no requieren preparaciones de enzima pura,

como son Km, Vmax, inhibiciones, termoestabilidad o interacción con otras proteínas, como la proteínaquinasa PKA. Las preparaciones obtenidas, por otro lado, presentaban un alto nivel de actividad (Tabla 1). Entre diferentes preparaciones se repetía la tendencia de las isoformas L de poseer mayor actividad específica que las más cortas. Esta propiedad concuerda con lo publicado por Zhang y col. (1996), donde CK1αL de rata exhibía una actividad específica tres veces la de CK1α, tanto para caseína como para fosvitina y 10 veces mayor para el antígeno T grande de SV40. En este trabajo se informó también sobre diferencias de Km aparentes de CK1α y CK1αL para fosvitina, donde la forma más larga exhibía un valor que superaba en casi un orden de magnitud a la más corta. En esta tesis, sin embargo, no se observó tal diferencia. Los valores de Km aparente obtenidos hacia diferentes sustratos proteicos y peptídicos no muestran diferencias significativas entre las subisformas (Tabla 2), por lo cual el aumento en la actividad específica exhibida por las formas L no se debería a una mayor afinidad hacia los sustratos de esta naturaleza, sino probablemente a un aumento en la Vmax debido a una alteración en la tasa de recambio de estos. Los resultados obtenidos con las enzimas que presentan el inserto L reflejan consistentemente un aumento de 2 veces en la Km aparente para ATP (Tabla 2 y Figura 8). Esta evidencia sugiere que la presencia del inserto L provocaría una disminución en la afinidad por el nucleótido. También en este trabajo se observó una disminución de 2 veces en la sensibilidad al inhibidor específico para CK1, el CKI-7 (Figura 9). Siendo éste

un inhibidor competitivo para ATP (Chijiwa y col., 1989), el resultado observado es otro reflejo de la influencia que ejercería el inserto L sobre la región donde se encuentra el sitio de unión del nucleótido, al cual se encuentra muy próximo. La explicación podría radicar, posiblemente, en que la presencia de esta secuencia de 28 aminoácidos que no exhibe elementos conspicuos de estructura secundaria altere la orientación o la distancia de ambos lóbulos entre sí, mediante un aumento en la flexibilidad de la bisagra. Este fenómeno podría, a su vez, desalinear algunos de los residuos aminoacídicos de ambos lóbulos que interactúan con el complejo de MgATP, desembocando en una menor afinidad por el nucleótido y, por analogía, con el inhibidor competitivo, CKI-7. El cambio estructural provocado por este inserto, no obstante, no fue suficiente para permitir el uso de GTP como dador de fosfato alternativo, lo que permite concluir que, cualquiera sea el efecto que produce el inserto L sobre el sitio de unión de ATP, este sería lo suficientemente sutil para mantener la especificidad de nucleótido. También el aumento en la actividad específica provocada por el inserto L podría explicarse por una flexibilización de la bisagra. Un fenómeno de esta naturaleza podría facilitar la salida más rápida del producto, reflejándose en un aumento de la tasa de recambio.

Al examinar el efecto del polímero de ácido glutámico y tirosina, poliGlu^{80}Tyr^{20}, se observó una tendencia de las formas L a ser levemente más sensibles que las que no tienen L, en especial la CK1αLS, que posee ambos insertos (Figura 10). Estos resultados podrían explicarse por el hecho de que

los dos insertos, S y L, tienen un alto contenido de aminoácidos básicos. En el caso del inserto L existe una extensión de 4 residuos básicos y en el inserto S hay 4 lisinas, repartidas a lo largo de la secuencia. Estos residuos podrían aumentar en algún grado la afinidad del polímero, que contiene un 80% de residuos de ácido glutámico, por las enzimas que tengan uno o ambos insertos.

La actividad de tirosinaquinasa, por otro lado, había sido descrito para la subisoforma αS de *Xenopus* (Pulgar y col., 1996), por lo cual se pensó en la posibilidad de que las formas que no contuvieran el inserto S carecieran de esta propiedad. Sin embargo, las cuatro subisoformas de CK1α fueron capaces de fosforilar el polipéptido poli($Glu^{80}Tyr^{20}$) en una manera dependiente del tiempo (Figura 11C). Por ende, la condición de quinasa de especificidad dual no radica en la presencia o ausencia de estos insertos. Por otro lado, la inhibición de la fosforilación de β-caseína (Figuras 11A y B) se explica por la condición del polímero de actuar como sustrato alternativo (Figura 11C), lo que se percibe como una disminución de la radioactividad asociada al papel de fosfocelulosa, ya que el poli$Glu^{80}Tyr^{20}$ fosforilado no se adhiere.

Se realizaron también en este estudio experimentos con objeto de determinar si uno o ambos insertos tenían consecuencias sobre la autofosforilación de las variantes de CK1α. Las cuatro variantes fueron capaces de autofosforilarse, aunque se detectó una tasa de autofosforilación levemente mayor en las subisoformas que contienen la secuencia L (Figura 12). Esto podría significar que esta secuencia posee uno o más sitios adicionales de

autofosforilación, o bien, que estas variantes exhiben una mayor capacidad de autofosforilarse en los mismos sitios que las más cortas. La dilucidación de este mecanismo requerirá de un análisis de péptidos fosforilados derivados de la digestión de las enzimas, para determinar si hubiese algún residuo adicional, presente en alguno de los dos insertos, que sea blanco de autofosforilación. El inserto L, en particular, posee 7 residuos de serina, alguno de los cuales podría ser autofosforilado.

Otro efecto observado por la presencia del inserto L es el de la disminución de la estabilidad térmica de las subisoformas de CK1α que la contienen. Al ser preincubadas las cuatro variantes durante lapsos variables de tiempo a 40ºC previo a la reacción de fosforilación del sustrato, la actividad de las formas con el inserto L decayó mucho más rápidamente que las formas más cortas (Figura 13). Este resultado sugiere que la conformación de la región alrededor del inserto L se encuentra estructurada más débilmente que en las subisoformas que no contienen esta secuencia, siendo afectada en mayor medida por una condición denaturante, como es el aumento de la temperatura. Es posible que la presencia de esta secuencia en la región bisagra afecte o elimine algunas de las interacciones que ocurren dentro de la estructura de la enzima en las isoformas más cortas.

Finalmente, en los estudios bioquímicos que se realizaron con las subisoformas de CK1α, se exploró la posibilidad de que algunas o todas ellas fueran fosforiladas por otras quinasas. El inserto L posee dos secuencias que

podrían constituir un consenso para la fosforilación de dos proteínaquinasas. La primera secuencia, SSQD, contiene las características propias de las secuencias de consenso de CK2, donde hay un residuo acídico en la posición +3 con respecto al residuo a fosforilar. Al explorar esta posibilidad, sin embargo, no se encontró efecto alguno ejercido por la subunidad catalítica de CK2 (CK2α) o por la holoenzima (CK2$\alpha_2\beta_2$) (resultados no mostrados). Este resultado no es sorpresivo desde el punto de vista fisiológico, en el sentido de que el residuo de serina que parecía ser fosforilable por CK2 no se encuentra conservado, puesto que este varía entre prolina y treonina en otras especies (Zhang y col., 1996; Green y Bennet, 1998; Yong y col., 2000). El otro sitio candidato para la fosforilación por otra quinasa es la secuencia RKRSM, que representa un consenso para la proteínaquinasa dependiente de cAMP (PKA). En los experimentos realizados, la fosforilación de CK1αL se ve muy estimulada en presencia de PKA, mientras que la diferencia observada con CK1α es mucho menor. Este hecho sugiere que la secuencia mencionada podría efectivamente ser un blanco de fosforilación por PKA. En la estructura tridimensional de CK1 (Esquema 4), el sitio de inserción de la secuencia L se encontraría expuesta al medio, constituyendo un blanco accesible para PKA, si esta fosforilación ocurriese en la célula. Por otro lado, la fosforilación de αS también se ve estimulada en presencia de PKA, en menor medida que αL, pero la isoforma que contiene ambas inserciones, CK1αLS, muestra una estimulación de la fosforilación estimada en unas 70 veces en presencia de

PKA. Esto sugiere que la fosforilación ocurriría en ambos insertos, lo cual es inesperado, puesto que en el inserto S no existe secuencia canónica alguna para PKA. Se podría explicar por una simple acción de masas, de manera que al haber una gran cantidad de cada enzima en la mezcla de reacción, la PKA sea capaz de fosforilar secuencias que divergen un tanto de su consenso. Sin embargo, en la secuencia común de CK1α existen 2 consensos más de PKA que, a juzgar por los resultados con la variante más corta, no se estarían fosforilando de manera importante en estas condiciones, probablemente por encontrarse poco expuestas. De cualquier modo, la fosforilación de CK1α en sus insertos por PKA podría constituir, de ocurrir *in vivo*, una forma de regulación diferencial que dependa de la variante de que se trate. Estas fosforilaciones podrían incidir sobre algún factor como actividad, especificidad o localización, por lo cual este hallazgo merece ser estudiado más a fondo utilizando técnicas experimentales más refinadas que involucren la construcción de mutantes y estudios en células vivas.

