



**Universitat Autònoma de
Barcelona**

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

INTERACCIÓ DE LA PROTEÏNA QUINASA CK2 AMB LA XAPERONA GRP94. IMPLICACIONS FUNCIONALS.

Memòria presentada per

Nerea Roher Armentia

Per optar al grau de Doctora en
Bioquímica i Biologia Molecular

Treball realitzat a la Unitat de Ciències del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular sota la direcció del Dr. Emilio Itarte i la Dra. Maria Plana.

Dr. Emilio Itarte

Dra. Maria Plana

Nerea Roher Armentia

Bellaterra, Abril 2002

Als que ja no hi són: Fèlix i Maria Roher, José Armentia i Marc Carbonell.

Són moltes les coses que haig d'agrair i volia expressar el que ha suposat per a mi i per aquest treball els consells i el suport de tots els que hi apareixen.

En primer lloc al Dr. Emili Itarte li vull agrair l'oportunitat que he tingut de fer bioquímica al seu grup i la paciència que ha demostrat aquests anys quan intentàvem esbrinar quelcom sobre la CK2, i a la Dra. Maria Plana tots els comentaris que m'ha fet, sempre oportuns en l'espai i en el temps.

Agraeixo al Dr. J. Farrés la tasca de fer habitables els laboratoris, al Dr. J. A. Biosca la capacitat de diàleg i l'entusiasme mostrats com a Cap d'unitat i al Dr. J. Vendrell per estar al cas de tot el que fa referència a les pràctiques.

Agraeixo al Dr. J. R. Daban l'amabilitat que ha tingut alhora de contestar les preguntes sobre microscòpia i al J. M Caravaca per ser el meu assessor en tot el que fa referència a reixetes de microscòpia.

A la Imma, la Sandra i la Chari, gats vells en el difícil món de les pràctiques, els agraeixo que han contestat amb paciència tota la bateria de preguntes que sempre tenia a punt.

Un apartat molt especial per la gent del grup tant la del passat com la d'ara perquè amb l'excusa de la ciència, hem compartit més que bones estones. El Joan, el Carles, la Floria, i la Marta R. com a kinasos del passat i el Francesc, el Franc, l'Edu i el Xavi com a kinasos presents. Esment especial a la passió que posa en Francesc en tot el que fa i que comparteix i encomana als que l'envolten, i a l'humor sempre oportú i esmolat de'n Franc que ha fet molt més habitable el laboratori en la meva última etapa. A l'Eduard, amb qui he compartit experiments, caos i xerrades de muntanya. També a la Marta i l'Arnau que atrets per el món de les kinases han donat "vidilla" al laboratori i a l'escriptori.

A la Irantzu, l'Alex i el Salva V. per compartir molts dinars i xerrades i al Roger pel seu somriure perenne. A les noies del laboratori del costat, Carol, Eva, Maykelis, Carme, Chari, Hakima i Trini per compartir a discreció Cary, miniproteans, bàsquet, sopars, loteria... A la Susana per compartir el seu humor mordaç i els nervis dels últims mesos de tesi i a la Silvia, l'Emma, l'Albert, Bernat i Ana M^a perquè hem habitat molts anys el mateix espai.

Al Dr. Issinger i la Dra. Boldyreff de la Universitat d'Odense els haig d'agrair la càlida acollida que em van donar al país del fred i totes les facilitats que vaig tenir per aprendre un munt de coses.

Al Dr. Pinna, Dr. Meggio, Dra. Ruzzenne i Dra. Sarno per compartir el món de la CK2 i sobretot el Biacore.

Necessitaria moltes planes per agrair tot el suport i ajuda del Dr. Salvador Bartolomé tant pel que fa al treball científic com pel que fa a la part humana.

No cal dir que agraeixo a les meves famílies la paciència i col·laboració mostrades al llarg d'aquests anys; la meva mare amb la seva curiositat inesgotable i la capacitat d'estar per tot i per tots; i al meu pare per mostrar-me coses tant bàsiques com distingir una amanita verinosa d'un ou de reig. Als meus germans petits Jordi i Bernat (que ja no ho són tant) i a la Marta O., per no preguntar massa vegades quan acabava la tesi. A Manuel Villena li agraeixo la bonica foto de la portada que millora considerablement aquesta tesi.

