



Universitat Autònoma de Barcelona

**Estudi de la implicació de la proteïna quinasa CK2
en la via de senyalització de les auxines en
Arabidopsis thaliana.**

Memòria presentada per
MARIA DEL MAR MARQUÈS I BUENO,

Llicenciada en Bioquímica,
per a optar al Grau de Doctor en Bioquímica, Biologia Molecular i
Biomedicina.

Treball realitzat al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de
la Universitat Autònoma de Barcelona, sota la direcció de la Doctora
M. CARMEN MARTÍNEZ GÓMEZ.

M. Carmen Martínez Gómez

Maria del Mar Marquès i Bueno

Bellaterra, juliol del 2012

Índex

Llistat d'abreviatures	1
Resum	3
Introducció general	5
I. La proteïna quinasa CK2	6
Generalitats.....	6
La subunitat catalítica (CK2 α).....	8
La subunitat reguladora (CK2 β).....	11
Substrats i funcions de la proteïna quinasa CK2.....	13
Regulació de la proteïna quinasa CK2.....	16
Regulació per fosforilació.....	17
Interaccions reguladores.....	17
Interaccions proteïna-proteïna.....	17
Estratègies per l'eliminació de l'activitatCK2	
Ús d'inhibidors químics.....	18
Inhibició de l'activitat CK2 mitjançant un mutant dominant negatiu de la CK2 α	19
II. Les auxines	
Generalitats.....	24
El metabolisme de l'auxina.....	25
Rutes de síntesi d'auxina en plantes.....	25
Vies dependents de triptòfan.....	25
Via independents de triptòfan.....	27
Inactivació de l'auxina.....	29
La conjugació de l'auxina.....	29
La hidròlisi dels conjugats d'auxina.....	30
Degradació oxidativa de l'auxina.....	31
El transport de l'auxina.....	33
L'entrada de l'auxina a la cèl·lula.....	34
La sortida de l'auxina de la cèl·lula.....	35
Sortida no polar.....	35
Sortida polar mediada per les proteïnes PIN.....	36
Percepció i senyalització de l'auxina.....	39
Objectius	43

Capítol I

A dominant negative mutant of protein kinase CK2 exhibits altered auxin responses in Arabidopsis

Abstract.....	47
Introduction.....	48
Experimental procedures	
Plant material	50
IAA, NPA and TIBA treatments	51
Determination of IAA content and auxin transport assay	51
Western blots and histochemical analysis of GUS activity	52
RT-PCR analysis.....	52
Hybridization of ATH1 Affymetrix arrays	53
Confocal microscopy	53
Results	
Arabidopsis CK2 dominant-negative mutant (CK2mut) exhibits phenotypic traits characteristic of perturbed auxin transport.....	54
CK2mut plants respond to exogenous auxin.....	57
IAA reactivates cell-division cycle in CK2mut plants.....	60
CK2mut plants exhibit disturbed auxin local gradients and impairment of auxin transport.....	63
Analysis of transcript profiles of CK2mut plants.....	64
CK2mut plants show altered levels and mislocalization of PIN and PID proteins.....	68
Discussion	72

Capítol II

Estudi vesicular de les proteïnes PIN en plantes defectives en CK2

Resum.....	79
Introducció	80
Tràfic vesicular dels transportadors d'auxina.....	80
Internalització i endocitosi dependent de clatrina.....	80
El reciclatge constitutiu.....	83
La fosforilació dirigeix el reciclatge polar.....	85
Transport en direcció al vacúol.....	86

Materials i mètodes

Material biològic.....	90
Cultius <i>in vitro</i>	90
Eliminació de l'activitat	
CK2.....	90
Tractaments amb inhibidors.....	91
Tractament amb <i>wortmannin</i> (WM)	91
Tractament amb <i>brefeldin A</i> (BFA)	91
Tractament amb <i>tyrphostin A23</i> o <i>A51</i> (Tyr A23 o Tyr A51)	92
Tractament amb cicloheximida (CHX)	92
Tractament amb àcid naftalenacètic (NAA).....	93
Tinció amb lugol.....	93
Tinció amb FM4-64.....	93
Microscòpia.....	94

Resultats

Estudi de l'afectació del meristem radicular en plantes CK2mut.....	95
Estudi del procés d'endocitosi de PIN7 en les plantes CK2mut.....	97
Tractament amb NAA de plantes sense activitat CK2.....	99
Estudi de la inhibició del reciclatge constitutiu.....	102
Inhibició de l'entrada al vacúol: tractament amb <i>wortmannin</i>	105
Efecte de la inhibició de la síntesi de proteïnes de <i>novo</i> amb cicloheximida en la formació de vesícules.....	108
Discussió	111

Discussió general

L'estudi del fenotip del mutant dominant negatiu de la proteïna quinasa CK2 posa en evidència la relació entre la CK2 i la via de senyalització de les auxines.	116
CK2, cicle cel·lular i auxines.....	117
L'estudi del transcriptoma de plàntules CK2mut va delatar l'afectació del transport d'auxina.....	118
La proteïna quinasa CK2 i el transport d'auxina.....	119
Implicació de la CK2 en el tràfic de vesícules.....	120
La CK2 una quinasa omnipresent i multifactorial.....	126

Conclusions	126
--------------------------	-----

Referències	129
--------------------------	-----

Annex (CD)

Figure S1. Validation of PID antibody

Figure S2. Time course of auxin relocation during root gravitropic response

Figure S2. Ratios of lateral root number relative to root length

Table S1. Primers used to amplify by real-time RT-PCR.

Table S2. Global changes of gene expression in Dex-treated CK2mut seedlings

Table S3. Auxin-related genes differentially expressed in CK2mut seedlings

Índex de figures

Figura 1. Visió general de l'estructura de la proteïna quinasa CK2.....	12
Figura 2. Repertori d'inhibidors de la CK2.....	19
Figura 3. Esquema de la construcció utilitzada i del funcionament del mutant dominant negatiu per la CK2 α (CK2mut).....	21
Figura 4. Potencials rutes de biosíntesi de l'IAA.....	28
Figura 5. Conjugació i inactivació de l'auxina.....	32
Figura 6. Entrada i sortida de l'IAA a la cèl·lula.....	34
Figura 7. Subclasse de la família de les proteïnes PIN.....	35
Figura 8. Localització subcel·lular de les proteïnes PIN tipus 1 i direcció del flux de l'auxina a l'arrel.....	39
Figura 9. Esquema de la percepció de l'auxina.....	42
Figure 10. Auxin-related phenotypes of Arabidopsis CK2mut seedlings.....	56
Figure 11. Auxin content and auxin responses.....	59
Figure 12. IAA reactivates cell-division cycle in CK2mut plants.....	62
Figure 13. Auxin-responsive DR5rev::GFP expression and auxin transport..	64
Figure 14. Transcript profiling of CK2mut plants.....	67
Figure 15. Western blot analysis of PINs and PID.....	70
Figure 16. PINs and PID localization in Arabidopsis roots depleted of CK2 activity.....	71
Figura 17. Mecanisme d'establiment de la polaritat de les proteïnes PIN.....	80
Figura 18. Esquema del procés d'invaginació.....	82
Figura 19. Mecanisme d'acció de la BFA.....	84
Figura 20. Efecte de la fosforilació de les proteïnes PIN.....	85
Figura 21. Efecte de la inhibició amb wortmannin.....	86
Figura 22. Tràfic vesicular dels transportadors d'auxina PIN tipus1.....	89
Figura 23. Afectació radicular de les plàntules CK2mut.....	96
Figura 24. Efecte del tractament amb tyrphostin A23 eliminant l'activitat CK2.....	98
Figura 25. Efecte del tractament amb NAA en plàntules sense activitat CK2.....	100
Figura 26. Tinció amb FM4-64 de plàntules PIN7::PIN7-GFP eliminant l'activitat CK2 i tractades amb NAA.....	101
Figura 27. Efecte del tractament amb BFA en plàntules sense activitat CK2.....	104
Figura 28. Efecte del tractament amb wortmannin en plàntules PIN7::PIN7-GFP i plàntules DR5::GFP.....	107

<i>Figura 29. Efecte dosi-resposta dels tractaments amb TBB en plàntules PIN7::PIN7-GFP.....</i>	<i>109</i>
<i>Figura 30. Efectes de la cicloheximida sobre la endocitosi en PIN1 i PIN7 i cinètica de la inducció amb dexametasona de PIN7.</i>	<i>110</i>
<i>Figura 31. Possibles models de l'actuació de la CK2 en la via de senyalització de les auxines.....</i>	<i>126</i>

Índex de taules

<i>Taula 1. Substrats descrits per la CK2 de sistemes vegetals.....</i>	<i>16</i>
<i>Table 2. Expression changes of auxin-transporters and auxin-regulators.....</i>	<i>68</i>

Llistat d'abreviatures

AG	Aparell de Golgi
Asp	Àcid Aspàrtic
AUX1/LAX	auxin resistant 1
BEN1	BFA-visualized endocytic trafficking defective 1
BFA	Brefeldin A
CK2	Casein quinasa 2
CK2mut	mutant dominant negatiu de la proteïna quinasa CK2
CYCB1;1-GFP	ciclina B1;1 fusionada a la proteïna verda fluorescent
Dex	Dexametasona
DMSO	dimetil sulfòxid
EE	Early endosome
ER	reticle endoplasmàtic
ESCRT	Endosomal sorting complex required for transport
GH3	proteïnes Gretchen Hagen 3
Glu	Àcid glutàmic
GNL1	GNOM-like 1
GUS	beta-glucuronidasa
IAA	àcid indol-3-acètic
IBA	Àcid indol-3-butíric
LE	late endosome
MVB	multivesicular body
NAA	àcid naftalenacètic
NPA	àcid 1-N-naftilafталàmic
PDK1	3'-PHOSPHOINOSITIDE-DEPENDENT PROTEIN KINASE 1
PID	proteïna quinasa pinoid
PIN	pin-formed
PP2A	Proteïna fosfatasa 2A
PVC	Prevacuolar compartment
RE	recycling endosome
SNX1	sorting nexin 1
TBB	4,5,6,7-tetrabromobenzotriazol
TGN	transgolgi network
TIBA	àcid 2,3,5-triodobenzoic
Tyr 23	tyrphostin A23
Tyr 51	tyrphostin A51
VSR	vacuolar sorting receptor
WM	wortmannin
IBR	resposta a l'àcid indol-3-butíric
UGT	UDP-glucosil transferasa

Resum

Aquesta tesi s'emmarca dins d'un projecte d'investigació més general que té per objectiu caracteritzar i estudiar la funció de la proteïna quinasa CK2 de sistemes vegetals. La CK2 és una Ser/Thr quinasa present a tots els eucariotes estudiats fins al moment. Estudis fets en diversos eucariotes han evidenciat la importància d'aquesta quinasa en el creixement i en el control del cicle cel·lular, no obstant, les vies de senyalització en que participa aquesta quinasa encara no estan caracteritzades per complet.

Al primer capítol d'aquesta tesi es descriu per primera vegada la involucració de la proteïna quinasa CK2 d'*Arabidopsis* en la via de senyalització de les auxines, en particular, del transport d'auxina. En plantes, la fitohormona auxina és la principal reguladora del creixement cel·lular. Recentment s'ha demostrat que la distribució asimètrica de l'auxina en els diferents òrgans de la planta és essencial per al desenvolupament vegetal i, aquesta distribució depèn principalment del transport polar de l'auxina. Per dur a terme aquesta investigació hem utilitzat un mutant dominant negatiu de la proteïna quinasa CK2 d'*Arabidopsis thaliana* (la línia CK2mut); aquest mutant té uns trets fenotípics que estan lligats a alteracions en processos dependents d'auxina, com són la inhibició del creixement de l'arrel principal, l'absència d'arrels laterals i el fenotip *wavy*. No obstant, s'ha comprovat que la percepció de l'auxina no està afectada ja que les plantes CK2mut responen al tractament exogen amb aquesta hormona. Hem demostrat que aquest mutant no té defectes en la síntesi de l'auxina, però sí en el transport d'aquesta hormona. Eliminant l'activitat CK2 utilitzant eines genètiques (línia CK2mut) i eines farmacològiques (tractament amb TBB, un inhibidor específic de la CK2) hem demostrat que hi ha anomalies en la formació dels gradients d'auxina i canvis en l'expressió de gens relacionats amb les auxines; en particular, en membres de la família de transportadors de sortida d'aquesta hormona cap a l'exterior cel·lular (PINs) i en la proteïna quinasa PINOID (PID). Aquestes proteïnes són reguladores dels fluxos d'auxina. Estudis fets amb plàntules PIN4::PIN4-GFP i PIN7::PIN7-GFP han permès detectar que l'eliminació de

l'activitat CK2 provoca l'acumulació d'aquestes proteïnes en vesícules endosomals.

La formació de vesícules endosomals va fer pensar que la CK2 tenia algun paper en la via de tràfic vesicular d'aquests transportadors, i aquest ha estat el tema d'estudi del segon capítol d'aquesta tesi. S'han emprat diversos inhibidors de diferents punts de la via de tràfic vesicular per tal de poder discriminar a quin punt d'aquesta via actua la CK2. Aquests experiments s'han realitzat utilitzant plantes PIN7::PIN7-GFP i utilitzant com a model les plantes PIN1::PIN1-GFP, ja que PIN1 és el transportador d'auxina més ben caracteritzat. Amb el tractament amb *tyrphostin A23* hem observat que les vesícules endosomals que es formen per eliminació de l'activitat CK2 estan revestides de clatrina. Amb els tractaments amb *brefeldin A* (BFA) i *wortmannin* hem determinat que la CK2 actua en algun punt de la via d'endocitosi diferent al d'aquests inhibidors. S'ha detectat que aquests endosomes no es tenyeixen amb el colorant específic de lípids FM4-64 i que són més grans que els endosomes obtinguts pel tractament amb BFA. Per últim, el tractament amb cicloheximida ens ha permès observar dos efectes: el primer és que la formació d'endosomes no depèn de la síntesi de proteïnes *de novo* i el segon, és que la inhibició de la CK2 no compromet la degradació al vacúol d'aquestes proteïnes. Així doncs, amb els resultats obtinguts podria ser que l'eliminació de la CK2 provoqués la formació d'endosomes *sorting nexin* aberrants, indicant així, que aquesta quinasa estaria intervenint en la via del retròmer.

Introducció general

La fosforilació de proteïnes és un mecanisme regulador essencial de la fisiologia cel·lular, que forma la base de la senyalització cel·lular {{148 Hunter,T. 2000}}. Aquesta modificació posttraduccional està catalitzada per enzims i constitueix un canvi reversible que porta a l'activació o a la inhibició de l'activitat de les proteïnes modificades. A més, la fosforilació també pot produir canvis en la interacció dels substrats amb altres proteïnes o molècules.

La fosforilació de proteïnes la realitzen les proteïnes quinases o cinases que catalitzen la transferència del grup γ -fosfat de l'ATP o del GTP a residus específics de serina, treonina, tirosina o histidina d'un substrat proteic. Aquest grup d'enzims presenta certa homologia de seqüència i d'estructura al domini catalític, i segons els residus que fosforilen, les quinases es divideixen en dos grans grups: serina/treonina quinases i tirosina quinases (Hanks *et al.*, 1988).

Gràcies a la seqüenciació del genoma d'*Arabidopsis thaliana*, s'ha pogut observar que les serina/treonina quinases representen un 4% del proteoma. Aquest elevat nombre de gens codificant quinases podria ser degut a rondes successives de duplicacions de gens i genomes, jugant aquesta redundància funcional un paper important en la robustesa genètica de les plantes. De la mateixa manera, es calcula que un 30% de les 22.500 proteïnes nuclears d'*Arabidopsis thaliana* requereixen fosforilació. Si això fos cert, s'esperaria que cada una de les mil quinases fosforilés una mitjana de set proteïnes. Tot i així, seria una infravaloració, ja que s'ha de tenir en compte que (1) moltes proteïnes són fosforilades en múltiples llocs; (2) les quinases tenen activitats solapades; i (3) per a moltes quinases es coneix, únicament, un o pocs substrats (Champion *et al.*, 2004). Així doncs, per a poder fosforilar tantes proteïnes es necessari que hi hagin quinases capaces de fosforilar múltiples substrats. La proteïna quinasa CK2 és un exemple d'aquest tipus de quinases.

I. La proteïna quinasa CK2

Generalitats

La proteïna quinasa CK2, coneguda també com a caseïna quinasa 2 o II, és una serina/treonina quinasa molt conservada evolutivament i present a totes les cèl·lules eucariotes estudiades fins ara.

Tot i que va ser una de les primeres proteïnes quinases descobertes en animals (BURNETT and KENNEDY, 1954) , el paper biològic de la CK2 encara està lluny de ser caracteritzat completament. Això és conseqüència de la naturalesa pleiotròpica de l'enzim. Fins al moment, s'han descrit més de 300 substrats, la majoria dels quals es troben implicats en la transducció de senyals, expressió gènica i altres funcions nuclears (Meggio and Pinna, 2003). Això comporta que participi en multitud de processos cel·lulars, com la proliferació, la neoplàsia, el control transcripcional i l'apoptosi (Allende and Allende, 1995; Issinger, 1993; Litchfield, 2003; Olsen *et al.*, 2010; Pinna and Meggio, 1997; Pinna, 1997).

En plantes, la CK2 s'ha estudiat en diverses espècies com el blat de moro (Riera *et al.*, 2001b), tabac (Espunya *et al.*, 1999; Salinas *et al.*, 2001), *Arabidopsis* (Espunya and Martínez, 1997; Sugano *et al.*, 1999), blat (Kato *et al.*, 2002), mostassa (Ogrzewalla *et al.*, 2002) i bròquil (Klimczak and Cashmore, 1994). Encara que, el llistat de substrats de CK2 identificats en plantes no és tant nombrós com en animals, s'ha demostrat que la CK2 està involucrada en diversos processos vitals com la senyalització per llum, transcripció, traducció, cicle cel·lular, transport a nucli, emmagatzematge de calci, emmagatzematge de proteïnes en llavors, defensa mediada per àcid salicílic, reparació del DNA, remodelació de cromatina i, per últim, en la via de senyalització de les auxines que ha estat el tema d'estudi d'aquesta tesi doctoral (Espunya *et al.*, 1999; Hidalgo *et al.*, 2001; Kang and Klessig, 2005;

Lee *et al.*, 1999; Marques-Bueno *et al.*, 2011; Meggio and Pinna, 2003; Moreno-Romero *et al.*, 2012; Riera *et al.*, 2001b; Sugano *et al.*, 1999).

La seqüència de fosforilació mínima reconeguda per la CK2 és X-S/T-X-X-E/D, on X representa residus no bàsics (Pinna, 1997). Una proteïna que presenti aquesta diana és un possible substrat de la CK2, però no vol dir que ho sigui realment. En tot cas, és important que els aminoàcids de la zona de reconeixement siguin de caràcter acídic, ja sigui per ser de càrrega negativa o per estar fosforilats. En determinats casos, s'ha descrit la capacitat de la CK2 de fosforilar residus de tirosina, almenys en *Saccharomices cerevisiae* (Wilson *et al.*, 1997) i en la CK2 recombinant humana (Marin *et al.*, 1999), pel que s'hauria de classificar com una quinasa dual.

La proteïna quinasa CK2 té característiques diferencials que no tenen la major part de quinases. Una d'aquestes és que té la capacitat d'utilitzar tant ATP com GTP com a donador de fosfat, amb unes *Km* similars (Pinna, 1997). Una altra característica diferencial és que sembla ser independent de missatgers secundaris clàssics com els nucleòtids cíclics, el Ca^{2+} o el fosfatidilinositol. Per altra banda, no està integrada en cap via específica de transducció de senyals (Pinna, 2002). La proteïna quinasa CK2 està activa constitutivament, però no desregulada, doncs diversos mecanismes actuen sobre la seva activitat i la regulen diferencialment enfront diversos substrats. Per exemple, l'activitat CK2 s'estimula per polications com la polilisina o les poliamines i és inhibida per polianions entre els quals destaca l'heparina.

L'estructura molecular típica de la quinasa CK2 és heterotetramèrica (Figura 1), i està constituïda per dos subunitats catalítiques (CK2 α , Mr= 36-44 kDa) i dos subunitats reguladores (CK2 β =24-26 kDa) que formen un complex ($\alpha_2\beta_2$ Mr= 130-150 kDa) (Litchfield, 2003). L'estructura de la forma heterotetramèrica s'ha deduït per anàlisis cristal·logràfics (Chantalat *et al.*, 1999; Niefind *et al.*, 2001). Les quatre subunitats formen una estructura en forma de papallona, amb un homodímer central β - β , que actua com a base estable per la unió de les dues subunitats CK2 α a les dos posicions distals,

que interaccionen amb el domini C-terminal de la CK2 β i que evita el contacte entre les dos subunitats α .

No obstant, la subunitat catalítica també pot trobar-se en forma monomèrica, sense associar-se amb la subunitat reguladora, fet que és més freqüent en plantes que en animals. S'han aïllat formes monomèriques de la subunitat catalítica, en *Arabidopsis* (Espunya and Martínez, 1997), blat (Yan and Tao, 1982), blat de moro (Dobrowolska *et al.*, 1992) i bròquil (Klimczak and Cashmore, 1994).

Al genoma humà s'han identificat tres gens que codifiquen per la subunitat alfa (un d'aquests és un pseudogen), i només un per la subunitat reguladora (Ackermann *et al.*, 2005; Wirkner *et al.*, 1992; Wirkner *et al.*, 1998). S'ha pogut detectar activitat CK2 al nucli, citoplasma, a la membrana plasmàtica, en lípids rafts, als mitocondris, al reticle endoplasmàtic, al citoesquelet i als centrosomes (Faust and Montenarh, 2000) (Gil *et al.*, 2011). En plantes el nombre de gens és més elevat i per tant, hi ha més isoformes possibles, tant per la subunitat catalítica com per la reguladora. En el genoma d'*Arabidopsis* s'han trobat quatre gens codificant per la subunitat alfa (αA , αB , αC i αcp) i quatre gens codificant per la subunitat beta ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, i $\beta 4$) (Espunya *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 1999; Riera *et al.*, 2001a; Sugano *et al.*, 1998). Mitjançant fusions de cada un d'aquests gens a proteïnes fluorescents (GFP o YFP), s'han determinat les localitzacions subcel·lulars de cadascuna d'aquestes isoformes. αA , αB i αC es localitzen al nucli, de forma predominant al nuclèol, i αcp únicament es localitza al cloroplast. Pel que fa a les subunitats beta, $\beta 1$ i $\beta 3$ es localitzen homogèniament al nucli i al citosol, $\beta 2$ és localitza només al nucli i $\beta 4$ només es localitza al citosol (Salinas *et al.*, 2006).

La subunitat catalítica (CK2 α)

El domini catalític de la subunitat CK2 α manifesta una gran conservació evolutiva, la qual cosa suggereix la seva implicació en processos crucials per

a la viabilitat cel·lular. Això ha estat demostrat en *S. Cerevisiae*, on la supressió dels dos gens que codifiquen per a la CK2 α és letal, però pot produir-se el rescat funcional quan es transforma el llevat mutant amb la CK2 α humana o de *C. elegans* (Padmanabha *et al.*, 1990).

L'anàlisi de les seqüències mostra que les quinases amb les que la CK2 α presenta una major similitud són les quinases dependents de ciclina (CDK), les quinases activades per mitògens (MAPK) i la glicogen sintetasa quinasa-3 (GSK-3) (Saxena *et al.*, 1987). Encara i així, el grau d'homologia no és gaire alt i és per aquest motiu, que la CK2 està considerada com una de les quinases més distants en termes evolutius (Pinna, 1997).

L'estructura tridimensional de la subunitat CK2 α en presència d'ATP i Mg²⁺, resolta per cristal·lografia de raigs X (figura 1a), va ajudar considerablement a interpretar algunes de les característiques singulars d'aquesta quinasa. L'estructura general de la CK2 α segueix el patró principal de la resta de les quinases, amb un domini amino-terminal ric en fulles β , un domini carboxi-terminal ric en hèlix α i el centre actiu entre els dos dominis. No obstant, hi ha diferències importants amb les altres quinases, que podrien explicar les característiques enzimàtiques de la CK2 α . Dos dels residus més conservats en les quinases, la Ala66 i la Phe176, han estat substituïts en la CK2 α per Ile66 i Trp176, respectivament. Aquestes substitucions s'han relacionat amb la capacitat que té l'enzim d'utilitzar tant ATP com GTP com a donador de fosfat (Pinna, 1990).

Una altra particularitat de la CK2 α és la presència d'un *cluster* de residus bàsics (ric en lisines) altament conservat i localitzat a l'inici de l'hèlix α C (del domini C-terminal), amb una possible implicació funcional múltiple i gens habitual en aquesta regió de la cadena polipeptídica de les quinases. El *cluster* de residus bàsics interacciona amb la subunitat reguladora CK2 β , mitjançant la regulació de l'activitat enzimàtica enfront a determinats substrats (Hu and Rubin, 1990; Marin *et al.*, 1997). Aquesta regió també està implicada amb la inhibició de la CK2 per heparina (Vaglio *et al.*, 1996) i en la interacció i

el reconeixement de diversos substrats, el que determina el caràcter acidòfil d'aquest enzim (Sarno *et al.*, 1996). A més a més, aquesta regió podria contenir una seqüència potencial de localització nuclear (NLS). Just davant d'aquest *cluster* es troba la Lys68 que és un residu essencial en la unió de l'ATP. L'eliminació d'aquesta lisina produeix la inhibició total de la CK2 α .

Una altra característica de la CK2 α és la presència d'un segment d'activació sense residus de serina ni de treonina (de l'aminoàcid 184 al 191), a diferència del que es dona en les quinases amb les que presenta més homologia (CDKs, MAPK i GSK-3). En aquestes quinases la fosforilació d'aquests residus desplega el segment d'activació que les estabilitza i les porta a la forma activa. En la CK2 α no s'ha descrit cap tipus de fosforilació en aquesta regió. Aquestes dades donarien suport a la idea que la CK2 α sempre es troba en conformació activa. Tot i així, la interacció d'aquest segment amb el domini N-terminal de la pròpia subunitat, sembla ser important per a l'activació total de la CK2 (Sarno *et al.*, 1998; Sarno *et al.*, 2002). En l'estructura tridimensional (Figura 1a) es mostren els contactes estabilitzadors entre el segment N-terminal (blau), el segment d'activació (groc) i l'hèlix α C (vermell).

La resolució d'aquesta estructura va permetre el disseny de fàrmacs inhibidors específics d'aquesta proteïna. Es va poder determinar que la butxaca hidrofílica del lloc d'unió a l'ATP d'aquesta quinasa és més petita que la de la resta de quinases, i va permetre obtenir inhibidors específics com el TBB (4,5,6,7-tetrabromobenzotriazol) (Battistutta *et al.*, 2001; Sarno *et al.*, 2001).

Finalment, en aus i mamífers hi ha un domini C-terminal que es fosforilat per p34^{cdc2}. No obstant, aquest domini és absent en les subunitats catalítiques de *Drosophila*, de *S. Cerevisiae* i de plantes, suggerint que aquesta fosforilació podria tenir funcions especialitzades en vertebrats.

La subunitat reguladora (CK2 β)

La subunitat reguladora de la CK2 no presenta homologia amb cap altre proteïna coneguda, excepte amb la proteïna *Stellate* de *Drosophila melanogaster* (Bozzetti *et al.*, 1995), de funció desconeguda. Generalment, en eucariotes superiors només es troba una isoforma de CK2 β . En llevat, es troben diverses formes i en plantes és freqüent trobar major heterogeneïtat. La subunitat reguladora CK2 β també es troba conservada al llarg de l'evolució, encara que en menor grau que la subunitat CK2 α (Boldyreff *et al.*, 1993; Maridor *et al.*, 1991).

L'estructura tridimensional de la CK2 β mostra dos dominis estructurals clarament diferenciats, un format per hèlix α i l'altre format per fulles β . A més, hi ha una cua N-terminal i una altra C-terminal no estructurades. Un àtom de Zn²⁺ es troba coordinat a 4 residus de cisteïna, formant un dit de zinc, que és el responsable de la formació dels dímers CK2 β -CK2 β a través d'interaccions hidrofòbiques. La cua N-terminal presenta un domini acídic que queda col·locat als extrems oposats al formar-se l'homodímer β - β . Aquests dominis acídics altament exposats podrien interaccionar amb poliamines i/o proteïnes reguladores de la CK2 (Chantalat *et al.*, 1999). Proper a aquest *loop* acídic existeix també una seqüència amb homologia a la *destruction box* de les ciclines, que podria regular l'estabilitat de la proteïna. A l'extrem C-terminal hi ha un *loop* bàsic implicat amb la interacció amb les subunitats catalítiques CK2 α .

La presència de la subunitat CK2 β afecta a tres característiques funcionals de la subunitat catalítica CK2 α : (1) l'estabilitat; (2) l'activitat; i (3) l'especificitat

(Allende and Allende, 1995; Issinger, 1993). A més, la CK2 β té diferents llocs d'unió per altres proteïnes, com c-Mos, A-Raf o PKC ζ , així com per altres components de diverses cadenes de senyalització com Dsh, FAF-1, p53, Topoll o b-FGF (Ahmed *et al.*, 2002). Això indica que podria estar involucrada en diferents vies de senyalització.

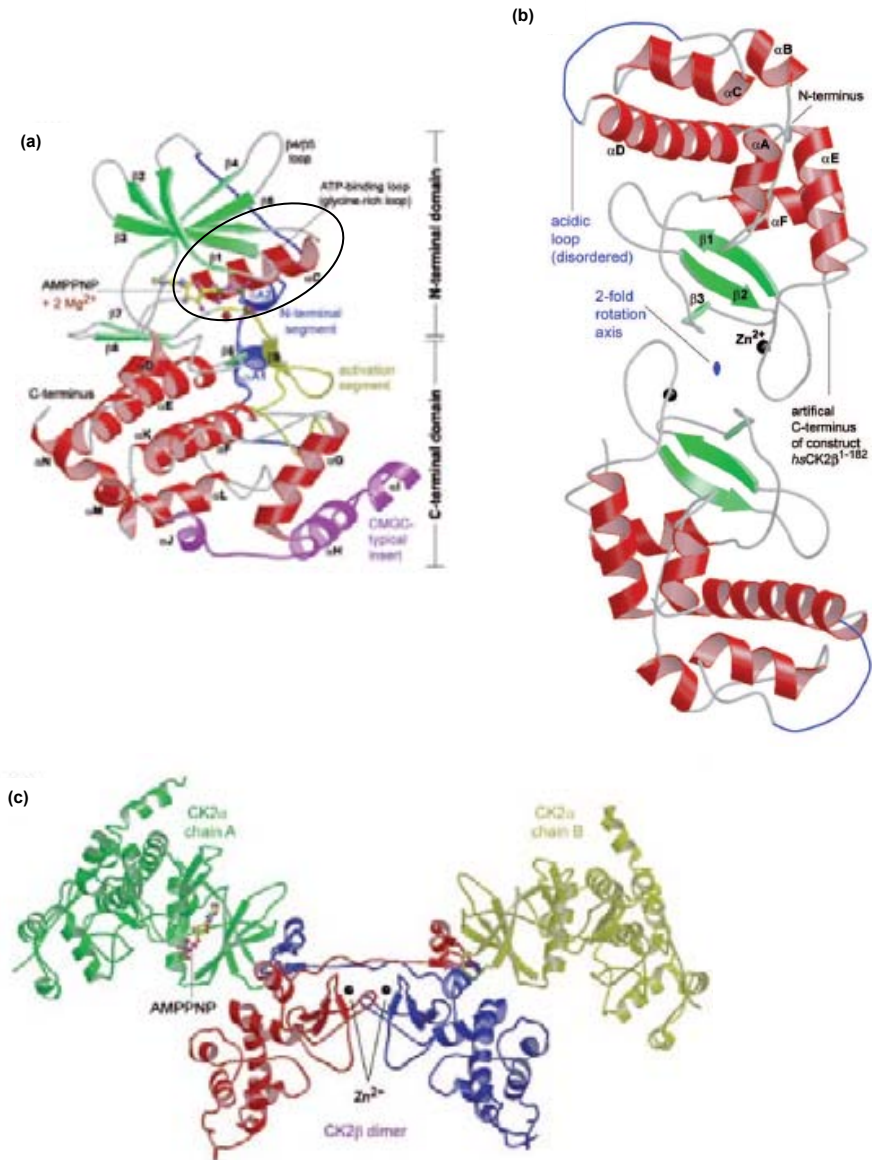


Figura 1. Visió general de l'estructura de la proteïna quinasa CK2

(a) Estructura de la subunitat catalítica de la CK2 α de *Zea mays* en complexe amb AMPPNP i ions de magnesi. En blau es mostra el segment N-terminal, en groc el segment d'activació i encerclada en negre l'hèlix α C. (b) Arquitectura de la subunitat CK2 β extreta de l'holoenzim CK2 humana. Es mostra l'estructura dimèrica de la CK2 β mostrant el motiu estructural dit de Zn (c) Estructura del complex holoenzimàtic. Figura modificada de (Niefind *et al.*, 2009).

Substrats i funcions de la proteïna quinasa CK2

En animals s'han descrit més de 300 substrats de la CK2, tot i això s'especula que n'hi ha molts més. D'alguns d'aquests es coneix l'efecte fisiològic de la fosforilació, però de la gran majoria només es coneix l'existència d'aquesta. A grans trets, els substrats de la CK2 es poden classificar segons la implicació del substrat fosforilat en: (1) proteïnes que controlen la síntesi del DNA i del RNA; (2) factors de transcripció i traducció; (3) proteïnes implicades en el creixement, la proliferació i la diferenciació cel·lular; i (4) proteïnes implicades en la transducció de senyals.

En plantes, el número de substrats identificats és molt menor que en animals. Entre aquests, hi ha factors de transcripció i transducció de senyals de llum i de ritmes circadians, factors de transcripció i proteïnes d'emmagatzematge a la llavor, proteïnes que s'encarreguen de la transcripció del DNA, proteïnes que s'encarreguen de la traducció de l'RNA, factors de transcripció i proteïnes que estan relacionades en vies d'estrès, proteïnes involucrades amb la síntesi d'ATP, proteïnes involucrades amb la síntesi de lípids, proteïnes del proteasoma, proteïnes de la matriu nuclear, una proteïna que forma part del catabolisme de la lisina, i una proteïna vírica. La taula 1 mostra tots els substrats de la CK2 de diferents plantes publicats fins al moment, amb les seves respectives referències.

Vies de transducció de senyals de llum

Nom	Planta	tipus i funció	Referència
GBF-1	Arabidopsis	Factor de transcripció bZIP que s'uneix a promotors G-box	(Klimczak <i>et al.</i> , 1992)
AT-1 i ATBP-1	Pèsol	Factors de transcripció que s'uneixen a promotors AT-rich	(Datta and Cashmore, 1989; Tjaden and Coruzzi, 1994)
CCA-1 i LHY	Arabidopsis	Factor de transcripció relacionat amb els Myb, components de l'oscil·ladors circadià	(Sugano <i>et al.</i> , 1999)
HY5	Arabidopsis	Factor de transcripció bZIP que promou la fotomorfogènesi	(Hardtke <i>et al.</i> , 2000)
PIF-1	Arabidopsis	Factor d'interacció amb el fitocrom	(Bu <i>et al.</i> , 2011)

Emmagatzematge a les llavors

Nom	Planta	tipus i funció	Referència
Opaque2	Blat de moro	Factor de transcripció bZIP que s'uneix al promotor de la zeína	(Ciceri <i>et al.</i> , 1997)
β -conglícina	Soja	Proteïna d'emmagatzematge	(Ralet <i>et al.</i> , 1999)
Calreticulina	Espinac	Proteïna d'unió a Ca^{2+} , metabolisme del calci	(Baldan <i>et al.</i> , 1996)
aEpa	Soja	Inhibidor de la proteïnasa tipus Bowman-Birk	(Katano <i>et al.</i> , 2005)

Transcripció

Nom	Planta	Tipus i funció	Referència
PDH65	Pèsol	DNA helicasa que separa la doble cadena del DNA	(Tuteja <i>et al.</i> , 2001)
DNA topoisomerasa I	Pèsol	DNA topoisomerasa que relaxa la tensió del DNA superhèlix	(Tuteja <i>et al.</i> , 2003)
SSRP1	Blat de moro	Transcripció i replicació del DNÀ danyat per UV	(Krohn <i>et al.</i> , 2003)
HMGB1	Blat de moro	Proteïna no histona d'unió al DNA	(Thomsen <i>et al.</i> , 2004)
SIG1	Mostassa	Factor sigma de la RNA polimerasa plastidial que transcriu el DNA del plastidi	(Ogrzewalla <i>et al.</i> , 2002)
HD2B	Blat, Arabidopsis	Deacetilasa d'histones que participa a la repressió de gens	(Dennis and Browning, 2009; Dennis <i>et al.</i> , 2009)

Traducció

Nom	Planta	tipus i funció	Referència
Proteïnes-P	Blat de moro	Formen un complex amb subunitat ribosomal 60S	(Bailey-Serres <i>et al.</i> , 1997)
p34	Cloroplast d'espínacs	Ribonucleoproteïna de processament del mRNA	(Kanehatsu <i>et al.</i> , 1993)(Dennis and Browning, 2009; Dennis <i>et al.</i> , 2009)
p36	Blat	Subunitat del eIF2 que intercanvia	(Janaki <i>et al.</i> , 1995)

eIF2 α , eIF2 β , eIF4c, eIF4B, eIF5	Blat	nucleòtids de guanina Subunitats eIF (factors d'iniciació de la traducció)	(Browning <i>et al.</i> , 1985; Dennis and Browning, 2009; Dennis <i>et al.</i> , 2009)
eIF2 α , eIF2 β , eIFB1, eIF4B2, eIF5 eIF5A	Arabidopsis Blat de moro	Subunitats eIF (factors d'iniciació de la traducció) Subunitat eIF (factor d'iniciació de la traducció)	(Dennis and Browning, 2009; Dennis <i>et al.</i> , 2009) (Lebska <i>et al.</i> , 2010)
Proteïnes ribosomals de la subunitat 60S	Blat	Forma un complex amb la subunitat ribosomal 60S	(Browning <i>et al.</i> , 1985)

Vies d'estrès/ABA

Nom	Planta	tipus i funció	Referència
Rab 17	Blat de moro	Proteïna LEA induïda per estrès hídric	(Plana <i>et al.</i> , 1991)
TAS-14	Tomàquet	Proteïna LEA induïda per estrès hídric	(Godoy <i>et al.</i> , 1994)
EmBP-2 i ZmBZ-1	Blat de moro	Factor de transcripció bZIP d'activació de la transcripció del induïble per abscísic rab28	(Nieva <i>et al.</i> , 2005)
TGA2	Arabidopsis	Factor de transcripció de la via de senyalització d'àcid salicílic	(Kang and Klessig, 2005)
p23	Arabidopsis	Co-xaperona que s'associa amb HSP90, s'activa en resposta a àcid salicílic	(Tosoni <i>et al.</i> , 2011)

Síntesi d'ATP

Nom	Planta	tipus i funció	Referència
CFOCF1- ATPasa Aspirasa	Cloroplasts d'espínacs Pèsol	Subunitat b de l'ATPasa sintetasa NTPasa d'hidròlisi d'ATP	(Kanekatsu <i>et al.</i> , 1998) (Hsieh <i>et al.</i> , 2000)

Síntesi de lípids

Nom	Planta	tipus i funció	Referència
Gp96	Soja	Lipooxigenasa d'àcids grassos insaturats	(Ohtsuki <i>et al.</i> , 1995)

Proteasoma

Nom	Planta	tipus i funció	Referència
C2	Arròs	Proteïna del proteasoma (degradació de proteïnes)	(Umeda <i>et al.</i> , 1997)

Proteïnes de la matriu nuclear

Nom	Planta	tipus i funció	Referència
Lamina-like MFP1	Pèsol Cloroplast de tomàquet i tabac	Proteïna de la matriu nuclear Component de la matriu nuclear	(Li and Roux, 1992) (Jeong <i>et al.</i> , 2004; Meier <i>et al.</i> , 1996)
90 kDa MFP1	Ceba	Component de la matriu nuclear	(Samaniego <i>et al.</i> , 2006)

Metabolisme			
Nom	Planta	tipus i funció	Referència
LKR/SDH	Arabidopsis blat	Catabolisme de la lisina	(Stepansky <i>et al.</i> , 2006)

Proteïnes víriques			
Nom	Planta	tipus i funció	Referència
ToMV MP	Tabac	Proteïna de moviment (MP) del virus del mosaic del tomàquet (ToMV)	(Matsushita <i>et al.</i> , 2003)

Taula 1. Substrats descrits per la CK2 de sistemes vegetals.

Ampliat de (Riera *et al.*, 2001a).

Regulació de la proteïna quinasa CK2

En plantes, els transcrits de CK2 α i CK2 β s'acumulen preferentment als meristems i a altres teixits amb alta proliferació cel·lular (Espunya and Martinez, 2003; Salinas *et al.*, 2006). Encara que no hi ha d'haver necessàriament una correlació entre transcrit i activitat en un moment concret (ja que la regulació de l'activitat CK2 és multifactorial), en cèl·lules de tabac s'ha demostrat una correlació entre expressió i activitat CK2 durant el cicle cel·lular (Espunya *et al.*, 1999).

Durant l'embriogènesi del blat de moro hi ha una expressió diferencial de les subunitats CK2 β , mentre que les subunitats CK2 α presenten un patró d'expressió similar entre elles (Riera *et al.*, 2001b). La complexitat a nivell d'expressió de les diverses isoformes es magnifica degut a la multiplicitat d'interaccions que cadascuna d'elles pot establir, encara que algunes de les possibles interaccions α/β i β/β són preferencials. Totes aquestes dades posen en evidència un alt grau de complexitat en la regulació de la formació de l'holoenzim. A més, existeixen altres mecanismes reguladors de l'activitat CK2 que es descriuen a continuació.

Regulació per fosforilació

Actualment no hi ha masses evidències que donin suport a una regulació de l'activitat CK2 per fosforilació (Litchfield, 2003), encara que no s'exclou que aquest mecanisme participi en algun grau. Aquesta és la gran diferència que presenta la CK2 respecte la majoria de quinases, ja que la seva actuació no és en "vertical", dins de la cascada de fosforilació, com la majoria de quinases.

La CK2 pot autofosforilar-se, tant en la subunitat CK2 α com en la CK2 β . No es coneix encara quin és el significat funcional d'aquesta autofosforilació, tot i que s'ha relacionat amb la capacitat de formar agregats d'ordre superior que inactivarien la quinasa (Pagano *et al.*, 2005). En Arabidopsis i en blat de moro, la CK2 β presenta possibles dianes d'autofosforilació addicionals, la major part d'aquestes situades a la regió N-terminal.

Interaccions reguladores

L'activitat de la CK2 és independent de missatgers secundaris coneguts. Tot i així, la interacció amb alguns compostos pot modificar la seva activitat. Compostos amb càrregues negatives com l'heparina, inhibeixen l'activitat *in vitro*, i compostos amb càrregues positives, com les poliamines, en són activadores (Tuazon and Traugh, 1991).

En estudis realitzats amb la CK2 purificada d'Arabidopsis, la presència de poliacions a la reacció enzimàtica (polilisina, poliarginina i protamina) provoca un desplaçament de la incorporació de fosfat des de la subunitat CK2 β a la CK2 α , mentre que l'espermina o l'espermidina causen un increment en la incorporació de fosfat a la subunitat CK2 β (Espunya and Martínez, 1997).

Interaccions proteïna-proteïna

La interacció de la quinasa CK2 amb altres proteïnes podria contribuir a la seva regulació. Les proteïnes no necessàriament han de ser substrats, sinó que la interacció pot alterar o estabilitzar la seva activitat. Podria ser també que la unió de determinades proteïnes estigués relacionada amb la localització de la CK2. Alguns estudis fets en animals, han demostrat que la CK2 interacciona amb proteïnes com la tubulina, que pot estar involucrada en la localització de la CK2 en llocs específics o en estructures intracel·lulars (Litchfield, 2003). En plantes, un possible exemple d'aquest tipus de regulació el trobaríem en la interacció de la CK2 amb proteïnes de la matriu nuclear (Meier *et al.*, 1996; Samaniego *et al.*, 2006). Aquestes proteïnes, a part de tenir un paper estructural, podrien constituir una plataforma per a la interacció intranuclear proteïna-proteïna o proteïna-àcid nucleic i així participar en l'organització de la replicació i la transcripció (Ahmed *et al.*, 2000).

Estratègies per l'eliminació de l'activitat CK2

Ús d'inhibidors químics

La proteïna quinasa CK2 té un ampli ventall d'inhibidors. Un dels més antics, és el DRB, 5,6-dicloro-1-(β -D-ribofuranosil)-benzamidazol, que es va descriure l'any 1986 (Zandomeni *et al.*, 1986), i que inhibeix la CK2 però també la CK1 i altres quinases amb la mateixa eficàcia (Meggio *et al.*, 1990). S'han descrit diferents tipus d'inhibidors de la CK2 com la quercetina i l'apigenina que són derivats de flavonoides (Sarno *et al.*, 2002), l'emodina i els seus derivats i, els derivats del pirazol(1,5- α)(1,3,5)-triazina. Aquests però, o són poc específics (a més de la CK2 inhibeixen altres quinases) i/o tenen una menor potència inhibidora (Davies, 2004; Sarno *et al.*, 2003).