La fosforilación además es aparentemente mutua, mostrando PKA un mayor nivel de fosforilación en presencia de ambas isoformas de CK1α. Como se mencionó en Resultados, esto no necesariamente implica la ocurrencia de una fosforilación mutua, sino que podría significar que ambas enzimas estimulen mutuamente su autofosforilación, en cuyo caso el efecto final sería igualmente interesante desde el punto de vista de la regulación fisiológica de estas enzimas.

El resultado de este experimento se torna más interesante a la luz de las evidencias obtenidas de los experimentos de transfección de variantes de CK1α e inmunocitoquímica (Figuras 23 y 24). La variante que posee el inserto L, el cual contiene un consenso para PKA evolutivamente conservado, se concentra en el núcleo, mientras que la variante α se localiza principalmente fuera del núcleo. Esta observación cobra interés a la luz de los experimentos de PKA, ya que esta enzima, luego de ser estimulada, se libera de sus subunidades inhibitorias en el citoplasma, lo que posibilita a las subunidades catalíticas para migrar al núcleo en una conformación activa (Taylor y col., 1990). De esta manera, la PKA al menos se encontraría disponible espacialmente para interactuar con CK1αL y/o CK1αLS.

3. Caracterización de la fosforilación de NFAT4 por CK1.

El factor de transcripción NFAT4 actúa en la activación de linfocitos T, formando parte del control de la respuesta inmune. Este factor ejerce su efecto migrando al núcleo, donde activa la transcripción de genes de citoquinas. En el trabajo publicado por Zhu y col. (1998), se identificó a la CK1α como la quinasa responsable de fosforilar al factor en el dominio Z, una de las regiones conservadas, el cual enmascara de esta manera a la señal de localización nuclear. Los autores concluyeron que el subdominio A2 de NFAT4, que se encuentra hacia el N-terminal del dominio Z, actuaría, luego de ser parcialmente fosforilado CK1α, como sitio de anclaje o "docking" de la enzima, para estimular

la fosforilación del dominio Z. Nuestro interés por este tema afloró debido a la posibilidad de buscar diferencias en el comportamiento de "docking" entre las cuatro subisoformas de CK1α. Para ello se planteó como aproximación experimental el uso de péptidos sintéticos derivados de la secuencia de NFAT4 descrita como blanco de fosforilación por CK1. Este trabajo fue realizado en colaboración con los laboratorios de los Drs. Lorenzo Pinna y Flavio Meggio de la Universidad de Padua, Italia y sus resultados dieron origen a una publicación reciente (Marin, Burzio y col., 2002).

Los resultados obtenidos con los primeros péptidos eran consistentes con la conclusión de Zhu y col. (1998). El péptido que estaba formado por el subdominio A2 solamente (péptido A1) era fosforilado en forma limitada, al igual que el péptido que contenía el dominio Z precedido por la región "linker" (péptido LZ1). El péptido "madre", no obstante, que estaba conformado por estas 3 regiones, era fosforilado con una eficiencia mucho mayor que la suma de los otros dos (Figuras 14 y 15), lo que confirmaba la noción de que A2 actuaría como "docking" para exacerbar la fosforilación de Z. Sin embargo, la mutación de la serina 194 de la región L a alanina provocó la abolición total de fosforilación del péptido LZ2. Esto, sumado al hecho de que el péptido tríptico conformado por el dominio Z no se encontraba fosforilado, contradice la teoría de que el dominio Z sería el blanco principal de fosforilación por CK1, como concluyeron Zhu y col. (1998). La raiz de esta discrepancia es difícil de establecer; la gran diferencia está en que Zhu y col. utilizaron fusiones del

dominio A2 con GST y un fragmento recombinante de NFAT4 (aa 187-351) que comenzaba río abajo de la región "linker" y se extendía hasta pasada la señal de localización nuclear. Mediante el uso de péptidos sintéticos que incluían el dominio A, junto con la región "linker", hemos dilucidado más finamente algunos aspectos estructurales que determinan la fosforilación de esta secuencia por CK1. La región "linker" contenía un único residuo de serina que formaba parte de una secuencia de consenso de fosforilación primaria (no dirigida por fosfoaminoácidos), correspondiente a la serina 194. Este residuo tiene sólo una moderada influencia sobre la capacidad del péptido madre de actuar como sustrato de CK1 y, debido a ello, la mayoría de los estudios fueron llevados a cabo sobre péptidos que tenían este residuo sustituído por alanina. Aunque en estos casos la región "linker" no era fosforilada, estimulaba considerablemente la fosforilación de los péptidos que contenían la secuencia A2 por CK1, siempre que su extensión de residuos acídicos se encontrara intacta. Por encontrarse esta región relativamente distante y C-terminal de la secuencia fosforilable, podría ser considerada como un sitio "docking" funcional. La presencia de este putativo sitio "docking" parece especialmente relevante para la fosforilación de los residuos del dominio A2, que son blancos para la fosforilación por CK1, a pesar de que ninguno de ellos constituye un buen consenso para la enzima. Al sustituir la serina 177 por fosfoserina, sin embargo, la presencia de la región "linker" se torna prácticamente innecesaria, ya que este residuo desencadenaría un fenómeno de fosforilación jerárquica en serie a partir de aminoácidos fosforilados, los que constituyen determinantes de fosforilación por CK1 mucho

más fuertes que los residuos acídicos en la posición -3. La influencia de la región "linker" prevalece, en este caso, aunque es bastante menos notoria que en péptidos no fosforilados previamente.

Cabe mencionar, finalmente, que en estos estudios con los péptidos que contenían sitios "docking" funcionales no se encontraron diferencias de comportamiento entre las subisoformas de CK1α, como se aprecia en las constantes catalíticas de la Tabla 4.

En resumen, el modo de acción de CK1 sobre la secuencia analizada de NFAT4 podría ocurrir en dos etapas principales; en una primera etapa, CK1 podría interactuar con un putativo sitio "docking" ubicado en la región "linker" con una alta afinidad. Esta asociación favorecería la fosforilación de la serina 177 en una segunda etapa, desencadenando un fenómeno de fosforilación jerárquica en serie de otro(s) residuo(s) de serina contenido(s) en el dominio A2. Otra posibilidad es que la serina 177 sea fosforilada previamente por otra quinasa, creando el sitio de consenso para CK1, que proseguiría con la fosforilación jerárquica.

