

### **3. La proteïna quinasa CK2.**

#### **3. 1. Introducció**

La proteïna quinasa CK2<sup>1</sup> és un enzim ubiqüo i altament conservat durant l'evolució que va ser descrit per primera vegada fa gairebé 50 anys (Burnet and Kennedy, 1954) i des de llavors ha sigut una de les proteïnes més estudiades i s'ha trobat a pràcticament tots els compartiments de totes les cèl.lules eucariotes examinades (Revisions exhaustives sobre CK2: Pinna, 1990; Tazon and Traugh, 1991; Allende and Allende, 1995; Guerra and Issinger, 1999; Guerra et al., 1999; Faust and Montenarh, 2000; Tawfic et al., 2001).

Es caracteritza per ser una de les poques quinases capaces d'utilitzar tant ATP com GTP com a donador de fosfats, la seva activitat s'estimula per efectors polibàsics (espermina, polilisina) i s'inhibeix per compostos aniònics com heparina, pèptids acídics com 2,3-bifosfoglicerat i derivats del benzimidazol com 5,6-diclor-1-( $\beta$ -D ribofuranosil) benzimidazol (DRB). Contràriament a altres serina/ treonina quinases descrites, la CK2 presenta preferència per substrats acídics que fosforila en serina o treonina situades preferentment en entorns acídics d'acord amb la seqüència consens S/T-XX-D/E, (a on X correspon a aminoàcid no bàsic). Tot i ser considerada durant anys una serina/ treonina quinasa, podria tenir especificitat dual ja que se li ha atribuït també activitat tirosina quinasa (Wilson et al., 1997; Marin et al., 1999).

És remarcable també la seva alta inespecificitat, ja que s'ha vist que pot fosforilar *in vitro* més de 160 substrats involucrats en molts processos cel.lulars, que han fet especular sobre la funció de CK2 en càncer i proliferació cel.lular (Seldin and Leder, 1995), control transcripcional (Lüscher et al., 1990), o cicle cel.lular (Hanna et al., 1995) entre molts d'altres. Paradoxalment, es desconeix el mecanisme de regulació de la CK2: no respon a segons missatgers i la seva funció biològica no està determinada. No obstant, la seva presència ubiqüa des de protozoous fins a humans, l'alt grau de conservació que presenta entre espècies i l'alt nombre de processos en que està involucrada, indica que aquest enzim té un paper fonamental dins la cèl.lula.

---

<sup>1</sup> La proteïna quinasa CK2: també anomenada caseïna quinasa II, CKII o CK2. Es va deixar de utilitzar el nom de caseïna quinasa ja que la caseïna no és un substrat fisiològic de la CK2.

### 3.2 Estructura molecular de la proteïna quinasa CK2.

L'holoenzim CK2 és un heterotetràmer d'aproximadament 130 kDa, format per dos tipus de subunitats, les catalítiques CK2 $\alpha$  (42-44 kDa) i CK2 $\alpha'$  (38 kDa) i les reguladores CK2 $\beta$  (28-41 kDa), en diferents combinacions:  $\alpha_2\beta_2$ ,  $\alpha\alpha'\beta_2$ ,  $\alpha'_2\beta_2$