Actualment, el tipus d'inhibidors més utilitzats són els derivats del DRB. Aquests es van obtenir utilitzant l'esquelet del DRB i substituint els radicals originals per àtoms de brom (veure figura 4), donant lloc al TBBz (tetrabromo-benzimidazol) i el TBB (4,5,6,7-tetrabromobenzotriazol) que són més potents i més específics que el DRB. A més a més, el derivat dietilamino

del TBBz, el DMAT, encara és més potent que el TBBz i que el TBB. Aquests tres últims, són més selectius perquè es van dissenyar tenint en compte que la butxaca hidrofòbica adjacent al lloc d'unió de l'ATP, és molt més petita en la CK2 que en la resta de quinases. No obstant això, estudis fets comparant la selectivitat entre aquests tres inhibidors revelen que el més efectiu i selectiu és el TBB.

En aquesta tesi s'ha utilitzat el TBB com a inhibidor específic de la CK2, com a control dels resultats obtinguts amb un mutant dominant negatiu de la CK2, el qual s'explica a continuació.

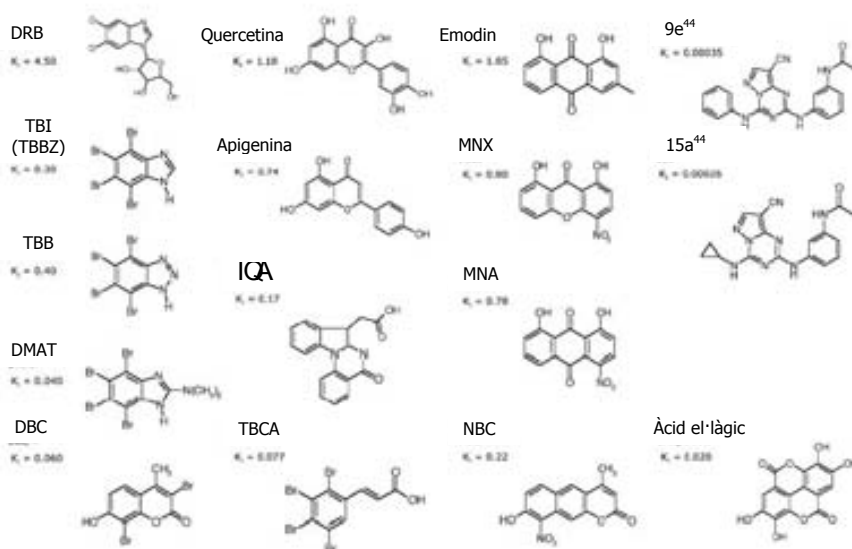


Figura 2. Repertori d'inhibidors de la CK2

Estructura dels diferents inhibidors de la CK2, es representen els acrònims i la seva constant d'inhibició K_i expressada en μM . Figura extreta de (- Sarno and - Pinna) .

Inhibició de l'activitat CK2 mitjançant un mutant dominant negatiu de la CK2 α

Per tal d'avançar en el coneixement del paper de la CK2 en els sistemes vegetals i, concretament en el desenvolupament d'*Arabidopsis thaliana*, es va

utilitzar una aproximació basada en l'obtenció d'un mutant de pèrdua de funció CK2 (la línia CK2mut). S'han descrit diverses estratègies per tal de poder estudiar *in vivo* la funció de la proteïna CK2 i dels seus substrats. La disminució dels nivells intracel·lulars de la CK2 α s'ha realitzat en diversos estudis per mitjà de DNA antisentit, *knockout* o mutants catalíticament inactius. En aquestes estratègies s'ha de posar especial atenció en el grau d'expressió basal de la CK2 endògena i en l'existència de diverses isoformes de CK2. Per exemple, el *knockout* en ratolí d'una de les subunitats dona a lloc un animal estèril però viable (Xu *et al.*, 1999), la qual cosa indica que la falta d'una subunitat és parcialment compensada per la presència d'una altra. En *S. Cerevisiae* únicament la disrupció d'ambdós subunitats catalítiques és letal (Padmanabha *et al.*, 1990).

Tenint en compte que l'activitat d'aquest enzim és absolutament necessària per la supervivència i que les diferents isoformes existents tenen funcions parcialment redundants, es va optar per dissenyar un mutant dominant negatiu. Aquesta estratègia, provada prèviament en cèl·lules de mamífer, es basa en l'eliminació de l'activitat CK2 mitjançant la sobreexpressió d'una subunitat α enzimàticament inactiva però, amb capacitat per interaccionar amb les subunitats β (moduladores de l'activitat CK2) i amb els substrats, competint així amb les subunitats α endògenes (Lebrin *et al.*, 2001; Vilk *et al.*, 1999).

La inactivació de la subunitat catalítica α es va produir per mutagènesi dirigida, on es va substituir la lisina K63, del gen CKA3 de tabac (GeneBank/EMBL accession no. AJ438263), per una metionina (Espunya *et al.*, 2005; Moreno-Romero *et al.*, 2008). Aquest canvi de residu elimina l'activitat fosfotransferasa de la quinasa però no interfereix en la interacció CK2 α -CK2 β . A més, es va introduir un epítotop d'hemaglutinina (HA) a l'extrem N-terminal de la cadena polipeptídica de la CKA3 mutada amb l'objectiu de poder ser immunodetectada.

L'ORF (*open reading frame*) mutat (CK2mut) es va clonar sota un promotor induïble per evitar els efectes letals de l'expressió constitutiva del transgèn.

Es va escollir un sistema induïble per dexametasona (Dex), un anàleg de glucocorticoides. Aquest sistema està controlat pel factor de transcripció quimèric GVG, que conté el domini d'unió a lligant del receptor de glucocorticoides (GR). El GVG està sota el control d'un promotor constitutiu però, de manera equivalent a altres receptors d'esteroides, tant sols quan s'uneix a l'inductor (Dex), migra al nucli, on s'uneix al promotor 6xUAS_{gal4} que controla l'expressió del transgèn (figura 3).

La construcció mencionada es va clonar al vector binari pTA7002 (Aoyama and Chua, 1997) i es va introduir al genoma d'*Arabidopsis* de manera estable per mitjà de la transformació amb *Agrobacterium tumefaciens*.

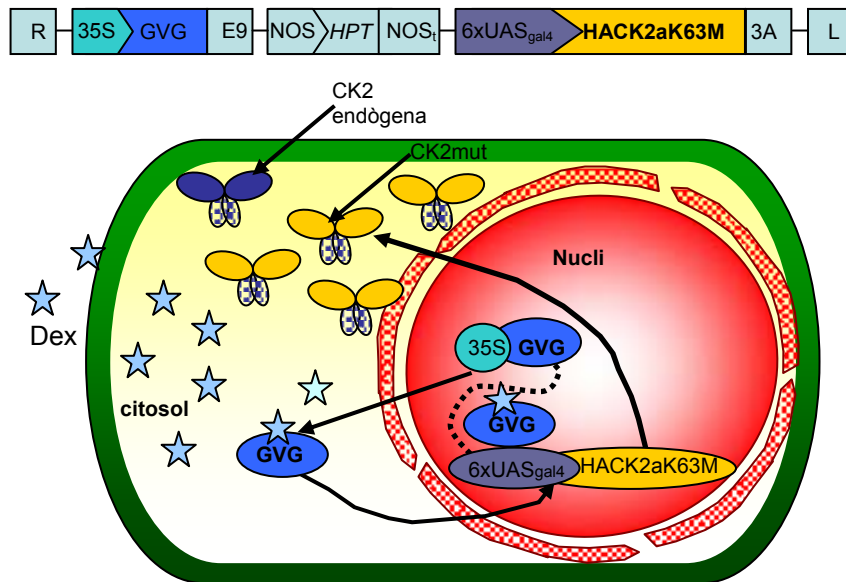


Figura 3. Esquema de la construcció utilitzada i del funcionament del mutant dominant negatiu per la CK2α (CK2mut).

Abreviatures: **R**, extrem dret del T-DNA; **35S**, promotor 35S; **GVG**, factor de transcripció quimèric induïble per dexametasona; **E9**, seqüència de poliadenilació de rbcS-E9 de pèsol; **NOS**, promotor de la nopalina sintetasa; **HPT**, higromicina fosfotransferasa; **NOS_t**, seqüència de poliadenilació de la nopalina sintetasa; **6xUAS_{gal4}**, promotor regulat pel GVG; **HACK2aK63M**, CK2 alfa de tabac amb la mutació K63M fusionada a l'epítip d'hemaglutinina (HA); **3A**, seqüència de poliadenilació de rbc-3 A de pèsol; **L**, extrem esquerre del T-DNA.

Gràcies a la construcció d'aquest mutant s'han pogut estudiar *in planta* alguns efectes de l'eliminació de l'activitat CK2. Com s'ha comentat anteriorment, el fet d'haver construït el mutant sota un sistema induïble ha permès estudiar els efectes de l'eliminació de la CK2 tant des de la germinació, com per induccions transitòries de plàntules en creixement.

Les plantes CK2mut han permès avançar en el coneixement de la implicació de la proteïna quinasa CK2 en el cicle cel·lular. Anteriorment a la construcció d'aquest mutant el nostre grup treballava amb la línia cel·lular de tabac BY-2 (*bright yellow-2*). Mitjançant l'ús d'aquesta es va determinar que els nivells d'expressió de CK2 oscil·len durant el transcurs del cicle cel·lular, sent més alta a les fases G1/S i M (Espunya *et al.*, 1999). Aquests resultats s'han pogut corroborar en planta, per mitjà de les plantes doble transgèniques CYCB1;1-GFPxCK2mut. Es va observar que hi ha un menor nombre de cèl·lules que expressen fluorescència a l'àpex radicular. Això s'interpreta com una parada del cicle cel·lular abans de G2/M, i juntament amb dades d'expressió de gens cicle cel·lular, es va detectar que la inhibició de l'activitat CK2 provocava una parada del cicle cel·lular a G2 primerenca i/o G1/S (Moreno-Romero *et al.*, 2008).

Aquest mutant va permetre fer un estudi exhaustiu dels efectes fenotípics que provoca l'eliminació de l'activitat CK2. La germinació de les plantes CK2mut en presència de dexametasona produeix uns efectes molt severes en el fenotip, com són la inhibició de l'expansió del cotiledó, un hipocòtil més llarg i despigmentat, així com una arrel principal més curta. També es va observar que la inducció de més de 6 dies amb dexametasona, provocava clorosi als cotiledons i una parada parcial del creixement, la qual resulta en la mort de la planta (Moreno-Romero *et al.*, 2008). Tot i així, es va comprovar que si es retira l'inductor del medi, les plantes CK2mut són capaces de recuperar-se parcialment (Moreno-Romero *et al.*, 2008).

A més es va observar que les plantes CK2mut crescudes en foscor, tenen un fenotip molt similar al de les plantes CK2mut crescudes en llum. Una planta salvatge crescuda en foscor té un fenotip anomenat etiolat, en el que

s'observen els cotiledons tancats en forma de garfi, i l'elongació de l'hipocòtil. En canvi, les plantes CK2mut presentaven el cotiledó obert i una inhibició d'elongació de l'hipocòtil, és a dir, un fenotip aparentment de-etiolat (Moreno-Romero *et al.*, 2008).

Per altra banda, duent a terme induccions transitòries de plantes CK2mut es va poder observar que aquestes tenien el creixement radicular afectat, tant de l'arrel principal com de les arrels laterals. Els fenotips obtinguts per l'eliminació de l'activitat CK2, tant des de la germinació (en presència o absència de llum), com per induccions transitòries en plàtules de cinc dies, van permetre comprovar que la proteïna quinasa CK2 té un paper clau en el desenvolupament de la planta (Moreno-Romero and Martinez, 2008; Moreno-Romero *et al.*, 2008; Moreno-Romero *et al.*, 2011). Alguns dels fenotips obtinguts per l'eliminació de l'activitat CK2 són típicament regulats per la fitohormona auxina. Partint d'aquests resultats, en aquesta tesi s'ha estudiat la implicació de la proteïna quinasa CK2 en les vies senyalització de les auxines.

II. Les auxines

Generalitats

Les auxines són una classe d'hormones vegetals o fitohormones que estimulen el creixement de les plantes. Són essencials durant tot el cicle vital d'una planta ja que intervenen en diversos processos del desenvolupament, com per exemple, l'embriogènesi, l'organogènesi postembrionària i el creixement en direcció als tropismes (Leysner, 2011). L'auxina més abundant i important a nivell de desenvolupament és l'àcid indol-3-acètic (IAA). A nivell cel·lular, aquesta hormona controla l'expansió cel·lular, la divisió cel·lular i la diferenciació i, aquesta regulació es produeix per un procés dependent de la concentració de l'hormona (Perrot-Rechenmann, 2010). Tenint en compte la multitud de processos que regula l'auxina, es pot considerar que aquesta fitohormona és un dels principals reguladors del desenvolupament vegetal.

La senyalització mediada per auxina pot estar regulada a diferents nivells: a nivell de metabolisme (síntesi, conjugació i degradació), a nivell de transport direccional de l'hormona i a nivell de transducció de senyals (Chapman and Estelle, 2009; Ludwig-Muller, 2011; Petrasek and Friml, 2009; Zhao, 2010). Defectes en el metabolisme o el transport donen uns trets fenotípics que es caracteritzen per l'absència d'arrels laterals, l'afectació dels tropismes, l'afectació del creixement de l'arrel o defectes en la floració.

El metabolisme de l'auxina

Rutes de síntesi de l'auxina en plantes.

L'àcid indol-3-acètic (IAA) és l'auxina endògena més abundant i una de les més importants a nivell del desenvolupament vegetal, però, també s'han identificat altres components auxínics en planta, com són l'àcid 4-cloroindol-3-acètic (4-Cl-IAA), l'àcid indol-3-butíric (IBA) i l'àcid fenilacètic (PAA). Per altra banda, també existeixen auxines sintètiques, com el 2,4-D (àcid 2,4-diclorofenoxiacètic) i el NAA (àcid naftalenacètic) (Simon and Petrusek, 2011; Strader and Bartel, 2011; Woodward and Bartel, 2005).

Tradicionalment es considerava que la biosíntesi d'auxina es donava solament a la part aèria de la planta, especialment a les fulles joves i als meristems (Ljung *et al.*, 2001); però, actualment s'ha demostrat que la biosíntesi d'auxina també es dona en altres teixits, com per exemple, en la regió meristemàtica de l'arrel i a les arrels laterals (Ljung *et al.*, 2001). Existeixen múltiples vies de biosíntesis de l'IAA que contribueixen a la regulació de la producció d'aquesta fitohormona, però, aquesta complexitat ha limitat, fins al moment, el coneixement complet d'aquestes vies. Les plantes utilitzen dues rutes generals per a la síntesi de l'IAA: les vies dependents de triptòfan i la via independent de triptòfan.

Vies dependents de triptòfan

S'han proposat diverses vies dependents de triptòfan, el nom de les quals prové d'un dels intermediaris de la via: la via de l'àcid indol-3-pirúvic (IPA) (figura 4 (1)), la via de l'indol-3-acetamida (IAM) (figura 4 (2)), la via de la triptamina (TAM) (figura 4 (3)) i la via de l'indol-3-acetaldoxima (IAOx) (figura 4 (4)). Tot i la diversitat de vies conegudes calen experiments bioquímics i

genètics que permetin revelar la importància relativa de cadascuna d'aquestes vies.

La via de l'àcid indol-3-pirúvic (IPA) (Figura 4 (1)) està formada pels següents intermediaris: Trp, IPA, indol-3-acetaldehid (IAAld) i IAA. L'enzim triptòfan aminotransferasa (TAA1), també anomenat *WEAK ETHYLENE INSENSITIVE8 (WEI8)* (Figura 4 (1a)), catalitza el pas de triptòfan a IPA, seguidament, es produeix la descarboxilació de l'IPA a indol-3-acetaldehid (Figura 4 (1b)) i, finalment, l'enzim aldehid oxidasa (AAO1) (Figura 4 (encerclat en lila)) origina l'àcid indol-3-acètic (IAA) (Stepanova *et al.*, 2008; Tao *et al.*, 2008; Yamada *et al.*, 2009).

La via de l'indolacetamida (IAM) (Figura 4 (2)) es va caracteritzar inicialment en bacteris, però, està conservada en plantes (Lehmann *et al.*, 2010; Mano *et al.*, 2010; Pollmann *et al.*, 2002; Pollmann *et al.*, 2003; Sugawara *et al.*, 2009). Aquesta via consta d'un únic intermediari, l'IAM; aquest es forma a partir del triptòfan amb una reacció catalitzada per un enzim amb activitat triptòfan monooxigenasa. A continuació, l'enzim amidohidrolasa (AMI1) (Figura 4 (2)) catalitza el pas de l'IAM a àcid indol-3-acètic (IAA).

La via de la triptamina (TAM) (Figura 4 (3)) està constituïda per varis intermediaris: Trp, TAM, *N-hydroxyl-TAM*, *indol-3-acetaldoxime (IAOX)*, *IAAd*, *IAA*. En el primer pas d'aquesta via, el Trp és convertit en triptamina per un enzim amb activitat descarboxilasa, posteriorment, l'enzim YUCCA (YUC) oxida la triptamina per formar *N-hydroxyl-TAM* (Figura 4 (3)) (Cheng *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2001; Zhao, 2010). Aquest intermediari, *N-hydroxyl-TAM*, es pot deshidrogenar a IAOX, o bé, deshidrogenar i hidrolitzar a IAAld (Figura 4 (3)). L'últim component, l'indol-3-acetaldehid, passa a àcid indol-3-acètic mitjançant l'enzim aldehid oxidasa (AAO1) (Figura 4 (*)), mentre que, IAOx pot ser convertit a IAA mitjançant la via de l'indol-3-acetaldoxima (IAOx).

La via de l'indol-3-acetaldoxima (IAOx) (figura 4 (4)) consta dels següents intermediaris: Trp, IAOx, indol-3-acetonitril (IAN) o IAAld, IAA. Els enzims CYP79B2 i CYP79B3 (figura 4 (4)) són citocrom P450 monooxigenases que

oxiden el triptòfan a indol-3-acetaldoxima (IAOx) (Hull *et al.*, 2000; Mikkelsen *et al.*, 2000). A continuació, com ja s'ha comentat anteriorment, l'IAOx és transformat a IAAlD i, aquest, per acció de l'enzim aldehid oxidasa (AAO1), pot ser convertit a IAA, (Figura 4 (*)). Alternativament, l'indol-3-acetaldoxima (IAOx) (figura 4 (4)) pot originar IAA, a partir d'una via en la que l'enzim CYP83B1 (figura 4 (5)) -una citrocrom P450 monooxigenasa- catalitza el pas cap a IAOx *N-oxide* (figura 4 (5)). Posteriorment, mitjançant una sèrie de reaccions consecutives catalitzades pels enzims *C-S liase* (figura 4 (6)) i *myrosinase* (figura 4 (7)) s'origina l'indol-3-acetonitril (IAN); aquest, en últim terme, és convertit a IAA en una reacció catalitzada pels enzims NIT (figura 4 (8)) (Bak *et al.*, 2001; Barlier *et al.*, 2000; Woodward and Bartel, 2005).

L'estudi de les diferents vies dependents de triptòfan va portar a conèixer que la biosíntesi local d'auxina (a teixits o a cèl·lules específiques) és requerida pel patró de distribució d'aquesta hormona. Els fenotips dels mutants de biosíntesi d'auxina poden ser rescatats per l'expressió local del gen bacterià *iaaM*, però no per l'aplicació d'auxina exògena. Aquest enzim catalitza el pas de triptòfan a indol-3-acetamida, compost que, seguidament, és hidrolitzat per donar IAA, (Cheng *et al.*, 2006).

Via independent de triptòfan

L'anàlisi de mutants dels enzims triptòfan sintasa α i/o triptòfan sintasa β - enzims que intervenen en els darrers passos de formació de triptòfan- va permetre identificar una via de síntesi d'IAA que era independent de triptòfan (figura 4). L'anell indol és l'últim intermediari abans del triptòfan, per tant, es va suggerir aquest compost com a precursor de la via independent de triptòfan (Ostin *et al.*, 1998). Tot i així, estudis quantitius en diferents mutants de biosíntesi i de pèrdua de funció de l'IGP sintetasa proposen l'indol-3-glicerol fosfat (IGP) com a precursor d'aquesta via (figura 4 (*)) (Ouyang *et al.*, 2000). No obstant, fins al moment, no s'han caracteritzat ni enzims ni intermediaris de la via independent de triptòfan, encara que, hi ha

evidències experimentals que aquesta és operativa en plantes (Ehlert *et al.*, 2008; Normanly *et al.*, 1993).

La via independent de triptòfan actua de manera predominant en la biosíntesi d'auxina durant l'embriogènesi somàtica en pastanaga, mentre que, en cultius de cèl·lules en suspensió d'*Arabidopsis*, predomina la biosíntesi d'auxina dependent de triptòfan (Michalczuk *et al.*, 1992), indicant doncs, que hi ha estímuls de desenvolupament que modulen el funcionament de la via dependent o la independent de triptòfan.

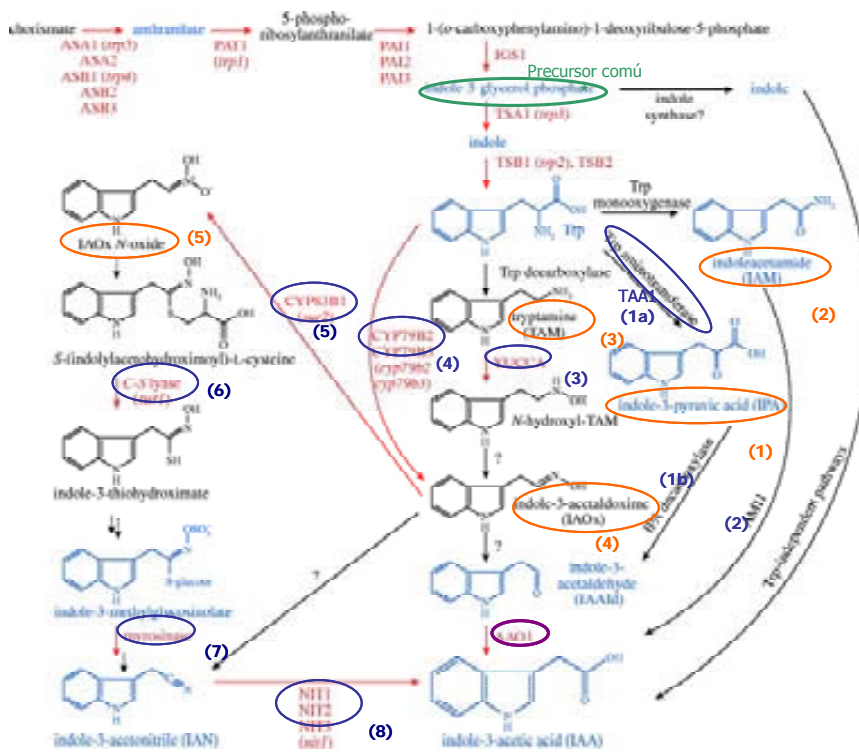


Figura 4. Potencials rutes de biosíntesi de l'àcid inol-3-acètic en *Arabidopsis*.

La síntesi *de novo* de l'IAA s'inicia a partir de l'indol-3-glicerol fosfat, i d'aquí es divideix en dos rutes: les vies dependents de triptòfan (ombrejades en groc) i la via independent de triptòfan (ombrejada en blau). Els components identificats en *Arabidopsis* es mostren en blau. Els enzims que han estat identificats en gens d'*Arabidopsis* es mostren en vermell i els mutants d'*Arabidopsis* en vermell i cursiva. Les conversions que encara no estan identificades es marquen amb un interrogant. Totes aquestes vies es donen al citoplasma excepte la conversió del triptòfan a l'indol-3-acetaldoxime que es dona al cloroplast. Figura modificada de la revisió (Woodward and Bartel, 2005).

Inactivació de l'auxina

La regulació de la homeòstasi cel·lular d'auxina és important per a que aquesta hormona dugui a terme les seves funcions. Per aquest motiu, és important que hi hagi un control de la producció d'auxina però, alhora, també hi ha d'haver un control de la seva inactivació. Aquest estat inactiu de l'auxina es produeix per conjugació reversible o irreversible, constituint aquest fet, un nivell més de complexitat en el metabolisme d'aquesta hormona.

La majoria de fitohormones es troben en forma de conjugat amb diversos aminoàcids, pèptids o sucres. En el cas de l'auxina, a banda de la seva forma lliure, es troba en forma inactiva per conjugació amb, com a mínim, tres grups de característiques diferents: dos grups de baix pes molecular que consisteixen en (1) ésters de sucres i (2) conjugats amida amb aminoàcids i, un tercer grup d'alt pes molecular (3) que inclou els conjugats amida amb pèptids o proteïnes (Bajguz and Piotrowska, 2009).

La conjugació de l'auxina

A nivell cel·lular l'auxina es troba principalment conjugada amb derivats amida i, en menor grau, amb ésters i sucres. Els conjugats d'auxina més comuns en *Arabidopsis* són IAA-Ala, IAA-Leu, IAA-Asp, IAA-Glu, IAA-glucosa i IAA conjugat amb pèptids o proteïnes (Kowalczyk and Sandberg, 2001; Ljung *et al.*, 2002; Seidel *et al.*, 2006; Tam *et al.*, 2000).

Els conjugats d'auxina es consideren, generalment, un reservori temporal d'auxina inactiva, que, ràpidament, per hidròlisi poden donar l'hormona lliure. No obstant, els conjugats d'auxina amb els aminoàcids aspàrtic o glutàmic són irreversibles, fet que permet especular que aquests conjugats podrien tenir una funció cel·lular alternativa a la de reservori..

La síntesi de conjugats d'auxina amb amides tant reversibles com irreversibles és dependent d'ATP i està catalitzada per la família de proteïnes

GH3 sintetases (*Gretche Hagen 3*) (Staswick *et al.*, 2002). Els gens d'aquesta família s'indueixen per l'auxina o per herbicides auxínics (Hagen and Guilfoyle, 1985; Kelley *et al.*, 2004) i, per la infecció amb patògens, que produeixen un augment de l'auxina intracel·lular.

En *Arabidopsis thaliana*, la conjugació de l'IAA amb la glucosa requereix l'enzim UDP-glucosa transferasa (UGT84B1) (Jackson *et al.*, 2001). El conjugat de l'auxina endògena àcid indol-3-butíric (IBA-glucosa) es forma mitjançant un altre enzim, la UGT4E2 (Tognetti *et al.*, 2010), que és induïble per peròxid. Malgrat això, no es coneix res més sobre els enzims que conjuguen l'auxina amb sucres.

A diferència de l'IAA, en *Arabidopsis*, els conjugats èster d'IBA predominen sobre els conjugats amb amides (Ludwig-Müller *et al.*, 1993). La importància fisiològica de l'IBA i la dels seus derivats conjugats està en controvèrsia, ja que, s'especula que podria estar funcionant de manera independent, com a principal precursor o com emmagatzematge de l'IAA (Ludwig-Müller, 2000; Woodward and Bartel, 2005) (figura 5).

Hidròlisi dels conjugats d'auxina

Com s'ha comentat anteriorment, els conjugats d'auxina reversibles actuen com a reservori d'IAA a la planta; per una reacció d'hidròlisi simple, aquests conjugats tornen a donar auxina lliure. La síntesi i la hidròlisi dels conjugats d'auxina amb aminoàcids és la més estudiada fins al moment i, els enzims més coneguts són les IAA aminohidrolases que regulen l'auxina lliure desconjugant les amides unides a IAA. Aquests enzims són membres de la família *iaa-leucin resistant 1* (ILR) (Bartel and Fink, 1995; Davies *et al.*, 1999; LeClere *et al.*, 2002) i, s'ha observat que juguen un paper important en el desenvolupament de la planta, ja que, en la resposta a la imbibició de les llavors hi ha una hidròlisi ràpida d'auxina conjugada a amides (Bialek and Cohen, 1992). També, hi ha una regulació d'aquestes hidrolases durant l'organogènesi (Campanella *et al.*, 2008). Per altra banda, s'ha observat que

l'àcid jasmònic activa aquestes hidrolases i es produeix un increment de IAA lliure; aquest fet fa pensar que hi pot haver altres hormones regulant els nivells d' IAA (Davies *et al.*, 1999).

La regulació de la conjugació de l'auxina i la subseqüent hidròlisi encara es poc coneguda a nivell molecular però, sembla ser que és fonamental per la resposta a estímuls del desenvolupament regulats per l'auxina (Ruiz Rosquete *et al.*, 2011; Woodward and Bartel, 2005).

Degradació oxidativa de l'auxina

S'han proposat dues vies de degradació de l'auxina: la descarboxilació oxidativa i l'oxidació no descarboxilativa. La primera està basada en la modificació de diferents parts de la cadena i de l'anell indol ((Barceló *et al.*, 1990; Östin *et al.*, 1995) i, la segona té lloc sobre el nucli de l'anell indol (Ostin *et al.*, 1998). Aquesta última via no només degrada l'auxina lliure sinó que, també, és capaç d'iniciar la degradació dels conjugats d'auxina irreversibles, com IAA-Asp i IAA-Glu (Riov and Bangerth, 1992; Tuominen *et al.*, 1994). Per tant, la conversió de l'auxina lliure cap a conjugats amb àcid glutàmic i àcid aspàrtic podria ser una ruta per iniciar el catabolisme. No obstant, resta per comprovar si la conjugació irreversible de l'auxina té altres funcions regulatòries a part de l'oxidació. També, l'oxidació d'altres conjugats com oxIAA-hexosa podria estar lligada amb el catabolisme de l'auxina (Ostin *et al.*, 1998).

La degradació oxidativa és important en determinades etapes del desenvolupament de la planta com, per exemple, en la maduració del fruit i durant la resposta a l'estrès oxidatiu. Malgrat això, el control de la degradació de l'auxina és desconegut a dia d'avui.

En resum, l'activitat de l'auxina lliure es pot modular per la conjugació amb amides o èsters, també s'ha postulat que es podria modular via conversió a

IBA . Ambdós processos podrien proporcionar un mecanisme temporal d'emmagatzematge reversible d'auxina inactiva. L'auxina lliure i la conjugada amb amides irreversibles, com IAA-Asp o IAA-Glu, poden anar dirigits cap a l'oxidació i posterior degradació. A més del catabolisme i de l'emmagatzematge, l'IBA o els conjugats reversibles d'IAA podrien estar implicats en la senyalització i en el transport de l'auxina (figura 5) (Ruiz Rosquete *et al.*, 2011).

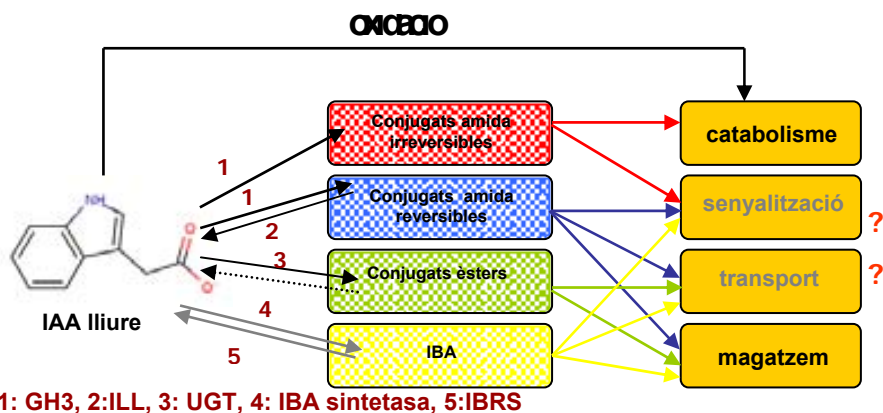


Figura 5. Conjugació i inactivació de l'auxina

Abreviacions: Asp, àcid aspàrtic; Glu; àcid glutàmic; GH3, GRETCHEN HAGEN 3; IAA, àcid indol-3-acètic; ILL, IAA-LEUCINE RESISTANT (ILL)-LIKE; IBA, àcid indol-3-butíric; IBRS, resposta a l'àcid indol-3-butíric; UGT, UDP-GLUCOSIL TRANSFERASA.

La hidròlisi dels conjugats èsters es marca amb una línia discontinua perquè encara no s'ha identificat l'enzim. Figura modificada de (Ruiz Rosquete, M. 2011).

El transport de l'auxina

Una característica clau per entendre l'acció de l'auxina és la seva distribució no uniforme als diferents òrgans de la planta, amb la formació de gradients i de màxims i mínims d'auxina que són essencials pel desenvolupament vegetal (Vanneste and Friml, 2009). Hi ha dos vies de transport d'IAA, separades físicament: una via de transport ràpid i no polar, a través del floema, i una via de transport lent i polar, que s'efectua de cèl·lula a cèl·lula i requereix l'assistència de proteïnes transportadores d'entrada i sortida de auxina (Leyser, 2005; Rubery and Sheldrake, 1974). La segona via rep el nom de transport polar d'auxina, o PAT.

La hipòtesi quimiosmòtica va ser formulada per explicar el transport polar d'auxina. D'acord amb aquesta hipòtesi, l'IAA es troba protonat a l'apoplast, on el pH és relativament àcid (pH=5,5), i és capaç de passar a través de la membrana plasmàtica per difusió. Una vegada al citosol, on el pH és més bàsic (pH=7), l'IAA es desprotona i no pot travessar la membrana plasmàtica si no és mitjançant l'assistència de transportadors proteics, localitzats a la membrana (RAVEN, 1975).

Es coneixen diverses famílies de transportadors d'auxina (Zazimalova *et al.*, 2010). Les més importants són els següents: 1) la família de proteïnes anomenades AUXIN-RESISTANT/LIKE AUX1 (AUX1/LAX), que són transportadores d'entrada d'auxina a la cèl·lula; 2) la subfamília B de la família de proteïnes transportadores ABC (ATP-binding cassette), que són principalment transportadors de sortida d'auxina; i 3) la família de proteïnes PIN-FORMED (PIN), que són transportadors de sortida d'auxina (Bennett *et al.*, 1996; Geisler *et al.*, 2005; Luschnig *et al.*, 1998) (Figura 6). Mitjançant l'ús d'eines genètiques i farmacològiques s'ha pogut esbrinar la importància d'aquests transportadors en la regulació dels fluxos d'auxina, i el seu impacte en el desenvolupament de la planta (Tanaka *et al.*, 2006).

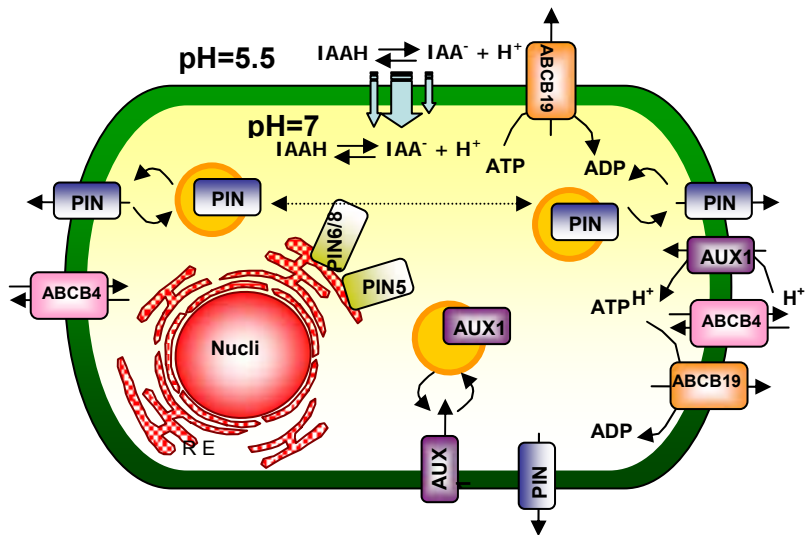


Figura 6. Entrada i sortida de l'IAA a la cèl·lula.

L'IAA pot entrar a la cèl·lula per difusió o per mitjà de les proteïnes transportadores AUX1. La sortida de l'IAA és donada de manera independent d'ATP per les proteïnes PIN i de manera dependent d'ATP per les proteïnes ABCB. La proteïna ABCB4, és la única que pot actuar tant facilitant l'entrada com la sortida d'IAA a la cèl·lula. Les proteïnes PIN5, PIN6 i PIN8 regulen el flux de IAA entre el reticle endoplasmàtic i el citosol.

L'entrada de l'auxina a la cèl·lula

Com s'ha explicat anteriorment, l'IAA és capaç d'entrar a la cèl·lula per difusió, però, sota algunes circumstàncies, la difusió no és suficient per la demanda existent a l'interior cel·lular. S'han identificat quatre transportadors d'entrada, l'AUX1 i tres proteïnes LAX. Tots ells transporten l'auxina a l'interior cel·lular, conjuntament amb un protó (Bennett *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2006). Depenent del tipus cel·lular, aquests transportadors es poden trobar localitzats de manera polar o apolar a la membrana plasmàtica (Bennett *et al.*, 1996; Swarup *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2006). En alguns casos, la proteïna AUX1 es troba polaritzada de manera oposada als

transportadors de sortida PIN, com per exemple, en les cèl·lules del protofloema de l'arrel (Kleine-Vehn *et al.*, 2006; Swarup *et al.*, 2001).

A més, s'ha observat que el transportador de nitrat NTR1 facilita l'entrada d'auxina a la cèl·lula a baixes concentracions de nitrat, indicant que hi ha un lligam directe entre la nutrició de la planta i el creixement d'adaptació mediat per l'auxina (Krouk *et al.*, 2010).

La sortida de l'auxina de la cèl·lula

Sortida no-polar

Les P-glicoproteïnes (PGPs) són membres de la família de transportadors ABC dependents d'ATP i estan implicades en el moviment de gran varietat de molècules, des de nutrients fins a xenobiòtics (Verrier *et al.*, 2008). S'ha observat que les proteïnes ABCB1/PGP1, ABCB4/PGP4 i ABCB19/PGP19 poden mediar el transport de l'auxina i que, majoritàriament, tenen una distribució no polar (Cho *et al.*, 2007; Geisler *et al.*, 2005; Mravec *et al.*, 2008; Petrsek *et al.*, 2006). S'ha suggerit que aquests transportadors podrien estar modulant el transport polar donat per les proteïnes PIN (que s'explicaran a continuació) (Blakeslee *et al.*, 2007). També, s'ha identificat que alguns membres d'aquesta família, com ABCG37 i ABCG36, poden actuar com a transportadors d'IBA (Růžička *et al.*, 2009; Strader and Bartel, 2009).

Per altra banda, algunes observacions suggereixen que el transportador ABC/PGP4 podria estar canviant el sentit del transport de l'auxina, d'entrada a sortida, en resposta als nivells cel·lulars de l'auxina (Yang and Murphy, 2009). Segurament, per a que és doni aquest canvi de sentit es necessita l'activació d'algun substrat.

Sortida polar mediada per les proteïnes PIN

En *Arabidopsis thaliana*, la família de proteïnes PIN consta de vuit membres, que es poden classificar en dues subclasses segons la longitud del *loop* hidrofílic central. La primera subclasse, anomenada PIN tipus1 (també PIN1-like), inclou les proteïnes PIN1, PIN2, PIN3, PIN4 i PIN7 i es caracteritza per tenir el *loop* central llarg. Aquestes proteïnes es localitzen a la membrana plasmàtica i tenen un paper clau en el transport polar d'auxina (Zazimalova *et al.*, 2010). Els altres tres membres de la família PIN (PIN5, PIN6 i PIN8) formen la subclasse tipus 2 (també anomenades PIN5-like), que tenen el *loop* central més curt (com és el cas de PIN6), o dramàticament reduït (com és el cas de PIN5 i PIN8) i es localitzen al reticle endoplasmàtic (figura 7) (Mravec *et al.*, 2009).

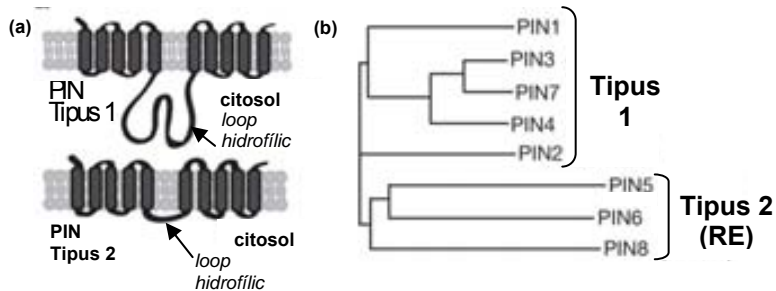


Figura 7. Subclasses de la família de les proteïnes PIN.

(a) Predicció de la topologia de les proteïnes PIN tipus 1 i tipus 2. (b) Arbre filogenètic de les proteïnes PIN. Abreviacions: MP, membrana plasmàtica; RE, reticle endoplasmàtic. Figures modificades de: {{436 Barbez,E. 2012; 289 Mravec,J. 2009}}

En termes evolutius, la proteïna PIN5 és la més antiga de les proteïnes PIN (Paponov *et al.*, 2005); la seva funció consisteix en regular el transport de l'auxina del citosol cap al lumen del reticle. Així mateix, podria estar regulant la disponibilitat de l'auxina lliure/activa en la cèl·lula, ja que, l'increment de PIN5 resulta en un augment dels conjugats d'auxina; això implicaria, doncs, que PIN5 podria tenir un paper important en la regulació del metabolisme de l'IAA (Mravec *et al.*, 2009). Recentment, s'ha descobert una nova família de

proteïnes transportadors, les proteïnes PIN-*like* (PILS), que es localitzen al reticle endoplasmàtic i podrien actuar com a reguladores de l'homeòstasi intracel·lular d'auxina (Barbez *et al.*, 2012).

Els 5 membres de la família de proteïnes PIN tipus1 es localitzen a la membrana plasmàtica, però, el seu patró de localització subcel·lular varia en funció del tipus cel·lular (Vieten *et al.*, 2007). En concret, a l'arrel d'*Arabidopsis*, aquestes proteïnes tenen la següent distribució: PIN1 s'expressa a les cèl·lules de l'estela, on es localitza a la membrana basal; PIN2 s'expressa a les cèl·lules del còrtex, on té una localització basal, i a les cèl·lules de l'epidermis, on té una localització apical; PIN3 s'expressa a les cèl·lules de la columel·la, on la localització és apolar, és a dir, es troba uniformement repartit per tota la membrana; PIN4 s'expressa a les cèl·lules centrals del meristem de l'arrel, on presenta localització basal i, a les cèl·lules del centre quiescent, amb una localització basal però menys pronunciada; per últim, PIN7 s'expressa a les cèl·lules de l'estela, on presenta polaritat basal i, a les cèl·lules de la columel·la, on es localitza de manera apolar (Ferarú and Friml, 2008) (figura 8).

El conjunt dels transportadors d'auxina tipus PIN1 (Gälweiler *et al.*, 1998; Luschnig *et al.*, 1998; Petrasek *et al.*, 2006) determina la direcció del flux d'auxina a l'arrel (Friml *et al.*, 2004; Sauer *et al.*, 2006; Wisniewska *et al.*, 2006) (figura 8).

La localització polar de les proteïnes PIN està mediada, a grans trets, per dos processos principalment: 1) el tràfic intracel·lular de vesícules i, 2) la modificació post-traducciona de les proteïnes PIN per fosforilació, mitjançant la proteïna quinasa PINOID (Friml *et al.*, 2004).

Independentment de que la localització final de les proteïnes PIN sigui polar o apolar, la localització de aquestes proteïnes sintetitzades *de novo* és sempre

apolar; el procés de polarització és posterior i implica processos de endocitosis, transcitosis y exocitosis lligats al tràfic intracel·lular de vesícules (Dhonukshe *et al.*, 2007). Actualment es pensa que la localització a la part basal de la membrana implica primer un procés d'endocitosis dependent de clatrina (Dhonukshe *et al.*, 2008), i un posterior reciclatge cap a la membrana basal regulat per la proteïna GNOM (Geldner *et al.*, 2003). En canvi, l'apicalització de les proteïnes PIN estaria regulada principalment per la proteïna quinasa PINOID, i seria independent de GNOM. La proteïna PINOID és una Ser/Thr quinasa que pertany a la família de les AGC3 quinases i que colocalitza a la membrana plasmàtica amb les proteïnes PIN, on aparentment es produiria la fosforilació (Benjamins *et al.*, 2001). PID fosforila diverses serines del *loop* hidrofílic (PINHL) de les proteïnes PIN (Friml *et al.*, 2004; Michniewicz *et al.*, 2007). Recentment, s'han identificat dos membres addicionals de la família de les AGC3 quinases (les quinases WAG1 i WAG2), que actuen de manera redundant a la quinasa PID regulant la localització de les proteïnes PIN a la part apical de la membrana plasmàtica per fosforilació (Dhonukshe *et al.*, 2010).

La distribució de les proteïnes PIN a la membrana plasmàtica està modulada per estímuls de lligats al desenvolupament i per estímuls ambientals. En la formació de les arrels laterals (estímul de desenvolupament), la proteïna PIN1 canvia la seva localització en les cèl·lules de l'estela, en una resposta mediada per auxina; en aquest cas, es produeix un desplaçament de la proteïna des de la membrana basal cap a la membrana lateral i, d'aquesta manera, s'inicia un creixement diferencial que origina la formació dels primordis d'arrel laterals (Benková *et al.*, 2003; Friml *et al.*, 2003). En resposta al gravitropisme (estímul ambiental), la proteïna PIN3, que normalment es posiciona apolarment a la membrana plasmàtica de les cèl·lules de la columel·la, es relocalitza lateralment en direcció al vector de gravetat i, en conseqüència, se activa el creixement en aquest mateix sentit (Kleine-Vehn *et al.*, 2010). Per tant, la polarització de proteïnes i, per defecte, el tràfic de les vesícules, contribueixen a l'adaptació i la flexibilitat de la natura de les plantes (Benková *et al.*, 2003; Friml *et al.*, 2003; Kleine-Vehn *et al.*, 2010; Reinhardt *et al.*).