Una situación similar se observa en la β-catenina, en la cual CK1α fosforila un residuo de serina, la Ser45, creando un sitio de fosforilación para GSK3, que desencadena la fosforilación secuencial de 3 residuos que se encuentran río arriba del sitio de CK1 (Liu y col., 2002). El residuo fosforilado por CK1α, en este caso, no constituye un consenso para CK1, salvo con la previa fosforilación de una treonina que se encuentra en la posición -3. Río

abajo de esta secuencia, por otro lado, se encuentra una extensión que contiene, al igual que NFAT4, 5 residuos acídicos, lo que podrían estimular de manera análoga la fosforilación de la serina 45. De manera análoga, la proteína armadillo de *Drosophila*, un ortólogo de β-catenina, es fosforilado por CK1, creándose un sitio para la consiguiente fosforilación por el equivalente de GSK3, ZW3. En armadillo, al igual que en β-catenina, las serinas que son fosforiladas por CK1 no constituyen consenso para dicha quinasa y también existe una agrupación de residuos acídicos ubicada hacia el C-terminal de la serina fosforilada por CK1 cuya mutación provoca una caída en la eficiencia de la fosforilación de esta proteína por CK1 y su consiguiente estabilización (Yanagawa y col., 2002). Con estos precedentes, podemos considerar la posibilidad de que la región "linker" de NFAT4 funcionaría como sitio "docking" en la célula para la fosforilación de residuos de la región A, como mecanismo de enmascaramiento de la señal de localización nuclear.

4. Expresión de subisoformas de CK1α en células en cultivo.

Existe a la fecha una serie de estudios relacionados con el rol fisiológico de CK1, su regulación y localización subcelular en la célula viva (ver Introducción). La CK1α, en particular se ha descrito participando en una serie de procesos celulares, como mitosis (Brockman y col., 1992; Gross y col., 1997), procesamiento de mRNA (Gross y col., 1999), transducción de señales (Tobin y col., 1997; Waugh y col., 1999; Budd y col., 2001) y desarrollo

embrionario (Liu y col., 2002). Esta gran variedad de papeles fisiológicos y localizaciones subcelulares induce a una confusión sobre la situación de esta isoforma dentro de la célula eucarionte. En este trabajo hemos querido resolver algunos aspectos del metabolismo de CK1α y de sus subisoformas dentro de la célula. Para ello se han realizado experimentos de transfección de células Cos-7 con construcciones de subisoformas de CK1α clonadas en el vector de expresión en eucariontes, pCEFL-HA, que le confiere a la proteína ectópica un epítope de hemaglutinina y donde su expresión es dirigida por el promotor constitutivo de citomegalovirus (CMV). Las construcciones transfectadas fueron las de CK1α, CK1αS y CK1αL. La subisoforma CK1αLS no fue incluida en estos estudios, ya que hubo dificultad en su subclonamiento en este vector. Las enzimas recombinantes fueron expresadas en células Cos-7 en forma activa, como se observó en la determinación de actividad quinasa de inmunoprecipitados de células transfectadas. Los lisados totales mostraban poca diferencia en actividad con el lisado de células transfectadas con vector vacío. Sin embargo, en algunos experimentos se observó lo mismo que se muestra en la figura 21, en que la actividad basal de los lisados de células transfectadas con vector vacío es mayor que la de las células que expresan las variantes ectópicas de CK1α. Una explicación de esta observación podría radicar en el gran radio de acción de esta isoforma de CK1. La acción de estas enzimas exógenas podría estar inactivando a otras quinasas celulares, o bien, compitiendo con ellas o con CK1 endógena por los mismos sustratos celulares.

La presencia de una secuencia en CK1α que se encontraría expuesta al medio y sin estructura secundaria aparente, es decir, el inserto L, sugería la posibilidad de que las formas que contienen este inserto podrían ser más susceptibles a la degradación y, por lo tanto, tener una vida media más corta. Por este motivo se realizaron experimentos de pulso y caza sobre células transfectadas con CK1α o CK1αL, marcando las células metabólicamente con una mezcla de ^{35}S-Met y ^{35}S-Cys y posteriormente incubando durante diferentes lapsos de tiempo con un medio que contenía una exceso de L-Met y L-Cys fríos. Los resultados obtenidos de estos experimentos nos indican que efectivamente CK1αL posee una vida media 4 veces más corta que CK1α (Figura 22), lo que podría ser reflejo de que el inserto L esté expuesto al medio y que esto lo haga más accesible a proteasas celulares. Esta diferencia en la estabilidad intracelular es reminiscente de la mayor termolabilidad de las variantes L, las que mostraron ser 4 veces menos estables al ser expuestas a una temperatura de 40ºC (Figura 13). La diferencia podría radicar también en la gran diferencia de localización subcelular entre estas dos isoformas (Figuras 23 y 24), de manera de que la compartimentalización determine la vida media de estas proteínas. De cualquier manera, la duración de ellas dentro de la célula podría constituir una instancia de regulación diferenciada.

La secuencia rica en aminoácidos básicos, contenida en el inserto L, PVGKRKR, parecía constituir una posible señal de localización nuclear. Por ello se realizaron estudios de inmunofluorescencia sobre células transfectadas con

las CK1α o CK1αL para investigar esta posibilidad. Los resultados de estos experimentos fueron variables dentro de la población total de células transfectadas. No obstante, la tendencia de CK1α era mayor de concentrarse predominantemente en el citoplasma y, en muchos casos, como algunos de los que se ilustran en la figura 23, había exclusión nuclear. Estos resultados no nos permiten determinar si la proteína recombinante se encuentra en forma soluble en el citoplasmo o asociado a alguna estructura u organelo en particular, pero la distribución citoplasmática granular recuerda la asociación de CK1α a vesículas secretorias (Brockman y col., 1992). Los resultados obtenidos con CK1αS eran indistinguibles de los de la variante α (resultados no mostrados). Pulgar (1999) detectó la CK1α endógena limitada prácticamente al citoplasma. La diferencia con nuestros resultados puede radicar en el hecho de que las células transfectadas sobreexpresan la enzima y esto resultaría en una distribución más amplia, favorecida posiblemente por difusión pasiva al interior del núcleo.

En contraste con lo observado para CK1α, CK1αL se localizaba siempre en el núcleo y, en algunos casos, con una señal más tenue en el citoplasma, similar en distribución pero menor en intensidad a la observada en el citoplasma de células transfectadas con CK1α. Estas evidencias concuerdan con el antecedente de que, en cerebro de pollo, solamente las isoformas α y αS se encuentran asociadas a los neurofilamentos, excluyendo a las isoformas que poseen el inserto L (Fu y col., 1999). En todos los casos, la señal nuclear se encontraba absolutamente excluída de los nucleolos. El hecho de que Pulgar

(1999) no detectara señal de CK1α endógena en el núcleo se puede explicar por el anticuerpo utilizado en ese estudio, el cual era específico contra una secuencia de CK1α que se encuentra interrumpida en CK1αL, de manera que este anticuerpo no reconoce a las formas con el inserto L (G. Bennet, comunicación personal a J. Allende). Gross y col. (1999), por otro lado, inmunolocalizaron CK1α, en células de hígado de rata, mediante el uso de un anticuerpo dirigido contra una secuencia común a las cuatro variantes. La enzima fue detectada en forma generalizada en toda la célula y, en el núcleo, colocalizaba con los llamados "nuclear speckles" o cúmulos de intercromatina granular, que constituyen centros de almacenaje de factores de procesamiento de mRNA, y otros componentes de la maquinaria de transcripción y procesamiento, incluyendo a la RNA polimerasa II (Lamond y Earnshaw, 1998; Bregman y col., 1995). En estas estructuras, la CK1α se encontraba asociada a cuatro miembros de la familia de las proteínas SR, que son factores de procesamiento de mRNA y era capaz de fosforilarlas *in vitro*. También en estos centros la enzima colocalizaba con snRNPs, como se observó por el uso del anticuerpo anti-Sm. Estas evidencias apuntan a la posibilidad de que la CK1α se encuentre involucrada en procesos del metabolismo de RNAs mensajeros.

