

Una de les grans fonts de joia a la vida és la satisfacció de la curiositat mateixa.

L. Pauling

1.- INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

La cèl·lula reacciona a canvis en el seu entorn, detectant aquests canvis i adaptant-se a les noves condicions. La cèl·lula actua com a **sensor** i com a **emissor** de senyals, integrant-los i donant una resposta adaptativa adequada. L'evolució ha dotat als organismes uni i pluricel·lulars de complexos sistemes de recepció i emissió de senyals, que s'integren en xarxes de comunicació conegudes com a **vies de transducció de senyals**. Les vies de transducció de senyals han d'integrar molts estímuls, aturant i/o engegant diferents processos cel·lulars per tal de mantenir l'homeòstasi cel·lular. Cal tenir en compte que un mateix estímul pot donar lloc a respostes cel·lulars molt diferents depenent del tipus cel·lular o que fins i tot un mateix processament del senyal pot tenir efectes diversos segons la proteïna diana. Dins les vies de transducció de senyals, la fosforilació i la desfosforilació juguen un paper principal. Es calcula que existeixen unes 1000 quinases i unes 500 fosfatases codificades en el genoma humà (Cohen, 2000). Aproximadament el 30% de les proteïnes cel·lulars estan fosforilades i nivells anormals de fosforilació poden ser la causa de diferents patologies.

1.1 Fosforilació de proteïnes

La fosforilació de proteïnes, és a dir la introducció d'una o més molècules de fosfat en una proteïna, és un dels sistemes de regulació de l'activitat cel·lular més importants que es coneixen. És una reacció universal present en el metabolisme cel·lular tant de procariotes com d'eucariotes. És una reacció energèticament **poc costosa, amplificable, diversificable**, molt **específica** i **reversible**. La fosforilació i la desfosforilació són sistemes de regulació àmpliament distribuïts a la cèl·lula, tant pel que fa a comunicació amb el medi extern com pel que fa a cascades de senyalització intracel·lulars. La fosforilació pot canviar l'activitat biològica intrínseca d'una proteïna, la seva localització subcel·lular, el temps de vida mitja o la capacitat d'associar-se amb altres molècules (Cohen, 2000).

La reacció de fosforilació està catalitzada per proteïna quinases (EC 2.7.1) i es defineix com la transferència del fosfat γ d'un nucleòtid trifosfat a residus aminoacídics d'una proteïna o pèptid, formant un enllaç fosfomonoéster (Sefton et

Introducció

al., 1998). En la Figura 1 es mostra el mecanisme catalític general mitjançant el qual es pot fosforilar un substrat.

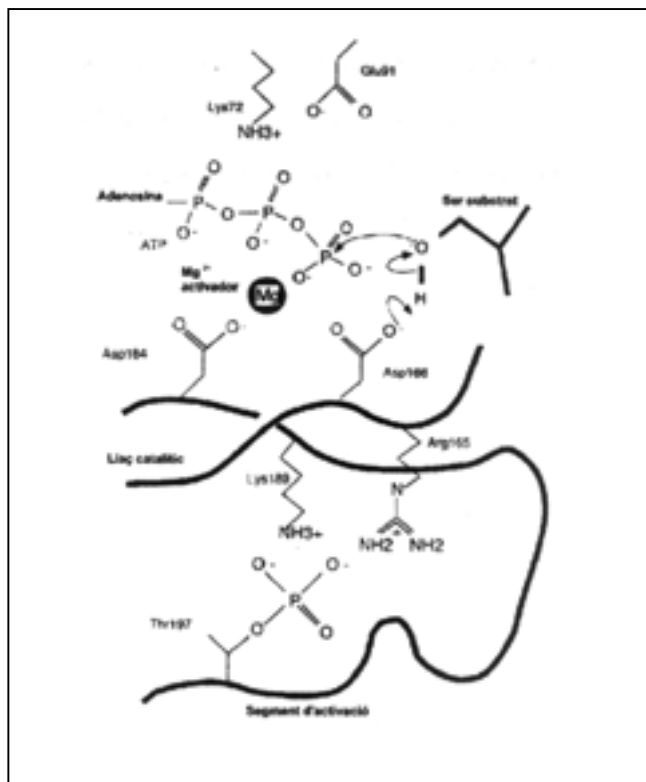


Figura 1. Mecanisme de catàlisi de les proteïna quinases (exemple extret de la PKA). De Johnson et al., 1996.

Els fosfats de l'ATP s'alineen amb el nitrogen de la Lys72 localitzada en un llaç ric en glicines (posicionada pel pont salí amb el Glu91) i per interacció amb cations bivalents. El catió més important interacciona amb els fosfats β i γ de l'ATP i amb l'Asp184. L'aspàrtic catalític conservat en totes les quinases (Asp166 en la PKA), actuaria com una base arrencant un protó de l'hidroxil del substrat. L'alcoholat o fenolat resultant atacaria al fosfat γ de l'ATP. És també determinant la fosforilació de la Thr197 del llaç d'activació ja que així la càrrega de l'Arg165 queda inactivada i l'aspàrtic catalític pot realitzar la seva funció.

Totes les quinases utilitzen ATP com a nucleòtid donador de fosfat encara que en alguns casos també poden utilitzar GTP, i necessiten de la presència de cations bivalents per dur a terme la reacció (Mg^{2+} o Mn^{2+}). Com hem esmentat anteriorment les proteïna quinases són específiques, és a dir fosforilen determinats residus envoltats per seqüències concretes d'aminoàcids; així doncs es

parla de **seqüències consens de fosforilació** quan en un substrat proteic està present una seqüència mínima de fosforilació determinada.

Les proteïna quinases es classifiquen segons el residu acceptor del fosfat (serina/treonina quinases EC 2.7.10 i proteïna tirosina quinases EC 2.7.11) o es poden classificar en famílies basant-se en la conservació evolutiva de la seva seqüència aminoacídica (Hanks et al., 1995). Així tenim la superfamília de les proteïna quinases eucariotes amb un domini catalític (domini quinasa) d'uns 250-290 AA amb característiques comunes conservades (Hanks et al., 1991). El domini quinasa està dividit en 12 subdominis que en major o menor grau estan conservats en totes les quinases eucariotes. A nivell estructural sembla que l'homologia dels dominis catalítics de les proteïna quinases faria que el seu plegament fos similar; les quinases cristal·litzades fins ara corroboren aquesta suposició i així trobem que els subdominis catalítics s'estructuren en dos grans dominis estructurals: un domini N-terminal ric en fulles β i un domini C-terminal ric en hèlix α ; entre els dos dominis trobaríem el lloc d'unió del nucleòtid i el lloc d'unió del substrat (veure com a exemple d'estructura d'una quinasa la Figura 4).

La superfamília de quinases eucariotes es pot dividir en grups, així trobem el grup **AGC** (inclou les famílies de quinases regulades per nucleòtids cíclics PKA, PKG i PKC), el grup **CaMK** (inclou la família de quinases regulades per calci i calmodulina) i el **grup CMGC** en el que es troba inclosa la **família de la CK2** i on també hi trobem la família de les CDKs, de les MAPK i de la GSK3.

Existeixen molts altres grups que inclouen altres famílies de quinases que no enumerarem en aquest treball però que es poden consultar al treball de Hanks et al., 1995.

1.2 Caseïna quinases

Tot i fer gairebé 50 anys des que es va descriure per primera vegada l'activitat caseïna quinasa (Burnet et al., 1954) encara ara es coneixen poques dades sobre els seus sistemes de regulació. L'activitat caseïna quinasa compren dues quinases, la CK1 i la CK2 anomenades així per que s'elueixen en aquest ordre d'una columna de DEAE-cel·lulosa, la CK1 a 0.3 M NaCl i la CK2 a 0.4 M NaCl. Aquestes dues quinases tot i anomenar-se caseïna quinases no són les responsables de la fosforilació fisiològica de la caseïna, que és duta a terme per un enzim

específic de glàndula mamària anomenat GEF-CK. La nomenclatura històrica de caseïna quinases tendeix a eliminar-se i s'ha proposat anomenar-les **proteïna quinases CK1 i CK2** per evitar confusions sobre la seva funció fisiològica.

La CK1 compren una família d'enzims monomèrics que fosforilen residus de serina i que utilitzen exclusivament ATP com a donador de fosfats. La seqüència consens de fosforilació és XS(P)/EXXSX sent la segona serina el residu fosforilat. Són una família d'enzims presents en tots els organismes eucariotes estudiats i amb una distribució ubiqua (per una revisió veure Tuazon et al., 1991).

1.3 Proteïna quinasa CK2

1.3.1 Característiques generals

La proteïna quinasa CK2 és una Ser/Thr quinasa, ubiqua en organismes eucariotes i altament conservada, que té com a seqüència consens de fosforilació **XXS/T-XX-E/D**, amb el residu acídic a la posició $n + 3$ com a determinant més característic. Presenta una sèrie de característiques funcionals poc usuals, com el fet que pot utilitzar, com a mínim *in vitro*, tant ATP com GTP com a donadors de fosfat amb unes K_m força similars (10 i 20 μM respectivament) i que l'enzim és constitutivament actiu. Algunes de les seves peculiaritats funcionals ha estat explicada a partir de la resolució de l'estructura tridimensional de la subunitat catalítica de *Zea mays* l'any 1998 (Niefind et al., 1998). És una proteïna quinasa amb més de 150 substrats descrits (veure Taula 1 a l'apartat 1.3.7), que ha estat implicada en múltiples processos cel·lulars bàsics com proliferació, càncer, control transcripcional, transducció de senyals etc. però de la que se'n desconeixen els sistemes de regulació. No respon a segons missatgers clàssics com Ca^{2+} , nucleòtids cíclics o fosfolípids ni està integrada en una via concreta de transducció de senyal.

L'enzim natiu en la seva forma més habitual és un tetràmer format per dues subunitats catalítiques (α i/o α') i dues subunitats reguladores (β) amb masses moleculars en organismes animals entre 36 i 44 kDa la subunitat α (44 kDa la proteïna humana) i de 24 a 26 kDa la subunitat β (26 kDa la proteïna humana). La α' té una massa entre 37 i 42 kDa (38 kDa la proteïna humana) (Pinna, 1990). En *Saccharomyces cerevisiae* s'han descrit dues subunitats β diferents de 41 i 32 kDa (Bidwai et al., 1994) i en *Zea mays* i *Arabidopsis thaliana* s'han descrit tres

subunitats β diferents amb masses moleculars al voltant de 30 kDa (Sugano et al., 1999, Riera et al., 2001). En *Xenopus* i *Drosophila* no s'han descrit subunitats α' (Allende et al., 1995).

Les subunitats α i α' són catalíticament actives per si soles mentre que la subunitat β que no té activitat catalítica, confereix especificitat, una major estabilitat a la subunitat α i un augment o disminució de l'activitat segons l'acceptor de fosfats (Meggio et al., 1992, Issinger et al. 1992).

1.3.2 La subunitat catalítica CK2 α

Com ja ha estat mencionat anteriorment la subunitat catalítica de l'enzim natiu pot ser tant α com α' . El menor pes molecular de la α' és degut a una seqüència primària més curta, que en humans és de 350 AA enfront dels 391 AA de la α . Les seqüències estan molt conservades entre elles si exceptuem el fragment C-terminal, absent en α' , donant un 88% d'homologia entre les alfes humanes (veure Figura 2 més endavant).

La subunitat α ha estat descrita en tots els organismes eucariotes estudiats mentre que la α' no s'ha trobat a *Xenopus* ni a *Drosophila* (Allende et al., 1995). En organismes on ambdues subunitats són presents, sembla que s'expressa més una o l'altra depenent del teixit, és a dir que la seva expressió sembla estar regulada d'alguna manera. Tot i que l'abundància relativa d'una o altra varia segons el teixit, és freqüent detectar totes dues subunitats catalítiques, p.ex. en cor i melsa de pollastre s'expressen nivells alts de CK2 α i baixos de CK2 α' .

Malgrat la seva alta homologia la α' presenta algunes característiques bioquímiques distintives. El pI de la CK2 α' és de 8.3 mentre que el de la CK2 α està entre 7.6-7.8 (Bodenbach et al., 1994) i l'estabilitat tèrmica de la CK2 α' és més gran que la de la CK2 α (Antonelli et al., 1996). Pel que fa a l'activitat catalítica la subunitat CK2 α' sembla que ser més sensible a les concentracions de sal a l'assaig, sensibilitat que es posa encara més de manifest en presència de subunitat β (Antonelli et al., 1996).

Cada subunitat catalítica està codificada per un gen diferent, que en el cas de la CK2 α d'humans està localitzat al cromosoma 20 (locus 20p13). S'ha descrit l'existència d'un pseudogen processat de la CK2 α al cromosoma 11 (locus 11p15) del que fins ara no s'han trobat transcrits, però del que no se'n pot descartar l'expressió (Wirkner et al., 1992). El gen que codifica per la CK2 α' humana està

Introducció

localitzat al cromosoma 16 (locus 16p13) (Yang-Feng et al., 1991). El promotor del gen de la CK2 α presenta les característiques típiques d'un *housekeeping gene*, és a dir un alt contingut en GC, falta de caixa TATA i presència de múltiples caixes GC (Pyerin, 1994). A nivell transcripcional la regulació de l'expressió de CK2 α no ha estat massa estudiada però el que si s'ha observat és que la CK2 α (però no la CK2 α') s'uneix al promotor del gen de CK2 β i n'estimula l'expressió (Robitzki et al., 1993; Pyerin, 1994).