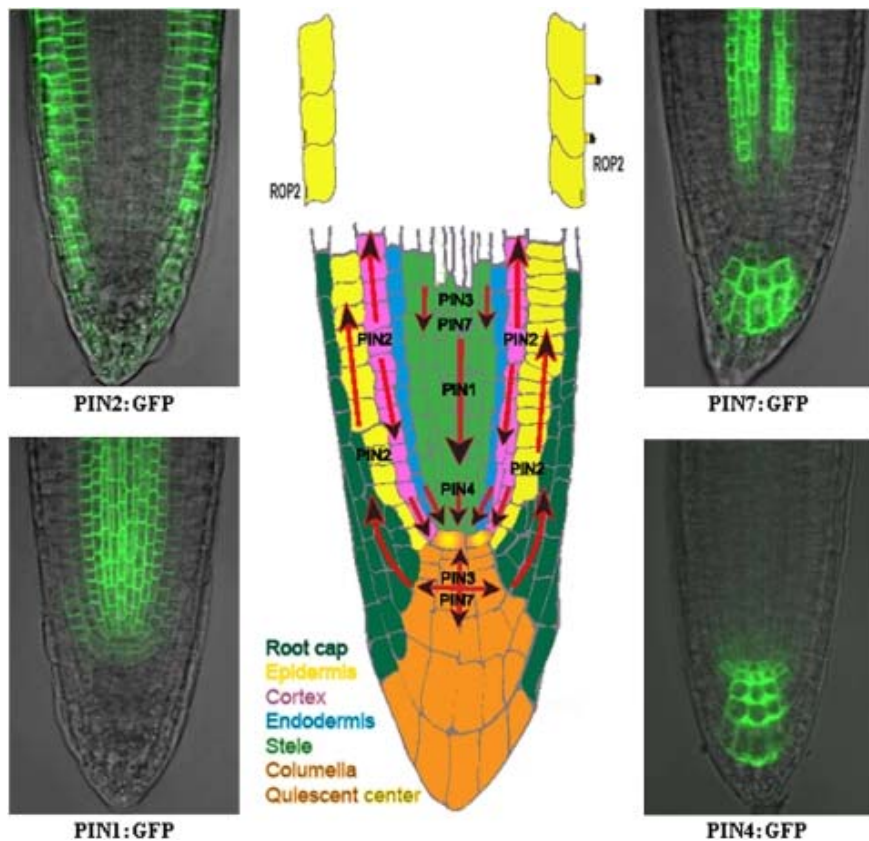


Figura 8. Localització subcel·lular de les proteïnes PIN tipus 1 i direcció dels fluxos de l'auxina a l'arrel.

Patró d'expressió de les plantes transgèniques PIN1-GFP, PIN2-GFP, PIN4-GFP i PIN7-GFP. Les imatges de fluorescència mostren la localització de cadascun dels transportadors i la seva polarització. Es mostra també la proteïna ROP que també està localitzada de manera asimètrica i està associada amb el creixement de pèls radiculars.

Al centre, es mostra un esquema d'una arrel d'*Arabidopsis* on es mostren en diferents colors cadascun dels tipus cel·lulars de l'arrel i s'indica on s'expressa cadascuna de les proteïnes. Les fletxes mostren la direcció dels fluxos d'auxina. Figura trenta de (Feraru and Friml, 2008).

Percepció i senyalització de l'auxina

El concepte de l'auxina com a reguladora de l'expressió gènica és un concepte arrelat històricament. Aquesta hormona és capaç de regular l'expressió de gens tant a nivell transcripcional com posttranscripcional.

En la via de senyalització transcripcional intervenen els següents elements: els coreceptors d'auxina de la família TIR1-AFB (Dharmasiri *et al.*, 2005; Kepinski and Leyser, 2005), la família de proteïnes repressores AUX/IAA, la família de factors de transcripció de resposta a auxina ARF (*auxin response factors*), i el corepressor de la transcripció TOPLESS (TPL) (Szemenyei *et al.*, 2008). En absència d'auxina, les proteïnes repressores AUX/IAA formen un complex trimèric amb els factors de transcripció ARFs (aquests últims units al DNA) i amb el corepressor TPL (Szemenyei *et al.*, 2008); aquest complex interfereix en la transcripció dels gens de resposta a auxina (Ulmasov *et al.*, 1997) (Figura 9a). En presència d'auxina, la hormona interacciona tant amb TIR1-AFB com amb AUX/IAA i, actua així, com un adaptador molecular entre les dos proteïnes (Dharmasiri *et al.*, 2005; Kepinski and Leyser, 2005; Tan *et al.*, 2007). L'auxina, per tant, promou que TIR1/AFB, que a més de ser un receptor de auxina té activitat E3-ubiquitina lligasa, marqui a les proteïnes AUX/IAA per a la seva degradació al proteasoma; d'aquesta manera, els factors ARF queden lliures per a poder actuar sobre els promotors dels gens de resposta a auxina (Dharmasiri *et al.*, 2005; Kepinski and Leyser, 2005) (Figura 9b). Existeixen diverses combinacions de proteïnes TIR1/AFB i de proteïnes repressores AUX/IAA, que formen complexos amb un rang ampli d'afinitats; l'afinitat depèn, principalment, de la proteïna AUX/IAA que s'hi uneix (Calderon Villalobos *et al.*, 2012). En absència d'AUX/IAA i TPL, els ARFs poden actuar com a reguladors transcripcionals (Gray *et al.*, 2001). Els ARFs poden actuar com activadors (ARF⁺) o com repressors transcripcionals (ARF⁻) (Figura 9b). Recentment s'ha demostrat que la majoria d'ARFs activadors interaccionen amb les proteïnes AUX/IAA, mentre que, els ARFs repressors no hi interaccionen, o bé, ho fan de manera limitada (Vernoux *et al.*, 2011). L'activitat repressora dels ARFs podria estar regulada de manera independent de l'auxina, i actuarien competint amb els ARF activadors per a unir-se als elements de resposta a l'auxina -TGTCTC (AuxREs)-, situats als corresponents promotors. Per tant, les concentracions respectives de ARF⁺ i ARF⁻ podrien influenciar el llindar de sensibilitat a l'auxina en una determinada cèl·lula o teixit (Finet and Jaillais).

Una altra proteïna que actua com a receptor d'auxina és l'ABP1 (*auxin binding protein 1*) (Hertel *et al.*, 1972). ABP1 sembla actuar principalment regulant a nivell postranscripcional diversos processos dependent d'auxina, i de manera independent de TIR1/AFB (Robert *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2010). En plantes que sobreexpressen ABP1 s'observa una expansió de les cèl·lules diferenciades dependent d'auxina, cèl·lules que en condicions normals no són sensibles a aquesta hormona (Jones *et al.*, 1998). En canvi, en plantes mutants de pèrdua de funció d' ABP1 s'observa un arrest de l'embriogènesis, degut a defectes en la divisió cel·lular i l'elongació (Chen *et al.*, 2001). A més, la inactivació d'ABP1 mitjançant un promotor induïble afecta al creixement de la planta, per interferència amb el cicle cel·lular durant el desenvolupament postembrionari de l'arrel i de la part aèria de la planta (Braun *et al.*, 2008; David *et al.*, 2007).

ABP1 es troba a l'apoplast, però la seva unió a l'auxina no està ben caracteritzada. Recentment s'ha observat que la unió d'auxina a ABP1 inhibeix l'endocitosi de les PINs, augmentant d'aquesta manera la quantitat de PINs a la membrana plasmàtica, i promovent per tant la sortida d'auxina cap a l'exterior cel·lular (Paciorek *et al.*, 2005; Robert *et al.*, 2010). A més, ABP1 actua en la regulació de la morfogènesi cel·lular *upstream* de ROP (una GTPasa de la classe RHO-OF-PLANT) (Xu *et al.*, 2010) (Figura 9b). No obstant, la pèrdua de funció d'ABP1 afecta a la regulació de la expressió de gens de resposta a auxina, però es desconeix si ABP1 regula l'expressió d'aquests gens, o bé, si l'efecte és secundari, degut a un *feedback* entre els efectes post-transcripcionals entre ABP1 i la senyalització pel complex TIR1/AFBs (Effendi *et al.*, 2011; Tromas *et al.*, 2009) (Finet and Jaillais).

Per últim, existeix una tercera via de senyalització que actua de manera independent de TIR1 i que està mediada per una proteïna fosfatasa amb especificitat dual, IBR5 (INDOLE-3-BUTYRIC ACIDRESPONSE5). Els mutants de pèrdua de funció d'aquesta proteïna presenten resistència a l'auxina i, com a resultat, són plantes més baixes, tenen defectes en el desenvolupament vascular i una formació reduïda d'arrels laterals (Monroe-

Augustus *et al.*, 2003). Contràriament a la senyalització per TIR1, les proteïnes repressores Aux/IAA no es desestabilitzen en la resposta a auxina a través d'aquesta via (Strader and Bartel, 2011). Es desconeixen el resta de components d'aquesta via que actuen *downstream* de IBR5 (Finet and Jaillais).

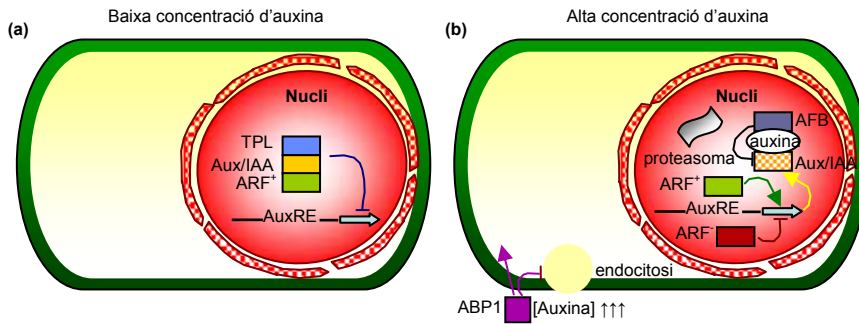


Figura 9. Esquema de la percepció de l'auxina.

(a) Percepció de l'auxina a baixes concentracions d'auxina. Es forma el complex trimèric TPL-Aux/IAA-ARF i no es dona l'expressió de gens de resposta a auxina (b) Percepció de l'auxina a altes concentracions d'auxina. L'auxina actua com a adaptador molecular entre AFB i Aux/IAA de manera que el complex AFB ubiquitina les proteïnes Aux/IAA i les dirigeix cap al proteasoma, deixant lliure els ARF⁺ que donarà l'expressió de gens de resposta a auxina. Per altra banda, l'auxina inhibeix l'endocitosi de les proteïnes PIN via ABP1,

Objectius

Aquesta tesi tenia com a objectiu principal estudiar la implicació de la proteïna quinasa CK2 en la via de senyalització de les auxines. Per dur-lo a terme, ens vam plantejar els següents objectius concrets:

- 1- Estudi de les característiques fenotípiques d'un mutant dominant negatiu de la proteïna quinasa CK2 (CK2mut) d'*Arabidopsis thaliana* en relació als processos dependents d'auxina.
- 2- Anàlisi de la percepció de l'auxina i la sensibilitat als inhibidors del transport d'auxina en les plantes CK2mut.
- 3- Estudi de l'afectació del cicle cel·lular en la formació d'arrels laterals en plantes CK2mut.
- 4- Anàlisi de l'expressió de gens de resposta a auxina en plantes CK2mut per tècniques d'anàlisi de *microarrays* i PCR quantitativa.
- 5- Estudi de l'efecte de l'eliminació de l'activitat CK2 en la localització subcel·lular de transportadors d'auxina.

Capítol 1



A dominant negative mutant of protein kinase CK2 exhibits altered auxin responses in Arabidopsis.

La majoria de resultats d'aquest capítol estan publicats als següents articles :

Marquès-Bueno MM, Moreno-Romero J, Abas L, De Michele R, Martínez MC. *A dominant negative mutante of protein kinase CK2 exhibits altered auxina response in Arabidopsis*. The Plant Journal (2011).

Abstract

Protein kinase CK2 is a pleiotropic Ser/Thr kinase, evolutionary conserved in eukaryotes. Studies performed in different organisms, from yeast to humans, have highlighted the importance of CK2 in cell growth and cell-cycle control. However, the signalling pathways in which CK2 is involved have not been fully identified. In plants, the phytohormone auxin is a major regulator of cell growth. Recent discoveries demonstrate that differential distribution of auxin within plant tissues is essential for developmental processes, and that this is dependent on auxin polar transport. We report here that a dominant-negative mutant of CK2 (CK2mut) in *Arabidopsis thaliana* shows phenotypic traits that are typically linked to alterations in auxin-dependent processes. However, CK2mut plants exhibit normal responses to exogenous indole-3-acetic acid (IAA) indicating that they are not affected in the perception of the hormone but upstream in the pathway. We demonstrate that mutant plants are not deficient in IAA but that they are impaired in its transport. Using genetic and pharmacological tools we show that CK2 activity depletion hinders correct formation of auxin gradients and leads to widespread changes in the expression of auxin-related genes. In particular, members of the auxin efflux carrier family (PINs), and the protein kinase PINOID, both key regulators of auxin fluxes, were misexpressed. PIN4 and PIN7 were also found mislocalized, with accumulation in endosomal bodies. We propose that CK2 functions in the regulation of auxin-signalling pathways, particularly in auxin transport.

Introduction

The phytohormone auxin (indole-3-acetic acid, IAA) regulates a wide variety of developmental processes, such as cell division, elongation and differentiation, as well as physiological responses such as gravitropism and phototropism (Davies, 2004). A key feature for auxin function is its differential distribution within plant tissues, resulting in the formation of auxin gradients that are essential for plant development processes (Vanneste and Friml, 2009). Although most tissues have the capacity to synthesize IAA, it is predominantly synthesized in young, developing tissues (Ljung *et al.*, 2001) (Petersson *et al.*, 2009). Two distinct and physically separated physiological pathways redistribute IAA within the organs and throughout the plant (Leyser, 2005). One is a rapid non-polar transport through the phloem, and the other is a slower cell-to-cell polar transport that is dependent on auxin influx and efflux carriers (RAVEN, 1975; Rubery and Sheldrake, 1974). Influx is carried out by the AUX1/LAX family of transporters (Bennett *et al.*, 1996) whereas efflux is dependent on the plasma membrane-resident PIN proteins (Friml *et al.*, 2003; Petrasek *et al.*, 2006) and on several P-glycoproteins (PGP) of the ATP-binding cassette family B (ABCB) transporter family (Bouchard *et al.*, 2006) (Geisler and Murphy, 2006). The polar targeting of the different PIN members determines auxin directional flow and establishment of local auxin gradients (Wisniewska *et al.*, 2006). PIN polar localization in a particular membrane domain depends on so far unidentified cell-type specific and PIN-sequence signals. Recent discoveries suggest that PIN proteins constitutively undergo cycles of exocytosis and endocytosis to and from the plasma membrane. Several distinct sorting and recycling endosomal trafficking pathways for PIN1 and PIN2 have been reported (Dhonukshe *et al.*, 2007; Dhonukshe *et al.*, 2008; Geldner *et al.*, 2001; Geldner *et al.*, 2003; Jaillais *et al.*, 2006). Environmental cues, such as gravity, can modulate PIN localization in the plasma membrane (Friml *et al.*, 2002; Geldner *et al.*, 2003) by retargeting PIN proteins by cytoskeleton-dependent vesicle traffic (Dhonukshe *et al.*, 2007; Geldner *et al.*, 2003). This post-translational mechanism allows rapid changes in redirection of auxin fluxes and thus provides flexibility in

response to environmental or developmental cues. PIN localization is additionally controlled by phosphorylation/dephosphorylation by the Ser/Thr protein kinase PINOID (PID) and the protein phosphatase PP2A (Friml *et al.*, 2004; Michniewicz *et al.*, 2007), as well as by the membrane sterol composition (Willemsen *et al.*, 2003). Auxin itself inhibits PIN endocytosis, increasing the amount and activity of PIN at the plasma membrane (Paciorek *et al.*, 2005), and thus regulating its own efflux. All these findings highlight the complexity of the processes involved in the formation of auxin gradients.

Protein kinase CK2 is an evolutionary conserved Ser/Thr kinase, which is vital for eukaryotic cells (Moreno-Romero *et al.*, 2008; Padmanabha *et al.*, 1990). The vast amount of substrates already known for CK2 (>300) confirms the idea that CK2 regulates many cellular processes. In plants, specific substrates of CK2 are involved in processes such as photomorphogenesis and circadian rhythms (Hardtke *et al.*, 2000; Menkens *et al.*, 1995; Perales *et al.*, 2006), ABA-signalling and seed development (Ciceri *et al.*, 1997; Plana *et al.*, 1991) and plant defence (Kang and Klessig, 2005). We have previously reported that overexpression of a catalytically inactive version of CK2 α subunit (CK2mut) resulted in CK2 activity depletion by a dominant negative effect (Moreno-Romero *et al.*, 2008). Since long term inductions of CK2mut are lethal to Arabidopsis plants, we developed a protocol in which transient inductions of the transgene (typically 24 to 48 hours) allowed us to study the consequences of CK2 activity depletion. Of particular interest was the predominance of auxin-related phenotypic traits. Using genetic and pharmacological tools, we demonstrate here that CK2 activity depletion affects auxin-dependent processes, and particularly auxin transport.

Experimental Procedures

Plant material

Arabidopsis thaliana (Col-0 ecotype) and the transgenic lines generated in the same genetic background were grown at 21 to 22°C under 16 hours photoperiod light ($140 \mu\text{E m}^{-2} \text{second}^{-1}$) unless otherwise indicated. For *in vitro* germination and culture, seeds were surface sterilized and grown in Murashige and Skoog (MS) plates (Duchefa Biochemie BV, Haarlem, The Netherlands) or Gambourg B5 (GB5) medium with 2 mM 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) (pH 5.7), 0.25 to 0.5% (w/v) sucrose and 1 to 1.2% (w/v) agar. Expression of *CK2mut* transgene was induced with Dexamethasone (Dex) dissolved in ethanol or dimethyl sulfoxide (DMSO). Treatments with 10 μM 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazol (TBB) dissolved in DMSO were performed on 5-day-old WT plantlets for 16 hours. *DR5rev::GFP* and *PID::PID-GUS* lines were purchased from the NASC European Arabidopsis stock centre (Nottingham, UK) and *PIN::PIN-GFP* lines were kindly provided by J. Friml (Ghent University, Belgium). *DR5rev::GFP* and *PIN::PIN-GFP* plants were sexually crossed with *CK2mut* plants to have homozygous lines for both transgenes. Double transgenic plants *CK2mut* x *CYCB1;1-GFP* were previously described (Moreno-Romero *et al.*, 2008). Measurements of root and hypocotyls lengths and of number of lateral roots were performed on scanned images using a Bio-Rad GS-700 Imaging Densitometer (BioRad Laboratories, Richmond, CA, USA) and IMAGEJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). Statistical analysis of data was performed in EXCEL (Microsoft, <http://www.microsoft.com>) using the Student's two-tailed *t*-test for independent samples ($P < 0.005$). To measure hypocotyls phototropic responses, 5-day-old seedlings grown in the dark were incubated with 1 μM Dex for 24 hours and then exposed to a light source from the side, without removing Dex from the medium. For the root gravitropic assay, 5-day-old seedlings grown on vertically-oriented plates were sprayed with freshly prepared 10 μM Dex in 0.2xGB5 and re-oriented by 90° in the dark. The final concentration of Dex after absorption into the solid medium was 1 μM .

IAA, NPA and TIBA treatments

Five-day-old seedlings were treated with either 1 μM Dex or ethanol for 48 hours and then with the appropriate concentration of IAA without Dex, except for the hypocotyls, in which seeds were germinated in presence of Dex and IAA. For analysis of expression of cell-cycle genes, the central part of the roots were cut off and cultured in liquid medium with 1 μM Dex for 48 hours, and then with 1 μM Dex and 1 μM IAA for the indicated times. Treatments with NPA and TIBA were performed on 5-day-old seedlings on plates containing the inhibitors and/or 1 or 5 μM Dex. All drugs were dissolved in DMSO, added to the cooled agar medium just before the gelling point, poured and used immediately. Plates were re-oriented by 90° and phenotypes recorded after 48 hours. All plates contained both WT and CK2mut seedlings to avoid any differences caused by possible plate-to-plate variations. No differences were observed between 1 or 5 μM Dex.

Determination of IAA content and auxin transport assay

IAA was determined by Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry (LC-ES-MS/MS), as previously described (Hull *et al.*, 2000). High performance liquid chromatography was performed using a Waters (Milford, MA, USA) Alliance 2690 system. Using an orthogonal Z-spray electrospray interface (Micromass, Manchester, UK), the effluents from the HPLC were introduced into a triple-quadrupole mass spectrometer (Quattro LC, Micromass). Auxin transport was measured according to (Besseau *et al.*, 2007). Five-day-old seedlings were treated with either 1 μM Dex or ethanol for 48 hours, then transferred to slides coated with 0.5% agarose, and 30 μl of MES buffer (5 mM MES and 1% sucrose, pH 5.5) containing 1 μM IAA, and 66 nM [^3H]-IAA was dropped at the apical shoot meristem and incubated for 4 hours in darkness. Segments of roots were excised, placed in 2.5 ml of liquid scintillation cocktail (Optiphase-highsafe 2, Perkin-Elmer), and incubated overnight before measuring radioactivity in a scintillation counter (Beckman LS6000 SC). As a negative control, [^3H]-IAA was dropped at the root meristem and the amount of radioactivity measured in excised shoots.

Western blots and histochemical analysis of GUS activity

For western blot analysis roots were collected, weighed, and immediately frozen in liquid nitrogen. Soluble and membrane protein fractions were prepared and analyzed as previously described (Abas and Luschnig, 2010). Loading of equal amounts of proteins was controlled by Ponceau-staining of the membranes. All results were confirmed in two or three independent biological repeats. We used affinity-purified rabbit antibodies against PIN1 (Paciorek *et al.*, 2005), PIN2 (Abas *et al.*, 2006), PIN4 (Friml *et al.*, 2004). For PIN3, mouse antibodies were raised against amino acids 334-483 and affinity purified. For PID two antibodies were raised separately against two peptides (Offringa R., personal communication) and affinity-purified using GST-PID. PID antibodies were validated with full-length PID expressed as a GST-fusion protein in *E. coli* as well as an inducible PID over-expressing line (Friml *et al.*, 2004), and extracts from *pid14* seedlings (Huang *et al.*, 2010) were used as a negative control (Annex: Figure S1). Both antibodies gave similar results. GUS activity in *Arabidopsis* seedlings was determined using the β -Glucuronidase Reporter Gene Staining Kit (Ref, GUSS-1KT) (Sigma-Aldrich Co, ST Louis, MO, USA). Seedlings were then mounted with 50% glycerol (v/v) and observed with a Leica DMRB microscope (Leica, www.leica.com). Images were taken with a Leica DC200 digital camera.

RT-PCR analysis

Total RNA was extracted with Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and first-strand cDNA synthesized with SuperScript II RT reverse transcriptase (Invitrogen). Real-time PCR was performed using a Bio-Rad MyiQ single color Real-Time PCR Detection System and SYBR Green Master Mix (Bio-Rad Laboratories). The specificity of the PCR reactions was confirmed by melting curve analysis (55-95°C). The $-\Delta C_t$ values were calculated relative to those of the reference gene *EF-1- α* (at5g60390) (Livak and Schmittgen, 2001). The annealing temperature and the gene-specific primers for each DNA molecule are described in Table S1.

Hybridization of ATH1 Affymetrix arrays

Total RNA was isolated from frozen tissue samples with Trizol (Invitrogen) and later purified using Qiagen RNA easy Plant Mini Kit columns (Qiagen, Hilden, Germany). RNA quality was checked using Experion (Bio-Rad Laboratories). Three independent RNA preparations were made from pooled samples of each of the conditions and lines (CK2mut-Dex, CK2mut+Dex, empty-vector-Dex, empty-vector+Dex). Microarray hybridizations (GeneChip[®] ATH1 from Affymetrix, with 22810 sequences, www.affymetrix.com), data normalization and additional statistical analysis were performed by the Genomic facilities of Progenika Biopharma (Derio, Spain) using the methodology and equipments recommended by Affymetrix Inc. Analysis of the data was performed using the Gene Chip Operating software (GCOS 1.4, Affymetrix[®]) and RMA normalized data matrices were obtained. For comparative analysis the following additional software was used: dChip (www.dchip.org), affyPLM (www.bioconductor.org), and Partek Genomics Suite v7.3.1 (Partek). Comparisons of expression data from CK2mut+Dex versus CK2mut-Dex, and from empty-vector+Dex versus empty-vector-Dex, respectively, resulted in lists of significantly changed sequences. Global transcriptional changes were grouped using BinGO 2.3 plugin (<http://www.psb.ugent.be/cbd/papers/BiNGO/>) for Cytoscape (<http://www.cytoscape.org/>). The updated GO data were obtained from TAIR (www.arabidopsis.org).

Confocal microscopy

Confocal Scanning Laser Microscopy was performed with either an Olympus IX81 Motorized Inverted microscope equipped with a Olympus FluoView[™] FV1000 laser scanning confocal microscope (Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Germany), or a Leica TCS SP5 microscope. Serial optical sections were collected at 1 μm intervals along the z axis. GFP fluorescence was monitored using a 488-nm excitation line with a 500- to 600-nm band pass emission filter. Images processing and analysis were performed either

with MetaMorph software (Universal Imaging Corp., Downingtown, PA., USA) or with IMARIS software (Bitplane, www.bitplane.com).

Results

Arabidopsis CK2 dominant-negative mutant (CK2mut) exhibits phenotypic traits characteristic of perturbed auxin transport.

To further characterize the phenotype of CK2mut plants described in (Moreno-Romero *et al.*, 2008), we performed transient inductions of the transgene with dexamethasone (Dex) for 24 to 48 hours, based on our previous data about the transgenic protein accumulation and stability. We confirmed that Dex-treated CK2mut plants exhibit inhibition of root growth and drastic reduction of lateral root formation. In addition, CK2mut roots show over proliferation of root hairs and enhanced wavy phenotype (Figure 10a). Root hairs were produced by all the cell files of mutant roots, including the atrichoblasts, and the hairs were also longer. Since all these phenotypic traits are auxin-dependent, we investigated other typical auxin-mediated responses, such as tropisms. To measure the root gravitropic response, CK2mut seedlings were treated with Dex in vertical Petri dishes and then rotated 90° in the dark or in the absence of a main light source from above. The results show that mutant roots have an enhanced gravitropic response, i.e. they re-oriented their growth towards the new gravity vector faster than control plants (Figure 10b). As a control of these results and in order to check the enhanced gravitropism, we used the double transgenic line *CK2mut* x *DR5rev::GFP* (homozygous for both *CK2mut* and *DR5rev::GFP* constructs). We visualized GFP fluorescence at a different times after changing the gravity vector in mutant (+Dex) and control (-Dex) *Arabidopsis* roots. We found the progressive auxin translocation to the lower side of the root after gravistimulation is more rapid and sustained in mutant than in control roots (Annex: Figure S2).

To investigate the phototropic response, plants were first grown vertically in darkness to obtain elongated hypocotyls and then were exposed to a light source coming from the side. Figure 10c shows that CK2mut hypocotyls lack a phototropic response.

Gravitropic and phototropic responses are dependent on asymmetrical distribution of auxin that leads to a specific differential growth response (Esmon *et al.*, 2005). The same gravitropic assay was performed in the presence of two different inhibitors of auxin polar transport, 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA) and *N*-1-naphtylphtalamic acid (NPA). Either NPA or TIBA reduced the gravitropic response in WT and in CK2mut roots, and there was a dose-response effect (Figure 10d). CK2mut roots displayed a more severe reduction in gravitropism compared to WT (*e.g.*, at 0.5 μ M NPA, 100% of WT roots retained residual gravitropism compared to 47% of CK2mut). Moreover, at high concentrations of the inhibitors, the roots hairs of CK2mut roots were severely reduced. From these results, we can conclude that the Dex-induced enhanced gravitropism and root hairs are auxin transport dependent responses, and that CK2mut roots are more sensitive to auxin transport inhibitors than wild-type.

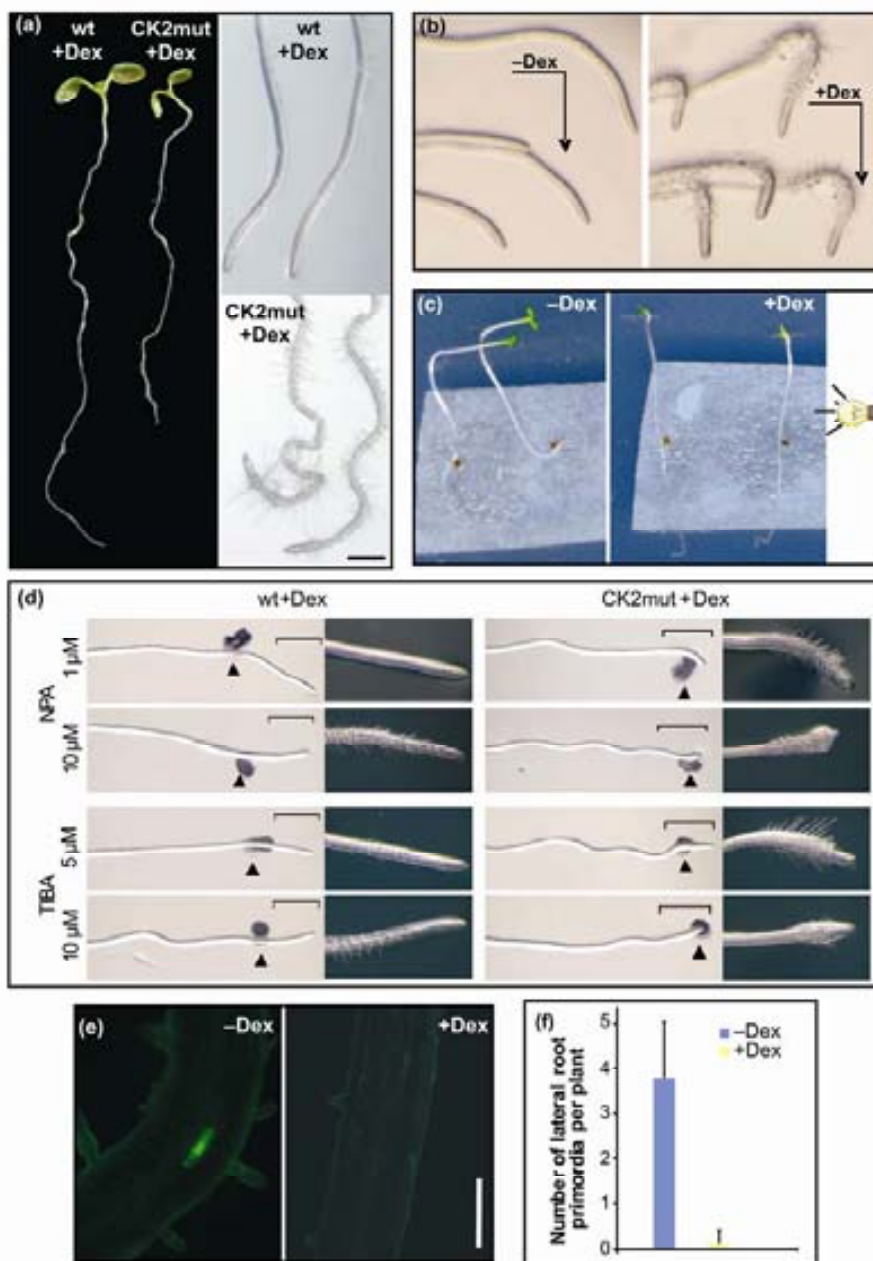


Figure 10. Auxin-related phenotypes of Arabidopsis CK2mut seedlings.

(a) Root growth and development. Phenotype of seven-day-old WT and CK2mut plants, incubated with 1 μ M Dex for the last 48 h. CK2mut plants exhibit short roots (left panel), and enhanced waving and proliferation of root hairs (bottom right). Scale bar: 1 mm. (b) Root gravitropic response. The change in the gravity vector is indicated by the connecting arrow. The

gravitropic curvature is enhanced in CK2mut roots, indicating a faster response. (c) Shoot phototropic response. CK2mut hypocotyls lack a phototropic response. (d) Influence of inhibitors of auxin polar transport. NPA and TIBA reduce the gravitropic response in WT and in CK2mut roots. Moreover, the hairy phenotype of CK2mut roots was severely reduced at high concentration of the inhibitors. The root tip (region indicated by brackets) is also shown at higher magnification. The black dots and arrowheads indicate the position of root tip at the time of application of the drugs and the change of gravitropic vector. For all panels, the gravity vector points towards the bottom of the page. (e) *CYCB1;1::GFP* expression in pericycle cells. Pictures show roots from seven-day-old CK2mut plantlets (+/-Dex). Scale bar: 100 μ m. (f) Quantification of the number of lateral root primordia by measuring *CYCB1;1::GFP* expression. Mean values (\pm SD) are represented (n=15).

Abbreviations: Dex, dexamethasone; -Dex, non-induced CK2mut seedlings (incubated with ethanol). SD: standard deviations.

CK2mut plants respond to exogenous auxin.

In Arabidopsis, lateral roots start to arise in the primary roots by accumulation of auxin in pericycle cells, which stimulates cell division (Celenza *et al.*, 1995; Himanen *et al.*, 2002; Laskowski *et al.*, 1995). To ascertain the stage at which lateral root formation was impaired in CK2mut plants, we introduced the *CYCB1;1::GFP* construct into the CK2mut background. *CYCB1;1* is a mitotic marker that allows visualization of cell division. Figure 10e shows that, whereas GFP expression was detected in the pericycle cells of control roots long before the primordia were histologically apparent, Dex-treated CK2mut plants showed no expression of this reporter gene in the same cells. Thus, CK2mut inhibits lateral root initiation and not emergence. A quantification of these results is shown in Figure 10f.

We reasoned that the absence of lateral roots observed in CK2mut plants could be a consequence of auxin deficit and/or perception. Determination of free-IAA content in whole seedlings demonstrated no significant differences between Dex-treated CK2mut plants and the controls (Figure 11a). To check the capability of CK2mut plants to respond to auxin we measured different developmental responses that can be triggered by exogenous auxin, such as lateral root initiation, inhibition of root growth and inhibition of hypocotyl elongation. Seven-day-old Arabidopsis seedlings (+/-Dex), were challenged with indole-3-acetic acid (IAA) at two different concentrations, 1 μ M and 5 μ M. WT (+/-Dex) and uninduced-CK2mut plants showed no differences in the

number of lateral roots before the IAA treatments. Dex-treatments hindered lateral root formation in CK2mut plants, but addition of exogenous IAA counteracted this effect (Figure 11b and annex Figure S3).

Since lateral root initiation is a process strictly associated with activation of cell-division cycle, in which CK2 has a demonstrated role in plants (Espunya *et al.*, 1999) we measured other IAA responses that are uncoupled from cell division, such as growth inhibition of primary roots and of etiolated hypocotyls. Lengths of primary roots were measured after three days of incubation with either 1 μM or 5 μM IAA. WT plants and uninduced-CK2mut plants showed the same values, but Dex-treated CK2mut plants exhibited shorter roots. Exogenous IAA produces a further inhibition of root growth in CK2mut plants (Figure 11c). Inhibition of hypocotyl elongation in etiolated seedlings was measured in the presence of 10 μM IAA. We had previously reported that Dex-treated CK2mut seedlings exhibit short hypocotyls when grown in darkness (Rahman *et al.*, 2010). Figure 12d shows that CK2mut seedlings still respond to exogenous IAA with a further reduction of hypocotyl length. These results not only confirm that CK2mut seedlings have intact auxin responses, but also show that CK2mut plants have an enhanced sensitivity to exogenous IAA, as IAA treatments produced relatively larger responses than those in WT plants.

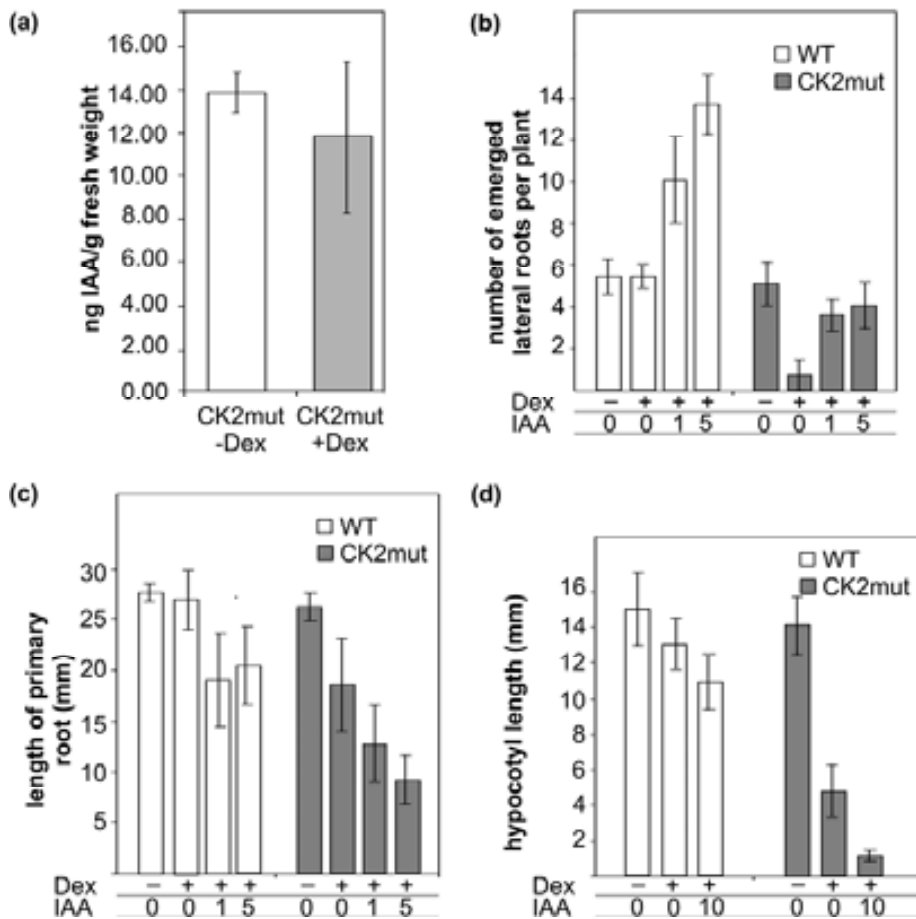


Figure 11. Auxin content and auxin responses.

(a) Indol-3-acetic acid (IAA) content. IAA levels were determined in seven-day-old CK2mut seedlings (+/-Dex). Values shown are the mean of three biological replicates (\pm SD). (b-d) Responses to exogenous auxin. (b) Number of emerged lateral roots and (c) lengths of primary roots. CK2mut seedlings (+/- Dex) were challenged with IAA at 1 μ M or 5 μ M. The number of emerged lateral roots was counted three days after IAA exposure. (d) Lengths of hypocotyls. Seeds were germinated in darkness in the presence of 10 μ M IAA and +/-Dex. Hypocotyls lengths were measured in six-day-old seedlings. The data shown are the mean values (\pm SD) of biological triplicates (n=14 for each triplicate).

IAA reactivates cell-division cycle in CK2mut plants.

We have previously reported that overexpression of a CK2 α kinase-inactive mutant in Arabidopsis and tobacco provokes cell cycle arrest at G1/S and/or early G2 (Moreno-Romero *et al.*, 2008). We investigated further this aspect of CK2 function, particularly in relation to lateral root (LR) formation. Since LRs arise by pericycle reactivation in the differentiation zone of the roots (Himanen *et al.*, 2002), we measured transcript levels of cell-cycle markers following stimulation with exogenous IAA in Dex-treated mutant plants. Seeds were germinated and grown for five days and then the central portion of the roots was excised and incubated with 1 μ M Dex for 48 h. IAA was then added to the medium to stimulate lateral root formation. Time 0 corresponds to ex-roots before IAA treatments and gives information about the cell-cycle arrest imposed by CK2 activity depletion. At time 0, G1/S markers, such as *Kip related-protein1 (KRP1)* and *CYCD3* genes, were overexpressed. KRP1 encodes an inhibitor of Cyclin-dependent kinases (CDKs), and its destruction is necessary to initiate DNA-replication. CYCD3 forms a complex with CDKA, which is seemingly the only CDK active at the G1 and S phases in plant cells (Inze and De Veylder, 2006). The CYCD3/CDKA complex activity is necessary to phosphorylate RBR that allows the transcription factor E2F to initiate S-phase. Both partners of the complex, *CYCD3* and *CDKA*, were overexpressed in CK2mut plants. *CDKA* overexpression is particularly striking, since this protein kinase is usually expressed at basal levels in cells that are competent for cell division, although is modestly up-regulated by IAA (Martinez *et al.*, 1992). On the other hand, *CDKB2;1*, encoding a mitotic-specific B-type CDK (Menges *et al.*, 2005), was expressed at similar levels as in control plants, as well as the mitotic cyclin *CYCB1;2*. Remarkably, *WEE1* kinase gene was also overexpressed in the mutant. WEE1 kinase controls cell cycle arrest in response to DNA damage, and also the switch from mitotic cycle to endoreduplication (De Schutter *et al.*, 2007; Gonzalez *et al.*, 2004). These results support the idea of a cell-cycle arrest in G1/S by CK2 activity depletion, with accumulation of gene transcripts corresponding to proteins

necessary in S-phase. Addition of IAA provoked a rapid down-regulation of *KRP1*, *WEE1*, *CYCD3* and *CDKA1* in Dex-treated roots, the transcript levels of which dropped in 3 h. However, *KRP1* always kept higher levels in mutant than in control roots, and the levels increased at long incubation times (12 h). *CYCD3;1* and *CDKA1* tend to be similar in CK2mut and control plants after 3 h of IAA treatments. On the other hand, the responses of *CYCB1;2* and *CDKB2;1* to exogenous IAA were similar in CK2mut plants and the controls: the initial down-regulation was followed by a slow increase of transcript levels (consistent with an entry into mitosis), although with a significant delay or a softer response in the mutant plants. Up-regulation of B-type CDKs by auxin has been linked to early lateral root initiation (Himanen *et al.*, 2002) (Figure 12).

In conclusion, these data provide supporting evidence of the competence of mutant roots to respond to exogenous IAA by activation of the cell-cycle machinery. Activation of cell division is not the only requirement for LR initiation, as has been demonstrated by overexpression of *CYCD3;1* in *solitary root* (*slr*) mutant (Vanneste *et al.*, 2005), which could not trigger lateral root initiation in spite of producing cell divisions in the pericycle. In consequence, CK2mut plants stimulated with exogenous IAA were able to re-specify cell fate in pericycle cells and trigger the formation of a new meristem.

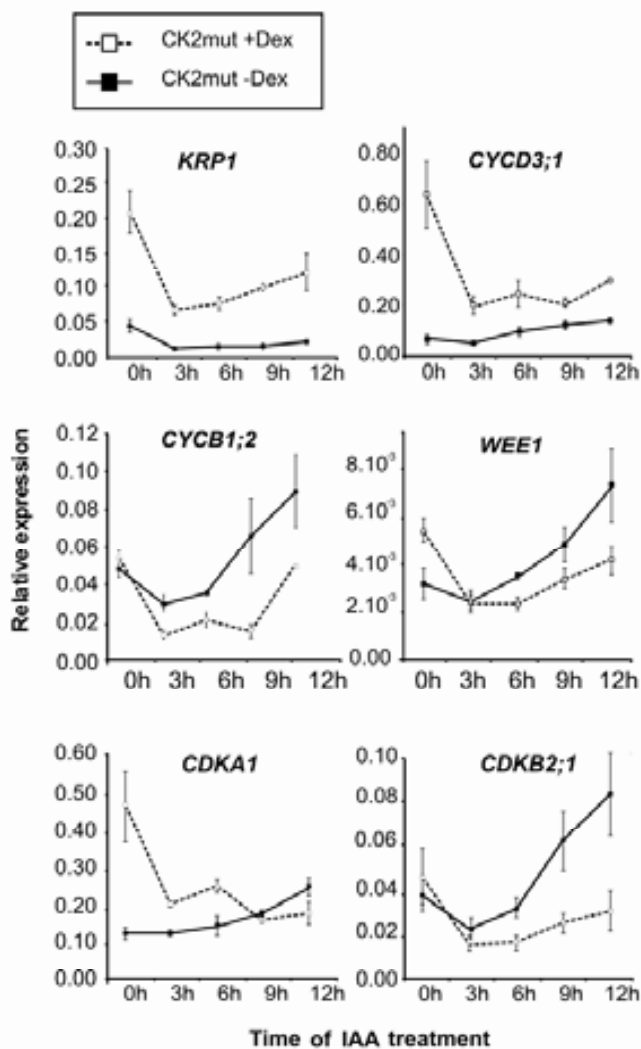


Figure 12. IAA reactivates cell-division cycle in CK2mut plants.