Durante la realización de estos experimentos, fue publicado un trabajo que describía la inmunolocalización de las cuatro subisoformas de CK1α de pollo transfectadas en células Cos-7 y NIH-3T3 (Fu y col., 2002). En esta publicación aparecen las dos subisoformas de CK1α que carecen del inserto S

con una localización exclusivamente citoplasmática, mientras que CK1αL y αLS se encuentran solamente en el núcleo. Las discrepancias con nuestros resultados se pueden explicar por la diferencia en las construcciones de CK1α. En la publicación de Fu y col. (2002), se utilizaron fusiones de las variantes de CK1α a la proteína verde fluorescente (green fluorescent protein, GFP), mientras que en este estudio, las construcciones de CK1α contenían un epítope de HA que adicionaba sólo 19 aminoácidos en el extremo N-terminal. De esta manera, la CK1α y CK1αL recombinantes utilizadas en este trabajo poseían un tamaño molecular de aproximadamente 40.000 y 43.000, respectivamente, que podría permitir la difusión pasiva de una proporción de ellas desde o hacia dentro del núcleo a través de los poros nucleares (Allen y col., 2000). Esto sería posible particularmente para la CK1α, lo que podría explicar la mayor disparidad que se observa en la localización de esta subisoforma con respecto a CK1αL. En contraste, la masa molecular de las fusiones de CK1α con GFP usadas por Fu y col (2002) se encontraría por sobre el límite que permite la difusión pasiva al interior del núcleo.

Al igual que como fue descrito por Gross y col. (1999), las isoformas que mostraron localización nuclear se encontraron asociadas a los "nuclear speckles" en ambos tipos celulares utilizados. En nuestro caso, no se visualizaron estas estructuras, puesto que se requiere realizar una preextracción de las células con Triton X-100 antes de la fijación, para eliminar

la señal de fondo homogénea generada por enzima presente en el nucleoplasma.

Las evidencias presentadas en esta tesis, junto con la publicación de Fu y col. (2002), confirman la condición de la secuencia PVGKRKR, absolutamente conservada desde el pez cebra hasta el hombre, de ser una señal de localización nuclear funcional. En base a la estructura cristalográfica de CKi1 de *S. pombe* (Xu y col., 1995) y la CK1δ de rata (Longenecker y col., 1996), el inserto L se encontraría en un "loop" superficial, expuesto al medio y a la posibilidad de interactuar con la maquinaria de importación nuclear. La asociación de CK1αL y CK1αLS con estructuras involucradas en el metabolismo de mRNA podría significar un rol generalizado de estas enzimas en estos procesos, o bien, podría constituir una instancia de autorregulación de la expresión de mensajeros para las subisoformas de CK1α. Por otro lado, el hecho de que dentro del mismo inserto e inmediatamente próximo a la señal de localización nuclear se encuentre un sitio de fosforilación para PKA podría ser fisiológicamente relevante, ya que la fosforilación contigua a la NLS podría producir un enmascaramiento de esta señal al contrarrestar las cargas positivas. De esta manera, si la fosforilación por PKA ocurre *in vivo*, la PKA podría influir directamente sobre la regulación de la localización subcelular de las variantes de CK1α que contengan el inserto L, dependiendo de las condiciones fisiológicas de la célula, en particular bajo diferentes niveles intracelulares de cAMP.

La generación de una señal de localización nuclear por procesamiento alternativo había sido descrita para la CaM quinasa II (Srinivasan y col., 1994) Este procesamiento introduce la secuencia DGVKKRK, muy similar a la señal de localización nuclear del inserto L de CK1α, que dirige a la enzima al núcleo. Esta inserción, sin embargo, ocurre en un sitio que se encuentra hacia el lado C-terminal del dominio quinasa, a diferencia de lo que ocurre en CK1α, donde la inserción se produce en medio del dominio quinasa. Este hecho sugiere que el inserto L cumple otro papel fisiológico, además del efecto sobre la compartimentalización.

No se encontró ni en nuestros estudios, ni en el trabajo de Fu y col. (2001) algún efecto que pudiera estar provocando sobre la localización subcelular el inserto S. Si lo hubiera, este debería ser muy sutil o manifestarse en tipos celulares específicos. No se observan, además, diferencias significativas en el comportamiento catalítico entre CK1α y CK1αS, según los experimentos mostrados en las secciones 2-5 de Resultados. Sin embargo, estas observaciones no deben ser extrapoladas a la situación *in vivo*, ya que la función que cumple tanto el inserto S como el L podría estar supeditada a su expresión en células eucarióticas, cuyo metabolismo difiere del de las bacterias. Ambos insertos poseen una alta proporción (7 y 2, respectivamente) de serinas o treoninas, que podrían ser blancos potenciales de fosforilación por otras proteínaquinasas celulares y, así modificados, uno o ambos insertos podrían ejercer su función. Esto podría ser el caso, por ejemplo, de la fosforilación del

inserto L por parte de la PKA, como se observó en la figura 14. Por otra parte, la existencia generalizada de regiones dentro de las proteínaquinasas que actúan como sitios de acoplamiento o "docking" para proteínas sustrato específicas, sugiere que uno o ambos insertos pudieran conferir tales sitios a la enzima.

5. Estudios de expresión de CK1α en desarrollo embrionario.

Mediante experimentos de RT-PCR se logró la amplificación de fragmentos provenientes de los transcritos de las cuatro subisoformas de CK1α a lo largo de diferentes estadíos de desarrollo embrionario de pez cebra (Figura 25). Estos resultados no se pueden considerar absolutamente cuantitativos por carecer de un estándar interno. Además, es posible que las diferencias observadas entre las intensidades de las bandas correspondientes a cada variante no reflejen la proporción real entre los transcritos iniciales, puesto que, en la amplificación por RT-PCR, las moléculas más largas de RNA suelen encontrarse en desventaja con respecto a las más cortas, lo cual puede distorsionar el resultado final. La posibilidad de que los transcritos provenientes de las variantes más cortas sean amplificados con mayor eficiencia que los de las más largas podría encontrarse apoyada por los resultados de la figura 6B, donde se amplificó en forma específica cada transcrito por separado. Aquí se observa que el transcrito que fue amplificado con mayor eficiencia es el de CK1αLS, el cual, a su vez, es el que aparece como el menos abundante en el experimento de la figura 25. Este efecto, no obstante, puede radicar en que se

utilizaron diferentes oligonucleótidos para el experimento de la figura 6B. A pesar de estas consideraciones, se puede apreciar en la figura 25 que ocurren cambios en la relación de los mensajeros de las variantes de CK1α a lo largo del desarrollo embrionario de pez cebra. Lo que resulta interesante de este resultado es el juego que se produce entre las isoformas αS y αL. La primera sufre un aumento en la abundancia relativa hacia las 8 horas, mientras que el nivel relativo de CK1αL decae entre las 22 y 35 horas de desarrollo. En estos estadíos observamos una abundancia aparentemente similar de CK1α y CK1αS, mientras que CK1αL se encuentra presente en muy baja proporción comparada con las primeras. Esta situación explicaría la dificultad en clonar las variantes L desde la biblioteca de cDNA de pez cebra en λZAP, que fue realizada a partir de RNA de embriones de 24-48 h. La proporción de los cuatro transcritos en adulto es similar al observado entre las 0 y las 3 horas, lo que puede significar que en estos estadíos, la procedencia de los mensajeros sea principalmente materno. El decaimiento en el nivel de CK1αL podría reflejar la desaparición de la dotación materna de este transcrito y un retardo en su síntesis *de novo* en el embrión. Esto implicaría la ocurrencia de un procesamiento alternativo regulado diferencialmente durante el desarrollo.

Este experimento fue repetido varias veces y con diferentes preparaciones de RNA total de embrión. De esta manera, se concluye que la expresión, al menos de las isoformas αS y αL, se encuentra bajo una regulación dependiente del estado del desarrollo embrionario. Los niveles

relativos de mensajeros no reflejan necesariamente la proporción de las proteínas correspondientes. Es posible que existan diferencias en la estabilidad de los transcritos o de las proteínas traducidas. Los resultados de los experimentos de pulso y caza ilustrados en la figura 22 arrojan una amplia diferencia en la estabilidad de CK1α y CK1αL. Si la proteína generada por el transcrito αL es 4 veces más inestable que CK1α, las diferencias observadas en el RT-PCR probablemente se acentuarían aun más, aunque podría ocurrir un grado de compensación por la mayor actividad que exhiben las variantes L (Tabla1).