Tot i les diferències entre CK2 α i α' fins ara no s'ha assignat un paper específic a cada una d'elles i sembla que l'holoenzim realitza les seves funcions indistintament tant si hi ha α com si hi ha α' present. Malgrat aquest solapament funcional, s'ha descrit que la transfecció amb un mutant inactiu de CK2 α' però no amb un mutant inactiu de CK2 α , provoca una inhibició de la proliferació cel·lular (Vilk et al., 1999), fet que indica una possible especificitat funcional.

Donada l'alta homologia de seqüència, sembla lògic pensar que les possibles diferències funcionals haurien d'estar associades a l'extrem C-terminal absent en la CK2 α' . Experiments *in vitro*, utilitzant una forma degradada de CK2 α a la que li falten uns 50 AA demostren que la seva activitat no varia (Guerra et al., 1999a), per tant el domini C-terminal ha de fer unes funcions diferents de les de modulació de l'activitat.

La seqüència primària de la CK2 α (també de CK2 α') està molt conservada, p.ex. trobem un 98% d'homologia entre la proteïna humana i la de pollastre i un 90% d'homologia entre els primers 328 residus de la proteïna humana i la de *Drosophila melanogaster*. La conservació evolutiva de la CK2 α és d'esperar en un enzim que té funcions vitals per la cèl·lula com s'ha demostrat en llevats, on la deleció dels gens que codifiquen per α i α' és letal (Padmanabha et al., 1990). A més de la conservació de la seqüència primària, existeix una conservació funcional ja que la CK2 α de llevat pot ser substituïda per la CK2 α humana o de *C. elegans* i realitzar les mateixes funcions (Dotan et al., 2001).

Recentment s'ha descrit l'existència d'una tercera isoforma de la subunitat catalítica de CK2, que s'ha anomenat CK2 α'' (Shi et al., 2001) que presenta un 91% d'identitat amb la CK2 α . Les seqüències de les dues isoformes són idèntiques fins a l'AA 353, exceptuant un sol residu a la posició 127 (Thr a Ala). A partir del residu 353 les dues isoformes són totalment diferents (Figura 2). L'activitat catalítica de l'enzim amb subunitat α'' és comparable a la de l'enzim amb la subunitat α o α' per tant es confirmaria que les diferències en l'extrem C-terminal no estarien

Introducció

En la CK2 α'' la Thr127 està substituïda per una Ala i en la CK2 α' per una Ile tot i que la seqüència adjacent en ambdues isoformes està molt conservada. La CK2 α es pot modificar per fosforilació i/o autofosforilació. L'autofosforilació és molt dèbil quan la subunitat no està associada amb la subunitat β i quan aquesta hi és present, policions com la polilisina estimulen l'autofosforilació de manera considerable. S'ha descrit la Thr127 de la CK2 α com a possible centre d'autofosforilació que no existiria en la α' i la α'' , podent ésser una forma de regulació de l'activitat catalítica dependent de la isoforma.

Recentment s'ha descrit una activitat d'autofosforilació de la CK2 α atípica. Sembla que tant la CK2 α com la CK2 α' es poden autofosforilar en residus de tirosina (concretament en la Tyr182), tot i que el significat funcional d'aquest tipus de fosforilació no ha estat explicat (Donella-Deana et al., 2001).

Les característiques estructurals essencials de la seqüència primària de la subunitat catalítica, exemplificades en la CK2 α humana, es mostren a la Figura 3.

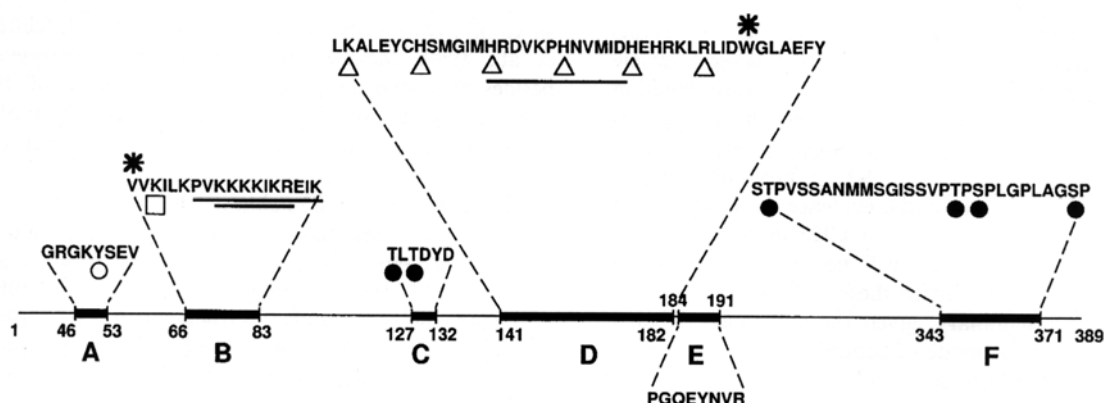


Figura 3. Resum de característiques estructurals destacades de la CK2 α . (de Blanquet, 2000). El domini A conté una Tyr fosforilable (○); el domini B conté la Lys 68 (□) i la Val66 (*) implicades en la unió de l'ATP i subratllats l'*stretch* bàsic i la NLS; el domini C conté dues Thr corresponents als residus d'autofosforilació (●); el domini D conté 6 residus bàsics implicats en el reconeixement de substrats (Δ) i el llaç catalític (subratllat), també hi trobem el Trp176 (*) implicat en la unió del nucleòtid; el domini F conté 4 residus potencials de fosforilació (●) per p34^{cdc2}.

A continuació es detallen característiques estructurals i funcionals associades a regions concretes de la seqüència primària de la CK2 α mostrada a la Figura 2:

- **Domini A:** Aquest segment N-terminal, també anomenat llaç de glicines, contacta amb el fosfat β de l'ATP i està implicat en el reconeixement de substrats. Té dos residus destacables: una lisina que contribueix al reconeixement del determinant acídic a la posició $n + 2$ del substrat i una serina que apropa les molècules d'aigua a l'ATP per a la posterior hidròlisi. La tirosina és un lloc potencial de fosforilació que en la família de les CDKs es fosforila.

- **Domini B:** En aquesta regió hi trobem un grup de residus bàsics (74-80) que està implicat en la interacció amb la CK2 β i en el procés de *downregulation* mediat per CK2 β . Aquests residus també s'han implicat en la inhibició per heparina i semblen intervenir en la interacció amb hsp90 (Miyata et al., 1995) i nucleolina (Li et al., 1996). El fragment delimitat pels residus 79-83 intervé en el reconeixement del substrat ja que interacciona amb el residu $n + 3$ (Sarno et al., 1996). D'altra banda aquesta regió conté una seqüència canònica de localització nuclear (NLS) que podria estar implicada en el transport de la subunitat catalítica a nucli (Rihis et al., 1991; Nigg et al., 1991). Per últim conté un residu altament conservat entre les CK2 α de diferents organismes però que és diferent de la resta de quinases eucariotes i que junt amb un altre residu de la regió D, són residus clau en la unió del complex nucleòtid-Mg²⁺: la Val66 i el Trp176 en CK2 α (Ala66 i Phe176 en la resta de quinases) que podrien ser la clau de la capacitat de la CK2 d'utilitzar indistintament ATP i GTP (Jakobi et al., 1992).

- **Domini C:** Conté el centre d'autofosforilació T127TDYD130 (•) tot i que el significat fisiològic de l'autofosforilació es desconeix.

- **Domini D:** En aquesta regió trobem una histidina (His160), que reemplaça un glutàmic en la resta de Ser/Thr quinases, seguida de 5 residus bàsics més, espaiats de forma regular, que estarien implicats en el reconeixement de les regions acídiques dels substrats. En aquesta regió hi trobem també el llaç catalític (subratllat).

- **Domini E:** Aquesta regió delimitada pels residus 184-191, és el que s'anomena llaç d'activació i en la CK2 a diferència d'altres quinases del mateix grup no presenta llocs de fosforilació. La fosforilació en residus de treonina (p.ex. MAPK) és un pas clau per desplaçar el llaç del centre actiu i activar la quinasa. En la CK2 el llaç d'activació sempre estaria en una conformació oberta i podria explicar el fet que és una quinasa constitutivament activa.

- **Domini F:** En aquest domini trobem quatre possibles centres de fosforilació per p34^{cdc2} (●). En cèl·lules aturades en la fase M del cicle cel·lular la CK2 α es

Introducció

troba fosforilada i sembla que aquesta fosforilació és deguda a la p34^{cdc2} (Litchfield et al., 1992).

La informació estructural de que es disposa des de la resolució de l'estructura de la CK2 α de blat de moro, ha explicat algunes de les característiques distintives d'aquesta quinasa (Niefind et al., 1998). El fet que la seqüència estigui molt conservada entre espècies fa pensar que es pot extrapolar la informació extreta de la resolució de l'estructura en blat de moro, a les CK2 α d'altres espècies. Cal remarcar que la CK2 α de blat de moro té una seqüència primària 60 AA més curta que la humana, i que tot i així és capaç de formar un holoenzim amb activitat normal si es reconstitueix amb la CK2 β humana (Boldyreff et al., 1993a). En la Figura 4 es mostra un model tridimensional de la CK2 α en el que podem destacar d'entrada, l'estructura bilobulada característica de les quinases de la família eucariota amb un domini N-terminal ric en fulles β , un domini C-terminal ric en hèlix α i el seti actiu de l'enzim entre els dos lòbuls. L'altra característica que es pot observar és que la quinasa està en una conformació **activa**, en la qual el segment d'activació contacta amb la regió N-terminal que sembla que faria una funció similar a la ciclina A, que en el cas de la cdk2 manté a la quinasa en una conformació activa. El segment N-terminal també contacta amb l'hèlix C, una regió característica de la CK2 que està implicada en la unió d'heparina, en la *downregulation* per β i en el reconeixement de determinants acídics dels substrats. L'altra característica de la CK2 que hem destacat al llarg de la introducció, és la capacitat d'utilitzar tant **ATP com GTP** com a donadors de fosfat. Aquest fet, observat des de la perspectiva estructural, es pot explicar per l'existència d'un residu de triptòfan (Trp176) entre les fulles $\beta 8$ i $\beta 9$ (en la resta de quinases és una fenilalanina), per l'existència d'una isoleucina en la posició 66 (en la resta de quinases és una alanina) i per la orientació de l'hèlix D. Aquests tres canvis permeten que el nucleòtid es posi de forma més flexible i així tant l'ATP com el GTP, poden entrar al seti actiu.

El Trp176 forma un pont d'hidrogen amb la Leu173 de forma que el segment d'activació està estabilitzat per una constricció interna. Aquest fet, juntament amb els contactes del segment d'activació amb l'extrem N-terminal són importants per explicar el fet que la CK2 sigui constitutivament activa.

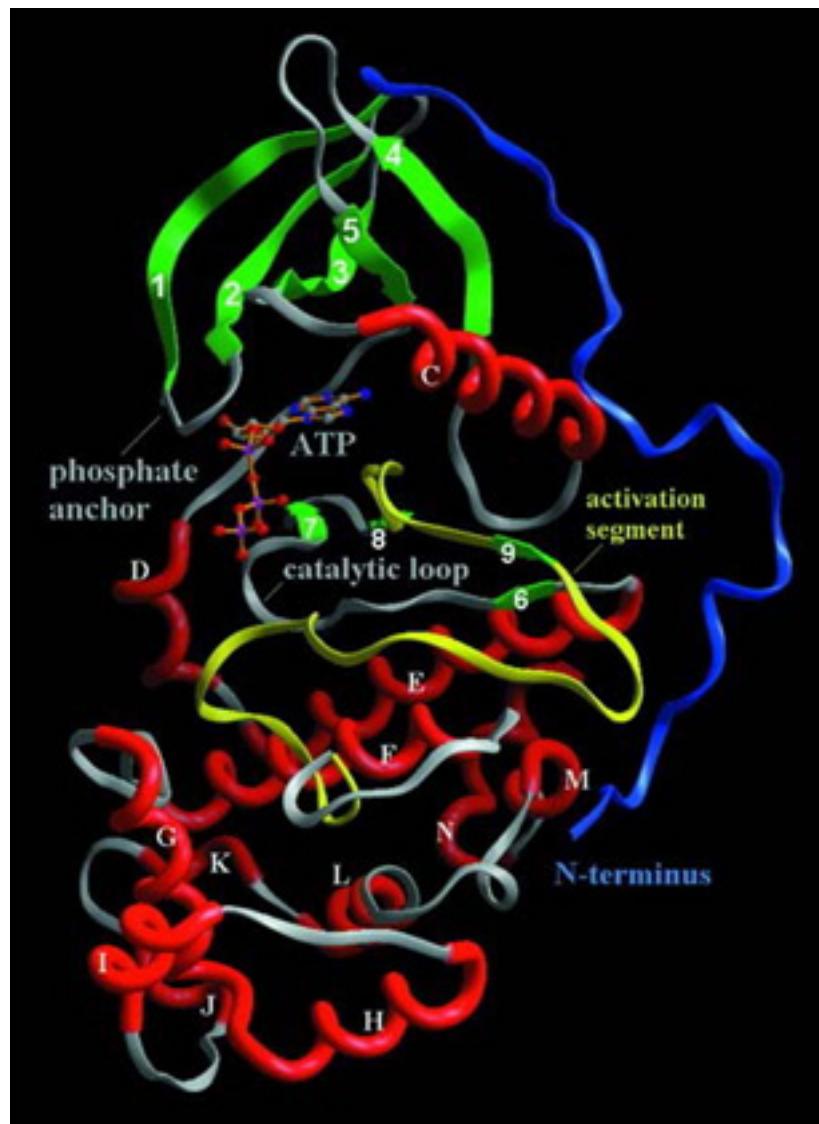


Figura 4. Estructura tridimensional de la CK2 α de blat de moro amb l'ATP unit al seti actiu (de Niefind et al., 1998).