Al Rodolfo que sempre ha estat present.

A Jositoperú per moltes cordades i vivències compartides. A la Marta V. i el Joanet perquè sempre han estat disposats a disfrutar de la vida i dels amics. A la Marta R., la Marta V., la M^a Rosa, la Txell, , la Dolors M. i la Dolors P. per que no entenc la Biologia i altres coses sense elles.

Al Simon i la Sònia que són els veïns i amics perfectes.

Al Jofre i l'Isaac perquè tenen la gràcia i la tendresa dels seus pares i a més són molt més guapos.

La supervivència diària per realitzar aquesta tesi ha estat possible en part, gràcies a una beca FPI-MEC (AP96) concedida pel Ministerio de Educación y Ciencia. Les estades en centres europeus s'han finançat amb la borsa de viatge de la mateixa beca i amb una acció integrada Hispano-Italiana.

Índex.....	i
Abreviatures.....	iii
Pròleg.....	v
1.- Introducció.....	1
1.1 Fosforilació de proteïnes.....	1
1.2 Caseïna quinases.....	3
1.3 Proteïna quinasa CK2.....	4
1.3.1 Característiques generals.....	4
1.3.2 La subunitat catalítica o CK2 α	5
1.3.3 La subunitat reguladora o CK2 β	12
1.3.4 La formació de l'heterotetràmer $\alpha_2\beta_2$	14
1.3.5 Activadors i Inhibidors de CK2.....	16
1.3.6 Localització subcel·lular.....	18
1.3.7 Substrats i <i>Partners</i> de CK2.....	18
1.4 Reticle endoplàsmic i plegament de proteïnes.....	24
1.5 Xaperones o proteïnes d'estrès de 90 kDa.....	26
1.5.1 hsp90.....	27
1.5.2 grp94.....	30
1.5.2.1 Estructura gènica.....	31
1.5.2.2 Estructura molecular.....	32
1.5.2.3 Modificacions post-traduccionals.....	34
1.5.2.4 Localització subcel·lular.....	34
1.5.2.5 Activitat xaperona i unió de pèptids.....	35
1.5.2.6 Condicions d'estrès que indueixen la síntesi de grp94.....	37
1.5.2.7 Resposta a proteïnes desplegadas (UPR).....	38
1.5.2.8 Control de qualitat al RE.....	41
2.- Objectius.....	43

3.- Resultats

Treball I. <i>Protein kinase CK2 is altered in insulin-resistant genetically obese (fa/fa) rats.</i>	46
Treball II. <i>The C-terminal domain of human grp94 protects the catalytic subunit of protein kinase CK2 (CK2α) against thermal aggregation. Role of disulphide bonds.</i>	52
Apèndix I. Estudis de Microscòpia electrònica.....	61
Apèndix II. Estudis d'agregació amb Citrat sintasa.....	67
Apèndix III. Estudis de MALDI/TOFMS	72
Treball III. <i>The carboxy-terminal domain of grp94 binds to protein kinase CK2α but not to CK2 holoenzyme.</i>	79
Apèndix IV. Surface plasmon resonance (SPR)	86
Apèndix V. Estudis d'interacció per Far-Western i pull down	93

4.- Discussió general i conclusions

4.1. Discussió general	98
4.2 Conclusions	108

5.- Bibliografia

110

*Fotografia de la portada elaborada per Manuel Villena.