En el trabajo recientemente publicado por Liu y col. (2002), se identifica a la CK1α como la enzima que ejerce una fosforilación sobre la β-catenina, que permite la acción subsiguiente de GSK3β sobre esta proteína. La identificación de CK1α, está basada en la microsecuenciación de péptidos trípticos obtenidos de una banda de un gel de poliacrilamida. El tamaño molecular y las secuencias de los péptidos se correlacionaban con la subisoforma α, no obstante, esto no descarta la posibilidad de que las otras subisoformas estén participando también en este proceso, en menor cantidad.

La hibridación *in situ* sobre embriones enteros muestra una señal bastante generalizada hasta los embriones de 1 día de edad. A partir de los 2 días, se observa una localización más limitada a la cabeza y a los primordios de las aletas pectorales. Estos resultados se corresponden con el reciente aislamiento de una mutante de pez cebra que presenta defectos en la

condrogénesis, lo que resulta en anormalidades morfológicas en la formación de los arcos branquiales, la mandíbula y la aleta pectoral (Antonelli y col., manuscrito en preparación). Estos experimentos fueron realizados utilizando como sonda al gen completo de cDNA de CK1α (la forma más corta) de pez cebra clonado en pBluescript. Por ello, lo más probable es que se estén detectando las cuatro subisoformas de CK1α. Se podría detectar, también por hibridación *in situ*, la expresión de las secuencias codificantes de los insertos, pero para ello, habría que utilizar sondas oligonucleotídicas.

CONCLUSIONES

1. El pez cebra expresa los transcritos de las cuatro variantes de CK1α, tanto en embrión como en adulto.

2. El inserto L introduce cambios en la enzima que se reflejan en una leve disminución en la afinidad por ATP y una menor estabilidad *in vitro* e *in vivo*.

3. El inserto L posee en su secuencia una señal de localización nuclear.

4. La fosforilación de las variantes que contienen el inserto L se estimula enormemente en presencia de PKA.

5. La región "linker" de NFAT4 actúa como sitio de acoplamiento (docking) en péptidos sintéticos *in vitro*, con una eficiencia similar para las cuatro variantes de CK1α.

6. La expresión de los transcritos de CK1α (como isoforma, incluyendo las 4 variantes) se encuentra espacialmente regulada durante el desarrollo embrionario de pez cebra. La proporción entre los transcritos de las cuatro variantes varía durante el desarrollo.

REFERENCIAS

Agostinis, P., Marin, O., James, P., Hendrix, P., Marlevede, W., Vandenheede, J. R. Y Pinna, L. A. (1992) Phosphorylation of the phosphatase modulator subunit (inhibitor-2) by casein kinase 1. *FEBS Lett.* **305**: 121-124.

Allen, T. D., Gronshaw, J. M., Bagley, S., Kiseleva, E. y Goldberg, M. W. (2000) The nuclear pore compex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm. *J. Cell Sci.* **113**: 1651-1659.

Barik, S., Taylor, R. E. y Chakrabarti, D. (1997) Identification, cloning and mutational análisis of the casein kinase 1 cDNA of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum. J. Biol. Chem.* **272**: 26132-26138.

Behrend, L., Stoter, M., Kurth, M., Rutter, G., Heukeshoven, J., Deppert, W. y Knippschild, U. (2000a) Interaction of casein kinase 1 delta (CK1δ) with post-Golgi structures, microtubules and the spindle apparatus. Eur. *J. Cell. Biol.* **79**: 240-251.

Behrend, L., Milne, D. M., Stoter, M., Deppert, W., Campbell, L. E., Meek, D. W. y Knippschild, U. (2000b) IC261, a specific inhibitor of the protein kinase casein kinase 1-δ and –ε, triggers the mitotic checkpoiunt and induces p53-dependent postmitotic events. *Oncogene* **19**: 5303-5313..

Beyaert, R., Vanhaesebroeck, B., Declercq, W., Van Lint, J., Vandenabeele, P., Agostinis, P, Vandenheede, J. R. y Fiers, W. (1995) Casein kinase-1 phosphorylates the tumor necrosis factor receptor and negatively regulates tumor necrosis factor signaling for apoptosis. *J. Biol. Chem.* **270** 23293-23299.

Bioukar, E. B., Marricco, N. C., Zuo, D. y Larose, L. (1999) Serine phosphorylation of the ligand-activated β-platelet-derived growth factor receptor by casein kinase 1-γ2 inhibits the receptor's autophosphorylating activity. *J. Biol. Chem.* **274**: 21457-21463.

Braun, S., Raymond, W. E. y Racker, E. (1984) Synthetic tyrosine polymers as substrates and inhibitors of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem.* **259**: 2051-2054.

Bregman, D. B., Du, L., Van der Zee, S. Y Warren, S. L. (1995) Transcription-dependent redistribution of the large subunit of RNA polymerase II to discrete nuclear domains. *J. Cell. Biol.* **129**: 287-298.

Brockman, J. L. y Anderson, R. A. (1991) Casein kinase I is regulated by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in native membranes. *J. Biol. Chem.* **266**: 2508-2512.

Brockman, J. L., Gross, S. Sussman, M. R. y Anderson, R. A. (1992) Cell cycle-dependent localization of casein kinase I to mitotic spindles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 9454-9458.

Budd, D. C., Willars, G. B., McDonald, J. E. y Tobin, A. B. (2001) Phosphorylation of the Gq/11-coupled m3-muscarinic receptor is involved in receptor activation of the ERK-1/2 mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **276**: 4581-4587.

Burzio, V., Antonelli, M., Allende, C. C. y Allende, J. E. (2002) Biochemical and cellular characteristics of the four splice variants of protein kinase CK1α from zebrafish (*Danio rerio*). *J Cell Biochem.* **86**: 805-814.

Cegielska, A. y Virshup, D. M. (1993) Control of simian virus 40 DNA replication by the HeLa cell nuclear kinase casein kinase I. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 1202-1211.

Cegielska, A., Fish, K., Rivers, A. y Virshup, D. M. (1998) Autoinhibition of casein kinase I ε (CKIε) is relieved by protein phosphatases and limited proteolysis. *J. Biol. Chem.* **273**: 1357-1364.

Crabtree, G. R. (2001) Calcium, calcineurin and the control of transcription. *J. Biol. Chem.* **276**: 2313-2316.

Chijiwa, T., Hagiwara, M. y Hidaka, H. (1989) A newly synthesized selective casein kinase I inhibitor, N-(2-aminoethyl)-5-chloroisoquinoline-8-sulfonamide and affinity purification of casein kinase I from bovine testis. *J. Biol. Chem.* **264**: 4924-4927.

de Groot, R. P., den Hertog, J., Vandenheede, J. R., Goris, J. Y Sassone-Corsi, P. (1993) Multiple and cooperative phosphorylation events regulate the CREM activator function. *EMBO J.* **12**: 3903-3911.

DeMaggio, A. J., Lindberg, R. A., Hunter, T. y Hoekstra, M. F. (1992) Tha budding yeast HRR25 gene product is a casein kinase I isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 7008-7012.

Desdouits, F., Cohen, D., Nairn, A., Greengard, P. Y Girault, J.-A. (1995) Phosphorylation of DARPP-32, a dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, by casein kinase *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **270**: 8772-8778.

Dhillon, N., Hoekstra, M. F. (1994) Characterization of two protein kinases from *Schizosaccharomyces pombe* involved in the regulation of DNA repair. *EMBO J.* **13**: 2777-2788.

Dubois, T., Rommel, C., Howell, S., Steinhussen, U., Soneji, Y., Morrice, N., Moelling, K., y Aitken, A. (1997) 14-3-3 is phosphorylated by casein kinase I on residue 233. Phosphorylation at this site *in vivo* regulates Raf/14-3-3 interaction. *J. Biol. Chem.* **272**: 28882-28888.