Root segments from 5-day-old seedlings were cut above the root apical meristem and incubated with either 1 μ M Dex (\square) or ethanol (-Dex) (\blacksquare) for 48 h (time 0 refers to the end of Dex or ethanol treatment). Then, 1 μ M IAA was added to the medium and the transcript levels of cell-cycle marker genes were determined by real-time RT-PCR using specific primers for each gene. The experiment was repeated twice with similar results. Mean values (\pm SD) from three RT-PCRs of one typical experiment are shown.

CK2mut plants exhibit disturbed auxin local gradients and impairment of auxin transport.

Asymmetrical auxin distribution and formation of local gradients are essential processes in plant development. Since CK2mut plants had overall normal levels of auxin, we investigated auxin distribution with the artificial reporter construct *DR5rev::GFP* that is widely used to monitor auxin-responsiveness *in vivo* (Petersson *et al.*, 2009; Ulmasov *et al.*, 1997). In root meristems, *DR5rev::GFP* typically shows a maximum in the quiescent centre (QC) area (Grieneisen *et al.*, 2007; Sabatini *et al.*, 1999). Distribution of GFP fluorescence was analyzed by confocal microscopy in double transgenic plants, homozygous for both *CK2mut* and *DR5rev::GFP* constructs. Serial z-sections from each root ($n \geq 15$, for each condition) were collected and the total amount of fluorescence on image stacks is shown in Figure 13a. In CK2mut roots the maximum at the QC was unchanged, but there was a shift of the signal to the upper-most cells in the meristem (the region of the QC and the initials) with depletion of auxin in the columella and root cap cells. Also, Dex-treated plants exhibited a much stronger *DR5rev::GFP*-derived signal in cotyledons compared to the controls.

To corroborate that changes in auxin distribution were due to depletion of CK2 activity, we studied the effects of 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazol (TBB) on Arabidopsis plants containing the *DR5rev::GFP* construct. TBB is a potent and specific inhibitor of CK2 activity (Shugar, 1994) that does not interfere with the activity of other plant kinases (Espunya *et al.*, 1999). Moreover, we have previously shown that incubation of Arabidopsis WT seedlings with 10 μ M TBB mimics the inhibition of lateral roots formation (Moreno-Romero *et al.*, 2008). Analysis of GFP expression by confocal microscopy revealed patterns of fluorescence similar to those in CK2mut seedlings, with a weaker signal in the columella cells and a stronger signal in cotyledons, as compared to their controls (Figure 13b).

Finally, we investigated whether auxin transport was affected in Dex-treated CK2mut seedlings. A drop of radiolabelled IAA was applied to the apical shoot

meristem and, after few hours, accumulation of radiolabelled IAA was measured in excised roots of the same plants. The results obtained indicate that the capacity to transport IAA from shoots to roots was dramatically reduced in CK2mut plants (Figure 13c).

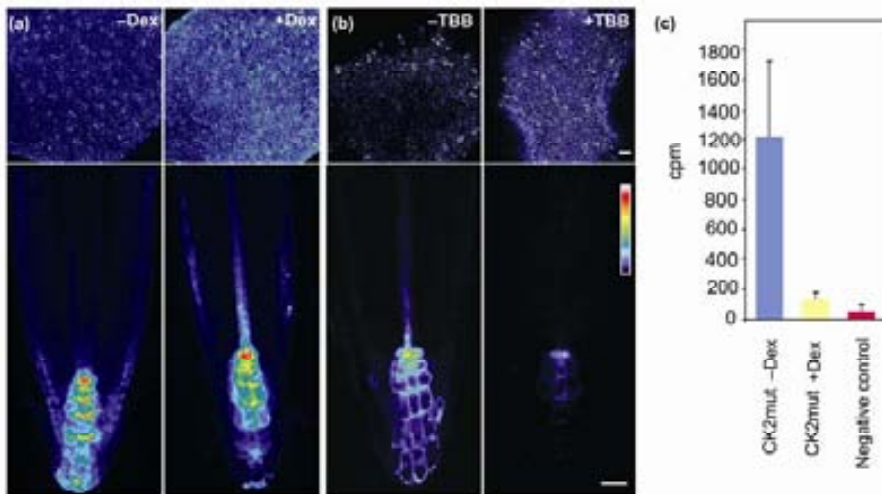


Figure 13. Auxin-responsive *DR5rev::GFP* expression and auxin transport.

(a, b) Expression of *DR5rev::GFP* reporter in CK2mut seedlings (+/- Dex) (a) and in TBB-treated WT seedlings (b). Serial optical sections at 1 μM intervals along the z axis (a total of 40 μm) were collected with a confocal microscope. Pictures in (a) show the fluorescence of typical z-stacks images (40 optical sections), using pseudocolor, whereas in (b) only one optical section (1 μm) is shown. Top, cotyledons; bottom, primary root apices. n=15, for each condition. Scale bars: 100 μm.

(c) Auxin transport. Auxin transport from shoots to roots was evaluated by measuring the amount of radioactivity (cpm) in CK2mut roots (+/-Dex). As a negative control, transport from roots to shoots was measured.

Analysis of transcript profiles of CK2mut plants

We analyzed global transcript profiles in CK2mut plants (+/-Dex), using ATH1 Affymetrix microarrays. To discard possible effects due to the constitutive expression of the glucocorticoid transcription factor (GVG) (Kang and Klessig,

2005), we also used plants transformed with the empty vector (pTA7002) as controls. Total RNA from seven-day-old plantlets, either treated with Dex or ethanol (-Dex) for the last 48 h, was extracted and used to hybridize the microarrays. CK2 activity depletion globally affected the expression of 6502 genes, 3364 of which were up-regulated and 3138 down-regulated. The affected genes were grouped into Plant Gene Ontology (GO) Slim biological process categories, shown in Figure 14a and Table S2 (annex). Within the transport category, auxin polar transport is highlighted and includes a significant number of up-regulated genes. Categories that were found to have significant changes included photosynthesis, translation, cell growth, response to stress or embryonic development; these results comply with the pleiotropy of protein kinase CK2 and the wide number of reported substrates, identified by *in vivo* or *vitro* studies (see Introduction).

In accordance to the scope of this work, we focused our analysis on the changes affecting to auxin-related genes. There were significant changes in 37.8% (121 genes) of the total 330 auxin-related genes present in the array (Figure 14b and Table S3a CD). Out of the 121 genes, 74 were overexpressed and 47 were underexpressed. The auxin-related genes were grouped into three GO biological process categories, and each category was found to contain a large proportion of genes that were significantly changed: 34.3% in the “response to auxin stimulus” category, 44% in the “auxin metabolic process” category, and 59.1% in the “auxin transport and auxin efflux” categories (Figure 18b, cross-hatched areas). Within each category, we also further grouped the significantly changed genes according to GO molecular functions (Figure 18c and Table S3b CD). We found that 36% of the listed genes within the auxin stimulus category are transcription factors, and 17% have DNA-, RNA- or protein-binding activities. Indeed, among the most overexpressed genes in the array there were four transcription factors: one of the myb-gene family (MYB51, At1g18570), a Dof-type zinc finger domain-containing protein (At3g50410), an auxin repressor (AUX/IAA proteins, At4g32280), and the transcription activator NAC1 (At1g56010) (see Table S2a).

Due to the phenotypes exhibited by the mutant, particularly interesting were the changes in the “auxin polar transport and auxin efflux” GO category, where 19 of the total 44 genes in the array were up-regulated (see Table S2a). Overexpressed genes included several members of the PIN family (*PIN2*, *PIN 3*, *PIN4* and *PIN 7*), as well as of the PGP family (*PGP4* and *PGP19*) and also the *PID* gene (Table S2a). In order to confirm and extend these results, we measured by real-time RT-PCR the transcript levels of *PIN* and *PID*, separately in shoots (cotyledons and apical shoot meristem) and roots (Table 2). Our results show that *PIN2*, *PIN4*, *PIN7* and *PID* were overexpressed in mutant roots, particularly *PIN7* (more than 4-fold) and *PID* (more than 8-fold), whereas *PIN1* and *PIN3* were underexpressed. In shoots, changes were less apparent, and only *PIN2* and *PIN3* were overexpressed 2-fold. We also measured the transcript levels in roots of two other characterized regulators of auxin homeostasis, *NAC1*, and *SHORT HYPOCOTYL 2 (SHY2)*. *NAC1* is a transcription factor of the NAM/ATAF/CUC domain-containing family, involved in auxin-mediated lateral root formation (Xie *et al.*, 2000), and *SHY2/IAA3* is a member of the AUX/IAA family of repressors and an important link between auxin- and cytokinin-signaling pathways in the differentiation zone of the roots (Dello Ioio *et al.*, 2008; Tian and Reed, 1999; Tian *et al.*, 2002). Our data show that *NAC1* was modestly overexpressed, confirming the data from the array analysis. However, *SHY2*, that did not show any significant changes in the array (referring to whole seedlings), was repressed 9-fold in roots, indicating a very specific response of *SHY2* in this tissue.

We also measured *PIN* and *PID* expression in TBB-treated seedlings. Table 2 shows that transcript levels of *PIN1*, *PIN2*, *PIN4*, *PIN7* and *PID* were increased in roots, whereas those of *PIN3* showed no significant changes. Importantly, the tendencies and the relative changes were the same as in CK2mut plants, except for *PIN1* and *PIN3* that were slightly down-regulated in mutant roots.

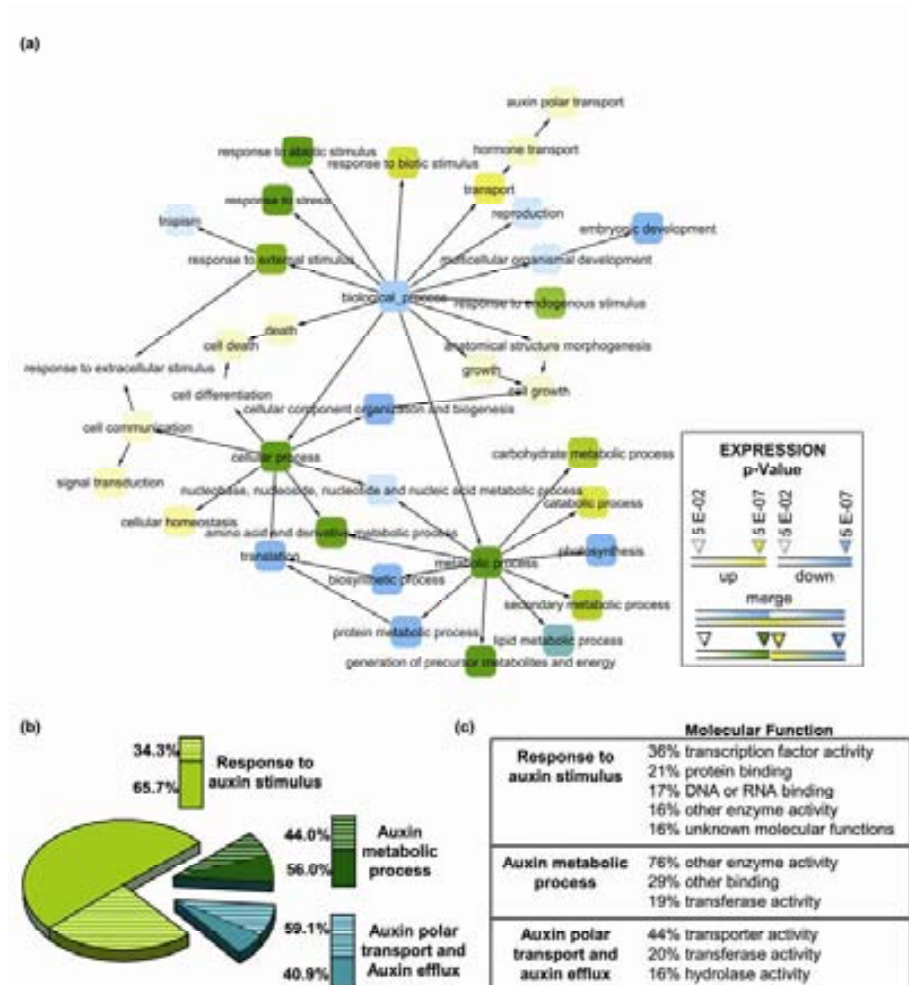


Figure 14. Transcript profiling of CK2mut plants.

(a) Differentially expressed genes (fold-change >2.0 and p-value <0.05) grouped in Plant GOSlim Biological Process categories. Enrichment analysis was performed with BiNGO 2.3 plugin for Cytoscape (<http://www.psb.ugent.be/cbd/papers/BiNGO/>). Color code: up-regulated (yellow), down-regulated (blue) and merged (with up- and down-regulated genes, green) categories.

(b, c) Functional categorization of differentially expressed auxin-related genes. (b) Gene distribution in GO biological processes. Percentages of differentially expressed genes (cross-hatched areas) were calculated within each category (more information in Table S2a). (c) Gene distribution in GO molecular functions. The significantly changed genes within each category of biological process were distributed according to GO Slim molecular functions. Percentages correspond to gene bar chart of TAIR Functional Categorization tool (www.arabidopsis.org) and only the categories with >15% are represented (more information in Table S2b)

Figura extreta del treball de tesi doctoral de Moreno-Romero J i publicada a (Marques-Bueno *et al.*, 2011),

		CK2mut + 48 h Dex		wt + 16 h TBB	
		real-time PCR		real-time PCR	
gene	AGI code	shoot	root	shoot	root
<i>PIN1</i>	At1g73590	1.60	0.61	1.73	1.62
<i>PIN2</i>	At5g57090	1.99	1.77	1.70	1.96
<i>PIN3</i>	At1g70940	1.78	0.49	1.92	1.07
<i>PIN4</i>	At2g01420	0.65	2.43	1.47	2.22
<i>PIN7</i>	At1g23080	1.56	4.30	1.13	8.03
<i>PID</i>	At2g34650	0.67	8.14	1.44	10.93
<i>NAC1</i>	At1g56010	n.d.	1.31	n.d.	n.d.
<i>SHY2</i>	At1g04240	n.d.	0.10	n.d.	n.d.

Table 2. Expression changes of auxin-transporters and auxin-regulators.

Fold changes of gene transcript levels in Dex-treated CK2mut and in TBB-treated wild-type seedlings. Five-day-old CK2mut seedlings were incubated with either 1 μ M Dex or ethanol for 48 h. Five-day-old wt seedlings were incubated with either DMSO or 10 μ M TBB for 16 h. Total RNA was extracted from roots and shoots separately, and transcript levels for each gene were measured by real-time RT-PCR and normalized to those of *EF-1 α* . Mean values of two biological replicates were obtained, with SD always \leq 28%. The data are represented as fold changes in Dex-treated or TBB-treated plants versus the respective controls. *NAC1* and *SHY2* transcript levels were determined only in roots.

Abbreviations: TBB, 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazol; n.d. not determined

CK2mut plants show altered levels and mislocalization of PIN and PID proteins

We measured by western blots the levels of PIN and PID in protein fractions from roots of CK2mut seedlings (+/-Dex). The results obtained are in agreement with those for the respective mRNA levels. Accumulation of PIN2, PIN4, and PIN7 was enhanced after Dex-treatments, particularly for PIN4 and PIN7, whereas the levels of PIN1 decreased (Figure 15a-e). PID protein levels were also much higher in CK2mut roots than in the controls (Figure 15f). Enhanced PID levels were found in both the soluble and the membrane protein fractions, agreeing with previous reports that the PID protein is both cytosolic and plasma membrane associated (Lee and Cho, 2006), and that PID-dependent PIN phosphorylation most likely occurs at the PM (Dhonukshe *et al.*, 2010).

We investigated further the expression and distribution of PIN4, PIN7 and PID using transgenic plants expressing functional *PIN4::PIN4-GFP*, *PIN7::PIN7-GFP*, and *PID::PID-GUS* constructs. Those plants were sexually crossed with CK2mut plants and the analysis of expression was performed in the F2 generation. RT-PCR determination of *GFP* and *GUS* transcript levels in Dex-treated double transgenic plants confirmed similar increases as those obtained for the corresponding endogenous *PIN* (results not shown). We then studied the subcellular localization of PIN4, PIN7 and PID using the protein reporter fusions. PIN4 normally localizes in the cells around the meristem (with a basal localization) and in the columella initials (with a non-polar localization) (Friml *et al.*, 2002), and PIN7 in provascular cells (with a basal and lateral localization) and columella cells (with a non-polar localization) (Blilou *et al.*, 2005). The spatial expression domains of PIN4 and PIN7 were unchanged after Dex-treatments (Figure 16a). However, both PIN4 and PIN7 appear internalized in the columella cells, and PIN7 is also internalized in the provascular tissue. The same results were obtained by incubating *PIN::PIN-GFP* plants with TBB (Figure 16b), corroborating that it is the inhibition of CK2 activity that has an impact on the localization of auxin transporters.

PID localization was studied by GUS-staining. In control roots, GUS activity was detected in the root tip vasculature but not in the upper root. The opposite expression pattern was seen in roots depleted of CK2 activity, i.e. GUS activity was undetectable in the root tip but a strong staining was seen in the upper part of the root (Figure 16c). We conclude that CK2 activity depletion changes the levels and the spatial expression domains of PID in roots.

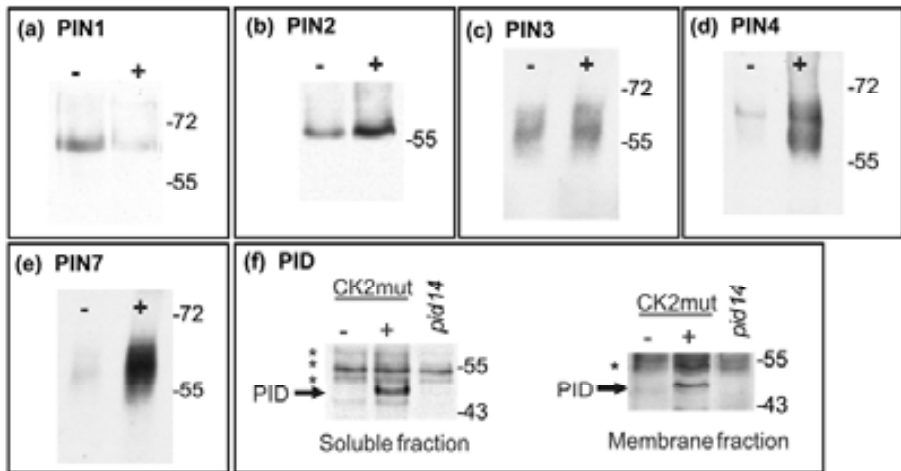


Figure 15. Western blot analysis of PINs and PID.

CK2mut seedlings were treated with DMSO (-) or 5 μ M dexamethasone (+) for 48h. Membrane (a–f) and soluble (f) protein fractions were prepared from roots. Proteins were analysed by western blotting using antibodies against PIN1 (a), PIN2 (b), PIN3 (c), PIN4 (d), PIN7 (e) or PID (f). Migration positions of molecular mass markers (in kD) are indicated on the right of each panel. In (f), *pid14* (Bialek and Cohen, 1992) was used as a negative control and non-specific bands are indicated by asterisks.

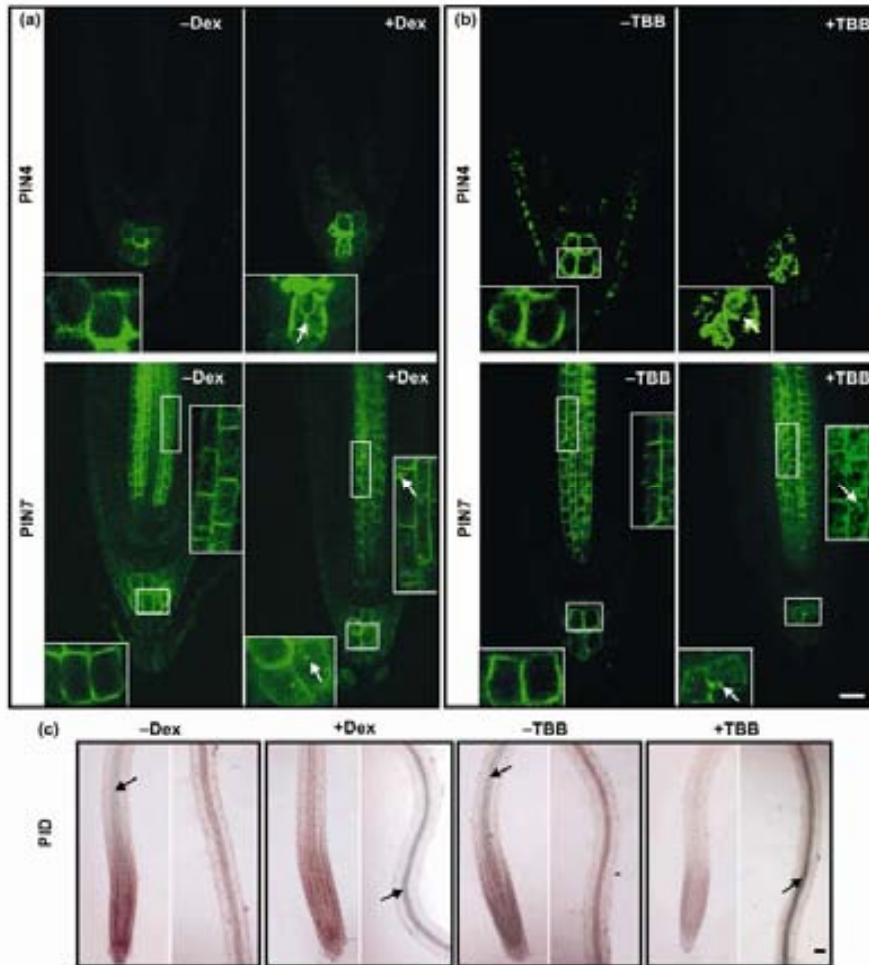


Figure 16. PINs and PID localization in Arabidopsis roots depleted of CK2 activity.

(a, b) Subcellular localization of PIN4 and PIN7. (a) *PIN4::PIN4-GFP* and *PIN7::PIN7-GFP* were introduced into the CK2mut background by sexual crossing and GFP fluorescence was detected by confocal microscopy at 24 h after Dex-treatments. (b) *PIN4::PIN4-GFP* and *PIN7::PIN7-GFP* localization in roots treated with TBB for 16 h.

(c) *PID::PID-GUS* expression. GUS activity is predominantly detected in the root tips of control plants, whereas Dex-treated CK2mut plants show predominant staining in the upper part of the roots. The same results were obtained in *PID::PID-GUS* roots treated with TBB for 16 h. Scale bars: 100 μm.

Discussion

The phenotypes exhibited by *Arabidopsis* plants that express a dominant negative form of CK2 α subunit reveal an important link between CK2 and auxin transport. Auxin is a phytohormone that regulates many aspects of growth and plant development. Interestingly, some of the auxin-related responses were inhibited (LR formation and phototropism) in CK2mut plants, whereas others were enhanced (gravitropism and root waving). The enhanced waving might be attributed to the faster gravitropic response exhibited by CK2mut roots, as reported for other *Arabidopsis* mutants (Eapen *et al.*, 2003). Moreover, waving, gravitropism, and lateral root formation are intertwined processes that depend on auxin transport (De Smet *et al.*, 2007).

The changes in auxin distribution and auxin transport, as well as other auxin-related phenotypes, are sustained by the large changes detected at the molecular level. A significant number of genes encoding auxin transporters, auxin response factors (ARFs), auxin repressors, and other related proteins, was misregulated in CK2mut plants. Concerning auxin transport, four out of the five genes encoding PM-resident members of the PIN family were significantly misexpressed, and the transcriptional changes correlated with changes in the corresponding protein levels. Moreover, the gene coding for PID protein, a key regulator of PIN subcellular localization, was overexpressed up to 8-fold in CK2mut roots. Among the PIN proteins, the most significant changes were those of PIN4 and PIN7, which were highly overexpressed. In addition, they appeared internalized in endosome-like particles, with a concomitant depletion from the PM (although the total amount of protein was higher). The fact that TBB produced the same effects indicates that CK2 catalytic activity is required. PIN4 and PIN7 mislocalization in the columella cells correlated with decreased auxin levels in the root tip. PIN4 and PIN7 have key roles in the auxin-reflux loop, that channel the phytohormone through the lateral root cap and the epidermal cells from the root tip to the basal part of the root (Baluska *et al.*, 2010; Blilou *et al.*, 2005). LR initiation is highly dependent on this auxin route (De Smet *et al.*, 2007) and thus

mislocalization of PIN4 and PIN7 might underline the absence of LR initiation. Exogenous auxin was able to restore cell division and LR initiation in CK2mut roots, corroborating that auxin supply is necessary and sufficient to rescue the phenotype. These data indicate that CK2 acts upstream of auxin, at least concerning the activation of cell division at pericycle cells.

Interestingly, the gravitropic response is still functional in mutant roots. The gravitropic response depends on PIN3 and PIN2, by changing their polar membrane localization in response to the gravity vector (Abas *et al.*, 2006; Friml *et al.*, 2002; Rahman *et al.*, 2010). PIN3 expression is not affected in CK2mut roots. PIN2 levels are slightly enhanced, and its subcellular localization is not significantly affected (results not shown). The enhanced gravitropic response in CK2mut roots may be caused by the apparent enhanced sensitivity to auxin (Figure 2c), and/or by the enhanced PIN2 levels. The gravitropic response in CK2mut roots is also more sensitive to the treatments with NPA and TIBA, which supports the above conclusion. It should be noted that the mechanism by which NPA and TIBA affect auxin transport does not affect the polar targeting of PIN2 or PIN1 (Rahman *et al.*, 2007).

The enhanced localization of PIN4 and PIN7 in intracellular bodies and their depletion from PM suggests that the PM/endosome trafficking system is impaired in mutant roots. Polar localization of PIN proteins depends on their continuous trafficking between PM and endosomal compartments, and inhibition of vesicle trafficking with different drugs results in accumulation of particular PINs in endosomal bodies (Abas *et al.*, 2006; Titapiwatanakun *et al.*, 2009). A functional similarity between the localization of PINs during auxin transport, and the asymmetrical distribution of the GLUT4 glucose transporter in response to insulin signalling has been pointed out, suggesting that the two processes might be mechanistically analogous (Muday and Murphy, 2002). During insulin signalling, two AGC kinases, PKB and PKC, are recruited to the membrane and activated by the 3-phosphoinositide-dependent protein kinase (PDK1) to generate a secondary signalling cascade, resulting in asymmetrical localization of GLUT4 within the plasma membrane (Watson *et al.*, 2004).

CK2-mediated phosphorylation affects the PI3K/PDK1/PKB pathway at multiple levels (Dominguez *et al.*, 2009). One of them is through phosphorylation of PKB (that is likely to occur after the PDK1-mediated phosphorylation), which has two effects: 1) promotes a further activation of PKB and 2) facilitates PKB interaction with chaperone Hsp90, contributing to maintaining high phosphorylation levels at the PDK1-phosphorylated site (Di Maira *et al.*, 2005; Di Maira *et al.*, 2009).

PID Ser/Thr kinase belongs to the AGC family (AGCVIII subfamily) of protein kinases in plants (Bogre *et al.*, 2003). It has been demonstrated that PID interacts with and is phosphorylated by a PDK1 homolog in Arabidopsis (Zegzouti *et al.*, 2006), indicating that the standard PDK1-mediated regulation of AGC kinases is likely to be conserved in plants. PID targets PIN proteins to the apical side of the PM via the GNOM-mediated pathway (Friml *et al.*, 2004; Michniewicz *et al.*, 2007). However, in spite of the high expression levels of PID in CK2mut roots, our results show no apicalization of PIN proteins, as occurs in 35S::PID plants. This discrepancy might be explained by the fact that the overexpression of PID in our mutant is restricted to a specific zone of the root, which is a different situation from the constitutive and ectopic expression of PID in 35S::PID plants. Alternatively, PID activity might be regulated by phosphorylation at multiple sites, as happens in mammalian AGC kinases. AGC kinases are triggered to the PM by PDK1-dependent phosphorylation, and the significant pool of PID in the membrane fraction of CK2mut roots indicates that the phospholipid-mediated membrane targeting was functional. However, depletion of CK2 activity might result in a non-fully-functional PID protein. Moreover, we cannot discard that CK2 activity might be required to control the function of other components of the signalling cascade involved in polar localization of auxin transport complex.

In conclusion, our results show that elimination of CK2 activity using genetic and pharmacological tools impairs auxin transport in Arabidopsis. We propose that CK2 acts upstream of auxin, regulating its asymmetrical distribution by affecting the expression and localization of auxin-transport machinery. We show that endosomal trafficking of PIN proteins (which is essential for their

polar localization) is affected, as is the expression of genes encoding auxin-transporters and their regulators. CK2 might be required at different points of the complex pathways that regulate auxin fluxes, including components of the signalling pathways, of the endosomal compartments, or cargo proteins. As multiple levels appear to be affected, future work should be aimed at determining the direct targets of CK2 kinase, in order to elucidate the precise molecular events that lead to the observed auxin-related phenotypes.

Capítol 2

**Estudi del tràfic vesicular de les
proteïnes PIN en plantes defectives en
CK2**

RESUM

En el capítol anterior s'ha mostrat que l'eliminació de l'activitat CK2 en plàntules d'*Arabidopsis* resulta en un fenotip lligat a defectes en el transport d'auxina. A banda d'un patró de distribució de l'auxina alterat, es produeixen canvis en l'expressió i quantitat total de proteïna dels transportadors PIN, i s'observa la formació de vesícules endosomals de PIN4 i PIN7. La formació d'endosomes d'aquests transportadors d'auxina, va fer pensar que la proteïna quinasa CK2 intervenia en algun punt de la via de tràfic vesicular. Estudis fets amb diferents fàrmacs inhibidors de la via de tràfic vesicular, així com amb mutants que tenen el transport d'auxina alterat, donen lloc a la formació de vesícules dels transportadors d'auxina. Així doncs, per tal d'estudiar en quin punt de la via del tràfic vesicular intervé la proteïna quinasa CK2, s'han emprat diversos tractaments amb fàrmacs inhibidors de diferents punts de la via del tràfic vesicular. A més, també s'ha dut a terme la tinció amb el colorant de lípids FM4-64 que ha permès veure colocalització de proteïnes amb membranes ja sigui a la membrana plasmàtica com en forma d'endosomes. Aquests experiments s'han realitzat utilitzant les plantes PIN7::PIN7-GFP i utilitzant com a model les plantes PIN1::PIN1-GFP, ja que PIN1 és el transportador d'auxina del que se'n coneixen més detalls del seu tràfic per la via endocítica. Tots aquests experiments ens han permès identificar que l'eliminació de l'activitat CK2 produeix endosomes tipus *sorting nexin* aberrants.

Introducció

Tràfic vesicular dels transportadors d'auxina

Internalització i endocitosi dependent de clatrina

Les proteïnes PIN són proteïnes integrals de membrana que es sintetitzen i es pleguen al reticle endoplasmàtic. A continuació, les proteïnes PIN tipus 2 (PIN5, PIN6 i PIN8) queden retingudes al reticle endoplasmàtic i les proteïnes PIN tipus 1 (PIN1, PIN2, PIN3, PIN4 i PIN7) es glicosilen i passen a l'aparell de Golgi. La xarxa *trans*-Golgi (TGN) és el punt central de classificació per dirigir les proteïnes PIN tipus 1, cap a la membrana plasmàtica o cap al vacúol (Viotti *et al.*, 2010). La secreció cap a la membrana plasmàtica dóna a lloc a una localització apolar (Dhonukshe *et al.*, 2008), de manera que l'establiment de la polaritat de les proteïnes PIN sintetitzades *de novo*, requereix un següent pas d'endocitosi i (posterior) reciclatge (Dhonukshe *et al.*, 2008) (figura 18).

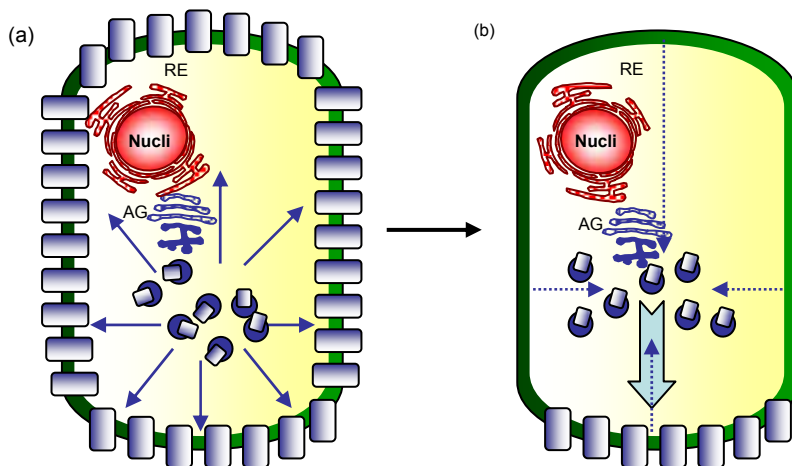


Figura 17. Mecanisme d'establiment de la polaritat de les proteïnes PIN.

Les proteïnes PIN sintetitzades *de novo* es distribueixen a la membrana de manera apolar (a), i posteriorment es localitzen de manera polar en funció del teixit o de l'estímul. Aquesta polaritat s'obté mitjançant el tràfic de vesícules (b).

Abreviatures:

RE, reticle endoplasmàtic; AG, Aparell de Golgi.

L'endocitosi de les proteïnes PIN que es troben en la membrana plasmàtica comença amb la internalització en vesícules recobertes de clatrina. L'endocitosi d'aquestes proteïnes s'inhibeix pel tractament amb auxina (s'explica detalladament més endavant) (Kleine-Vehn *et al.*, 2011; Robert *et al.*, 2010). Aquestes vesícules es fusionen amb els endosomes, orgànuls que serveixen per a la classificació, el reciclatge i per a promoure el transport de les proteïnes de membrana. Aquests endosomes es poden dividir en dos tipus, els endosomes primerencs i els tardans. Els endosomes primerencs tenen una mida d'entre 100-300 nm i s'encarreguen de la classificació i del reciclatge cap a la membrana plasmàtica (Dettmer *et al.*, 2006; Lam *et al.*, 2007). Els endosomes tardans, tenen una mida més gran (200-500 nm) i són cossos multivesiculars o compartiments prevacuolars (*multivesicular bodies*, MVB, o *prevacuolar compartment*, PVC) que transporten les proteïnes cap al vacúol lític (Robinson *et al.*, 2008). Aquest orgànu té la funció equivalent al lisosoma animal, és a dir, s'encarrega de la degradació i de l'emmagatzematge del rebuig. En plantes, a més del vacúol lític, també es troben els vacúols d'emmagatzematge de proteïnes, que acumulen proteïnes necessàries en la geminació de la llavor (Grunewald and Friml, 2010).

L'estudi del procés d'endocitosi en plantes ha estat facilitat per l'ús dels fàrmacs *tyrphostins*, descrits a l'article (Aniento and Robinson, 2005) i per l'ús d'anticossos específics anti-clatrina. Les *tyrphostins* són anàlegs estructurals de la tirosina i s'utilitzen com a inhibidors competitiu dels receptors de les tirosina quinases en cèl·lules de mamífers. Es va observar que aquests fàrmacs poden inhibir tant l'endocitosi com la vesiculació a la xarxa *trans*-Golgi (Austin and Shields, 1996; Holen *et al.*, 1995). En concret, la *tyrphostin* A23 interfereix en la interacció entre els motius endocítics del domini citoplasmàtic de la proteïna que s'ha invaginat i, la subunitat $\mu 2$ de la proteïna adaptadora AP-2, que facilita la incorporació de la clatrina a les vesícules en formació (Figura 19). Com a control negatiu d'aquest tractament s'utilitza la *tyrphostin* A51, un anàleg estructural de la *tyrphostin* A23 però que no té capacitat d'interacció amb l'adaptador AP-2 (Banbury *et al.*, 2003; Dhonukshe *et al.*, 2007). Diversos articles demostren que la *tyrphostin* A23 és

un inhibidor útil per a l'estudi de l'endocitosi en cèl·lules vegetals. Per una banda, s'ha demostrat que aquest inhibidor és capaç d'interferir en la internalització del receptor humà de la transferrina (hTfR) quan s'expressa en protoplastos d'Arabidopsis (Ortiz-Zapater *et al.*, 2006) i, per altra banda, s'ha demostrat que en arrels d'Arabidopsis, els tractaments amb *tyrphostin A23* són capaços d'inhibir la formació de vesícules de PIN2 originades pel tractament amb Brefeldina A (BFA), un inhibidor del procés de reciclatge constitutiu, que s'explicarà al següent apartat (Dhonukshe *et al.*, 2007).

Com s'ha comentat anteriorment, el tractament amb auxina inhibeix l'endocitosi de les proteïnes PIN en vesícules revestides de clatrina (Figura 19). El procés de formació d'aquestes vesícules és dependent del receptor d'auxina ABP1, que actua com a factor positiu en el reclutament de clatrina a la membrana plasmàtica. Quan l'auxina interacciona amb ABP1, interfereix en el reclutament de clatrina, inhibint així l'endocitosi i la internalització de les proteïnes PIN (Kleine-Vehn *et al.*, 2011; Robert *et al.*, 2010). Aquest procés d'inhibició és molt ràpid i no depèn de transcripció (per tant, és independent de TIR-1) i es suggereix que aquesta via de senyalització podria ser important en la regulació del transport de l'auxina.

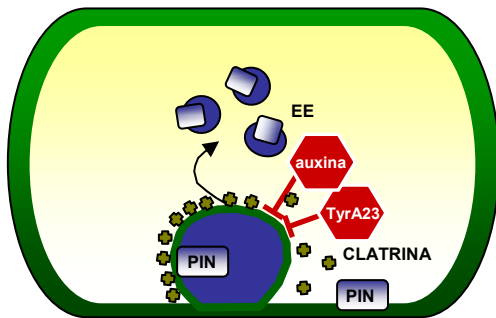


Figura 18. Esquema del procés d'invaginació.

Part inicial del mecanisme d'endocitosi dependent de clatrina (l'invaginació). Es mostra on actua la clatrina i els inhibidors del procés: l'auxina i la tyrphostin.

Abreviatures:

TyrA23, tyrphostin A23; **EE**, *early endosome* (endosoma primerenc).

El reciclatge constituti

Els cicles de transport de les proteïnes PIN entre la membrana plasmàtica i els endosomes estan controlats pels factors de ribosilació d'ADP (ARFs). Aquests són proteïnes petites d'unió a nucleòtids de guanina que tenen funcions importants en el tràfic endocític en tots els eucariotes. Els ARFs són solubles i estan associats a la membrana on s'hi enllacen feblement quan estan units amb el GDP, i fortament quan estan units amb el GTP. Els ARFs a la membrana poden interaccionar amb els seus activadors, (els factors d'intercanvi de nucleòtids de guanina ARF-GEFs que catalitzen l'intercanvi GDP/GTP) i amb els seus inhibidors (les proteïnes activadores de GTPases ARF-GAPs que hidrolitzen el GTP) (Donaldson and Jackson, 2000). En animals hi ha vuit famílies d'ARF-GEFs, mentre que en plantes només se n'han trobat dos, les BIG i les GBF (Cox *et al.*, 2004; Mouratou *et al.*, 2005). Les proteïnes ARF-GEF tenen la seva pròpia especificitat, localització i regulació; aquest fet, permet controlar específicament els diferents passos del transport vesicular mediat pels ARFs.

L'ARF-GEF més estudiat en el tràfic vesicular de plantes és la proteïna GNOM, un membre de la família GBF. Aquesta proteïna actua principalment en l'endosoma tardà i s'ha vist involucrada en el reciclatge cap a la membrana de les proteïnes PIN i d'altres proteïnes de la membrana plasmàtica (Geldner, 2004) (Figura 20). L'estudi d'aquesta via ha estat facilitat pel fàrmac *brefeldin A* (BFA) que inhibeix a GNOM, ja que actua sobre els factors d'intercanvi de guanina (Steinmann *et al.*, 1999). La pèrdua de funció de GNOM dóna defectes en el desenvolupament de l'embrió, degut a la pertorbació de l'establiment de la polaritat de PIN1 durant l'embriogènesi (Friml *et al.*, 2003; Steinmann *et al.*, 1999). A més, la funció de GNOM només compromet la localització basal de les proteïnes PIN, mentre que la localització apical d'aquestes proteïnes no està afectada (Kleine-Vehn and Friml, 2008).

A banda de la proteïna GNOM, en *Arabidopsis* les proteïnes GNOM-like (GNL) també formen part de la família GBF de les ARF-GEF (Geldner *et al.*,

2003). La proteïna GNL1 està involucrada en el tràfic vesicular entre l'aparell de Golgi i el reticle endoplasmàtic (Richter *et al.*, 2007; Teh and Moore, 2007) i actua principalment a l'aparell de Golgi regulant la formació de vesícules revestides de COPI. Aquest revestiment és característic de les vesícules que van de l'aparell de Golgi al reticle endoplasmàtic (transport retrògrad) (Figura 23).

En plantes d'*Arabidopsis* que expressen versions de GNOM insensibles a la BFA, s'ha pogut detectar que PIN2, a diferència de PIN1, té una sensibilitat parcial a la BFA (Geldner *et al.*, 2003); aquest fet, implica la presència d'altres ARF-GEFs o d'altres mecanismes involucrats en el tràfic intracel·lular de les proteïnes PIN. D'acord amb això, s'ha demostrat que la localització apical de les proteïnes PIN no està regulada principalment per GNOM sinó per alguna altra ARF-GEFs (Kleine-Vehn *et al.*, 2008).

A diferència de les GBF, la família BIG de les ARF-GEFs gairebé no ha estat caracteritzada funcionalment. Recentment, s'ha identificat BIG5/BEN1 (abans coneguda com a MIN7) com a reguladora de la internalització de PIN dependent de GNOM (Tanaka *et al.*, 2009). BEN1 (*BFA-visualized endocytic trafficking defective1*) es localitza al TGN/EE, de manera diferent dels endosomes de reciclatge GNOM-positiu (Figura 20). S'ha comprovat que BEN1 regula el tràfic dels cicles constitutius entre els endosomes primerencs i els endosomes de reciclatge, en el tràfic de les proteïnes PIN1 i PIN2 (Tanaka *et al.*, 2009).

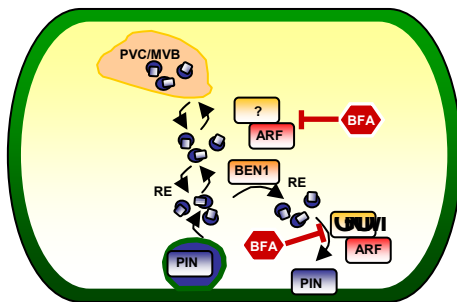


Figura 19. Mecanisme d'acció de la BFA.

El fàrmac BFA actua en els endosomes tant inhibint el retorn a la membrana plasmàtica com l'entrada al compartiment prevacuolar.

Abreviatures:

RE, *recycling endosome* (endosoma de reciclatge); **BFA**, **brefeldina A**; **ARF**, *ADP ribosilation factors* (factors de ribosilació d'ADP); **PVC/MVB**, *prevacuolar compartment / multivesicular bodies* (compartiment prevacuolar/ cossos multivesiculars)

La fosforilació dirigeix el reciclatge polar

Com s'ha comentat anteriorment, els mecanismes que dirigeixen la localització basal o apical de les proteïnes són molecularment diferents (Kleine-Vehn *et al.*, 2006; Wisniewska *et al.*, 2006) i el reclutament cap a aquestes vies depèn de l'estat de fosforilació de les proteïnes PIN (Dhonukshe *et al.*, 2010; Friml *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2010; Kleine-Vehn *et al.*, 2009). La serina/treonina quinasa PINOID (PID) catalitza la fosforilació del *loop* hidrofílic de les proteïnes PIN ((Michniewicz *et al.*, 2007), dirigint així el pas de la part basal cap a la part apical de la membrana, per una via independent de l'ARF-GEF GNOM que regula el pas cap a la part basal. PID actua conjuntament amb la família de proteïnes reguladores ENHANCER OF PINOID (ENP)/NON-PHOTOTROPIC HYPOCOTIL 3 (NPH3)like/MACCHI-BOU 4 (MAB4) que tenen una localització polar similar a la de les proteïnes PIN (Furutani *et al.*, 2007; Furutani *et al.*, 2011; Kleine-Vehn *et al.*, 2009; Trembl *et al.*, 2005). El mecanisme de translocació que regeix el canvi de polarització de les proteïnes PIN que han estat fosforilades per la quinasa PINOID és desconegut, però, segurament està relacionat amb el reclutament de les proteïnes PIN fosforilades i desfosforilades en la via del tràfic polar durant els cicles constitutius de les proteïnes PIN (Dettmer and Friml, 2011). Per altra banda, la proteïna fosfatasa PP2A actua contrarestant a la quinasa PINOID en la fosforilació de les proteïnes PIN i, promou la localització d'aquestes a la part basal de la membrana per una via dependent de l'ARF-GEF GNOM (Kleine-Vehn *et al.*, 2009; Michniewicz *et al.*, 2007) (figura 21).

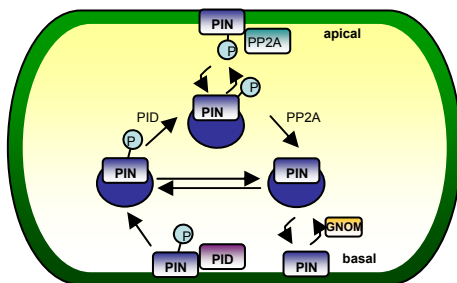


Figura 20. Efecte de la fosforilació de les proteïnes PIN.