#### 3.2.1 Les subunitats catalítiques CK2 $\alpha/\alpha'$ .

Les subunitats CK2 $\alpha/\alpha'$  pertanyen a la superfamília de proteïnes quinases eucariotes i dins d'ella al grup CMGC. Estan molt conservades entre espècies i presenten homologia amb el grup de les proteïnes quinases cdc2. Presenten una identitat a nivell de seqüència proteica del 86%, però CK2 $\alpha'$  és 41 residus més curta que CK2 $\alpha$  en el seu extrem carboxi terminal i no mostren cap homologia entre elles en els seus últims 18 residus. Les subunitats CK2 $\alpha$  s'ha descrit a tots els organismes estudiats mentre que les CK2 $\alpha'$  no s'ha descrit a *Dictiostelium discoideum* ni a *Xenopus laevis*. Les subunitats CK2 $\alpha/\alpha'$  són constitutivament actives i estan codificades per gens diferents localitzats en diferents cromosomes (Litchfield et al., 1990). Es postula que poden tenir diferents funcions dins la cèl.lula (Vilk et al., 1999; Xu et al., 1999; Litchfield et al., 2001). S'ha descrit que la unió de DNA a les subunitats CK2 $\alpha$  pot inhibir la seva activitat (Gatica et al., 1995). Diferents estudis a nivell del promotor de CK2 $\alpha$  demostren el caràcter "housekeeping" d'aquest gen (Wirkner et al., 1998; Miró et al., 1999).

Les subunitats CK2 $\alpha/\alpha'$  humanes presenten els 12 subdominis característics de totes les subunitats catalítiques. (un alineament entre CK2 $\alpha/\alpha'$  humanes i diverses CK2 $\alpha$  de plantes es representa a l'apartat 3.6.1). Al subdomini I es troba el lloc d'unió a co-substrat (ATP/GTP), als subdominis II-III presenta un "cluster" ric en lisines, responsable de la interacció amb les zones àcides dels substrats i amb els components aniónics que li afecten l'activitat, com la heparina. També en aquesta zona es troba una seqüència de localització nuclear (NLS) responsable de la translocació a nucli. Presenten un lloc d'autofosforilació (T<sub>125</sub>) tot i que es una autofosforilació molt dèbil que augmenta quan l'holoenzim està reconstituit i en presència de compostos policatiónics (Boldyreff et al., 1994). En humans, CK2 $\alpha$  pot ser fosforilada per p34<sup>cdc2</sup> al seu extrem carboxi terminal (Litchfield et al., 1992; Bosc et al., 1995). Aquesta possible regulació per fosforilació dependent del cicle cel.lular seria

diferent entre CK2 $\alpha$  i CK2 $\alpha'$ , ja que CK2 $\alpha'$  no conte aquests llocs de fosforilació per p34<sup>cdc2</sup>, així com tampoc les subunitats CK2 $\alpha$  d'altres organismes com *Xenopus*, *Drosophila*, llevat o plantes.

Fins al moment degut a la seva alta inestabilitat, les subunitats CK2 $\alpha$  animals no han pogut ser cristal·litzades individualment, la única subunitat catalítica CK2 cristal·litzada correspon a la de blat de moro (apartat 3.6.1). Recentment però, la cristal·lització de l'holoenzim CK2 humà ha permès conèixer l'estructura de les subunitats CK2 $\alpha$  humanes, tot i que parcials (els hi manquen 5 kDa de l'extrem carboxi terminal) i ha aportat les dades que mancaven en el coneixement de l'estructura d'aquest enzim (apartat 3.2.3)

### 3.2.2 Les subunitats reguladores CK2 $\beta$ .

Les subunitats reguladores CK2 $\beta$  no presenten homologia amb cap altre proteïna coneguda excepte *Stellate* de *D.melanogaster*. La homologia entre les CK2 $\beta$  de diferents espècies no és tan gran com en el cas de les subunitats CK2 $\alpha$ , fins al moment d'iniciar aquesta tesi no s'havia descrit presència de CK2 $\beta$  ni en *Dictyostelium* ni en *Zea mays*. A la majoria dels organismes s'ha descrit un únic gen per la subunitat CK2 $\beta$  excepte alguns com *Saccharomyces cerevisiae* a on se n'han descrit dos, (*CKB1* i *CKB2*) (Bidwai et al., 1994). També *Drosophila melanogaster* té dos gens CK2 $\beta$  (Saxena et al., 1987; Bidwai et al., 1999) així com una proteïna  $\beta$ -like codificada pel locus *Stellate* (Livak,1990). A *Arabidopsis thaliana* s'han descrit tres gens CK2 $\beta$  (Collinge and Walker,1994; Sugano et al.,1998) i un quart gen s'ha predit un cop finalitzada la seqüenciació del genoma d' *Arabidopsis*.