Dumaz, N., Milne, D. M. y Meek, D. W. (1999) Protein kinase CK1 is a p53-threonine 18 kinase which requires prior phosphorylation of serine 15. *FEBS Lett.* **463**: 312-316.

Dunlap, J. C. (1999) Molecular bases for circadian clocks. *Cell* **96**: 271-290.

Estrada, E., Agostinis, P., Vandenheede, J. R., Goris, J., Merlevede, W., Francois, J., Goffeau, A. y Ghislain, M. (1996) Phosphorylation of yeast plasma membrane H^+-ATPase by casein kinase I. *J. Biol. Chem.* **271**:32064.32072.

Fish, K. J., Cegielska, A., Getman, M., Landes, G. M., y Virshup, D. M. (1995) Isolation and characterization of human casein kinase Iε (CKI), a novel member of the CKI gene family. *J. Biol. Chem.* **270**: 14875-14883.

Flotow, H. y Roach, P. J. (1989) Synergistic phosphorylation of rabbit muscle glycogen synthase by cyclic AMP-dependent protein kinase and casein kinase I. Implications for hormonal regulation of glycogen synthase. *J. Biol. Chem.* **264**: 9126-9128.

Flotow, H., Graves, P. R., Wang, A., Fiol, C. J., Roeske, R. W. y Roach, P. J. (1990) Phosphate groups as substrate determinants for casein kinase I action. *J. Biol. Chem.* **265**: 14264-14269.

Flotow, H. y Roach, P. J. (1991) Role of acidic residues as substrate determinants for casein kinase I. *J. Biol. Chem.* **266**: 3724-3727.

Frylinck, L. y Dubery, I. A. (1998) Protein kinase activities in ripening mango, *Mangifera indica L.* fruit tissue I. Purification and characterization of a calcium-stimulated casein kinase-I. *Biochim. Biophys. Acta* **382**: 65-79.

Fu, Z., Green, C. L. y Bennett, G. S. (1999) Relationship between casein kinase I isoforms and a neurofilament-associated kinase. *J. Neurochem.* **18**: 745-757.

Fu, Z., Chakraborti, T., Morse, S., Bennett, G. S. y Shaw, G. (2001) Four casein kinase I isoforms are differetially partitioned between nucleus and cytoplasm. *Exp. Cell Res.* **269**: 275-286.

Ghoshal, N., Smiley, J. F.., DeMaggio, A. J., Hoekstra, M. F., Cochran, E. J., Binder, L. I y Kuret, J. (1999) A new molecular link between the fibrillar and granovacuolar lesions of Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* **155**: 1163-1172.

Graves, P. R., Haas, D. W., Hagedorn, C. H., DePaoli-Roach, A. A. Y Roach, P. J. (1993) Molecular cloning, expression and characterization of a 49-kilodalton casein kinase I isoform from rat testis. *J. Biol. Chem.* **268**: 6394-6401.

Graves, P. R. y Roach, P. J. (1995) Role of COOH-terminal phosphorylation in the regulation of casein kinase I δ. *J. Biol. Chem.* **270**: 21689-21694.

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

Gross, S. D., Hoffman, D. P., Fisette, P. L., Baas, P. y Anderson, R. A. (1995) A phosphatidylinositol 4,5-*bis*phosphate-sensitive casein kinase Iα associates with synaptic vesicles and phosphorylates a subset of vesicle proteins. *J. Cell Biol.* **130**: 711-724.

Gross, S. D., Simerly, C., Schatten, G. y Anderson, R. A. (1997) A casein kinase I isoform is required for proper cell cycle progression in the fertilized mouse oocyte. *J. Cell. Sci.* **110**: 3083-3090.

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

Gross, S. D., Loijens, J. C. y Anderson, R. A. (1999) Tha casein kinase Iα isoform is both physically positioned and functionally competent to regulate multiple events of mRNA metabolism. *J.Cell Sci.* **112**: 2647-2656.

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

Hanks, S. K. y Hunter, T. (1995) The eukaryotic protein kinase superfamily: Kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **9**: 576-596.

Ho, U., Mason, S., Kobayashi, R., Hoekstra, M. y Andrews, B. (1997) Role of the casein kinase I isoform, Hrr25, and the cell cycle regulatory transcription factor, SBF, in the transcriptional response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 581-586.

Hoekstra, M. F., Liskay, M. R., Ou, A. C., DeMaggio, A. J., Burbee, D. G. y Heffron, F. (1991) HRR25, a putative protein kinase from budding yeast: association with repair of damaged DNA. *Science* **253**:1031-1034.

Hoekstra, M. F., Dhillon, N., Carmel. G., DeMaggio, A. J., Lindberg, R. A., Hunter, T. y Kuret, J. (1994) Budding and fission yeast casein kinase I isoforms have dual-specificity protein kinase activity. *Mol. Biol. Cell* **5**: 877-886.

Ishida, Y., Yagita, K., Fukuyama, T., Nishimura., M. Nagano, M., Shigeyoshi, Y., Yamaguchi, S., Komori, T. Y Okamura, H. (2001) Constitutive expression and delayed light response of casein kinase Iε and Iδ mRNAs in the mouse suprachiasmatic nucleus. *J. Neurosci. Res.* **64**:612-616.

Kearney, P. H., Ebert, M. y Kuret, J. (1994) Molecular cloning and sequence analysis of two novel fission yeast casein kinase-1 isoforms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **203**: 231-236.

King, D. P. y Takahashi, J. S. (2000) Molecular genetics of circadian rhythms in mammals. *Annu. Rev. Neurosci* **23**: 713-742.

Kishida, M., Hino, Si, Michiue, T., Yamamoto, H., Kishida, S., Fukui, A., Asashima, M. y Kikuchi, A. (2001) Synergistic activation of the Wnt signaling pathway by Dvl and casein kinase Iε. *J. Biol. Chem.* **276**: 33147-55.

Kitabayashi, A. N., Kusuda, J., Hirai, M. y Hashimoto, K. (1997) Cloning and chromosomal mapping of human casein kinase I gamma 2 (CSNK1G2). *Genomics* **46**: 133-137.

Kitamura, K. y Yamashita, I. (1998) Identification of a novel casein kinase-1 homolog in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe. Gene* **214**: 131-137.

Klimczak, L. J. y Cashmore, A. R. (1993) Purification of casein kinase I from broccolli. *Biochem. J.* **293**: 283-288.

Klimczak, L. J., Farini, D., Lin, C., Ponti, D., Cashmore, A. R. y Giuliano, G. (1995) Multiple isoforms of Arabidopsis casein kinase I combine conserved catalytic domains with variable carboxyl-terminal extensions. *Plant Physiol.* **109**: 687-696.

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

Kloss, B., Rothenfluh, A., Young, M. W. y Saez, L. (2001) Phosphorylation of period is influenced by cycling physical association of double-time, period and timeless in the *Drosophila* clock. *Neuron* **30**: 699-706.

Knippschild, U., Milne, D. M., Campbell, L. E., DeMaggio, A. J., Christenson, E., Hoestra, M. F. y Meek, D. W. (1997) p53 is phosphorylated *in vitro* and *in vivo* by the δ and ε isoforms of casein kinase 1 and enhances the level of casein kinase 1δ in response to topoisomerase-directed drugs. *Oncogene* **15**: 1727-1763.

Koch, C. y Nasmyth, K. (1994) Cell cycle regulated transcription in yeast. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**: 451.459.

Kusuda, J., Hidari, N., Hirai, M. y Hashimoto, K. (1996) Sequence analysis of the cDNA for the human casein kinase I δ (CSNK1D) gene and its chromosomal localization. *Genomics* **32**: 140-143.

Kusuda, J., Hirai, M., Tanuma, R. y Hashimoto, K. (2000) Cloning, expression analysis and chromosome mapping of hman casein kinase 1 gamma1 (CSNK1G1): identification of two types of cDNA encoding the kinase protein associated with heterologous carboxy-terminal sequences. *Cytogenet. Cell Genet.* **90**: 298-302.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Lamond, A. I. Y Earnshaw, W. C. (1998) Structure and function in the nucleus. *Science* **280**: 547-553.