1.3.3 La subunitat reguladora CK2 β

La subunitat β de la CK2 és un polipèptid de 215 residus en humans, que no té capacitat catalítica per ella mateixa però que afecta a l'estabilitat, especificitat i activitat de la CK2 amb la qual s'associa per formar l'holoenzim (Meggio et al., 1992; Issinger et al., 1992). La seqüència de la CK2 β ha estat molt conservada al llarg de l'evolució p.ex. la seqüència de la proteïna humana, de ratolí, porc i pollastre són idèntiques i difereixen en un sol aminoàcid amb la CK2 β de *Xenopus*. No presenta homologia amb cap altre proteïna dipositada als bancs de dades exceptuant la proteïna producte del gen *stellate* (*Ste*) de *Drosophila melanogaster* i del producte de dos gens homòlegs al gen *stellate*, localitzats al cromosoma Y de *Drosophila*, que es considera que actuen com a supressors de *Ste* (*SuSte*). L'homologia entre CK2 β i *Ste* és del 38% i entre CK2 β i *SuSte* és del 28%. La proteïna *Ste* s'acumula en mascles als que els falta el cromosoma Y i quan és present *in vitro* en excés respecte a CK2 α , és capaç de dur a terme varies de les funcions de la CK2 β (Bozzetti et al., 1995). El gen que codifica per la CK2 β humana està localitzat al cromosoma 6 (locus 6p21.1).

Les característiques estructurals essencials de la seqüència primària de la subunitat β , exemplificades en la CK2 β humana, es mostren a la Figura 5.

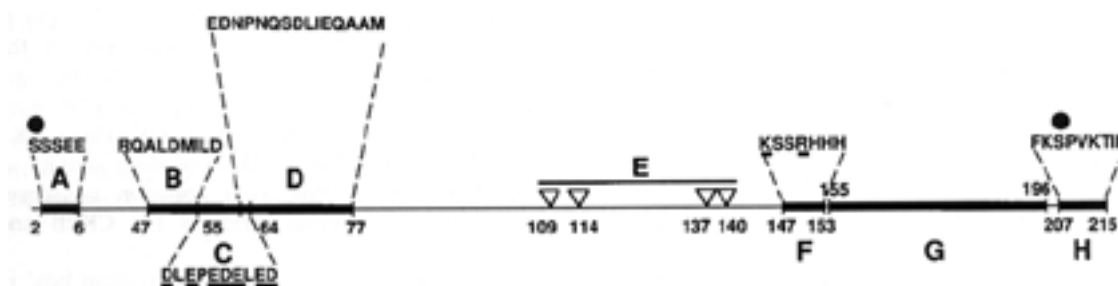


Figura 5. Resum de característiques estructurals destacades de la CK2 β . (de Blanquet, 2000). El domini A conté com a mínim una Ser fosforilable (●) per la CK2 α (autofosforilació); el domini B és homòleg a un motiu "caixa de destrucció"; el domini C conté molts residus acídics; el domini D té homologia amb els dominis d'unió a calci; el domini E conté 4 cisteïnes (∇) implicades en la formació d'un dit de zinc; el domini F és un NLS putatiu; el domini G està implicat en la dimerització α - β ; en el domini H trobem una acumulació de càrrega positiva i una Ser fosforilable (●).

- **Domini A:** aquest domini constitueix una regió pseudosubstrat de CK2 α i conté els centres d'autofosforilació Ser-2 i Ser-3 (Boldyreff et al., 1993b; Bodenbach et al., 1994). No està clar el significat funcional que pot tenir l'autofosforilació de CK2 β ja que no sembla tenir cap efecte sobre l'activitat de CK2. D'altra banda aquesta regió sembla la responsable de l'associació de CK2 amb Nopp140 i el receptor CD5 (Li et al., 1997; Raman et al., 1998). Aquesta regió també seria la responsable d'inhibir la unió a DNA del dímers de Max (Berberich et al., 1992).

- **Domini B:** aquesta regió de la proteïna conté una caixa de destrucció similar a la de les ciclins (Glutzer et al., 1991). Les ciclins són subunitats reguladores de les CDKs i estan subjectes a una regulació molt fina mitjançant proteòlisi dirigida per les caixes de destrucció. Això suggereix que la CK2 β es podria comportar com una ciclina de la CK2 α (Allende et al., 1995), tot i així no hi ha dades experimentals que donin suport a aquesta hipòtesi.

- **Domini C:** conté un grup de residus acídics i és la regió responsable de la *downregulation* de CK2 i de la regulació mediada per poliamines (Boldyreff et al., 1993a; Leroy et al., 1994; Leroy et al., 1997). D'altra banda sembla que aquesta regió podria intervenir en l'associació de l'holoenzim amb la membrana plasmàtica (Sarrouilhe et al., 1998).

- **Domini D:** des del residu 62 al 77 trobem una regió similar al domini d'unió a calci de la tubulina (Serrano et al., 1986).

- **Domini E:** les quatre cisteïnes contingudes en aquesta regió formen un dit de zinc atípic (no forma les clàssiques hèlixs α sinó tres fulles β) i té una estructura semblant al factor d'elongació TFII. Els dits de zinc estan implicats en la dimerització de CK2 β (Chantalat et al., 1999). Aquests dits de zinc també es troben presents en la proteïna Ste (Reed et al., 1994).

- **Domini F:** la seqüència delimitada en aquesta regió conté una NLS putativa que podria dirigir a la CK2 β o a l'holoenzim a nucli (Boulikas et al. 1996).

- **Domini G:** aquesta regió està implicada en la associació β - β , l'associació α - β i en la interacció amb A-Raf (Boldyreff et al., 1997).

- **Domini H:** l'extrem C-terminal conté la Ser209 que és fosforilada *in vitro* i *in vivo* per la p34^{cdc2} (Litchfield et al., 1992; Litchfield et al., 1995).

Estudis de cristal·lografia (Chantalat et al., 1999) utilitzant una forma truncada de CK2 β , a la que li falten 33 residus de l'extrem C-terminal, han

Introducció

determinat que la proteïna existeix en forma dimèrica. Cada monòmer està estructurat en dos dominis: un domini d'hèlix α i un domini de fulles β amb un àtom de Zn^{2+} coordinat amb 4 residus de cisteïna. Els dits de zinc interaccionen per formar el dímer, bàsicament a través d'interaccions hidrofòbiques (Figura 6).

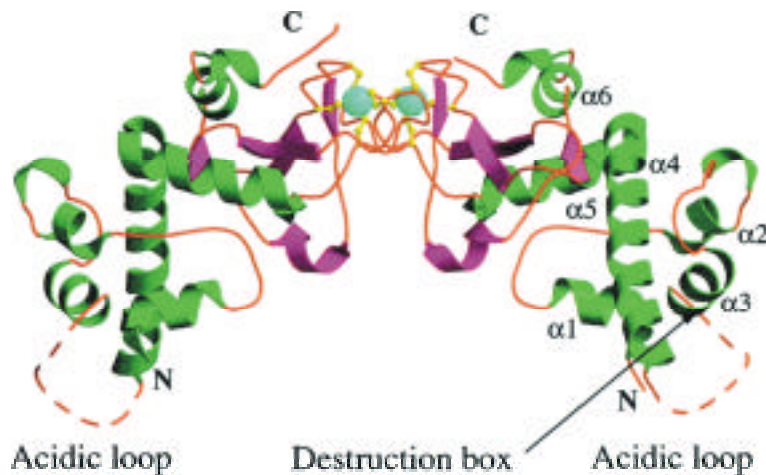


Figura 6. Representació de cintes del dímer de CK2 β . Les hèlixs α i les hèlixs 3-10 estan representades en verd, les fulles β en rosa i els loops en taronja. Els àtoms de Zn i les Cys es mostren en blau i groc respectivament.

1.3.4 La formació de l'heterotetràmer $\alpha_2\beta_2$

L'enzim purificat de diferents eucariotes presenta, generalment, l'estructura d'un heterotetràmer d'un pes molecular aproximat de 130,000 Da. Estudis realitzats utilitzant tècniques d'immunoprecipitació i de doble híbrid mostren que les subunitats catalítiques depenen de les subunitats reguladores per formar el tetràmer (Gietz et al., 1995; Kusk et al., 1995). Els experiments de doble híbrid han demostrat que es donen interaccions entre les subunitats β - β i α - β , però no existeix interacció directa entre subunitats α . En la Figura 7 es mostra un model d'holoenzim, proposat a partir de les diferents dades experimentals.

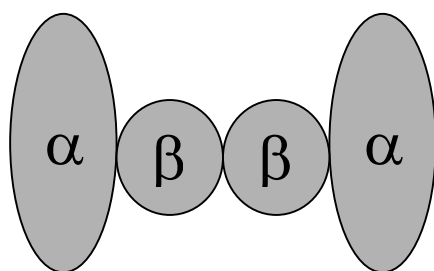


Figura 7. Model d'oligomerització de la proteïna quinasa CK2 (de Gietz et al., 1995).

El model indirecte mostrat a la Figura 7 s'apropa molt al model obtingut a partir de la cristal·lització de l'holoenzim humà. La interacció $CK2\alpha$ - $CK2\beta$ es produeix per la cua C-terminal de la subunitat $CK2\beta$ (residus 180-200) i sembla que cada subunitat $CK2\beta$ contacta amb una altra subunitat β i amb les dues subunitats α (Niefind et al., 2001). Tot i així cal dir que l'holoenzim no s'ha pogut cristal·litzar amb la $CK2\alpha$ intacta sinó que s'ha utilitzat una $CK2\alpha$ degradada a la que li falten 40 residus de l'extrem C-terminal. Aquesta aproximació s'ha utilitzat degut a la gran inestabilitat de la $CK2\alpha$ de mamífer que es degrada a formes de menor pes molecular al llarg del procés de purificació (Guerra et al., 2001).

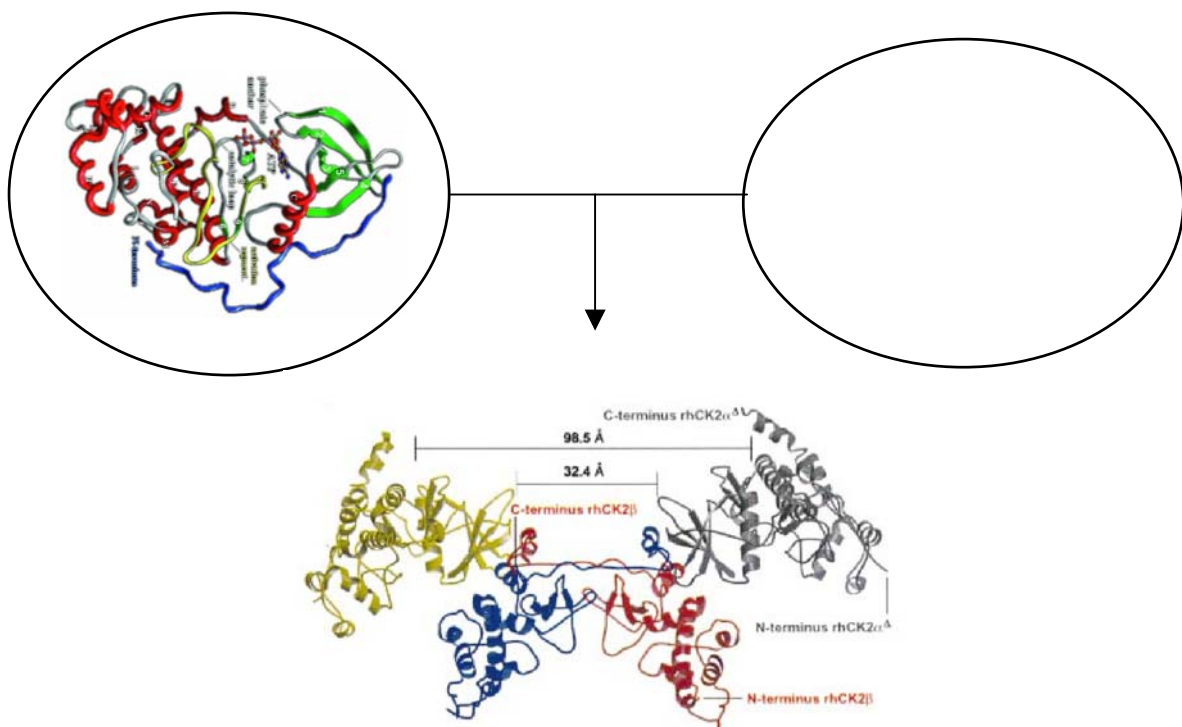


Figura 8. Estructura tridimensional de la proteïna quinasa CK2 (de Niefind et al., 2001).