A la subunitat CK2 $\beta$  se li atribueixen tres funcions:

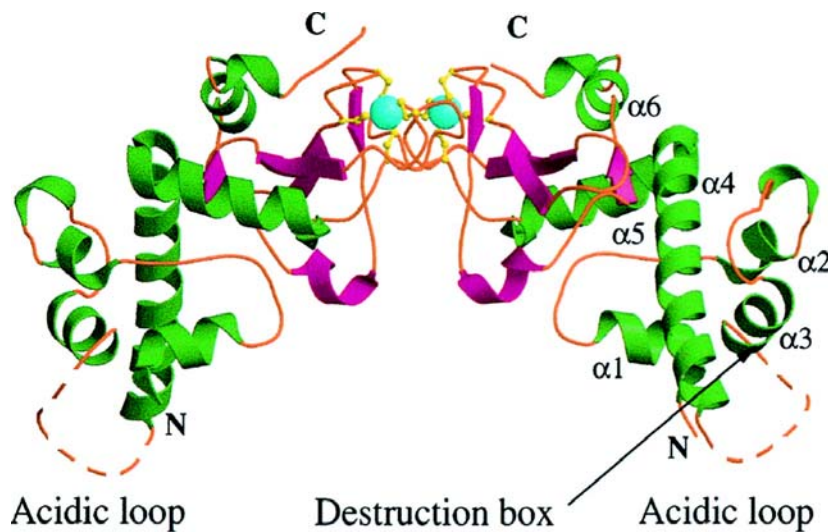
- (a) És **inactiva** per ella mateixa però pot **modular l'activitat** catalítica de CK2 $\alpha$  (Grankowski et al., 1991): en general, la presència de la subunitat CK2 $\beta$  augmenta l'activitat de CK2 $\alpha$ , tot i que en determinats casos succeeix a l'inrevés, per exemple, la subunitat CK2 $\alpha$  lliure és capaç de fosforilar calmodulina mentre que l'holoenzim és incapaç de fer-ho si no és en presència de l'activador polilisina (Bidwai et al., 1993)

- (b) Confereix **estabilitat** a l'holoenzim: la subunitat CK2 $\beta$  li confereix a la subunitat CK2 $\alpha$  una activitat màxima a concentracions fisiològiques de sal i augmenta la seva resistència a agents desnaturalitzants com la urea, el calor i l'acció de proteases com la tripsina (Meggio et al., 1992).
  
- (c) Contribueix a l'**especificitat** d'interacció amb substrats e inhibidors, per exemple, s'ha descrit que CK2 $\beta$  té la capacitat d'interaccionar amb altres proteïnes quinases i regular la seva activitat, com c-Mos (Chen et al., 1997) i A-Raf (Boldyreff and Issinger, 1997).

A nivell estructural, la CK2 $\beta$  humana presenta una regió amino terminal amb una zona anomenada pseudo-substrat, ja que conté dues serines autofosforilables, Ser<sup>2</sup> i Ser<sup>3</sup> (Boldyreff et al., 1993a). També a l'extrem amino terminal trobem una regió àcida ("acidic loop") responsable junt amb la zona pseudo-substrat de la "down-regulation" de l'activitat enzimàtica de la subunitat catalítica CK2 $\alpha/\alpha'$  i de l'activació per compostos polibàsics i poliamines (Leroy et al., 1994). S'ha demostrat que determinades poliamines com la ornitina descarboxilasa poden afectar *in vivo* l'activitat CK2 i la seva translocació del citoplasma al nucli. (Shore et al., 1997). CK2 $\beta$  conté també un element estructural del tipus "destruction box" similar al descrit per ciclins. En les ciclins aquesta seqüència es la responsable de la síntesi i degradació per ubiquitinació en determinades etapes de cicle cel·lular. No obstant, no està clar quina és la funció d'aquesta seqüència en les subunitats CK2 $\beta$ . El motiu estructural característic de les subunitats reguladores està situat a la regió central i presenta quatre cisteïnes conservades estructurades com dit de zinc. A l'extrem carboxi terminal es troba un lloc de fosforilació per p34<sup>cdc2</sup> (Litchfield et al., 1991).