ABREVIATURES

AA	aminoàcid
ATP	adenosina 5'-trifosfat
BCIP	5-bromo-4-cloro-indolil fosfat
BSA	albúmina sèrica bovina
CDK	quinasa depenent de ciclina
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CK1	caseïna quinasa 1 o proteïna quinasa CK1
CK2	caseïna quinasa 2 o proteïna quinasa CK2
CK2 α	subunitat α de la proteïna quinasa CK2
CK2 α'	subunitat α' de la proteïna quinasa CK2
CK2 α''	subunitat α'' de la proteïna quinasa CK2
CK2 β	subunitat β de la proteïna quinasa CK2
CoA	coenzima A
cpm	comptes per minut
CS	citrat sintasa
C-terminal	regió aminoacídica de l'extrem carboxiterminal d'una proteïna
DEAE	dietilaminoetil
DNA	àcid desoxiribonucleic
DTNB	ditio-1,4-àcid nitrobenzoic
DTT	ditiotreitòl
ϵ	coeficient d'extinció molar
EC	sigles d' <i>Enzyme Commission</i>
EDTA	àcid etilendiaminotetracètic
EGTA	etilenglicol bis(β -aminoetil éter) N,N,N',N'-tetracetat
eIF	factor d'iniciació eucariòtic
endo H	endoglicosidasa H
et al.	et alter (i col·laboradors)
folding	terme anglès per designar plegament de proteïnes
grp94	<i>glucose regulated protein</i> de 94 kDa (també gp96 o endoplasmína)
grp78	<i>glucose regulated protein</i> de 78 kDa (també BiP)
GTP	guanosina 5'-trifosfat
HS1	<i>hematopoietic lineage cell specific protein 1</i>
hsp90	heat shock protein de 90 kDa
hsp70	heat shock protein de 70 kDa
Ig	immunoglobulines
K _a	constant d'associació
K _d	constant de dissociació
K _D	constant d'equilibri de dissociació
K _m	constant de Michaelis-Menten
MET	microscopi electrònic de transmissió
mRNA	àcid ribonucleic missatger

NAP	<i>nucleosome assembly proteins</i>
NBT	nitroblau de tetrazolium
NLS	<i>nuclear localization sequence</i>
N-terminal	regió aminoacídica de l'extrem amí-terminal d'una proteïna
OAA	àcid oxalacètic
O/N	<i>overnight</i> (tota la nit)
PAGE	gels electroforètics de poliacrilamida
PBS	solució salina amb amortidor fosfat
p.ex.	per exemple
PKA	proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic
PMSF	fluorur de fenilmetilsulfonil
PVDF	<i>polivinylidene difluoride</i>
RE	reticle endoplasmàtic
RNasa	ribonucleasa
rpm	revolucions per minut
RU	unitats de ressonància
SDS	dodecilsulfat sòdic
TBS	solució salina amb amortidor Tris
TCA	àcid tricloroacètic
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletildiamina
Tris/HCl	hidroclorur de tris(hidroximetil)aminoetà
wt	tipus salvatge

PRÒLEG

El present treball s'inclou dins un projecte ampli que tracta d'esbrinar en quins processos cel·lulars exerceix la seva funció la proteïna quinasa CK2 i com es regula l'activitat de CK2 en resposta a una situació cel·lular concreta (proliferació, estrès, situacions patològiques, etc.). En el cas particular d'aquest treball, l'estudi s'ha centrat en un substrat de CK2 implicat en la protecció de la cèl·lula enfront d'estrès i que degut a la seva localització i possible funció ens permetia enfocar l'estudi de la CK2 des d'un punt de vista diferent i pensant en que la possible interacció entre ambdues proteïnes podia ser una forma de regulació de CK2 per posicionament. Alhora eren poques les dades estructurals i funcionals disponibles sobre grp94 i per tant l'estudi implicava també una caracterització bioquímica de grp94.

L'escriptura de la tesi s'ha estructurat al voltant dels treballs que se n'han derivat, però intentant aportar informació extra que permeti una visió més global del tema. Aquesta informació es presenta en forma d'**introducció i discussió generals** que proporcionen una visió de conjunt sobre el que s'ha fet i integrant la informació nova en el conjunt de dades científiques disponibles. A banda dels articles publicats s'adjunten, en forma d'**apèndixs**, dades experimentals o metodològiques que ens semblaven interessants o que ens semblava que valia la pena tenir recollides en un format apte per consultar. També s'inclou un breu **resum de cada treball** amb una descripció dels resultats obtinguts i de les conclusions a les que s'ha arribat. Els articles s'adjunten en el format original de publicació mentre que tota la resta d'informació s'adjunta en un format diferent intentant però, mantenir la coherència al llarg de tota la presentació.