La proteïna quinasa CK2 té la capacitat de formar estructures d'ordre superior depenent de la força iònica del medi; així doncs a concentracions altes de sal (0.5 M NaCl) la CK2 existeix com a tetràmer; a forces iòniques menors (0.2 M NaCl) els tetràmers s'associen de quatre en quatre per formar estructures en forma d'anell presentant activitat catalítica màxima; a concentracions de sal menors de 0.1 M apareixen estructures en forma de filaments prim i llargs (polímers de tetràmers) o curts i gruixuts (polímers d'anells). Sembla que les estructures en forma d'anell són les catalíticament actives *in vitro* i s'especula

sobre la possibilitat que la formació d'estructures d'ordre superior sigui un sistema de regulació de l'activitat CK2 (Leroy et al., 1994; Valero et al., 1995).

La unió de les subunitats β a les subunitats α per formar l'holoenzim, canvia considerablement les seves propietats bioquímiques. Així doncs, tot i que la CK2 α o α' tenen activitat catalítica quan estan aïllades, la unió a β modifica l'activitat enzimàtica segurament per alteració de l'estructura terciària de CK2 α (Jakobi et al., 1994). En la majoria dels casos la subunitat β incrementa entre 5 i 10 vegades l'activitat de CK2 α tot i que p.ex. en el cas de la calmodulina succeeix a l'inrevés (veure l'apartat de substrats). L'activació o inhibició de l'activitat s'ha atribuït a diferents regions de CK2 β : l'extrem C-terminal seria responsable dels efectes activadors (Marin et al., 1995) i la zona àcida (AA 55-64) la responsable dels efectes inhibidors (Leroy et al., 1997). La subunitat β , a través del seu extrem N-terminal, és també la responsable de la capacitat activadora de l'espermina (Leroy et al., 1994).

D'altra banda la subunitat β protegeix a la subunitat α enfront de desnaturalització per urea, per calor i enfront de proteòlisi per tripsina; per tant el fet de formar part de l'holoenzim proporciona avantatges a la subunitat catalítica i a més permet una modulació de la seva activitat (Meggio et al., 1992).

Existeixen treballs que descriuen l'existència de CK2 α lliure de CK2 β , associada a altres proteïnes com p.ex. l'eIF2 β (Gil et al., 1996) o la PP2Ac (Heriché et al., 1997) però altres estudis semblen indicar que en situacions normals la majoria de la CK2 α està associada a la CK2 β . Diferents estudis indiquen que la CK2 β és sintetitzada en excés (Litchfield et al., 1993) i que la que no s'associa a CK2 α és ràpidament degradada. Tot i així també hi ha treballs que descriuen l'associació de la CK2 β a altres proteïnes, per exemple a A-Raf (Boldyreff et al., 1997) i a Mos (Chen et al., 1997).

En testicles de *Drosophila* s'han descrit dues isoformes de CK2 β específiques d'aquest teixit que mostren les propietats bioquímiques característiques de la CK2 β però que és específica de teixit i que sembla estar implicada en espermatogènesi (Kalmykova et al., 2002).

1.3.5 Inhibidors i activadors de CK2

Com ja s'ha esmentat al llarg de la introducció els mecanismes de regulació de la CK2 encara no es coneixen. És una quinasa constitutivament activa i tant la

fosforilació per altres quinases com l'autofosforilació no regulen la seva activitat. D'altra banda l'associació amb la subunitat reguladora CK2 β proporciona un sistema de **modulació** de l'activitat més que una activació o inactivació del tot o res com succeeix amb altres quinases.

S'han descrit diferents compostos que funcionen com a activadors o inhibidors alguns dels quals poden tenir rellevància fisiològica i d'altres poden ser utilitzats com a eines per l'estudi de la regulació de CK2. Entre els activadors trobem substàncies de naturalesa policatiònica com l'**espermina** (poliamina) i la **polilisina**. Les poliamines són molècules alifàtiques petites, solubles en aigua i a pH fisiològic tots els seus grups amino estan carregats positivament. El rang de concentracions fisiològiques és de l'ordre de nanomolar (p.ex. en cervell humà hi ha entre 8.5-146 nmols d'espermina per gram de teixit). La regulació per poliamines pot tenir significat fisiològic ja que en cèl·lules en divisió (p.ex. cèl·lules tumorals o embrionàries) els nivells de poliamines augmenten principalment per síntesis *de novo*. La concentració de poliamines també varia al llarg del cicle cel·lular així doncs, en la línia cel·lular de tabac BY2 s'han correlacionat les oscil·lacions en activitat CK2 que es produeixen al llarg del cicle cel·lular, amb oscil·lacions paral·leles en la concentració intracel·lular de les poliamines putrescina i espermidina (Espunya et al., 1999). Els efectes dels activadors policatiònics però, varien molt segons el substrat; aquest és el cas de la calmodulina que no és fosforilada per l'holoenzim si no és en presència de polilisina i en canvi si que ho fa la CK2 α sola. Un fet a remarcar és que la CK2 fosforila *in vitro* dos enzims claus del metabolisme de les poliamines: l'ornitina descarboxilasa (Reddy et al., 1996) i l'espermidina/espermina N-acetiltransferasa (Bordin et al., 1996) tot i que no s'ha pogut demostrar que la fosforilació afecti a l'activitat d'aquests enzims.

Pel que fa als inhibidors en trobem de dos tipus: els polianions com l'heparina i els anàlegs d'ATP. L'**heparina** és un inhibidor molt potent a concentracions en el rang de nanomolar; el significat fisiològic d'aquest fet però no sembla tenir molta rellevància ja que només en cèl·lules hepàtiques trobem concentracions d'heparina que podrien afectar a l'activitat CK2. Els anàlegs d'ATP tenen només interès experimental i alguns dels més utilitzats són: el **DRB** (5,6-diclororibofuranosilbenzimidazol), el **LY294002** o l'**apigenina** (per una revisió veure Shugar et al., 1994; Davies et al., 2000).

Els polipèptids rics en residus acídics que contenen tirosines també són bons inhibidors de la CK2 i per tant es pot pensar que proteïnes riques en residus acídics podrien actuar també com a inhibidors.

1.3.6 Localització subcel·lular de CK2

La localització de la CK2 dins la cèl·lula és un dels aspectes més controvertits pel que fa a aquesta quinasa. Sembla que és un enzim predominantment nuclear i citoplasmàtic tot i que s'ha trobat també associat a altres fraccions subcel·lulars com reticle endoplasmàtic (Sfeir et al., 1995; Trujillo et al., 1997; Faust et al., 2001), aparell de Golgi (Mauxion et al., 1996) o membrana plasmàtica (Sarroiulhe et al., 1998). Dins el nucli sembla que la CK2 està associada preferentment amb la matriu nuclear (MN) i la cromatina (Guo et al., 2001).

Molts substrats de CK2 tenen una localització nuclear i molts d'altres tenen una localització citoplasmàtica (veure Taula 1). Per conciliar aquestes dades tant variables s'ha postulat que la localització subcel·lular de la CK2 es regula segons l'estat de la cèl·lula; així tindriem que en estats de proliferació la CK2 es localitzaria bàsicament al nucli i en estats quiescents es localitzaria a citoplasma (Issinger, 1993) i que aquesta redistribució es produiria en resposta a determinats estímuls proliferatius com p.ex. en resposta a andrògens que indueixen una ràpida translocació de CK2 de citoplasma a nucli en un model de cèl·lules epitelials (Guo et al., 2001). Tant la CK2 α com la CK2 β tenen seqüències putatives de localització nuclear (NLS) en les seves seqüències primàries i podria ser que quan les cèl·lules entren en el cicle cel·lular des d'un estat quiescent, la CK2 es transloqués a nucli (Tawfic et al., 1994). Estudis de fraccionament subcel·lular i immunocitoquímica no han aconseguit demostrar una ubicació exclusiva de la CK2.

1.3.7 Substrats i *partners* de CK2

Com s'ha esmentat anteriorment la seqüència consens de fosforilació per CK2 és **S/T-X-X-E/D**, on el residu acídic de la posició **n + 3** pot ser glutàmic o aspàrtic o també pot ser fosfoserina o fosfotirosina. Pel que fa a la posició **n + 1** sembla que una prolina en aquesta posició no afavoreix la fosforilació per CK2. L'observació que residus prèviament fosforilats són determinants específics per la CK2, és interessant ja que suggereix que algunes proteïnes són fosforilades per

CK2 només quan prèviament han estat fosforilades per un altre quinasa, el que seria un exemple de **fosforilació jeràrquica** (Litchfield et al., 1993).

Per la realització d'aquest treball s'han recollit dades bibliogràfiques que descriuen la fosforilació per CK2, de més de 150 proteïnes diferents, la majoria de les quals no s'ha demostrat que siguin fosforilades *in vivo* (Taula 1). Trobem proteïnes substrat implicades en processos cel·lulars molt diferents tot i que la major part es poden distribuir en dos grans grups: proteïnes nuclears implicades en la replicació i transcripció del DNA i proteïnes víriques que normalment estan implicades en la replicació i transcripció de les proteïnes víriques.

L'efecte fisiològic de la fosforilació per CK2 només s'ha determinat en alguns casos. Un exemple n'és la topoisomerasa II que incrementa l'activitat decatenadora quan està fosforilada. Pels factors de transcripció s'ha descrit que, en alguns casos, la fosforilació augmenta l'afinitat pel DNA p.ex. la p53 o la disminueix p.ex. c-Myb o Max. En altres casos la fosforilació per CK2 sembla provocar canvis en la degradació de proteïnes substrat com és el cas de l'ornitina descarboxilasa (Reddy et al., 1996) o de PTEN (Torres et al., 2001) que en ser fosforilats incrementen la seva estabilitat intracel·lular o de I κ B α en que la fosforilació afavoreix la seva degradació (McElhinny et al., 1996). En el cas de l'antigen T del virus SV40 la fosforilació per CK2 incrementa la velocitat de translocació a nucli (Rihis et al., 1991).

El gran nombre de substrats que controlen la replicació i transcripció del DNA junt amb els estudis que indiquen que l'activitat CK2 és elevada en cèl·lules que proliferen comparades amb cèl·lules quiescents i en teixits tumorals comparat amb teixits no tumorals, indiquen que la CK2 juga un paper molt important en el control de la proliferació cel·lular.

Taula 1. Substrats de CK2

Proteïnes implicades en síntesi proteica	Supressors de tumors
<u>eIF2β</u>	p53
<u>eIF2B</u>	pRb
eIF3	mdm2
eIF4B	<u>PTEN</u>
eIF5	
EF1 β	
EF2 β	

Introducció

Proteïna ribosomal L5

Proteïnes YP (P1 α , P1 β , P2 α i P2 β)

Proteïnes implicades en replicació de DNA

DNA topoisomerasa I i II

DNA lligasa

RNA polimerasa I, II i III

Helicasa de reparació de DNA

PolyA polimerasa

Enzims de vies metabòliques

Glicogen sintasa

Acetil CoA carboxilasa

Ornitina descarboxilasa

NADPH oxidasa

Espermina N-acetiltransferasa

Factors de transcripció

c-Myc

c-Fos

N-Myc

c-Myb

c-Jun

Max

SRF

Cut

CREB

UBF

Receptor d'androgen

c-ErbA

Spi/PU.1

Tal-1

Oct-1

Oct-2

Sp1

TFIIIB

VDR

ATF-1

I κ B α

I κ B β

BTF3

TAN-1

PHAS-1

CCA-1

ZFP47

TFIIIA

Proteïnes implicades en el plegament

hsp90

grp94

Calreticulina

Calnexina

Proteïnes nucleolars i nuclears

Nucleolina

Proteïna nucleolar B23

Proteïna nucleolar p120

Proteïna A2 del hnRNA

Proteïna C del hnRNA

HMG 1 i 14

Proteïna P1

pp35

NAP-1 i NAP-2

Nopp 140

NAP57

Lamin A/C

FK506 binding protein

HMGB1/3

Proteïnes implicades en transducció

Receptor de IGF-II/manosa-6-P

FAF1

Receptor de manosa

p34^{cdc2}

cdc28 (cdc2 en llevats)

Altres

Receptor de lipoproteïnes de baixa densitat

Subunitat C8 del proteosoma

Subunitat C2 del proteosoma

Subunitat CP29 (fotosistema II)

PKC
 PKA (subunitat reguladora R2)
 IRS-1
 Receptor de IGF-2
 Caldesmon
 Calseqüestrina
 CBP1 i CBP2
 PP2A i PP2C
 Inh. 2 de la proteïna fosfatasa 1
 Inh. de la proteïna fosfatasa-1 NIPP-1
Proteïna Dsh
 Receptor de vitamina D
 Receptor LD de lipoproteïnes
 Statmina
Receptor de CD45
CDC34

Proteasa del complement C1r
 β -conglucina (soja)
 mRNP3 i mRNP4
 VMAT2
 Sinaptotgamina
 Sintaxina
 Dinamina 1
 Proteïna priònica bovina
 GAP-43
 DARPP-32
Calmodulina
 α 7/PR51 (proteosoma)
 RAB-17

Proteïnes estructurals

β -tubulina
 Cadena lleugera de la miosina
 Cadena pesada de la miosina
 Espectrina
 Troponina-T
 Cadena lleugera de la clatrina
 Tau
 MAP-1A
 MAP-1B
 Occludina
 MAP τ
 Vitronectina
 Dineïna

Proteïnes víriques

v-Myb
 Antigen T de SV40
 E1A d'adenovirus
 E7 de papilomavirus
 pp62 de pseudorabies virus
 gpI de virus de varicela Zoster
 Rev i Vpu del HIV
 gp120 i p41 del HVI
 Transcriptases reverses p66 i p51 del HIV
 Antigen nuclear 2, EBNA-2 i ZEBRA del virus d'Epstein-Barr
 HDAg del virus de l'hepatitis δ
 VP1 del polioma virus
 VP22, VP16, α 22, subunitat R1 i glicoproteïna E del virus *Herpes Simplex*
Proteïna P dels virus de estomatitis vesicular, measles, distemper caní, malaltia de Borna
 NS5A del virus de la hepatitis C

*Apareixen subratllats els substrats de CK2 que ho són també *in vivo*.