L'estructura terciària de la CK2 $\beta$  humana s'ha cristal·litzat, a 1,7 Å de resolució, en una forma truncada a la que li manquen 33 aminoàcids en el seu extrem carboxi terminal, CK2 $\beta^{\Delta}$  (Chantalat et al., 1999). S'havia descrit que aquests últims 33 aminoàcids de CK2 $\beta$  eren necessaris per la oligomerització de l'holoenzim (Leroy et al., 1999). No obstant, la forma truncada CK2 $\beta^{\Delta}$  presenta la capacitat de interaccionar amb CK2 $\alpha$  tot i que amb menor afinitat que la CK2 $\beta$  *wild-type*. La resolució d'aquesta estructura ha permès demostrar la funcionalitat dels dominis prèviament descrits. El

domini de dit de zinc, que generalment és un domini d'unió a DNA, en aquest cas és el responsable de la dimerització de les subunitats CK2 $\beta$  (Figura 4). Aquest cristall va demostrar per primera vegada la homodimerització d'una proteïna a mitjançant una estructura de dit de zinc. Estudis recents de mutagènesi dirigida d'aquest domini demostren que també està implicat en la interacció amb les subunitats catalítiques (Canton et al., 2001). A més, l'estructura tridimensional del dímer demostra que les dues zones àcides implicades en la modulació de l'activitat catalítica, queden als extrems de la molècula com a possibles llocs accessibles per unió de poliamines o altres "partners" de CK2 $\beta$ .



**Figura 4: Representació esquemàtica de l'estructura dimèrica CK2 $\beta^{\Delta}$ -CK2 $\beta^{\Delta}$ .** Les fulles- $\beta$  estan representades en rosa, les hèlix- $\alpha$  en verd, els àtoms de zinc en blau i les cisteïnes en groc.