La quinasa PID fosforila a les proteïnes PIN i promou la seva polarització apical. Contrarestant aquest efecte hi ha la proteïna fosfatasa PP2A, que es responsable de la polaritat basal juntament amb la proteïna GNOM.

Figura modificada de {{402 Lofke,C. 2012}}.

Transport en direcció al vacúol

Les proteïnes carregades als endosomes poden dirigir-se cap a la via de reciclatge dependent de GNOM, tornant cap a la membrana plasmàtica, o bé, dirigir-se cap al compartiment prevacuolar PVC/MVB (també conegut com endosoma tardà), com a pas previ en el seu camí cap al vacúol. L'estudi de les vies de tràfic cap al vacúol ha estat facilitat per l'ús de fàrmacs com la *wortmannin* (WM), un inhibidor de la fosfatidil-3-quinasa (PI3K) amb capacitat per inhibir la PI4K i la síntesi de fosfolípids quan se n'augmenta la concentració (Emans *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2001; Matsuoka *et al.*, 1995; Xue *et al.*, 1999) que té com a diana el tràfic del PVC, inhibint el pas cap al vacúol de la proteïna PIN2 i altres proteïnes de membrana des del PVC al vacúol (figura 22) (Jaillais *et al.*, 2006; Kleine-Vehn *et al.*, 2008). A més a més de la *wortmannin*, s'ha detectat que la BFA també afecta al transport cap al vacúol, ja que tant plantes salvatges tractades amb aquest inhibidor com plantes mutants de GNOM, tenen reduït el tràfic cap a aquest orgànel (Kleine-Vehn *et al.*, 2008) (figura 20).

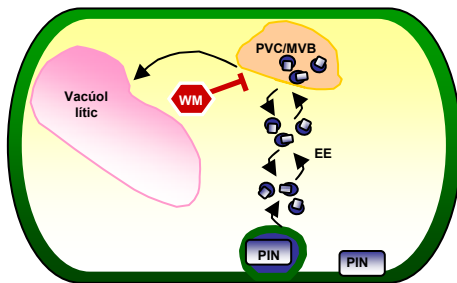


Figura 21. Efecte de la inhibició amb *wortmannin*,

El tractament amb *wortmannin* inhibeix l'entrada de les proteïnes PIN al vacúol lític quedant retingudes al compartiment prevacuolar,
Abreviatures:
EE, *early endosome* (endosoma primerenc);
PVC/MVB, prevacuolar compartment/
multivesicular bodies (compartiment
prevacuolar / cossos multivesiculars; **WM**,

Per a que es dugui a terme el transport cap al vacúol, a més de les proteïnes ARF-GEF es requereixen els *vacuolar sorting receptors* (VSRs), proteïnes integrals de membrana que medien aquest tràfic via PVC. Per tal d'estalviar energia i reduir el rebuig, les cèl·lules vegetals reciclen els VSRs després de la dissociació amb el seu lligand (Seaman, 2005). Aquest reciclatge és mediat pel retròmer, un complex heteropentamèric que consta d'un dímer de

proteïnes *sorting nexin* (SNX) i un trímer format per proteïnes *sorting vacuolar* (VPS26, VPS29 i VPS35). El dímer de SNX té la funció de reclutar el complex cap als endosomes, mentre que el trímer VPS actua com a mitjà d'unió a les proteïnes transportades (Bonifacino and Hurley, 2008; Collins, 2008; Seaman, 2005).

Els components del retròmer SNX1 i VPS29 són els més estudiats i s'ha observat que són importants pel creixement i el desenvolupament de la planta. Els mutants d'aquestes proteïnes presenten fenotips relacionats amb el transport d'auxina com són l'absència d'arrels laterals, disminució del creixement de l'arrel principal i resposta als tropismes alterada. A més es va poder observar que els creuaments d'aquests mutants amb plantes que contenen els constructes PIN1-GFP i PIN2-GFP donaven lloc a una acumulació de PIN1 i PIN2 en vesícules (Jaillais *et al.*, 2006; Jaillais *et al.*, 2007). La funció de SNX1 i VPS29 dins de la via de tràfic vesicular ha estat tema de controvèrsia. Inicialment, es va interpretar que les ambdues proteïnes intervenien en el reciclatge cap a la membrana plasmàtica de les proteïnes PIN2 i PIN1 (Jaillais *et al.*, 2006) (Jaillais *et al.*, 2007). Per altra banda, a l'article (Jurgens and Geldner, 2007), postulen una interpretació alternativa, es proposa que SNX1 i VPS29 actuarien a la via regulant el balanç entre les proteïnes que es dirigeixen cap al vacúol de les proteïnes que es reciclen cap a la membrana plasmàtica (Kleine-Vehn *et al.*, 2008).

Aquesta última interpretació concorda amb els estudis fets en llevats i en sistemes animals on el retròmer es requereix per reciclar els VSR del TGN (Bonifacino and Hurley, 2008; Seaman, 2005). També està d'acord amb la localització de les proteïnes SNX1, VPS26, VPS29 i VPS35 a la membrana del PVC. No obstant, experiments fets amb microscòpia electrònica indiquen que totes les subunitats del retròmer es troben, també, localitzades a la xarxa *trans*-Golgi (Niemes *et al.*, 2010b). A més, en mutants de les SNXs s'inhibeix l'exportació dels VSRs de la xarxa *trans*-Golgi cap al reticle endoplasmàtic (Niemes *et al.*, 2010a). Tot i així, actualment no s'ha resolt si tots aquests resultats involucren el mateix mecanisme o si el putatiu complex

del retròmer regula diverses vies de tràfic, per exemple del PVC cap TGN i/o del TGN cap al reticle endoplasmàtic.

Un cop les proteïnes de membrana plasmàtica es troben al PVC/MVB, són incorporades al lumen dels seus endosomes transportadors i direccionades cap al lumen del vacúol per a la seva degradació. Aquesta internalització està mediada per la maquinària dels *endosomal sorting complexes required for transport* (ESCRT). Els ESCRT contraresten el dispositiu del retròmer, ja que el ESCRT fa que les proteïnes passin de la membrana dels endosomes a lumen endosomal, mentre que el retròmer rescata les proteïnes de la membrana dels endosomes i les retorna cap al TGN.

Els mutants de les proteïnes ESCRT-related (CHMP1A i CHMP1B) comprometen la classificació de PIN1, PIN2 i AUX1 al lumen de les vesícules del PVC, conduint a la retenció de les proteïnes a la membrana del PVC i l'acumulació al tonoplast (Spitzer *et al.*, 2009). Com a resultat, el mutant *chmp1a chmp1b* dona un embrió que falla en l'establiment del gradient d'auxina i té defectes en el desenvolupament tant a nivell embrionari com postembrionari (Spitzer *et al.*, 2009).

A la figura 23 es mostra un esquema de les proteïnes i els compartiments cel·lulars que intervenen en el tràfic vesicular de les proteïnes PIN tipus 1.

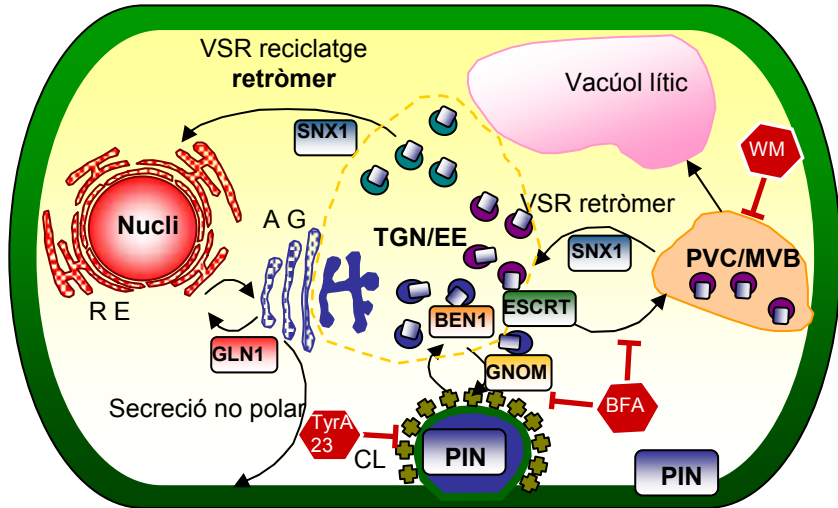


Figura 22. Tràfic vesicular dels transportadors d'auxina PIN tipus 1.

La TGN/EE es mostra al centre del tràfic intracel·lular. S'assumeix que hi poden haver subcompartiments, els quals es mostren de diferents colors. La Tyrphostin A23 interfereix amb l'adaptador de la clatrina inhibint la internalització de les proteïnes PIN. El reciclatge de PIN1 a la part basal de la cèl·lula és GNOM-dependent i sensible a la BFA, mentre que el tràfic de TGN/EE cap PVC/MVB és GNOM independent i parcialment sensible a la BFA. L'inhibidor de la PI3K (WM) afecta a l'integritat del PVC i disminueix l'entrada al vacuol. El tràfic de les proteïnes PIN tipus 1 és sensible a la BFA, però els mecanismes són diferents.

Abreviatures:

BEN1, BFA-VISUALIZED ENDOCYTIC TRAFFICKING DEFECTIVE 1; **BFA**, brefeldin A; **RE**, reticle endoplasmàtic; **ESCRT**, ENDOSOMAL SORTING COMPLEX REQUIRED FOR TRANSPORT; **GNL1**, GNOM-LIKE1; **MVB**, multivesicular bodies; **PIN**, PIN-FORMED; **PVC**, pre-vacuolar compartment; **SNX1**, SORTING NEXIN-1; **TGN/EE**, trans Golgi network/ early endosome; **Tyr A23**;

Materials i mètodes

Material biològic

En aquest treball s'han utilitzat plantes salvatges d'*Arabidopsis thaliana* d'ecotip *Columbia* (Col-0) i les següents plantes transgèniques, totes elles originades a partir de l'ecotip Col-0: *proPIN1::PIN1-GFP*, *proPIN7::PIN7-GFP*, *proDR5rev::GFP* i les plantes prèviament descrites CK2mut (el mutant dominant negatiu de la proteïna quinasa CK2).

Cultius *in vitro*

Les llavors de les diverses línies utilitzades es van esterilitzar i es van deixar a 4°C durant 48 hores per tal de sincronitzar la seva germinació. Es van fer créixer en plaques de medi Murashige and Skoog (MS) (Duchefa Biochemie BV, Haarlem, The Netherlands) o medi Gambourg B5 (GB5) (Duchefa Biochemie BV, Haarlem, The Netherlands) contenint 2 mM 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) (Duchefa Biochemie BV, Haarlem, The Netherlands) (pH 5.7), 2,5-5 (g/l) sacarosa (Sigma-Aldrich Co, www.sigmaaldrich.com) i, 12 (g/l) d'agar (Pronadisa) si es feia el creixement en plaques quadrades verticals, o bé, 8 g/l d'agar si es feia el creixement en plaques rodones horitzontals. En tots els casos, les plantes es van créixer a una temperatura de 22°C i un fotoperíode de dia llarg (16 hores de llum a 140 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ segon}^{-1}$ i 8 hores de foscor).

Eliminació de l'activitat CK2

S'han utilitzat dues metodologies per a la inhibició de l'activitat CK2. Per una banda, s'ha nutilitzat eines genètiques, mitjançant la inducció del transgèn CK2mut i, per altra banda, eines farmacològiques, mitjançant l'inhibidor TBB.

Per a dur a terme l'expressió del transgèn CK2mut, es van fer créixer les plàntules CK2mut durant 5 dies i es van tractar amb dexametasona 1 μ M (Dex) (Duchefa Biochemie BV, Haarlem, The Netherlands), dissolta en etanol, durant 48 hores o amb dexametasona 5 μ M durant 24 hores.

Per a la inhibició de la CK2 mitjançant l'ús del fàrmac inhibidor 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazol (TBB) (Calbiochem), es van fer créixer les plàntules durant 5 dies i, a continuació, es van tractar durant 2 hores en medi líquid amb TBB 10, 25 o 50 μ M, o bé, durant 16 hores en medi sòlid amb TBB 10 μ M. En ambdós casos es va partir d'un estoc de TBB 20 mM dissolt amb dimetilsulfòxid (DMSO) (Sigma-Aldrich Co, www.sigmaaldrich.com).

Tractaments amb inhibidors

Els tractaments amb els diversos inhibidors utilitzats es va realitzar en plàntules de 5 dies, en les condicions prèviament explicades. Les plàntules es van fer créixer en posició vertical en medi sòlid MS o GB5 i el corresponent tractament amb el fàrmac inhibidor es va dur a terme en MS medi líquid o MS sòlid, la meitat de concentrat del que s'utilitza per la germinació i el creixement de les plantes.

Tractament amb *wortmannin* (WM)

La solució estoc d'aquest inhibidor es va preparar dissolent el fàrmac *wortmannin* (Sigma) en dimetilsulfòxid (DMSO) a 50 mM (Sigma-Aldrich Co, www.sigmaaldrich.com). El tractament amb aquest inhibidor es va fer, durant 2 hores a 33 μ M o durant 16 hores a 16 μ M. En ambdós casos el tractament es va fer en medi sòlid.

Tractament amb *brefeldin A* (BFA)

La solució estoc d'aquest inhibidor es va preparar en dimetilsulfòxid (DMSO) a 50 mM (Sigma-Aldrich Co, www.sigmaaldrich.com). Aquest tractament es va

dur a terme en 4ml de medi MS líquid, en plaques estèrils de 6 pouets i en agitació. El tractament amb BFA (Sigma-Aldrich Co, www.sigmaaldrich.com) es va fer a concentració final de 50 μ M durant un temps de 1 o 2 hores. També es van fer tractaments simultanis de BFA 50 μ M i TBB 10 μ M.

Tractament amb *tyrphostin* A23 o A51 (Tyr A23 o Tyr A51)

Les solucions estoc dels inhibidors *tyrphostin* A23 (Sigma-Aldrich Co, www.sigmaaldrich.com) i *tyrphostin* A51 (Sigma-Aldrich Co, www.sigmaaldrich.com) es van preparar dissolent cadascun d'aquests fàrmacs en dimetilsulfòxid a 50 mM. El tractament amb aquest inhibidor es va fer, durant 2 hores a 30 μ M o durant 16 hores a 16 μ M, en medi MS sòlid.

Les plàntules de 5 dies es van transferir a una placa que contenia *tyrphostin* A23 30 μ M o *tyrphostin* A51 30 μ M i es va mantenir durant 2 hores. Seguidament, es van transferir a una altra placa que contenia *tyrphostin* A23 o *tyrphostin* A51 16 μ M i TBB 10 μ M o el corresponent volum de dimetilsulfòxid (DMSO), i es van incubar durant 16 hores.

Tractament amb cicloheximida (CHX)

La solució estoc de cicloheximida (Sigma-Aldrich Co, www.sigmaaldrich.com) es va preparar dissolent aquest fàrmac en dimetilsulfòxid (DMSO) a 50 mM. Aquest tractament es va dur a terme en 4ml de medi MS líquid, en plaques estèrils de 6 pouets i en agitació. El tractament amb cicloheximida es va fer a concentració final de 50 μ M durant un temps de 2 hores. També es van fer tractaments simultanis de cicloheximida i BFA 50 μ M o cicloheximida i TBB 10 μ M.

Tractament amb àcid naftalenacètic (NAA)

La solució estoc de NAA (àcid naftalenacètic) (Sigma-Aldrich Co, www.sigmaaldrich.com) es va preparar dissolent aquesta hormona en KOH 1M. Aquest tractament es va dur a terme en medi MS sòlid a una concentració final de 1 μ M.

Les plàntules es van fer créixer durant 5 dies i seguidament es van transferir a plaques que contenien NAA 1 μ M, o simultàniament TBB 10 μ M i NAA 1 μ M, i es van incubar durant 16 hores. També es van fer tractaments simultanis amb wortmannin 30 μ M i NAA 10 μ M durant 16 hores.

Tinció amb lugol

Aquesta tinció es va realitzar en plàntules CK2mut de 7 dies de creixement prèviament tractades amb dexametasona, o amb etanol, durant 48 hores. Aquestes plantes es van incubar durant 1 minut amb una de solució de lugol al 50% (Sigma-Aldrich Co, www.sigmaaldrich.com). A continuació, es van fer 3 rentats de 5 minuts cadascun amb medi MS i es van observar les mostres al microscopi òptic.

Tinció amb FM4-64

La solució estoc d'aquest colorant es va preparar dissolent 100 μ g en 100 μ l de dimetilsulfòxid, obtenint un estoc a 1,65 mM

Aquesta tinció es va realitzar just abans de la visualització al microscopi de les plantes sotmeses als diversos tractaments. Es van posar les plàntules en medi MS líquid contenint FM4-64 (Life-Technologies Co., Paisley, UK) a 9 μ M durant 20 minuts i en agitació. A continuació, es van fer 3 rentats amb medi líquid de 5 minuts cadascun i es van observar al microscopi confocal.

Microscòpia

Les imatges de microscòpia confocal es van obtenir per mitjà del microscopi Olympus IX81 Motorized Inverted microscope equipat amb l'Olympus FluoView™ FV1000 laser (Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Germany). La fluorescència de la GFP es va detectar utilitzant una longitud d'ona d'excitació de 488 nm i una banda de pas d'emissió de 500 a 600 nm. La tinció amb FM4-64 es va detectar a una longitud d'ona d'excitació de 561 nm i una longitud d'ona d'emissió >575 nm. El processament de les imatges obtingudes es va realitzar per mitjà del programa MetaMorph (Universal Imaging Corp., Downingtown, PA., USA).

L'observació de la tinció amb lugol es va dur a terme mitjançant microscòpia òptica. Les plàntules es van muntar amb glicerol al 50% i es van visualitzar per mitjà del microscopi Leica DM RB (Leica Heidelberg, Germany).

Resultats

Estudi de l'afectació del meristem radicular de les plantes CK2mut.

Defectes en el transport d'auxina afecten al desenvolupament del meristem radicular. Prèviament s'ha descrit que les plantes CK2mut tenen un fenotip radicular especialment afectat; l'arrel principal és més curta, no hi ha formació d'arrels laterals i, a més, s'observa l'acumulació en vesícules endosomals dels transportadors d'auxina PIN4 i PIN7. Tractaments amb auxina exògena i tractaments amb NPA (inhibidor del transport d'auxina) afecten a la diferenciació de les cèl·lules de la columel·la provocant canvis en la distribució i el número de cèl·lules que contenen grànuls de midó (Ding and Friml, 2010; Dolan *et al.*, 1993). Per tal d'analitzar si el meristem radicular de les plantes CK2mut presentava alteracions, es va dur a terme una tinció dels amiloplasts amb lugol. Es va partir de plàntules CK2mut tractades amb dexametasona durant 48 hores, i es va detectar la presència d'una fila menys de cèl·lules tenyides i, a més de formes irregulars (Figura 23a). En canvi, en les plàntules control (CK2mut -Dex), s'observa les quatre files de cèl·lules perfectament organitzades. Aquests resultats indiquen que en les plàntules CK2mut +Dex el meristem radicular es troba afectat.

A continuació es va analitzar l'afectació del tràfic vesicular a les arrels de les plantes CK2mut, mitjançant la tinció amb el colorant específic de lípids, FM4-64 (Betz *et al.*, 1992; Betz *et al.*, 1996). Aquest colorant permet seguir el tràfic de la via endocítica, ja que, en primera instància, a temps curts d'incubació, es tenyeix la membrana plasmàtica, mentre que, a temps llargs d'incubació es tenyeixen petits orgànuls intracel·lulars i per últim el vacúol (Bolte *et al.*, 2004). Per a dur a terme aquest experiment es va seguir el protocol habitual de creixement i inducció de les plàntules i, després del tractament amb Dex durant 48 hores es va fer la tinció amb FM4-64 a 9 μ M durant 15 minuts. Com es pot observar a la figura 23b, els resultats de la tinció de les plàntules CK2mut tractades amb Dex donen lloc a la tinció de la membrana plasmàtica i, a més, es detecten vesícules intracel·lulars. La tinció

d'aquestes vesícules s'ha pogut observar a tots els tipus cel·lulars, però, amb major abundància a les cèl·lules de l'epidermis. En canvi, en una plàntula no induïda (-Dex), només s'observa tinció de la membrana plasmàtica (Figura 23b). Aquests resultats indiquen que el tràfic vesicular de les plantes CK2mut està afectat en tots els tipus cel·lulars de l'arrel i especialment a les cèl·lules de l'epidermis.

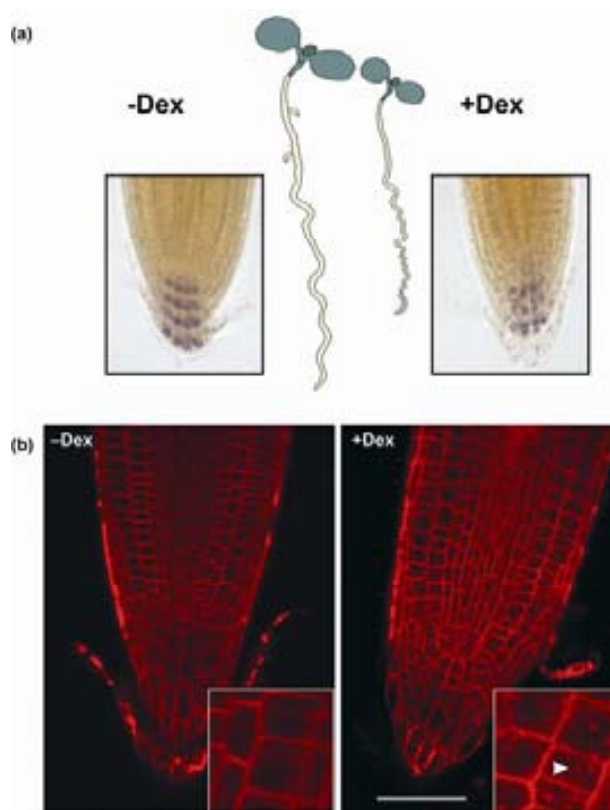


Figura 23. Afectació radicular de les plàntules CK2mut.

(a) Tinció amb lugol de plàntules CK2mut induïdes (+Dex) i no induïdes (-Dex). Al centre es mostra un esquetx dels trets fenotípics principals de les plàntules mutants de CK2mut (a la dreta) enfront una plàntula control (a l'esquerra).

(b) Tinció amb FM4-64 de plàntules induïdes (+Dex) enfront plàntules no induïdes (-Dex) .

Estudi del procés d'endocitosi de la proteïna PIN7 en les plantes CK2mut.

S'ha demostrat que la internalització dels transportadors d'auxina PIN1 i PIN2 requereix l'endocitosi, i en aquest pas és necessària l'activitat de la clatrina a la membrana plasmàtica. La formació d'endosomes de PIN1 i PIN2 donada pel tractament amb *brefeldin A* (BFA) es pot inhibir pel tractament amb *tyrphostin A23*. Aquest és un inhibidor específic dels processos dependents de clatrina. Com a control d'aquest tractament s'utilitza l'anàleg estructural *tyrphostin A51*, que falla en la unió a l'adaptador de la clatrina (Aniento and Robinson, 2005; Dhonukshe *et al.*, 2007).

Per tal de demostrar si les vesícules obtingudes per la inhibició de l'activitat CK2 eren part d'un procés dependent de clatrina, es van fer estudis amb aquests inhibidors. Per dur a terme aquest experiment, es va seguir el protocol habitual de creixement de plàntules durant 5 dies, seguit d'un pretractament de 2 hores amb la corresponent *tyrphostin* a 30 μ M, previ a l'eliminació de l'activitat CK2, mantenint la *tyrphostin* al medi a 16 μ M. L'inhibició de l'activitat CK2 es va dur a terme mitjançant la inducció amb Dex de plantes dobles transgèniques CK2mutxPIN7::PIN7-GFP, o bé per la incubació amb TBB de plàntules PIN7::PIN7-GFP. Com es pot observar a la Figura 24, el tractament amb *tyrphostin A23* conjuntament amb l'eliminació de l'activitat CK2 (amb Dex o TBB), provoca la desaparició de les vesícules originades per la manca d'activitat CK2. En canvi, quan es fa el tractament amb la *tyrphostin A51*, aquestes vesícules romanen intactes. Aquests resultats, permeten afirmar que les vesícules que s'obtenen de la inhibició de l'activitat CK2 estan recobertes de clatrina.

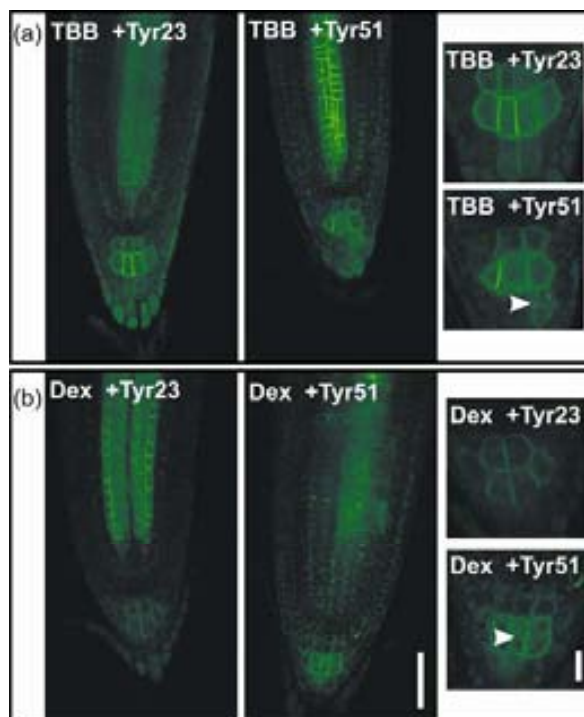


Figura 24. Efecte del tractament amb *tyrphostin A23* eliminant l'activitat CK2.

(a) Plàntules PIN7::PIN7-GFP tractades durant 16 hores amb TBB 10 μM i *tyrphostin A23* 16 μM o *tyrphostin A51* 16 μM . A la dreta es mostren magnificacions (zoom 5) de les cèl·lules de la columel·la.

(b) Plàntules CK2mutxPIN7::PIN7-GFP tractades durant 24 hores amb dexametasona 5 μM i *tyrphostin A23* 16 μM o *tyrphostin A51* 16 μM . A la dreta es mostren magnificacions (zoom 5) de les cèl·lules de la columel·la.

Les barres de calibració de les imatges dels meristems radiculars i de les corresponents magnificacions són de 50 μm i 5 μm , respectivament.

Abreviatures:

TBB, 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazol; **Tyr A23**, tyrphostin A23; **Tyr A51**, tyrphostin A51; **Dex**, dexametasona.

Tractaments amb NAA de plantes sense activitat CK2.

L'aplicació d'auxina exògena permet estimular la formació d'arrels laterals en les plantes CK2mut (Marques-Bueno *et al.*, 2011). S'ha demostrat que en plàntules PIN1::PIN1-GFP, el tractament amb auxina exògena impedeix la formació d'endosomes de BFA. En aquest procés, la proteïna ABP1, que és un receptor d'auxina, actua com a regulador positiu del reclutament de la clatrina a la membrana plasmàtica i permet que es formin vesícules. La unió d'ABP1 a l'auxina impedeix que la clatrina es situï a la membrana plasmàtica; com a conseqüència, s'inhibeix l'endocitosi i augmenta la quantitat de proteïnes PIN a la membrana plasmàtica (Paciorek *et al.*, 2005; Robert *et al.*, 2010).

L'objectiu d'aquest experiment era demostrar si el tractament amb auxina era capaç de revertir la formació de les vesícules que es formen per l'eliminació de l'activitat CK2. Es van fer créixer plantes PIN7::PIN7-GFP durant 5 dies i es va inhibir l'activitat CK2 amb TBB 10 µM durant 16 hores (en plantes) i, simultàniament, es van fer tractaments amb NAA (àcid naftalèn acètic) 1µM. El NAA és una auxina sintètica que és capaç d'entrar a la cèl·lula per difusió però, la sortida cap a l'exterior cel·lular depèn de les proteïnes PIN (Delbarre *et al.*, 1996). Els resultats que es mostren a la figura 25 revelen que el tractament amb auxina exògena no inhibeix la formació de vesícules. No obstant, s'observa un augment de la quantitat de PIN7 a la membrana plasmàtica.

Per fer un anàlisi més exhaustiu d'aquestes dades, es va repetir l'experiment però, alhora, fent una tinció amb el colorant de lípids FM4-64. Es va observar que les vesícules de PIN7 obtingudes pel tractament amb TBB o pel tractament simultani de TBB i NAA no colocalitzen amb les vesícules/endosomes tenyits amb FM4-64, però, si que es detecta colocalització a nivell de la membrana plasmàtica (Figura 26). Amb aquests resultats es pot deduir que la presència d'auxina no reverteix la formació de vesícules, però, si afecta a la presència d'una major quantitat de

transportadors a la membrana plasmàtica. A més, els resultats de la tinció revelen que la inhibició de l'activitat CK2 provoca la formació d'uns endosomes que no colocalitzen amb la tinció amb FM4-64.

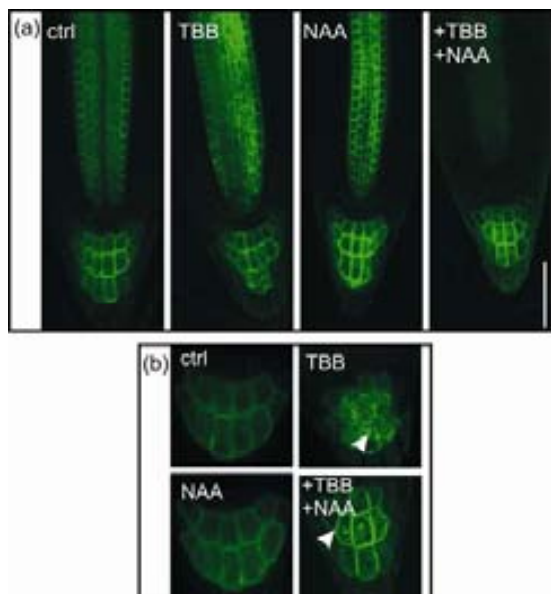


Figura 25. Efecte del tractament amb NAA en plàntules sense activitat CK2.

(a) Plàntules PIN7::PIN7-GFP control (no tractades), tractades amb TBB 10 μM, tractades amb NAA 1 μM i tractades simultàniament amb TBB 10 μM i NAA 1 μM durant 16 hores.

(b) Magnificacions de les cèl·lules de la columel·la de plàntules PIN7::PIN7-GFP que es mostren a l'apartat (a).

Abreviatures:

ctrl, control; **NAA**, àcid naftalèn acètic; **TBB**, 4,5,6,7-tetrabromobenzatriol.

Barra de calibració: 50 μm.

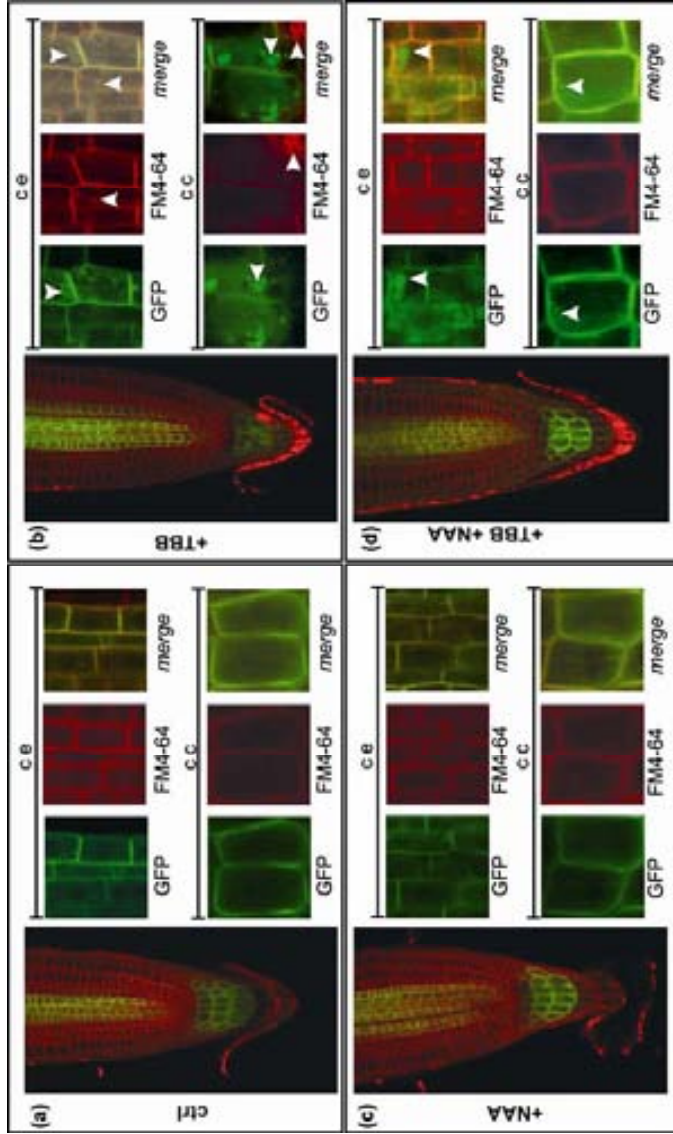


Figura 26. Tinció amb FM4-64 de plàntules PIN7::PIN7-GFP eliminant l'activitat CK2 i tractades amb NAA.

Tinció durant 15 minuts amb FM4-64 de plàntules PIN7::PIN7-GFP, (a) de plantes control; (b) plantes tractades amb TBB 10 μ M durant 16 hores; (c) plantes tractades amb NAA 1 μ M durant 16 hores, (d) plantes amb el tractament simultani de TBB i de NAA. En vermell s'observa la tinció amb FM4-64, en verd la tinció amb PIN7::PIN7-GFP i en groc la colocalització (merge). En fletxes es senyalen els diferents tipus de vesícules.

Abreviatures:

Ce, cèl·lules de l'estela i **cc**, cèl·lules de la columna.

Abreviatures: **NT**, no tractada; **NAA**, àcid nàftalen acètic; **TBB**, 4,5,6,7-tetrabromo benzotriazol.

Estudi de la inhibició del reciclatge constituïu

La *brefeldin A* (BFA) inhibeix a les ARF-GEF i, en concret, a la proteïna GNOM, el membre de la família GBF de les ARF-GEF que està més ben caracteritzat. Aquesta inhibició afecta a la polarització de les proteïnes PIN a la part basal de la cèl·lules i indueix la formació d'endosomes anomenats compartiments de BFA (Geldner *et al.*, 2001). A l'article de (Kleine-Vehn *et al.*, 2010) descriuen que PIN3 i PIN7 funcionen de manera redundat en la redistribució d'auxina durant la resposta gravitròpica. Ambdues proteïnes s'expressen a les cèl·lules de la columel·la i tenen una distribució apolar a la membrana d'aquestes cèl·lules (Feraru and Friml, 2008; Kleine-Vehn *et al.*, 2010). Els mateixos autors han publicat que tractaments amb BFA només produeixen la internalització de PIN3 després d'un estímul gravitròpic (Kleine-Vehn *et al.*, 2010).

El transportador PIN7 s'expressa a les cèl·lules de la columel·la de manera apolar (com PIN3) i a la membrana basal de les cèl·lules de l'estela (com PIN1). Inicialment, per a analitzar la sensibilitat a BFA del reciclatge de PIN7, ens vam focalitzar en l'estudi de les cèl·lules de la columel·la. Es van fer créixer plantes PIN7::PIN7-GFP durant 5 dies i es va dur a terme el tractament amb BFA 50 μ M durant 1 hora. Tal i com es mostra a la figura 27a, el transportador PIN7 roman a la membrana plasmàtica després del tractament amb BFA i no s'observa la formació de cap tipus vesicular.

Posteriorment, es va analitzar l'efecte conjunt del tractament amb BFA i la inhibició de l'activitat CK2 amb TBB, en tots els casos es va utilitzar la tinció amb FM4-64 per al marcatge de les internalitzacions. Aquest colorant ens va permetre visualitzar que el tractament amb BFA produeix la formació d'endosomes a les cèl·lules de l'epidermis, a les cèl·lules del córtex i a les cèl·lules de l'estela. A més, a les cèl·lules de l'estela, es va observar colocalització entre les vesícules tenyides amb FM4-64 i les vesícules que contenen PIN7. Per contra, a les cèl·lules de la columel·la no es va observar la formació de vesícules de PIN7 produïdes pel tractament amb BFA (Figura 27b, BFA 1h).

La tinció amb FM4-64 del tractament simultani de TBB i BFA, ens va permetre detectar internalitzacions a les cèl·lules de l'epidermis, del córtex, de l'estela i de la columel·la. A més, va observar que en el tractament simultani de TBB i BFA, es detecten un major número d'internalitzacions a les cèl·lules de l'epidermis comparat amb els tractaments per separat amb cadascún dels fàrmacs. Pel que fa als endosomes de PIN7 es va observar la seva formació tant a les cèl·lules de l'estela com a les cèl·lules de la columel·la i, tal i com s'havia observat anteriorment amb el tractament amb TBB no colocalitzen amb les vesícules tenyides amb FM4-64 (Figura 27B TBB+BFA 1h).

Aquestes internalitzacions que contenen PIN7 i que no colocalitzen amb la tinció amb FM4-64 són similars als endosomes tipus SNX1 que es descriuen a l'article de (Jaillais *et al.*, 2007) ja que a més de no tenyir-se amb FM4-64, aquests endosomes que es formen a les cèl·lules de l'estela són morfològicament més grans. Els endosomes SNX1 s'obtenen pel tractament amb *wortmannin* i són un compartiment diferent a les vesícules de BFA (Jaillais *et al.*, 2006). Com s'ha comentat a la introducció d'aquest mateix capítol, SNX1 i VPS29 formen part del complex del retròmer (composat per un dímer de proteïnes SNX i un trímer de VPS), que s'encarrega de portar un balanç de les proteïnes PIN que es dirigeixen al vacúol i les que retornen cap a la membrana plasmàtica (Bonifacino and Hurley, 2008; Collins, 2008; Seaman, 2005). En plantes mutants per la Ser/Thr fosfatasa VPS29, els autors van observar que hi ha la formació d'endosomes que contenen tant PIN1 com PIN2. Aquests els anomenen endosomes tipus SNX1 aberrants, ja que són morfològicament més grans i no colocalitzen amb la tinció amb FM4-64 (Jaillais *et al.*, 2007).

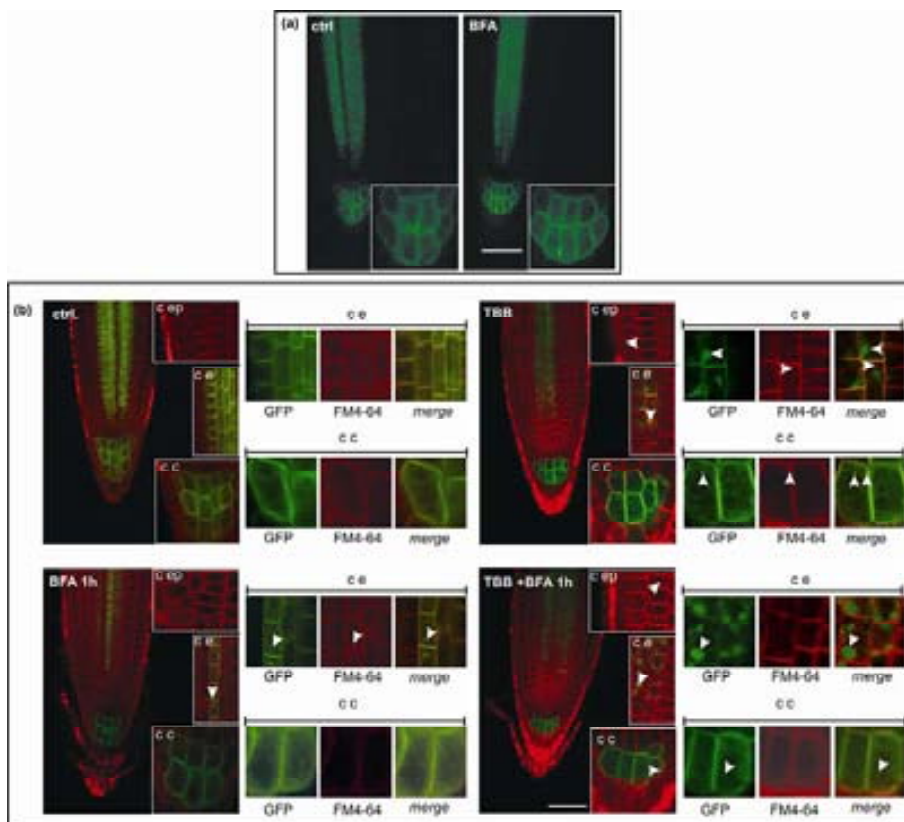


Figura 27. Efecte del tractament amb BFA en plàntules sense activitat CK2.

(a) Plàntules PIN7::PIN7-GFP tractades amb BFA 50 μ M durant 1 hora. (b) Plàntules PIN7::PIN7-GFP tenyides amb FM4-64, no tractades, tractades amb TBB 10 μ M durant 16 hores. (c) Plàntules tractades amb BFA 50 μ M durant 1 hora. (d) Plàntules tractades amb TBB 10 μ M i BFA 50 μ M durant 16 hores i 1 hora, respectivament. En verd es mostra la senyal de PIN7::PIN7-GFP, en vermell la tinció amb FM4-64 i en groc la colocalització (*merge*). La barra de calibració correspon a 50 μ m.

Abreviatures:

c ep, cèl·lules de l'epidermis; **c e**, cèl·lules de l'estela; **c c**, cèl·lules de la columella; **ctrl**, control (no tractades); **TBB**, tetrabromobenzotriazol; **BFA**, *brefeldin A*.

Inhibició de l'entrada al vacúol: tractament amb *wortmannin*.

El fàrmac *wortmannin* (WM) és un inhibidor específic de la PI3K (fosfatidilinositol-3 quinasa) tot i que a concentracions més elevades també es capaç d'inhibir la PI4K (fosfatidilinositol-4 quinasa) (Emans *et al.*, 2002). Tractaments curts amb aquest inhibidor donen lloc a la formació d'endosomes de PIN2 a les cèl·lules de l'epidermis, mentre que tractaments llargs inhibeixen la localització apical de PIN2 (Jaillais *et al.*, 2006; Kleine-Vehn *et al.*, 2008). Aquests endosomes es van definir com a *sorting nexin endosomes* ja que contenen la proteïna SNX1, i no colocalitzen amb els compartiments de BFA (Jaillais *et al.*, 2006; Jaillais *et al.*, 2007; Jaillais *et al.*, 2008). La construcció PIN1::PIN1-GFP, que s'expressa a les cèl·lules de l'estela amb localització basal, presenta insensibilitat al tractament amb aquest inhibidor (ja que el tractament amb WM no dona lloc a la formació d'endosomes que continguin PIN1) (Jaillais *et al.*, 2006), indicant així que aquest només interfereix en el reciclatge a la membrana apical.

Per tal d'analitzar l'efecte de la *wortmannin* sobre les plantes transgèniques de PIN7::PIN7-GFP es van fer tractaments amb aquest fàrmac, utilitzant dues concentracions i dos temps d'incubació diferents; per una banda es va utilitzar *wortmannin* a 16 µM durant 16 hores i, per altra banda *wortmannin* a 33 µM durant 1 hora. Tal i com es mostra a la figura 28 (a), el transportador PIN7 es troba formant vesícules en resposta al tractament amb *wortmannin*, però, només a les cèl·lules de la columel·la. En aquestes cèl·lules s'observa que el tractament amb *wortmannin* produeix un efecte dosi-resposta, ja que, a temps curts hi ha la formació d'endosomes, mentre que a temps llargs PIN7 es disposa al voltant del vacúol. En el cas de les cèl·lules de l'estela no s'observa resposta a aquest tractament, tal i com succeeix amb la proteïna PIN1.

Posteriorment es va analitzar la resposta de les plantes PIN7::PIN7-GFP al tractament simultani de *wortmannin* i NAA, per tal de poder comparar els

resultats obtinguts pel tractament amb NAA de plàntules sense activitat CK2. Es van escollir les condicions de temps curt, 1 hora a 16 μ M, ja que aquestes ens permeten veure endosomes i una concentració de NAA a 10 μ M. Amb aquest tractament simultani s'observa que es produeix un increment de fluorescència a la membrana plasmàtica, però, no s'observa la inhibició de la formació d'endosomes (Figura 28b).

Per tal de comprovar si els endosomes obtinguts pel tractament amb *wortmannin*, presenten les mateixes característiques que els que s'obtenen en plantes sense activitat CK2, es van utilitzar les mateixes condicions experimentals però, a més, es van tenyir les plàntules amb FM4-64 abans de visualitzar-les al microscopi. Tal i com s'observa a la figura 28c, els endosomes formats per la falta d'activitat CK2 no colocalitzen amb els tenyits amb FM4-64, mentre que, els endosomes que es formen per la inhibició amb *wortmannin* sí que colocalitzen amb el colorant fluorescent. Aquests resultats indiquen que es tracta de dos tipus diferents d'endosomes.