Com es pot observar a la Taula 1 hi ha una gran quantitat de substrats de CK2 amb funcions molt diverses dins el metabolisme cel·lular. Tot i l'esforç de molts grups els mecanismes de regulació de la CK2 encara són desconeguts. En els últims anys s'ha incrementat el nombre de treballs que enfoquen l'estudi de la

Introducció

regulació de CK2 estudiant els *partners* o proteïnes que s'associen a CK2. Aquesta seria una forma de regulació per segrestament o posicionament de la CK2 o d'alguna de les seves subunitats, en compartiments subcel·lulars determinats o en moments determinats del cicle cel·lular on puguin realitzar la seva funció. Les primeres evidències de que podien existir subunitats lliures de l'enzim provenen de Stigare et al., 1993 en que es descriu l'existència de CK2 α a nucli, no associada amb CK2 β . També s'ha descrit l'existència d'una població de CK2 β en testicles i cervell de ratolí que no forma part de l'holoenzim, i que podria estar associada a altres proteïnes (Guerra et al., 1999b).

En aquest sentit a la Taula 2 es mostra un recull de les proteïnes que interaccionen amb CK2 o amb alguna de les seves subunitats.

Taula 2. *Partners* de CK2 o d'alguna de les subunitats de l'enzim.

<i>Partner</i>	<i>Interacció amb CK2 α, β o holoenzim</i>
A-Raf	CK2 β
ATF1	CK2
Receptor CD5	CK2, CK2 β
Dsh	CK2
DNA topoisomerasa I	CK2
DNA topoisomerasa II	CK2, CK2 β
Dineina	CK2
FGF2	CK2, CK2 β
FK506BP	CK2
hsp90	CK2, CK2 α
HOX proteïna antenapedia	CK2 α
Mos	CK2 β
Nopp140	CK2, CK2 β
Nucleolina	CK2, CK2 α
Nucleoplasmina	CK2
p21 ^{WAF1}	CK2 β
PP2A	CK2 α
eIF2 β	CK2, CK2 α , CK2 β
L5	CK2, CK2 β
L41	CK2 β
RNA polimerasa I	CK2
Antigen T SV40	CK2
p53	CK2, CK2 β
S6 p90 ^{nsk}	CK2 β

FAF1	CK2 β
CDC34	CK2 β
BRCA1	CK2 β
ZFP47	CK2 α
Pin-1	CK2 α
PLD-1	CK2 α

Modificat de Guerra et al., 1999a

Les proteïnes que interaccionen amb CK2 o alguna de les seves subunitats són funcionalment molt diverses i entre elles podem trobar des de proteïnes implicades en control del cicle cel·lular a proteïnes implicades en plegament. Moltes de les proteïnes que interaccionen amb CK2 també són substrats de l'enzim així alguns autors postulen que la interacció amb la subunitat β podria actuar com a posicionador per promoure la interacció de l'enzim amb el seu substrat.

1.4 Reticle endoplasmàtic i plegament de proteïnes

La cèl·lula està dividida, mitjançant membranes, en diferents compartiments funcionalment especialitzats. Un dels orgànuls subcel·lulars més grans és el reticle endoplasmàtic (RE), la membrana del qual té una superfície 25 vegades més extensa que la de la membrana plasmàtica (Alberts et al., 1983). El RE es defineix com un **conjunt de cavitats aplanades, de formes diferents i molt ramificades, on té lloc la síntesi i plegament de proteïnes de secreció i de membrana (RE rugós) i la síntesi d'àcids grassos i fosfolípids (RE llis)**. En les dues modalitats, llis i rugós, formen un complex sistema laberíntic que està en continuïtat amb altres tipus de compartiments cel·lulars com el nucli o els dictiosomes de l'aparell de Golgi. Totes les cèl·lules eucariotes contenen RE i determinats tipus cel·lulars (p.ex. cèl·lules hepàtiques o pancreàtiques) tenen el citosol pràcticament ocupat per RE.

El RE és, com a mediador de la síntesi de proteïnes de secreció i de membrana, un compartiment cel·lular on moltes proteïnes adquireixen les seves estructures terciàries i quaternàries definitives. Els mecanismes de "control de qualitat" asseguren que, les proteïnes que no es pleguen o no oligomeritzen correctament, no s'enviïn al seu destí sinó que es degradin (Kopito, 1997).

La informació pel plegament d'una proteïna està continguda en la seva seqüència primària d'aminoàcids, això és el que es coneix com el dogma d'Anfisen. Els experiments d'Anfisen als anys 50 demostraven que una proteïna desnaturalitzada es podia plegar espontàniament recuperant la seva activitat biològica (Creighton, 1992). El fet que *in vitro* les proteïnes puguin dirigir el seu propi plegament no garantitza la seva habilitat per fer-ho *in vivo* (Creighton, 1992). A la cèl·lula el plegament no passa com un fet aïllat sinó que està solapat i ordenat amb processos com translació, translocació, proteòlisi, modificacions postraduccionals, oligomerització, etc. És per això que *in vivo* el **plegament de proteïnes** és un procés **assistit** o **modulat** per enzims com isomerases i xaperones moleculars. Existeixen diferències entre les condicions en que es dona el plegament *in vivo* i *in vitro* però potser la més destacable en el cas del RE, és l'alta concentració de proteïna que trobem al lumen del RE, aproximadament 100 mg/ml, unes condicions en que s'afavoreix clarament l'agregació (Stevens et al., 1999). En el cas de proteïnes acabades de sintetitzar i que s'estan translocant al RE, el perill d'agregació és encara major si tenim en compte que exposen regions hidrofòbiques

que en la proteïna nativa no estarien exposades al medi. Minimitzar l'agregació sembla una de les principals funcions de les xaperones, tant al RE com al citosol. Sembla que el mecanisme de plegament de proteïnes a citosol i a RE és similar i de fet les xaperones de RE són homòlogues a les de citosol i es classifiquen en les mateixes famílies.

Existeixen algunes aspectes únics que caracteritzen el plegament de proteïnes al RE com són l'alt **potencial oxidant** existent al lumen, les altes concentracions de Ca^{2+} i la presència de la maquinaria de **glicosilació**. El potencial redox del RE està produït bàsicament per la relació glutatió reduït/oxidat que al RE està entre 1:1-3:1 enfront del 30:1-300:1 del citosol (Hwang et al. 1992). El potencial oxidant fa que els residus de cisteïna presents en una cadena polipeptídica tendixin a oxidar-se, i els ponts disulfur resultants són una modificació covalent molt important que pot restringir el plegament i que s'ha de controlar de forma precisa. Al RE existeixen diferents enzims que s'encarreguen de la formació dels ponts disulfur i que també poden corregir ponts disulfur erronis; l'enzim d'aquest tipus més abundant és la *protein disulphide isomerase* (PDI) però també trobem la Erp72 i la Erp58.

El RE és un dels reservoris més importants de Ca^{2+} de la cèl·lula i està sotmès a fluctuacions en la concentració d'aquest ió, depenent de les necessitats cel·lulars. No s'ha demostrat una dependència entre plegament i nivells de Ca^{2+} però existeixen evidències que la depleció del Ca^{2+} del RE pot afectar al plegament d'algunes proteïnes com p.ex. el de la tiroglobulina (Kuznetsov et al., 1997). D'altra banda, la majoria de xaperones del RE són proteïnes que uneixen Ca^{2+} amb baixa i alta afinitat encara que no està clar si aquest fet té alguna efecte sobre l'activitat xaperona.

Pel que fa a la glicosilació destacaríem el fet que la introducció de carbohidrats en una proteïna incrementa la seva solubilitat, "marca" la superfície de la proteïna ja que en general, les regions glicosilades no seran internes i incrementa la barrera energètica per que la proteïna surti del RE.

El RE conté diversos tipus de xaperones (Taula 3) dividides en famílies, algunes d'elles característiques només del reticle com p.ex. les xaperones que uneixen glicoproteïnes com són la calnexina i la calreticulina. Dins la família de les hsp70 trobem la grp78 i la grp170. La grp78 uneix intermediaris inicials del plegament amb baixa afinitat i baixa especificitat i la grp170 sembla que està

Introducció

implicada en el plegament d'immunoglobulines. La família de les hsp90 només està representada per la grp94 (informació detallada en els següents apartats) i no s'han trobat representants de xaperones de la família de les hsp60. Recentment ha estat descrit el primer representant d'una xaperona de baix pes molecular la Erp29.

Taula 3. Xaperones moleculars i isomerases de reticle endoplasmàtic.

<i>Disulfur isomerases</i>	<i>hsp90</i>
PDI Erp72 Erp58 Ero1p Erp57	grp94
<i>Prolil isomerases</i>	<i>Lectines</i>
FKBP13 FKBP65 S-ciclofilina CCYLP Ciclofilina B	Calreticulina Calnexina
<i>Hsp70</i>	<i>Dna-J-like</i>
grp78 Lhs1p grp170	Sec63p Scj1p Erdj4 Jem1p

L'interès del present treball es concentra en la grp94, que pertany a la família de xaperones de 90 kDa; així doncs centrarem la informació en aquesta proteïna, tot i que per homologia d'estructura i funció el recull bibliogràfic sobre hsp90 també és força extens.

1.5 Xaperones o proteïnes d'estrès de 90 kDa

Les xaperones moleculars es poden definir, a nivell general, com **proteïnes que uneixen i estableixen conformacions inestables d'altres proteïnes,**

facilitant el seu correcte destí final *in vivo* (sigui plegament, oligomerització, transport a un compartiment subcel·lular determinat o degradació) (Hartl, 1996). Les xaperones no determinen l'estructura terciària d'una proteïna sinó que ajuden que aquesta trobi la seva conformació definitiva de forma més eficient. Són proteïnes ubiques i altament conservades, imprescindibles pel funcionament normal de la cèl·lula al llarg de tot el seu cicle vital i imprescindibles en moments concrets, en que la cèl·lula pateix algun tipus d'agressió ambiental o d'estrès.

Taula 4. Membres de la família de xaperones de 90-kDa

Nom	Localització majoritària
htpG	<i>E. Coli</i>
hsp75/TRAP-1	Mitocondris
hsp90 α i β	Citosol
hsp90N	Citosol
grp94	RE

1.5.1 hsp90 (*heat shock protein 90-kDa*)

L'hsp90 és una de les proteïnes citosòliques més abundants (representa al voltant de l'1% de la proteïna soluble de citoplasma fins i tot en absència d'estrès) (Buchner, 1999). És una proteïna ubica en tots els tipus cel·lulars i present tant en procariotes com en eucariotes. S'ha demostrat que l'hsp90 és imprescindible per la viabilitat cel·lular en llevat (Borkovich et al., 1989) i en *Drosophila* (Cutforth et al., 1994) encara que la deleció de la proteïna homòloga de procariotes (htpG) no és letal (Bardwell et al., 1988).

L'hsp90 té dues isoformes, α i β , amb un 76% d'identitat i que sembla que són conseqüència d'una duplicació gènica antiga (Krone et al., 1994). Ambdues isoformes realitzen les mateixes funcions encara que presenten algunes diferències a nivell de regulació com p.ex. que l'hsp90 β és menys induïble per xoc tèrmic que l'hsp90 α , però és induïble per factors de creixement.

