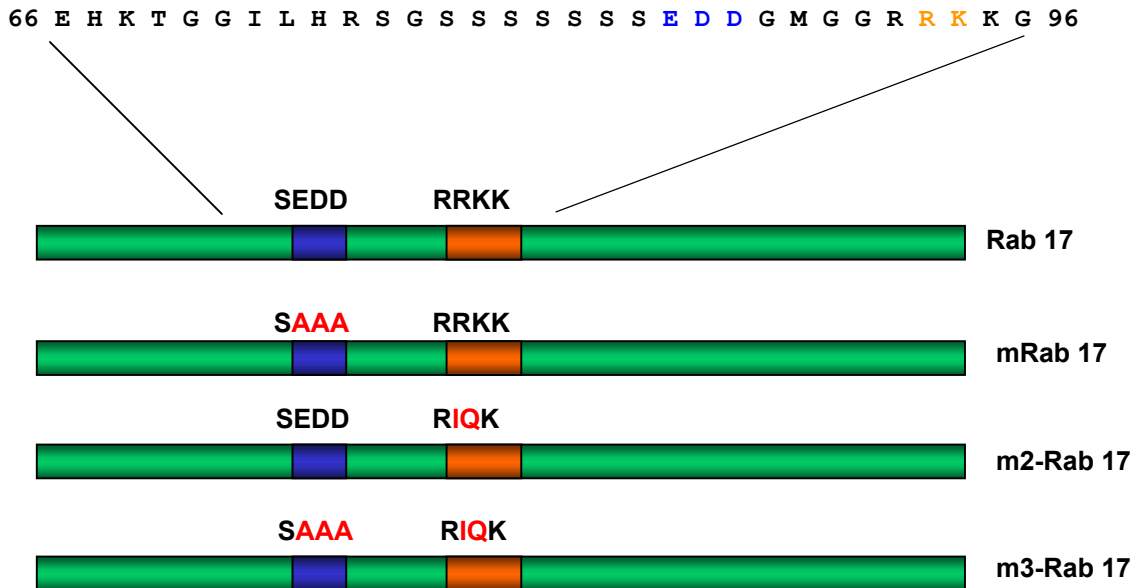


### **2.3 Localització subcel.lular de la proteïna Rab17 i la proteïna quinasa CK2 en cèl.lules de ceba**

Anàlisis previs de fraccionament subcel.lular i electroforesi bidimensional de la proteïna Rab17 indiquen que es troba tant en nucli com en citoplasma de les cèl.lules d'embrió de blat de moro. Es desconeix quin és en compartiment cel.lular a on es fosforila la Rab17, no obstant, el nombre de formes fosforilades és superior en citoplasma que en nucli (Goday et al., 1994). En el treball previ Jensen et al., (1998) s'havia estudiat quins eren els dominis responsables de la translocació citoplasma/nucli de la Rab17 utilitzant diferents del.leccions i versions mutades de la proteïna fusionades a la proteïna  $\beta$ -glucoronidasa (GUS). Es va determinar que la regió situada entre els aminoàcids 66-96 estava implicada en la translocació de les proteïnes de fusió amb GUS al nucli. En aquesta zona es troba el "cluster" de serines seguit del consens de fosforilació CK2, i la seqüència  $^{89}\text{MGRRK}^{95}$ , semblant a la seqüència de localització nuclear (NLS) de l'antigen T SV40 (Kalderon et al., 1984). Es va demostrar que aquesta possible NLS era només parcialment responsable de la localització nuclear de Rab17, suggerint l'existència d'altres regions implicades.

Per estudiar amb més detall la localització subcel.lular de la Rab17 es van clonar de les versions mutades de Rab17 descrites a Jensen et al., (1998) al vector ppK100, sota el control d'un promotor constitutiu doble 35S i es van fusionar en el seu extrem 3' en pauta amb la proteïna GFP (green-fluorescent protein). A la figura 15 es mostra l'esquema de les construccions utilitzades: mRab17, corresponent a la Rab17 mutada en el consens de fosforilació CK2 a on els aminoàcids  $^{85}\text{EDD}^{87}$  van ser substituïts per mutagènesi dirigida per  $^{85}\text{AAA}^{87}$  i que ja s'havia utilitzat previament en els estudis de interacció i fosforilació (apartats 2.1 i 2.3). La segona, m2-Rab17, està mutada en la seqüència de localització nuclear (NLS) esmentada, a on els aminoàcids bàsics  $^{93}\text{RK}^{94}$  han estat substituïts per dos de caràcter neutre,  $^{93}\text{IQ}^{94}$ . La tercera, doble mutada, m3-Rab17 conté les dues mutacions m1 i m2.



**Figura 15: Esquema de les construccions utilitzades per l'estudi de la localització de la proteïna Rab17 en cèl.lules de ceba.** mRab17, correspon a la Rab17 mutada en el consens de fosforilació CK2 a on els aminoàcids <sup>85</sup>EDD<sup>87</sup> van ser substituïts per mutagènesi dirigida per <sup>85</sup>AAA<sup>87</sup>, m2-Rab17, està mutada en la seqüència de localització nuclear (NLS) i els aminoàcids bàsics <sup>93</sup>RK<sup>94</sup> han estat substituïts per dos de caràcter neutre, <sup>93</sup>IQ<sup>94</sup>, per últim la doble mutada, m3-Rab17 conté les dues mutacions m1 i m2.

Amb les proteïnes de fusió a GFP es va realitzar transformació transient de cèl.lules monocapa d'epidermis de ceba (*Allium cepa*) pel mètode de bombardeig de partícules d'or. Després d'unes 16 hores, les cèl.lules transformades es van observar al microscopi confocal. La transformació de cèl.lules de ceba és un mètode que permet estudiar directament la localització de proteïnes en cèl.lules vives. L'utilització de monocapa d'epidermis de ceba presenta diverses avantatges: en primer lloc, el teixit s'obté fàcilment de cebes fresques i no es necessari cap tractament previ abans de la transformació; no presenten autofluorescència ja que no contenen cloroplasts, i al igual que el blat de moro, la ceba es una espècie monocotiledònia. Les cèl.lules són grans i uniformes i l'ús del microscopi confocal permet conèixer amb detall la localització subcel.lular de la proteïna.