Per últim, tenint en compte que la inhibició de l'activitat CK2 canvia el patró de distribució de l'auxina, tant als cotiledons com al meristem radicular, es va analitzar la distribució d'auxina en plantes transgèniques DR5*rev::GFP* tractades amb *wortmannin* (figura 28d). Amb aquest tractament es pot veure que la distribució de l'auxina a l'arrel està afectada, tot i que, amb un patró diferent a l'obtingut en les plantes CK2mut, ja que, s'observa que hi ha un augment de la fluorescència a l'àpex de l'arrel mentre que en les plantes CK2mut la fluorescència en aquesta regió disminueix. Pel que fa als cotiledons, no s'observen diferències ni en la quantitat ni en la distribució de fluorescència de les plantes tractades i les no tractades.

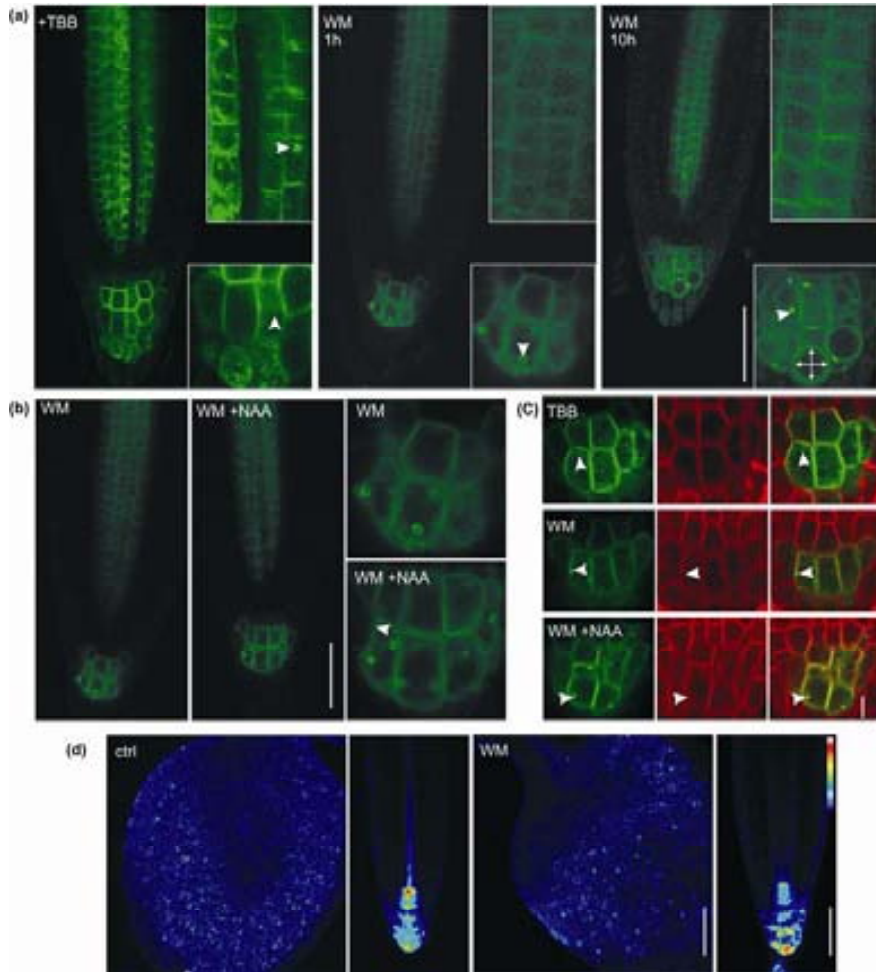


Figura 28. Efecte del tractament amb *wortmannin* en plàntules PIN7::PIN7-GFP i plàntules DR5::GFP.

(a) Cinètica de l'efecte del tractament amb *wortmannin* en plàntules PIN7::PIN7-GFP. (b) Tractament simultani de *wortmannin* 33 μ M i NAA 10 μ M. (c) Tinció de 15 minuts amb FM4-64 de plàntules de cinc dies tractades amb TBB 10 μ M 16h, *wortmannin* 33 μ M durant 1h i el tractament simultani de *wortmannin* 33 μ M i NAA 10 μ M durant 1 hora. Es mostren imatges de GFP, la tinció amb FM4-64 i la superposició. (d) Tractament amb *wortmannin* 16 μ M durant 16 hores en plantes DR5::GFP. Les imatges es mostren en escala pseudocolor per tal de poder observar les diferents intensitats de fluorescència. Cadascuna de les imatges és una suma de 20 talls en z de 1 μ m.

Efecte de la inhibició de la síntesi de proteïnes *de novo* amb cicloheximida en la formació de vesícules

Per tal d'investigar els mecanismes cel·lulars que donen la formació de vesícules com a producte de la inhibició de l'activitat CK2, es va examinar si es requeria la síntesi de proteïnes *de novo*, mitjançant tractaments amb cicloheximida, un inhibidor de la síntesi de proteïnes. Aquest tractament és molt agressiu i només es pot utilitzar a temps curts sense comprometre la viabilitat de la planta. A més, aquest tipus d'experiment no es pot realitzar amb plantes de la línia CK2mut, ja que es necessita que hi hagi síntesi de proteïnes per a obtenir l'efecte dominant negatiu. Per aquest motiu, es van posar a punt les condicions del tractament amb TBB que donen lloc a la formació d'endosomes en un temps d'entre 2-4 hores; aquest és el temps màxim publicat per tractaments amb cicloheximida en plantes. A la figura 29, es mostra l'experiment dosi-resposta, amb tractaments de TBB 10, 25 i 50 μM durant un temps de 2 hores. S'observa que 50 μM és una concentració massa alta ja que es perd fluorescència a les cèl·lules de l'estela. En canvi, entre 10 μM i 25 μM la senyal de fluorescència no baixa i s'observa la formació de vesícules. Cal remarcar que aquests experiments es van realitzar utilitzant medi líquid, la qual cosa fa que el tractament amb els inhibidors sigui més ràpid que no pas utilitzant plaques d'agar.

Una vegada posada a punt la concentració de TBB, es van poder realitzar els experiments amb l'inhibidor de la síntesi de proteïnes. Es va realitzar un tractament simultani de cicloheximida 50 μM i TBB 20 μM . Com a control d'aquest experiment es van emprar plàntules PIN1::PIN1-GFP tractades amb BFA i cicloheximida (CHX), ja que en aquest cas la formació de cossos o vesícules de BFA no depèn de la síntesi de proteïnes *de novo* (Geldner *et al.*, 2001). Tanmateix, es van tractar plantes PIN1::PIN1-GFP amb TBB i s'observà que el transportador PIN1 també forma endosomes quan s'elimina l'activitat CK2. El tractament simultani de TBB i cicloheximida va permetre determinar que les vesícules dels transportadors PIN1 i PIN7 formades pel tractament amb TBB no depenen de la síntesi de proteïnes *de novo*. Així mateix, la inhibició de l'activitat CK2 no altera la degradació de les proteïnes

PIN1 i PIN7, ja que s'observa una baixada de la fluorescència a la membrana plasmàtica en les plantes tractades amb cicloheximida (Figura 30). Per altra banda, la formació de vesícules en plantes de PIN1::PIN1-GFP permet deduir que l'eliminació de l'activitat CK2 afecta tant als transportadors que tenen una localització cel·lular no polar com als que tenen una polaritat basal.

Per tal de determinar més exhaustivament si la inhibició de la CK2 comprometia el destí al vacúol i, en conseqüència, la degradació de les proteïnes PIN, es van fer induccions a temps llarg de les plantes CK2mutxPIN7::PIN7-GFP. En aquest experiment també es pot observar la desaparició de la fluorescència de PIN7 de la membrana plasmàtica i, aquesta desaparició augmenta amb el temps d'incubació; a més les cèl·lules primerament afectades són les de la columel·la (Figura 30)

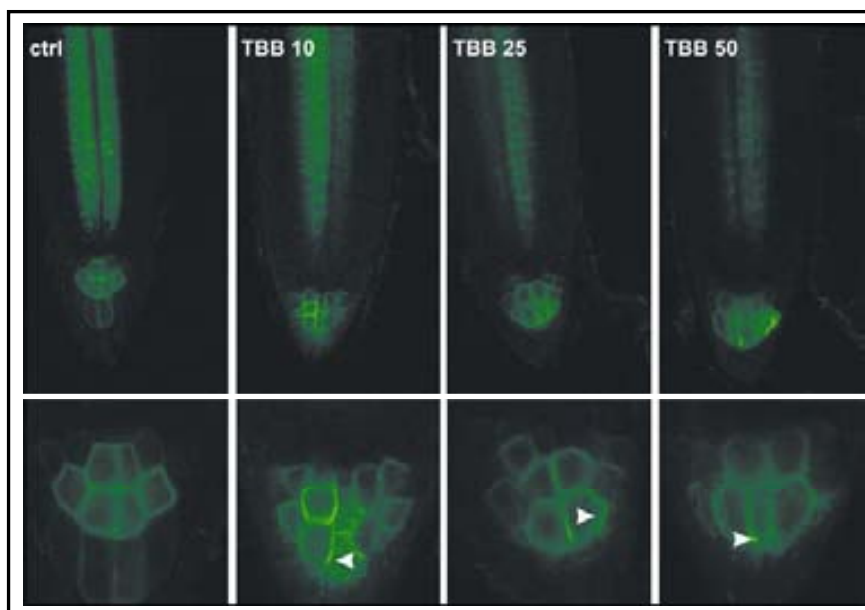


Figura 29. Efecte dosi-resposta dels tractaments amb TBB en plàntules PIN7::PIN7-GFP.
Plàntules de 5 dies PIN7::PIN7-GFP tractades amb TBB a 10, 25 i 50 μ M durant 2 hores en medi líquid.

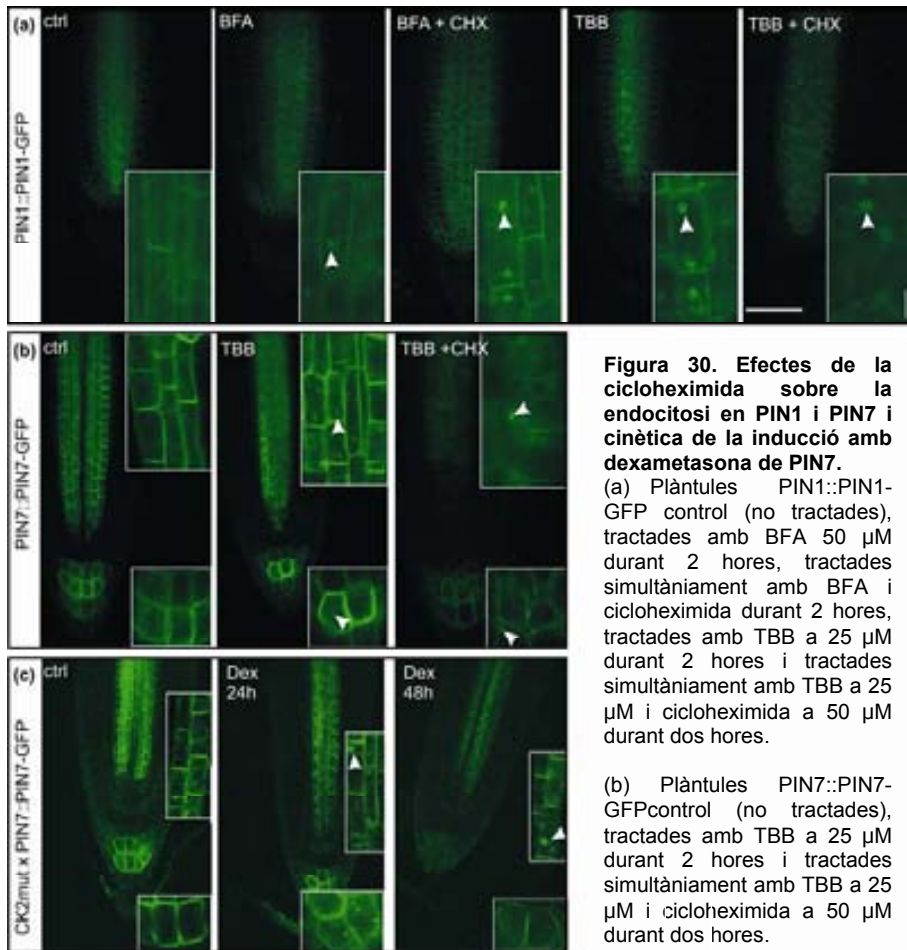


Figura 30. Efectes de la cicloheximida sobre la endocitosi en PIN1 i PIN7 i cinètica de la inducció amb dexametasona de PIN7.

(a) Plàntules PIN1::PIN1-GFP control (no tractades), tractades amb BFA 50 μ M durant 2 hores, tractades simultàniament amb BFA i cicloheximida durant 2 hores, tractades amb TBB a 25 μ M durant 2 hores i tractades simultàniament amb TBB a 25 μ M i cicloheximida a 50 μ M durant dos hores.

(b) Plàntules PIN7::PIN7-GFP control (no tractades), tractades amb TBB a 25 μ M durant 2 hores i tractades simultàniament amb TBB a 25 μ M i cicloheximida a 50 μ M durant dos hores.

(c) Plàntules CK2mutxPIN7::PIN7-GFP, control (no tractada), tractament amb Dex durant 24 hores i tractament amb Dex durant 48 hores.

Abreviatures: **ctrl**, control (no tractada); **BFA**, *brefeldin A*; **CHX**, cicloheximida; **TBB**, 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazol; **Dex**, dexametasona.

Discussió

L'establiment i el manteniment de la polaritat cel·lular tenen un rol clau en la senyalització direccional i la comunicació intercel·lular. Gràcies a la diferent localització polar dels transportadors d'auxina, aquesta hormona pot tenir una distribució asimètrica. Tractaments de plàntules amb inhibidors del transport d'auxina, així com tractaments amb auxina exògena afecten a la distribució d'aquesta hormona a l'arrel i en conseqüència al desenvolupament del meristem radicular. Havent observat els defectes en el desenvolupament de l'arrel de les plantes CK2mut, el següent pas va ser l'estudi del meristem radicular, utilitzant la tinció amb lugol dels amiloplasts. Aquesta tinció ha permès detectar una clara afectació en les plantes CK2mut, ja que es va observar una disminució del número de cèl·lules diferenciades i a més una desorganització dels grànuls de midó {{147 Marques-Bueno,M.M. 2011; }}.

Anteriorment, s'ha descrit que la manca d'activitat CK2 produeix la formació d'endosomes que contenen PIN7-GFP, tant a les cèl·lules de l'estela com a les cèl·lules de la columel·la de l'arrel d'Arabidopsis {{2 Marques-Bueno,M.M. 2011; }}. Per tal de determinar l'afectació del tràfic vesicular a tots els tipus cel·lulars de l'arrel es va fer la tinció amb el colorant FM4-64, que va revelar que el tràfic vesicular de l'arrel en general es veia clarament afectat en les plantes CK2mut, ja que s'observava la formació de vesícules a tots els tipus cel·lulars i sobretot a les cèl·lules de l'epidermis.

Per tal de determinar a quina de les vies del tràfic vesicular actua la proteïna quinasa CK2, es van fer experiments inhibint diferents punts d'aquest procés. Es va començar per l'anàlisi d'un dels primers passos, que és la invaginació de la membrana plasmàtica necessària per a la formació de les vesícules. Mitjançant l'ús de l'inhibidor de càrrega de proteïnes de membrana, *tyrphostin* A23 {{318 Aniento,F. 2005;70 Dhonukshe,P. 2007; }} es va observar la inhibició de la formació de les vesícules de PIN7-GFP en plàntules sense activitat CK2. Per tant, les internalitzacions obtingudes requereixen l'embolcall de clatrina per a formar-se. Aquests resultats indiquen que la

inhibició de l'activitat CK2 interfeix en algun punt de la via d'endocitosi *downstream* del procés d'invaginació.

Seguidament, es va comprovar si el tractament amb NAA exogen era capaç d'inhibir la formació de vesícules, ja que, s'ha publicat que el tractament amb NAA inhibeix la formació de vesícules de clatrina i augmenta la quantitat de proteïnes PIN a la membrana plasmàtica. Aquesta inhibició es dona via ABP1, que actua com a receptor d'auxina, i impedeix que la clatrina es situï a la membrana plasmàtica (Robert *et al.*, 2010). Tot i que el tractament amb NAA va permetre rescatar la formació d'arrels laterals al nostre mutant {{2 Marques-Bueno, M.M. 2011; }}, vam poder observar que la formació de vesícules endosomals no es veia inhibida, encara que els endosomes sembla que canvien de morfologia. També es va observar un augment de fluorescència a la membrana plasmàtica, que podria ser conseqüència de la síntesi *de novo* de PIN7, que es regulada transcripcionalment per les auxines. Aquest fet podria explicar la recuperació de la formació d'arrels laterals de les plantes CK2mut, recuperant el flux normal d'auxina. Tot i així, també cal tenir en compte que, el fet que no es reverteixi la formació de vesícules també podria ser degut a que l'absència d'activitat CK2 d'alguna manera desregulés ABP1, donant a lloc a un augment de la formació de vesícules que no es reverteix pel tractament amb NAA, tal i com es dona en el mutant *abp1-5* (Robert *et al.*, 2010). Contràriament, als tractaments de plantes salvatges amb BFA i NAA, dona a lloc a una reversió del fenotip de vesícules, degut a que ABP1 no està afectada (Paciorek *et al.*, 2005; Robert *et al.*, 2010).

Per tal d'estudiar l'afectació del reciclatge constitutiu del transportador PIN7, es van fer tractaments amb *brefelidina A* (BFA). Tal i com s'ha comentat anteriorment, aquest fàrmac inhibeix a GNOM, proteïna que regula el reciclatge a la part basal de la membrana plasmàtica de les proteïnes PIN (Geldner *et al.*, 2003; Richter *et al.*, 2007). El tractament amb aquest inhibidor va permetre determinar que la proteïna PIN7 presenta dos comportaments diferents en funció del tipus cel·lular. A les cèl·lules de la columel·la, tal i com succeeix amb el transportador PIN3 (Kleine-Vehn *et al.*, 2010), no es formen endosomes de BFA, mentre que, a les cèl·lules de l'estela, si que es produeix

la formació d'aquests endosomes de BFA, de la mateixa manera que la proteïna PIN1 (Geldner *et al.*, 2003). Per altra banda, els endosomes obtinguts com a resposta a aquest tractament es tenyeixen amb el colorant de lípids FM4-64 (Geldner *et al.*, 2003), mentre que les internalitzacions obtingudes per la inhibició de l'activitat CK2 no es tenyeixen amb aquest colorant; aquest fet ens indica que es tracta d'endosomes d'identitats diferents.

Tractaments amb *wortmannin*, l'inhibidor de la PI3K, impedeix l'entrada al vacúol formant endosomes tardans o PVC (també anomenats endosomes SNX1 tot i que actualment s'ha descrit que els endosomes SNX1 són un híbrid entre TGN/EE i PVC (Emans *et al.*, 2002; Jaillais *et al.*, 2006; Jaillais *et al.*, 2007; Jaillais *et al.*, 2008; Robinson *et al.*, 2012)), Aquest tractament s'utilitza per estudiar la via del retròmer i el transport en direcció al vacúol. Curiosament, el comportament de la proteïna PIN7 en resposta a l'inhibidor *wortmannin* és invers a l'obtingut amb BFA. El tractament amb *wortmannin* de plantes salvatges no causa la formació d'endosomes de PIN7 a les cèl·lules de l'estela, tal i com es dona amb la proteïna PIN1 (Jaillais *et al.*, 2006; Jaillais *et al.*, 2007)(Jaillais *et al.*, 2007), mentre que, si que es formen aquests endosomes a les cèl·lules de la columel·la. A més, es va detectar un efecte dosi-resposta, ja que, en augmentar el temps i la concentració de *wortmannin*, el transportador canvia de localització subcel·lular; des dels endosomes es desplaça fins a situar-se al voltant del vacúol. Aquestes vesícules de PIN7, obtingudes com a resposta al tractament amb *wortmannin*, colocalitzen amb vesícules tenyides amb FM4-64; fet que va ajudar a descartar que fossin el mateix tipus d'endosomes que els obtinguts per l'eliminació de l'activitat CK2, ja que aquests últims no es tenyeixen amb aquest colorant. Per últim, el tractament amb *wortmannin* de plàntules transgèniques DR5*rev::GFP*, va resultar amb un patró de distribució de fluorescència totalment diferent al de les plàntules CK2mut, fet que va corroborar que el tractament amb *wortmannin* i la inhibició de l'activitat CK2 tenen efectes diferents.

Per tant, els tractaments de les plantes *proPIN7::PIN7-GFP* amb els fàrmacs inhibidors BFA i *wortmannin* van permetre determinar que la resposta a

aquestes drogues, per part del transportador d'auxina PIN7, és diferent en funció de que la seva localització subcel·lular sigui apolar o polar. El fet que les plantes sense activitat CK2 continguin endosomes tant a les cèl·lules de l'estela com a les de la columel·la, permet deduir que la CK2 intervé en algun punt de la via de tràfic vesicular que és independent de la localització polar d'aquests transportadors i, per tant, comú per a totes les proteïnes que circulen per aquesta via.

La manca de tinció amb FM4-64 dels endosomes de PIN7 obtinguts per la inhibició de la CK2 recorda al comportament dels endosomes de PIN1 originats quan s'atura la via del retròmer. Concretament, mitjançant el mutant d'una proteïna del retròmer, la Ser/Thr fosfatasa VPS29, es va demostrar la formació d'uns endosomes engrandits i aberrants que contenen la proteïna SNX1 (un altre membre del retròmer) i que no es tenyeixen amb FM4-64 (Jaillais *et al.*, 2007). A més, l'estudi fenotípic d'aquest mutant és molt similar al de les plantes CK2mut que, a grans trets, es caracteritza per no formar arrels laterals, per tenir una arrel principal més curta i per la resposta gravitropica alterada. Tanmateix, l'anàlisi del creuament *vps29xDR5rev::GFP*, va mostrar un increment de la fluorescència als cotiledons i un patró de fluorescència de l'arrel alterat com en les plantes CK2mut (Jaillais *et al.*, 2007; Marques-Bueno *et al.*, 2011). Així doncs, aquests resultats ens porten a pensar que la CK2 podria estar actuant com a regulador d'algun punt de la via del retròmer, ja que, la inhibició de l'activitat CK2 dóna trets fenotípics i moleculars similars als que s'obtenen en un mutant d'aquesta via.

En cèl·lules de mamífer s'ha identificat que la proteïna quinasa CK2 té un paper clau en el tràfic d'endosomes cap a la xarxa *trans*Golgi i en el endosomes de reciclatge (Ghosh and Kornfeld, 2004; Lukashova *et al.*, 2011; Scott *et al.*, 2006; Stöckli *et al.*, 2004). Així doncs podria ser que alguna d'aquestes funcions estigués conservada en les cèl·lules vegetals.

Actualment s'està treballant per confirmar si els endosomes de PIN7 que es formen per l'eliminació de l'activitat CK2 colocalitzen amb endosomes SNX1 i amb la proteïna VPS29. Per una banda, s'està estudiant si l'eliminació de

l'activitat CK2 provoca algun canvi en els endosomes SNX1. Per fer-ho s'estan fent tractaments amb TBB de les plantes transgèniques (Jaillais *et al.*, 2006; Jaillais *et al.*, 2007; Jaillais *et al.*, 2008) SNX1::SNX1-GFP i VPS29::VPS29-GFP {{69 Jaillais,Y. 2006; 128 Jaillais,Y. 2007; 329 Jaillais,Y. 2008}}. Per altra banda, s'hauria d'esbrinar si els endosomes que es formen per l'eliminació de l'activitat CK2 colocalitzen amb els endosomes que contenen SNX1. Per comprovar-ho s'estan elaborant creuaments de plantes PIN7::PIN7-GFP i PIN1::PIN1-GFP amb plantes SNX1::SNX1-*cherry* i VPS29::VPS29-mRFP. Si en la superposició d'imatges obtinguéssim endosomes amb senyal de color groc, podríem afirmar que la proteïna quinasa CK2 ens estaria afectant a aquests endosomes.

Per últim, el tractament amb cicloheximida de plantes tractades amb TBB va permetre comprovar que no era necessària la síntesi de proteïnes *de novo* per formar les vesícules dels transportadors PIN7. També es va poder determinar que en plàntules *proPIN1*::PIN1-GFP hi havia la formació de vesícules d'aquest transportador després del tractament amb TBB i que aquestes no depenien de la síntesi de proteïnes *de novo*. Alhora, es va observar que la fluorescència d'aquests transportadors a la membrana plasmàtica disminueix amb el doble tractament TBB i CHX, fet que ens indica que la degradació al vacúol de les proteïnes PIN no està compromesa. Aquest resultat s'observa, en plàntules CK2mut tractades a temps llargs amb dexametasona. Així doncs, es torna a corroborar que la degradació d'aquests transportadors no està afectada, però, que està compromès el retorn cap a la membrana plasmàtica.

Malgrat que les vesícules de PIN7 obtingudes en les plantes sense activitat CK2 no es tenyeixen amb FM4-64, aquesta tinció va revelar que aquestes plantes mutants, presenten un major nombre de vesícules que les plantes que mantenen intacte l'activitat CK2. Segurament, aquest fet es deu a l'actuació de la CK2 en diversos estadis de la via del tràfic vesicular que, a banda de les proteïnes PIN, afecta a altres proteïnes de membrana, originant, així, vesícules amb identitats diferents.

Discussió general

L'estudi del fenotip del mutant dominant negatiu de la proteïna quinasa CK2 posa en evidència la relació entre la CK2 i la via de senyalització de les auxines.

La proteïna quinasa CK2 és una proteïna vital pel desenvolupament dels eucariotes (Moreno-Romero *et al.*, 2008; Padmanabha *et al.*, 1990); per aquest motiu, es va construir un mutant dominant negatiu sota el control d'un sistema d'expressió induïble. Les plantes transgèniques d'*Arabidopsis thaliana* obtingudes (CK2mut) van permetre eliminar l'activitat CK2 durant un temps concret del desenvolupament de la planta i, així, van facilitar l'estudi de la implicació a nivell fenotípic d'aquesta proteïna i, també, dels processos de senyalització necessaris per al desenvolupament de les plantes, en els quals la CK2 hi podria jugar un paper regulador (Moreno-Romero *et al.*, 2008).

Induccions de 24 o 48 hores de plàntules CK2mut van permetre detectar que l'eliminació de l'activitat CK2 produeix canvis espectaculars en el desenvolupament de l'arrel. Aquestes plàntules mostraven una arrel principal més curta, absència d'arrels laterals, formació de pèls radiculars a tots els tipus cel·lulars, i fenotip *wavy*. Tots aquests trets fenotípics són característics de mutants d'auxines (en anglès, *auxin related phenotypes*). Per aquest motiu, es van fer experiments directament relacionats amb la resposta a aquesta fitohormona. Es va trobar que la resposta als tropismes (fototropisme i gravitropisme) es trobava alterada en les plantes sense activitat CK2. Per una banda, aquestes plàntules no responien al fototropisme i, per altra banda, responen més ràpidament a estímuls de gravitropisme. Així doncs, gràcies a l'anàlisi fenotípic del mutant es va posar en evidència que la proteïna quinasa CK2 tenia algun paper regulador de la via de senyalització de l'auxina.

Les plantes CK2mut, però, tenen la capacitat de respondre a l'auxina, ja que, l'aplicació de l'hormona de manera exògena és capaç d'activar la formació d'arrels laterals, donar la inhibició del creixement de l'arrel principal i el creixement de pèls radiculars, entre d'altres. Aquests tractaments, doncs, van permetre descartar que aquest mutant tingués problemes de percepció de l'hormona. Per altra banda, es va poder determinar que les plantes CK2mut eren més sensibles als inhibidors del transport d'auxina NPA i TIBA, com a mínim, en resposta a estímuls de gravitropisme.

CK2, cicle cel·lular i auxines

L'acumulació d'auxina a les cèl·lules del pericicle de l'arrel és la responsable de la formació de les arrels laterals (Celenza *et al.*, 1995; Himanen *et al.*, 2002; Laskowski *et al.*, 1995) i, aquest procés està estretament lligat amb la divisió cel·lular. En estudis previs a aquesta tesi, s'ha demostrat que la proteïna quinasa CK2 té un rol en l'activació del cicle cel·lular (Espunya *et al.*, 1999). Més concretament, la sobreexpressió de la subunitat α inactiva de la CK2, en cèl·lules de tabac i en plantes d'*Arabidopsis*, produeix una parada del cicle cel·lular a G1/S i/o G2. A més, el creuament sexual de les plantes CK2mut i les plantes CYCB1;1-GFP – un marcador de la mitosi que permet seguir el cicle cel·lular- va permetre observar una disminució del nombre de cèl·lules en divisió al meristem radicular (Moreno-Romero and Martinez, 2008; Moreno-Romero *et al.*, 2008).

En aquesta tesi, mitjançant les plantes doble transgèniques CK2mutxCYCB1;1-GFP, s'ha vist que la inhibició de la formació d'arrels laterals es dona en els primers estadis del desenvolupament d'aquestes arrels. Per altra banda, els tractaments amb IAA d'arrels tallades (en concret de la part central de l'arrel, que correspon a la zona de diferenciació) van ser capaços de reactivar transcripcionalment diversos gens essencials en la maquinària del cicle cel·lular. Així doncs, l'absència d'activitat CK2 podria estar afectant a les cèl·lules del pericicle.

L'estudi del transcriptoma de les plantes CK2mut va delatar l'afectació del transport d'auxina

La proteïna quinasa CK2 té múltiples substrats, entre aquests, diversos factors de transcripció; així doncs, era d'esperar que la manca d'activitat CK2 provoqués canvis en l'expressió d'un gran nombre de gens.

Mitjançant experiments de *microarray* es van analitzar els canvis d'expressió que produeix l'eliminació de l'activitat CK2. Aquests experiments van permetre detectar canvis en l'expressió d'un 28,5% dels gens presents al *microarray*; d'aquests, un 51,7% estaven sobreexpressats i un 48,3% reprimits. Per tal de dur a terme l'anàlisi es van agrupar aquests gens segons el procés biològic, en categories del *gene ontology* (GO). A partir d'aquesta classificació es van detectar gens relacionats amb auxines que es van classificar en tres grups: (1) gens de resposta a l'auxina; (2) gens implicats en el metabolisme de l'auxina; i (3) gens implicats en el transport de l'auxina. El grup amb canvis més significatius va ser el format pels transportadors d'auxina. Concretament, es va detectar la sobreexpressió de PIN2, PIN3, PIN4 i PIN7, així com, de la quinasa PID, proteïna que regula per fosforilació la localització apical d'aquests transportadors. La sobreexpressió d'aquests gens va ser confirmada per PCR quantitativa, corroborant els resultats anteriors. En les determinacions per PCR quantitativa, es va comprovar que hi havia l'afectació de l'expressió de tots els membres de la subfamília de les proteïnes PIN tipus 1. Experiments de *western blot* amb anticossos específics contra cadascuna d'aquestes proteïnes van permetre determinar que l'acumulació d'aquestes proteïnes seguien el mateix sentit que els nivells d'expressió del mRNA.

Els mutants de les proteïnes transportadores PIN, així com, de la Ser/Thr quinasa PID, tenen afectat el transport d'auxina i, a més, tenen alguns trets fenotípics similars als de les plantes CK2mut, com per exemple, una

disminució de la formació d'arrels laterals, la inhibició del creixement de l'arrel principal i la resposta al gravitropisme afectada (Benjamins *et al.*, 2001; Friml *et al.*, 2002; Gälweiler *et al.*, 1998; Muller *et al.*, 1998; Okada *et al.*, 1991).

La proteïna quinasa CK2 i el transport d'auxina

La quantificació de l'auxina lliure en planta va descartar que les plantes sense activitat CK2 tinguessin algun tipus d'afectació en la síntesi d'aquesta hormona i, per tant, que els trets fenotípics observats fossin deguts a la manca d'auxina. Com ja s'ha comentat anteriorment, aquestes plantes responen a la presència d'auxina exògena, per tant, els fenotips observats no són tampoc conseqüència del procés de detecció intracel·lular d'aquesta hormona.

Els experiments d'anàlisi d'expressió van portar a pensar que podia existir algun tipus d'afectació en el transport d'auxina i en la distribució en gradient d'aquesta hormona en diferents òrgans de la planta. Per mitjà de la planta doble transgènica CK2mutxDR5rev::GFP es va determinar que el patró de distribució de l'auxina estava alterat. Per una banda, les plantes sense activitat CK2 mostraven més fluorescència als cotiledons i, per tant, una major acumulació de l'hormona en aquest òrgan. Per altra banda, a l'arrel s'observava un desplaçament del màxim d'auxina i una disminució d'auxina a les cèl·lules més basals de l'àpex radicular (columel·la). A més, els experiments per mesurar el transport d'auxina, per mitjà de [H^3]-IAA, van determinar que aquest estava clarament inhibit.

Un cop observada l'afectació del transport d'auxina es va analitzar si hi havia alteracions en el patró de localització subcel·lular dels transportadors d'aquesta hormona. Per tal de dur a terme aquest anàlisi, es van utilitzar plantes transgèniques d'aquestes proteïnes fusionades a un gen *reporter*. Es va escollir PIN4, PIN7 i PID ja que eren els gens que havien donat canvis més significatius tant a les PCR quantitatives com als *western-blot*. Amb l'ús de les plantes PIN4::PIN4-GFP i PIN7::PIN7-GFP creuades fins a

l'homozigosi amb plantes CK2mut, es va poder detectar una disminució de la fluorescència a la membrana plasmàtica i, l'aparició de vesícules endosomals d'aquestes dues proteïnes. Pel que fa a la quinasa PID, es van utilitzar plantes PID::PID-GUS i es va poder determinar que el patró de distribució d'aquesta proteïna estava invertit en comparació amb una planta salvatge. En una planta salvatge s'observa expressió de PID (en forma de precipitat de color blau) a les cèl·lules de la zona apical de l'arrel. En canvi, en plàntules CK2mut l'expressió de GUS està desplaçada a la part més basal. Amb la transgènica de PID fusionada la l'enzim GUS no es van poder determinar estructures intracel·lulars. Segurament, per mitjà de plantes PID::PID-YFP (Dhonukshe *et al.*, 2010) (que en el moment que es van fer aquests experiments encara no estaven publicades) s'hauria pogut determinar algun tipus d'alteració a nivell intracel·lular.

Implicació de la CK2 en el tràfic de vesícules

L'observació de que l'eliminació de l'activitat CK2 produeix la internalització massiva de les proteïnes PIN4 i PIN7, ens va permetre plantejar que aquesta quinasa podria tenir un paper en la regulació de la via de tràfic de vesícules endosomals. Com s'ha comentat a la introducció del capítol 2, una de les característiques dels transportadors PIN és que tenen una localització polar a la membrana plasmàtica i, aquesta polaritat dirigeix els fluxos de l'auxina. La localització a la part basal depèn principalment de la proteïna GNOM, i la localització a la part apical depèn de l'estat de fosforilació de les proteïnes PIN donat per la quinasa PID (Benjamins *et al.*, 2001; Friml *et al.*, 2004; Geldner *et al.*, 2003; Kleine-Vehn *et al.*, 2009; Steinmann *et al.*, 1999). Per tal de determinar quin és el procés cel·lular que estava afectat i que originava les internalitzacions en les plantes sense activitat CK2, es van fer tractaments amb inhibidors que actuen en diferents punts del tràfic de vesícules. Per a aquest anàlisi ens vam centrar en l'estudi del transportador PIN7. Aquest transportador presenta una localització subcel·lular diferent en funció del tipus cel·lular: a les cèl·lules de la columel·la es distribueix apolarment, i a les cèl·lules de l'estela es localitza a la membrana basal. Els resultats van ser

especialment interessants ja que, vam veure que la resposta de PIN7 als tractaments amb inhibidors depenia de la localització polar d'aquest transportador. Els tractaments amb BFA donaven lloc a vesícules endosomals a les cèl·lules de l'estela, on PIN7 hi té una localització polar, mentre que no es va observar formació d'endosomes a les cèl·lules de la columel·la. Pel que fa als tractaments amb *wortmannin*, es va observar l'efecte contrari, una absència d'endosomes a les cèl·lules de l'estela i la formació d'endosomes a les cèl·lules de la columel·la.

Per altra banda, els endosomes que es formen per l'eliminació d'activitat CK2 s'observen tant en cèl·lules on el transportador es localitza de manera basal com en cèl·lules on la localització del transportador és apolar. Això ens permet deduir que la parada del tràfic vesicular es produeix en un punt comú de la via d'endocitosi que és independent del procés de polarització. Sorprenentment, contrari a la majoria de vesícules descrites fins ara (Bolte *et al.*, 2004) les vesícules formades per la manca d'activitat CK2 no es tenyeixen amb el colorant de lípids FM4-64. Aquest fet va portar a pensar que la manca d'activitat CK2 produïa la formació d'endosomes SNX1 aberrants en morfologia, com els que s'obtenen per la mutació de la proteïna del retròmer VPS29 (Jaillais *et al.*, 2007). Aquests endosomes tampoc es tenyeixen amb el colorant FM4-64 i, es formen de manera independent de la polarització de la proteïna, ja que, s'han pogut observar tant per a la proteïna PIN1 -de disposició basal- com per a la proteïna PIN2 -de disposició apical.

Pensar que la proteïna quinasa CK2 està present en la via de tràfic vesicular en plantes no és un fet estrany, ja que, aquesta quinasa intervé en una multitud de processos cel·lulars. A més, se sap que en animals intervé en diferents estadis de la via d'endocitosi de proteïnes. En vesícules revestides de clatrina presents al cervell de porc, s'ha detectat que la proteïna quinasa CK2 es responsable de la fosforilació de la majoria de proteïnes subjectes a fosforilació associades a aquest tipus de vesícules. Tot i així, la CK2 roman de forma inactiva fins que aquestes vesícules no perden el revestiment de clatrina (Bar-Zvi and Branton, 1986; Korolchuk and Banting, 2002). En relació

amb les vesícules revestides de clatrina, en cèl·lules de mamífer s'ha detectat l'associació del complex format per la proteïna quinasa CK2 i la proteïna del síndrome neural de *Wiskot-Aldrich* amb la maquinària de polimerització de l'actina, fenomen necessari per a l'optimització de l'endocitosi dependent de clatrina (Galovic *et al.*, 2011). Per altra banda, s'ha implicat a la proteïna quinasa CK2 en el tràfic dels endosomes cap a la xarxa *trans*-Golgi, on la fosforilació de la CK2 és essencial per a que es dugui a terme aquest transport (Han *et al.*, 2008).

Així doncs, amb els resultats obtinguts en aquesta tesi, i per comparació amb l'actuació de CK2 en mamífers, podem formular tres possibles models, no excloents entre ells, sobre el mode d'actuació de la CK2 en la via de senyalització de les auxines: (1) que l'activitat CK2 reguli el mòdul central format per una AGC quinasa i una proteïna tipus NPH3; (2) que l'activitat CK2 reguli el complex del retròmer; (3) que l'activitat CK2 reguli el receptor d'auxina ABP1.

El primer dels models es basa amb els resultats obtinguts sobre l'increment dels nivells d'RNA i de proteïna de la quinasa PID després d'eliminar l'activitat CK2. Dins del grup de gens relacionats amb el transport d'auxina, la quinasa PID és la que pateix uns canvis més severos (a nivell d'RNA, de quantitat de proteïna, i del patró de distribució radicular). La fosforilació/desfosforilació de les proteïnes PIN ve donada per l'acció antagonist de la proteïna quinasa PID i la proteïna fosfatasa PP2A, que controla la localització de les proteïnes PIN a la part apical o basal de la membrana plasmàtica (Michniewicz *et al.*, 2007). La proteïna quinasa PID és membre de la família de les AGC quinases i, al igual que les AGC quinases de mamífers, PID es fosforilada per una proteïna quinasa associada a membrana, la quinasa PDK1 (Zegzouti *et al.*, 2006). A més, s'ha postulat una analogia funcional entre la localització asimètrica de les proteïnes PIN, regulada per l'auxina i, la distribució asimètrica del receptor de glucosa (GLUT4) regulada per l'insulina (Muday and Murphy, 2002). En ambdós casos, les proteïnes PIN i GLUT4 són transportades en vesícules i, aquest procés es mediat per l'activació d'una

AGC quinasa que és fosforilada per PDK1. En mamífers es conegut que la proteïna quinasa CK2 fosforila a diverses proteïnes de la família de les AGC quinases i, aquesta fosforilació es crítica per la seva activació total .

Basant-nos en els nostres resultats, la quinasa CK2 podria estar actuant sobre un centre regulador del transport d'auxina, constituït per la quinasa PID i una proteïna amb domini NPH3, que pertany a la família NPH3/RPT2. Les proteïnes que contenen el domini NPH3 juguen un paper important en resposta als tropismes (fototropisme i al gravitropisme) i en la regulació de tràfic vesicular de les proteïnes PIN (Furutani *et al.*, 2011). Tal i com ha estat proposat per altres autors, l'esquema de participació conjunta d'una AGC quinasa i una proteïna amb domini NPH3 actuant *upstream* d'un factor ARF (*auxin response factor*) podria ser un element comú en la resposta a diversos estímuls senyalitzats per l'auxina (Cheng *et al.*, 2007). Per altra banda, tant la quinasa PID, com la família de proteïnes amb domini NPH3, contenen diversos motius que acompleixen les característiques de les seqüències consens de fosforilació per CK2 (Figura 31a).

El segon model fa referència a un possible paper de la proteïna quinasa CK2 en la via del retròmer. En primer lloc, es va observar que els trets fenotípics de la línia mutant CK2mut són molt similars als del mutant de la proteïna del retròmer VPS29, entre ells, la inhibició de la formació d'arrels laterals, una arrel principal més curta, afectació dels tropismes, una distribució del patró d'auxina alterat i la formació d'endosomes de proteïnes PIN (Jaillais *et al.*, 2007; Marques-Bueno *et al.*, 2011). En segon lloc, es va poder determinar que l'eliminació de l'activitat CK2 en plàntules PIN7::PIN7-GFP dona lloc a la formació d'uns endosomes que no colocalitzen amb la tinció amb el colorant FM4-64 i, que aquests endosomes s'observen tant a les cèl·lules de la columel·la on PIN7 té una distribució apolar, com a les cèl·lules de l'estela on PIN7 (i també PIN1) té una localització basal. A més, els tractaments amb cicloheximida van permetre determinar que la formació d'aquests endosomes era independent de la síntesi de proteïnes *de novo* i, que la degradació de les proteïnes PIN1 i PIN7 no es veia afectada, ja que, es va detectar una

disminució de la fluorescència a la membrana plasmàtica. La coincidència dels resultats obtinguts per l'eliminació de l'activitat CK2 amb els de les plantes mutants *vps29* i la diferent resposta de les plàntules PIN7::PIN7-GFP a drogues com la BFA i la *wortmannin*, ens va permetre deduir que la CK2 interfereix en algun punt de la via d'endocitosi que és independent de la localització polar del transportador. Aquest punt és el que està regulat pel retròmer. Aquest complex és un heteropentàmer format per un dímer SNX1 i SNX2 i un trímer VSP35, VPS26 i VPS29. Tot i les controvèrsies publicades darrerament, sembla que el retròmer està localitzat entre el TGN/EE i el PVC i, la seva funció és regular (o classificar/separar) les proteïnes PIN que van en direcció al vacúol de les que retornen cap a la membrana plasmàtica (Jaillais *et al.*, 2008; Niemes *et al.*, 2010b; Robinson *et al.*, 2012; Viotti *et al.*, 2010). Així doncs, podria ser que la fosforilació d'alguna d'aquestes proteïnes (per part de la CK2) fos necessària perquè el complex del retròmer funcionés i, en conseqüència es doni el retorn de les proteïnes PIN cap a la membrana plasmàtica (Figura 31b).

La tercera i últim model es basa en la hipòtesi que l'eliminació de l'activitat CK2 provoca una desregulació del receptor d'auxina ABP1. A la literatura es descriu que el tractament amb auxina exògena reverteix la formació d'endosomes de BFA en un procés que és dependent d'ABP1 (Paciorek *et al.*, 2005; Robert *et al.*, 2010). Nosaltres hem observat que la manca d'activitat CK2 comporta la formació d'uns endosomes que no desapareixen pel tractament amb auxina exògena; aquest fet permet pensar que hi pugui haver algun tipus de desregulació en aquest punt de la via. Per exemple el mutant de pèrdua de funció d'ABP1, *abp1-5*, tampoc no reverteix la formació de vesícules després del tractament amb NAA (Paciorek *et al.*, 2005; Robert *et al.*, 2010; Sauer and Kleine-Vehn, 2011). A banda, es va confirmar que les vesícules que es formen per l'eliminació de l'activitat CK2 són vesícules recobertes de clatrina, ja que, el tractament amb *tyrphostin A23* és capaç de revertir la formació d'endosomes. El fet que només s'observi reversió de la formació d'internalitzacions en el tractament amb *tyrphostin A23* i no en el tractament amb auxina, fa pensar que la CK2 actua *upstream* del procés d'incorporació de la clatrina a les vesícules i, en aquest punt és on actua

ABP1. La manca d'activitat CK2 podria estar interferint, doncs, en l'activitat d'ABP1, de manera que hi hagués una formació d'endosomes descontrolada i no es revertís pel tractament amb auxina (Figura 31c).