Introducció

Recentment s'ha descrit un altre membre de la família hsp90, l'hsp90N, la sobreexpressió de la qual resulta en un fenotip neoplàsic per activació de la Raf quinasa i la via de senyalització de ERK (Grammatikakis et al., 2001).

A nivell estructural l'hsp90 és un dímer i la dimerització sembla que és imprescindible per realitzar les seves funcions. Trobar formes oligomeritzades d'hsp90 *in vivo* també és característic d'aquesta proteïna (Nemoto et al., 1998) i sembla que en presència de cations bivalents, nucleòtids i altes concentracions d'hsp90, aquesta tendeix a oligomeritzar (Csermely et al., 1998).

L'hsp90 consisteix en un domini N-terminal altament conservat d'uns 25 kDa, connectat a un domini C-terminal d'uns 55 kDa també molt conservat. La regió *linker* que connecta els dos dominis és flexible i variable en composició i llargada entre isoformes i espècies (Pearl et al., 2000). La proteïna dimeritza unint-se pels extrems C-terminals de forma antiparal·lela en absència d'ATP; quan uneix ATP o en condicions de xoc tèrmic pateix un canvi conformacional que posiciona als monòmers de forma que s'estableixen contactes entre els extrems N-terminals (Maruya et al., 1999; Buchner, 1999). En la Figura 8 es mostra un model del canvi conformacional d'hsp90.

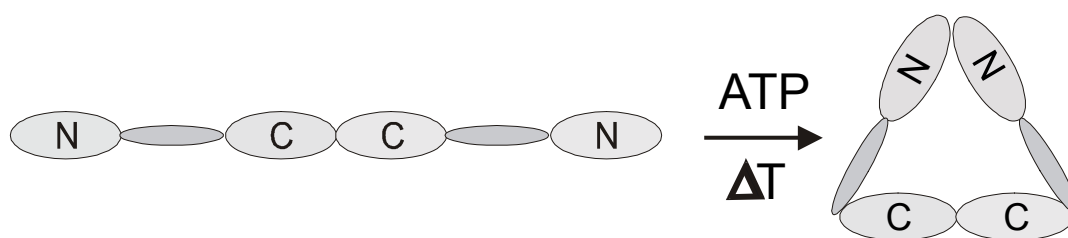


Figura 9. Model de l'estructura de l'hsp90 i del canvi conformacional associat a la unió d'ATP o a un xoc tèrmic (de Buchner, 1999).

El domini N-terminal conté el seti d'unió d'ATP/ADP (Prodromou et al., 1997a), el de **geldanamicina** un antibiòtic d'acció antitumoral (Stebbins et al., 1997) i el de **radicol** (Soga et al., 1998) un altre antibiòtic amb capacitat d'inhibir transformació (Schulte et al., 1999). La geldanamicina és un antibiòtic aïllat de diverses espècies d'actinomicets que té efectes antitumorals en varies línies cel·lulars. L'acció antitumoral ha estat atribuïda a la capacitat de la geldanamicina d'induir degradació de proteïnes clau, implicades en la transducció de senyals mitogènics. El radicol és un altre antibiòtic aïllat de *Monosporium* que té la

capacitat d'inhibir la transformació induïda pels oncogens *src*, *ras* i *mos* (Schulte et al., 1999). L'acció d'ambdós antibiòtics sembla que té com a punt central l'hsp90 ja que és la proteïna intracel·lular que majoritàriament uneix aquests dos antibiòtics.

El domini N-terminal també està involucrat en la unió de proteïnes substrat, que interaccionen segurament en el seti d'unió de la geldanamicina (Prodromou et al., 1997b; Young et al., 1997). El domini central d'unió que conté una alta densitat de càrrega, ha estat involucrat en la unió a receptors d'hormones esteroidees (Tbarka et al., 1993; Cadepond et al., 1993) i en la unió a CK2 (Miyata et al., 1995). A més conté els llocs d'unió de Ca^{2+} i una seqüència de localització nuclear (Nardai et al., 1996). El domini C-terminal conté el seti d'unió a calmodulina (Minami et al., 1993) i la regió de dimerització (Minami et al., 1994; Nemoto et al., 1995; Meng et al., 1996).

S'ha demostrat que l'hsp90 per si sola és incapaç de plegar els seus substrats *in vivo* i necessita unir-se a altres xaperones i co-xaperones, p.ex. el requeriment mínim per l'activació del receptor d'hormones esteroidees *in vitro* és la formació del complex hsp90, hsp70 i p60/Hop (Dittmar et al., 1997). La unió a altres xaperones és realitza a través del motiu C-terminal MEEVD d'hsp90 que s'uneix a un motiu de 34 residus conegut com a tetratricopeptid (TPR) present en moltes de les co-xaperones d'hsp90 (Russell et al., 1999).

La hsp90 participa en el **plegament i localització de receptors d'hormones esteroidees** (SHRs) i de diferents **proteïna quinases**. En el cas dels receptors d'hormones l'hsp90 s'hi uneix mantenint el receptor en un estat parcialment desplegat, però competent per unir l'hormona. En el moment en que aquesta s'hi uneix es desestabilitza la unió hsp90-receptor i es dissocia el complex. Així el receptor pot dimeritzar i unir-se a seqüències específiques de DNA regulant la seva transcripció (veure Pratt, et al. 1998 per una revisió). La hsp90 actuaria com un repressor mantenint als receptors en una forma inactiva quan la hormona corresponent no està present (Buchner, 1999).

En la Taula 5 es recullen totes les proteïna quinases, descrites fins al moment, que s'uneixen a hsp90 i que són substrats *in vivo*. Actualment hi ha descrites 24 quinases substrat d'hsp90.

Taula 5. Proteïna quinases que formen complex amb hsp90.

Tirosina quinases	Ser/Thr quinases
v-Src, c-Src	v-Raf, c-Raf, B-Raf
v-Fes, c-Fes, v-Fgr, v-Fps, v-Ros, v-Yes	Gag-Mil
Lck, c-Fgr	MEK, MOK
p75-v-erbA	CDK4
p185erbB2	eIF-2- α -quinasa
Wee1	eEF-2- α -quinasa
Receptor d'insulina	CK2

En gairebé tots els casos, en el complex hsp90/quinasa s'hi troba una altra quinasa de 50-kDa anomenada CDC37/p50 que actua com a adaptador (co-xaperona) de la unió entre la quinasa substrat i l'hsp90 (Hunter et al., 1997).

Un exemple de quinasa substrat que s'uneix a hsp90 és la eIF2 α quinasa, un dels factors que regulen la síntesi proteica. La dissociació del complex hsp90/eIF2 α quinasa requereix l'autofosforilació de la quinasa. Quan aquesta s'autofosforila estabilitza la seva conformació i no necessita de la unió a hsp90 (Uma et al., 1997). La proteïna quinasa CK2 també és substrat d'hsp90 que s'hi uneix, inhibint-ne l'agregació (Miyata et al., 1992; Miyata et al., 1995).

A banda d'interaccionar amb diferents quinases, l'hsp90 és substrat de CK2 (Lees-Miller et al., 1989a) i de la quinasa dependent de DNA (Lees-Miller et al., 1989b). D'altra banda s'ha demostrat que el tractament amb àcid okadàic, un inhibidor de fosfatases, provoca la hiperfosforilació d'hsp90 i una disminució en l'associació amb pp60^{v-src}, suggerint una possible relació entre fosforilació i associació (Mimnaugh et al., 1995).

1.5.2 grp94 (*glucose regulated protein 94-kDa*)

La grp94 pertany a la família de proteïnes induïdes per estrès de 90 kDa o xaperones de 90 kDa (hsp90). Presenta la seqüència ⁹⁴YKNKEIFLRE¹⁰³ (numeració

de residus corresponents a la seqüència humana), segell característic de la família de les hsp90. Va ser descrita per primera vegada en fibroblasts de pollastre, com una de les proteïnes l'expressió de les quals era induïda quan les cèl·lules eren sotmeses a deprivació de glucosa (Shiu et al., 1977); d'aquí també el terme de GRP (*glucose regulated protein*). És una de les proteïnes més abundants al reticle endoplasmàtic (RE) amb una concentració estimada de 10 mg/ml (Koch et al., 1986). Tal i com succeeix amb l'hsp90, la grp94 també és una proteïna que s'expressa constitutivament i que es sobreexpressa en determinades condicions d'estrès (veure apartat 1.4.2.6).

1.5.2.1 Estructura gènica

La grp94 es troba en vertebrats i en alguns invertebrats com *C. elegans* i en plantes, i és absent en *Drosophila* i organismes unicel·lulars com bacteris, llevats i arqueobacteris. Recentment però, ha estat descrita l'existència de grp94 en el protozou paràsit *Leishmania infantum* (Larreta et al, 2000). Anàlisi filogenètiques donen suport al model que postula que l'origen de grp94 va ser la duplicació d'un gen ancestral que també va donar lloc a hsp90 (Gupta, 1995). En tots els organismes on s'ha descrit l'existència de grp94 es troba com a gen de copia única, que en humans localitza al cromosoma 12 (q24.2-q24.3). En humans, a més del gen expressat trobem dos pseudogens processats (Maki et al., 1990). El gen porcí està format per 18 exons distribuïts en 17 kb mentre que el gen murí, amb una estructura exó/intró similar, es distribueix en 18 kb (Dechert et al., 1994).

La grp94 es sobreexpressa en situacions d'estrès conjuntament amb la grp78, degut a l'existència de promotors molt similars que uneixen els mateixos factors de transcripció (Liu et al., 1991). Els promotors dels gens de les GRPs contenen un motiu GC/CAAT i un motiu ric en GC (Liu et al., 1991). En els últims anys s'han descrit sistemes de regulació de l'expressió de les xaperones de RE que impliquen vies de senyalització complexes i específiques detallades en l'apartat 1.4.2.7.

El domini N-terminal conté el lloc d'unió de geldanamicina, radicicol (Mimnaugh et al., 1996; Schulte et al., 1999) i nucleòtids. També hi trobem l'Asn196, que és l'únic seti de N-glicosilació descrit fins ara (Qu et al., 1994). Aquest domini és seguit d'una regió acídica central, homòloga a la regió *linker* de hsp90, però més curta. Entre els residus 421 i 448 trobem una seqüència *leucine zipper* imperfecte, que podria servir com a lloc d'unió de proteïnes. Els aminoàcids 559-609 delimiten un altra regió acídica, que conté un motiu KEKE. Els motius KEKE, en general, es proposen com a zones d'interacció entre proteïnes (Realini et al., 1994).

La grp94 nativa és un homodímer, que s'ha proposat que dimeritza a través del domini C-terminal mitjançant interaccions hidrofòbiques (Wearsch et al., 1996a; Wearsch et al., 1996b).

Moltes proteïnes de RE uneixen calci, ja que el RE és el major magatzem cel·lular de calci (concentració de calci al RE 400 μM) i regula moltes funcions cel·lulars bàsiques. La grp94 és una proteïna de gran capacitat alhora d'unir calci ja que conté 14 llocs d'unió (Koch et al., 1986; Kang et al., 1991), quatre dels quals són d'alta afinitat (K_d 2 μM) i 10 de baixa afinitat (K_d 600 μM) (Van et al., 1989; Hubbard et al., 1996). A més de la seva funció com a magatzem de calci podria ser que la funció de grp94 fos regulada per calci, ja que s'ha vist que la unió de calci provoca una disminució en el contingut en hèlix α (Van et al., 1989). *In vitro* i en presència de calci, la grp94 s'uneix a calmodulina i s'inhibeix la unió de la xaperona a filaments d'actina (Koyasu et al., 1989).

La grp94 pot unir **ATP** i **GTP** amb baixa afinitat (Clairmont et al., 1992; Li et al., 1993; Nigam et al., 1994; Csermely et al., 1995). S'ha descrit una seqüència d'unió a ATP del tipus A (d'unió al trifosfat) i dues del tipus B (d'unió a l'adenina) (Li et al., 1993) tot i que d'altres autors localitzen altres seqüències d'unió a ATP (Csermely et al., 1995). La grp94 té activitat **ATPasa**, similar a la de hsp90 i denominador comú de moltes xaperones moleculars (Li et al., 1993). *In vivo* es produiria un increment de l'activitat ATPasa després de l'estimulació amb interferó α (Anderson et al., 1994). L'activitat ATPasa però, podria requerir la presència de proteïnes addicionals i no ha estat observada en preparacions pures de grp94 (Csermely et al., 1995; Trujillo, R., treball de Tesi). Un altra similitud amb hsp90 és que la capacitat d'unir pèptids no es veu afectada per la presència de nucleòtids (Wearsch et al., 1997).