Lindberg, R. A., Quinn, A. M. y Hunter, T. (1992) Dual-specificity protein kinases: Will any hydroxyl do? *Trends Biochem. Sci.* **17**:114-119.

Liu, F., Ma, X.-H., Ule, J., Bibb, J. A., Nishi, A., DeMaggio, A., Yan, Z., Nairn, A. C. y Greengard, P. (2001) Regulation of cyclin-dependent kinase 5 and casein kinase 1 by metabotropic glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 11062-11068.

Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G.-H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X. Y He, X. (2002) Control of β-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* **108**: 837-847.

Longenecker, K. L., Roach, P. J. y Hurley, T. D. (1996) Three-dimensional structure of mammalian casein kinase I: molecular basis for substrate recognition. *J. Mol. Biol.* **257**: 618-631.

Longenecker, K. L., Roach, P. J. y Hurley, T. D. (1998) Crystallographic studies of casein kinase I delta towards a structural understanding of auto-inhibition. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **54**: 473-475.

Lowrey, P. L., Shimomura, K., Antoch, M. P., Yamazaki, S., Zemenides, P. D., Ralph, M. R., Menaker, M. y Takahashi, J. S. (2000) Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science* **288**: 483-492.

Lussier, G. y Larose, L. (1997) A casein kinase I activity is constitutively associated with Nck. *J. Biol. Chem.* **272**: 2688-2694.

Marin, O., Burzio, V., Boschetti, M., Meggio, F., Allende, C. C., Allende, J. E. y Pinna, L. E (2002) Structural features underlying the multisite phosphorylation of the A domain of the NF-AT4 transcription factor by protein kinase CK1. *Biochemistry* **41**: 618-27.

Mashhoon, N., DeMaggio, A. J., Tereshko, V., Bergmeier, S. C., Egil, M., Hoektra, M. F. y Kuret, J. (2000) Crystal structure of a conformation-selective casein kinase-1 inhibitor. *J. Biol. Chem.* **275**: 20052-20060.

McInnes, C. y Leader, D.P. (1997) Tissue-specific distribution of mouse casein kinase Iα mRNA. *DNA Sequence* **8**: 55-57.

Meek, D. W. (1998) New developments in the multi-site phosphorylation and integration of stress signaling at p53. *Int. J. Radiat. Biol.* **74**: 729-737.

Meggio, F., Perich, J. W., Reynolds, E. C. y Pinna, L. A. (1991) A synthetic β-casein phosphopeptideand analogues as model substrates for casein kinase-1, a ubiquitous, phosphate directed protein kinase. *FEBS Lett.* **283**: 303-306.

Meggio, F., Perich, J. W., Marin, O. y Pinna, L. A. (1992) The comparative efficiencies of the Ser(*P*)- and Tyr(*P*)- residues as specificity determinants for casein kinase-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **182**: 1460-1465.

Milne, D. M., Palmer, R. H., Campbell, D. G. y Meek, D. W. (1992) Phosphorylation of the p53 tumor supressor protein at three N-terminal sites by a novel casein kinase I-like enzyme. *Oncogene* **7**: 1361-1369.

Milne, D. M., Looby, P. y Meek, D. W. (2001) Catalytic activity of protein kinase CK1δ (casein kinase 1δ) is essential for its normal subcellular localization. *Exp. Cell Res.* **263**: 43-54.

Moreno-Bueno, G., Cales, C., Behrens, M. M. y Fernández-Renart, M. (2000) Isolation and characterization of casein kinase I from *Dyctostelium discoideum*. *Biochem. J.* **349**: 527-537.

Morin, P. J. (1999) β-catenin signaling and cancer. *Bioessays* **21**: 1021-1030.

Murakami, A., Kimura, K. y Nakano, A. (1999) The inactive form of a yeast casein kinase I suppresses the secretory defect of the sec12 mutant. Implication of negative regulation by the Hrr25 kinase in the vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **274**: 3804-3810.

Panek, H. R., Stepp, J. D., Engle, H. M., Marks, K. M., Tan, P. K., Lemmon, S. K. y Robinson, L. C. (1997) Suppressors of YCK-encoded yeast casein kinase 1 deficiency define the four subunits of a novel clathrin AP-like complex. *EMBO J.* **16**: 4194-4204.

Peters, J. M., McKay, R. M., McKay, J. P. y Graff, J. M. (1999) Casein kinase I transduces Wnt signals. *Nature 401*: 345-350.

Plowman, G. D., Sudarsanam, S., Bingham, J., Whyte, D. y Hunter, T. (1999) The protein kinases of *Caenorhabditis elegans*: a model for signal transduction in multicellular organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 13603-13610.

Price, J. L., Blau, J., Rothenfluh, A., Abodeely, M., Kloss, B. y Young, M.W. (1998) Double-time is a novel Drosophila clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell* **94**: 83-95.

Pulgar, V., Tapia, C., Vignolo, P., Santos, J., Sunkel, C., Allende, C. C. y Allende, J. E. (1996) The recombinant α isoform of the protein kinase CK1 from *Xenopus laevis* can phosphorylate tyrosine in synthetic substrates. *Eur. J. Biochem.* **242**: 519-528.

Pulgar, V., Marin, O., Meggio, F., Allende, C. C., Allende, J. E. y Pinna, L. A. (1999) Optimal sequences for non-phosphate-directed phosphorylation by protein kinase CK1 (casein kinase-1) - a re-evaluation. *Eur. J. Biochem.* **260**: 520-526.

Pulgar, V. M. (1999) Caracterización bioquímica y celular de isoformas de la proteínaquinasa CK1. Tesis de Grado presentada a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile para optar al Grado de Doctor en Ciencias. 124 pp.

Rapuano, M. y Rosen, O. M. (1991) Phosphorylation of the insulin receptor by a casein kinase I-like enzyme. *J. Biol. Chem.* **266**: 12902-12907.

Rivers, A., Gietzen, K. F., Vielhaber, E. y Virshup, D. M. (1998) Regulation of casein kinase I delta by an *in vivo* futile phosphorylation cycle. *J. Biol. Chem.* **273**: 15980-15984.

Robinson, L. C., Hubbard, E. J., Graves, P. R., DePaoli-Roach, A. A., Roach, P. J., Kung, C., Haas, D. W., Hagedorn, C. H., Goebl, M. y Culbertson, M. R. (1992) Yeast casein kinase I homologues: an essential gene pair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 28-32.

Robinson, L. C., Menold. M. M., Garret, S. y Culbertson, M. R. (1993) Casein kinases I-like protein kinases encoged by YCK1 and YCK2 are required for yeast morphogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 2870-2881.

Robinson, L. C., Bradley, C., Bryan, J. D., Jerome, A., Kweon, Y y Panek, H. R. (1999) Tha Yck2 yeast casein kinase 1 isoform shows cell cycle-specific localization to sites of polarized growth and is required for proper septin organization. *Mol. Biol. Cell* **10**: 1077-1092.

Rowles, J., Slaughter, C., Moomaw, C., Hsu, J. Y Cobb, M. H. (1991) Purification of casein kinase I and isolation of cDNAs encoding multiple casein kinase I-like enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 9548-9552.

Sakaguchi, Saito, S., Higashimoto, Roy, S., Anderson, C. W y Appella, E. (2000) Damage-mediated phosphorylation of human p53 threonine 18 through a cascade mediated by a casein kinase 1-like kinase. Effect on Mdm2 binding. *J. Biol. Chem.* **275**: 9278-9283.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2ª edición, Cold Spring harbor Laboratory Press.

Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.

Santos, J. A., Logarinho, E., Tapia, C., Allende, C., Allende, J. E. y Sunkel, C. (1996) The casein kinase 1α gene of *Drosophila melanogaster* is developmentally regulated and the kinase activity of the protein induced by DNA damage. *J. Cell Sci.* **109**: 1847-1856.