Recentment (Scherer Günther F. *et al.*), han proposat un model de funció de les fosfolipases en la transducció de senyals d'auxina. En aquest model hipotetitzen que la proteïna quinasa CK2 està implicada d'alguna manera en la regulació dels dos receptors d'auxina principals: TIR1 i ABP1. Pel que fa a la via de TIR1, especulen que la CK2 podria estar regulant a la quinasa PID i en conseqüència a les proteïnes PIN. Per altra banda, pel que fa al receptor d'auxina ABP1, situen a la CK2 regulant a fosfolipasa A (pPLA) *downstream* d'ABP1.

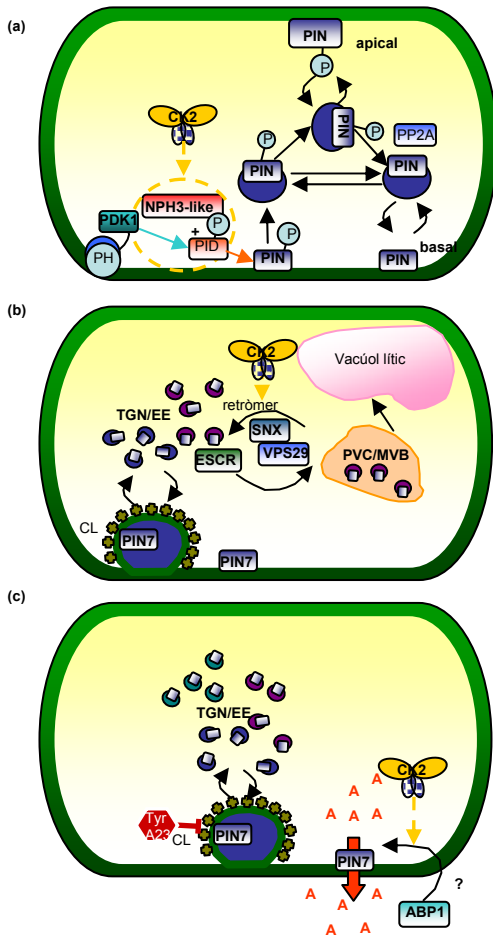


Figura 31. Possibles models d'actuació de la CK2 a la via de senyalització de les auxines.

- (a) Regulació del mòdul central format per una AGC quinasa (PID) i una proteïna tipus NPH3.
- (b) Regulació de l'activitat del retròmer
- (c) Regulació d'ABP1.

Abreviatures:
P, fosfat; **PH**, domini *pleckstrinhomology* on es localitza PDK1; **TGN/EE**, xarxa trans-Golgi/endosoma primerenc; **CL**, clatrina; **PVC/MVB**, compartiment prevacuolar/multivesicular; **TyrA23**, *tyrphostin A23*.

La CK2, una quinasa omnipresent i multifuncional

Tenint en compte la gran quantitat de proteïnes amb funcions diferents que són substrats de la CK2, podríem concloure que gairebé totes les funcions cel·lulars estan regulades d'alguna manera per aquesta quinasa. Particularment, sembla ser que la CK2 té un rol important en la regulació de l'expressió de gens i en la síntesi i degradació de proteïnes, en la mediació d'estímuls d'estrès i com a potent agent de supervivència, afectant a diferents nivells de la maquinària apoptòtica (Filhol and Cochet, 2009). També participa en el control del rellotge biològic i actua com una ectoquinasa sent responsable de la fosforilació de diverses proteïnes extracel·lulars; aquests

posen en evidència la versatilitat d'aquesta quinasa. Una conseqüència de l'aparent activitat constitutiva de la CK2 és que una gran quantitat de virus han evolucionat per utilitzar aquesta quinasa com a font de fòsfor per a la fosforilació de diverses proteïnes involucrades en cicle vital dels virus (St-Denis and Litchfield, 2009). De fet, a la revisió del 2003 dels substrats de la CK2 (Meggio and Pinna, 2003), gairebé 40 proteïnes virals van ser identificades com a substrats d'aquesta quinasa. Més tard, també es van identificar la proteïnes de virus vegetals com a substrats de CK2 (Matsushita *et al.*, 2003). En aquesta tesi, proposem una nova funció per a la proteïna quinasa CK2, que és la regulació de la via de senyalització de les auxines i, més concretament, del transport d'aquesta hormona. Ara per ara, encara no coneixem quines són les proteïnes diana de la CK2 dins d'aquesta via de senyalització, però, no obstant, al nostre grup ja s'està treballant per a trobar aquests possibles substrats. S'ha realitzat assaigs de doble híbrid i, s'estan realitzant experiments de complementació bimolecular (BIFC) per validar els resultats *in planta*. Aquests resultats permetran avançar en la recerca de nous substrats de la quinasa CK2 en *Arabidopsis*.

La CK2 és una quinasa ubiqua que controla l'activitat i/o la vida mitjana d'altres quinases (Pinna and Allende, 2009). La implicació de la CK2 a les cascades de senyalització és atípica ja que, en comparació amb la majoria de proteïnes quinases conegudes, no té una funció reguladora jeràrquica. Degut a la falta de mecanismes moleculars que fàcilment activin o inhibeixin la seva activitat (especialment aquells que actuen a través de la fosforilació del *loop* d'activació), la CK2 està exempta del control per altres quinases i exclosa de la senyalització de vies canòniques que actuen verticalment a la cèl·lula, és a dir, des de la membrana cap al nucli. Aquesta quinasa actua lateralment, afectant a moltes d'aquestes vies verticals. Potser, es podria considerar a la CK2 com a reguladora de diversos processos cel·lulars, compromesa en la integració i la consolidació del creuament de diverses vies (St-Denis and Litchfield, 2009). Aquesta podria ser la raó que explicaria perquè la desregulació de l'activitat CK2 provoca múltiples alteracions a nivell cel·lular (Ruzzene and Pinna, 2010).

La naturalesa pleiotròpica de la CK2, així com els seus múltiples papers a nivell cel·lular, han estat un obstacle per entendre la funció fisiològica d'aquesta quinasa i a la vegada una font de confusió per dur a terme l'estudi. És un requisit essencial determinar quines són les funcions primàries i quins són efectes secundaris de l'activitat CK2 i, d'aquesta manera, reconciliar el freqüent conflicte de les funcions de la CK2 i de com aquesta diversitat de senyals és interpretada per la cèl·lula per a poder dur a terme la resposta adequada.

Conclusions

- 1- L'estudi fenotípic de plantes d'Arabidopsis defectives en activitat CK2 (plantes CK2mut) ha portat a concloure que aquest mutant presenta trets fenotípics característics de mutants amb alteracions en processos regulats per auxina, com són l'absència d'arrels laterals, la inhibició del creixement de l'arrel principal i el fenotip wavy. A més, les plantes CK2mut són hipergravitròpiques i en canvi no responen al fototropisme
- 2- Els tractaments amb auxina exògena reverteixen la majoria de fenotips de les plantes CK2mut, indicant que no tenen afectada la percepció d'auxina. Per altra banda, aquest mutant és més sensible que les plantes salvatges als tractaments amb inhibidors del transport d'auxina, com el NPA i TIBA.
- 3- S'ha pogut observar que la inhibició de la formació de arrels laterals en les plantes CK2mut es dona des dels primers estadis de formació del primordi, ja que no es va detectar divisió cel·lular a les cèl·lules del pericicle de l'arrel. A més, la determinació de l'expressió de gens de cicle cel·lular a la part central de l'arrel mitjançant PCR quantitativa va permetre concloure que el tractament amb auxina exògena és capaç de reactivar la divisió cel·lular.
- 4- La quantificació d'IAA endogen va indicar que les plantes CK2mut no tenen afectada la síntesi d'auxina. Per altra banda, experiments amb $[H^3]$ -IAA han revelat que les plantes CK2mut són deficientes en el transport d'aquesta hormona.
- 5- L'anàlisi de l'expressió del constructe DR5-GFP en plantes doble transgèniques (CK2mutxDR5-GFP) ha revelat que l'eliminació de

l'activitat CK2, provoca canvis en el patró de distribució de l'auxina tant a l'arrel com al cotiledó.

- 6- L'anàlisi dels canvis de expressió global en plantes CK2mut +Dex/-Dex mitjançant *microarrays* i la posterior validació de les dades per PCR quantitativa, han permès determinar canvis significatius de l'expressió dels gens que codifiquen per les proteïnes PIN i de la quinasa PID. A més, experiments de *western-blot* van confirmar que aquests canvis afectaven també als nivells de les corresponents proteïnes.
- 7- Utilitzant les plantes dobles transgèniques CK2mutxPID::PID-GUS, CK2mutxPIN4::PIN4-GFP i CK2mutxPIN7::PIN7-GFP s'ha pogut determinar que el patró d'expressió espacial de PID i la localització intracel·lular de PIN4 i PIN7 estan clarament afectades en les plantes deficientes en CK2. En particular, l'eliminació de l'activitat CK2 produeix l'acumulació dels transportadors PIN4 i PIN7 en vesícules endosomals, tant a les cèl·lules de l'estela com de la columel·la i aquests, i aquestes vesícules no se tenyeixen amb FM4-64.
- 8- Els tractaments amb *tyrphostin* A23, un inhibidor de l'endocitosi dependent de clatrina, impedeix la formació dels endosomes de PIN7 a les plantes mutants de CK2, indicant que aquestes vesícules estan recobertes de clatrina. Per altra banda, la formació d'aquests endosomes no es reverteix pels tractaments amb NAA.
- 9- Els tractaments amb els inhibidors *wortmannin* i BFA ha permès deduir que la CK2 actua a punts de la via de tràfic vesicular diferents als d'aquests inhibidors.
- 10- El tractament amb cicloheximida i TBB ha permès determinar que per a la formació d'endosomes que contenen PIN7 no es necessària la

síntesi de proteïnes *de novo*, i que la inhibició de la CK2 no compromet la degradació de les proteïnes PIN al vacúol.

- 11- El recull d'aquests resultats, conjuntament amb les dades bibliogràfiques, ens porta a postular que la proteïna quinasa CK2 podria estar actuant com un regulador del complex del retròmer.

Bibliografia

- Abas, L. and Luschign, C.** (2010) Maximum yields of microsomal-type membranes from small amounts of plant material without requiring ultracentrifugation. *Anal. Biochem.*, **401**(2), 217-227.
- Abas, L., Benjamins, R., Malenica, N., Paciorek, T., Wisniewska, J., Moulinier-Anzola, J. C., Sieberer, T., Friml, J. and Luschign, C.** (2006) Intracellular trafficking and proteolysis of the arabidopsis auxin-efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism. *Nat. Cell Biol.*, **8**(3), 249-256.
- Ackermann, K., Neidhart, T., Gerber, J., Waxmann, A. and Pyerin, W.** (2005) The catalytic subunit alpha' gene of human protein kinase CK2 (CSNK2A2): Genomic organization, promoter identification and determination of Ets1 as a key regulator. *Mol. Cell. Biochem.*, **274**(1-2), 91-101.
- Ahmed, K., Gerber, D. A. and Cochet, C.** (2002) Joining the cell survival squad: An emerging role for protein kinase CK2. *Trends Cell Biol.*, **12**(5), 226-230.
- Ahmed, K., Davis, A. T., Wang, H., Faust, R. A., Yu, S. and Tawfic, S.** (2000) Significance of protein kinase CK2 nuclear signaling in neoplasia. *J. Cell. Biochem. Suppl.*, **Suppl 35**, 130-135.
- Allende, J.E. and Allende, C. C.** (1995) Protein kinases. 4. protein kinase CK2: An enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation. *FASEB J.*, **9**(5), 313-323.
- Aniento, F. and Robinson, D. G.** (2005) Testing for endocytosis in plants. *Protoplasma*, **226**(1-2), 3-11.
- Aoyama, T. and Chua, N. H.** (1997) A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J.*, **11**(3), 605-612.
- Austin, C.D. and Shields, D.** (1996) Formation of nascent secretory vesicles from the trans-golgi network of endocrine cells is inhibited by tyrosine kinase and phosphatase inhibitors. *J. Cell Biol.*, **135**(6 Pt 1), 1471-1483.
- Bailey-Serres, J., Vangala, S., Szick, K. and Lee, C. H.** (1997) Acidic phosphoprotein complex of the 60S ribosomal subunit of maize seedling roots. components and changes in response to flooding. *Plant Physiol.*, **114**(4), 1293-1305.
- Bajguz, A. and Piotrowska, A.** (2009) Conjugates of auxin and cytokinin. *Phytochemistry*, **70**(8), 957-969.
- Bak, S., Tax, F. E., Feldmann, K. A., Galbraith, D. W. and Feyereisen, R.** (2001) CYP83B1, a cytochrome P450 at the metabolic branch point in auxin and indole glucosinolate biosynthesis in arabidopsis. *The Plant Cell Online*, **13**(1), 101-111.
- Baldan, B., Navazio, L., Friso, A., Mariani, P. and Meggio, F.** (1996) Plant calreticulin is specifically and efficiently phosphorylated by protein kinase CK2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **221**(3), 498-502.

- Baluska, F., Mancuso, S., Volkmann, D. and Barlow, P. W.** (2010) Root apex transition zone: A signalling-response nexus in the root. *Trends Plant Sci.*, **15**(7), 402-408.
- Banbury, D.N., Oakley, J. D., Sessions, R. B. and Banting, G.** (2003) Tyrostatin A23 inhibits internalization of the transferrin receptor by perturbing the interaction between tyrosine motifs and the medium chain subunit of the AP-2 adaptor complex. *J. Biol. Chem.*, **278**(14), 12022-12028.
- Barbez, E., Kubes, M., Rolcik, J., Beziat, C., Pencik, A., Wang, B., Rosquete, M. R., Zhu, J., Dobrev, P. I., Lee, Y., Zazimalova, E., Petrasek, J., Geisler, M., Friml, J. and Kleine-Vehn, J.** (2012) A novel putative auxin carrier family regulates intracellular auxin homeostasis in plants. *Nature*, .
- Barceló, A., Pedreño, M. A., Ferrer, M. A., Sabater, F. and Muñoz, R.** (1990) Indole-3-methanol is the main product of the oxidation of indole-3-acetic acid catalyzed by two cytosolic basic isoperoxidases from *lupinus*. *Planta*, **181**(3), 448-450.
- Barlier, I., Kowalczyk, M., Marchant, A., Ljung, K., Bhalerao, R., Bennett, M., Sandberg, G. and Bellini, C.** (2000) The SUR2 gene of *Arabidopsis thaliana* encodes the cytochrome P450 CYP83B1, a modulator of auxin homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**(26), 14819-14824.
- Bartel, B. and Fink, G. R.** (1995) ILR1, an amidohydrolase that releases active indole-3-acetic acid from conjugates. *Science*, **268**(5218), 1745-1748.
- Bar-Zvi, D. and Branton, D.** (1986) Clathrin-coated vesicles contain two protein kinase activities. phosphorylation of clathrin beta-light chain by casein kinase II. *Journal of Biological Chemistry*, **261**(21), 9614-9621.
- Battistutta, R., De Moliner, E., Sarno, S., Zanotti, G. and Pinna, L. A.** (2001) Structural features underlying selective inhibition of protein kinase CK2 by ATP site-directed tetrabromo-2-benzotriazole. *Protein Sci.*, **10**(11), 2200-2206.
- Benjamins, R., Quint, A., Weijers, D., Hooykaas, P. and Offringa, R.** (2001) The PINOID protein kinase regulates organ development in *Arabidopsis* by enhancing polar auxin transport. *Development*, **128**(20), 4057-4067.
- Benková, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertová, D., Jürgens, G. and Friml, J.** (2003) Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*, **115**(5), 591-602.
- Bennett, M.J., Marchant, A., Green, H. G., May, S. T., Ward, S. P., Millner, P. A., Walker, A. R., Schulz, B. and Feldmann, K. A.** (1996) *Arabidopsis* AUX1 gene: A permease-like regulator of root gravitropism. *Science*, **273**(5277), 948-950.
- Besseau, S., Hoffmann, L., Geoffroy, P., Lapierre, C., Pollet, B. and Legrand, M.** (2007) Flavonoid accumulation in *Arabidopsis* repressed in lignin synthesis affects auxin transport and plant growth. *Plant Cell*, **19**(1), 148-162.
- Betz, W.J., Mao, F. and Smith, C. B.** (1996) Imaging exocytosis and endocytosis. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **6**(3), 365-371.
- Betz, W.J., Mao, F. and Bewick, G. S.** (1992) Activity-dependent fluorescent staining and destaining of living vertebrate motor nerve terminals. *J. Neurosci.*, **12**(2), 363-375.

- Bialek, K. and Cohen, J. D.** (1992) Amide-linked indoleacetic acid conjugates may control levels of indoleacetic acid in germinating seedlings of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.*, **100**(4), 2002-2007.
- Blakeslee, J.J., Bandyopadhyay, A., Lee, O. R., Mravec, J., Titapiwatanakun, B., Sauer, M., Makam, S. N., Cheng, Y., Bouchard, R., Adamec, J., Geisler, M., Nagashima, A., Sakai, T., Martinoia, E., Friml, J., Peer, W. A. and Murphy, A. S.** (2007) Interactions among PIN-FORMED and P-glycoprotein auxin transporters in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, **19**(1), 131-147.
- Bllilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., Heidstra, R., Aida, M., Palme, K. and Scheres, B.** (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature*, **433**(7021), 39-44.
- Bogre, L., Okresz, L., Henriques, R. and Anthony, R. G.** (2003) Growth signalling pathways in Arabidopsis and the AGC protein kinases. *Trends Plant Sci.*, **8**(9), 424-431.
- Boldyreff, B., James, P., Staudenmann, W. and Issinger, O. G.** (1993) Ser2 is the autophosphorylation site in the beta subunit from bicistronically expressed human casein kinase-2 and from native rat liver casein kinase-2 beta. *Eur. J. Biochem.*, **218**(2), 515-521.
- Bolte, S., Talbot, C., Boutte, Y., Catrice, O., Read, N. D. and Satiat-Jeuemaitre, B.** (2004) FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells. *J. Microsc.*, **214**(Pt 2), 159-173.
- Bonifacio, J.S. and Hurley, J. H.** (2008) Retromer. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **20**(4), 427-436.
- Bouchard, R., Bailly, A., Blakeslee, J. J., Oehring, S. C., Vincenzetti, V., Lee, O. R., Paponov, I., Palme, K., Mancuso, S., Murphy, A. S., Schulz, B. and Geisler, M.** (2006) Immunophilin-like TWISTED DWARF1 modulates auxin efflux activities of Arabidopsis P-glycoproteins. *J. Biol. Chem.*, **281**(41), 30603-30612.
- Bozzetti, M.P., Massari, S., Finelli, P., Meggio, F., Pinna, L. A., Boldyreff, B., Issinger, O. G., Palumbo, G., Ciriaco, C. and Bonaccorsi, S.** (1995) The ste locus, a component of the parasitic cry-ste system of *Drosophila melanogaster*, encodes a protein that forms crystals in primary spermatocytes and mimics properties of the beta subunit of casein kinase 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **92**(13), 6067-6071.
- Braun, N., Wyrzykowska, J., Muller, P., David, K., Couch, D., Perrot-Rechenmann, C. and Fleming, A. J.** (2008) Conditional repression of AUXIN BINDING PROTEIN1 reveals that it coordinates cell division and cell expansion during postembryonic shoot development in Arabidopsis and tobacco. *The Plant Cell Online*, **20**(10), 2746-2762.
- Browning, K.S., Yan, T. F., Lauer, S. J., Aquino, L. A., Tao, M. and Ravel, J. M.** (1985) Phosphorylation of wheat germ initiation factors and ribosomal proteins. *Plant Physiol.*, **77**(2), 370-373.
- Bu, Q., Zhu, L., Dennis, M. D., Yu, L., Lu, S. X., Person, M. D., Tobin, E. M., Browning, K. S. and Huq, E.** (2011) Phosphorylation by CK2 enhances the rapid light-induced degradation of phytochrome interacting factor 1 in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.*, **286**(14), 12066-12074.
- BURNETT, G. and KENNEDY, E. P.** (1954) The enzymatic phosphorylation of proteins. *J. Biol. Chem.*, **211**(2), 969-980.
- Calderon Villalobos, L.I., Lee, S., De Oliveira, C., Ivetac, A., Brandt, W., Armitage, L., Sheard, L. B., Tan, X., Parry, G., Mao, H., Zheng, N., Napier, R., Kepinski, S. and**

- Estelle, M.** (2012) A combinatorial TIR1/AFB-Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin. *Nat. Chem. Biol.*, **8**(5), 477-485.
- Campanella, J., Smith, S., Leib, D., Wexler, S. and Ludwig-Müller, J.** (2008) The auxin conjugate hydrolase family of *medicago truncatula* and their expression during the interaction with two symbionts. *Journal of Plant Growth Regulation*, **27**(1), 26-38.
- Celenza, J.L., Jr, Grisafi, P. L. and Fink, G. R.** (1995) A pathway for lateral root formation in arabidopsis thaliana. *Genes Dev.*, **9**(17), 2131-2142.
- Champion, A., Kreis, M., Mockaitis, K., Picaud, A. and Henry, Y.** (2004) Arabidopsis kinome: After the casting. *Funct. Integr. Genomics*, **4**(3), 163-187.
- Chantalat, L., Leroy, D., Filhol, O., Nueda, A., Benitez, M. J., Chambaz, E. M., Cochet, C. and Dideberg, O.** (1999) Crystal structure of the human protein kinase CK2 regulatory subunit reveals its zinc finger-mediated dimerization. *EMBO J.*, **18**(11), 2930-2940.
- Chapman, E.J. and Estelle, M.** (2009) Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Genet.*, **43**, 265-285.
- Chen, J., Ullah, H., Young, J. C., Sussman, M. R. and Jones, A. M.** (2001) ABP1 is required for organized cell elongation and division in arabidopsis embryogenesis. *Genes & Development*, **15**(7), 902-911.
- Cheng, Y., Dai, X. and Zhao, Y.** (2006) Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in arabidopsis. *Genes Dev.*, **20**(13), 1790-1799.
- Cheng, Y., Qin, G., Dai, X. and Zhao, Y.** (2007) NPY1, a BTB-NPH3-like protein, plays a critical role in auxin-regulated organogenesis in arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104**(47), 18825-18829.
- Cho, M., Lee, S. H. and Cho, H.** (2007) P-Glycoprotein4 displays auxin efflux Transporter-Like action in arabidopsis root hair cells and tobacco cells. *The Plant Cell Online*, **19**(12), 3930-3943.
- Ciceri, P., Gianazza, E., Lazzari, B., Lippoli, G., Genga, A., Hoscheck, G., Schmidt, R. J. and Viotti, A.** (1997) Phosphorylation of Opaque2 changes diurnally and impacts its DNA binding activity. *Plant Cell*, **9**(1), 97-108.
- Collins, B.M.** (2008) The structure and function of the retromer protein complex. *Traffic*, **9**(11), 1811-1822.
- Cox, R., Mason-Gamer, R. J., Jackson, C. L. and Segev, N.** (2004) Phylogenetic analysis of Sec7-domain-containing arf nucleotide exchangers. *Mol. Biol. Cell*, **15**(4), 1487-1505.
- Datta, N. and Cashmore, A. R.** (1989) Binding of a pea nuclear protein to promoters of certain photoregulated genes is modulated by phosphorylation. *Plant Cell*, **1**(11), 1069-1077.
- David, K.M., Couch, D., Braun, N., Brown, S., Grosclaude, J. and Perrot-Rechenmann, C.** (2007) The auxin-binding protein 1 is essential for the control of cell cycle. *The Plant Journal*, **50**(2), 197-206.
- Davies, P.J.** (2004) *Plant hormones: Biosynthesis, signal transduction, action!* London: Kluwer Academic Publishers.

- Davies, R.T., Goetz, D. H., Lasswell, J., Anderson, M. N. and Bartel, B.** (1999) IAR3 encodes an auxin conjugate hydrolase from arabidopsis. *Plant Cell*, **11**(3), 365-376.
- De Schutter, K., Joubes, J., Cools, T., Verkest, A., Corellou, F., Babiychuk, E., Van Der Schueren, E., Beeckman, T., Kushnir, S., Inze, D. and De Veylder, L.** (2007) Arabidopsis WEE1 kinase controls cell cycle arrest in response to activation of the DNA integrity checkpoint. *Plant Cell*, **19**(1), 211-225.
- De Smet, I., Tetsumura, T., De Rybel, B., Frey, N. F., Laplaze, L., Casimiro, I., Swarup, R., Naudts, M., Vanneste, S., Audenaert, D., Inze, D., Bennett, M. J. and Beeckman, T.** (2007) Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of arabidopsis. *Development*, **134**(4), 681-690.
- Delbarre, A., Muller, P., Imhoff, V. and Guern, J.** (1996) Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, naphthalene-1-acetic acid, and indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells. *Planta*, **198**(4), 532-541.
- Dello Iorio, R., Nakamura, K., Moubayidin, L., Perilli, S., Taniguchi, M., Morita, M. T., Aoyama, T., Costantino, P. and Sabatini, S.** (2008) A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science*, **322**(5906), 1380-1384.
- Dennis, M.D. and Browning, K. S.** (2009) Differential phosphorylation of plant translation initiation factors by arabidopsis thaliana CK2 holoenzymes. *J. Biol. Chem.*, **284**(31), 20602-20614.
- Dennis, M.D., Person, M. D. and Browning, K. S.** (2009) Phosphorylation of plant translation initiation factors by CK2 enhances the in vitro interaction of multifactor complex components. *J. Biol. Chem.*, **284**(31), 20615-20628.
- Dettmer, J. and Friml, J.** (2011) Cell polarity in plants: When two do the same, it is not the same... *Curr. Opin. Cell Biol.*, **23**(6), 686-696.
- Dettmer, J., Hong-Hermesdorf, A., Stierhof, Y. D. and Schumacher, K.** (2006) Vacuolar H⁺-ATPase activity is required for endocytic and secretory trafficking in arabidopsis. *Plant Cell*, **18**(3), 715-730.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S. and Estelle, M.** (2005) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, **435**(7041), 441-445.
- Dhonukshe, P., Aniento, F., Hwang, I., Robinson, D. G., Mravec, J., Stierhof, Y. D. and Friml, J.** (2007) Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in arabidopsis. *Curr. Biol.*, **17**(6), 520-527.
- Dhonukshe, P., Huang, F., Galvan-Ampudia, C. S., Mahonen, A. P., Kleine-Vehn, J., Xu, J., Quint, A., Prasad, K., Friml, J., Scheres, B. and Offringa, R.** (2010) Plasma membrane-bound AGC3 kinases phosphorylate PIN auxin carriers at TPRXS(N/S) motifs to direct apical PIN recycling. *Development*, **137**(19), 3245-3255.
- Dhonukshe, P., Tanaka, H., Goh, T., Ebine, K., Mahonen, A. P., Prasad, K., Blilou, I., Geldner, N., Xu, J., Uemura, T., Chory, J., Ueda, T., Nakano, A., Scheres, B. and Friml, J.** (2008) Generation of cell polarity in plants links endocytosis, auxin distribution and cell fate decisions. *Nature*, **456**(7224), 962-966.
- Di Maira, G., Brustolon, F., Pinna, L. A. and Ruzzene, M.** (2009) Dephosphorylation and inactivation of Akt/PKB is counteracted by protein kinase CK2 in HEK 293T cells. *Cell Mol. Life Sci.*, **66**(20), 3363-3373.

- Di Maira, G., Salvi, M., Arrigoni, G., Marin, O., Sarno, S., Brustolon, F., Pinna, L. A. and Ruzzene, M.** (2005) Protein kinase CK2 phosphorylates and upregulates Akt/PKB. *Cell Death Differ.*, **12**(6), 668-677.
- Ding, Z. and Friml, J.** (2010) Auxin regulates distal stem cell differentiation in arabidopsis roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **107**(26), 12046-12051.
- Dobrowolska, G., Meggio, F., Szczegielniak, J., Muszynska, G. and Pinna, L. A.** (1992) Purification and characterization of maize seedling casein kinase IIB, a monomeric enzyme immunologically related to the alpha subunit of animal casein kinase-2. *Eur. J. Biochem.*, **204**(1), 299-303.
- Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K. and Scheres, B.** (1993) Cellular organisation of the arabidopsis thaliana root. *Development*, **119**(1), 71-84.
- Dominguez, I., Sonenshein, G. E. and Seldin, D. C.** (2009) Protein kinase CK2 in health and disease: CK2 and its role in wnt and NF-kappaB signaling: Linking development and cancer. *Cell Mol. Life Sci.*, **66**(11-12), 1850-1857.
- Donaldson, J.G. and Jackson, C. L.** (2000) Regulators and effectors of the ARF GTPases. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **12**(4), 475-482.
- Eapen, D., Barroso, M. L., Campos, M. E., Ponce, G., Corkidi, G., Dubrovsky, J. G. and Cassab, G. I.** (2003) A no hydrotropic response root mutant that responds positively to gravitropism in arabidopsis. *Plant Physiol.*, **131**(2), 536-546.
- Effendi, Y., Rietz, S., Fischer, U. and Scherer, G. F. E.** (2011) The heterozygous *abp1/ABP1* insertional mutant has defects in functions requiring polar auxin transport and in regulation of early auxin-regulated genes. *The Plant Journal*, **65**(2), 282-294.
- Ehlert, B., Schottler, M. A., Tischendorf, G., Ludwig-Muller, J. and Bock, R.** (2008) The paramutated SULFUREA locus of tomato is involved in auxin biosynthesis. *J. Exp. Bot.*, **59**(13), 3635-3647.
- Emans, N., Zimmermann, S. and Fischer, R.** (2002) Uptake of a fluorescent marker in plant cells is sensitive to brefeldin A and wortmannin. *Plant Cell*, **14**(1), 71-86.
- Esmon, C.A., Pedmale, U. V. and Liscum, E.** (2005) Plant tropisms: Providing the power of movement to a sessile organism. *Int. J. Dev. Biol.*, **49**(5-6), 665-674.
- Espunya, M.C. and Martinez, M. C.** (2003) In situ hybridization analysis of protein kinase CK2 expression during plant development. *Physiol. Plant.*, **117**(4), 573-578.
- Espunya, M.C., Lopez-Giraldez, T., Hernan, I., Carballo, M. and Martinez, M. C.** (2005) Differential expression of genes encoding protein kinase CK2 subunits in the plant cell cycle. *J. Exp. Bot.*, **56**(422), 3183-3192.
- Espunya, M.C., Combettes, B., Dot, J., Chaubet-Gigot, N. and Martinez, M. C.** (1999) Cell-cycle modulation of CK2 activity in tobacco BY-2 cells. *Plant J.*, **19**(6), 655-666.
- Espunya, M.C. and Martínez, M. C.** (1997) Identification of two different molecular forms of arabidopsis thaliana casein kinase II. *Plant Science*, **124**(2), 131-142.
- Faust, M. and Montenarh, M.** (2000) Subcellular localization of protein kinase CK2. A key to its function? *Cell Tissue Res.*, **301**(3), 329-340.

- Feraru, E. and Friml, J.** (2008) PIN polar targeting. *Plant Physiol.*, **147**(4), 1553-1559.
- Filhol, O. and Cochet, C.** (2009) Protein kinase CK2 in health and disease: Cellular functions of protein kinase CK2: A dynamic affair. *Cell Mol. Life Sci.*, **66**(11-12), 1830-1839.
- Finet, C. and Jaillais, Y.** AUXOLOGY: When auxin meets plant evo-devo. *Dev. Biol.*, (0).
- Friml, J., Wisniewska, J., Benkova, E., Mendgen, K. and Palme, K.** (2002) Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in arabidopsis. *Nature*, **415**(6873), 806-809.
- Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., Offringa, R. and Jurgens, G.** (2003) Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of arabidopsis. *Nature*, **426**(6963), 147-153.
- Friml, J., Yang, X., Michniewicz, M., Weijers, D., Quint, A., Tietz, O., Benjamins, R., Ouwerkerk, P. B., Ljung, K., Sandberg, G., Hooykaas, P. J., Palme, K. and Offringa, R.** (2004) A PINOID-dependent binary switch in apical-basal PIN polar targeting directs auxin efflux. *Science*, **306**(5697), 862-865.
- Furutani, M., Sakamoto, N., Yoshida, S., Kajiwara, T., Robert, H. S., Friml, J. and Tasaka, M.** (2011) Polar-localized NPH3-like proteins regulate polarity and endocytosis of PIN-FORMED auxin efflux carriers. *Development*, **138**(10), 2069-2078.
- Furutani, M., Kajiwara, T., Kato, T., Trembl, B. S., Stockum, C., Torres-Ruiz, R. A. and Tasaka, M.** (2007) The gene MACCHI-BOU 4/ENHANCER OF PINOID encodes a NPH3-like protein and reveals similarities between organogenesis and phototropism at the molecular level. *Development*, **134**(21), 3849-3859.
- Galovic, M., Xu, D., Areces, L. B., van der Kammen, R. and Innocenti, M.** (2011) Interplay between N-WASP and CK2 optimizes clathrin-mediated endocytosis of EGFR. *Journal of Cell Science*, **124**(12), 2001-2012.
- Gälweiler, L., Guan, C., Müller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A. and Palme, K.** (1998) Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in arabidopsis vascular tissue. *Science*, **282**(5397), 2226-2230.
- Geisler, M. and Murphy, A. S.** (2006) The ABC of auxin transport: The role of p-glycoproteins in plant development. *FEBS Lett.*, **580**(4), 1094-1102.
- Geisler, M., Blakeslee, J. J., Bouchard, R., Lee, O. R., Vincenzetti, V., Bandyopadhyay, A., Titapiwatanakun, B., Peer, W. A., Bailly, A., Richards, E. L., Ejendal, K. F. K., Smith, A. P., Baroux, C., Grossniklaus, U., Müller, A., Hrycyna, C. A., Dudler, R., Murphy, A. S. and Martinoia, E.** (2005) Cellular efflux of auxin catalyzed by the arabidopsis MDR/PGP transporter AtPGP1. *The Plant Journal*, **44**(2), 179-194.
- Geldner, N.** (2004) The plant endosomal system--its structure and role in signal transduction and plant development. *Planta*, **219**(4), 547-560.
- Geldner, N., Friml, J., Stierhof, Y. D., Jurgens, G. and Palme, K.** (2001) Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature*, **413**(6854), 425-428.
- Geldner, N., Anders, N., Wolters, H., Keicher, J., Kornberger, W., Müller, P., Delbarre, A., Ueda, T., Nakano, A. and Jurgens, G.** (2003) The arabidopsis GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell*, **112**(2), 219-230.

- Ghosh, P. and Kornfeld, S.** (2004) The cytoplasmic tail of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor contains four binding sites for AP-1. *Arch. Biochem. Biophys.*, **426**(2), 225-230.
- Gil, C., Falques, A., Sarro, E., Cubi, R., Blasi, J., Aguilera, J. and Itarte, E.** (2011) Protein kinase CK2 associates to lipid rafts and its pharmacological inhibition enhances neurotransmitter release. *FEBS Lett.*, **585**(2), 414-420.
- Godoy, J.A., Lunar, R., Torres-Schumann, S., Moreno, J., Rodrigo, R. M. and Pintor-Toro, J. A.** (1994) Expression, tissue distribution and subcellular localization of dehydrin TAS14 in salt-stressed tomato plants. *Plant Mol. Biol.*, **26**(6), 1921-1934.
- Gonzalez, N., Hernould, M., Delmas, F., Gevaudant, F., Duffe, P., Causse, M., Mouras, A. and Chevalier, C.** (2004) Molecular characterization of a WEE1 gene homologue in tomato (*Lycopersicon esculentum* mill.). *Plant Mol. Biol.*, **56**(6), 849-861.
- Gray, W.M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O. and Estelle, M.** (2001) Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature*, **414**(6861), 271-276.
- Grieneisen, V.A., Xu, J., Maree, A. F., Hogeweg, P. and Scheres, B.** (2007) Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature*, **449**(7165), 1008-1013.
- Grunewald, W. and Friml, J.** (2010) The march of the PINs: Developmental plasticity by dynamic polar targeting in plant cells. *EMBO J.*, **29**(16), 2700-2714.
- Hagen, G. and Guilfoyle, T. J.** (1985) Rapid induction of selective transcription by auxins. *Mol. Cell. Biol.*, **5**(6), 1197-1203.
- Han, J., Wang, Y., Wang, S. and Chi, C.** (2008) Interaction of Mint3 with furin regulates the localization of furin in the trans-golgi network. *J. Cell. Sci.*, **121**(Pt 13), 2217-2223.
- Hanks, S.K., Quinn, A. M. and Hunter, T.** (1988) The protein kinase family: Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, **241**(4861), 42-52.
- Hardtke, C.S., Gohda, K., Osterlund, M. T., Oyama, T., Okada, K. and Deng, X. W.** (2000) HY5 stability and activity in arabidopsis is regulated by phosphorylation in its COP1 binding domain. *EMBO J.*, **19**(18), 4997-5006.
- Hertel, R., Thomson, K. - and Russo, V. E. A.** (1972) *In-vitro* auxin binding to particulate cell fractions from corn coleoptiles. *Planta*, **107**(4), 325-340.
- Hidalgo, P., Garreton, V., Berrios, C. G., Ojeda, H., Jordana, X. and Holuigue, L.** (2001) A nuclear casein kinase 2 activity is involved in early events of transcriptional activation induced by salicylic acid in tobacco. *Plant Physiol.*, **125**(1), 396-405.
- Himanen, K., Boucheron, E., Vanneste, S., de Almeida Engler, J., Inze, D. and Beekman, T.** (2002) Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell*, **14**(10), 2339-2351.
- Holen, I., Gordon, P. B., Stromhaug, P. E., Berg, T. O., Fengsrud, M., Brech, A., Roos, N., Berg, T. and Seglen, P. O.** (1995) Inhibition of asialoglycoprotein endocytosis and degradation in rat hepatocytes by protein phosphatase inhibitors. *Biochem. J.*, **311** (Pt 1)(Pt 1), 317-326.

- Hsieh, H.L., Song, C. J. and Roux, S. J.** (2000) Regulation of a recombinant pea nuclear apyrase by calmodulin and casein kinase II. *Biochim. Biophys. Acta*, **1494**(3), 248-255.
- Hu, E. and Rubin, C. S.** (1990) Expression of wild-type and mutated forms of the catalytic (alpha) subunit of caenorhabditis elegans casein kinase II in escherichia coli. *J. Biol. Chem.*, **265**(33), 20609-20615.
- Huang, F., Zago, M. K., Abas, L., van Marion, A., Galvan-Ampudia, C. S. and Offringa, R.** (2010) Phosphorylation of conserved PIN motifs directs arabidopsis PIN1 polarity and auxin transport. *Plant Cell*, **22**(4), 1129-1142.
- Hull, A.K., Vij, R. and Celenza, J. L.** (2000) Arabidopsis cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**(5), 2379-2384.
- Hunter, T.** (2000) Signaling--2000 and beyond. *Cell*, **100**(1), 113-127.
- Inze, D. and De Veylder, L.** (2006) Cell cycle regulation in plant development. *Annu. Rev. Genet.*, **40**, 77-105.
- Issinger, O.G.** (1993) Casein kinases: Pleiotropic mediators of cellular regulation. *Pharmacol. Ther.*, **59**(1), 1-30.
- Jackson, R.G., Lim, E. K., Li, Y., Kowalczyk, M., Sandberg, G., Hoggett, J., Ashford, D. A. and Bowles, D. J.** (2001) Identification and biochemical characterization of an arabidopsis indole-3-acetic acid glucosyltransferase. *J. Biol. Chem.*, **276**(6), 4350-4356.
- Jailais, Y., Fobis-Loisy, I., Miege, C. and Gaude, T.** (2008) Evidence for a sorting endosome in arabidopsis root cells. *Plant J.*, **53**(2), 237-247.
- Jailais, Y., Fobis-Loisy, I., Miege, C., Rollin, C. and Gaude, T.** (2006) AtSNX1 defines an endosome for auxin-carrier trafficking in arabidopsis. *Nature*, **443**(7107), 106-109.
- Jailais, Y., Santambrogio, M., Rozier, F., Fobis-Loisy, I., Miege, C. and Gaude, T.** (2007) The retromer protein VPS29 links cell polarity and organ initiation in plants. *Cell*, **130**(6), 1057-1070.
- Janaki, N., Krishna, V. M. and Ramaiah, K. V.** (1995) Phosphorylation of wheat germ initiation factor 2 (eIF-2) by N-ethylmaleimide-treated wheat germ lysates and by purified casein kinase II does not affect the guanine nucleotide exchange on eIF-2. *Arch. Biochem. Biophys.*, **324**(1), 1-8.
- Jeong, S.Y., Peffer, N. and Meier, I.** (2004) Phosphorylation by protein kinase CKII modulates the DNA-binding activity of a chloroplast nucleoid-associated protein. *Planta*, **219**(2), 298-302.
- Jones, A.M., Im, K., Savka, M. A., Wu, M., DeWitt, N. G., Shillito, R. and Binns, A. N.** (1998) Auxin-dependent cell expansion mediated by overexpressed auxin-binding protein 1. *Science*, **282**(5391), 1114-1117.
- Jurgens, G. and Geldner, N.** (2007) The high road and the low road: Trafficking choices in plants. *Cell*, **130**(6), 977-979.

- Kanekatsu, M., Saito, H., Motohashi, K. and Hisabori, T.** (1998) The beta subunit of chloroplast ATP synthase (CF0CF1-ATPase) is phosphorylated by casein kinase II. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **46**(1), 99-105.
- Kanekatsu, M., Munakata, H., Furuzono, K. and Ohtsuki, K.** (1993) Biochemical characterization of a 34 kDa ribonucleoprotein (p34) purified from the spinach chloroplast fraction as an effective phosphate acceptor for casein kinase II. *FEBS Lett.*, **335**(2), 176-180.
- Kang, H.G. and Klessig, D. F.** (2005) Salicylic acid-inducible arabidopsis CK2-like activity phosphorylates TGA2. *Plant Mol. Biol.*, **57**(4), 541-557.
- Katano, T., Kamata, Y., Ueno, T., Furuya, T., Nakamura, T. and Ohtsuki, K.** (2005) Biochemical characterization of an effective substrate and potent activators of CK2 copurified with bowman-birk-type proteinase inhibitor from soybean seeds in vitro. *Biochim. Biophys. Acta*, **1725**(1), 47-56.
- Kato, K., Kidou, S., Miura, H. and Sawada, S.** (2002) Molecular cloning of the wheat CK2alpha gene and detection of its linkage with *vrn-A1* on chromosome 5A. *Theor. Appl. Genet.*, **104**(6-7), 1071-1077.
- Kelley, K.B., Lambert, K. N., Hager, A. G. and Riechers, D. E.** (2004) Quantitative expression analysis of GH3, a gene induced by plant growth regulator herbicides in soybean. *J. Agric. Food Chem.*, **52**(3), 474-478.
- Kepinski, S. and Leyser, O.** (2005) The arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, **435**(7041), 446-451.
- Kim, D.H., Eu, Y., Yoo, C. M., Kim, Y., Pih, K. T., Jin, J. B., Kim, S. J., Stenmark, H. and Hwang, I.** (2001) Trafficking of phosphatidylinositol 3-phosphate from the trans-golgi network to the lumen of the central vacuole in plant cells. *The Plant Cell Online*, **13**(2), 287-301.
- Kleine-Vehn, J. and Friml, J.** (2008) Polar targeting and endocytic recycling in auxin-dependent plant development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **24**, 447-473.
- Kleine-Vehn, J., Dhonukshe, P., Swarup, R., Bennett, M. and Friml, J.** (2006) Subcellular trafficking of the arabidopsis auxin influx carrier AUX1 uses a novel pathway distinct from PIN1. *Plant Cell*, **18**(11), 3171-3181.
- Kleine-Vehn, J., Ding, Z., Jones, A. R., Tasaka, M., Morita, M. T. and Friml, J.** (2010) Gravity-induced PIN transcytosis for polarization of auxin fluxes in gravity-sensing root cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **107**(51), 22344-22349.
- Kleine-Vehn, J., Langowski, L., Wisniewska, J., Dhonukshe, P., Brewer, P. B. and Friml, J.** (2008) Cellular and molecular requirements for polar PIN targeting and transcytosis in plants. *Mol. Plant.*, **1**(6), 1056-1066.
- Kleine-Vehn, J., Huang, F., Naramoto, S., Zhang, J., Michniewicz, M., Offringa, R. and Friml, J.** (2009) PIN auxin efflux carrier polarity is regulated by PINOID kinase-mediated recruitment into GNOM-independent trafficking in arabidopsis. *Plant Cell*, **21**(12), 3839-3849.
- Kleine-Vehn, J., Leitner, J., Zwiewka, M., Sauer, M., Abas, L., Luschnig, C. and Friml, J.** (2008) Differential degradation of PIN2 auxin efflux carrier by retromer-dependent vacuolar targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **105**(46), 17812-17817.