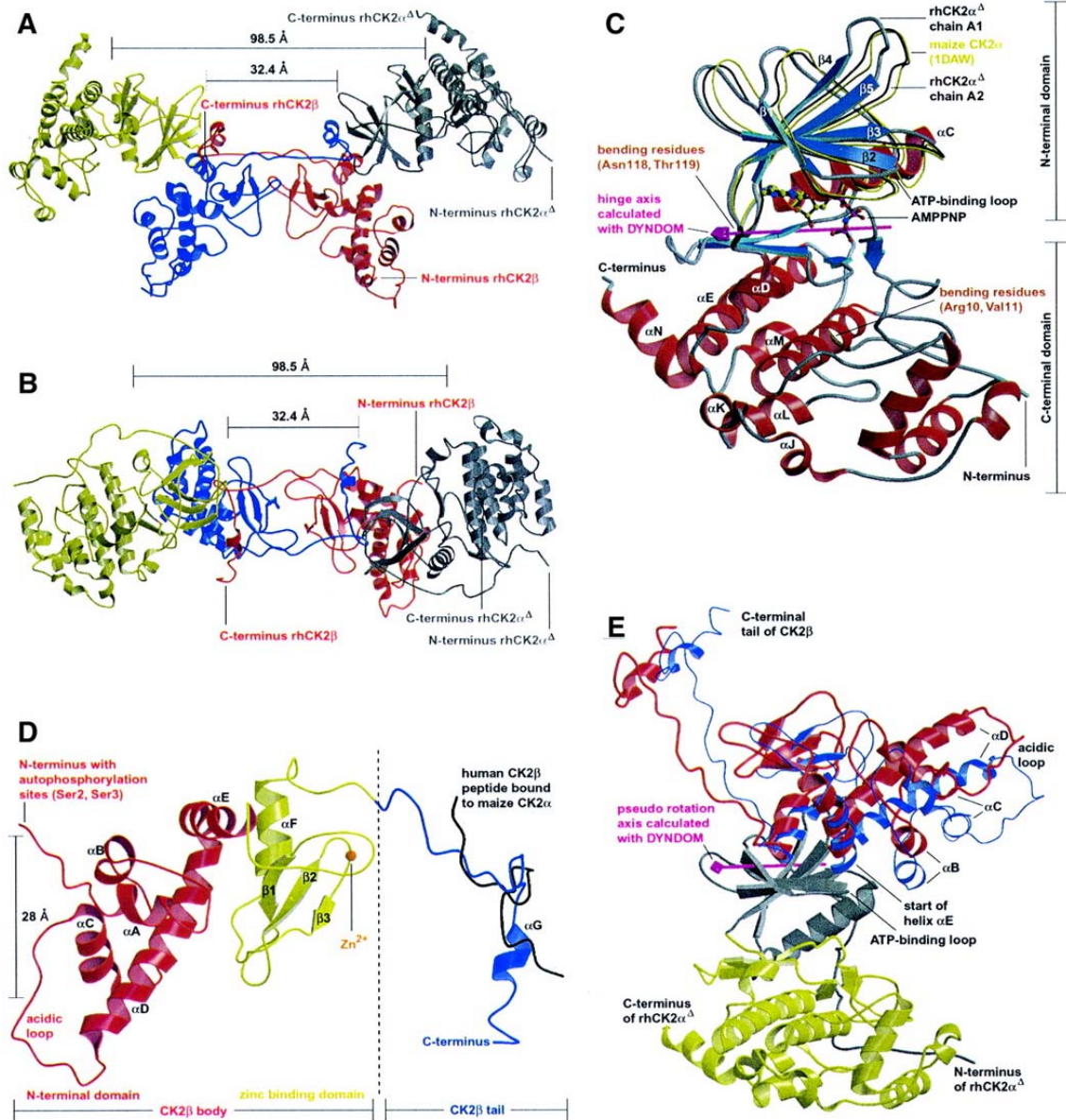
### 3.2.3 L'holoenzim CK2.

S'ha demostrat que l'holoenzim CK2 en la seva forma tetramèrica és extremadament estable, ja que *in vitro* només pot ser dissociat en condicions desnaturalitzants (Grankowski et al., 1991). Es desconeix si *in vivo* aquesta dissociació es dona una vegada l'holoenzim està format. Actualment es pensa que les subunitats individuals poden existir *in vivo* a la cèl.lula i que tindrien funcions diferents de les de l'holoenzim (Pinna and Meggio, 1997). També s'ha determinat que les subunitats reguladores CK2 $\beta$  es sintetitzen en excés respecte a les subunitats catalítiques CK2 $\alpha$  i formen dímers CK2 $\beta$ -CK2 $\beta$  que precedeixen a la formació de l'holoenzim (Luscher and Litchfield, 1994). A més, s'han descrit dímers CK2 $\beta$ -CK2 $\beta$  en cèl.lules de mamífer

en absència de subunitats catalítiques (Graham and Litchfield, 2000). Per tant, la identificació de proteïnes que interaccionen específicament amb una o altre subunitat pot ser essencial per entendre la regulació de l'enzim.