Shibasaki, F., Price, E.R., Milan, D. y Mckeon, F (1996) Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4. *Nature* **382**: 370-373.

Singh, T. J., Grundke-Iqbal, I., McDonald, B. e Iqbal, K. (1994) Comparison of the phosphorylation of microtubule-associated protein tau by non-proline dependent protein kinases. *Mol. Cell. Biochem.* **131**: 181-189.

Singh, T. J., Grundke-Iqbal, I. e Iqbal, K. (1995) Phosphorylation of tau protein by casein kinase-1 converts it to an abnormal Alzheimer-like state. *J. Neurochem.* **64**:1420-1423.

Songyang, Z, Lu, K. P., Kwon, Y. T., Tsai, L.-H., Filhol, O., Cochet, C., Brickley, D. A., Soderling, T. R., Bartleson, C., Graves, D., DeMaggio, A. J., Hoekstra, M. F., Blenis, J., Hunter, T y Cantley, L. C. (1996) A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: promary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, cdk5 and Erk1. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 6486-6493.

Srinivasan, M., Edman, C. F. y Schulman, H. (1994) Alternative splicing introduces a nuclear localization signal that targets multifunctional CaM kinase to the nucleus. *J. Cell Biol.* **126**: 839-852.

Takano, A., Shimizu, K., Kani, S., Buijs, R. M., Okada, M. y Nagai, K. (2000) Cloning and characterization of rat casein kinase Iε. *FEBS Lett.* **349**: 307-312.

Tapia, C., Featherstone, T., Gomez, C., Taillon-Miller. P., Allende, C. C. Y Allende, J. E. (1994) Cloning and chromosomal localization of the gene coding for human protein kinase CK1. *FEBS Lett.* **349**: 307-312.

Taylor, S. S., Buechler, J. A. y Yonemoto, W. (1990) cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu. Rev. Biohem.* **59**: 971-1005.

Tobin, A. B., Totty, N. F., Sterlin, A. E. Y Nahorsky, S. R. (1997) Stimulus-dependent phosphorylation of G protein-coupled receptors by casein kinase 1α. *J. Biol. Chem.* **272**: 20844-20849.

Toh, K. L., Toh, C. R., Toh, J., He, Y., Eide, E. J., Hinz, W. A., Virshup, D. M., Ptacek, L. J. y Fu, Y.-H. (2001) An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep-phase syndrome. *Sciencexpress* 11 enero online.

Torres, M. A. y Nelson, W. J. (2000) Colocalization and redistribution of dishevelled and actin during Wnt-induced mesenchymal morphogenesis. *J. Cell Biol.* **149**: 1433-1442.

Tuazon, P. T., Pang, D. T., Schafer, J. A. y Traugh, J. A. (1985) Phosphoylation of the insulin receptor by casein kinase I. *J. Cell. Biochem.* **28**: 159-170.

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

Vancura, A., Sessler, A., Leichus, B. Y Kuret, J. (1994) A prenylation motif is required for plasma membrane localization and biochemical function of casein kinase I in budding yeast. *J. Biol. Chem.* **269**: 19271-19278.

Venter, J. C. y col. (2001) the sequence of the human genome. *Science* **291**: 1304-1351.

Voisin , L., Larose, L. y Meloche, S. (1999) Angiotensin II stimulates serine phosphorylation of the adaptor protein Nck: physical association with the serine/threonine kinases Pak1 and casein kinase I. *Biochem. J.* **341**: 217-223.

Walczak, C. E., Anderson, R. A. y Nelson, D. L. (1993) Identification of a family of casein kinases in *Paramecium*: biochemical characterization and cellular localization. *Biochem. J.* **296**: 729-735.

Walter, J., Schindzielorz, A., Hartung, B. y Haas, C. (2000) Phosphorylation of the β-amyloid precursor protein at the cell surface by ectoprotei kinases 1 and 2. *J. Biol. Chem.* **275**: 23523-23529.

Wang, P.-C., Vancura, A., Mitcheson, T. G. M. y Kuret, J. (1992) Two genes in *Saccharomyces cerevisiae* encode a membrane-bound form of casein kinase 1. *Mol. Biol. Cell* **3**: 275-286.

Wang, P.-C., Vancura, A., Desai, A., Carmel, G. y Kuret, J. (1994) Cytoplasmic forms of fission yeast casein kinase-1 associate primarily with the particulate fraction of the cell. *J. Biol. Chem.* **269**: 12014-12023.

Wang, X., Hoekstra, M. E., DeMaggio, A. J., Dhillon, N., Vancura, A., Kuret, J., Johnston, G. C. y Singer, R. A. (1996) Prenylates isoforms of yeast casein kinase I, including the novel Yck3p, suppress the gcs1 blockage of cell proliferation from stationary phase. *Mol. Cel. Biol.* **16**: 5375-5385.

Watts, A. D., Hunt, N. H., Wanigasekara, Y., Bloomfield, G., Wallach, D., Roufogalis, B. D. y Chaudhri, G. (1999) A casein kinase I motif present in the cytoplasmic domain of members of the tumor necrosis factor ligand family is implicated in 'reverse signaling'. *EMBO J.* **18**: 2119-2126.

Waugh, M. G., Challiss, J., Berstein, G., Nahorski, S. R. y Tobin, A. B. (1999) Agonist-induced desensibilization and phosphorylation of m1-muscarinic receptors. *Biochem. J.* **338**: 175-183.

Xu, R. M., Carmel, G., Sweet, R. M., Kuret, J., y Cheng, X. (1995) Crystal strcture of casein kinase-1, a phosphate directed protein kinase. *EMBO. J.* **14**: 1015-1023.

Yasojima, K., Kuret, J., DeMaggio, A. J., McGeer, E. y McGeer, P. L. (2000) Casein kinase 1δ mRNA is upregulated in Alzheimer disease brain. *Brain Res.* **865**: 116-120.

Yong, T. J. K., Gan, Y.-Y., Toh, B.-H. y Sentry, J. W. (2000) Human CKIαL and CKIαS are encoded by both 2.4- and 4.2-kb transcripts, the longer containing multiple RNA-destablising elements. *Biochim. Biophys. Acta* **1492**: 425-433.

Young, M. W. (1998) The molecular control of circadian behavioral rhythms and their entrainment in Drosophila. *Ann. Rev. Biochem.* **67**: 135-152.

Zhai, L., Graves, P. R., Robinson, L. C., Italiano, M., Culbertson, M. R., Rowles, J., Cobb, M. H., DePaoli-Roach, A. A. Y Roach, P. J. (1995) Casein kinase Iγ subfamily. *J. Biol. Chem.* **270**: 12717-12724.

Zhang, J., Gross, S. D. Schroeder, M. D., y Anderson, R. A. (1996) Casein kinase I α and αL: alternative splicing-generated kinases exhibit different catalytic properties. *Biochemistry* **35**: 16319-16327.

Zhu, J., Shibasaki, F., Price, R., Guillemot, J.-C., Yano, T., Dötsch, V., Wagner, G., Ferrara, P. y McKeon, F. (1998) Intramolecular masking of nuclear import signal on NF-AT4 by casein kinase I and MEKK1. *Cell* **93**: 851-861.

Zhu, J. y McKeon, F. (2000) Nucleoplasmic shuttling and the control of NF-AT signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**: 411-420.

PUBLICACIONES GENERADAS DE LA TESIS

A la fecha, la presente Tesis ha dado origen a dos publicaciones:

1. Marin, O., Burzio, V., Boschetti, M., Meggio, F., Allende, C. C., Allende, J. E. y Pinna, L. E (2002) Structural features underlying the multisite phosphorylation of the A domain of the NF-AT4 transcription factor by protein kinase CK1. *Biochemistry* **41**: 618-27.

2. Burzio, V., Antonelli, M., Allende, C. C. y Allende, J. E. (2002) Biochemical and cellular characteristics of the four splice variants of protein kinase CK1α from zebrafish (*Danio rerio*). *J Cell Biochem.* **86**: 805-814.