1.5.2.3 Modificacions post-traduccionals

La grp94 és una **glicoproteïna** amb 6 llocs potencials de glicosilació dels quals només s'ha descrit que se'n glicosili un, l'Asn196 (Qu et al., 1994). Aquesta Asn està conservada en les grp94 de diferents espècies excepte en *Ordeum vulgare*, en que trobem la glicosilació a l'Asn410 (Argon et al., 1999). La glicosilació és del tipus manosa sensible a endo H (Mazzarella et al., 1987; Cala, 2000). Una petita fracció de grp94 és hiperglicosilada en condicions normals i aquesta fracció s'incrementa molt quan es sobreexpressa grp94 en cèl·lules COS o d'insecte (Lenny et al., 1991). Quan es sobreexpressa grp94 en cèl·lules Sf1 es troba tota la grp94 glicosilada tot i que en diferents graus (Cala, 2000). La glicosilació, aparentment no afecta a la unió de substrats, ja que la grp94 desglicosilada és capaç d'associar-se amb proteïnes substrat (Argon et al., 1999).

La grp94 es fosforila en **serines i treonines** però no en tirosines (Trujillo, R. Treball de Tesis). El patró de fosforilació té totes les característiques de la fosforilació per CK2 tot i que encara no s'ha determinat la quinasa responsable de la seva fosforilació *in vivo* (Cala et al., 1994; Trujillo et al., 1997; Cala 2000). *In vitro* la fosforilació de grp94 de rata per CK2 es produeix en serines i treonines (predominantment en Thr) (Trujillo et al., 1997), i es localitza en un fosfopèptid N-terminal que conté la Ser285 i la Thr267 i en l'extrem C-terminal on trobem les Thr745, 749, 753, 765 (numeració corresponent a la grp94 de gos, Cala et al., 1994). També s'ha descrit la capacitat d'autofosforilació de grp94 (Csermely et al., 1995) tot i que aquesta última qüestió està en discussió, ja que podria ser deguda a traces de CK2 contaminants presents a les mostres purificades. Altres quinases com la PKC no fosforilen a grp94 *in vitro* tot i presentar seqüències consens de fosforilació per aquesta quinasa. La fosforilació podria regular l'activitat de grp94 ja que s'ha vist que la proteïna fosforilada no s'associa a la cadena lleugera d'immunoglobulines (Argon et al., 1999).

1.5.2.4 Localització subcel·lular de grp94

Experiments d'immunofluorescència i immunomicroscòpia electrònica posen de manifest una distribució, majoritària i uniforme de grp94, en tot el **lumen del RE** (Koch et al., 1988). La permanència al RE és conseqüència de l'existència del tetrapèptid C-terminal KDEL, també present en grp78, calnexina, PDI i

calreticulina (Munro et al., 1987). La seqüència KDEL és reconeguda per un receptor en els compartiments post-RE, que evita la secreció de les xaperones (Lewis et al., 1992). Tot i la seqüència de permanència al RE també s'ha descrit la presència de grp94 en altres compartiments subcel·lulars. Un exemple n'és l'associació de grp94 amb la lipasa dependent de sal (BSDL, bile salt dependent lipase). El complex BSDL/grp94 és secretat per les cèl·lules del pàncreas fins al lumen de l'intestí on és internalitzat pels enteròcits (Bruneau et al., 1998). També s'ha descrit la presència de grp94 a la **membrana plasmàtica** (Srivastava et al., 1986; Maki et al., 1990; Erkeller Yustel et al., 1992; Wiest et al., 1997), al **citoplasma** (Takano et al., 2001; Tanaka et al., 2001), al **nucli** (Tanaka et al., 2001) i a l'**aparell de Golgi** (Brunati et al., 2000). Les raons per les quals proteïnes amb la seqüència KDEL poden "escapar" al sistema de recircularització via receptor podrien ser des de la saturació del sistema de receptors KDEL, a defectes en el sistema de retenció fins a proteòlisi de l'extrem C-terminal.

La grp94 és una proteïna hidrofòbica amb tendència a associar-se amb membranes i que es purifica en presència de detergents (Trujillo et al., 1997). També s'ha descrit com a proteïna transmembrana amb l'extrem C-terminal localitzat a citoplasma (Mazzarella et al., 1987). Un altre aspecte important pel que fa a la localització, és la descripció de grp94 com a proteïna presentadora d'antigens tumorals, i localitzada per tant, a la superfície de cèl·lules canceroses (Srivastava et al., 1986; Tamura et al., 1995).

El conjunt d'observacions evidencien que la localització de grp94 no és exclusiva de RE tot i que majoritàriament sigui descrita com a proteïna de RE.

1.5.2.5 Activitat xaperona i unió de pèptids

La implicació directa de grp94 en un procés de plegament, és a dir l'existència d'una activitat "plegadora" de grp94 no està clara. Existeixen indicis de que grp94 formaria part d'un complex "plegador" i que s'uniria a proteïnes preplegades per grp78 (Melnick et al., 1992; Melnick et al., 1994). De fet s'ha demostrat que grp94 és capaç d'unir-se a altres xaperones de RE com grp78, calreticulina, calnexina, PDI o hsp47 (Melnick et al., 1992; Tatu et al., 1997; Kuznetsov et al., 1997; Ferreira et al., 1994;) i actuar coordinadament per exercir l'activitat xaperona. Una dada experimental interessant que recolza aquesta

Introducció

suposició, és que en cèl·lules tractades amb geldanamicina es produeix un increment de proteïnes desplegadas, associades a grp78 (Lawson et al., 1998).

Un fet a destacar és que grp94, a diferència de grp78 o calnexina, interacciona amb un nombre de proteïnes substrat restringit. Fins al moment s'ha descrit la interacció amb MHC classe II (Schaiff et al., 1992), tiroglobulina (Kuznetsov et al., 1994), erbB2 (Chavany et al., 1996), una glicoproteïna del virus Herpes (Ramakrishnan et al., 1995), apolipoproteïna B (Linnik et al., 1998), col·lagen (Ferreira et al., 1994), proteïna C (Katsumi et al., 1996), BSDL (Bruneau et al., 1998) i immunoglobulines (Melnick et al., 1992). Aquest estret ventall de proteïnes substrat sense seqüències relacionades, fa pensar en la possibilitat de reconeixement d'una estructura tridimensional concreta com a característica comuna.

El plegament de les cadenes lleugeres de les Ig és un model ben estudiat on s'observa que grp94 té preferència per formes oxidades, mentre que grp78 s'uneix a les Ig durant molt pocs minuts i en formes primerenques menys oxidades (Melnick et al., 1994; Melnick et al., 1995). Aquesta preferència per intermediaris de plegament tardans és consistent amb les característiques funcionals de l'hsp90 *in vitro* (Wiech et al., 1992; Jakob et al., 1995). Fins ara però, no s'ha assajat activitat xaperona de grp94 d'una forma directa.

Un altre aspecte molt interessant de la funció de grp94 és la seva capacitat d'unir **una gran diversitat de pèptids** *in vitro* (Arnold et al., 1995; Lammert et al., 1997; Arnold et al., 1997) i *in vivo* (Srivastava et al., 1986). Aquesta activitat té un gran potencial en el camp de les **vacunes contra càncers** ja que s'ha demostrat que la injecció de grp94 purificada de tumors, en ratolins amb càncer, provoca una disminució en la progressió del tumor (Tamura et al., 1997). Els primers experiments de vacunes contra processos cancerosos es van realitzar, injectant grp94 purificada de sarcoma murí, de manera que s'induïa una protecció contra un posterior desenvolupament del tumor (Srivastava et al., 1986). Aquesta capacitat de protecció no es deguda a grp94 *per se* sinó als pèptids units a grp94 que són capaços d'induir una resposta immunitària de les cèl·lules T. Recentment s'han reconstituït *in vitro* complexos pèptid/grp94 que presenten activitat immunològica, és a dir, són capaços d'induir una resposta dels limfòcits T de la mateixa manera que els complexos aïllats de tumors (Blachere et al., 1997). La resposta no és directa sinó que grp94 "presenta" els pèptids al MHC I de macròfags, que s'encarreguen d'estimular la resposta de limfòcits T citotòxics (Suto et al., 1995).

Els complexos grp94/peptid són internalitzats pels macròfags per endocitosi, els quals s'encarreguen de la presentació a cèl·lules T (Arnold-Schild et al., 1999; Wassenberg et al., 1999). La presentació de pèptids no és exclusiva de grp94 sinó que xaperones de la família de les hsp70 també exerceixen aquesta activitat no així l'hsp90 que té una baixa capacitat de presentar pèptids (Udono et al., 1994). Per revisions sobre el tema es poden consultar les referències de Przepiorka et al., 1998, Edgington et al., 1995 o Nicchitta et al., 1998.

1.5.2.6 Condicions d'estrès que indueixen la síntesi de grp94

La grp94 és induïda en diferents condicions d'estrès com deprivació de glucosa, hipòxia, ionòfors de calci, inhibidors de la glicosilació, pH àcid, isquèmia, creixement tumoral (veure llistat a la part inferior de la plana amb referències o Csermely et al., 1998 per una revisió). Curiosament el promotor de grp94 no té els elements de resposta a heat shock (HSE) i per tant no és induïble per xoc tèrmic, tot i que alguns autors l'han descrit com a proteïna induïda per xoc tèrmic. La majoria de les condicions llistades provoquen l'acumulació de proteïnes al RE resultant en la inducció de la resposta a proteïnes desplegadas o *unfolded protein response* (UPR) (veure secció 1.4.2.7).

Inducció per compostos químics

Tractament amb àcid xanturènic (Malina, 1999)
Lactacistina (Bush et al., 1997)
DTT (Liu et al., 1997)
Geldanamicina (Lawson et al., 1998)
Ionòfors de Ca²⁺ com A23187 (Lee, 1987) o thapsigargina (McCormick et al., 1997)
Deprivació de glucosa (Pouyssegur et al., 1977)
Inhibidors de la glicosilació com tunicamicina (Lee, 1987)
Etanol (Kwei-Perng et al., 1996)

Inducció per processos fisiològics o patològics

Isquèmia (Kuznetsov et al., 1996)
Acumulació de proteïnes mal plegades (Kozutsumi et al., 1988)
Insulina (Kasambalides et al., 1985)

Interleucina-6 (Haverty et al., 1997)

Interferó α i γ (Anderson et al., 1994)

Hipotiroïdisme congènit (Medeiros-Neto et al., 1997)

Osteoartritis (Takahashi et al., 1997)

Epilèpsia (Little et al., 1996)

Tirotrofina (Sarsgyan et al., 2002)

1.5.2.7 Resposta a proteïnes desplegadas (*unfolded protein response* o *UPR*)

El RE proporciona un entorn adequat per a plegar proteïnes, però si es produeix una fallida en els sistemes de plegament, les cèl·lules no només tenen la carència de funció de les proteïnes que no s'han plegat, sinó que a més s'exposen als efectes tòxics de l'acumulació de proteïnes *per se*. Les cèl·lules responen a l'acumulació al RE de proteïnes desplegadas o mal plegades, incrementant la transcripció dels gens que codifiquen per xaperones i enzims implicats en plegament; aquesta resposta es coneix com a *UPR (unfolded protein response)*. La resposta cel·lular d'incrementar l'expressió de determinades proteïnes està coordinada amb un alentiment de la traducció general de proteïnes (per una revisió Walter, 1998; Patil et al., 2001).

La UPR es dona en tots els organismes eucariotes estudiats fins ara tot i que l'estudi en mamífers ha posat de manifest un sistema més complex que la via descrita en llevats. La via de transducció del senyal però, té característiques bàsiques conservades: la informació de RE a nucli es transmet via quinases transmembrana que s'activen per oligomerització i autofosforilació. Aquestes quinases de membrana tenen a més activitat RNAsa i poden realitzar un *splicing* alternatiu d'un factor de transcripció (Hac1p) que al ser processat de forma diferent activa la transcripció dels gens diana. Els gens que s'han de sobreexpressar contenen una seqüència comú d'activació en els seus promotors, anomenada **element de resposta a proteïnes desplegadas (UPRE)** que és on s'uneix Hac1.

El sistema d'estudi utilitzat inicialment per estudiar aquesta via va ser *S. cerevisiae* on es van descriure els tres components bàsics: **Ire1p** (quinasa

transmembrana), **Hac1p** (factor de transcripció) i **Rlg1p** (llogasa que uneix l'RNA generat per *splicing* alternatiu). En la Figura 11 s'esquemmatitza el procés. Ire1p és una Ser/Thr quinasa amb unes característiques força atípiques ja que el domini N-terminal localitzat al lumen del RE actua com a sensor de proteïnes desplegadas (Cox et al., 1993), promovent l'oligomerització de la proteïna, que s'autofosforila en *trans* en el domini quinasa. Aquest domini quinasa està localitzat a la cara citosòlica i és adjacent a un domini endonucleasa, l'únic substrat del qual és l'mRNA que codifica per Hac1p. El factor Hac1p es transcriu constitutivament però no es tradueix (Cox et al., 1996). Quan s'activa la UPR l'endonucleasa realitza un *splicing* alternatiu que elimina un intró (Sidrauski et al., 1997). L'mRNA es processa després per la tRNA llogasa (Rlg1p) generant-se un mRNA que codifica per un factor de transcripció tipus *leucine zipper** (Hac1p) i que és traduït eficientment. Un cop traduït transloca a nucli i s'uneix a la seqüència UPRE (Cox et al., 1996; Kawahara et al., 1997) activant la transcripció dels gens diana (Mori et al., 1998).