Les contradiccions en torn a l'estructura de l'holoenzim han quedat finalment clarificades gràcies a la recent cristal·lització de l'holoenzim CK2 humà, a 3.1 Å de resolució (Niefind et al., 2001). L'estructura cristal·litzada, rhCK2<sup>Δ</sup>, presenta una degradació parcial, d'uns 5 kDa, de l'extrem carboxi terminal de les dues subunitats CK2 $\alpha$ . La figura 5 mostra diferents aspectes de l'estructura del tetràmer. L'holoenzim presenta forma de papallona (Figura 5 A,B). S'observa que les dues subunitats reguladores del tetràmer formen un homodímer CK2 $\beta$ -CK2 $\beta$  que queda a la part central de la molècula separant les dues subunitats CK2 $\alpha$ , situades als extrems i que per tant, no poden interaccionar entre sí. Aquests resultats corroboren dades prèvies en es demostrava, a partir del sistema del doble híbrid, que les subunitats CK2 $\alpha$  podien interaccionar amb les CK2 $\beta$  però no entre elles, mentre que les CK2 $\beta$  sí que eren capaces de homodimeritzar (Gietz et al., 1995; Kusk et al., 1998). L'estructura de les subunitats CK2 $\alpha$  humanes, que es mostra a la figura 5C, és molt semblant a la descrita per la única CK2 $\alpha$  prèviament cristal·litzada, la CK2 $\alpha$  de blat de moro (Niefind et al., 1998). Les subunitats reguladores es poden dividir en dos zones: el domini format per l'extrem amino terminal i el dit de zinc ("CK2 $\beta$  body"), descrit per Chantalat et al., (1999) i l'extrem carboxi terminal ("CK2 $\beta$  tail") que no havia estat cristal·litzat prèviament (Figura 5D). Cada domini "CK2 $\beta$ -tail" forma un angle de 90° respecte al seu "CK2 $\beta$ -body" amb el que no interacciona. No obstant, el domini "CK2 $\beta$ -tail" sí que interacciona amb l'altre subunitat CK2 $\beta$  i amb la subunitat CK2 $\alpha$  que li queda més allunyada físicament. Així, cada subunitat CK2 $\alpha$  interacciona amb les dues subunitats CK2 $\beta$ , predominantment via el domini "CK2 $\beta$ -tail" de les subunitats reguladores i l'extrem amino terminal (fulla- $\beta$ ) de les subunitats catalítiques (Figura 5A). L'estructura en fulla- $\beta$  de l'extrem amino terminal de les subunitats catalítiques que interacciona amb les subunitats CK2 $\beta$  està molt conservada entre totes les proteïnes quinases eucariotes. Això podria explicar perquè les subunitats CK2 $\beta$  són capaces de interaccionar i modular l'activitat d'altres proteïnes quinases, com c-Mos (Chen et al. 1997) i A-Raf (Boldyreff and Issinger, 1997). Finalment, les dades obtingudes respecte a la flexibilitat entre subunitats (Figura 5D) suggereix que l'holoenzim és un heterocomplexe transitori, que es forma i es dissocia *in vivo* per determinades raons

funcionals i reguladores. En quan a l'estructura quaternària de l'enzim, s'han descrit múltiples estats oligomèrics de la CK2 depenent de la força iònica del medi en que es troba (Valero et al., 1995)



**Figura 5: Diferents aspectes de l'estructura de rhCK2 $\Delta$ (A i B)** Estructura tetramèrica de l'holoenzim. Les subunitats CK2 $\alpha$  es representen en verd i gris i les CK2 $\beta$  en vermell i blau. **(C)** Estructura de la subunitat CK2 $\alpha^{\Delta}$  : domini N-terminal en blau i domini C-terminal en vermell **(D)** Estructura de la subunitat CK2 $\beta$ . Domini N-terminal en vermell, dit de zinc en verd i domini C-terminal en blau. **(E)** Flexibilitat entre subunitats en el contacte  $\alpha/\beta$ . Subunitat CK2 $\alpha$ : domini N-terminal en gris i domini C-terminal en verd. Subunitat CK2 $\beta$ : CK2 $\beta$ -tail en blau i CK2 $\beta$ -body en vermell.