- Kleine-Vehn, J., Wabnik, K., Martiniere, A., Langowski, L., Willig, K., Naramoto, S., Leitner, J., Tanaka, H., Jakobs, S., Robert, S., Luschnig, C., Govaerts, W., Hell, S. W., Runions, J. and Friml, J.** (2011) Recycling, clustering, and endocytosis jointly maintain PIN auxin carrier polarity at the plasma membrane. *Mol. Syst. Biol.*, **7**, 540.
- Klimczak, L.J. and Cashmore, A. R.** (1994) Microheterogeneous cytosolic high-mobility group proteins from broccoli co-purify with and are phosphorylated by casein kinase II. *Plant Physiol.*, **105**(3), 911-919.
- Klimczak, L.J., Schindler, U. and Cashmore, A. R.** (1992) DNA binding activity of the arabidopsis G-box binding factor GBF1 is stimulated by phosphorylation by casein kinase II from broccoli. *Plant Cell*, **4**(1), 87-98.
- Korolchuk, V.I. and Banting, G.** (2002) CK2 and GAK/auxilin2 are major protein kinases in clathrin-coated vesicles. *Traffic*, **3**(6), 428-439.
- Kowalczyk, M. and Sandberg, G.** (2001) Quantitative analysis of indole-3-acetic acid metabolites in arabidopsis. *Plant Physiol.*, **127**(4), 1845-1853.
- Krohn, N.M., Stemmer, C., Fojan, P., Grimm, R. and Grasser, K. D.** (2003) Protein kinase CK2 phosphorylates the high mobility group domain protein SSRP1, inducing the recognition of UV-damaged DNA. *J. Biol. Chem.*, **278**(15), 12710-12715.
- Krouk, G., Lacombe, B., Bielach, A., Perrine-Walker, F., Malinska, K., Mounier, E., Hoyerova, K., Tillard, P., Leon, S., Ljung, K., Zazimalova, E., Benkova, E., Nacry, P. and Gojon, A.** (2010) Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Developmental Cell*, **18**(6), 927-937.
- Lam, S.K., Siu, C. L., Hillmer, S., Jang, S., An, G., Robinson, D. G. and Jiang, L.** (2007) Rice SCAMP1 defines clathrin-coated, trans-golgi-located tubular-vesicular structures as an early endosome in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell*, **19**(1), 296-319.
- Laskowski, M.J., Williams, M. E., Nusbaum, H. C. and Sussex, I. M.** (1995) Formation of lateral root meristems is a two-stage process. *Development*, **121**(10), 3303-3310.
- Lebrin, F., Chambaz, E. M. and Bianchini, L.** (2001) A role for protein kinase CK2 in cell proliferation: Evidence using a kinase-inactive mutant of CK2 catalytic subunit alpha. *Oncogene*, **20**(16), 2010-2022.
- Lebska, M., Ciesielski, A., Szymona, L., Godecka, L., Lewandowska-Gnatowska, E., Szczegielniak, J. and Muszynska, G.** (2010) Phosphorylation of maize eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) by casein kinase 2: Identification of phosphorylated residue and influence on intracellular localization of eIF5A. *J. Biol. Chem.*, **285**(9), 6217-6226.
- LeClere, S., Tellez, R., Rampey, R. A., Matsuda, S. P. and Bartel, B.** (2002) Characterization of a family of IAA-amino acid conjugate hydrolases from arabidopsis. *J. Biol. Chem.*, **277**(23), 20446-20452.
- Lee, S.H. and Cho, H. T.** (2006) PINOID positively regulates auxin efflux in arabidopsis root hair cells and tobacco cells. *Plant Cell*, **18**(7), 1604-1616.
- Lee, Y., Lloyd, A. M. and Roux, S. J.** (1999) Antisense expression of the CK2 alpha-subunit gene in arabidopsis. effects on light-regulated gene expression and plant growth. *Plant Physiol.*, **119**(3), 989-1000.

- Lehmann, T., Hoffmann, M., Hentrich, M. and Pollmann, S.** (2010) Indole-3-acetamide-dependent auxin biosynthesis: A widely distributed way of indole-3-acetic acid production? *Eur. J. Cell Biol.*, **89**(12), 895-905.
- Leyser, O.** (2011) Auxin, self-organisation, and the colonial nature of plants. *Curr. Biol.*, **21**(9), R331-7.
- Leyser, O.** (2005) Auxin distribution and plant pattern formation: How many angels can dance on the point of PIN? *Cell*, **121**(6), 819-822.
- Li, H. and Roux, S. J.** (1992) Casein kinase II protein kinase is bound to lamina-matrix and phosphorylates lamin-like protein in isolated pea nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**(18), 8434-8438.
- Litchfield, D.W.** (2003) Protein kinase CK2: Structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem. J.*, **369**(Pt 1), 1-15.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T. D.** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. *Methods*, **25**(4), 402-408.
- Ljung, K., Hull, A. K., Kowalczyk, M., Marchant, A., Celenza, J., Cohen, J. D. and Sandberg, G.** (2002) Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, **49**(3-4), 249-272.
- Ljung, K., Bhalerao, R. P. and Sandberg, G.** (2001) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *The Plant Journal*, **28**(4), 465-474.
- Ludwig-Müller, J.** (2011) Auxin conjugates: Their role for plant development and in the evolution of land plants. *J. Exp. Bot.*, **62**(6), 1757-1773.
- Ludwig-Müller, J.** (2000) Indole-3-butyric acid in plant growth and development. *Plant Growth Regulation*, **32**(2), 219-230.
- Ludwig-Müller, J., Sass, S., Sutter, E. G., Wodner, M. and Epstein, E.** (1993) Indole-3-butyric acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation*, **13**(2), 179-187.
- Lukashova, V., Szabó, E. Z., Jinadasa, T., Mokhov, A., Litchfield, D. W. and Orlowski, J.** (2011) CK2 phosphorylation of an acidic Ser/Thr di-isoleucine motif in the Na⁺/H⁺ exchanger NHE5 isoform promotes association with β -Arrestin2 and endocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, **286**(13), 11456-11468.
- Luschnig, C., Gaxiola, R. A., Grisafi, P. and Fink, G. R.** (1998) EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.*, **12**(14), 2175-2187.
- Mano, Y., Nemoto, K., Suzuki, M., Seki, H., Fujii, I. and Muranaka, T.** (2010) The AMI1 gene family: Indole-3-acetamide hydrolase functions in auxin biosynthesis in plants. *J. Exp. Bot.*, **61**(1), 25-32.
- Maridor, G., Park, W., Krek, W. and Nigg, E. A.** (1991) Casein kinase II. cDNA sequences, developmental expression, and tissue distribution of mRNAs for alpha, alpha', and beta subunits of the chicken enzyme. *J. Biol. Chem.*, **266**(4), 2362-2368.

- Marin, O., Meggio, F., Sarno, S. and Pinna, L. A.** (1997) Physical dissection of the structural elements responsible for regulatory properties and intersubunit interactions of protein kinase CK2 beta-subunit. *Biochemistry*, **36**(23), 7192-7198.
- Marin, O., Meggio, F., Sarno, S., Cesaro, L., Pagano, M. A. and Pinna, L. A.** (1999) Tyrosine versus serine/threonine phosphorylation by protein kinase casein kinase-2. A study with peptide substrates derived from immunophilin Fpr3. *J. Biol. Chem.*, **274**(41), 29260-29265.
- Marques-Bueno, M.M., Moreno-Romero, J., Abas, L., De Michele, R. and Martinez, M. C.** (2011) A dominant negative mutant of protein kinase CK2 exhibits altered auxin responses in arabidopsis. *Plant J.*, **67**(1), 169-180.
- Martinez, M.C., Jorgensen, J. E., Lawton, M. A., Lamb, C. J. and Doerner, P. W.** (1992) Spatial pattern of cdc2 expression in relation to meristem activity and cell proliferation during plant development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**(16), 7360-7364.
- Matsuoka, K., Bassham, D. C., Raikhel, N. V. and Nakamura, K.** (1995) Different sensitivity to wortmannin of two vacuolar sorting signals indicates the presence of distinct sorting machineries in tobacco cells. *The Journal of Cell Biology*, **130**(6), 1307-1318.
- Matsushita, Y., Ohshima, M., Yoshioka, K., Nishiguchi, M. and Nyunoya, H.** (2003) The catalytic subunit of protein kinase CK2 phosphorylates in vitro the movement protein of tomato mosaic virus. *J. Gen. Virol.*, **84**(Pt 2), 497-505.
- Meggio, F. and Pinna, L. A.** (2003) One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J.*, **17**(3), 349-368.
- Meggio, F., Shugar, D. and Pinna, L. A.** (1990) Ribofuranosyl-benzimidazole derivatives as inhibitors of casein kinase-2 and casein kinase-1. *Eur. J. Biochem.*, **187**(1), 89-94.
- Meier, I., Phelan, T., Gruissem, W., Spiker, S. and Schneider, D.** (1996) MFP1, a novel plant filament-like protein with affinity for matrix attachment region DNA. *Plant Cell*, **8**(11), 2105-2115.
- Menges, M., de Jager, S. M., Gruissem, W. and Murray, J. A.** (2005) Global analysis of the core cell cycle regulators of arabidopsis identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *Plant J.*, **41**(4), 546-566.
- Menkens, A.E., Schindler, U. and Cashmore, A. R.** (1995) The G-box: A ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins. *Trends Biochem. Sci.*, **20**(12), 506-510.
- Michalczyk, L., Ribnicky, D. M., Cooke, T. J. and Cohen, J. D.** (1992) Regulation of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in carrot cell cultures. *Plant Physiol.*, **100**(3), 1346-1353.
- Michniewicz, M., Zago, M. K., Abas, L., Weijers, D., Schweighofer, A., Meskiene, I., Heisler, M. G., Ohno, C., Zhang, J., Huang, F., Schwab, R., Weigel, D., Meyerowitz, E. M., Luschig, C., Offringa, R. and Friml, J.** (2007) Antagonistic regulation of PIN phosphorylation by PP2A and PINOID directs auxin flux. *Cell*, **130**(6), 1044-1056.
- Mikkelsen, M.D., Hansen, C. H., Wittstock, U. and Halkier, B. A.** (2000) Cytochrome P450 CYP79B2 from arabidopsis catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indole glucosinolates and indole-3-acetic acid. *J. Biol. Chem.*, **275**(43), 33712-33717.

- Monroe-Augustus, M., Zolman, B. K. and Bartel, B.** (2003) IBR5, a dual-specificity phosphatase-like protein modulating auxin and abscisic acid responsiveness in arabidopsis. *The Plant Cell Online*, **15**(12), 2979-2991.
- Moreno-Romero, J. and Martinez, M. C.** (2008) Is there a link between protein kinase CK2 and auxin signaling? *Plant. Signal. Behav.*, **3**(9), 695-697.
- Moreno-Romero, J., Armengot, L., Mar Marques-Bueno, M., Britt, A. and Carmen Martinez, M.** (2012) CK2-defective arabidopsis plants exhibit enhanced double-strand-break repair rates and reduced survival after exposure to ionizing radiation. *Plant J.*, .
- Moreno-Romero, J., Armengot, L., Marques-Bueno, M. M., Cadavid-Ordóñez, M. and Martínez, M. C.** (2011) About the role of CK2 in plant signal transduction. *Mol. Cell. Biochem.*, .
- Moreno-Romero, J., Espunya, M. C., Platara, M., Arino, J. and Martínez, M. C.** (2008) A role for protein kinase CK2 in plant development: Evidence obtained using a dominant-negative mutant. *Plant J.*, **55**(1), 118-130.
- Mouratou, B., Biou, V., Joubert, A., Cohen, J., Shields, D. J., Geldner, N., Jurgens, G., Melançon, P. and Cherfils, J.** (2005) The domain architecture of large guanine nucleotide exchange factors for the small GTP-binding protein arf. *BMC Genomics*, **6**, 20.
- Mravec, J., Kubes, M., Bielach, A., Gaykova, V., Petrasek, J., Skupa, P., Chand, S., Benkova, E., Zazimalova, E. and Friml, J.** (2008) Interaction of PIN and PGP transport mechanisms in auxin distribution-dependent development. *Development*, **135**(20), 3345-3354.
- Mravec, J., Skupa, P., Bailly, A., Hoyerova, K., Krecek, P., Bielach, A., Petrasek, J., Zhang, J., Gaykova, V., Stierhof, Y. D., Dobrev, P. I., Schwarzerova, K., Rolcik, J., Seifertova, D., Luschign, C., Benkova, E., Zazimalova, E., Geisler, M. and Friml, J.** (2009) Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter. *Nature*, **459**(7250), 1136-1140.
- Muday, G.K. and Murphy, A. S.** (2002) An emerging model of auxin transport regulation. *Plant Cell*, **14**(2), 293-299.
- Muller, A., Guan, C., Galweiler, L., Tanzler, P., Huijser, P., Marchant, A., Parry, G., Bennett, M., Wisman, E. and Palme, K.** (1998) AtPIN2 defines a locus of arabidopsis for root gravitropism control. *EMBO J.*, **17**(23), 6903-6911.
- Niefind, K., Raaf, J. and Issinger, O. G.** (2009) Protein kinase CK2 in health and disease: Protein kinase CK2: From structures to insights. *Cell Mol. Life Sci.*, **66**(11-12), 1800-1816.
- Niefind, K., Guerra, B., Ermakowa, I. and Issinger, O. G.** (2001) Crystal structure of human protein kinase CK2: Insights into basic properties of the CK2 holoenzyme. *EMBO J.*, **20**(19), 5320-5331.
- Niemes, S., Labs, M., Scheuring, D., Krueger, F., Langhans, M., Jesenofsky, B., Robinson, D. G. and Pimpl, P.** (2010a) Sorting of plant vacuolar proteins is initiated in the ER. *Plant J.*, **62**(4), 601-614.
- Niemes, S., Langhans, M., Viotti, C., Scheuring, D., San Wan Yan, M., Jiang, L., Hillmer, S., Robinson, D. G. and Pimpl, P.** (2010b) Retromer recycles vacuolar sorting receptors from the trans-golgi network. *Plant J.*, **61**(1), 107-121.

- Nieva, C., Busk, P. K., Dominguez-Puigjaner, E., Lumbreras, V., Testillano, P. S., Risueno, M. C. and Pages, M.** (2005) Isolation and functional characterisation of two new bZIP maize regulators of the ABA responsive gene rab28. *Plant Mol. Biol.*, **58**(6), 899-914.
- Normanly, J., Cohen, J. D. and Fink, G. R.** (1993) Arabidopsis thaliana auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**(21), 10355-10359.
- Ogrzewalla, K., Piotrowski, M., Reinbothe, S. and Link, G.** (2002) The plastid transcription kinase from mustard (*sinapis alba* L.). A nuclear-encoded CK2-type chloroplast enzyme with redox-sensitive function. *Eur. J. Biochem.*, **269**(13), 3329-3337.
- Ohtsuki, K., Nakamura, S., Shimoyama, Y., Shibata, D., Munakata, H., Yoshiki, Y. and Okubo, K.** (1995) A 96-kDa glycyrrhizin-binding protein (gp96) from soybeans acts as a substrate for casein kinase II, and is highly related to lipoxygenase 3. *J. Biochem.*, **118**(6), 1145-1150.
- Okada, K., Ueda, J., Komaki, M. K., Bell, C. J. and Shimura, Y.** (1991) Requirement of the auxin polar transport system in early stages of arabidopsis floral bud formation. *Plant Cell*, **3**(7), 677-684.
- Olsen, B.B., Guerra, B., Niefind, K. and Issinger, O. G.** (2010) Structural basis of the constitutive activity of protein kinase CK2. *Methods Enzymol.*, **484**, 515-529.
- Ortiz-Zapater, E., Soriano-Ortega, E., Marcote, M. J., Ortiz-Masia, D. and Aniento, F.** (2006) Trafficking of the human transferrin receptor in plant cells: Effects of tyrphostin A23 and brefeldin A. *Plant J.*, **48**(5), 757-770.
- Ostin, A., Kowalyczk, M., Bhalerao, R. P. and Sandberg, G.** (1998) Metabolism of indole-3-acetic acid in arabidopsis. *Plant Physiol.*, **118**(1), 285-296.
- Östin, A., Catalá, C., Chamarro, J. and Sandberg, G.** (1995) Identification of glucopyranosyl-?-1,4-glucopyranosyl-?-1-N-oxindole-3-acetyl-N-aspartic acid, a new IAA catabolite, by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, **30**(7), 1007-1017.
- Ouyang, J., Shao, X. and Li, J.** (2000) Indole-3-glycerol phosphate, a branchpoint of indole-3-acetic acid biosynthesis from the tryptophan biosynthetic pathway in arabidopsis thaliana. *Plant J.*, **24**(3), 327-333.
- Paciorek, T., Zazimalova, E., Ruthardt, N., Petrasek, J., Stierhof, Y. D., Kleine-Vehn, J., Morris, D. A., Emans, N., Jurgens, G., Geldner, N. and Friml, J.** (2005) Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. *Nature*, **435**(7046), 1251-1256.
- Padmanabha, R., Chen-Wu, J. L., Hanna, D. E. and Glover, C. V.** (1990) Isolation, sequencing, and disruption of the yeast CKA2 gene: Casein kinase II is essential for viability in *saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **10**(8), 4089-4099.
- Pagano, M.A., Sarno, S., Poletto, G., Cozza, G., Pinna, L. A. and Meggio, F.** (2005) Autophosphorylation at the regulatory beta subunit reflects the supramolecular organization of protein kinase CK2. *Mol. Cell. Biochem.*, **274**(1-2), 23-29.
- Paponov, I.A., Teale, W. D., Trebar, M., Blilou, I. and Palme, K.** (2005) The PIN auxin efflux facilitators: Evolutionary and functional perspectives. *Trends Plant Sci.*, **10**(4), 170-177.

- Perales, M., Portolés, S. and Más, P.** (2006) The proteasome-dependent degradation of CKB4 is regulated by the arabidopsis biological clock. *The Plant Journal*, **46**(5), 849-860.
- Perrot-Rechenmann, C.** (2010) Cellular responses to auxin: Division versus expansion. *Cold Spring Harb Perspect. Biol.*, **2**(5), a001446.
- Petersson, S.V., Johansson, A. I., Kowalczyk, M., Makoveychuk, A., Wang, J. Y., Moritz, T., Grebe, M., Benfey, P. N., Sandberg, G. and Ljung, K.** (2009) An auxin gradient and maximum in the arabidopsis root apex shown by high-resolution cell-specific analysis of IAA distribution and synthesis. *Plant Cell*, **21**(6), 1659-1668.
- Petrasek, J. and Friml, J.** (2009) Auxin transport routes in plant development. *Development*, **136**(16), 2675-2688.
- Petrasek, J., Mravec, J., Bouchard, R., Blakeslee, J. J., Abas, M., Seifertova, D., Wisniewska, J., Tadele, Z., Kubes, M., Covanova, M., Dhonukshe, P., Skupa, P., Benkova, E., Perry, L., Krecek, P., Lee, O. R., Fink, G. R., Geisler, M., Murphy, A. S., Luschig, C., Zazimalova, E. and Friml, J.** (2006) PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science*, **312**(5775), 914-918.
- Pinna, L.A.** (2002) Protein kinase CK2: A challenge to canons. *J. Cell. Sci.*, **115**(Pt 20), 3873-3878.
- Pinna, L.A.** (1997) Protein kinase CK2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **29**(4), 551-554.
- Pinna, L.A.** (1990) Casein kinase 2: An 'eminence grise' in cellular regulation? *Biochim. Biophys. Acta*, **1054**(3), 267-284.
- Pinna, L.A. and Allende, J. E.** (2009) Protein kinase CK2 in health and disease: Protein kinase CK2: An ugly duckling in the kinome pond. *Cell Mol. Life Sci.*, **66**(11-12), 1795-1799.
- Pinna, L.A. and Meggio, F.** (1997) Protein kinase CK2 ("casein kinase-2") and its implication in cell division and proliferation. *Prog. Cell Cycle Res.*, **3**, 77-97.
- Plana, M., Itarte, E., Eritja, R., Goday, A., Pages, M. and Martinez, M. C.** (1991) Phosphorylation of maize RAB-17 protein by casein kinase 2. *J. Biol. Chem.*, **266**(33), 22510-22514.
- Pollmann, S., Neu, D. and Weiler, E. W.** (2003) Molecular cloning and characterization of an amidase from arabidopsis thaliana capable of converting indole-3-acetamide into the plant growth hormone, indole-3-acetic acid. *Phytochemistry*, **62**(3), 293-300.
- Pollmann, S., Muller, A., Piotrowski, M. and Weiler, E. W.** (2002) Occurrence and formation of indole-3-acetamide in arabidopsis thaliana. *Planta*, **216**(1), 155-161.
- Rahman, A., Takahashi, M., Shibasaki, K., Wu, S., Inaba, T., Tsurumi, S. and Baskin, T. I.** (2010) Gravitropism of arabidopsis thaliana roots requires the polarization of PIN2 toward the root tip in meristematic cortical cells. *Plant Cell*, **22**(6), 1762-1776.
- Rahman, A., Bannigan, A., Sulaman, W., Pechter, P., Blancaflor, E. B. and Baskin, T. I.** (2007) Auxin, actin and growth of the arabidopsis thaliana primary root. *The Plant Journal*, **50**(3), 514-528.

- Ralet, M.C., Fouques, D., Leonil, J., Molle, D. and Meunier, J. C.** (1999) Soybean beta-conglycinin alpha subunit is phosphorylated on two distinct serines by protein kinase CK2 in vitro. *J. Protein Chem.*, **18**(3), 315-323.
- RAVEN, J.A.** (1975) TRANSPORT OF INDOLEACETIC ACID IN PLANT CELLS IN RELATION TO pH AND ELECTRICAL POTENTIAL GRADIENTS, AND ITS SIGNIFICANCE FOR POLAR IAA TRANSPORT. *New Phytol.*, **74**(2), 163-172.
- Reinhardt, ,Didier, Pesce, ,Eva-Rachele, Stieger, ,Pia, Mandel, ,Therese, Baltensperger, ,Kurt, Bennett, ,Malcolm, Traas, ,Jan, Friml, ,Jiri and Kuhlemeier, ,Cris** Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. .
- Richter, S., Geldner, N., Schrader, J., Wolters, H., Stierhof, Y. D., Rios, G., Koncz, C., Robinson, D. G. and Jurgens, G.** (2007) Functional diversification of closely related ARF-GEFs in protein secretion and recycling. *Nature*, **448**(7152), 488-492.
- Riera, M., Peracchia, G. and Pages, M.** (2001a) Distinctive features of plant protein kinase CK2. *Mol. Cell. Biochem.*, **227**(1-2), 119-127.
- Riera, M., Peracchia, G., de Nadal, E., Arino, J. and Pages, M.** (2001b) Maize protein kinase CK2: Regulation and functionality of three beta regulatory subunits. *Plant J.*, **25**(4), 365-374.
- Riov, J. and Bangerth, F.** (1992) Metabolism of auxin in tomato fruit tissue: Formation of high molecular weight conjugates of oxindole-3-acetic acid via the oxidation of indole-3-acetylaspatic acid. *Plant Physiol.*, **100**(3), 1396-1402.
- Robert, S., Kleine-Vehn, J., Barbez, E., Sauer, M., Paciorek, T., Baster, P., Vanneste, S., Zhang, J., Simon, S., Covanova, M., Hayashi, K., Dhonukshe, P., Yang, Z., Bednarek, S. Y., Jones, A. M., Luschnig, C., Aniento, F., Zazimalova, E. and Friml, J.** (2010) ABP1 mediates auxin inhibition of clathrin-dependent endocytosis in arabidopsis. *Cell*, **143**(1), 111-121.
- Robinson, D.G., Jiang, L. and Schumacher, K.** (2008) The endosomal system of plants: Charting new and familiar territories. *Plant Physiol.*, **147**(4), 1482-1492.
- Robinson, D.G., Pimpl, P., Scheuring, D., Stierhof, Y. D., Sturm, S. and Viotti, C.** (2012) Trying to make sense of retromer. *Trends Plant Sci.*, .
- Rubery, P.H. and Sheldrake, A. R.** (1974) Carrier-mediated auxin transport. *Planta*, **118**(2), 101-121.
- Ruiz Rosquete, M., Barbez, E. and Kleine-Vehn, J.** (2011) Cellular auxin homeostasis: Gatekeeping is housekeeping. *Mol. Plant.*, .
- Růžička, K., Šimášková, M., Duclercq, J., Petrášek, J., Zažímalová, E., Simon, S., Friml, J., Van Montagu, M. C. E. and Benková, E.** (2009) Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**(11), 4284-4289.
- Ruzzene, M. and Pinna, L. A.** (2010) Addiction to protein kinase CK2: A common denominator of diverse cancer cells? *Biochim. Biophys. Acta*, **1804**(3), 499-504.
- Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., Benfey, P., Leyser, O., Bechtold, N., Weisbeek, P. and Scheres, B.** (1999) An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the arabidopsis root. *Cell*, **99**(5), 463-472.

- Salinas, P., Bantignies, B., Tapia, J., Jordana, X. and Holuigue, L.** (2001) Cloning and characterization of the cDNA coding for the catalytic alpha subunit of CK2 from tobacco. *Mol. Cell. Biochem.*, **227**(1-2), 129-135.
- Salinas, P., Fuentes, D., Vidal, E., Jordana, X., Echeverria, M. and Holuigue, L.** (2006) An extensive survey of CK2 alpha and beta subunits in arabidopsis: Multiple isoforms exhibit differential subcellular localization. *Plant Cell Physiol.*, **47**(9), 1295-1308.
- Samaniego, R., Jeong, S. Y., de la Torre, C., Meier, I. and Moreno Diaz de la Espina, S.** (2006) CK2 phosphorylation weakens 90 kDa MFP1 association to the nuclear matrix in allium cepa. *J. Exp. Bot.*, **57**(1), 113-124.
- Sarno, S., Marin, O., Ghisellini, P., Meggio, F. and Pinna, L. A.** (1998) Biochemical evidence that the N-terminal segments of the alpha subunit and the beta subunit play interchangeable roles in the activation of protein kinase CK2. *FEBS Lett.*, **441**(1), 29-33.
- Sarno, S., Vaglio, P., Meggio, F., Issinger, O. G. and Pinna, L. A.** (1996) Protein kinase CK2 mutants defective in substrate recognition. purification and kinetic analysis. *J. Biol. Chem.*, **271**(18), 10595-10601.
- Sarno, S., Reddy, H., Meggio, F., Ruzzene, M., Davies, S. P., Donella-Deana, A., Shugar, D. and Pinna, L. A.** (2001) Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, an ATP site-directed inhibitor of protein kinase CK2 ('casein kinase-2'). *FEBS Lett.*, **496**(1), 44-48.
- Sarno, S., Moro, S., Meggio, F., Zagotto, G., Dal Ben, D., Ghisellini, P., Battistutta, R., Zanotti, G. and Pinna, L. A.** (2002) Toward the rational design of protein kinase casein kinase-2 inhibitors. *Pharmacol. Ther.*, **93**(2-3), 159-168.
- Sarno, S., de Moliner, E., Ruzzene, M., Pagano, M. A., Battistutta, R., Bain, J., Fabbro, D., Schoepfer, J., Elliott, M., Furet, P., Meggio, F., Zanotti, G. and Pinna, L. A.** (2003) Biochemical and three-dimensional-structural study of the specific inhibition of protein kinase CK2 by [5-oxo-5,6-dihydroindolo-(1,2-a)quinazolin-7-yl]acetic acid (IQA). *Biochem. J.*, **374**(Pt 3), 639-646.
- Sauer, M. and Kleine-Vehn, J.** (2011) AUXIN BINDING PROTEIN1: The outsider. *Plant Cell*, .
- Sauer, M., Balla, J., Luschnig, C., Wisniewska, J., Reinohl, V., Friml, J. and Benkova, E.** (2006) Canalization of auxin flow by Aux/IAA-ARF-dependent feedback regulation of PIN polarity. *Genes Dev.*, **20**(20), 2902-2911.
- Saxena, A., Padmanabha, R. and Glover, C. V.** (1987) Isolation and sequencing of cDNA clones encoding alpha and beta subunits of drosophila melanogaster casein kinase II. *Mol. Cell. Biol.*, **7**(10), 3409-3417.
- Scherer G?nther F., E., Labusch, C. and Effendi, Y.** Phospholipases and the network of auxin signal transduction with ABP1 and TIR1 as two receptors: A comprehensive and provocative model. .
- Scott, G.K., Fei, H., Thomas, L., Medigeshi, G. R. and Thomas, G.** (2006) A PACS-1, GGA3 and CK2 complex regulates CI-MPR trafficking. *EMBO J.*, **25**(19), 4423-4435.
- Seaman, M.N.** (2005) Recycle your receptors with retromer. *Trends Cell Biol.*, **15**(2), 68-75.
- Seidel, C., Walz, A., Park, S., Cohen, J. D. and Ludwig-Muller, J.** (2006) Indole-3-acetic acid protein conjugates: Novel players in auxin homeostasis. *Plant. Biol. (Stuttg)*, **8**(3), 340-345.

- Shugar, D.** (1994) Development of inhibitors of protein kinases CKI and CKII and some related aspects, including donor and acceptor specificities and viral protein kinases. *Cell. Mol. Biol. Res.*, **40**(5-6), 411-419.
- Simon, S. and Petrasek, J.** (2011) Why plants need more than one type of auxin. *Plant Sci.*, **180**(3), 454-460.
- Spitzer, C., Reyes, F. C., Buono, R., Sliwinski, M. K., Haas, T. J. and Otegui, M. S.** (2009) The ESCRT-related CHMP1A and B proteins mediate multivesicular body sorting of auxin carriers in arabidopsis and are required for plant development. *Plant Cell*, **21**(3), 749-766.
- Staswick, P.E., Tiryaki, I. and Rowe, M. L.** (2002) Jasmonate response locus JAR1 and several related arabidopsis genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *Plant Cell*, **14**(6), 1405-1415.
- St-Denis, N.A. and Litchfield, D. W.** (2009) Protein kinase CK2 in health and disease: From birth to death: The role of protein kinase CK2 in the regulation of cell proliferation and survival. *Cell Mol. Life Sci.*, **66**(11-12), 1817-1829.
- Steinmann, T., Geldner, N., Grebe, M., Mangold, S., Jackson, C. L., Paris, S., Galweiler, L., Palme, K. and Jurgens, G.** (1999) Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science*, **286**(5438), 316-318.
- Stepanova, A.N., Robertson-Hoyt, J., Yun, J., Benavente, L. M., Xie, D. Y., Dolezal, K., Schlereth, A., Jurgens, G. and Alonso, J. M.** (2008) TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell*, **133**(1), 177-191.
- Stepansky, A., Less, H., Angelovici, R., Aharon, R., Zhu, X. and Galili, G.** (2006) Lysine catabolism, an effective versatile regulator of lysine level in plants. *Amino Acids*, **30**(2), 121-125.
- Stöckli, J., Höning, S. and Rohrer, J.** (2004) The acidic cluster of the CK2 site of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor (CD-MPR) but not its phosphorylation is required for GGA1 and AP-1 binding. *Journal of Biological Chemistry*, **279**(22), 23542-23549.
- Strader, L.C. and Bartel, B.** (2011) Transport and metabolism of the endogenous auxin precursor indole-3-butyric acid. *Mol. Plant.*, **4**(3), 477-486.
- Strader, L.C. and Bartel, B.** (2009) The arabidopsis PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE8/ABCG36 ATP binding cassette transporter modulates sensitivity to the auxin precursor indole-3-butyric acid. *The Plant Cell Online*, **21**(7), 1992-2007.
- Sugano, S., Andronis, C., Ong, M. S., Green, R. M. and Tobin, E. M.** (1999) The protein kinase CK2 is involved in regulation of circadian rhythms in arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**(22), 12362-12366.
- Sugano, S., Andronis, C., Green, R. M., Wang, Z. Y. and Tobin, E. M.** (1998) Protein kinase CK2 interacts with and phosphorylates the arabidopsis circadian clock-associated 1 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**(18), 11020-11025.
- Sugawara, S., Hishiyama, S., Jikumaru, Y., Hanada, A., Nishimura, T., Koshiba, T., Zhao, Y., Kamiya, Y. and Kasahara, H.** (2009) Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**(13), 5430-5435.

- Swarup, K., Benkova, E., Swarup, R., Casimiro, I., Peret, B., Yang, Y., Parry, G., Nielsen, E., De Smet, I., Vanneste, S., Levesque, M. P., Carrier, D., James, N., Calvo, V., Ljung, K., Kramer, E., Roberts, R., Graham, N., Marillonnet, S., Patel, K., Jones, J. D., Taylor, C. G., Schachtman, D. P., May, S., Sandberg, G., Benfey, P., Friml, J., Kerr, I., Beekman, T., Laplaze, L. and Bennett, M. J.** (2008) The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nat. Cell Biol.*, **10**(8), 946-954.
- Swarup, R., Friml, J., Marchant, A., Ljung, K., Sandberg, G., Palme, K. and Bennett, M.** (2001) Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the arabidopsis root apex. *Genes Dev.*, **15**(20), 2648-2653.
- Szemenyi, H., Hannon, M. and Long, J. A.** (2008) TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during arabidopsis embryogenesis. *Science*, **319**(5868), 1384-1386.
- Tam, Y.Y., Epstein, E. and Normanly, J.** (2000) Characterization of auxin conjugates in arabidopsis. low steady-state levels of indole-3-acetyl-aspartate, indole-3-acetyl-glutamate, and indole-3-acetyl-glucose. *Plant Physiology*, **123**(2), 589-596.
- Tan, X., Calderon-Villalobos, L. I., Sharon, M., Zheng, C., Robinson, C. V., Estelle, M. and Zheng, N.** (2007) Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature*, **446**(7136), 640-645.
- Tanaka, H., Dhonukshe, P., Brewer, P. and Friml, J.** (2006) Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: A means to coordinate plant development. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **63**(23), 2738-2754.
- Tanaka, H., Kitakura, S., De Rycke, R., De Groodt, R. and Friml, J.** (2009) Fluorescence imaging-based screen identifies ARF GEF component of early endosomal trafficking. *Curr. Biol.*, **19**(5), 391-397.
- Tao, Y., Ferrer, J. L., Ljung, K., Pojer, F., Hong, F., Long, J. A., Li, L., Moreno, J. E., Bowman, M. E., Ivans, L. J., Cheng, Y., Lim, J., Zhao, Y., Ballare, C. L., Sandberg, G., Noel, J. P. and Chory, J.** (2008) Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell*, **133**(1), 164-176.
- Teh, O.K. and Moore, I.** (2007) An ARF-GEF acting at the golgi and in selective endocytosis in polarized plant cells. *Nature*, **448**(7152), 493-496.
- Thomsen, M.S., Franssen, L., Launholt, D., Fojan, P. and Grasser, K. D.** (2004) Interactions of the basic N-terminal and the acidic C-terminal domains of the maize chromosomal HMGB1 protein. *Biochemistry*, **43**(25), 8029-8037.
- Tian, Q. and Reed, J. W.** (1999) Control of auxin-regulated root development by the arabidopsis thaliana SHY2/IAA3 gene. *Development*, **126**(4), 711-721.
- Tian, Q., Uhlir, N. J. and Reed, J. W.** (2002) Arabidopsis SHY2/IAA3 inhibits auxin-regulated gene expression. *Plant Cell*, **14**(2), 301-319.
- Titapiwatanakun, B., Blakeslee, J. J., Bandyopadhyay, A., Yang, H., Mravec, J., Sauer, M., Cheng, Y., Adamec, J., Nagashima, A., Geisler, M., Sakai, T., Friml, J., Peer, W. A. and Murphy, A. S.** (2009) ABCB19/PGP19 stabilises PIN1 in membrane microdomains in arabidopsis. *The Plant Journal*, **57**(1), 27-44.

- Tjaden, G. and Coruzzi, G. M.** (1994) A novel AT-rich DNA binding protein that combines an HMG I-like DNA binding domain with a putative transcription domain. *Plant Cell*, **6**(1), 107-118.
- Tognetti, V.B., Van Aken, O., Morreel, K., Vandenbroucke, K., van de Cotte, B., De Clercq, I., Chiwocha, S., Fenske, R., Prinsen, E., Boerjan, W., Genty, B., Stubbs, K. A., Inze, D. and Van Breusegem, F.** (2010) Perturbation of indole-3-butyric acid homeostasis by the UDP-glucosyltransferase UGT74E2 modulates arabidopsis architecture and water stress tolerance. *Plant Cell*, **22**(8), 2660-2679.
- Tosoni, K., Costa, A., Sarno, S., D'Alessandro, S., Sparla, F., Pinna, L. A., Zottini, M. and Ruzzene, M.** (2011) The p23 co-chaperone protein is a novel substrate of CK2 in arabidopsis. *Mol. Cell. Biochem.*, .
- Tremli, B.S., Winderl, S., Radykewicz, R., Herz, M., Schweizer, G., Hutzler, P., Glawischmig, E. and Ruiz, R. A.** (2005) The gene ENHANCER OF PINOID controls cotyledon development in the arabidopsis embryo. *Development*, **132**(18), 4063-4074.
- Tromas, A., Braun, N., Muller, P., Khodus, T., Paponov, I. A., Palme, K., Ljung, K., Lee, J. -, Benfey, P., Murray, J. A. H., Scheres, B. and Perrot-Rechenmann, C.** (2009) The AUXIN BINDING PROTEIN 1 is required for differential auxin responses mediating root growth. *PLoS ONE*, **4**(9).
- Tuazon, P.T. and Traugh, J. A.** (1991) Casein kinase I and II--multipotential serine protein kinases: Structure, function, and regulation. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.*, **23**, 123-164.
- Tuominen, H., Ostin, A., Sandberg, G. and Sundberg, B.** (1994) A novel metabolic pathway for indole-3-acetic acid in apical shoots of populus tremula (L.) x populus tremuloides (michx.). *Plant Physiol.*, **106**(4), 1511-1520.
- Tuteja, N., Beven, A. F., Shaw, P. J. and Tuteja, R.** (2001) A pea homologue of human DNA helicase I is localized within the dense fibrillar component of the nucleolus and stimulated by phosphorylation with CK2 and cdc2 protein kinases. *Plant J.*, **25**(1), 9-17.
- Tuteja, N., Reddy, M. K., Mudgil, Y., Yadav, B. S., Chandok, M. R. and Sopory, S. K.** (2003) Pea DNA topoisomerase I is phosphorylated and stimulated by casein kinase 2 and protein kinase C. *Plant Physiol.*, **132**(4), 2108-2115.
- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G. and Guilfoyle, T. J.** (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell*, **9**(11), 1963-1971.
- Umeda, M., Manabe, Y. and Uchimiya, H.** (1997) Phosphorylation of the C2 subunit of the proteasome in rice (oryza sativa L.). *FEBS Lett.*, **403**(3), 313-317.
- Vaglio, P., Sarno, S., Marin, O., Meggio, F., Issinger, O. G. and Pinna, L. A.** (1996) Mapping the residues of protein kinase CK2 alpha subunit responsible for responsiveness to polyanionic inhibitors. *FEBS Lett.*, **380**(1-2), 25-28.
- Vanneste, S. and Friml, J.** (2009) Auxin: A trigger for change in plant development. *Cell*, **136**(6), 1005-1016.
- Vanneste, S., De Rybel, B., Beemster, G. T., Ljung, K., De Smet, I., Van Isterdael, G., Naudts, M., Iida, R., Gruijsem, W., Tasaka, M., Inze, D., Fukaki, H. and Beeckman, T.** (2005) Cell cycle progression in the pericycle is not sufficient for SOLITARY ROOT/IAA14-mediated lateral root initiation in arabidopsis thaliana. *Plant Cell*, **17**(11), 3035-3050.

- Vernoux, T., Brunoud, G., Farcot, E., Morin, V., Van den Daele, H., Legrand, J., Oliva, M., Das, P., Larrieu, A., Wells, D., Guedon, Y., Armitage, L., Picard, F., Guyomarc'h, S., Cellier, C., Parry, G., Koumproglou, R., Doonan, J. H., Estelle, M., Godin, C., Kepinski, S., Bennett, M., De Veylder, L. and Traas, J.** (2011) The auxin signalling network translates dynamic input into robust patterning at the shoot apex. *Mol. Syst. Biol.*, **7**, 508.
- Verrier, P.J., Bird, D., Burla, B., Dassa, E., Forestier, C., Geisler, M., Klein, M., Kolukisaoglu, Ü., Lee, Y., Martinoia, E., Murphy, A., Rea, P. A., Samuels, L., Schulz, B., Spalding, E. P., Yazaki, K. and Theodoulou, F. L.** (2008) Plant ABC proteins – a unified nomenclature and updated inventory. *Trends Plant Sci.*, **13**(4), 151-159.
- Vieten, A., Sauer, M., Brewer, P. B. and Friml, J.** (2007) Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development. *Trends Plant Sci.*, **12**(4), 160-168.
- Vilk, G., Saulnier, R. B., St Pierre, R. and Litchfield, D. W.** (1999) Inducible expression of protein kinase CK2 in mammalian cells. evidence for functional specialization of CK2 isoforms. *J. Biol. Chem.*, **274**(20), 14406-14414.
- Viotti, C., Bubeck, J., Stierhof, Y. D., Krebs, M., Langhans, M., van den Berg, W., van Dongen, W., Richter, S., Geldner, N., Takano, J., Jurgens, G., de Vries, S. C., Robinson, D. G. and Schumacher, K.** (2010) Endocytic and secretory traffic in arabidopsis merge in the trans-golgi network/early endosome, an independent and highly dynamic organelle. *Plant Cell*, **22**(4), 1344-1357.
- Watson, R.T., Kanzaki, M. and Pessin, J. E.** (2004) Regulated membrane trafficking of the insulin-responsive glucose transporter 4 in adipocytes. *Endocr. Rev.*, **25**(2), 177-204.
- Willemsen, V., Friml, J., Grebe, M., van den Toorn, A., Palme, K. and Scheres, B.** (2003) Cell polarity and PIN protein positioning in arabidopsis require STEROL METHYLTRANSFERASE1 function. *Plant Cell*, **15**(3), 612-625.
- Wilson, L.K., Dhillon, N., Thorner, J. and Martin, G. S.** (1997) Casein kinase II catalyzes tyrosine phosphorylation of the yeast nucleolar immunophilin Fpr3. *J. Biol. Chem.*, **272**(20), 12961-12967.
- Wirkner, U., Voss, H., Ansorge, W. and Pyerin, W.** (1998) Genomic organization and promoter identification of the human protein kinase CK2 catalytic subunit alpha (CSNK2A1). *Genomics*, **48**(1), 71-78.
- Wirkner, U., Voss, H., Lichter, P., Weitz, S., Ansorge, W. and Pyerin, W.** (1992) Human casein kinase II subunit alpha: Sequence of a processed (pseudo)gene and its localization on chromosome 11. *Biochim. Biophys. Acta*, **1131**(2), 220-222.
- Wisniewska, J., Xu, J., Seifertova, D., Brewer, P. B., Ruzicka, K., Bliilou, I., Rouquie, D., Benkova, E., Scheres, B. and Friml, J.** (2006) Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science*, **312**(5775), 883.
- Woodward, A.W. and Bartel, B.** (2005) Auxin: Regulation, action, and interaction. *Ann. Bot.*, **95**(5), 707-735.
- Xie, Q., Frugis, G., Colgan, D. and Chua, N. H.** (2000) Arabidopsis NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes Dev.*, **14**(23), 3024-3036.

- Xu, T., Wen, M., Nagawa, S., Fu, Y., Chen, J. G., Wu, M. J., Perrot-Rechenmann, C., Friml, J., Jones, A. M. and Yang, Z.** (2010) Cell surface- and rho GTPase-based auxin signaling controls cellular interdigitation in arabidopsis. *Cell*, **143**(1), 99-110.
- Xu, X., Toselli, P. A., Russell, L. D. and Seldin, D. C.** (1999) Globozoospermia in mice lacking the casein kinase II alpha' catalytic subunit. *Nat. Genet.*, **23**(1), 118-121.
- Xue, H., Pical, C., Brearley, C., Elge, S. and Müller-Röber, B.** (1999) A plant 126-kDa phosphatidylinositol 4-kinase with a novel repeat structure. *Journal of Biological Chemistry*, **274**(9), 5738-5745.
- Yamada, M., Greenham, K., Prigge, M. J., Jensen, P. J. and Estelle, M.** (2009) The TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE2 gene is required for auxin synthesis and diverse aspects of plant development. *Plant Physiol.*, **151**(1), 168-179.
- Yan, T.F. and Tao, M.** (1982) Purification and characterization of a wheat germ protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **257**(12), 7037-7043.
- Yang, H. and Murphy, A. S.** (2009) Functional expression and characterization of arabidopsis ABCB, AUX 1 and PIN auxin transporters in schizosaccharomyces pombe. *The Plant Journal*, **59**(1), 179-191.
- Yang, Y., Hammes, U. Z., Taylor, C. G., Schachtman, D. P. and Nielsen, E.** (2006) High-affinity auxin transport by the AUX1 influx carrier protein. *Current Biology*, **16**(11), 1123-1127.
- Zandomeni, R., Zandomeni, M. C., Shugar, D. and Weinmann, R.** (1986) Casein kinase type II is involved in the inhibition by 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole of specific RNA polymerase II transcription. *J. Biol. Chem.*, **261**(7), 3414-3419.
- Zazimalova, E., Murphy, A. S., Yang, H., Hoyerova, K. and Hosek, P.** (2010) Auxin transporters—why so many? *Cold Spring Harb Perspect. Biol.*, **2**(3), a001552.
- Zegzouti, H., Anthony, R. G., Jahchan, N., Bogre, L. and Christensen, S. K.** (2006) Phosphorylation and activation of PINOID by the phospholipid signaling kinase 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) in arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**(16), 6404-6409.
- Zhao, Y.** (2010) Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **61**, 49-64.
- Zhao, Y., Christensen, S. K., Fankhauser, C., Cashman, J. R., Cohen, J. D., Weigel, D. and Chory, J.** (2001) A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science*, **291**(5502), 306-309.