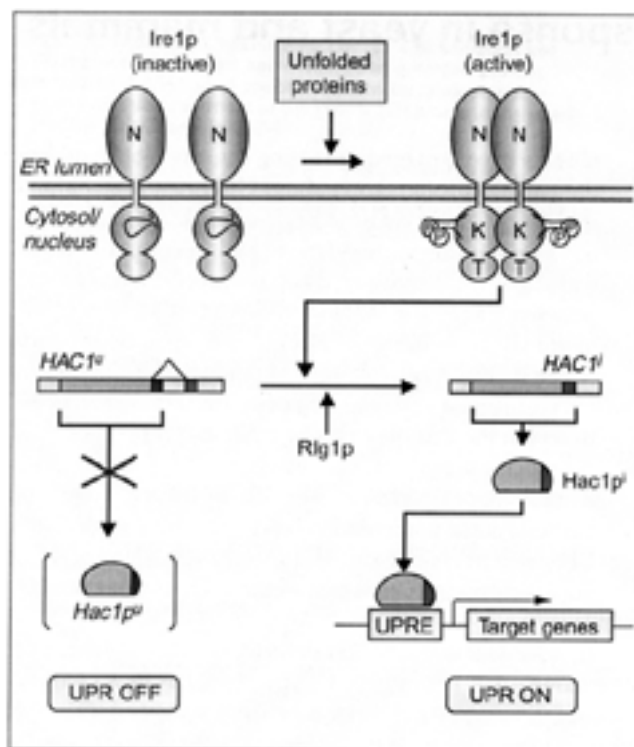


Figura 11. La figura mostra un esquema de la UPR de llevat. Ire1p consta de tres dominis: un domini encarat al lumen del RE (N), un domini quinasa citosòlic (K) i un domini endonucleasa també citosòlic (T). El domini T talla $HAC1^u$ (no induït) eliminant un intró i Rlg1p uneix els dos exons resultants, donant lloc a $HAC1^i$ (induíit). La proteïna que es tradueix és Hac1pⁱ que actua com a factor de transcripció unint-se a les UPRE. De Patil et al., 2001.

*NOTA: els factors de transcripció tipus *leucine zipper* o cremallera de leucines estan caracteritzats per tenir fragments de 35 AA amb leucines cada 7 residus. Aquests factors de transcripció formen dímers, units per estructures helicoidals estabilitzades per les leucines.

Introducció

El mecanisme bàsic s'ha conservat al llarg de l'evolució de forma que en **mamífers** s'han descrits 3 homòlegs de Ire1p (Wang et al., 1998): **Ire1 α** i **Ire1 β** que són molt similars a Ire1p de llevat (Niwa et al., 1999), i **PERK/PEK** que presenta homologia amb el domini N-terminal de Ire1p, però que no presenta activitat endonucleasa i amb una activitat quinasa similar a l'activitat de la eIF2 α quinasa (Harding et al., 1999). El mecanisme d'oligomerització pel qual s'activa l'activitat quinasa estaria conservat en mamífers, tot i que s'ha proposat que el domini luminal, més que actuar com a sensor de proteïnes desplegadas estaria, en condicions normals unit a grp78 i grp94, i en condicions d'estrès les xaperones es dissociarien i PERK podria oligomeritzar, és a dir la grp78 i la grp94 actuarien com a repressors (Shamu et al., 1994; Bertolotti et al., 2000). També està conservada l'activitat endonucleasa que permet l'*splicing* alternatiu (Niwa et al., 1999) tot i que no s'ha trobat encara l'homòleg de Hac1. Existeix també un altre component anomenat ATF6 que és un factor de transcripció expressat constitutivament com a proteïna de membrana, i que en condicions d'estrès és proteolitzat i actua directament com a factor de transcripció unint-se a ERSEs (ER stress response element) (Yoshida et al., 1998; Haze et al., 1999). ATF6 és també un factor de transcripció tipus *leucine zipper*. També Ire1 α i β poden ser proteolitzats per una proteasa anomenada presenilina 1 (PS-1) i actuar directament com a factors de transcripció. Alhora que s'activen tots aquests mecanismes, l'oligomerització de PERK promou l'aturada de la síntesi proteica per fosforilació de eIF2 α (Harding et al., 1999). També s'atura el cicle cel·lular per inhibició de la síntesi de ciclina D1 (Brewer et al., 2000) i si continua la situació d'estrès, s'activen els mecanismes d'apoptosi per activació de la via de JNK (Patil et al., 2001). En la Figura 12 es mostra un esquema del mecanisme en mamífers.

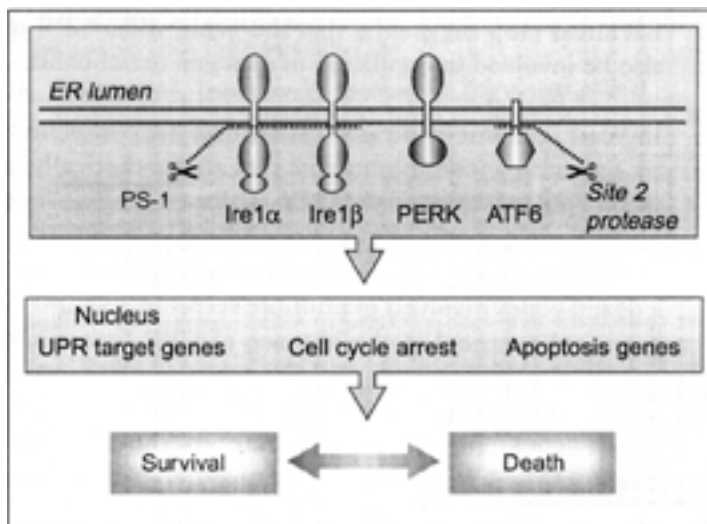


Figura 12. Esquema de la UPR de mamífers. Modificat de Patil et al., 2001.

Existeix un altre mecanisme de senyalització des de RE anomenat *ER overload response* (EOR) que sembla que s'inicia quan existeix una superproducció de proteïna que ha de ser secretada i que per tant ha de passar pel RE. En aquest cas es produeix una acumulació de proteïna a RE que aquest no pot processar i que provoca que s'indueixi l'activació de NF- κ B (Pahl, et al., 1997). Sembla que els exemples més clars on es produeix activació de NF- κ B són els casos d'infecció per virus (p.ex. virus de la hepatitis B, adenovirus E3/19K i influenza virus) en que el virus obliga a la cèl·lula hoste a produir grans quantitats de proteïnes de la càpside, algunes de les quals es processen al RE. Es desconeix la via de senyalització que activa NF- κ B des de RE però s'ha vist que la preincubació amb quelants de Ca^{2+} inhibeix l'activació de NF- κ B.

L'activació del factor de transcripció NF- κ B requereix la fosforilació de I κ B (inhibidor de NF- κ B) que en ser fosforilat és degradat pel proteosoma i permet que NF- κ B es transloqui a nucli i estimuli la transcripció de gens de defensa antiviral (per una revisió veure Hatada, 2000).

1.5.2.8 Control de qualitat al RE

Els mecanismes de control de qualitat del RE permeten detectar proteïnes que no es pleguen bé o que no oligomeritzen correctament, de manera que no seran enviades als seus destins finals sinó que seran degradades. Aquest procés de degradació en un principi va ser localitzat al lumen del RE, però hi havia una dificultat clara alhora de conciliar la coexistència de proteïnes parcialment desplegadas molt susceptibles de degradació, amb la presència al mateix compartiment d'un sistema proteolític. L'únic sistema proteolític descrit al lumen del RE era l'endopeptidasa que talla els pèptids senyal (Bonifacino et al., 1994). El fet que la lactacistina, un potent inhibidor del proteosoma, (Fenteany et al., 1995) fos un inhibidor també de la degradació al RE va posar de manifest que el proteosoma podria estar implicat en la degradació de proteïnes del RE. El proteosoma és la maquinaria de degradació de proteïnes més important en cèl·lules procariotes i eucariotes i està localitzat a citoplasma i a nucli però no a RE (Coux et al., 1996; Lord et al., 2000 per una revisió sobre proteosoma). Així doncs, les proteïnes que no poden ser plegades i que han de ser degradades han de ser retrotranslocades a citosol per poder ser ubiquitinades i degradades pel proteosoma (Kopito, 1997; Sommer et al., 1997). Un exemple de proteïna que no

Introducció

pot ser correctament plegada i que és enviada a degradació, és el canal transmembrana de la fibrosi quística (CFTR). Les mutacions típiques dels malalts de fibrosi (la més habitual és la Phe508) impedeixen un correcte plegament de la proteïna, de forma que la proteïna és ubiquitinada i enviada a degradació (Lord et al., 2000).

En la Figura 13 es mostra un resum que integra els processos de plegament que tenen lloc al reticle, així com les vies de senyalització (UPR i control de qualitat) esmentades en aquesta part de la introducció.

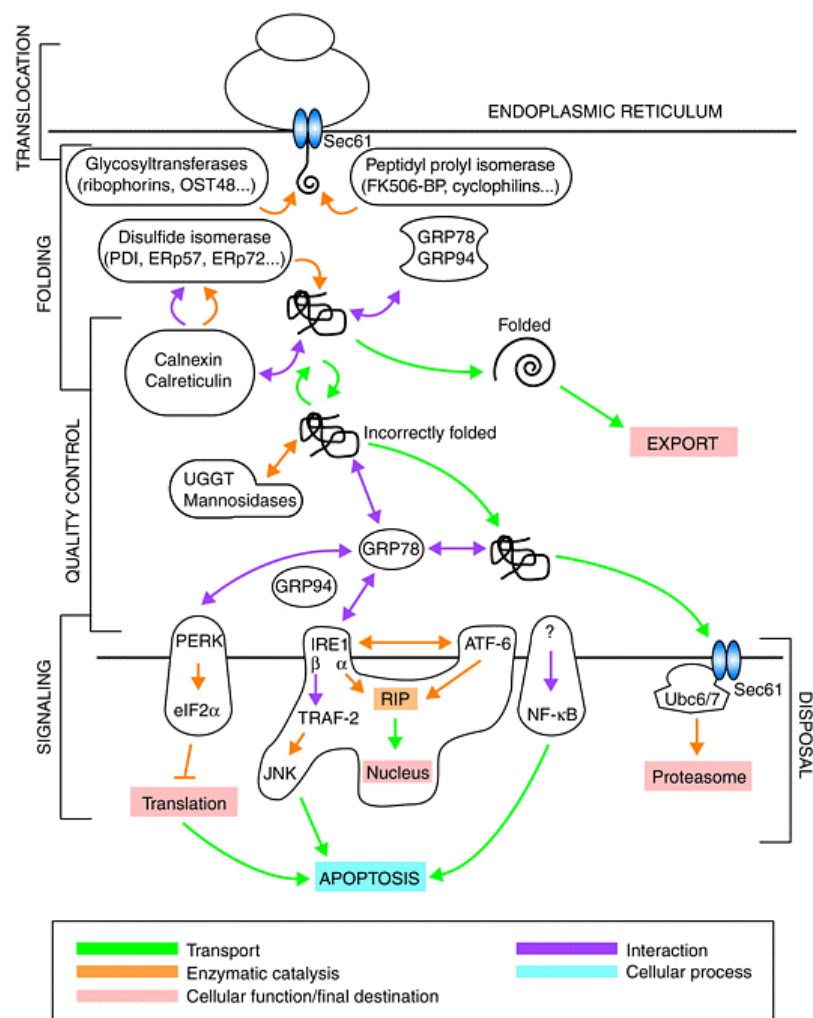


Figura 13. Plegament i senyalització al RE (de Patil et al., 2000).

2.- OBJECTIUS

OBJECTIUS

Com s'ha explicat al llarg de la introducció la proteïna quinasa CK2 és un enzim amb un gran nombre de substrats, implicat en múltiples processos cel·lulars. Té activitat constitutiva i no estan clars els efectors o els mecanismes que regulen la seva activitat ni la seva localització subcel·lular. És un enzim que sembla que no està integrat en cap via clàssica de transducció del senyal i que podria estar regulat d'una forma més bàsica, per canvis en la localització cel·lular per associació amb proteïnes. Els antecedents del present treball suggerien que una part de la CK2 cel·lular podia estar associada a membranes del RE via alguna proteïna adaptadora. Les preparacions de membrana de fetge de rata contenien CK2 i un substrat de CK2 que es va identificar com a grp94. La persistent co-purificació d'ambdues proteïnes suggeria una forta associació i va ser amb aquestes dades prèvies que es van plantejar els següents objectius generals inicials:

1. Estudiar CK2 i grp94 en un model de rata obesa en el que inicialment esperàvem nivells alterats de grp94 i relocalització subcel·lular de CK2 lligada a grp94.
2. Clonar, expressar i caracteritzar bioquímicament grp94 wt humana i diferents mutants de grp94.
3. Demostrar l'associació de la proteïna quinasa CK2 amb grp94.
4. Determinar la regió d'interacció entre ambdues proteïnes.
5. Determinar una possible funcionalitat a l'associació entre CK2 i grp94.